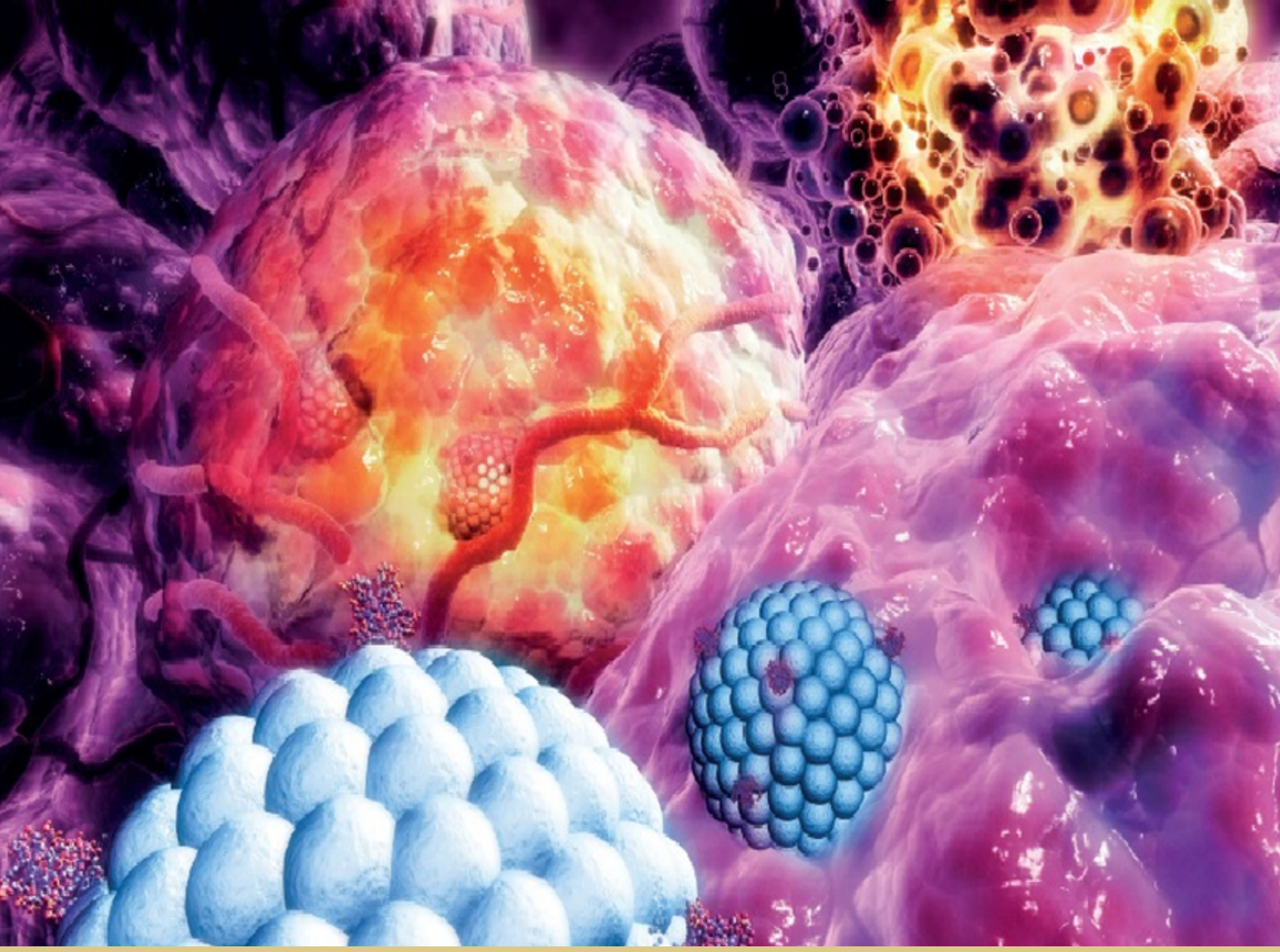


Eva Fabiana Silva Pereira

LIOFILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PARA APLICAÇÃO DE PRODUTOS INOVADORES EM ONCOLOGIA

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica sob orientação da Dra. Vera Dantas Moura e Dr. João Nuno Moreira, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2015

· U C ·

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eva Fabiana Silva Pereira

LIOFILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PARA APLICAÇÃO DE PRODUTOS INOVADORES EM ONCOLOGIA

COIMBRA 2015

"Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas."

Carl Sagan

Agradecimentos

Este espaço destina-se a agradecer a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho. O alcance do sucesso não é atingido simplesmente pelo trabalho individual e por esse motivo sinto uma enorme gratidão por todas aquelas pessoas, que de alguma maneira, conseguiram prestar auxílio e que me encheram de força em todos os momentos que mais precisei. Para expressar o meu sentimento quero agradecer, em particular:

À Doutora Vera Dantas Moura, CEO da TREAT U, orientadora desta dissertação, por toda a disponibilidade, dedicação, apoio, compreensão ao longo do trabalho e principalmente por estar sempre presente na orientação desta dissertação. Tenho-lhe a agradecer o fato de se ter disponibilizado para partilharmos conhecimentos e por me ter dado o prazer de concretizar este trabalho em parceria com a TREAT U.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por se ter disponibilizado para orientar esta dissertação.

Às minhas amigas do coração, Cátia Piedade, Rita Lourenço, que apesar de estarem longe, estão muito presentes na minha vida e que guardo com muita saudade todos os momentos que vivenciamos juntas. As memórias que ficaram vão ser para sempre inesquecíveis e sinto um grande orgulho em ter amizades destas.

À Joana Rosa e Joana Sequeira, amigas de licenciatura, que me acompanharam durante muito tempo e que me fizeram passar por muitas alegrias, vocês estão marcadas na minha vida.

À minha irmã, Mariana Pereira, que apesar das nossas divergências, mostrou sempre disponível para me ajudar a contornar todos os obstáculos que foram surgindo.

Ao meu avô, que apesar do seu estado de saúde, transmite-me muita força e que me faz acreditar nos meus sonhos. Apesar desta fase menos boa, quero-te agradecer imenso por todos os conhecimentos e por me acompanhares em todas as fases da minha vida

À minha grande mãe, por todo o esforço que faz para tornar possível a realização dos meus desejos, por todos os valores que me transmitiu, por toda a preocupação que tem comigo e

que me faz sentir uma pessoa especial. Agradeço-te todo o apoio incondicional que me deste pois sem ti e o pai nada disto seria possível. Devo-te a ti o ser humano que sou.

Ao meu pai, por ser um homem muito lutador e cheio de garra, que se esforça todos os dias para que nada me possa faltar. Não tenho como te agradecer tudo o que fizeste por mim.

Ao meu namorado, por depositar toda a confiança em mim e por ser a minha fonte de inspiração. Agradeço-te do fundo do coração toda a força que me tens dado e todos os momentos que me tens oferecido. És um exemplo a seguir, o meu profundo obrigado.

Não posso deixar de referir as pessoas que têm estado presentes na minha vida nos últimos anos, e que me tem proporcionado momentos muito agradáveis e que me trazem muita nostalgia. Bruno e Denise, companheiros de longa data, sinto um enorme carinho por vós.

A toda a família, por me acompanharem ao longo de todo o meu percurso e por todas as palavras de carinho que foi recebendo.

Índice

Capítulo 1 1
1. Enquadramento teórico 1
1.1 Nanopartículas 1
1.2 Problemática das terapias convencionais para o cancro 2
1.2.1 Barreiras fisiológicas que condicionam a libertação do fármaco no tecido tumoral 3
1.2.2 Estratégias - Nanomedicinas terapêuticas 6
1.2.3 Vantagens do uso de nanopartículas na entrega de moléculas antineoplásicas 8
1.3 Tipos de nanopartículas utilizadas na libertação controlada de fármacos 9
Capítulo 2 17
2. Estabilidade das nanopartículas farmacêuticas 17
Capítulo 3 29
3. Princípio do processo de liofilização 29
Capítulo 4 32
4. Processo de liofilização 32
4.1 Etapas envolvidas 33
4.2 Fatores que afetam a taxa do processo de liofilização 39
4.3 Impacto do recipiente e tampa no processo de liofilização 42
4.4 Otimização do processo de liofilização 46
4.5 Aplicações farmacêuticas da liofilização 56
4.6 Pros e contras deste processo 57
Capítulo 5 59
5. Métodos utilizados na liofilização 59
5.1 Método *Manifold* 59
5.2 Método *Batch* 60
5.3 Método *Bulk* 60
Capítulo 6 62
6. Nanopartículas liofilizadas 62
6.1 Importância da formulação 62
6.2 Influência de diferentes crioprotetores e lioprotetores 63
6.2.1 Influência dos diferentes agentes estabilizantes 67
6.3 Aspetos de armazenamento 77
6.4 Caraterísticas de uma liofilização desejada 78
6.5 Motivos inerentes à obtenção de nanopartículas liofilizadas 78
Capítulo 7 81
7. Requisitos normativos do processo de liofilização segundo as boas Práticas Laboratoriais e de Fabrico 81
Capítulo 8 93
8. Nanopartículas liofilizadas com aplicação em Oncologia 93
8.2 Produtos em ensaios clínicos 100
8.3 Produtos em fase de desenvolvimento pré – clínico 109
8.4 Patentes de produtos liofilizados 111
Conclusão 115
Referências 117

Resumo

Este trabalho abrange uma revisão do estado de arte do processo de liofilização e da sua aplicação na área da Nanotecnologia. O foco principal desta revisão é a caracterização dos produtos liofilizados inovadores existentes no mercado e em fase de desenvolvimento clínico, com aplicação em Oncologia.

Na área farmacêutica, a exploração das propriedades únicas das nanopartículas tornou-se diferenciadora pela demonstração de efeitos na biodisponibilidade de moléculas ativas e também na proteção contra a degradação enzimática. Mais recentemente, as nanopartículas têm sido usadas para proporcionar um aumento da especificidade e efetividade no direcionamento dos fármacos aos locais alvo, permitindo a diminuição da dose eficaz e da toxicidade geral. Com tudo isto, o desenvolvimento de nanoestruturas para transporte de fármacos tem sido objeto de um interesse crescente, tendo em vista colmatar alguns pontos negativos existentes nos sistemas de dosagem tradicionais.

No entanto, a estabilidade das nanopartículas pode constituir um problema, pelo que a sua concepção não é propriamente linear. No caso específico das nanodispersões coloidais, fatores físicos e químicos contribuem para uma baixa estabilidade a longo termo, provocando a destabilização do sistema que limita a sua aplicação clínica.

A liofilização surge neste cenário como um processo tecnológico que pode minimizar os problemas de estabilidade das suspensões aquosas de nanopartículas. Trata-se de uma técnica de desidratação muito eficiente quando comparada com as demais, que tem vindo a apresentar melhorias na estabilidade destas suspensões coloidais, e por esta razão merece destaque. Cada produto possui um ciclo de liofilização único em função das suas particularidades, o que faz com que este processo seja uma operação unitária. Para ser percetível a forma como o processo de liofilização é executado cumprindo as boas práticas laboratoriais (BPL/*GLP*) e de fabrico (BPF/*GMP*) são explícitos, neste estudo, os requisitos normativos a ter em conta.

A liofilização, além de ser útil ao nível da estabilidade, é ainda utilizada para outras finalidades que estão descritas no estudo. De forma a elucidar toda a operação envolvida neste processo é feita uma breve abordagem das etapas envolvidas, dos métodos utilizados, das

aplicações farmacêuticas e dos principais pros e contras, com o intuito de entender a importância da formulação de nanopartículas liofilizadas.

Será ainda dedicado um capítulo ao estudo dos componentes e das condições do processo para conseguir obter resistência às tensões a que as suspensões de nanopartículas são submetidas durante a fase de congelamento na liofilização. Nesta fase, o efeito crioprotetor ou lioprotetor é determinante, dado que na reidratação do produto é mandatório que as propriedades originais das nanopartículas sejam mantidas.

A respeito dos avanços recentes com aplicação deste processo, são ainda apresentadas as formulações liofilizadas que estão inseridas no mercado e os ensaios clínicos e pré-clínicos existentes para o tratamento de doenças do foro oncológico, com referência aos produtos protegidos por patente.

A relevância deste trabalho traduz-se no facto de o resultado da pesquisa ser orientado em ambiente empresarial e académico, com vista à inserção no processo de valorização da propriedade intelectual de uma *spin-off* da Universidade de Coimbra.

Palavras chave: Nanopartículas liofilizadas; Liofilização; Oncologia; Estabilidade; BPL; BPF.

Abstract

This work aims at conducting a review of the state of art of the lyophilization process and its application in the field of Nanotechnology. The main focus is the characterization of existing innovative freeze-dried products on the market and in clinical evaluation, with applications in Oncology.

In the pharmaceutical area, the unique properties of nanoparticles began to demonstrate positive effects on the bioavailability of active molecules and also in protecting against enzymatic degradation. More recently, nanoparticles have been used to provide increased specificity and effectiveness in the targeting of drugs to specific locations, thereby reducing the effective dose and toxicity. With all this, the development of nanostructures for drug delivery has provided the solution for existing weaknesses in traditional dosing systems.

However, the stability of the nanoparticles is not exactly a linear topic. In the case of colloidal nanodispersions, physical and chemical factors contribute to a low long term stability, leading to destabilization of the system and thus creating an obstacle to its clinical application.

Lyophilization in this scenario appears as a technological process that can minimize stability problems of aqueous suspensions of nanoparticles. It is a very efficient dewatering technique, which has been presenting improvements in the stability of these colloidal suspensions, and therefore noteworthy. Each product has a single lyophilization cycle on the basis of their features, which makes this process a unitary operation. To be noticeable how the freeze-drying process is performed in compliance with the good laboratory practice (BPL/GLP) and manufacturing practice (BPF/GMP), the regulatory requirements to be considered are explicit in this study.

This technique, besides being useful for stability issues, it is still used for other purposes which are described in the study. In order to elucidate the entire operation involved in this process, it is made a brief approach of the steps involved, the methods used, the pharmaceutical applications and the main pros and cons of the formulation of lyophilized nanoparticles.

The study also comprises a chapter on the components and process conditions to achieve resistance to the stresses to which the nanoparticulate suspensions are subjected during the

freezing stage of the lyophilization. At this stage, the cryoprotectant or lioprotetor effect is decisive for the rehydration, in order to preserve that the original properties of the nanoparticles.

Regarding the recent advances in the application of this process, this study presents the most recent lyophilized formulations on the market and in clinical and preclinical trials for the treatment of oncological diseases, with reference to the proprietary products.

The main conclusions of this work will be included in the valuing process of the intellectual property of a spin-off from the University of Coimbra, combining an academic and business perspective on a pharmaceutical process of industrial application.

Keywords: Nanoparticles freeze-dried; Lyophilization; Oncology; Stability; GLP; GMP.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

BPF/*GMP* – Boas Práticas de Fabrico, *Good Laboratory Practices*

BPL/*GLP* – Boas Práticas Laboratoriais, *Good Manufacturing Practices*

CDI - *N'-carbonyldiimidazole*

CIP – *Clean in Place*

DAB - Poli (propileno-imina)

Dm/dt – Taxa de transferência de massa

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSC – *Differential Scanning Calorimetry*

EMA – Agência Europeia de Medicamento

FDA – *Food and Drug Administration*

FRET – Transferência Ressonante de Energia por Fluorescência

GAH – Fragmento de um anticorpo monoclonal

HEPA – *Hight Efficienty Particulate Air*

HDL – Lipoproteínas de alta densidade

HCL – Ácido clorídrico

HPMA – (Hidroxipropil) meta-acrilamida

ICH – Conferência Internacional sobre Harmonização

ISSO – *Internacional Organization for standardization*

LT-FDM – *Light Transmission Freeze-Dry Microscopy*

MPEG - Metoxopolietileno

MTX - Metotrexano

NSCLS – Cancro do pulmão de células não-pequenas

OCT- FDM – *Optical Coherence Tomography – Freeze-Dry Microscopy*

PAMAM - Poli (amidoamina)

PAT – Process Analytical Technology

pc – pressão da câmara

PCL – Poli (caprolactona)

PC:CH:SA – Fosfatidilcolina:colesterol:estearilamida

PEG - Polietilenoglicol

PEHAM – Poli (éter-hidroxilamina)

PEO – Óxido de etileno

PGA – Ácido poli (glutâmico)

PI – Índice de polidispersão

PLA – Poli (ácido láctico)

PLGA – Ácido poli (láctico-co-glicólico)

PMM 212 – Poli (metileno malonato 212)

P_0 – pressão de vapor de água em equilíbrio

QI- Qualificação da instalação

QO – Qualificação da operação

QP – Qualificação da performance

r – localização

RAMEB – B-ciclodextrina metilada

RNA – Ácido ribonucleico

Rp – Resistência da camada seca do produto

Rs – Resistência da tampa

SCLC – Cancro do pulmão de células pequenas

SIP – *Sterilization in Place*

t - Tempo

T - Temperatura

Tg – Temperatura de transição vítrea

ts – Temperatura de prateleira

TLDA – *Tunable diode laser absortion spectroscopy*

V – Taxa de arrefecimento do produto

VHP - *Vaporized Hydrogen Peroxide*

VT – energia potencial de interação entre as nanopartículas

Vmax – valor (barreira) que influência a estabilidade de um sistema nanoparticulado

Lista de Figuras

Figura 1 – Evolução dos nanosistemas aceites pela FDA para aplicação médica.

Figura 2 – Terapias convencionais para o cancro.

Figura 3 – Ilustração da vasculatura existente em tecidos normais e tumorais.

Figura 4 – Barreiras e estratégias no tratamento quimioterapêutico.

Figura 5 – Representação esquemática do efeito de permeabilidade aumentada em tecido tumoral e normal.

Figura 6- Vantagens dos sistemas nanomedicinais.

Figura 7 – Tipos de nanopartículas com aplicação terapêutica.

Figura 8 – Representação de um lipossoma e uma micela.

Figura 9 – Representação de micelas.

Figura 10 – Representação de um lipossoma (A) e uma nanopartícula lipídica sólida (B).

Figura 11 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.

Figura 12 – Estrutura geral das ciclodextrinas.

Figura 13 – Instabilidade físico-química das nanosuspensões coloidais e estratégias para alcançar a estabilização do sistema.

Figura 14 – Representação do processo de sedimentação versus *creaming*.

Figura 15 – Comportamento de sedimentação de nanosuspensões defloculadas e floculadas.

Figura 16 – Caraterísticas de uma sedimentação coagulada e floculada bem como aquela que seria desejável.

Figura 17 – Energia versus Tamanho da nanopartícula (quanto menor for a nanopartícula maior será a sua energia superficial).

Figura 18 – Energia potencial total versus Distância entre as partículas.

Figura 19 – Representação dos mecanismos de estabilização.

Figura 20 – Representação do Amadurecimento de ostwald.

Figura 21 – Diagrama de fases.

Figura 22 – Representação esquemática de um liofilizador.

Figura 23 – Representação esquemática das fases envolvidas no processo de liofilização.

Figura 24 – Etapas envolvidas na liofilização.

Figura 25 – Esquema que demonstra o conceito de temperatura eutéctica e temperatura de transição vítrea.

Figura 26 – Diagrama representativo do estado cristalino e do estado vítreo.

Figura 27 – Transferência de calor e massa durante a secagem primária.

Figura 28 – Representação dos fenómenos de colapso do produto e *melt-back.*
Figura 29 – Representação do processo de liofilização.
Figura 30 – Representação das várias etapas envolvidas no processo de liofilização.
Figure 31 – Mecanismos de transferência de calor.
Figura 32 – Transferência de calor e massa durante a liofilização.
Figura 33 – Ampolas de vidro usadas no processo de liofilização.
Figura 34 – Frascos tubulares de vidro versus Frascos moldados.
Figura 35 – Seringas de dupla câmara (Genotropin MiniQuick).
Figura 36 – Produto liofilizado num vial de dupla câmara (Act-O-Vial).
Figura 37 – Cartucho de dupla câmara (Genotropin).
Figura 38 – Seringa SWFI.
Figura 39 – Lyoguard® utilizado num processo de liofilização.
Figura 40 – Ilustração de um frasco fechado parcialmente versus fechado completamente.
Figura 41 – Solidificação com a nucleação dos cristais de gelo controlada. A imagem da esquerda representa uma solidificação com um baixo grau de *supercooling*, e a da direita, representa uma solidificação com um alto grau de *supercooling.*
Figura 42 – Tabuleiros de fundo removível utilizados no processo de liofilização.
Figura 43 - Perfil da pressão de pirani durante a secagem primária de um produto (o medidor de pirani apresenta inicialmente valores de pressão maiores devido à condutividade térmica do vapor de água ser superior à do nitrogénio).
Figura 44 – Método *Manifold.*
Figura 45 – Método *Batch.*
Figura 46 – Método *Bulk.*
Figura 47 – Tensões envolvidas no processo de liofilização.
Figura 48 – Suspensões lipossomais liofilizadas obtidas na presença de trealose nas concentrações de 1% (A) e 10% (B).
Figura 45 – Efeito do tamanho das vesículas lipossomais na retenção do fármaco encaspsulado.
Figura 46 – Efeito da trealose e da sacarose na retenção do fármaco presente em vesículas lipossomais.
Figura 47 – Produção e administração de liofilizados farmacêuticos.
Figura 48 – Ilustração representativa do fluxo de materiais através do departamento de produção.

Figura 49 – Efeito do tamanho das vesículas lipossomais na retenção do fármaco encaspsulado.
Figura 50 – Efeito da trealose e da sacarose na retenção do fármaco presente em vesículas lipossomais.
Figura 51 – Produção e administração de produtos liofilizados farmacêuticos.
Figura 52 – Ilustração representativa do fluxo de materiais através do departamento de produção.
Figura 53 - Componentes de enchimento.
Figura 54 – Etapas envolvidas na produção de produtos liofilizados.
Figura 55 – Concentração plasmática de doxorrubicina após uma única administração de 1,5mg/kg de doxorrubicina lipossomal revestida por PEG (quadrados) versus doxorrubicina livre (círculos) em modelo animal.
Figura 56 – *In vivo*, quantidade de doxorrubicina presente no tumor após o recurso a hipertermia.
Figura 57 – Representação esquemática do Abraxane®.
Figura 58 – Representação esquemática do MCC-465.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Polímeros utilizados nas formulações poliméricas.

Tabela 2 - Excipientes utilizados na liofilização de produtos farmacêuticos.

Tabela 3 - Diferentes crioprotetores e lioprotetores utilizados no processo de liofilização.

Tabela 4 - Tamanho da nanopartícula e o índice de polidispersão, antes e após a liofilização, na presença da tealose.

Tabela 5 - Análise do tamanho das nanopartículas reconstituídas após a liofilização.

Tabela 6 - Redispersibilidade e fluidez das nanopartículas reconstituídas após a liofilização.

Tabela 7- Percentagem de retenção de ácido isocítrico nas vesículas lipossomas na presença de trealose.

Tabela 8 - Percentagem de retenção de ácido isocítrico nas vesículas lipossomas na presença de trealose.

Tabela 9 - Percentagem de sondas intermisturadas nas vesículas, na presença e ausência de trealose.

Tabela 10 - Percentagem de fármaco retido em vesículas lipossomais, na presença de maltose.

Tabela 11 - Percentagem de fármaco retido em vesículas lipossomais, na presença de sacarose.

Tabela 12 - Caraterísticas a ter em conta na escolha do fecho de recipientes utilizados por produtos liofilizados.

Tabela 13 - Controlo de qualidade do processo.

Tabela 14 - Formulações lipossomais atualmente comercializadas.

Tabela 15 - Formulações nanoparticuladas atualmente comercializadas.

Tabela 16 - Conjugados Polímero – Proteína.

Tabela 17 - Formulações de micelas atualmente comercializadas.

Tabela 18 - Formulações lipossomais em fase de desenvolvimento clínico.

Tabela 19 - Formulações nanoparticuladas em fase de ensaios clínicos.

Tabela 20 - Conjugados Polímero – Proteína.

Tabela 21 - Conjugados Polímero – Fármaco.

Tabela 22 - Formulações de micelas em fase de ensaios clínicos.

Tabela 23 - Produtos em fase pré – clínica.

Tabela 24 - Produtos patenteados e o seu respetivo método de produção/liofilização.

Capítulo 1

1. Enquadramento teórico

1.1 Nanopartículas

As nanopartículas utilizadas em aplicações médicas podem ser definidas como partículas de tamanho compreendido entre 1 a 100 nm, com capacidade para interagir e influenciar entidades e processos celulares (Wilczewska, 2012).

Um dos requisitos a que uma nanopartícula deve obedecer para aplicação biomédica é a biocompatibilidade com o organismo onde irá exercer o seu efeito, o que implica o controlo da natureza química, tamanho, forma, estado de dispersão, meio de dispersão e modificação da superfície (revestimento) (Wilczewska, 2012).

Na área particular da Oncologia, as nanopartículas têm conquistado terreno como estratégias alternativas à administração de fármacos livres. São exemplos os lipossomas, nanopartículas de albumina, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, micelas, dendrímeros que estão aprovadas pela FDA ou em fase de desenvolvimento (figura 1) (Wilczewska, 2012).

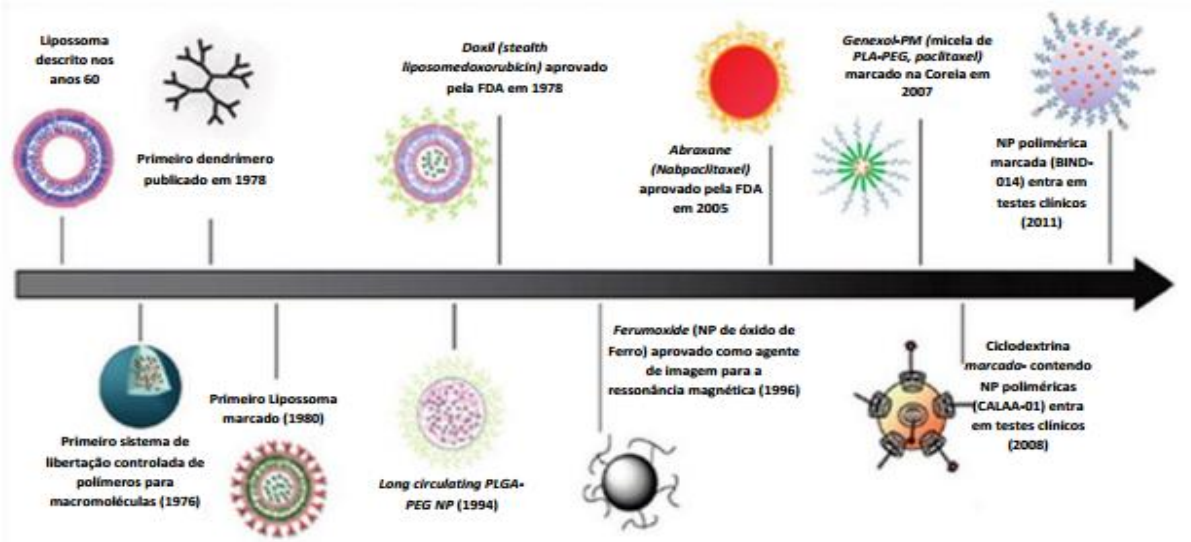


Figura 1 – Evolução dos nanosistemas aceites pela FDA para aplicação médica. Adaptado de Miguel, 2012.

1.2 Problemática das terapias convencionais para o cancro

Os agentes citotóxicos utilizados na quimioterapia convencional (figura 2) apresentam dois problemas fundamentais que justificam o desenvolvimento de novas formas de entrega com base em sistemas nanotecnológicos: falta de especificidade para o tumor, associada a um volume de biodistribuição elevado e incompatibilidade com administração intravenosa (Brochado, 2013).

Os fármacos com atividade antitumoral atuam nas células alvo numa determinada fase do ciclo celular ou em vias de sinalização cruciais para a sobrevivência da célula, com base no pressuposto de que as células tumorais se dividem mais rapidamente do que uma célula normal. Todavia, dada a existência de tecidos normais que apresentam um ritmo de renovação similar ao das células tumorais, esta tentativa de conferir especificidade aos fármacos citotóxicos vê logrado o seu objetivo com a demonstração inequívoca de incidência de efeitos secundários que condicionam o sucesso da terapêutica antitumoral (Barros, 2013).

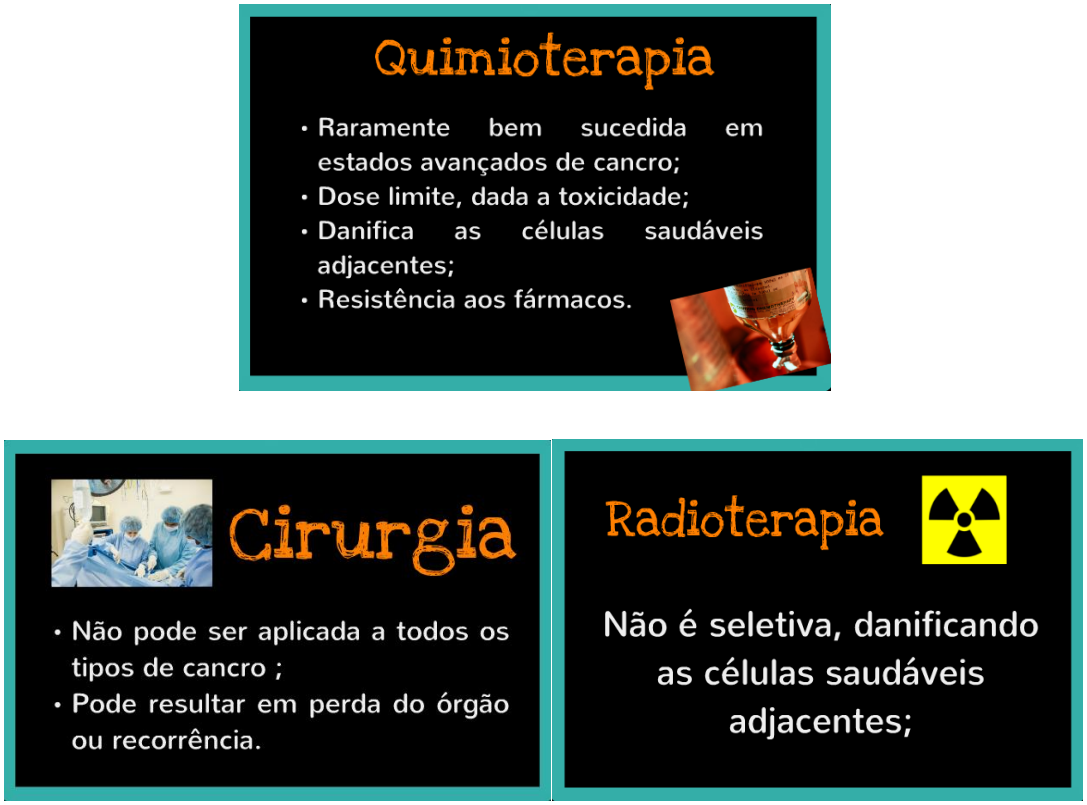


Figura 2 – Terapias convencionais para o cancro

No final do século XX, a comunidade científica criou a expressão *magic bullet* para definir o conceito inovador à época de uma molécula dotada de atividade terapêutica e de seletividade entre células tumorais e normais. Entre muitos exemplos, podemos mencionar o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, nanopartículas passivamente direcionadas e com direcionamento ativo para recetores exclusivamente expressos ou sobreexpressos na superfície das células tumorais (Barros, 2013).

Relativamente às características físico-químicas para administração sistémica, a insolubilidade apresentada pela maioria dos citotóxicos no plasma humano torna o perfil farmacodinâmico e farmacocinético inadequado para uso terapêutico. Para contornar esta barreira são muitas vezes utilizados solventes orgânicos que aumentam a toxicidade dos fármacos, com aumento da incidência de efeitos secundários. A inclusão destes fármacos em nanopartículas, permite alterar a solubilidade sem aumentar a toxicidade, com a vantagem terapêutica associada (Barros, 2013).

Não obstante, é importante realçar que o fato de determinada substância ativa possuir atividade farmacológica, especificidade para o alvo e ser adequada a administração sistémica não garante o sucesso do tratamento. A dose terapêutica eficaz tem de ser assegurada no local desejado e existem barreiras a ultrapassar entre o local de administração e o tumor (Barros, 2013).

1.2.1 Barreiras fisiológicas que condicionam a libertação do fármaco no tecido tumoral

A obtenção de uma resposta terapêutica eficaz mediante administração sistémica de um agente quimioterapêutico está condicionada pela existência de processos naturais de eliminação do organismo e das barreiras à penetração no espaço intratumoral, tais como: o sistema retículo endotelial, a filtração renal, a vascularização anormal, a matriz extracelular e o transporte intracelular (Barros, 2013).

- ✓ **Sistema retículo endotelial**

Após a administração intravenosa do agente terapêutico, este pode ser visto como um corpo estranho ao organismo, ficando sujeito ao reconhecimento por parte das proteínas plasmáticas (opsoninas) num processo designado por opsonização. Ao ser estabelecida a ligação entre o corpo estranho e as opsoninas por interações iónicas, eletrostáticas, hidrófobas, hidrófilas e de van der walls, ocorre a sua eliminação da circulação através das células fagocitárias do sistema retículo endotelial do fígado e do baço para ser posteriormente digerido no complexo lisossómico (Barros, 2013).

- ✓ **Filtração renal**

As nanopartículas administradas intravenosamente e que apresentam um tamanho inferior aos poros do glomérulo (< 10 nm) estão sujeitas a uma eliminação rápida da circulação sanguínea por depuração renal. É necessário encontrar um equilíbrio entre o tamanho viável para promover o extravasamento nos vasos sanguíneos tumorais, mantendo um longo tempo de circulação (Barros, 2013)

- ✓ **Vascularização anormal**

O processo de angiogénese tumoral é responsável pela formação de uma rede vascular de suporte ao crescimento tumoral, ainda que por vezes disfuncional (figura 3). Se, por um lado, a deficiente justaposição das células endoteliais cria fenestrações que favorecem o extravasamento de fármacos e nanopartículas no espaço intratumoral, o fluxo sanguíneo irregular pode ser um entrave no que respeita ao alcance ao tumor. A falta de irrigação em algumas áreas do tumor e o fluxo bidirecional em certos vasos podem ser limitantes no alcance da dose terapêutica eficaz no alvo, bem como uma distribuição não uniforme do agente ativo. Esta deficiente perfusão sanguínea juntamente com a deficiente drenagem linfática não colabora na entrega eficaz dos agentes terapêuticos ao tumor (Barros, 2013).

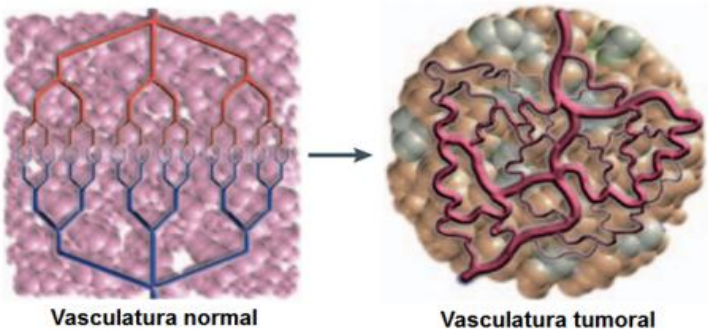


Figura 3 – Ilustração da vasculatura existente em tecidos normais e tumorais. Adaptado de Jain et al., 2007.

- ✓ **Matriz extracelular**

A matriz extracelular representa mais uma limitação para o tratamento por quimioterapia, dado que dificulta a difusão e a distribuição do agente ativo no interstício do tumor (Barros, 2013). Este é constituído por um sistema linfático disfuncional e uma vasculatura imatura e altamente permeável, responsáveis pela criação de uma pressão intersticial elevada. Este aumento da pressão dificulta a passagem de agentes terapêuticos através do endotélio para o espaço intersticial e conduz o fluido intersticial (e o agente ativo) para os tecidos circundantes. A redução do transporte convectivo inibe assim a distribuição de agentes terapêuticos no tumor. Por outro lado, a elevada densidade da matriz extracelular dificulta o efeito de difusão (Brochado, 2013).

- ✓ **Transporte intracelular**

A internalização de uma nanopartícula pela célula-alvo pode ocorrer por mecanismos específicos mediados por recetores ou por um processo passivo de fusão com a membrana citoplasmática. Uma vez no compartimento intracelular, o agente terapêutico está sujeito a mecanismos de degradação enzimática ou a um fenómeno de multirresistência, mediado por bombas de efluxo, que enviam a substância internalizada para fora da célula. Estes mecanismos limitam a eficácia terapêutica pretendida, na medida em que constituem uma barreira de acesso ao alvo celular e molecular (Barros, 2013).

1.2.2 Estratégias - Nanomedicinas terapêuticas

As limitações impostas aos fármacos convencionais pelo organismo humano (sejam de natureza física, química ou biológica) obrigam ao desenvolvimento de novas formulações que otimizem o mecanismo de ação dos agentes terapêuticos e lhes confiram seletividade para um alvo específico, meios para alcançar uma concentração adequada no local alvo e um efeito terapêutico desejável com reduzida incidência de efeitos secundários (figura 4) (Miguel, 2012).

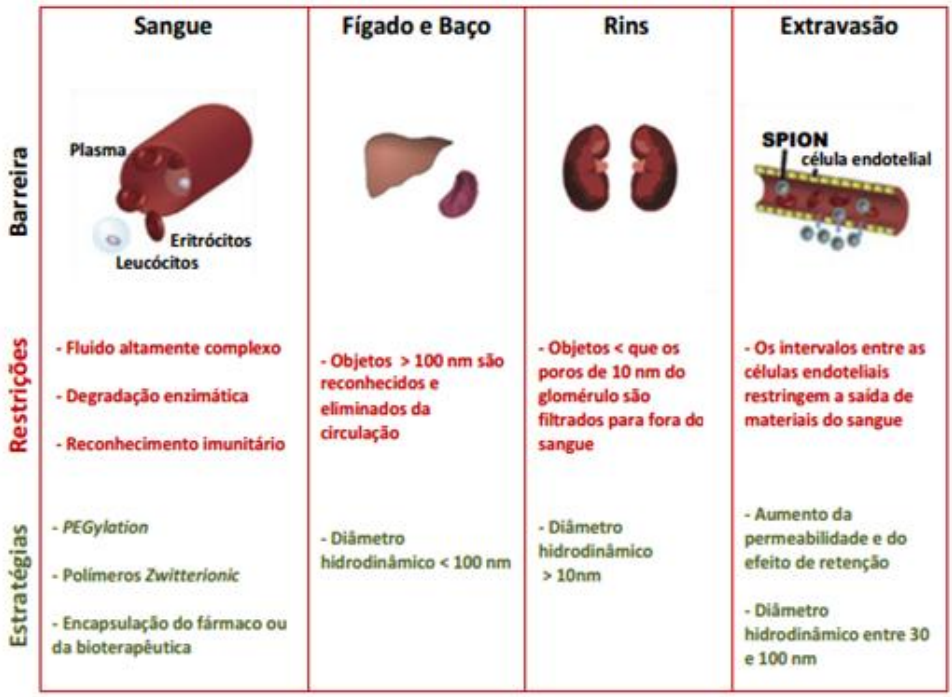


Figura 4 – Barreiras e estratégias no tratamento quimioterapêutico. Adaptado de Miguel, 2012.

O uso de nanopartículas para o transporte e vectorização de fármacos tem sido uma das alternativas de maior sucesso para superar alguns dos desafios impostos. Por isso, têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados ao longo do tempo para permitir explorar a enorme versatilidade que oferecem na encapsulação de agentes de tratamento ou diagnóstico (em monoterapia ou em combinação), na forma de entrega ativa (por meio de inclusão de ligandos de natureza diversa) e no controlo da libertação temporal e espacial do agente incluso (Wilczewska, 2012).

As caraterísticas chave que limitam o desempenho terapêutico destes sistemas nanoestruturados são o **tamanho** e a **superfície química**. As partículas deverão apresentar-se preferencialmente monodispersas com um diâmetro médio entre 100 e 200nm e possuir propriedades físicas-químicas uniformes (Miguel, 2012).

O diâmetro deverá ser tão pequeno quanto possível para minimizar a eliminação pelo sistema retículo-endotelial e, ao mesmo tempo, grande o suficiente para evadir à depuração renal (ou seja, sistemas que apresentem uma gama de valores que torne possível eliminar ambas as barreiras fisiológicas). Estes sistemas podem ainda ser revestidos por polímeros ou moléculas hidrofílicas (como o polietilenoglicol, polissacarídeos e outros), não sendo reconhecidos pelo sistema imunitário. A modificação da superfície das nanoestruturas consegue evitar o processo de opsonização e passar despercebida ao sistema imunitário. Esta alternativa resulta num aumento do tempo de meia vida das nanopartículas na circulação, favorecendo a acumulação em tumores sólidos em concentrações terapêuticas (Miguel, 2012).

O microambiente caraterístico da região tumoral também contribui para que as nanopartículas demostrem um bom desempenho terapêutico. A existência de uma vasculatura tumoral altamente permeável (pela existência de fenestrações entre as células endoteliais e de um revestimento deficiente de pericitos e células do músculo liso), induz o extravasamento das nanopartículas da corrente sanguínea para o espaço intersticial com a posterior acumulação favorecida pelo sistema linfático deficiente e pouco funcional na região tumoral. Este acontecimento é designado por efeito de permeabilidade e retenção aumentada das nanopartículas em tumores. Tal fenómeno não acontece nos tecidos normais pois os seus vasos sanguíneos são compostos por células endoteliais justapostas e integralmente revestidas, que impossibilitam o extravasamento das nanopartículas, e por um sistema linfático funcional (Barros, 2013).

Portanto, é possível tirar partido das propriedades exclusivas do microambiente tumoral e adaptar as características das nanopartículas para permitem a acumulação seletiva nos tumores – **vectorização passiva e ativa** (Brochado, 2013; Pillai, 2015).

O direcionamento passivo tira partido da fisionomia anormal dos neovasos tumorais. Uma vez que estes apresentam fenestrações maiores do que o endotélio normal (tamanho variável entre 10 e 500 nm), permitem que as nanopartículas consigam extravasar as

fenestrações mais largas e se acumulem na região tumoral onde libertam o fármaco (figura 5) (Brochado, 2013; Pillai, 2015).

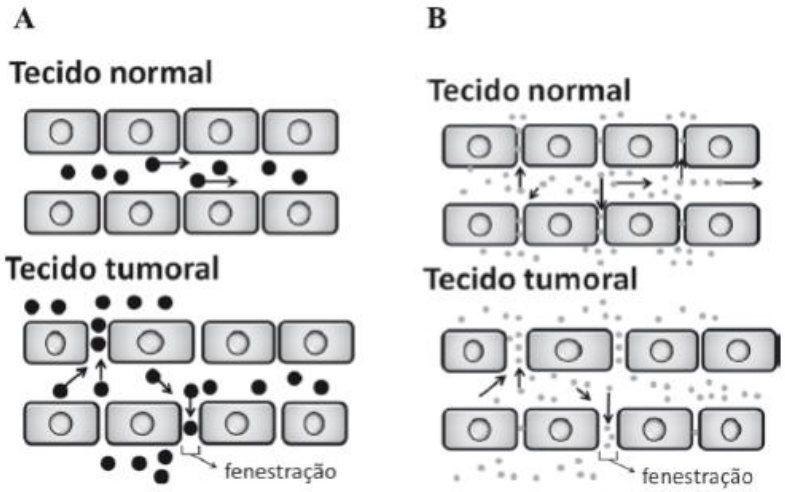


Figura 5 – Representação esquemática do efeito de permeabilidade aumentada em tecido tumoral e normal. A- as esferas pretas representam as nanopartículas contendo fármaco citotóxico que no tecido normal não conseguem atravessar o endotélio. No tecido tumoral devido as fenestrações largas, atravessam o endotélio e ficam retidas no tecido. B - as esferas cinzas representam o fármaco citotóxico, que consegue atravessar tanto o endotélio normal quanto o tumoral. Fonte: Oliveira, 2012.

Na **vectorização ativa**, além de usufruírem do efeito de permeabilidade e retenção aumentado, as nanopartículas contém ligandos (que podem ser adsorvidos na sua superfície), que interagem com recetores exclusivos ou sobrexpressos num tipo celular específico do tumor (Brochado, 2013; Pillai, 2015).

A junção dos dois tipos de mecanismos dá origem a um nanosistema terapêutico mais eficaz e potencia a ação do fármaco no alvo de interesse (Brochado, 2013; Pillai, 2015).

1.2.3 Vantagens do uso de nanopartículas na entrega de moléculas antineoplásicas

O desenvolvimento das nanopartículas apresenta vantagens (figura 6) no perfil toxicológico e na eficácia dos fármacos livres, tais como (Chen, 2010):

a) Melhorar a solubilidade dos agentes anticancerígenos;
b) Aumentar o tempo de circulação do agente ativo na corrente sanguínea;
c) Aumentar a acumulação do fármaco no tecido tumoral;
d) Aumentar a concentração intracelular do fármaco (maior *uptake* por parte das células tumorais através da endocitose);
e) Permitir a libertação do fármaco de forma controlada e estável;
f) Minimizar a resistência ao fármaco mediada pelas bombas de efluxo;
g) Aumentar a dosagem sem aumento de toxicidade;
h) Permitir a administração de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos por várias vias de administração;
i) Diminuir o volume de distribuição dos fármacos livres.

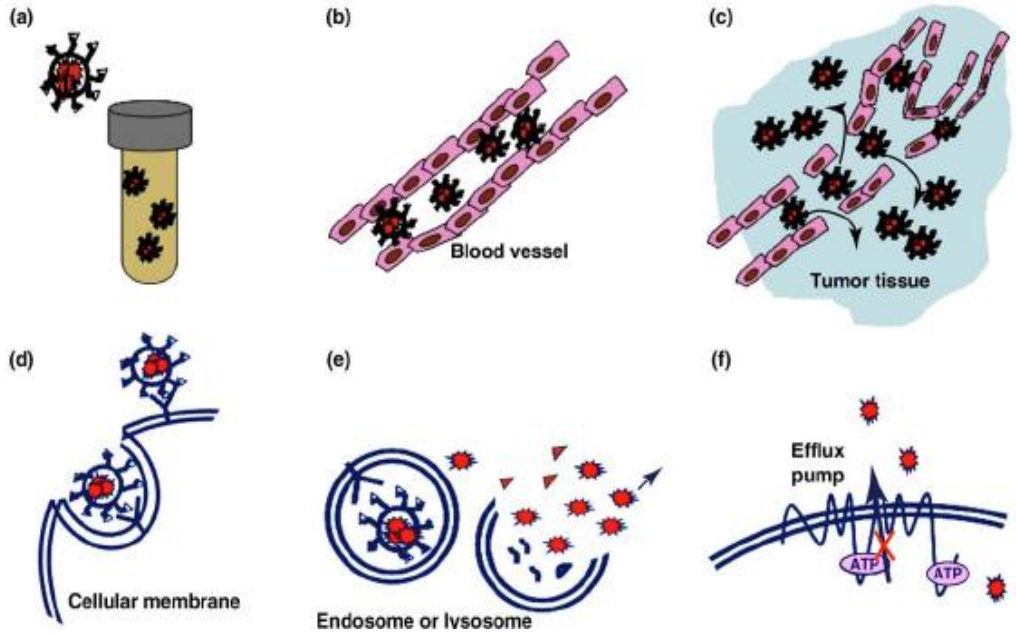


Figura 6- Vantagens dos sistemas nanomedicinais. Adaptado de Chen, 2010.

1.3 Tipos de nanopartículas utilizadas na libertação controlada de fármacos

Os sistemas de libertação controlada de fármacos, quando comparados aos sistemas convencionais, permitem manter as concentrações de um determinado agente ativo constantes por longos períodos de tempo, oferecendo uma melhor eficácia terapêutica através de uma única dosagem. Além do mais, as nanopartículas possibilitam ainda a

proteção do fármaco contra a degradação preservando a sua ação farmacológica (Wilczewska, 2012; Parreira, 2011).

As plataformas nanotecnológicas mais utilizadas na encapsulação de fármacos são os lipossomas, nanopartículas poliméricas, ciclodextrinas e nanopartículas lipídicas, dendrímeros e nanotubos de carbono (figura 7), que serão descritos de seguida (Brochado, 2013).

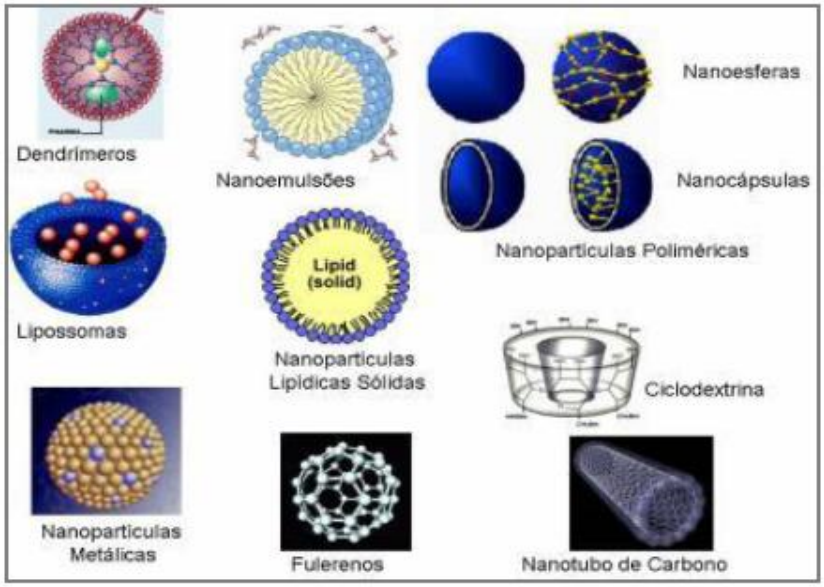


Figura 7 – Tipos de nanopartículas com aplicação terapêutica. Adaptado de Brochado, 2013.

No capítulo 8, estão evidenciados todos os sistemas aprovados pela FDA e em fase de investigação e prova-de-conceito para uso clínico no tratamento oncológico.

Nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas (figura 8) podem ser divididas em três categorias (Brochado, 2013):

- ✓ Lipossomas
- ✓ Micelas
- ✓ Nanopartículas lipídicas sólidas

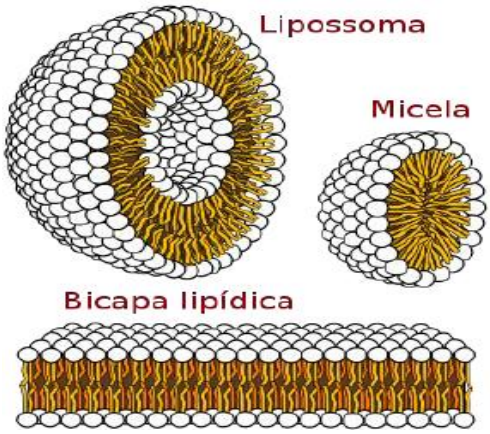


Figura 8 – Representação de um lipossoma e uma micela. Adaptado de Brochado, 2013.

Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas constituídas por uma ou mais bicamadas lipídicas que formam um ou vários compartimentos aquosos. Este sistema é muito versátil, dado permitir encapsular moléculas hidrofílicas no núcleo aquoso e moléculas hidrofóbicas e solutos lipofílicos na bicamada lipossomal. A interação do fármaco com a célula alvo pode dar-se através de processos de adsorção, fusão, endocitose ou transferência lipídica entre a bicamada do lipossoma e membrana da célula (Brochado).

Estas estruturas podem ainda ser multifuncionais e conjugar uma variedade de ligandos na sua superfície que lhes conferem seletividade para um tecido em particular (Brochado, 2013).

Os lípidos que integram a membrana do lipossoma são normalmente fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, fosfatidilglicerol e esfingomielina. Estes podem ser compostos por uma única bicamada ou por múltiplas bicamadas, sendo unilamelares ou multilamelares, respetivamente (Brochado, 2013).

A administração oral de lipossomas não é a via preferencial para a sua aplicação clínica, dada a rápida degradação no trato gastrointestinal (pH gástrico, presença de enzimas de degradação e ação detergente dos sais biliares no intestino) (Brochado, 2013).

Os lipossomas podem ser administrados pela via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea, sendo a primeira a via de eleição (Brochado, 2013). A via nasal por ser bastante irrigada é dotada de particular interesse no que respeita à biodisponibilidade do fármaco.

Quando administrados na corrente sanguínea, os lipossomas sujeitam-se a ser eliminados pelo sistema reticuloendotelial, pelo fígado, baço e nódulos linfáticos. Uma vez no compartimento vascular, os lipossomas podem ser fagocitados pelas opsoninas do plasma ou os fosfolípidos da bicamada podem ser removidos pelas lipoproteínas de alta densidade (HDL), o que afeta a entrega do fármaco no tumor sólido (Silva, 2011). Esta rápida eliminação constitui uma desvantagem ao uso dos lipossomas, mas pode ser ultrapassada pela inclusão de polímeros hidrofílicos na bicamada lipídica (Brochado, 2013).

Micelas

As micelas (figura 9) são vesículas esféricas que se originam pela agregação espontânea de moléculas de surfatante anfifílico na presença de um meio aquoso. Estas possuem a capacidade para encapsular fármacos hidrófobos já que tem um núcleo hidrofóbico e apresentam uma camada composta por moléculas de cabeça polar e uma cauda hidrofóbica (Brochado, 2013). Existem também micelas poliméricas que são constituídas por polímeros com a capacidade para se agregarem em meio aquoso. Podem ser copolímeros de bloco hidrofílico compostos por poli (óxido de etileno) (PEO) ou de bloco hidrofóbico constituídos por poli (óxido de propileno) (PPO), poli (ácido lático) (PLA) entre outros. A utilização destes em alta concentração pode resultar num maior tempo de dissolução do sistema (Silva, 2011).

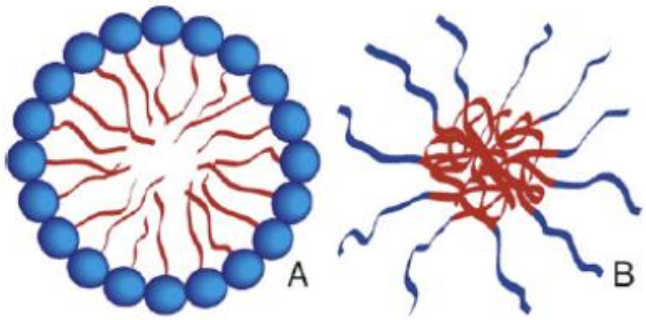


Figura 9 – Representação de micelas. A) Micela não polimerizada constituída por moléculas anfifílicas; B – Micela polimérica constituída por blocos de copolímeros anfifílicos. Adaptado de Silva, 2011.

Nanopartículas lipídicas sólidas

Estas nanopartículas lipídicas sólidas (figura 10) são compostas por um núcleo sólido coberto por uma camada de moléculas de agentes tensoativos. Os lípidos utilizados para produzir este sistema são os triglicerídeos, mistura de glicerídeos, ácidos gordos e ceras. Como estas nanopartículas apresentam o fármaco entre as suas cadeias lipídicas e nas imperfeições dos cristais, a alta organização dos cristais origina uma baixa eficiência na encapsulação do fármaco (Brochado, 2013).

Quanto à via de administração, estas nanopartículas podem ser administradas por via intravenosa, intramuscular, parenteral, oral, oftálmica e tópica (Brochado, 2013).

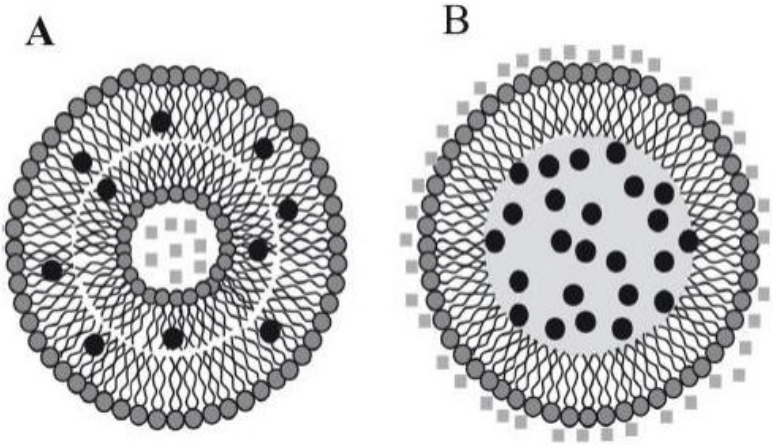


Figura 10 – Representação de um lipossoma (A) e uma nanopartícula lipídica sólida (B). No lipossoma o fármaco encapsulado, quadrados cinza, é hidrofílico, e as esferas pretas são o fármaco lipofílico. Na nanopartícula lipídica, o fármaco hidrofílico é adsorvido na sua superfície e é encapsulada a porção lipofílica. Fonte: Oliveira, 2010.

Nanopartículas poliméricas

Estas estruturas (figura 11) são constituídas por uma matriz sólida composta por polímeros. Conforme o método de preparação, pode-se obter nanocápsulas ou nanoesferas e o fármaco pode ser agregado, encapsulado ou adsorvido às partículas. As nanocápsulas como não apresentam óleo na sua composição, o fármaco fica retido e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas caracterizam-se por um invólucro polimérico que forma um

núcleo oleoso, estando o fármaco dissolvido e/ou adsorvido à parede polimérica (Brochado, 2013).

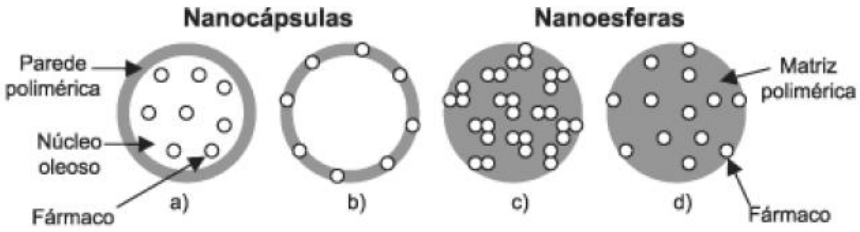


Figura 11 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. Fonte: Guterres; Schaffazick, 2003).

As vias de administração preferencialmente utilizadas são a oral, parenteral e oftálmica. Podem ser direcionadas, no caso de serem empregues ligandos-alvo na formulação polimérica (Brochado, 2013).

Os materiais poliméricos mais usados no encapsulamento de fármacos são o poli (ácido láctico) (PLA), o ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) e o ácido poli (glutâmico) (PGA) por serem biocompatíveis e biodegradáveis (tabela 1). Existem ainda outros polímeros utilizados para o mesmo efeito e que estão apresentados a seguir (Brochado, 2013).

Tabela 1 – Polímeros utilizados nas formulações poliméricas (Brochado, 2013).

Polímeros sintéticos	**Polímeros naturais**
Poliésteres • Poli (ácido D,L-lático-co-glicólico) (PLGA) • Poli (ácido lático) (PLA) • Poli (ácido glutâmico) (PGA) • Poli (caprolatona) (PCL) Copolímeros de N-(2-hidroxipropil) – metacrilato (HPMA) Polifosfazenos Polianidridos	Proteínas • Albumina • Colagénio Polissacarídeos • Celulose • Alginato • Quitosano • Dextrano • Ácido hialurónico

Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (figura 12) são oligossacarídios cíclicos formados pela degradação do amido pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase. Como apresentam um arranjo tridimensional, as suas moléculas originam uma cavidade (espaço) interna apolar formando complexos de inclusão. Esta propriedade complexante permite melhorar a solubilidade de muitos fármacos e sendo assim são considerados bons transportadores hidrofílicos (Silva, 2011).

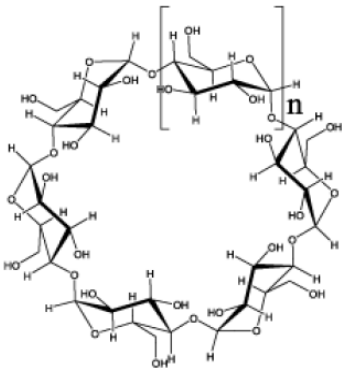


Figura 12 – Estrutura geral das ciclodextrinas (Silva, 2011).

Dendrímeros

Os dendrímeros são polímeros globulares altamente ramificados, com alto grau de uniformidade e alta previsão do peso molecular e tamanho. Um núcleo central, uma região ramificada e a presença de grupos funcionais de superfície fazem parte da constituição destes sistemas. Um dendrímero de "geração completa" apresenta aminas primárias como grupos terminais e os de meia geração já são compostos por grupos carboxilo ou éster (Silva, 2011).

Os dendrímeros catiónicos são os mais tóxicos. Os aniónicos são biocompatíveis, solúveis em água e com a capacidade de veicular fármacos dado a existência de cavidades internas (Brochado, 2013).

Os dendrímeros são considerados um sistema de última geração e apresentam um grande potencial de aplicação em sistemas terapêuticos (formulação de fármacos) e em sistemas de diagnóstico (Brochado, 2013).

Os dendrímeros mais utilizados para este tipo de aplicação são (Brochado, 2013):

Poli (amidoamina) (PAMAM)
Poli (propileno-imina) (PPI ou DAB)
Poli (éter-hidroxilamina) (PEHAM)

Capítulo 2

2. Estabilidade das nanopartículas farmacêuticas

A estabilidade de um sistema coloidal visa o impedimento da ocorrência de processos que resultem na alteração da sua estrutura, seja do grau de dispersão, seja da distribuição das partículas pelas dimensões.

A estabilidade dos nanosistemas coloidais é extremamente importante no que respeita a questões de eficácia e segurança. Durante o percurso de fabrico, armazenamento e transporte das nanodispersões, poderão ocorrer alterações de natureza física e/ou química, que levam à desestabilização do sistema (figura 13) e consequentemente anulam a possibilidade de alcançar uma estabilidade a longo prazo (Wu; Zhang; Watanabe, 2011).

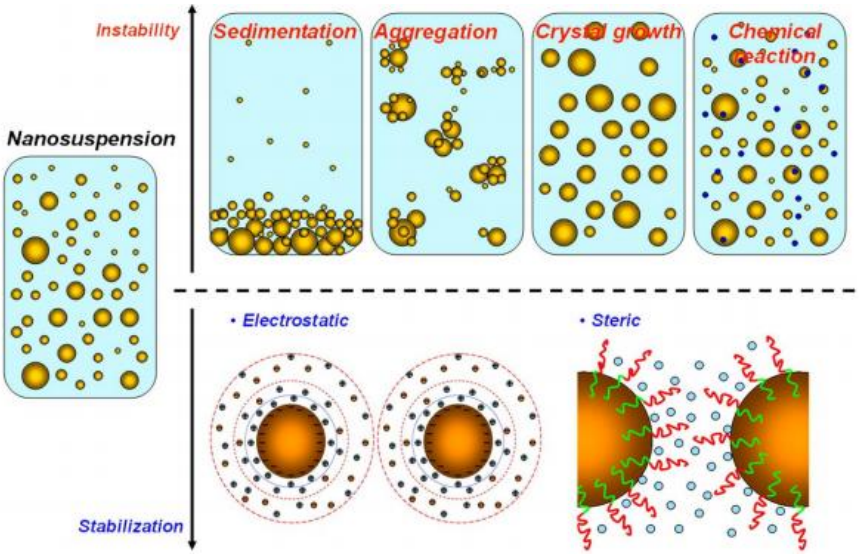


Figura 13 – Instabilidade físico-química das nanosuspensões coloidais e estratégias para alcançar a estabilização do sistema. Adaptado de Wu; Zhang; Watanabe, 2011.

A instabilidade física do sistema está principalmente relacionada com as caraterísticas da sua fase dispersa e do seu meio de dispersão, assim como dos eventuais adjuvantes utilizados. A existência de coloides liofílicos ou liofóbicos numa nanodispersão tem impacto na sua

estabilidade. Numa dispersão liófila (reversível), a fase dispersa tem grande afinidade para o meio de dispersão e sendo assim, existem moléculas do meio de dispersão que são adsorvidas à superfície da fase dispersa formando uma camada protetora – camada de solvatação. Numa dispersão liófoba (irreversível), a extensão da afinidade entre a fase dispersa e o meio de dispersão é menor.

Os problemas mais relevantes deste tipo de instabilidade, que se desencadeiam ao longo do armazenamento e transporte do sistema, são a sedimentação ou cremação, aglomeração e crescimento dos cristais. Outro fenómeno que compromete a estabilidade física, durante o processo de fabrico, é a mudança de cristalinidade das nanopartículas associada à alta pressão ou temperatura (Wu; Zhang; Watanabe, 2011).

Sedimentação ou *Creming*

De acordo com a equação de Stokes existem certos fatores, como o tamanho das partículas coloidais, a viscosidade do meio e a diferença de densidade entre a fase dispersa (fase interna) e o meio de dispersão (fase externa), que estão implícitos na determinação da taxa de sedimentação (Vizzotti, 2013).

Relativamente ao tamanho das partículas, estas devem ser suficientemente pequenas para não exibirem uma tendência de sedimentação sob a ação gravitacional.
As partículas de tamanho coloidal apresentam uma sedimentação lenta ao longo do tempo. Durante o seu armazenamento num sistema coloidal, estas evidenciam um movimento contínuo e aleatório, em forma de ziguezague, no fluido circundante. Este movimento dos coloides no meio de dispersão, designado por movimento browniano (forças de difusão), resulta das sucessivas colisões entre as partículas dispersas e as moléculas do meio de dispersão. No que se refere a entidades de tamanho coloidal, o movimento browniano predomina em relação ao efeito gravitacional, e esta é a razão pela qual as partículas da fase dispersa não se depositam no fundo do recipiente (não decantam) (Degobert, 2006).
Portanto, reduzindo o tamanho das partículas da fase dispersa consegue-se reduzir a velocidade de sedimentação (Wu; Zhang; Watanabe, 2011).

A taxa de sedimentação também é influenciada pela viscosidade do meio de dispersão. Segundo a equação de Stokes, o aumento da viscosidade do meio conduz a uma redução da velocidade de sedimentação ou de formação de creme (no caso das emulsões). Esta é uma

das estratégias adotadas para resolver os problemas de estabilidade de soluções coloidais (Santos, 2011).

No que diz respeito à diferença de densidade entre a fase interna e externa, as nanodispersões coloidais quando apresentam uma fase interna mais densa do que a externa ocorre uma movimentação descendente das partículas da fase dispersa - processo de **sedimentação** (figura 14). No caso contrário, quando a fase externa é mais densa do que a interna sucede-se um movimento ascendente das partículas coloidais - ***creaming*** (formação de natas – processo de flutuação), que se verifica nas nanoemulsões (Santos, 2011). Portanto, quanto maior for a diferença de densidade entre a fase dispersa e o meio de dispersão, maior será a velocidade de sedimentação.

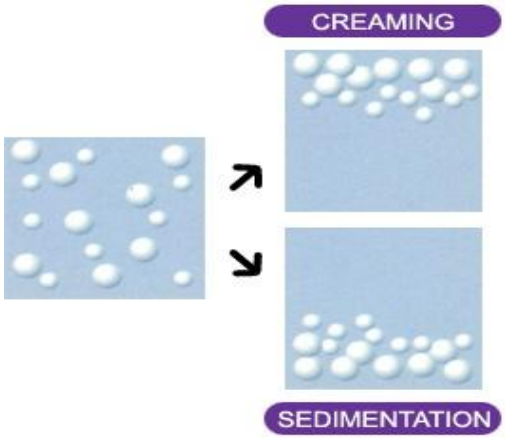


Figura 14 – Representação do processo de sedimentação versus *creaming*. Fonte: Santos, 2011.

A figura seguinte exibe os tipos de sedimentação que podem ocorrer numa nanodispersão coloidal.

A figura 15 a) demonstra que num sistema defloculado (coagulado), as forças de repulsão entre as partículas são maiores do que as forças de atração resultando numa dispersão (encontram-se em suspensão como entidades separadas). Com o decorrer do tempo, pode ocorrer uma sedimentação bastante lenta dado que cada partícula se deposita de forma individualizada. Como resultado deste fenómeno é obtido um sedimento densamente compactado – *caking* (aglomerado) devido ao peso das camadas superiores de material sedimentado. As forças de repulsão entre as partículas são vencidas e forma-se um sedimento denso de difícil redispersão. Este sistema tem a vantagem de possibilitar retirar doses mais uniformes do recipiente (Wu; Zhang; Watanabe, 2011).

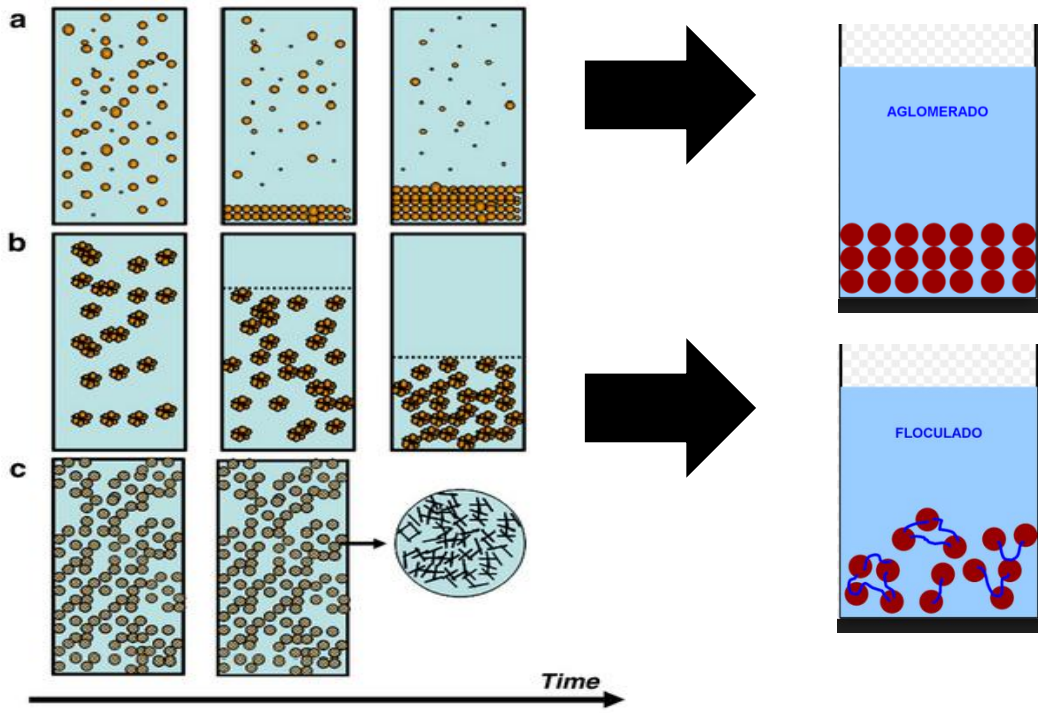
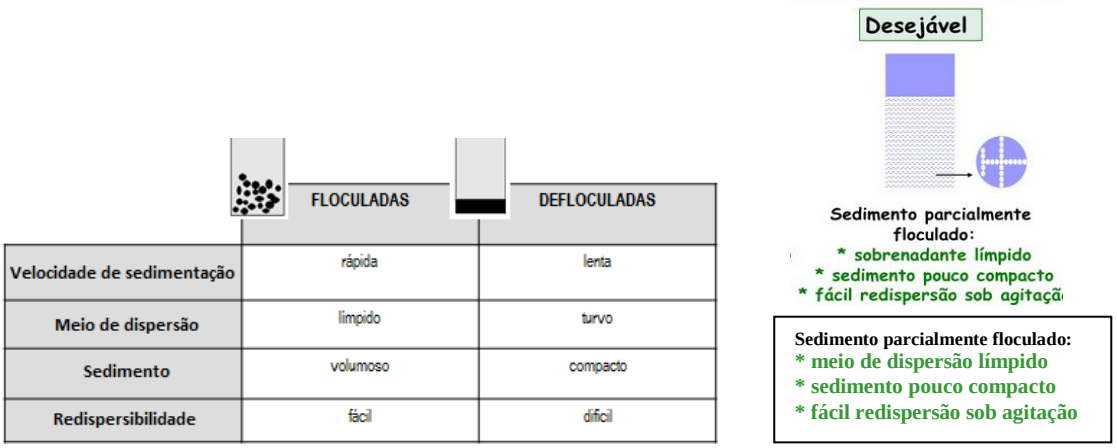


Figura 15 – Comportamento de sedimentação de nanosuspensões defloculadas e floculadas. Adaptado de Wu; Zhang; Watanabe, 2011.

Perante uma situação de sedimentação floculada (figura 15 b), as forças de repulsão entre as partículas encontram-se diminuídas e as forças de atração passam a predominar. Posto isto, as partículas ficam muito próximas umas das outras comportando-se assim como uma só – formação de flocos (agregados que possuem uma estrutura aberta). A velocidade de sedimentação é muito mais rápida devido ao aumento de tamanho das partículas (flocos) que se depositam no recipiente levando ao risco de administração de doses imprecisas (Wu; Zhang; Watanabe, 2011).

Estas estruturas abertas, pouco compactas e pouco densas, que se sedimentam rapidamente, tendem a preservar nos sedimentos uma quantidade significativa das moléculas do meio circundante. Assim o volume do sedimento final é relativamente grande e torna-se fácil a sua redispersão após agitação (força de atração é superada e as partículas desunem-se rapidamente voltando ao seu estado original) (Wu; Zhang; Watanabe, 2011).

A seguinte figura resume as diferentes caraterísticas de uma sedimentação floculada e defloculada.



	FLOCULADAS	DEFLOCULADAS
Velocidade de sedimentação	rápida	lenta
Meio de dispersão	límpido	turvo
Sedimento	volumoso	compacto
Redispersibilidade	fácil	difícil

Figura 16 – Caraterísticas de uma sedimentação coagulada e floculada bem como aquela que seria desejável. Adaptado de Wu; Zhang; Watanabe, 2011.

Agregação

As nanopartículas presentes num líquido estão em movimento contínuo (movimento browniano), como já foi explicado anteriormente, e as colisões resultantes desse movimento podem conduzir a uma **agregação** das partículas. A agregação evidencia diversas formas podendo levar à coalescência (no caso das nanoemulsões) ou à formação de agregados (Wu; Zhang; Watanabe, 2011; Santos, 2011).

Existem fatores determinantes na estabilidade de uma nanosuspensão coloidal, tais como o carácter anfotérico da superfície das partículas, a dupla camada elétrica e o potencial zeta (Fairhurst; Lee; 2011).

Os coloides, como são obtidos a partir da subdivisão da matéria (o que leva à criação de novas superfícies), apresentam um aumento da razão superfície/volume. Esta caraterística faz com que o comportamento dos sistemas coloidais esteja dependente da sua superfície. Dado que pequenas partículas possuem alta energia superficial (figura 17) e por essa razão são termodinamicamente instáveis, estas tendem a agregar-se espontaneamente no sentido de alcançar um estado de menor energia. Desta forma, as partículas diminuem a sua energia superficial pela diminuição da área de superfície (formando agregados). Para desenvolver uma formulação cineticamente estável, de uma dispersão coloidal, são normalmente utilizados estabilizadores (Réfega, 2010).

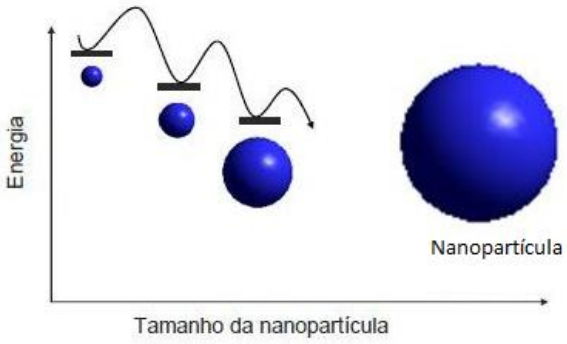


Figura 17 – Energia versus Tamanho da nanopartícula (quanto menor for a nanopartícula maior será a sua energia superficial). Fonte: https://lh6.googleusercontent.com/-LtiG78XQBUE/TjcmOeCxDMI/AAAAAAAAAH0/XFbJfRrZrig/particle.jpg.

A estabilidade dos coloides numa nanodispersão também depende da interação de cargas elétricas na sua superfície. Geralmente quando nanopartículas coloidais entram em contacto com um fluido ganham uma carga elétrica na sua superfície. Esta carga elétrica das nanopartículas, positiva ou negativa, pode derivar da ionização das moléculas na superfície ou ainda da adsorção de iões do meio de dispersão nessa mesma superfície (Fairhurst; Lee; 2011).

O potencial elétrico produzido na superfície das nanopartículas desencadeia a atração de iões de carga oposta presentes no seu meio envolvente, formando uma monocamada - **camada de Stern**. Tendo em conta as dimensões finitas das nanopartículas coloidais, a neutralização do potencial elétrico não se sucede totalmente uma vez que a adsorção de contra iões na sua superfície coloidal é realizada com base na limitação espacial. Então o que nomeadamente acontece é uma redução acentuada deste potencial até à camada de Stern, devido à elevada concentração de iões de carga oposta, recriando um novo potencial - potencial de Stern. Por sua vez, este novo potencial também necessita de atrair contra iões para a região da nanopartícula, mas como alguns destes sofrem o efeito repulsivo, devido à presença de iões com a mesma carga na camada de Stern, então estabelecem-se ligações muito fracas com as partículas (Réfega, 2010).

Assim sendo, esta concentração de iões de carga oposta que envolvem a camada de Stern diminui à medida que a distância aumenta criando uma camada difusa. É formada então, uma

dupla camada elétrica na interface das nanopartículas com o seu meio de dispersão (Fairhurst; Lee; 2011).

Com isto pode-se afirmar que quanto maior for a presença de iões no meio, menor é a distância em que existe potencial eletroestático e consequentemente maior possibilidade da ocorrência de **agregação**. Portanto a estabilidade coloidal é conseguida conforme a repulsão electroestática existente, e esta está dependente da espessura da camada difusa (Degobert, 2006).

O potencial zeta é um fator crucial na determinação da estabilidade de uma dispersão. Ao adquirir a diferença de potencial entre a camada difusa e a dispersão eletricamente neutra consegue-se prever o quanto estável uma nanodispersão é. Quanto mais elevado for o valor deste potencial (em módulo), mais estável é a dispersão. Isto explica-se porque as nanopartículas carregadas repelem-se umas às outras sendo que a forças de repulsão ente estas vencem as forças de van der walls (que promovem a **agregação**). Um valor de potencial zeta baixo compromete a estabilidade da dispersão podendo levar à sua agregação (Réfega, 2010).

De acordo com a teoria de DLVO, a estabilidade de uma dispersão coloidal está relacionada com a energia potencial total de interação das partículas, que corresponde à soma de dois tipos de forças eletromagnéticas, as forças electroestáticas da dupla camada e as forças atrativas de van der walls, existentes entre as partículas à medida que se aproximam. Esta teoria pressupõe que existe uma barreira energética proveniente deste somatório de forças, que quando é ultrapassada pela colisão de partículas de alta energia térmica, as forças de atração passam a predominar sujeitando-as à **agregação**. A baixa energia térmica dos coloides anula a capacidade destes superarem a barreira energética existente, mantendo-os dispersos (Réfega, 2010).

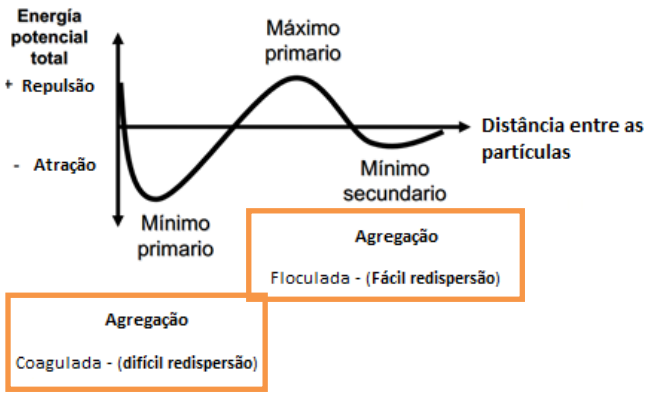


Figura 18 – Energia potencial total versus Distância entre as partículas. Adaptado de Réfega, 2010.

Termodinamicamente, uma dispersão é estável se o valor da energia potencial de interação entre as nanopartículas (VT) for superior a zero (VT > 0). A figura 18 demonstra que, se o valor do máximo for muito pequeno (se a barreira V_{max} for vencida), as partículas que interagem entre si podem atingir a região do ponto mínimo primário, onde a distância entre elas é pequena e o sistema torna-se instável. Nesta situação as partículas aproximam-se umas das outras e formam agregados, de carácter irreversível, não sendo possível dissociar-se após agitação. Esta teoria também pressupõe a existência de uma região do mínimo secundário, onde ocorre uma fraca e reversível **agregação** das partículas e assim sendo esta adesão pode ser desfeita por uma agitação moderada (Sharma, 2012).

Em suma, a ideia chave desta teoria é entender que para ser mantida a estabilidade cinética dos coloides é necessário que as forças repulsivas sejam predominantes, ou seja, a distâncias intermédias a energia de repulsão é fundamental para o sistema coloidal (Réfega, 2010).

Em virtude de obter sistemas coloidais estáveis podem ser aplicados dois tipos de mecanismos – a estabilização eletrostática e a estabilização estérica (Vizzotti, 2013).

Na estabilização electroestática (figura 19 a), a estabilidade é obtida pela variação da carga de superfície. Cada partícula de uma dada suspensão encontra-se envolvida por uma nuvem de iões e como essas nuvens são todas da mesma carga ocasiona-se uma repulsão entre as nanopartículas. Isto consegue-se através da utilização de solventes e dispersantes com variadas polaridades (Vizzotti, 2013).

A estabilização estérica (figura 19 b) dá-se pela adição de polímeros que são adsorvidos à superfície das partículas e formam uma camada protetora em redor destas, resultando numa barreira física à aproximação das nanopartículas (Vizzotti, 2013).

Figura 19 – Representação dos mecanismos de estabilização. Fonte: Particle Sciences, 2009.

A combinação das caraterísticas das técnicas citadas anteriormente dá origem à estabilização eletrostérica (figura 19 c) (Vizzotti, 2013).

Crescimento de cristais

Um dos fatores que põe em causa a estabilidade das dispersões coloidais é o crescimento dos cristais (figura 20). O aumento de tamanho dos nanocristais deve-se ao fato da concentração do sólido em solução se apresentar maior que a solubilidade (Wu; Zhang; Watanabe, 2011).

Os nanocristais por terem uma elevada área superficial fazem com que o fármaco se dissolva mais rapidamente e além disso, proporcionam um aumento da solubilidade de saturação. De acordo com a equação de Ostwald - Freundlich, o fato das partículas pequenas possuírem uma maior solubilidade de saturação relativamente às partículas de maiores dimensões origina um gradiente de concentração entre pequenas e grandes partículas acelerando a difusão do fármaco. As moléculas que se encontram numa região de maior concentração de fármaco tendem a migrar para uma região de menor concentração, gerando uma solução supersaturada à volta destas e consequente cristalização do fármaco. No entanto, a área que rodeia as pequenas partículas passa a ser uma solução insaturada e ocorre a dissolução das moléculas do fármaco. Neste processo o crescimento das grandes partículas dá-se pelo consumo das pequenas (reprecipitação dos iões) (Wu; Zhang; Watanabe, 2011).

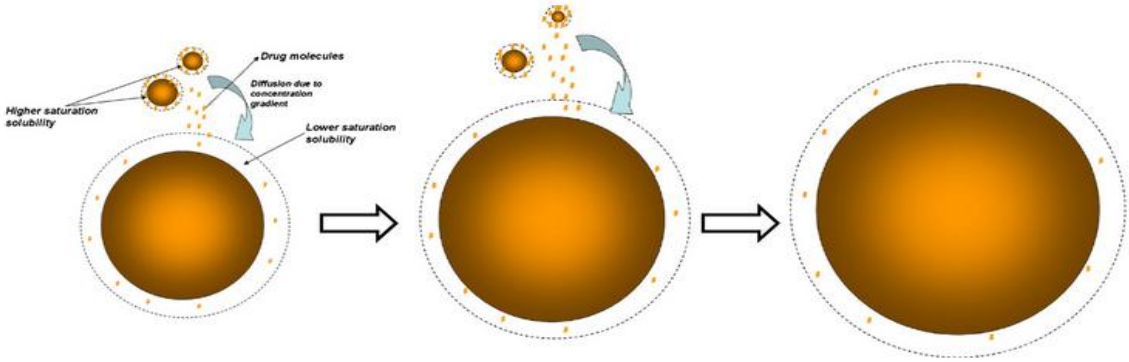


Figura 20 – Representação do Amadurecimento de ostwald. Adaptado de Wu; Zhang; Watanabe, 2011.

Modificação do estado cristalino

A modificação do estado cristalino do fármaco é outro aspeto a ter em conta, visto que esta pode alterar a sua ação terapêutica, solubilidade e estabilidade. Na obtenção de nanocristais de fármaco são utilizadas dois tipos de tecnologias: a *top-down* (homogeneização por alta pressão) e a *bottom-up* (precipitação). Assim estes podem adquirir uma forma com uma fração amorfa quando são expostos à alta energia do processo de precipitação (*bottom-up*) ou uma forma completamente amorfa se submetidos à homogeneização por alta pressão. As formas amorfas normalmente apresentam maior solubilidade do que as formas cristalinas e portanto possuem maior velocidade de dissolução. Em nanodispersões coloidais, as formas amorfas geralmente convertem-se na forma cristalina e por isto torna-se necessário a aplicação de substâncias aditivas que suprimem este procedimento. Os fármacos que se apresentam na sua forma amorfa conseguem apresentar concentrações superiores na corrente sanguínea, 3 a 4 vezes maior, relativamente à forma cristalina (Wu; Zhang; Watanabe, 2011).

Estabilidade química

A estabilidade química das nanodispersões está dependente do tipo de polímero utilizado, do efeito do pH, da estabilidade química do fármaco encapsulado e da temperatura de armazenamento (Degobert, 2006).

Tipo de polímero

A estabilidade química das dispersões coloidais está dependente do tipo de polímero usado como nanotransportador do fármaco. Os polímeros degradáveis hidrolíticos são aqueles que evidenciam uma degradação ao longo do tempo, a não ser que, pelo controlo da temperatura e pH desta, ocorra uma degradação a uma taxa mais lenta. A presença de nanoparticulas de PCL numa formulação terapêutica demonstra que o seu peso molecular inicial não altera a estabilidade do sistema (Degobert, 2006; Lemoine et al., 1996).

Este tipo de estabilidade também está condicionado pela ocorrência de reações químicas que limitam a solubilidade do fármaco. Os grupos funcionais das moléculas podem sofrer mecanismos químicos que levam à instabilidade das nanopartículas, como por exemplo, os éster e os amidos estão sujeitos a reações de hidrólise e os grupos amino submetem-se à degradação oxidativa (Degobert, 2006).

No caso das nanoparticulas lipídicas sólidas, os fosfolípidos usados na preparação destas podem ser degradados pela hidrólise das ligações éster ou pela peroxidação de cadeias de acilo insaturadas. Os triglicerídeos expostos à reação de hidrólise, presentes numa nanopartícula lipídica sólida, resultam em mono ou di-glicerídeos com os ácidos gordos livres. Estes últimos, por se apresentarem na parte interna da nanopartícula sofrem menos degradação do que os fosfolípidos da parte externa (Degobert, 2006; Heurtault et al., 2003).

Efeito do pH

O fármaco e os componentes usados na preparação de uma formulação são determinantes no valor de pH. As variações de pH propiciam uma degradação do polímero e consequentemente do fármaco. A condições extremas de pH e temperatura, o polímero das nanopartículas sofre uma reação hidrolítica. Num meio ácido, as cadeias do polímero formam oligómeros insolúveis e baixa produção de grupos carboxílicos livres. A pH alcalino há a formação de derivados solúveis já que a clivagem das ligações éster se dá de forma não aleatória (Degobert, 2006; Belbella et al., 1996).

Estabilidade química do fármaco encapsulado

É imperativo manter a integridade da molécula ativa encapsulada numa nanopartícula. Para isso deve ter-se em conta o tamanho da nanopartícula, o peso molecular do polímero e a possibilidade de fuga do fármaco durante o armazenamento, a partir das nanopartículas (Degobert, 2006; Alonso, 1996).

Temperatura de armazenamento

A temperatura de armazenamento é um fator de extrema importância na estabilidade das dispersões coloidais a longo termo. Existem autores que referem que ambos os polímeros, poli (D, L – lático) e poli (ε-caprolactona), evidenciam pequenas alterações no seu peso molecular e no tamanho das nanoesferas, quando são armazenados durante 350 dias a 5°C. Pelo contrário, quando são expostas a uma temperatura de 37°C, ocorre uma rápida degradação dos polímeros. No caso das nanopartículas de PLA, poli (ácido láctico), não foram detetadas alterações do peso molecular do polímero durante um período de quatro meses, quando submetidas a uma temperatura de 25°C (Degobert, 2006; Coffin, McGinity, 1992).

Capítulo 3

3. Princípio do processo de liofilização

A estabilidade limitada das dispersões coloidais em função do tempo, determinou o desenvolvimento de estratégias como a técnica de liofilização (Degobert, 2006).

A liofilização baseia-se num processo de sublimação no qual a água ou outro solvente, passa diretamente do estado sólido para o estado gasoso, sob condições de baixa pressão (vácuo) e baixa temperatura, sem ter que passar pelo estado líquido. Este processo consiste na remoção da água previamente congelada (desidratação do sistema) para obtenção de formas farmacêuticas sólidas de nanopartículas (Lavakumar, 2013).
Portanto, em vez de utilizar o aquecimento, esta provoca uma redução da pressão com intuito da fase sólida não derreter. O resultado adquirido permite obter um produto em que a maior parte da estrutura é conservada sendo possível o seu posterior armazenamento à temperatura e pressão ambientes. Devido ao seu alto custo, a liofilização normalmente restringe-se apenas a matérias que são sensíveis ao calor (por exemplo as proteínas) e que possuem uma estrutura delicada (Lavakumar, 2013).

A liofilização é alcançada abaixo do ponto triplo e só assim é possível converter o estado sólido do solvente imediatamente num estado gasoso. Este ponto é alcançado quando uma determinada substância possui os três estados da matéria (sólido, líquido e gasoso) simultaneamente e em equilíbrio no sistema (figura 21) (Lavakumar, 2013).

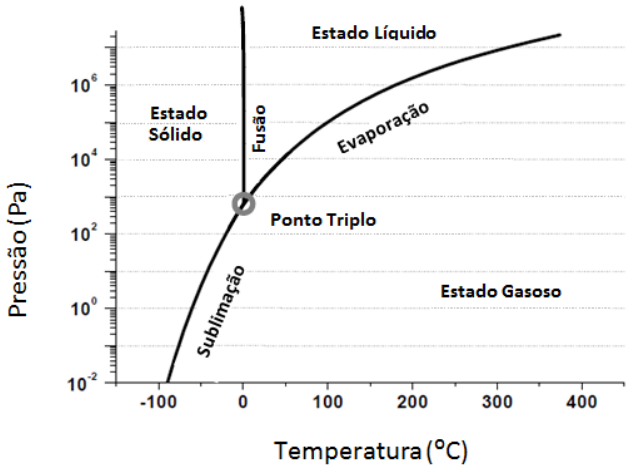


Figura 21 – Diagrama de fases. Adaptado de Graberg, 2011.

Esta técnica tem sido usada para proceder à secagem de nanosuspensões coloidais, principalmente lipossomas e nanoesferas, de forma a evitar ou retardar os problemas associados com a estabilidade do sistema. Também pode ser utilizada em nanocápsulas, se o óleo não promover a dissolução do fármaco e a estrutura das nanopartículas formar uma vesícula (Degobert, 2006).

Este processo é realizado através da utilização de um equipamento designado por liofilizador (figura 22). Existem diferentes liofilizadores que são projetados de acordo com as diversas aplicações. Estes são constituídos essencialmente por uma câmara de secagem, um condensador, uma bomba de vácuo e um refrigerador (Lavakumar, 2013).

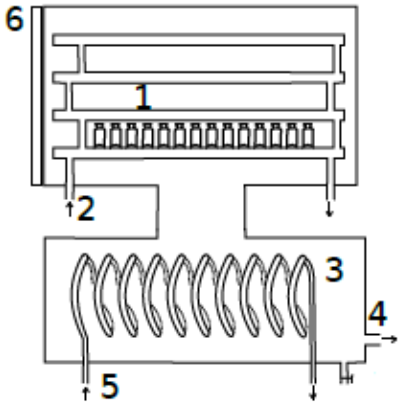


Figura 22 – Representação esquemática de um liofilizador. (1) Câmara de secagem constituída por três prateleiras; (2) entrada de fluido circulante para a transferência de calor; (3) condensador; (4) conexão para a bomba de vácuo; (5) entrada do fluido refrigerante; (6) porta do liofilizador. Adapatado de Graberg, 2011.

A câmara de secagem é um compartimento composto por várias prateleiras onde o produto a ser liofilizado é disposto, geralmente, em frascos ou em tabuleiros. Esta câmara está projetada para suportar as pressões negativas usadas no processo. A maioria dos equipamentos já contém um sistema hidráulico que realiza, de forma automática, o fecho recipientes simultaneamente. A carga e descarga do produto são realizadas através da porta da câmara que fecha hermeticamente (Lavakumar, 2013).

O condensador pode localizar-se no mesmo compartimento da câmara de secagem (condensador interno) ou num compartimento separado (condensador externo) estando ligado diretamente a esta. A posição do condensador não implica a eficácia do processo e sendo assim este pode localizar-se na parte superior, inferior ou traseira à câmara. Já a

geometria que apresenta é um fator que afeta a taxa de sucesso do processo. Existem placas ou serpentinas no interior do condensador que contêm um fluido que está continuamente a ser resfriado pelo sistema de refrigeração, para que o vapor de água proveniente do processo de sublimação seja congelado. O condensador encontra-se ligado diretamente à bomba de vácuo. No decorrer da liofilização é importante que a temperatura na superfície do condensador se mantenha em determinado valor para que a pressão de vapor neste seja inferior â pressão da câmara (temperatura do condensador é normalmente -60°C) (Lavakumar, 2013).

A bomba de vácuo é um equipamento que tem como função remover os vapores não que não condensaram e estabelecer uma pressão de operação adequada. Existem dois tipos de bombas, as de difusão e rotativas ou então, com ambas as caraterísticas. Os equipamentos de maiores dimensões utilizam a bomba por difusão dada a sua maior capacidade de produzir vácuo. Tipicamente é requerida uma taxa de vácuo entre 50 a 100μ bar (Lavakumar, 2013).

Existem também outros componentes importantes para a funcionalização do processo (por exemplo, o sistema de arrefecimento do produto, o sistema de aquecimento do produto, o sistema de controlo do processo).

O sistema de aquecimento é necessário ao processo para estabelecer a energia que é requerida durante o ciclo de liofilização. Os liofilizadores tradicionais são providos de um fluido circulante para promover o aquecimento das prateleiras ou por resistências elétricas (no caso de aquecimento por condução) (Lavakumar, 2013).

O sistema de arrefecimento pode estar presente no liofilizador ou numa câmara à parte. Quando os produtos estão dispostos em frascos, a solidificação destes dá-se pelo seu arrefecimento utilizando, por exemplo, prateleiras refrigeradas, imersão em líquidos refrigerantes ou prateleiras com gelo seco picado. Quando são utilizados recipientes de alta capacidade, o processo de solidificação aplicado é, normalmente, a congelação em concha onde os recipientes são colocados em suportes rotativos com um banho refrigerante (Lavakumar, 2013).

Podem ainda existir componentes acessórios para auxiliarem o controlo do processo. Estes componentes adicionais podem ser medidores de pressão e pares termoelétricos (Lavakumar, 2013).

Capítulo 4

4. Processo de liofilização

A liofilização é um método que permite estabelecer a estabilidade a longo termo de um sistema coloidal. A redução da quantidade de solvente através da sublimação é uma técnica que impede toda a atividade biológica e reações químicas decorrentes no sistema. De forma a minimizar os problemas de estabilidade das nanodispersões coloidais recorre-se frequentemente ao processo da liofilização (BANSAL 2010).

O desenvolvimento deste processo inclui a passagem por diferentes fases até obter o produto liofilizado final (figura 23). Para executar este processo é necessário recorrer aos seguintes passos (Jennings, 2008):

- Dissolução da molécula ativa e dos excipientes num solvente adequado;
- Esterilização (filtração) da solução;
- Enchimento dos recipientes individuais estéreis;
- Solidificação da solução:
- Sublimação e secagem secundária;
- Fecho total dos recipientes.

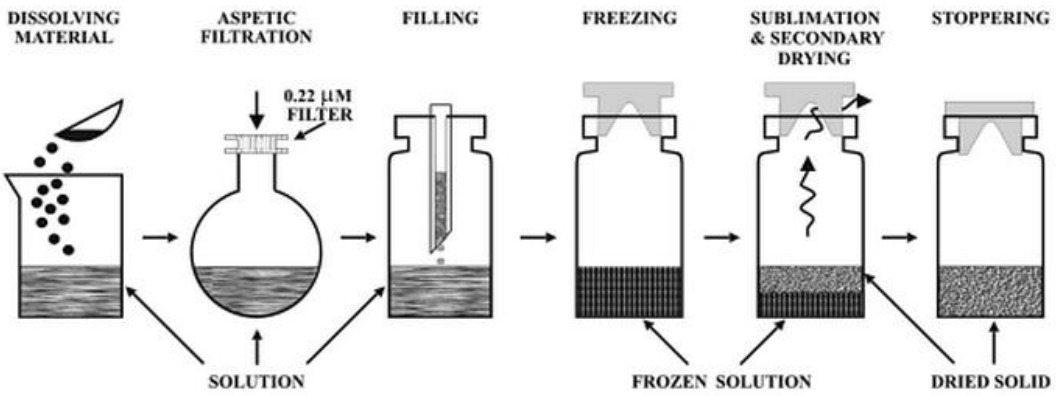


Figura 23 – Representação esquemática das fases envolvidas no processo de liofilização. Adaptado de Jennings, 2008.

O ciclo de liofilização baseia-se essencialmente na concretização de três etapas que definem a qualidade do produto liofilizado final, e portanto serão abordadas de seguida.

4.1 Etapas envolvidas

A execução desta técnica resume-se em três etapas, solidificação, secagem primária e secagem secundária (figura 24), estando o seu desempenho significativamente dependente da etapa de solidificação (BANSAL 2010).

Solidificação – o produto adquire o ponto de congelação;
Secagem primária – sublimação do solvente da matriz onde a maior porção é eliminada;
Secagem secundária – dessorção do solvente a partir da camada seca do produto de forma a retirar a porção adsorvida ao produto.

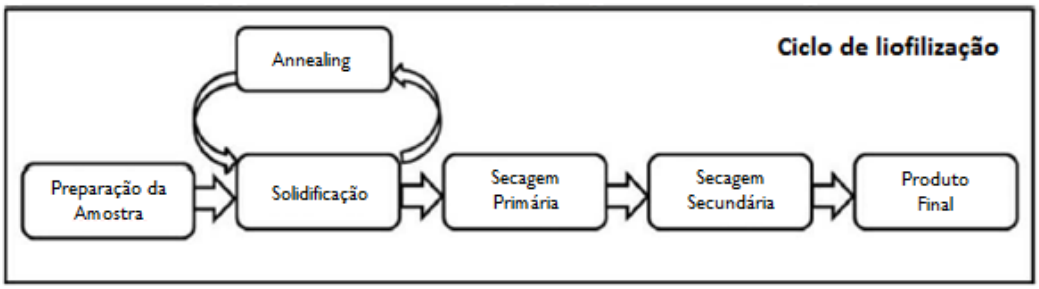


Figura 24 – Etapas envolvidas na liofilização (BANSAL 2010).

Solidificação

Esta etapa do processo é a fase mais crítica e será aquela em que é introduzida a primeira modificação no produto sendo maioritariamente responsável pelo produto final e pelo tempo que é necessário para secar a nanodispersão

Esta etapa dá-se pela formação de uma mistura eutética decorrente da cristalização do soluto e do solvente, adquirindo assim uma forma cristalina, ou pela cristalização apenas do solvente levando a uma forma amorfa com separação de fases (figura 25). A temperatura requerida nesta fase do processo apresenta valores entre -30° C e -50° C (Kumar, Prashanth, Kumari, 2011).

À medida que ocorre o arrefecimento, dá-se a formação dos cristais de gelo onde as moléculas de água se concentram nos núcleos cristalinos. Por esta razão, inicia-se a separação entre soluto e solvente (os solutos concentram-se na região intersticial da matriz) e a dispersão remanescente, ao atingir um valor crítico de concentração a determinada temperatura pode sofrer uma solidificação eutética ou transição vítrea. Se o soluto que se separou forma uma estrutura cristalina, isto está associado a um valor de temperatura

eutética. Se o soluto que se separou produz uma estrutura amorfa, isto remete para um valor de temperatura de transição vítrea (Kauppinen, 2015).

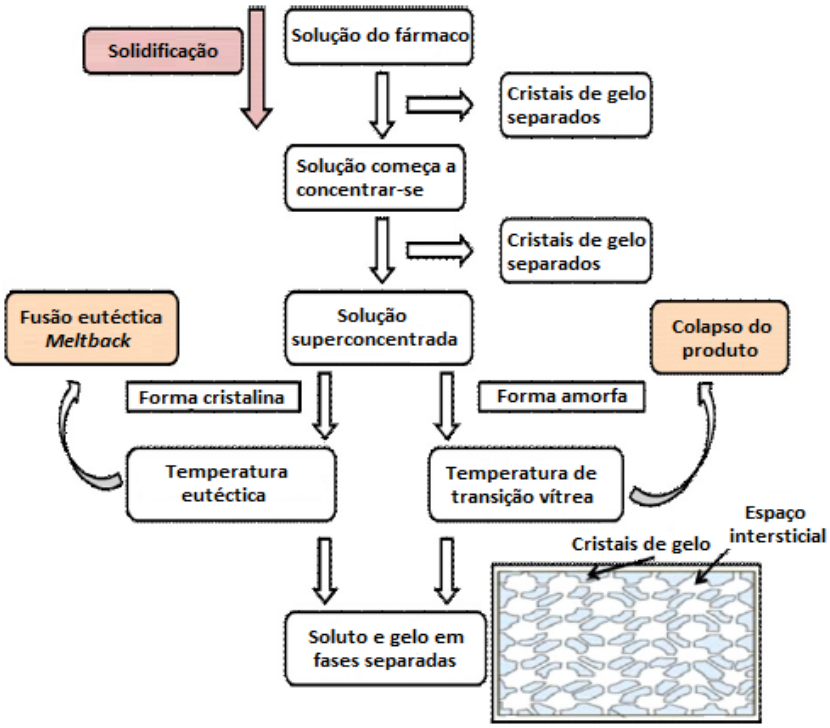


Figura 25 – Esquema que demonstra o conceito de temperatura eutética e temperatura de transição vítrea (BANSAL 2010).

Quando ocorre a separação de fases, há um aumento da concentração na restante dispersão que quando atinge determinado valor de viscosidade sofre uma transição vítrea. Uma estrutura amorfa sujeita-se ao fenómeno de transição vítrea quando ocorre uma transformação do estado líquido viscoso em estado vítreo. Portanto quando a temperatura de transição vítrea (Tg - abaixo da temperatura eutética) é atingida dá-se um aumento da viscosidade e consequentemente a redução da mobilidade molecular (figura 26) (BANSAL 2010, Khairnar, 2013).

Antes de adquirir um estado vítreo, a mistura alcança uma viscosidade que lhe permite conservar a estrutura e forma ao longo da liofilização – temperatura de colapso (BANSAL 2010).

Um fator importante na solidificação é a sua taxa de nucleação. A criação de núcleos ocorre devido à união das moléculas do solvente, presentes na dispersão, e isto marca o início da

cristalização. À medida que se juntam moléculas do solvente aos núcleos dá-se o processo de crescimento dos cristais levando a um estado de solidificação.

A estrutura optada pelos cristais de gelo durante esta etapa influencia o fluxo de vapor de água do produto seco para a superfície, portanto o comportamento do processo de liofilização está depende da etapa de congelação. Uma solidificação rápida (alto grau de *supercooling*) conduz à formação de cristais pequenos que devido ao seu tamanho não facilitam a taxa de sublimação. Pelo contrário, uma solidificação lenta exibe cristais de gelo maiores, que apresentam poros de maiores dimensões e que aceleram o processo de sublimação (Chang; Patro, 2004).

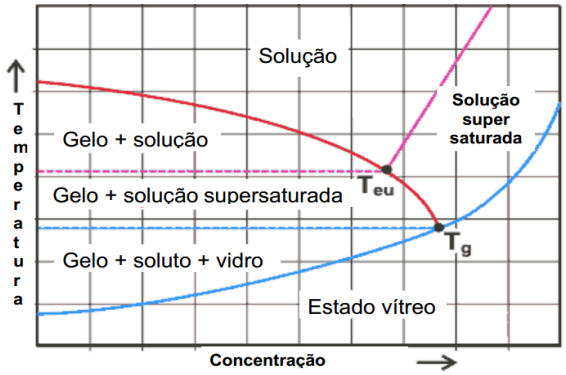


Figura 26 – Diagrama representativo do estado cristalino e do estado vítreo. Adapatado de Junior, 2004.

Como uma etapa prévia à secagem primária, existem vários métodos de solidificação que podem ser empregues aos produtos a ser liofilizados, com vista à sua transformação no estado sólido. Os produtos serão então submetidos, à priori, a um método de solidificação que poderá ser um dos seguintes (Kasper, 2011):

- Solidificação *shelf – ramp:* os vials são posicionados nas prateleiras do liofilizador e a temperatura destas diminui linearmente ao longo do tempo. Para finalizar a solidificação é requerido o tempo necessário que varia conforme a espessura da amostra. Quando se trata de amostras com uma espessura menor ou igual a 1cm, este processo poderá demorar 1 hora até que a temperatura de prateleira final seja atingida. Se a amostra possuir uma espessura de 2 cm, o processo poderá demora até 2 horas (Kasper, 2011);
- Solidificação por pré-arrefecimento da prateleira *(precooled shelf):* os vials são posicionados nas prateleiras do liofilizador, pré-arrefecidas, que possuem a

temperatura final desejada. Contudo este método desencadeia baixas taxas de solidificação e uma elevada heterogeneidade no *supercooling* entre os vials, o que faz com que seja exigido um elevado cuidado na atribuição da temperatura de prateleira final (Kasper, 2011);

- Solidificação direcional: os vials são colocados em contato com gelo seco para que se desenvolvam os cristais de gelo na parte inferior destes. Em seguida, estes são posicionados numa prateleira pré-arrefecida (tipicamente -50 °C) para que a solidificação ocorra lentamente e a propagação do gelo se desencadeie de forma vertical (Kasper, 2011);
- Solidificação *Quench* – Imersão dos vials*:* este método corresponde à imersão dos vials em nitrogénio líquido ou propano líquido ou ainda pela utilização de um banho de gelo seco/etanol ou gelo seco/acetona para posteriormente serem expostos nas prateleiras pré-arrefecidas. A aplicação deste tipo de solidificação induz altas taxas de solidificação e a formação de cristais de gelo heterogéneos (Kasper, 2011).

Quando o produto presente no recipiente apresenta uma camada superior a 1cm de espessura, o método de solidificação aplicado deverá ser (Kasper, 2011):

- Solidificação em concha (*shell freezing*) ou *spin freezing:* os frascos são imersos num banho refrigerado e permanecem em rotação durante o processo. Este método promove uma diminuição da espessura do produto e um aumento da sua área superficial, levando à redução do tempo de secagem primária e portanto maximiza o ciclo de liofilização (Kasper, 2011).

Secagem primária

Na secagem primária ocorre a sublimação da amostra congelada sob condições de vácuo, pressão reduzida e com a adição de calor (a temperatura adequada para ocorrer a sublimação). Normalmente para produtos farmacêuticos são usadas pressões que variam entre 30 a 300mTorr dependendo da temperatura do produto congelado e do recipiente utilizado (Khairnar, 2013) e temperaturas de prateleira que poderão se encontrar numa gama de valores entre -30° C a -10° C (Kumar, Prashanth, Kumari, 2011). Para que ocorra a sublimação do produto, este processo requer a transmissão de calor e a transferência de massa, simultaneamente (figura 27) (Khairnar, 2013).

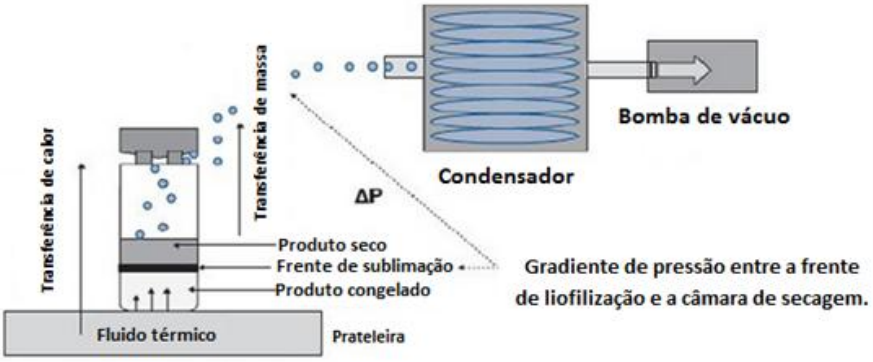


Figura 27 – Transferência de calor e massa durante a secagem primária. Adaptado de Khairnar, 2013.

O produto é submetido à câmara de secagem, onde o ar presente no seu interior é removido por bombas de alto vácuo, de modo a criar um ambiente desprovido de oxigénio que será favorável à manutenção das caraterísticas originais do produto. Através das condições referidas anteriormente, as moléculas de água passam ao seu estado gasoso onde o vapor de água formado migra para a superfície da amostra através da camada seca do produto. O vapor de água sai então da câmara de secagem com destino ao condensador para ocorrer a condensação de todo o vapor libertado do produto. O produto final liofilizado tem um aspeto poroso (formação de um tampão com estrutura porosa) devido aos espaços ocupados pelos cristais de gelo (Khairnar, 2013).

Durante a sublimação, a temperatura do produto deve ser inferior à temperatura crítica da formulação, temperatura eutética para formas cristalinas e temperatura de transição vítrea para formas amorfas (figura 28), de forma a evitar os fenómenos de *meltback* ou de colapso do produto, respetivamente (Nail, Gatin, 1993; Bansal, 2010).

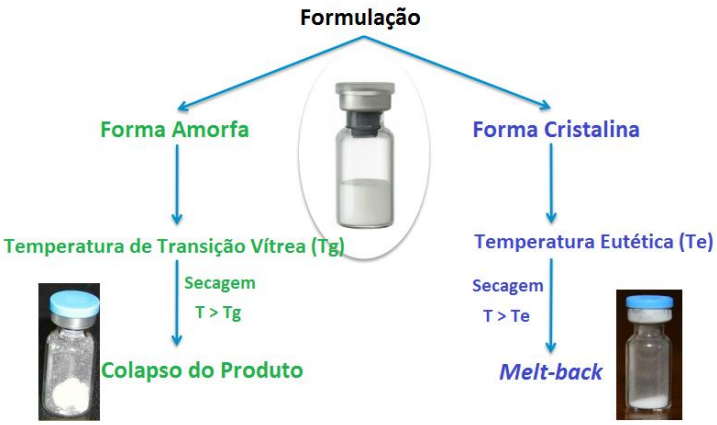


Figura 28 – Representação dos fenómenos de colapso do produto e *melt-back*. Fonte: Próprio autor.

Estas temperaturas dizem respeito à temperatura do produto máxima permitida (tolerável), na frente de sublimação (interface entre a camada seca e congelada do produto), para que não ocorra a perda da qualidade do produto, e portanto a determinação da temperatura crítica da formulação é um fator essencial no desenvolvimento de um ciclo de liofilização. A calorimetria de varredura diferencial (*differential scanning calorimetry* - DSC) e a microscopia de liofilização baseada na transmissão da luz (*light transmission freeze-dry microscopy* LT-FDM) são métodos normalmente empregues para obter experimentalmente o valor deste parâmetro chave no processo de liofilização (Kauppinen, 2015).

Secagem secundária

Este tipo de secagem promove a eliminação do solvente que não congelou e consequentemente também não sofreu sublimação durante a secagem primária. Nesta fase, a água adsorvida ao produto é removida pela dessorção da camada seca do produto através da aplicação de calor, sob vácuo. A elevação da temperatura da prateleira varia entre 15 a 30 ^{0} C e pode ser mantida durante um longo período de tempo. A restante água é retirada por evaporação sem que haja uma eliminação total do solvente (figura 29). A formulação contida no recipiente é selada por um sistema de fecho e o produto pode ser retirado do liofilizador. Toda esta etapa requer um aumento da temperatura, mantendo uma pressão reduzida, até que seja estabelecido um valor de humidade residual. A estabilidade de uma molécula ativa aumenta com a redução da humidade. Por isso é importante alcançar o mínimo de humidade residual de forma a não ser possível desenvolver reações químicas ou atividade biológica (Khairnar, 2013).

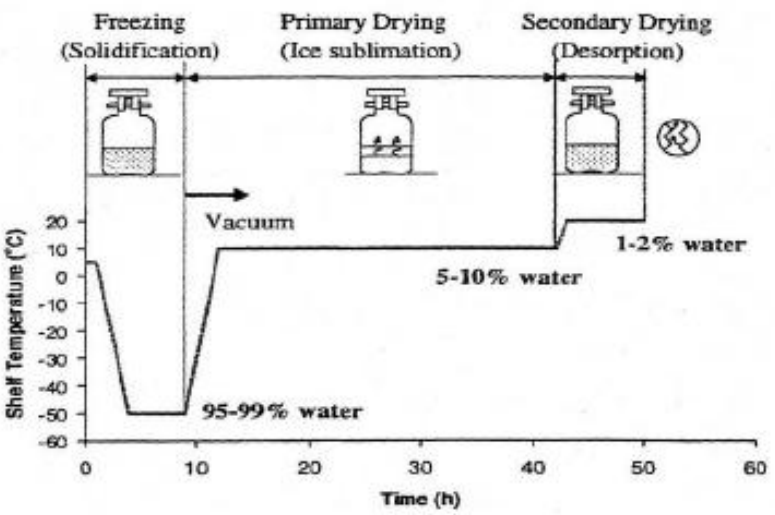


Figura 29 – Representação do processo de liofilização (Kumar, Prashanth, Kumari, 2011).

Em suma, as etapas fundamentais do ciclo de liofilização (figura 30) são:

- Solidificação: onde ocorre a congelação do produto sob condições de baixa temperatura;
- Vácuo: o produto congelado é posteriormente colocado em condições de vácuo para sofrer o processo de sublimação;
- Calor: depois do produto estar congelado é aplicada uma temperatura superior para acelerar o processo;
- Condensação: as placas do condensador, por apresentar uma baixa temperatura, retiram o solvente na forma de vapor da câmara de vácuo, voltando a convertê-lo num estado sólido;
- Dessorção do solvente: remoção da água adsorvida ao produto.

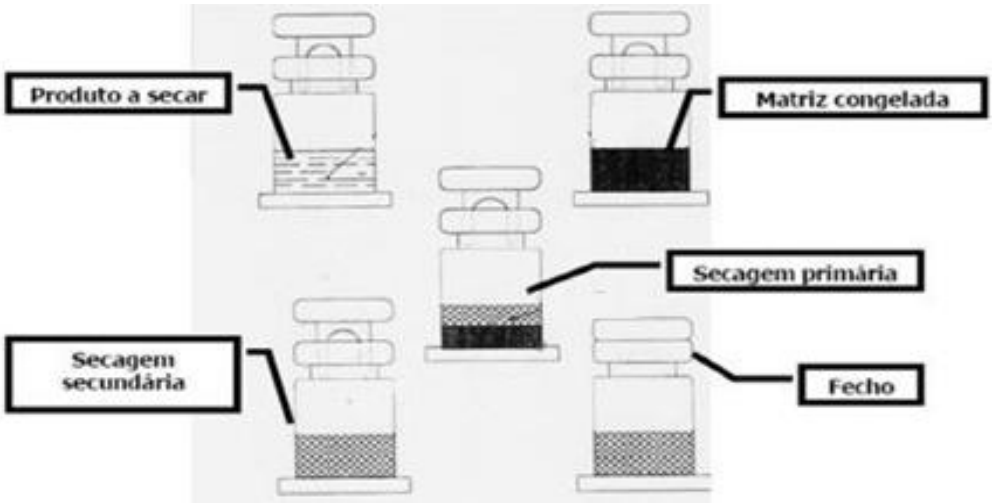


Figura 30 – Representação das várias etapas envolvidas no processo de liofilização. Adaptado de Jennings, 2008.

4.2 Fatores que afetam a taxa do processo de liofilização

✓ **Taxa de transferência de calor**

O aquecimento do sistema origina uma interface (frente de sublimação) entre a camada seca e a camada congelada do produto (figura 31). Para que ocorra a sublimação das moléculas de água presentes no produto é necessário a transmissão de calor para o sistema. Se não existir uma fonte de calor aplicada a este, o gradiente de pressão entre a interface de sublimação e a câmara de secagem anula-se e origina um equilíbrio do sistema. Além disso, a existência de

um diferencial de temperatura entre o produto e o condensador, e um gradiente de pressão entre a dispersão no vial e o condensador, é essencial para que se desencadeie a passagem do vapor de água do vial para o condensador. Quanto maior for este diferencial, maior será a velocidade de secagem.

A migração do vapor de água através da camada seca até atingir o condensador está dependente do consumo de energia. À medida que a resistência aumenta, mais energia é necessária para ocorrer o fluxo de vapor. Portanto, a temperatura do produto aumenta com o aumento da resistência.

O calor fornecido ao sistema pode ser por condução, convecção e/ou radiação. A taxa de transmissão de calor é influenciada por vários parâmetros sendo eles: (1) a prateleira do liofilizador, (2) o tabuleiro onde os frascos são colocados, (3) o vial de vidro e (4) o produto congelado acondicionado no vial (Jadhav, 2015).

O valor da temperatura do produto é mais elevado nos lados dianteiro e traseiro da prateleira do que no seu interior. Os frascos que se encontram no centro da prateleira encontram-se mais protegidos em relação aos restantes e isto deve-se ao fato de existir uma transferência de calor adicional proveniente da porta e das paredes da câmara (Minhaj, 2015).

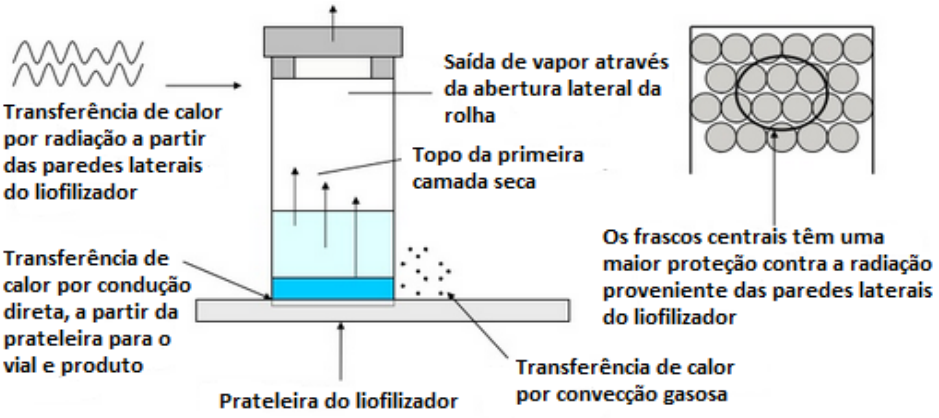


Figure 31 – Mecanismos de transferência de calor. Adaptado de Cook, 2010.

- ✓ **Taxa de Transferência de massa**

A transferência de vapor de água da frente de sublimação do produto para a superfície dá-se por um mecanismo conhecido por transferência de massa (figura 32). A sublimação realiza-se pela transferência de massa, em que o vapor de água atravessa a matriz seca do produto até chegar ao condensador. Esta situação verifica-se quando existe um gradiente de pressão

de vapor entre a frente de sublimação do produto e o condensador, fazendo com que as moléculas de água na forma de vapor migrem da região de maior pressão para a de menor (Jadhav, 2015).

Quando se processa a transferência de massa existem determinadas resistências com que esta se depara, tais como, a camada seca, o recipiente ou vial, a tampa do vial inserida parcialmente e a passagem (trajeto) do vapor de água da câmara para o condensador que podem comprometer o sucesso do processo de liofilização. No decorrer da secagem do produto, a profundidade da camada seca sofre um aumento e vai oferecer uma resistência cada vez maior ao fluxo de vapor (Jadhav, 2015).

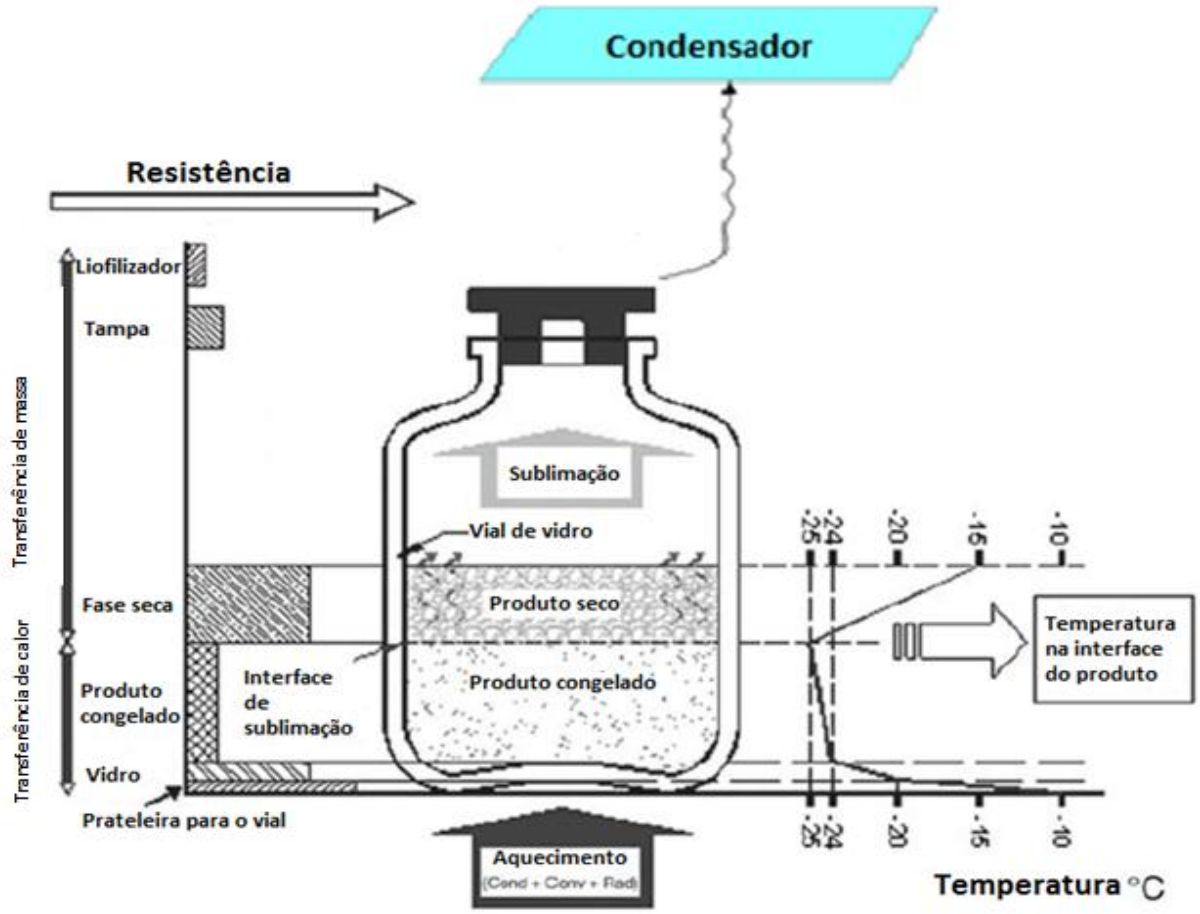


Figura 32 – Transferência de calor e massa durante a liofilização. (Rey, 2010)

4.3 Impacto do recipiente e tampa no processo de liofilização

O *design* e tamanho do recipiente e a respetiva tampa utilizados no processo de liofilização têm uma grande influência no desempenho deste e consequentemente a qualidade do liofilizado final. No caso dos vials, a geometria e tamanho destes influenciam a transferência de calor e a tampa utilizada influencia a transferência de massa (Rey, 2010).

Os recipientes mais utilizados no processo de liofilização de produtos biofarmacêuticos são os vials e as ampolas. As ampolas (figura33) são pequenos recipientes de vidro e não providenciam de qualquer tampa. Estas requerem um cuidado especial por serem recipientes autoquebráveis, pois apresentam um maior risco de quebrar antes da utilização (Rey, 2010).

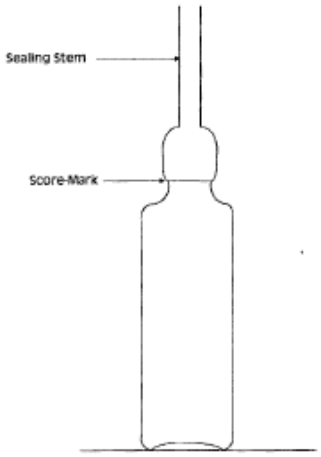


Figura 33 – Ampolas de vidro usadas no processo de liofilização (Rey, 2010).

Os vials (frascos) utilizados no processo podem ser frascos tubulares de vidro do tipo I (embalagens especificas para o acondicionamento de injetáveis e liofilizados), frascos moldados de vidro (figura 34) ou produzidos a partir de plástico tal como o copolímero de olefina cíclica. Os frascos de vidro possuem um sistema de fecho composto por uma rolha de borracha especial que possui uma abertura para a saída de vapor durante a liofilização, e um anel de alumínio aplicado na terminação dos vials de vidro (Rey, 2010).

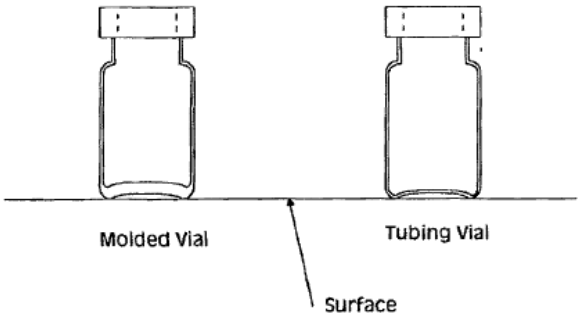


Figura 34 – Frascos tubulares de vidro versus Frascos moldados (Rey, 2010).

Quando se pretende obter pequenos volumes de liofilizado, geralmente, são escolhidos os vials e as ampolas. O vial de vidro tipo I é normalmente o mais utilizado no acondicionamento de produtos biofarmacêuticos devido à baixa interação com o produto acondicionado e alto desempenho mecânico deste tipo de embalagem. Os vials moldados são tipicamente indicados para volumes ≥ 50 ml de liofilizado. Dado que os fármacos oncológicos são produtos de maior volume, pode ser necessário recorrer ao uso de vials de vidro moldado. Os vials de copolímero de olefina cíclica têm sido alvo de estudo para o acondicionamento de liofilizados e demostram uma maior uniformidade do liofilizado final (Bhambhani; Medi, 2010; Troy; Beringer, 2006).

Existem também outros formatos que são um foco para a indústria farmacêutica pois apresentam um tempo de reconstituição rápido. Os dispositivos de dupla câmara, que possuem dois compartimentos separados, um constituído pelo liofilizado e outro pela solução de reconstituição, oferecem uma maior comodidade ao paciente e possibilidade de autoadministração. A utilização de seringas de dupla câmara (figura 35) também está a ganhar uma grande afluência devido ao fato da maioria dos liofilizados apresentarem uma formulação para injetáveis. Este tipo de dispositivo é o formato mais inovador dedicado aos produtos liofilizados (Bhambhani; Medi, 2010; Minhaj, 2015).

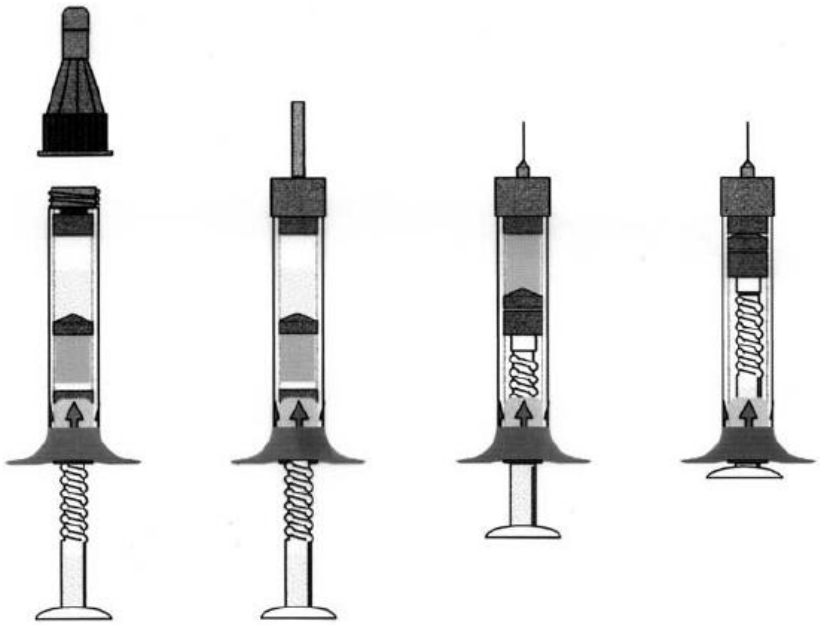


Figura 35 – Seringas de dupla câmara (Genotropin MiniQuick). Adapatado de Rey, 2010.

Um vial de dupla câmara (figura 36) é composto por um compartimento superior que contém o diluente e outro inferior com o produto liofilizado. A separação das duas câmaras é conseguida pela existência de uma rolha de elastómero central. Para utilização deste formato, o utilizador deve pressionar um ativador de plástico, de forma a que a rolha central seja forçada e o diluente passará assim para o compartimento inferior. O processo de reconstituição realiza-se assim desta forma (Rey, 2010).

Figura 36 – Produto liofilizado num vial de dupla câmara (Act-O-Vial). Adaptado de Rey, 2010.

Os cartuchos de dupla câmara (figura 37) são seringas cilíndricas que possuem dois compartimentos, o frontal para alojar o produto liofilizado e o outro para armazenar o diluente. Na câmara frontal existe uma região do fecho de elastómero que necessita de ser perfurada. A câmara inferior que contém o diluente possui um êmbolo de elastómero na parte final. A passagem do diluente para a câmara do produto liofilizada é realizada através de um *bypass* em que este pode ser externo ou interno (ranhura interna no dispositivo) (Rey, 2010).

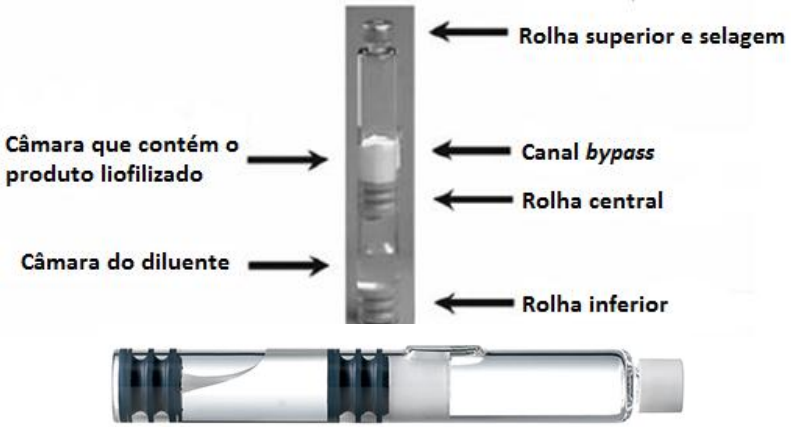


Figura 37 – Cartucho de dupla câmara (Genotropin). Adapatado de Rey, 2010.

Uma solução inovadora para o armazenamento e processo de reconstituição de produtos liofilizados é a seringa esterilizada WFI (figura 38). Este dispositivo que contém a água esterilizada WFI pode ser um complemento aos frascos que contêm a molécula ativa liofilizada. Uma seringa com o diluente adequado para injetar nos frascos reduz os componentes e as etapas necessárias para realizar a reconstituição da terapia, além de minimizar possíveis erros de manuseamento (Drug Development & Delivery, 2014).

Seringa para injeção de água estéril

Figura 38 – Seringa SWFI. Adapatado de Drug Development & Delivery, 2014.

Quando se trata de grandes quantidades de produto (*bulk product*) que se pretende liofilizar, são utilizados tabuleiros que o acondicionam ao longo do processo de liofilização. Estes podem ser compostos de aço inoxidável ou de alumínio (condutividade térmica alta) com revestimento interior de aço inoxidável formando tabuleiros de topo aberto. Este tipo de recipiente levanta problemas que podem ser ocasionados devido à rutura do produto trazendo desvantagens como a contaminação do equipamento, perda do material e problemas de limpeza (Kauppinen, 2015).

Uma recente inovação (figura 39), o Lyoguard®, foi desenvolvida com vista a suprir as dificuldades apontadas pelo uso dos tabuleiros tradicionais. Este novo recipiente tem a vantagem de possuir uma membrana semipermeável que confere uma maior proteção ao produto relativamente a partículas contaminantes ou humidade atmosférica, e da mesma forma permite a permeação do vapor de água (Patel, 2011).

Figura 39 – Lyoguard® utilizado num processo de liofilização (Varshney, 2015).

Sistema recipiente-fecho

Um sistema recipiente-fecho é composto por um vial de vidro e uma tampa de elastómero (figura 40). Normalmente o liofilizador é provido de um mecanismo de fecho que tem a função de selar os recipientes. Este mecanismo pressiona o fecho para o interior do frasco de forma a proteger o produto da exposição ao meio ambiente. O produto só pode ser retirado do liofilizador, de forma segura, quando o fecho do vial estiver devidamente correto. Posteriormente a rolha é selada com uma tampa de metal ou de plástico colorido (Rey, 2010; Troy; Beringer, 2006).

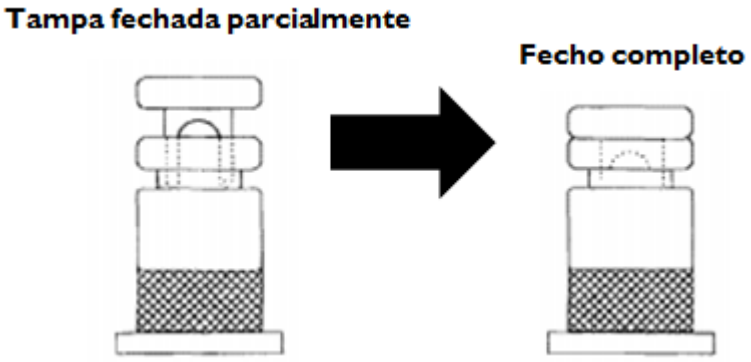


Figura 40 – Ilustração de um frasco fechado parcialmente versus fechado completamente. Adapatado de Jennings, 2008.

4.4 Otimização do processo de liofilização

Um processo de liofilização otimizado requer um controle das condições de operação para ser possível adquirir um produto liofilizado de qualidade num período de tempo mais reduzido e com menor consumo energético (Chang; Patro, 2004).

O controlo e a identificação dos parâmetros críticos deste processo podem ser otimizados recorrendo às ferramentas PAT (Process Analytical Technology), um novo conceito introduzido pela FDA para aumentar a eficiência do processo de produção farmacêutica (Schneid, 2009).

O *design* de um ciclo de liofilização ótimo e a complexidade deste processo fazem com que seja necessário o controlo de variados parâmetros implícitos neste, relacionados com o equipamento usado, o produto em questão e o ciclo de liofilização (Mayeresse, 2007).

Relativamente ao equipamento utilizado, o liofilizador, o seu desempenho bem como o tamanho que apresenta são parâmetros que requerem uma atenção para a projeção do processo de liofilização (Mayeresse, 2007).

Quanto ao produto, é importante ter em conta as propriedades críticas da formulação, o seu volume, o recipiente e a tampa utilizada. O conhecimento da temperatura crítica da formulação, das propriedades dos excipientes empregues e da estabilidade desta contribuem para formatação de um processo eficiente (Mayeresse, 2007).

Cada ciclo de liofilização está dependente de três variáveis que são essenciais no processo, a temperatura da prateleira (ts), a pressão da câmara (pc) e o tempo. O controlo destas variáveis é uma prática de extrema importância no decorrer de cada ciclo (Mayeresse, 2007).

No sentido de otimizar este processo, alguns investigadores têm vindo a desenvolver modelos matemáticos que revelam dados importantes para o delineamento do processo de liofilização, nomeadamente, prever o comportamento do produto no decorrer do processo, diminuir o número de experiências/ensaios e obter variáveis impossíveis de medir experimentalmente (Chang; Patro, 2004).

Como dito anteriormente, a etapa de solidificação é a responsável pelo crescimento e morfologia que os cristais de gelo adquirem e pela distribuição de tamanho, que consequentemente interfere na taxa de sublimação. A taxa de arrefecimento do produto é decisiva na morfologia e tamanho que os cristais de gelo e os poros da matriz adquirem podendo ser determinada da seguinte forma (I) (Kumar, Prashanth, Kumari, 2011):

$$V = \frac{dT(r,t)}{dt} \qquad (I)$$

onde T é a temperatura em função da localização (r) e do tempo (t).

O desenvolvimento de cristais de gelo com um tamanho uniforme é uma ótima opção para otimizar o processo de liofilização. Alguns investigadores relatam a importância de incluir um tratamento térmico (*annealing*) nesta fase do processo no sentido de conduzir a uma homogeneidade no crescimento dos cristais (Abdelwahed et al., 2006). Se o tratamento de *annealing* induzir cristais dispersos homogeneamente, a secagem primária ocorrerá num tempo mais curto e o produto liofilizado será de fácil reidratação (Chang; Patro, 2004).

Existem novos métodos de solidificação que permitem controlar a nucleação dos cristais de gelo produzindo os lotes referentes ao produto mais homogéneos, e nomeadamente ciclos de liofilização mais rápidos. Alguns destes métodos que podem ser utilizados para otimizar o processo são (Kasper, Friess, 2011):

- ✓ Técnica de "*ice fog*" (aplicação de gás frio no liofilizador produz uma suspensão de vapor de pequenas partículas, que quando entram em contacto com a amostra de cada vial, promovem a nucleação dos cristais de gelo);
- ✓ Nucleação do gelo controlada por ultra-som (o ultra-som leva à formação de bolhas de cavitação em que o seu colapso origina alta pressão por um período reduzido induzindo a nucleação);
- ✓ *Electrofreezing* (a imersão de elétrodos na amostra provoca um alto campo elétrico, pulsado ou continuo, induzindo a nucleação dos cristais de gelo);
- ✓ Solidificação induzida por vácuo (a amostra é submetida ao vácuo e a baixas temperaturas onde a entalpia de vaporização é suficiente para formar uma fina camada de gelo na superfície do produto, permitindo o desenvolvimento de grandes cristais de gelo);
- ✓ Método de despressurização (primeiramente a câmara de secagem sofre uma pressurização de gás onde o produto é arrefecido para uma temperatura de solidificação desejada. Numa fase posterior, a câmara é despressurizada com o intuito de iniciar o processo de nucleação do gelo;
- ✓ Adição de agentes de nucleação;
- ✓ Pré-tratamento dos vials.

Estes métodos ajudam a controlar a etapa de solidificação mas como podem comprometer a esterilidade do lote, pelo fato de serem invasivos, não são empregues numa escala de produção. Ao serem utilizadas as ferramentas PAT, mais propriamente através da tecnologia ContrLyo, é possível controlar a solidificação do produto numa escala piloto e de produção. Esta promove a nucleação simultânea de todo o produto e a formação de grandes cristais de gelo, pela aplicação de uma pressurização e despressurização rápida na câmara do liofilizador, sendo possível obter uma uniformidade e homogeneidade entre os frascos. Quando a solidificação ocorre sem o controlo da nucleação dos cristais de gelo, esta poderá

iniciar-se em temperaturas e tempos diferentes do processo podendo variar o grau de *supercooling* entre produtos do mesmo lote (Varshney, Singh, 2015).

A figura seguinte retrata o processo de solidificação de uma amostra, onde a nucleação dos cristais de gelo é controlada pela tecnologia Lyostar™3.

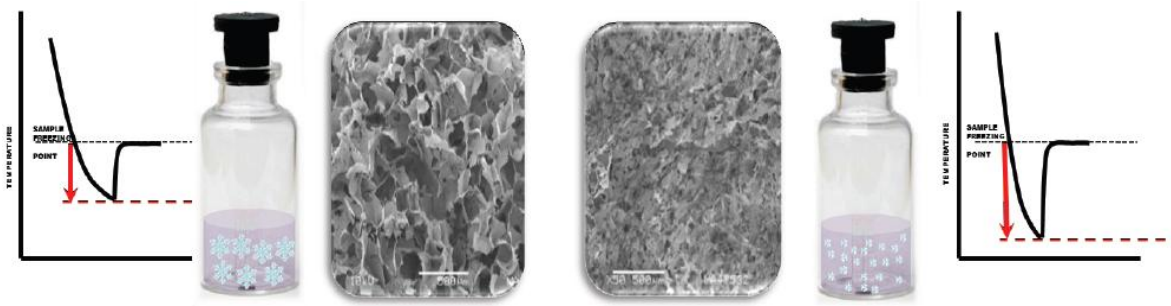


Figura 41 – Solidificação com a nucleação dos cristais de gelo controlada. A imagem da esquerda representa uma solidificação com um baixo grau de *supercooling*, e a da direita, representa uma solidificação com um alto grau de *supercooling (*Lyostar™3).

A secagem primária é a etapa que apresenta uma maior duração no processo de liofilização sendo que a indústria centra-se na sua otimização. Um fabricante de produtos liofilizados deve ser conhecedor da temperatura crítica da formulação, uma vez que esta é um fator chave para delinear um ciclo de liofilização eficiente. Normalmente esta é determinada pelos métodos de microscopia de liofilização baseada na transmissão da luz (LT-FDM) ou calorimetria de varredura diferencial mas uma nova tecnologia demonstra ser mais eficiente que as anteriores. A microscopia de liofilização baseada na tomografia de coerência ótima (OCT-FDM) é uma inovação que oferece imagens em 3D, em tempo real, da formulação farmacêutica no vial, a qual permite observar alterações estruturais do produto e determinar a temperatura à qual o produto resistir sem sofrer colapso (Varshney, Singh, 2015).

.

Ao ter conhecimento do valor da temperatura de colapso do produto, recorrendo às técnicas citadas anteriormente, é possível controlar o calor que é transmitido a este através da monotorização da temperatura de prateleira, ou seja, é necessário incluir medições da temperatura do produto, ao longo da secagem primária, e realizar os corretos ajustes na temperatura de prateleira até que o produto atinga a temperatura pretendida (o processo repete-se até que o produto apresente um valor de temperatura 5 a 40°C menor que a temperatura de prateleira). A temperatura do produto deve-se manter 3 a 5°C abaixo da temperatura crítica (temperatura eutéctica ou temperatura de transição vítrea), como

margem de segurança, contudo, convém salientar que será possível reduzir o ciclo de liofilização até 13% por cada grau a mais de temperatura. Os produtos que possuem temperaturas de colapso de valor elevado são preferenciais neste processo, na medida em que favorecem a taxa de sublimação pelo aumento do gradiente de pressão do vapor do gelo entre o produto e o condensador (Kauppinen, 2015).
Quanto mais reduzida for a pressão do vapor na câmara de secagem, maior será a taxa de transferência de massa. Na literatura está evidenciado que um valor ótimo de pressão na câmara de secagem resulta num processo de sublimação eficaz fazendo-se acompanhar por uma transmissão de calor uniforme entre os frascos. Portanto a otimização desta etapa visa maximizar a velocidade da frente de sublimação (interface de sublimação) reduzindo o seu tempo de duração (Chang; Patro, 2004).

Para que não ocorra um aumento da pressão na câmara de secagem, como consequência da formação de vapor de água, existe um elemento essencial que faz parte dos componentes de um liofilizador, o condensador, que se encarrega de remover o vapor de água presente na câmara para garantir a permanência da condição de não equilíbrio do sistema. Como tal, a ausência deste componente provoca uma paragem no processo de sublimação dado que a presença de vapor de água na câmara levaria a uma condição de equilíbrio do sistema (Rey, 2010).

Para reduzir o número de tentativas desenvolvidas para delinear um ciclo de liofilização foi desenvolvida uma nova tecnologia que optima automaticamente o processo. O SMART, uma ferramenta de Tecnologia do Processo Analítico (PAT), consegue determinar e manter a temperatura alvo do produto, ajustando automaticamente a temperatura da prateleira e pressão da câmara, e ainda realizar um ciclo de liofilização adequado a produtos cristalinos ou amorfos, onde mantém presente o processo de *annealing* quando se trata de materiais cristalinos (Kauppinen, 2015).

A transferência de massa que ocorre no sistema pode encontrar várias resistências que diminuem a taxa de sublimação (a resistência da camada seca do produto (Rp), da tampa (Rs), da passagem da câmara para o condensador). A maior resistência é a da camada seca pois as moléculas de água passam pelos poros e canais existentes na matriz porosa para alcançar o seu destino, o condensador. A equação de Pikal (2) que expressa a taxa da

transferência de massa, dm/dt, que ocorre durante a secagem primária é a seguinte (Kauppinen, 2015):

$$\frac{dm}{dt} = \frac{p_0 - p_c}{R_p - R_s}, \qquad (2)$$

onde p_0 é a pressão de vapor da água em equilíbrio.

Nesta equação pode ser observado que uma diminuição da pressão de vapor da câmara induz um aumento da taxa de transferência de massa (Kauppinen, 2015).

Esta etapa pode ser otimizada pelo aumento dos espaços intersticiais presentes na estrutura porosa que reduzem o tempo de duração da secagem (Rey, 2010).
Uma estratégia para reduzir este tipo de resistências pode ser a modificação do *design* do frasco e do tipo de geometria do liofilizador (Tang, Pikal, 2004). O *design* geométrico do liofilizador interfere com o processo de liofilização de maneira que controla a temperatura do produto na interface de sublimação e na transferência de vapor para o condensador. A taxa de sublimação está comprometida com o *design* que a câmara de secagem apresenta. Cada superfície da câmara pode apresentar emissividades diferentes logo a transferência de calor também varia (Chang; Patro, 2004; Minhaj, 2015).

Têm surgido novos desenvolvimentos com o objetivo de otimizar os vials de produtos liofilizados e melhorar a performance na transferência de calor. O exemplo de um novo desenvolvimento para produtos liofilizados é o vial SCHOTT TopLyo™, um frasco tubular, que resulta da combinação da camada interna hidrofóbica com uma geometria de fundo otimizada (desenho do fundo especial para liofilizados). Este tipo de recipiente promove um processo de liofilização mais eficaz dado que tal geometria é dimensionada com o intuito de melhorar a transparência térmica e reduzir a quebra do vidro. Outro exemplo, é o vial EasyLyo™, um frasco moldado tipo I, que é uma inovação ao serviço da liofilização. Este apresenta uma melhor resistência aos choques térmicos e mecânicos decorrentes do processo de liofilização (Hibler; Wagner; Henning; 2012).

Durante o processo de liofilização é necessário a existência de uma fonte térmica (placa do liofilizador) que transmita calor ao sistema. As moléculas de água ao se transformarem em vapor de água consomem o calor latente da sublimação ($\Delta Hs \approx 670$ cal/g) e a temperatura

do produto congelado reduzirá. Se não existir uma fonte de calor, a pressão de vapor de água no produto vai-se igualar à pressão parcial de vapor de água na câmara e o processo de sublimação encerra. O calor que é consumido durante a sublimação e a taxa de transferência das moléculas de água, na forma de vapor, são parâmetros que influenciam a taxa de remoção de calor (dQ/dt) a partir do produto. Desta forma, esta pode ser determinada a partir da seguinte equação (3) (Kauppinen, 2015):

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{dm}{dt} \Delta H_s \tag{3}$$

A profundidade de enchimento também é um fator que compromete a duração da secagem primária. Durante a etapa de secagem, a camada no topo do produto é a que seca primeiro sendo que a frente de secagem orienta-se a partir dessa camada em direção à parte inferior. Um produto de baixa espessura faz com que as moléculas de água enfrentem uma resistência menor quando passam pela sua camada seca comparativamente a um de espessura elevada, e portanto transforma a secagem primária numa etapa mais rápida. Dado que um volume de enchimento menor proporciona um menor tempo de secagem, a utilização de frascos com um diâmetro maior permite diminuir o volume e possibilita uma maior transferência de calor (Chang; Patro, 2004; Minhaj, 2015). Durante a transferência de calor, a temperatura do produto é menor nos frascos que se encontram no interior da prateleira e maior para os que se localizam nas margens. De forma a contornar este problema normalmente procede-se à colocação de frascos vazios nas margens ou à colocação de uma folha de alumínio no lado de fora da porta, solucionando desta forma a heterogeneidade verificada (Minhaj, 2015).

Com vista a melhorar a condutibilidade térmica, existem liofilizadores que têm como acessório tabuleiros de fundo removível (figura 42). Os frascos com o produto a liofilizar podem ser agrupados nestes tabuleiros cuja base é retirada, ficando em contacto direto com as prateleiras, o que permite uma melhor absorção de calor necessária ao processo de solidificação (MANUAL BÁSICO DE LIOFILIZACIÓN).

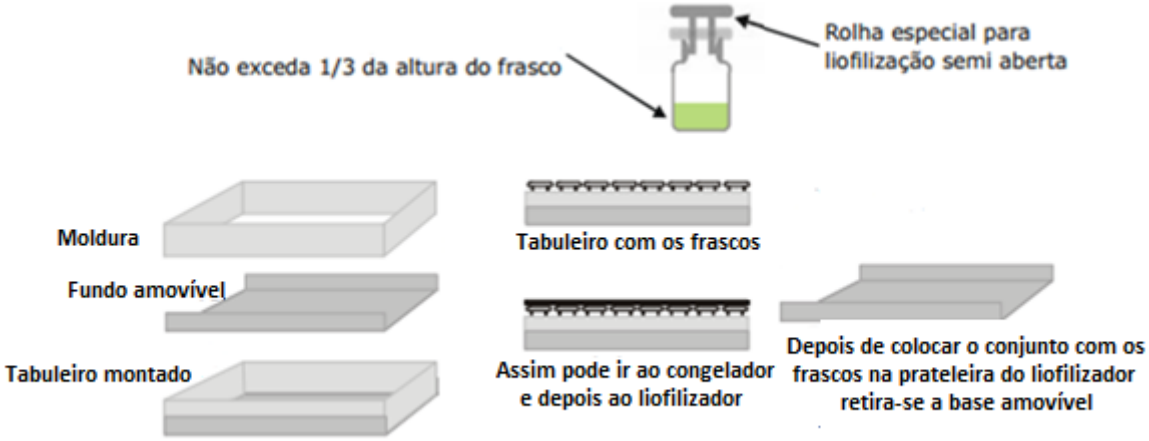


Figura 42 – Tabuleiros de fundo removível utilizados no processo de liofilização. Adaptado do MANUAL BÁSICO DE LIOFILIZACIÓN.

De forma a melhorar o controlo deste processo, existem vários testes para determinar o ponto final da etapa primária. O simples fato de iniciar prematuramente a secagem secundária, pelo aumento da temperatura de prateleira, pode comprometer a qualidade do produto, pois poderá resultar no colapso deste. Normalmente recorre-se ao uso de termopares, que são colocados na parte inferior e no centro geométrico do vial, para obter um registo da temperatura do produto quando todo o gelo já sublimou. O problema inerente ao uso deste método deve-se ao fato de não ser apropriado para um lote inteiro do produto, mas sim, para alguns vials que contêm o produto, fazendo com que os restantes não estejam incluídos nesta leitura (Pikal, Doen, Patel, 2010).
Alguns métodos que podem ser usados relativamente ao lote completo são por exemplo:

- Medidor de pirani e Manómero de capacitância

O medidor de pirani utiliza como base a condutividade térmica dos gases para medir a pressão na câmara de secagem (figura 43). Quando o processo de sublimação se completa, o vapor de água diminui e o nitrogénio passa a marcar a sua presença na câmara, fazendo com que a condutividade térmica seja alterada devido à mudança na composição do gás. O fim da secagem primária pode ser detetado então pela diminuição da pressão obtida pelo medidor de pirani (Pikal, Doen, Patel, 2010).
O manómetro de capacitância é utilizado para realizar a leitura da pressão absoluta (vácuo) presente na câmara do liofilizador, e simultaneamente controlar este parâmetro ao longo do processo de liofilização, sendo completamente independe da composição de gás que poderá

existir nesta. Ao utilizar unicamente este método não é possível determinar o ponto final da secagem primária, portanto é usado juntamente com o medidor de pirani para definir o fim do processo de sublimação. Quando estes dois métodos apresentam o mesmo valor de pressão, o ponto final da secagem primária é atingido (Pikal, Doen, Patel, 2010).

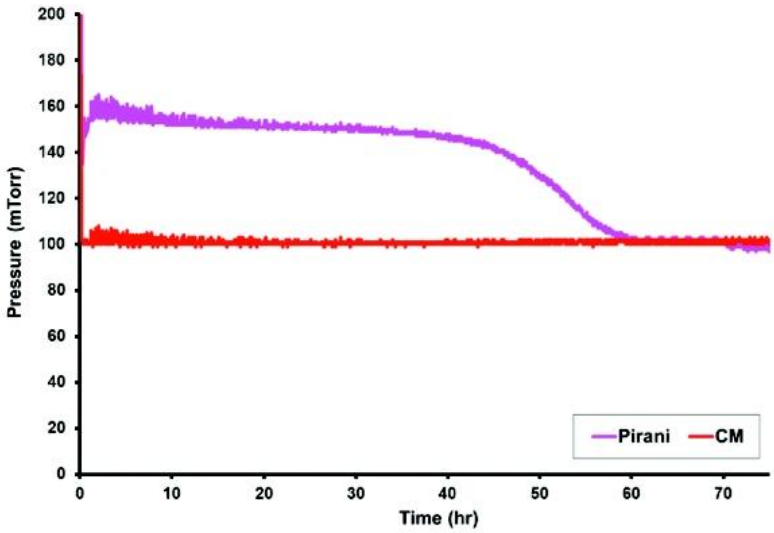


Figura 43 - Perfil da pressão de pirani durante a secagem primária (o medidor de pirani apresenta inicialmente valores de pressão maiores devido à condutividade térmica do vapor de água ser superior à do nitrogénio) (Shah, Lobo, Patel, 2013).

- Medição da temperatura manométrica – Teste de aumento da pressão

Este tem por base determinar se a pressão na câmara de secagem se eleva quando a válvula entre esta e o condensador é fechada. Se a pressão do vapor do gelo aumentar, este efeito significa que ainda reside água no produto. Pelo contrário, se a presença desta começa a diminuir, até que se iguala à pressão da câmara de secagem, isto corresponde ao ponto final da secagem primária (Pikal, Doen, Patel, 2010).

- Medidor eletrónico de humidade

Os sensores de humidade eletrónicos determinam a temperatura de ponto de orvalho que se for reduzida conduz a uma redução do vapor de água presente na câmara (Pikal, Doen, Patel, 2010).

- Espectroscopia de absorção do laser por díodo ajustável

Este método (*tunable diode laser absorption spectroscopy* - TLDA) pretende determinar a concentração de vapor de água existente na ligação entre a câmara e o condensador. Nesta ligação é atravessado um feixe de laser, com um comprimento de onda correspondente às linhas de absorção do vapor de água, para calcular o número de moléculas de água que fazem parte do espetro de absorção do vapor pela intensidade de radiação que é transmitida. Quando se verificar que o vapor de água diminui, isto coincide com o momento no qual o processo de sublimação se completa (Pikal, Doen, Patel, 2010).

- Espectroscopia de gás plasma (*Lyotrack*)

O Lyotrack é um sensor de humidade que determina a razão entre o vapor de água e o nitrogénio a partir da aplicação de radio frequência. Este dispositivo pode ser aplicado diretamente na câmara de secagem onde alta energia de rádio frequência, pela ionização das moléculas de água e nitrogénio, leva a que o gás presente na câmara forme o cold plasma. Os electrões presentes na câmara, ao absorve esta energia, passam para um estado excitado e quando regressam ao seu estado normal emitem luz. O comprimento de onda referente à luz emitida relata a concentração de vapor de água presenta na câmara. A diminuição desta é um indicador de mudança na composição de gás presente na câmara e portanto indica também o final da sublimação (Pikal, Doen, Patel, 2010).

A otimização da secagem secundária passa por minimizar a duração desta etapa para desenvolver um produto com a quantidade de humidade desejável sob condições que não provoquem o seu colapso. A humidade presente no produto é uma variável que pode ser determinada por vários métodos propostos na *Guideline For a Determination of Residual Moisture in Dried Biological Products*. Os que são utilizados com mais frequência são os métodos gravimétricos (este método determina a quantidade de humidade residual com base na perda de peso da amostra. É necessário obter o peso da amostra antes e após o processo de secagem, o qual ocorre numa temperatura especifica durante determinado período de tempo, para que esta diferença de pesos revele o valor de humidade residual presente. metodologia Karl Fischer (um reagente Karl Fisher, que contém iodo, dióxido de enxofre e amina, é misturado à amostra para aferir a quantidade de água presente nesta, em

que esta análise é efetuada pela medição dos reagentes que são consumidos se existir água no produto) e a termogravimetria (este método implica um aumento gradual da temperatura da amostra para proceder à medição do seu peso em função deste parâmetro e do tempo) (Duru, 2010). A espectroscopia próxima do infravermelho é um método mais recente que permite obter uma elucidação quantitativa dos fenómenos físicos e químicos que ocorrem durante o processo (Kauppinen,2015).

O conteúdo de humidade residual de um lote pode variar de acordo com os múltiplos fatores implícitos no processo, sendo maioritariamente (Cook, 2010; Cook, 2011):

- ✓ O grau de contato entre o recipiente e a prateleira do liofilizador que está dependente da geometria do recipiente usado, diferenças no contato devido a variações na base dos vials ou deformações dos tabuleiros;
- ✓ Tipo de formulação (excipientes e agente ativo);
- ✓ Variações na taxa de secagem devido a temperaturas do produto diferentes, presença ou ausência de *anneling*, variação na temperatura de prateleira, posição dos recipientes na prateleira;
- ✓ Eficiência na transferência de calor que também está dependente da condutibilidade térmica do recipiente;
- ✓ Os parâmetros do processo usados (temperatura da prateleira e pressão na câmara).

4.5 Aplicações farmacêuticas da liofilização

Normalmente esta técnica é aplicada na desidratação de produtos termosensíveis. Na indústria farmacêutica, a liofilização tem um amplo espectro de aplicações e portanto existem muitos produtos que se podem apresentar na forma de liofilizado, sendo eles (Pai, 2014):

- Enzimas;
- Hormonas;
- Anticoagulantes;
- Antibióticos;
- Anticorpos;
- Vitaminas;
- Frações de sangue;
- Vacinas virais atenuadas.

É muito comum a utilização deste processo na formulação de fármacos biológicos para conservar a sua estrutura e função. Muitas proteínas e péptidos que desnaturam facilmente à temperatura ambiente devido à sua instabilidade física e química podem ser estabilizadas pela aplicação deste processo (Pai, 2014).

Em biotecnologia, este processo tem sido muito aplicado em nanopartículas, proteínas recombinantes e microorganismos. Também é comum a liofilização de bactérias, vírus e leveduras para assegurar a sua viabilidade quando são armazenados por muito tempo (Pai, 2014).

4.6 Pros e contras deste processo

A liofilização é aplicada quando existem produtos sensíveis ao calor, instáveis, que necessitam de uma rápida desidratação e que para os quais não é aconselhável um armazenamento em refrigeração (Jadhav, 2015).

Este processo de desidratação apresenta inúmeras vantagens tais como (Jadhav, 2015):

- ✓ As baixas temperaturas que o processo de liofilização utiliza fazem com que substâncias sensíveis ao calor não sofram alterações químicas. Este baixo valor também evita o crescimento de microorganismos e reações enzimáticas. Todos os problemas associados às altas temperaturas dos processos convencionais serão eliminados pelo uso deste novo método;
- ✓ O produto final apresenta uma constituição porosa que facilita a reidratação quando em contacto com o solvente;
- ✓ O produto final apresenta baixo teor de humidade residual;
- ✓ Há uma perda mínima de compostos voláteis;
- ✓ O período de armazenamento do produto é amplamente alargado pelo uso da liofilização (*long shelf life);*
- ✓ Evita as reações oxidativas devido à ausência de oxigénio (condição de vácuo);
- ✓ O risco de contaminação é muito reduzido devido ao processo asséptico;
- ✓ É conseguida a esterilidade do produto;

  Em suma, é um método de desidratação que origina produtos com alta qualidade farmacêutica.

Vantagens

- Boa estabilidade;
- Manutenção das características originais do produto;
- Redispersão fácil e rápida;
- Conservação a longo termo;
- Proteção de possíveis influências externas prejudiciais.

Os pontos negativos atribuídos à aplicação desta técnica são os seguintes (Jadhav, 2015):

- ✓ Requer equipamento dispendioso e complexo;
- ✓ O produto final é frágil e requer um cuidado especial durante o seu armazenamento;
- ✓ Este método é lento, contribuindo para elevar o custo do processo;
- ✓ Os produtos com uma estrutura porosa estão mais sujeitos a reações de oxidação durante o armazenamento. É necessário conservação sob vácuo, numa atmosfera inerte;
- ✓ Os compostos voláteis só podem ser removidos por elevado vácuo;
- ✓ Requer diluentes estéreis após reconstituição.

Principal desvantagem

- Processo muito dispendioso;
- Método lento.

Capítulo 5

5. Métodos utilizados na liofilização

Este capítulo relata os três métodos utilizados no processo de liofilização (método *manifold*, *batch* e *bulk*).

5.1 Método *Manifold*

Neste método, cada recipiente (frascos, ampolas ou vials) é colocado num suporte rotativo e ligado individualmente à câmara de secagem com uma passagem direta para o coletor, como se pode visualizar na figura 44 (Pai, 2014).

O produto pode ser altamente congelado por submersão direta num banho de baixa temperatura, ou por congelação em concha, dependendo da natureza do produto e do volume a liofilizar (Pai, 2014).

O produto previamente congelado é ligado à câmara de secagem com o intuito de não aquecer. Há a necessidade de criar condições de vácuo no recipiente do produto e sucede-se um arrefecimento evaporativo para manter a baixa temperatura do produto (Pai, 2014).

Este método é aplicado apenas para volumes relativamente pequenos e produtos que apresentem altas temperaturas eutéticas e de colapso (Pai, 2014).

Figura 44 – Método *Manifold.* Adapatado de Pai, 2014.

5.2 Método *Batch*

No método *batch* (figura 45), uma quantidade de recipientes de tamanhos idênticos, portadores do produto, são colocados em conjunto num secador de bandeja. Todo o calor fornecido ao produto pode ser mantido durante este método (Pai, 2014).

Geralmente todos os recipientes do conjunto são tratados da mesma maneira ao longo do processo podendo apenas existir pequenas diferenças na humidade residual.

O fecho de todos os recipientes também ocorre simultaneamente fornecendo um ambiente uniforme em cada um e uma maior estabilidade do produto.

Este método é aplicado na preparação de uma quantidade favorável de recipientes que contêm o mesmo produto (Pai, 2014).

Figura 45 – Método *Batch*. Adaptado de Pai, 2014.

5.3 Método *Bulk*

No método *bulk*, o produto é colocado num recipiente de grande quantidade que após o processo de secagem apresenta uma única unidade.

A falta de porosidade da matriz altera a quantidade de calor que entra no produto. Esta limitação deriva também do fato do calor contactar com a prateleira (figura 46).

Neste caso, não são requeridas condições de controlo durante o fecho dos recipientes. Este método destina-se a produtos estáveis que não apresentem sensibilidade ao oxigénio ou humidade (Pai, 2014).

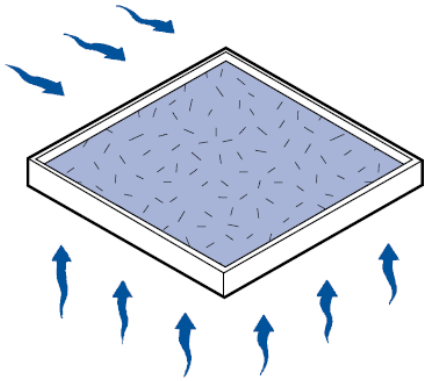


Figura 46 – Método *Bulk*. Adapatado de Pai, 2014.

Capítulo 6

6. Nanopartículas liofilizadas

Este capítulo relata o cuidado a ter no desenvolvimento de uma formulação, a influência dos crioprotetores ou lioprotetores empregues nesta, os aspectos de armazenamento, as caraterísticas de uma liofilização desejada e os motivos inerentes à obtenção de nanopartículas liofilizadas.

6.1 Importância da formulação

A formulação deve ser criteriosamente estabelecida antes de se iniciar o processo de liofilização, pois as condições de temperatura e pressão são definidas pelas propriedades térmicas da composição a liofilizar (Degobert, 2006).

Para obter uma formulação estável de nanosistemas com atividade biológica é importante correlacionar as propriedades físico-químicas das matérias-primas utilizadas (excipientes e substâncias ativas), diâmetro médio, carga superficial, composição dos tampões, de forma a ser possível determinar a velocidade de libertação do agente encapsulado, estabelecer a solubilidade de moléculas insolúveis e controlar o processo de absorção do fármaco (Degobert, 2006).

Outros dois aspetos que comprometem o mecanismo de ação e a estabilidade de uma formulação liofilizada são a atividade superficial da nanopartícula e as tensões externas aplicadas durante o processo de desidratação. É prática comum incluir agentes tensioativos numa formulação para diminuir a tensão superficial e crioprotetores para diminuir o efeito do processo de liofilização sobre a nanopartícula (Degobert, 2006).

O tipo e concentração de crioprotetores ou lioprotetores usados, a natureza do surfactante, os grupos químicos ligados à superfície das nanopartículas e até o tipo de polímero utilizado no desenvolvimento destas são fatores cruciais e controláveis em todo o processo (Degobert, 2006).

6.2 Influência de diferentes crioprotetores e lioprotetores

A liofilização proporciona um aumento do tempo de armazenamento de certas substâncias. Contudo induz diferentes tensões ao produto durante o decorrer do processo (figura 47). Esta problemática ocorre tanto na fase de solidificação como na fase de secagem levando à agregação das nanopartículas (Degobert, 2006).

Tendo em conta os problemas associados ao fenómeno de liofilização, é necessário incluir excipientes (aditivos) nas formulações de biofármacos antes da sua exposição ao processo. Os excipientes que atuam para conseguir uma estabilidade de forma generalizada são conhecidos por crioprotetores, se conferem proteção na fase de solidificação, ou lioprotetores, se promovem uma proteção na fase de secagem. A formulação de uma nanopartícula liofilizada requer uma profunda investigação dos componentes a ser empregues (tipo e concentração de crioprotetores ou lioprotetores) e das condições a que vai ser submetida, de modo a conferir a sua integridade durante as etapas do processo e no seu posterior armazenamento (Degobert, 2006).

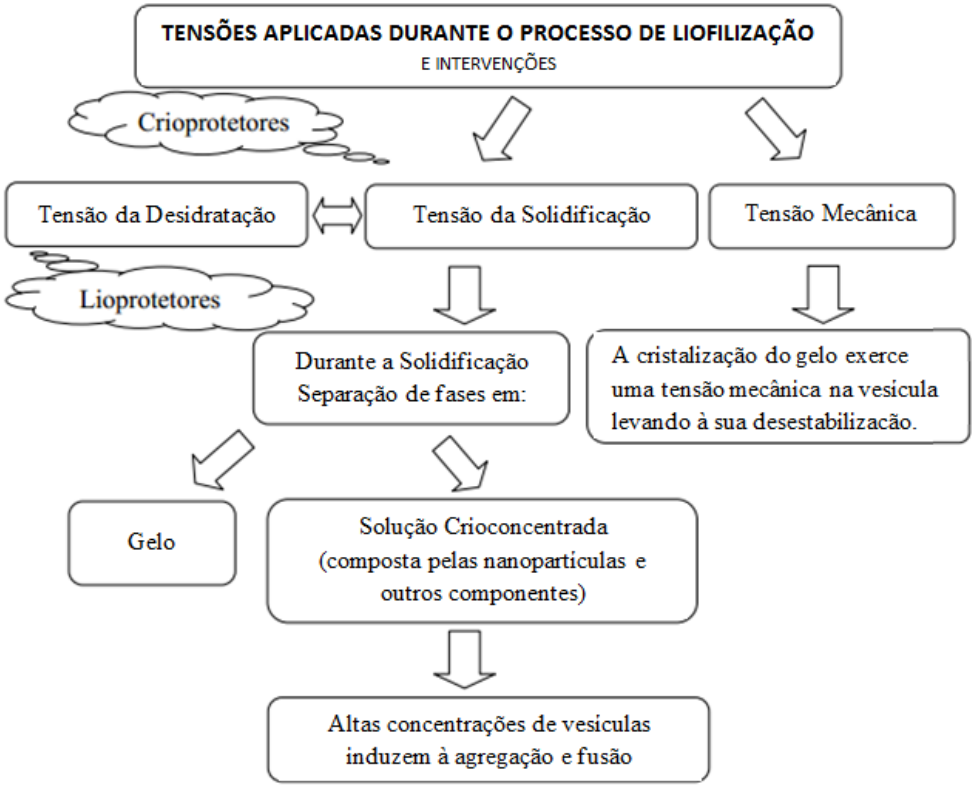


Figura 47 – Tensões envolvidas no processo de liofilização. Adaptado de Date; Samad; Devarajan, 2010.

Os diferentes excipientes empregues (tabela 2) em nanopartículas procuram promover a estabilidade físico-química e amenizar as tensões a que o processo as submete (Date; Samad; Devarajan, 2010). Os excipientes usados na proteção de nanopartículas liofilizadas são apresentados na tabela seguinte (Degobert, 2006).

Tabela 2 – Excipientes utilizados na liofilização de produtos farmacêuticos (Degobert, 2006).

Tipo	Função	Exemplos
Agentes de volume	Fornecer volume à formulação especialmente quando a concentração do produto liofilizado é muito baixa	Hidroxietilamido, trealose, manitol, lactose e glicina.
Agentes tampão	Ajustar mudanças de durante a liofilização	Fosfato, tris, HCL, citrato e histidina.
Agentes estabilizantes	Proteger o produto das tensões a que é submetido durante a solidificação e secagem.	Sacarose, lactose, glucose, tealose, glicerol, manitol, sorbitol, glicina, alanina, lisina, polietilenoglicol, dextrano e PVP.
Agentes ajustadores de tonicidade	Desenvolver uma nanodispersão isotónica e controlar a pressão osmótica	Manitol, sacarose, glicina, glicerol e cloreto de sódio.
Modificadores da temperatura de colapso	Aumentar a temperatura de colapso do produto para fornecer temperaturas de secagem mais elevadas.	Dextrano, hidroxipropil-β-ciclodextrina, PEG, poli(vinil pirolidone).

Agentes tampão

Os agentes tampão são utilizados na formulação de produtos liofilizados com a finalidade de evitar as mudanças drásticas de pH durante o decorrer do processo. Normalmente os produtos liofilizados também requerem um pH neutro após a sua redispersão. Esta necessidade pode ser superada pela aplicação de soluções tampão como por exemplo, tampão citrato de sódio, tampão fosfato de sódio e tris (Degobert, 2006; Rushil, 2014).

Agentes de volume

Este tipo de agentes são aplicados em formulações que apresentam uma baixa concentração da molécula ativa com o intuito de lhes dar forma farmacêutica. Os excipientes inertes, como os açúcares cristalinos, são muito utilizados, sendo o manitol o mais comum. Os outros agentes que podem ainda ser usados são o sorbitol, dextrano e arginina. Estes acúcares adquirem uma forma cristalina ao serem congelados promovendo uma boa aparência do produto liofilizado. Além do excipiente cristalino, uma formulação pode ainda conter um excipiente amorfo para assegurar a estabilidade. Assim sendo, esta passa a ser composta por uma fase amorfa contendo o fármaco, um excipiente amorfo e a fase cristalina resultante do excipiente inerte que produzirá o volume (Degobert, 2006; Rushil, 2014).

Agentes estabilizantes

Os lioprotetores e/ou crioprotetores (tabela 3) como a sacarose, trealose, maltose, lactose e manitol podem ser adicionados a nanopartículas para lhes conferir estabilidade durante o decorrer do processo. Os crioprotetores atenuam as tensões aplicadas aos produtos durante a solidificação e promovem a imobilização das nanopartículas pela formação de uma estrutura vítrea. Os lioprotetores conferem proteção na fase de secagem (Degobert, 2006).

A tabela seguinta demonstra os crioprotetores mais citados na literatura aplicados na liofilização de nanopartículas.

Tabela 3 – Diferentes crioprotetores e lioprotetores utilizados no processo de liofilização (Degobert, 2006; Rushil, 2014)

Crioprotetores	**Lioprotetores**
Glucose	Sacarose
Sacarose	Trealose
Trealose	Dextrano
Lactose	Glicina
Manitol	
Sorbitol	
Aerosil	
Maltose	
Polivinilpirrolidona	
Frutose	
Dextrano	
Glicerol	
Álcool polivinílico	
Glicina	
Hidroxipropil-β-ciclodextrina	
Gelatina	

No caso dos lipossomas, os agentes de proteção ligam-se aos grupos polares dos fosfolípidos através de pontes de hidrogénio, impedindo a agregação durante a secagem. A proteção pode-se também basear na formação de uma estrutura vítrea amorfa dos açúcares à temperatura ambiente. O efeito protetor nas nanoparticulas poliméricas pode ser explicado pela formação de uma matriz vítrea ao redor destas impedindo o seu contacto, ou por outro lado, os protetores podem criar ligações de hidrogénio com a água e ficar

adsorvidos à superfície das nanopartículas (por exemplo poloxamer 188). Estes agentes, como substituem as moléculas de água ocupando os espaços deixados por estas, reduzem a probabilidade de agregação das vesículas e aumentam a proteção das tensões mecânicas dos cristais de gelo.

Para assegurar a proteção do produto no estado seco é realmente importante que o agente estabilizante se consiga manter no estado amorfo tal como as nanopartículas, pois isto permite uma maior aproximação entre eles através de ligações por pontes de hidrogénio.

6.2.1 Influência dos diferentes agentes estabilizantes

A manutenção das caraterísticas originais das vesículas e a retenção do fármaco encapsulado dependem do tipo e da concentração dos açúcares empregues durante a liofilização. A literatura recente demonstra uma notável dificuldade no sucesso da liofilização devido à utilização de diversos crioprotetores e diferentes concentrações em cada trabalho. Os sistemas mais estudados para comprender a influência dos crioprotetores na liofilização são as nanocápsulas, nanoesferas e lipossomas (Degobert, 2006).

Um parâmetro extremamente importante para assegurar a estabilidade das nanopartículas, descrito na literatura, é o rácio crioprotetor/nanopartícula (Degobert, 2006).

Normalmente, para obter um efeito protetor adequado é necessário adicionar elevadas quantidades de um determinado açúcar. A trealose é um agente estabilizante que se tem mostrado muito eficaz na estabilização das formulações devido à baixa higroscopicidade, ausência de pontes de hidrogénio internas (o qual permite uma maior flexibilidade na formação de pontes de hidrogénio com as nanopartículas durante a liofilização), baixa reatividade química e alta temperatura de transição vítrea (Tg) (Degobert, 2006).

Também está descrito que a trealose é um agente bastante eficiente na proteção da bicamada lipídica durante a liofilização. Quando a trealose é empregue num sistema nanoparticulado de poli (ácido láctico - co - óxido etileno) numa razão 1:1 (trealose:nanoparticulas) torna-se possível obter uma completa redispersão após a liofilização (Degobert, 2006).

Um estudo comprova que uma concentração de 15% de trealose consegue ser adequada para estabilizar nanopartículas lipídicas sólidas de compritol (benehato de glicerol) e nanopartículas de trilaurato glicerol (Degobert, 2006).

Por sua vez, a adição de sacarose e glucose (concentração de 20%) a nanoparticulas de poli (D,L-láctico-co-glicólico) e poli (ε-caprolactona) também consegue demonstrar produtos estáveis após a reconstituição (Degobert, 2006).

Numa formulação lipossomal, agentes como a sacarose, lactose e trealose, evidenciam uma proteção adequada numa razão de 2g de açúcar/ 1g de fosfolípido. Luzard e al. (2000) afirmaram que a sacarose e a trealose têm mecanismos de ação diferentes (por apresentarem uma estereoquímica dos grupos hidroxilo nas posições equatorial e axial). No entanto, perante uma situação em que a água é completamente removida atuam de maneira semelhante (Degobert, 2006).

Altas concentrações de glucose, frutose, manose, maltose e trealose (acima de 25%) foram empregues em nanopartículas lipídicas sólidas derivadas de calix[4]resorcinareno na tentativa de atingir a estabilização do sistema durante o processo de liofilização, mas não se conseguiu comprovar a sua estabilidade (Degobert, 2006).

A presença de uma alta concentração de glucose em nanopartículas de sílica, modificadas cationicamente, proporciona um aumento da agregação destas durante a liofilização (Degobert, 2006).

A concentração de nanopartículas também é um aspeto relevante para o sucesso do processo de liofilização. Esta afirmação baseia-se num estudo concretizado a aprtir da liofilização de nanopartículas compostas pelo copolímero poli (ácido lácteo)-poli(óxido de etileno). Nos resultados obtidos foi demonstrado que a concentração de nanopartículas apresentada por uma formulação antes da sua exposição à liofilização, independentemente da quantidade de lioprotetor que contém, é determinante no mecanismo de proteção. Existem resultados que evidenciam não ser possível a redispersão de nanopartículas para uma concentração de 0,2% (w/w), numa proporção de 10/1 (tealose/nanoparticulas). Com uma razão de 2:1, a uma concentração de 0,8% (w/w) de nanoparticulas já é possível manter as suas carateristicas originais. A ideia chave que este estudo nos fornece é que quanto maior for a concentração de nanopartículas, maior será o efeito do lioprotetor (Degobert, 2006).

Um estudo recente utilizou diferentes concentrações de trealose (0,1,5,10 e 15% m/v) na formulação de dispersões lipossomais (PC:CH:SA), (fosfatidilcolina de soja: colesterol: estearilamida), onde o fármaco não se encontra encapsulado, para posteriormente avaliar as suas caraterísticas físicas e químicas antes e depois da liofilização (Lapenda, 2010).

Para concentrações de 10 e 15% de trealose, constatou-se a formação de uma matriz amorfa e uniforme após a liofilização das vesículas (figura 48 B). Estas, na presença de concentrações mais baixas de trealose, apresentam-se agregadas, formando um aglomerado lipídico após sofrerem o processo de desidratação (figura 48 A). Para as concentrações mais elevadas de trealose também se verificou uma rápida reconstituição pela reabsorção do solvente. Pelo contrário, para concentrações mais baixas do açúcar ocorre uma lenta reidratação do produto (Lapenda, 2010).

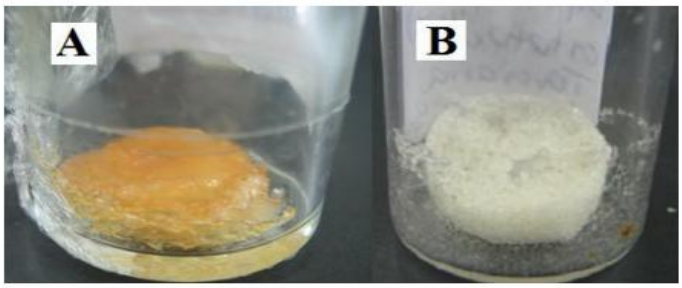


Figura 48 – Liofilizados das suspensões lipossomais obtidos na presença de trealose nas concentrações de 1% (A) e 10% (B). Adaptado de Lapenda, 2010.

Dado que a conservação das características originais do produto é um fator crucial para uma liofilização bem-sucedida, este estudo fez uma avaliação do tamanho das vesículas e o seu índice de polidispersão antes e depois da liofilização, na presença de diferentes concentrações de trealose (tabela 4) (Lapenda, 2010).

O tamanho dos lipossomas é preservado quando o valor da razão do tamanho das vesículas antes e depois da liofilização é próximo de 1. Neste caso (tabela 4), a formulação lipossomal com uma concentração de 10% de trealose foi a que apresentou uma razão de tamanhos próxima de 1 (S_f/S_i= 1,04), após se submeter à liofilização (Lapenda, 2010).

O outro parâmetro que permite avaliar a conservação dos lipossomas é a determinação do seu índice de polidispersão (PI), que indica a distribuição do tamanho das partículas. Quando estas se apresentam de forma homogénea, o valor de PI tem que ser baixo (PI< 0,3). Já a heterogeneidade de lipossomas confirma valores mais altos de PI. No caso em estudo (tabela 4), a formulação com 10% de trealose foi a que demonstrou um valor de PI inferior a 0,3,

levando à conclusão de que as vesículas apresentam um tamanho homogéneo de distribuição (Lapenda, 2010).

Tabela 4 – Tamanho da nanopartícula e o índice de polidispersão, antes e após a liofilização, na presença da tealose (Lapenda, 2010).

Trealose % (m/v)	Tamanho de partícula (nm)			Índice de Polidispersão	
	Pré-liofilização	Pós-liofilização	S_f/S_i	Pré-liofilização	Pós-liofilização
0	59,9 ± 3,1	845,4 ± 12,8	14,11	0,38 ± 0,03	0,42 ± 0,02
1	63,9 ± 1,1	715,2 ± 13,9	11,19	0,32 ± 0,01	0,43 ± 0,01
5	68,1 ± 1,0	79,4± 2,9	1,17	0,32 ± 0,01	0,38 ± 0,01
10	86,6 ± 9,5	90,2 ± 5,9	1,04	0,29 ± 0,04	0,22 ± 0,01
15	108,4 ± 1,3	83,0 ± 6,9	0,77	0,41 ± 0,05	0,29 ± 0,05

Sf/Si: Razão do tamanho dos lipossomas antes e depois da liofilização.

Dave et al. (2012), elaboraram um estudo para perceber o papel e a influência de diferentes crioprotetores na liofilização e as concentrações mais adequadas destes. Nanopartículas de quitosano carregadas de HCL-doxorrubicina foram expostas ao processo de liofilização com diferentes tipos de crioprotetores (manitol, dextrose e sacarose). Após a reconstituição das nanopartículas, o tamanho destas teve uma mínima variação na presença da sacarose na formulação (tabela 5). As nanopartículas revestidas pela sacarose na proporção 1:1 apresentam bons resultados em relação à redispersibilidade e fluidez (tabela6). Assim sendo, a sacarose (proporção 1:1) foi eleita o melhor agente crioprotetor neste tipo de sistema.

Tabela 5 – Análise do tamanho das nanopartículas reconstituídas após a liofilização (Dave, 2012).

Crioprotetor	**Rácio**	**Tamanho das nanopartículas (nm) (método gelificação iónica)**	**Tamanho das nanopartículas (método de emulsificação W/O)**
Manitol	1:1	934	678
	1:2	876	621
	1:3	843	584
Dextrose	1:1	897	656
	1:2	842	603
	1:3	809	567
Sacarose	1:1	377	266
	1:2	365	258
	1:3	353	234

Tabela 6 - Redispersibilidade e fluidez das nanopartículas reconstituídas após a liofilização (Dave, 2012).

Crioprotetor	**Rácio**	**Tamanho das nanopartículas (nm) (método gelificação iónica)**		**Tamanho das nanopartículas (método de emulsificação W/O)**	
		Fluidez	Redispersibilidade	Fluidez	Redispersibilidade
Manitol	1:1	-	--	-	--
	1:2	-	--	-	--
	1:3	+	+	+	+
Dextrose	1:1	--	-	--	-
	1:2	-	--	-	--
	1:3	+	--	+	--
Sacarose	1:1	++	++	++	++
	1:2	+	+	+	+
	1:3	+	+/-	+	+/-

--- Formação de grumos, -- Muito pobre, - Pobre.

+/- Moderadamente bom, + Bom, ++ Muito bom.

Um outro estudo foi desenvolvido para demonstrar a capacidade das vesículas lipossomais em reter o material encapsulado, na presença de diferentes açúcares (Crowe, L.; Crowe, J., 1989).

Vesículas lipossomais largas foram preparadas a partir de dipalmitoil fosfatidilcolina e ácido fosfatídico para encapsular o ácido isocítrico, onde a trealose foi adicionada num rácio 2:1 (trealose: fosfolípidos). Após a liofilização e ridratação destas, tendo a trealose presente no interior e exterior das vesículas, foi observado que 60% do ácido isocítrico encapsulado manteve-se retido nestas. Se a trealose está presente, unicamente, no exterior da vesícula visualizou-se um aumento na eficiência de retenção do fármaco, numa percentagem menor comparativamente às vesículas que contém a trealose no seu interior e exterior. Pelo contrário, como se pode observar na tabela 7, a trealose presente no interior da vesícula não é eficiente na retenção do fármaco Percentagem de retenção de ácido isocítrico nas vesículas lipossomas na presença de trealose (Crowe, L.; Crowe, J., 1989).

Tabela 7- Percentagem de retenção de ácido isocítrico nas vesículas lipossomas na presença de trealose (Crowe, L.; Crowe, J., 1989).

Method of Preparing Vesicles	Concentration of Lipid (mg/ml)	g Trehalose /g Lipid	Trehalose External	Trehalose Internal	% Retention
FT*	10.8	0	−	−	0
FT	11.1	0.08	−	+	0
FT	10.8	1.78	+	−	42
FT	11.1	1.78	+	+	61

*FT = freeze-thaw

Grandes vesículas unilamelares foram preparadas a partir de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) (90%) e fosfatidilserina (10%) que realizaram o encapsulamento do ácido isocítrico. Após os processos de liofilização e reidratação, as vesículas com um tamanho de 50 nm, aproximadamente, foram capazes de reter o fármaco encapsulado. Ao visualizar a tabela 8, é notória uma retenção de 100% do fármaco quando a trealose está presente interior e exteriormente (Crowe, L.; Crowe, J., 1989).

Tabela 8 – Percentagem de retenção de ácido isocítrico nas vesículas lipossomas na presença de trealose (Crowe, L.; Crowe, J., 1989).

Method of Preparing Vesicles	g Trehalose /g Lipid	Trehalose External	Trehalose Internal	% Retention
RD*	0.06	–	+	0
RD	3.2	+	+	100
RD	0	–	–	0
RD**	3.9	+	–	26
RD	0.11	+	+	22
RD	0.19	+	+	49
RD	0.33	+	+	69
RD	0.63	+	+	76
RD	0.91	+	+	86
RD	1.76	+	+	99

*RD = rotary drying
**The lipid was rotary dried and the resulting vesicles were sized by gel filtration to produce vesicles approximately the same size as those used for measurements without trehalose.

As vesículas unilamelares que se submetem ao processo de liofilização podem estar sujeitas aos fenómenos de fusão e perda do conteúdo vesicular. Devido a essa problemática associada à liofilização, foram preparadas vesículas portadoras de sondas, doador e aceitante, para submetê-las ao método de transferência ressonante de energia por fluorescência (FRET). Após a liofilização e reidratação, houve uma diminuição da intermistura de sondas com o aumento da concentração de trealose (tabela 9) e desta forma a presença de trealose reduz a fusão das vesículas (Crowe, L.; Crowe, J., 1989).

Tabela 9 – Percentagem de sondas intermisturadas nas vesículas, na presença e ausência de trealose (Crowe, L.; Crowe, J., 1989).

Method of Preparing Vesicles	g Trehalose /g Lipid	Trehalose External	Trehalose Internal	% Probe Mixing
RD*	0.05	–	+	72
RD	0.15	+	+	39
RD	0.25	+	+	29
RD	0.50	+	+	12
RD	0.95	+	+	8
FT**	0	–	–	93.0
FT	0.4	+	+	79.0
FT	0.8	+	+	59.0
FT	1.2	+	+	54.0
FT	1.6	+	+	38.0
FT	2.0	+	+	15.0

*RD = rotary drying
**FT = freeze-thaw

De forma a verificar a eficiência das vesículas na retenção do fármaco, utilizando diferentes açúcares, foi desenvolvido outro estudo. A determinação da percentagem de retenção do fármaco nas vesículas, na presença de maltose (tabela 10) ou sacarose (tabela 11) revelou

que estas promovem uma maior quantidade de fármaco retido quando estão presentes, interior e exteriormente (Crowe, L.; Crowe, J., 1989).

Tabela 10 – Percentagem de fármaco retido em vesículas lipossomais, na presença de maltose (Crowe, L.; Crowe, J., 1989).

Method of Preparing Vesicles	g Maltose /g Lipid	Maltose External	Maltose Internal	% Retention
RD	0.05	–	+	3
RD	0.15	+	+	41
RD	0.25	+	+	88
RD	0.49	+	+	95
RD	0.64	+	+	100

Tabela 11 - Percentagem de fármaco retido em vesículas lipossomais, na presença de sacarose (Crowe, L.; Crowe, J., 1989).

Method of Preparing Vesicles	g Sucrose /g Lipid	Sucrose External	Sucrose Internal	% Retention
RD	0.07	–	+	20
RD	0.35	+	+	57
RD	0.49	+	+	89
RD	0.83	+	+	86
RD	1.15	+	+	91

Para visualizar o efeito do tamanho da nanopartícula na retenção do fármaco encapsulado com um agente estabilizante presente, foram concebidas vesículas de fosfatidilcolina (90%) e de fosfatidilserina de cérebro de bovino (10%). A partir do processo de extrusão foram obtidas nanopartículas com os seguintes diâmetros – 25 nm, 50nm, 100nm, 200nm e grandes vesículas unilamelares. A partir da utilização de cada uma destas juntamente com uma determinada concentração de trealose ou sacarose são obtidos diferentes resultados (figura 49). Após o processo de liofilização e posteriormente a reidratação verificou-se o seguinte (Crowe, L.; Crowe, J., 1989):

- ✓ **Vesículas de 25nm:** 70% do fármaco retido num rácio de 8g de trealose/1g de lípidos e uma retenção na ordem dos 45% quando são liofilizadas na presença de 4g de trealose/1g de lípidos.

- ✓ **Vesículas de 50nm:** estas conseguem reter 100% do fármaco encapsulado após reidratação quando apresentam um rácio 2g de trealose/1g de lípidos.
- ✓ **Vesículas de 100nm:** tal como as vesículas de 50nm, estas apresentam-se estáveis e são capazes de reter 100% do fármaco encapsulado após reidratação na presença de 2g de trealose/1g de lípidos.
- ✓ **Vesículas de 200nm:** estas são menos estáveis comparativamente às de 50nm de diâmetro obtendo apenas 40% do fármaco retido após a reidratação, na presença de 4g de trealose/1g de lípidos.
- ✓ As **grandes vesículas unilamelares** demonstram uma menor estabilidade relativamente às vesículas de 50 e 100nm de diâmetro e conseguem reter apenas 40% do fármaco após reidratação quando são liofilizadas na presença de 4g de trealose/1g de lípidos.

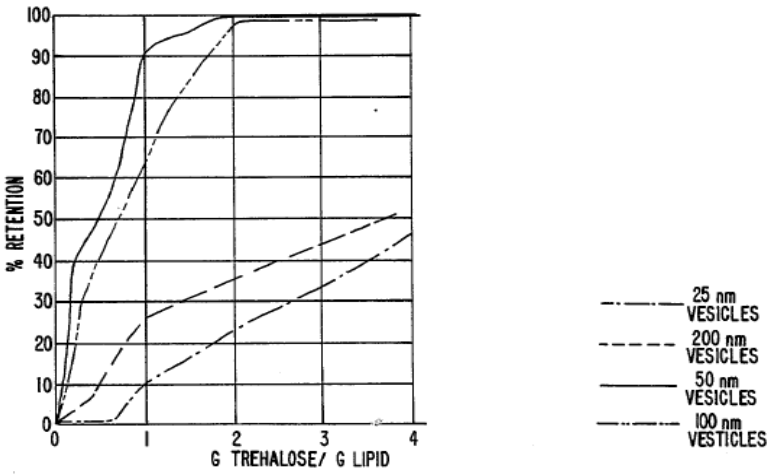


Figura 49 – Efeito do tamanho das vesículas lipossomais na retenção do fármaco encaspsulado. Adaptado de Crowe, L.; Crowe, J., 1989

Relativamente à utilização da sacarose na formulação das nanopartículas anteriormente citadas obteve os seguintes resultados (Crowe, L.; Crowe, J., 1989):

- ✓ **Vesículas de 25nm:** são muito estáveis durante a liofilização e só conseguem reter 10% do fármaco encapsulado na presença de 4g de sacarose/1g de lípidos;
- ✓ **Vesículas de 50nm:** são muito estáveis durante a liofilização e conseguem reter 90% do fármaco encapsulado, num rácio de 1g de sacarose/ 1g de lípidos;
- ✓ **Vesículas de 100nm:** são estáveis durante a liofilização e a retenção do fármaco encapsulado está na ordem dos 90%, na presença de 2g de sacarose/ 1 g de lípidos.

- ✓ **Vesículas de 200nm:** são menos estáveis durante a liofilização e apenas conseguem reter 40% do fármaco encapsulado, na presença de 4g de sacarose/ 1g de lípidos.
- ✓ As **grandes vesículas unilamelares** são menos estáveis que as vesículas de 50 e 100nm obtendo uma retenção do fármaco encapsulado na ordem dos 40%, na presença de 4g de sacarose/1g de lípidos.

A trealose e sacarose promovem um efeito de estabilidade nas vesículas de diâmetro de 50nm, na presença de uma baixa concentração de açúcares. As pequenas vesículas demonstram ser um pouco mais estáveis. Os sistemas lipossomais de diâmetro 50 e 100nm apresentam-se muito estáveis com concentrações mais baixas de trealose e sacarose. As vesículas passam a ser menos estáveis quando o seu diâmetro passa de 100 para 200nm (Crowe, L.; Crowe, J., 1989).

A trealose é um estabilizante essencial para promover uma maior retenção do material encapsulado em vesículas, quando presente interior e exteriormente. Como se pode visualizar na figura 50, o efeito de proteção conferido por esta faz-se notar quando está presente num rácio 4g de trealose/1g de lípidos. A sacarose apresenta uma curva semelhante à da trealose mas o seu efeito não é tão eficaz (Crowe, L.; Crowe, J., 1989)

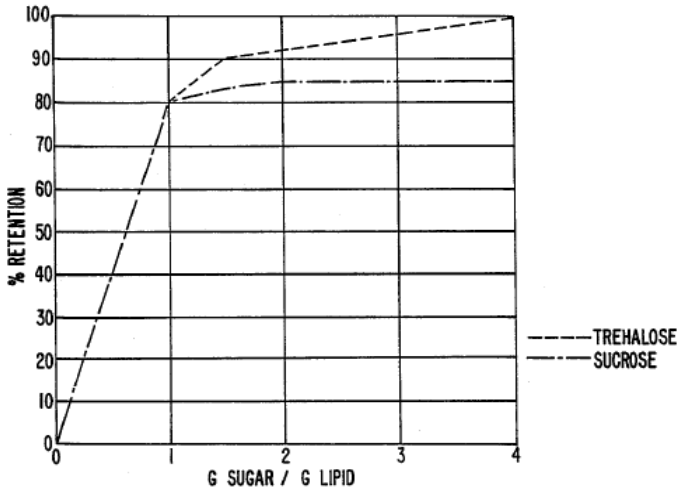


Figura 50 – Efeito da trealose e da sacarose na retenção do fármaco presente em vesículas lipossomais. Adapatado de Crowe, L.; Crowe, J., 1989.

Agentes ajustadores de tonicidade

Quando é necessário obter uma formulação isotónica são adicionados agentes ajustadores de tonicidade. A utilização destes origina uma solução com caraterísticas osmóticas semelhantes às dos fluidos biológicos. Estes aditivos podem ser manitol, sacarose, glicina, glicerol e cloreto de sódio (Degobert, 2006; Rushil, 2014).

Modificadores da temperatura de colapso

Uma formulação que contém um valor de temperatura de colapso muito baixo estará sujeita a um processo de sublimação muito lento. Se a temperatura do produto exceder a sua temperatura crítica de colapso, será colocada em causa a integridade do produto e assim sendo, muitas formulações incorporam na sua nanodispersão modificadores da temperatura para que estas possam providenciar de temperaturas críticas mais elevadas. Ao ser possível elevar a temperatura do produto, já que a formulação passa a ter uma alta temperatura de colapso, o processo de liofilização é realizado mais rapidamente (Kauppinen, 2015).

6.3 Aspetos de armazenamento

A estabilidade das dispersões coloidais a longo termo está relacionada com a formulação destas, o conhecimento das vias que levam à sua degradação e a capacidade de manutenção das condições. Vários parâmetros como, o tamanho das nanopartículas, o potencial zeta, a distribuição da massa molar do polímero, o pH e teor de fármaco, podem ser monitorizados na tentativa de estabelecer/prever a estabilidade ao sistema (Degobert, 2006).

O estudo da estabilidade pode ser realizado durante a etapa de armazenamento, em determinadas condições de temperatura e humidade residual (temperatura de 25^0 C e 60% de humidade residual) durante 12 meses. Os testes de estabilidade devem avaliar parâmetros que estejam sujeitos a eventuais alterações durante o armazenamento da formulação. Quando existe a necessidade de efetuar um teste acelerado, a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH) propõe que se realize a uma temperatura de 40ºC e 75% da humidade residual. Portanto, pela utilização deste teste, a vida útil do nanossistema liofilizado pode ser determinada pela taxa de degradação do produto a uma elevada temperatura.

Quanto maior for a temperatura de armazenamento, mais rápida será a degradação do produto. Estes testes são fundamentais para a determinação do prazo de validade dos sistemas terapêuticos (Degobert, 2006).

6.4 Caraterísticas de uma liofilização desejada

Um ótimo processo de liofilização vai originar um produto liofilizado com caraterísticas adequadas. Para que uma formulação contenha as caraterísticas de uma liofilização desejável tem que conter os seguintes parâmetros (Pai, 2014):

- ✓ Estrutura de "bolo" intacta;
- ✓ Cor uniforme (coloração homogénea);
- ✓ Resistência suficiente;
- ✓ Matriz suficientemente seca;
- ✓ Estrutura porosa;
- ✓ Estéril;
- ✓ Isenta de pirogénios;
- ✓ Livre de partículas;
- ✓ Quimicamente estável;
- ✓ Alta higroscopicidade;
- ✓ Rápida dissolução.

6.5 Motivos inerentes à obtenção de nanopartículas liofilizadas

a) Melhorar a estabilidade das nanopartículas

A liofilização tem vindo a ser aplicada às nanopartículas como uma alternativa para adquirir formulações estáveis. As dispersões coloidais aquosas, ao adquirirem um estado sólido, estão menos propensas aos processos de agregação das partículas e à degradação do polímero que as reveste e ainda pode evitar a perda do fármaco encapsulado. A título de exemplo, a liofilização de nanopartículas de poli (metileno malonato 212) (PMM 212) permite prolongar a estabilidade destas a longo termo. Após o armazenamento durante 12 meses à temperatura ambiente ou a uma inferior, na ausência de luz ou à luz do dia, as

nanopartículas mantiveram-se estáveis. A uma temperatura de 40ºC, houve alterações significativas na estabilidade (Degobert, 2006; Roy, 1997).

b) Melhorar a associação do fármaco às nanopartículas

A taxa de associação do fármaco às nanopartículas está condicionada por diversos parâmetros entre os quais, as caraterísticas do fármaco, o pH do meio, as caraterísticas da superfície das nanopartículas, natureza do polímero, quantidade de fármaco adicionada à dispersão, adição do fármaco antes ou depois da formação dos nanosistemas, tipo de tensioativo adsorvido à superfície. A liofilização tem contribuído para melhorar a associação de fármacos polares à superfície hidrofóbica dos coloides. A modificação da superfície destes também leva à obtenção de diferentes taxas de associação. O facto das nanopartículas poliméricas terem evidenciado uma diferente taxa de associação após a sua liofilização, significa que este processo ajuda a melhorar a interação do fármaco com as nanopartículas (Degobert, 2006; Alonso, 1991).

c) Para produzir formas de dosagem sólidas destinadas a várias vias de administração

A liofilização é a forma de adquirir formulações sólidas estáveis para várias vias de administração. A desidratação das dispersões coloidais permite que a entrega do agente terapêutico seja pela via mais conveniente/adequada de forma a aumentar a eficácia terapêutica dos fármacos no local de ação. Este processo pode alargar a aplicabilidade dos fármacos a outro tipo de vias de administração alternativas, que venham a ser avaliadas, no sentido de ir ao encontro do máximo de eficácia (Degobert, 2006; Chasteigner,1995).

d) Para preparar nanopartículas *core-shell*

A liofilização pode ser empregue com o objetivo de desenvolver nanopartículas core-shell (estrutura do tipo núcleo-casca). O revestimento das nanopartículas permite a associação de determinadas propriedades de modo a tornar a sua "casca" com atividade superficial. Normalmente estas nanopartículas são compostas por um material interior, o núcleo, que envolve o fármaco e este, por sua vez, encontra-se revestido por outro material, a concha (Degobert, 2006; Oh, 2005).

e) Para obter produtos liofilizados (sólidos) para caraterização analítica

A liofilização também pode ser utilizada para a caraterização analítica de sistemas coloidais. Esta caraterização permite obter informações relevantes sobre o estado da dispersão coloidal sólida e o estado molecular do fármaco encapsulado nesta (Degobert, 2006).

Capítulo 7

7. Requisitos normativos do processo de liofilização segundo as boas Práticas Laboratoriais e de Fabrico

As boas práticas de fabrico (BPF) e laboratoriais (BPL) envolvem um conjunto de normas que devem ser cumpridas por parte das indústrias farmacêuticas com o intuito de garantir a conformidade dos produtos desenvolvidos e uma qualidade sanitária (Maini, 2013).

A liofilização e esterilização de produtos requerem um processo de qualificação que envolve 3 fases: qualificação da instalação (QI – documento que evidencia que as instalações utilizadas nos processos produtivos estão de acordo com as especificações), a qualificação de operação (QO - documento que relata que todos os componentes do sistema operam conforme as especificações), e a qualificação de performance (QP – documento que evidencia que as instalações, equipamento, utilidades foram desenhados como os requisitos de BPF) (Maini, 2013).

A produção de produtos liofilizados implica o desenvolvimento de um processo de validação de todas as etapas envolvidas no processo sendo necessário validar processos tais como limpeza, esterilização, envase asséptico, liofilização, selagem, recravação entre outros. Devem ser documentados, detalhadamente, todos os parâmetros, equipamentos e especificações de cada fase do processo. A certificação do processo envolve uma análise de vários parâmetros como a instalação e a qualificação operacional de liofilizadores, mudanças bacterianas dos filtros estéreis, estudos de simulação entre outros (Mourato, 2013).

A esterilidade dos produtos farmacêuticos deve ser feita, sempre que possível, na fase terminal dentro dos recipientes finais (Mourato, 2013)). De acordo com a farmacopeia portuguesa VIII, quando este tipo de esterilização não pode ser empregue recorre-se ao processamento asséptico para manter a esterilidade dos componentes pré-esterilizados e do produto, mantendo-a no recipiente final.

Segundo as BPF e as BPL, a área de produção de produtos estéreis tem que ser uma área limpa, com sistemas de ventilação que utilizem filtros de eficiência comprovada e o seu acesso deve ser feito através de uma antecâmara. Todo o tipo de material, bem como a entrada do pessoal tem que ser feita através desta região. A limpeza da sala tem que estar dentro dos padrões adequados, e esta deve ser de fácil limpeza (Manual CE de Boas Práticas de Fabrico, 2013).

As diferentes áreas de produção de produtos estéreis estão classificadas em diversos graus, A,B,C e D, dependendo das caraterísticas exigidas para a qualidade do ar. O vestuário também deve ser adequado a cada área limpa de produção (Manual CE de Boas Práticas de Fabrico, 2013).

As diretrizes regulamentares direcionadas à aplicação do processo de liofilização podem ser consultadas na parte 3 da ISO 13408 (*Aseptic processing of health care products – Part 3: Lyophilization*).

O desenvolvimento de um produto liofilizado implica a passagem por várias fases (figura 51), tais como (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS*):

(1) Dissolução da molécula ativa e dos excipientes num solvente adequado (por exemplo, água estéril para injeção - WFI);

(2) Esterilização da amostra através da utilização de um filtro de 0,22 µm;

(3) Enchimento dos recipientes estéreis, individualmente, em condições assépticas e proceder ao fecho parcial destes;

(4) Transporte dos recipientes parcialmente fechados para o liofilizador;

(5) Solidificação da amostra através da colocação dos recipientes nas prateleiras arrefecidas do liofilizador ou solidificação ou pré-solidificação numa outra câmara;

(6) Secagem da amostra pela aplicação de vácuo na câmara do lioflizador;

(7) Fecho total dos recipientes.

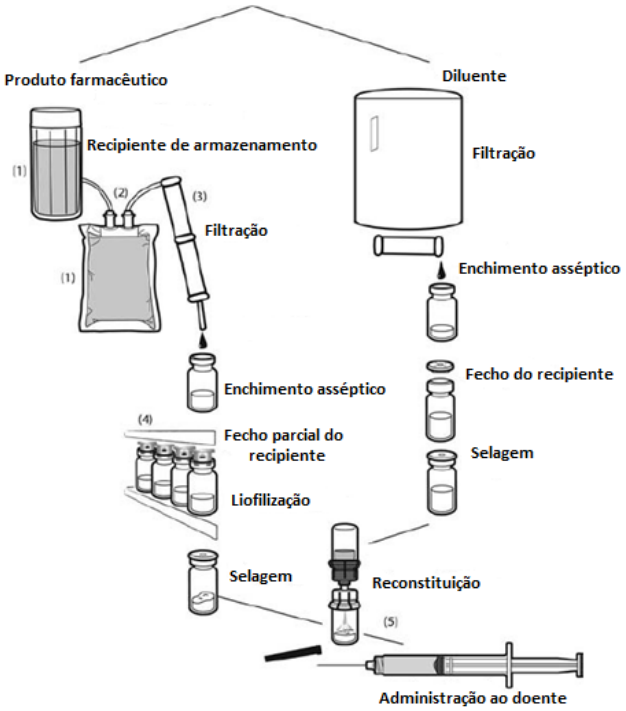


Figura 51 – Produção e administração de produtos liofilizados farmacêuticos (Rey, 2010).

Produção de um produto estéril

As matérias-primas da formulação, os componentes do recipiente e o equipamento de produção são transferidos do armazém para a área de produção a fim de se iniciar o processo de produção (figura 52). Durante este processo é importante destacar os requisitos normativos essenciais e são eles (Mourato, 2013):

- ✓ O equipamento deve ser esterilizado sempre que muda de local, mas caso permaneça no local de origem só necessita de ser esterilizado quando se procede à montagem. Posteriormente requer verificações periódicas;
- ✓ As matérias-primas e componentes esterilizados devem manter-se num ambiente classe A com uma envolvente de classe B, a não ser que sejam posteriormente submetidos ao processo de esterilização. Caso sejam, normalmente os recipientes de vidro são esterilizados por calor seco e as tampas de borracha por calor húmido;
- ✓ A preparação dos produtos e materiais não filtrados deve ocorrer num ambiente de classe A com uma envolvente de classe B;
- ✓ Se a preparação for filtrada posteriormente, então esta pode ocorrer num ambiente classe C.

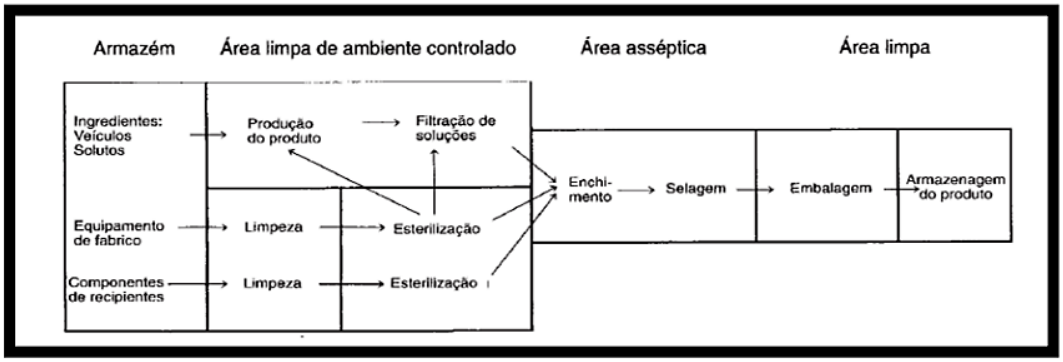


Figura 52 – Ilustração representativa do fluxo de materiais através do departamento de produção (Mourato, 2013).

Embalagens para produtos estéreis

Os componentes de enchimento também podem variar de acordo com as necessidades de medicamentos e de produção. Para estar em conformidade com as novas especificações regulamentares, a embalagem do produto deve ser feita em condições controladas de humidade e temperatura de modo a conservar a integridade do produto (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA).

De acordo com a *guideline* formulada pela FDA, intitulada "*Container Closure for Packaging Human Drugs and Biologics*", todos os componentes que fazem parte da embalagem da formulação são o recipiente de enchimento, os revestimentos para recipientes, as tampas (tampas de rosca ou rolha), os revestimentos de tampas, os selantes de tampas, os selantes internos para recipientes, os invólucros, os acessórios para administração e as etiquetas para os recipientes.

O recipiente (figura 53) utilizado na liofilização tem uma influência no desempenho do processo e na qualidade do produto final. Deve existir um cuidado especial na seleção do recipiente e da respetiva tampa, dado que os produtos liofilizados apresentam uma maior sensibilidade em relação aos demais. A escolha terá de ser realizada ponderando determinados fatores, tais como, (1) compatibilidade química entre a embalagem e o produto, (2) entrada de humidade, (3) adsorção à superfície, (4) contaminação do silicone, (5) contaminação de possíveis substâncias extraíveis e lixiviáveis e (6) integridade do selante (Rey, 2010).

As propriedades de um produto liofilizado podem ser mantidas se o recipiente selecionado obedecer a certos requisitos, tais como, apresentar condutividade térmica, possuir a capacidade de ser selado hermeticamente no final da liofilização, impedir a reabsorção da humidade (uso de selantes) (Lavakumar, 2013).

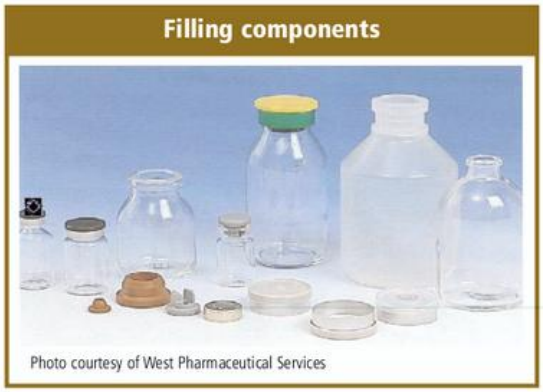


Figura 53 - Componentes de enchimento. Adaptado de *GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA.

Sistema recipiente-fecho

O sistema recipiente-fecho é constituído por um tampão elastómero e um vial de vidro. Segundo a FDA, este sistema tem que obedecer a certos parâmetros tais como: (1) proteção adequada à forma de dosagem relativamente aos vários fatores que afetam o período de vida útil desta (por exemplo, temperatura, luz, perda do solvente, absorção do vapor de água, contaminação microbiana), (2) compatibilidade entre a forma de dosagem e a sua embalagem, (3) segurança dos materiais envolvidos na embalagem para a utilização pretendida do fármaco e (4) uma funcionalidade adequada do recipiente de forma a minimizar o desperdício (por exemplo, utilizando dispositivos de dupla câmara), facilitar a forma de utilização (por exemplo, uso de seringas pré-cheias) e entregar a forma de dosagem na quantidade descrita na embalagem (Rey, 2010).

O fecho dos vials está condicionado pela uniformidade e pela posição das prateleiras no liofilizador. A tampa pode não ser inserida adequadamente nos vials se o liofilizador possuir prateleiras que não são uniformes, planas e paralelas entre si (Rey, 2010).

Os requisitos essenciais para a escolha do recipiente e o sistema de fecho de produtos liofilizados estão apresentados na tabela seguinte.

Tabela 12 – Caraterísticas a ter em conta na escolha do recipiente e fecho para produtos liofilizados (Rey, 2010; Kauppinen, 2015).

Considerações a ter no desenvolvimento e escolha do recipiente e fecho para produtos liofilizados	
Recipientes	**Fechos**
Mínima quebra do vial	Baixa permeação de humidade
Consistência dimensional tolerante	Baixa absorção de humidade
Mínima resistência à transferência de calor	Reduzidos componentes voláteis do *headspace*
Durável quimicamente	Reduzidos componentes extraíveis e lixiviáveis
Resistência aos stresses térmicos e mecânicos	Reduzidas caraterísticas de absorção ou adsorção
Robustez contra a esterilização	Baixa transmissão de oxigénio
Inerte com as substâncias da formulação	Reduzida fragmentação
Capacidade para completar a remoção da dosagem	Diminuir a aderência à superfície durante o processo
Baixa alcalinidade	Bom selante
Transparência da luz ajustável	Capaz de manter a integridade do selante na presença de gás ou vácuo
Curvatura da superfície do produto ajustável	Funcionalidade para o usuário final
Vestígios mínimos de impurezas	Providenciar uma máxima integridade do produto

É também importante a concretização de auditorias internas para deteção de não conformidades e melhorias contínuas (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA*)*.

Enchimento

O enchimento do produto, previamente preparado de forma asséptica, deve ocorrer num ambiente de classe A com uma envolvente de classe B. É importante referir que todos os materiais e equipamentos que envolvem o produto têm que manter o requisito de esterilidade (Mourato, 2013).

O enchimento de produtos para esterilização terminal deve ocorrer no mínimo em ambiente classe C, salvo se o produto estiver em risco de contaminação ambiental (Mourato, 2013).

A validação de todo o processamento asséptico é realizada com base em testes de simulação, utilizando um meio nutritivo. Estes devem reproduzir todo o processo asséptico, tanto quanto possível, e incluir todas as fases críticas posteriores (Mourato, 2013; FDA, *GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS*).

A fase de enchimento também é uma etapa crítica. De acordo com o guia de inspeção da liofilização de parenterais da FDA, nesta fase pode haver probabilidade de contaminação do conteúdo do frasco pois estes estão parcialmente tapados e só no liofilizador é que são completamente selados. Durante esta operação de enchimento, o produto estéril encontra-se exposto a vários riscos de contaminação como o meio ambiente, o equipamento, e os operadores (Mourato, 2013).

É necessário ter uma atenção especial à etapa de enchimento dos recipientes. A resistência da camada seca ao fluxo de vapor de água durante o processo depende do enchimento que for efetuado. Para que esta resistência não seja muito eficaz e não se desencadeie a ruptura do vial durante a solidificação é recomendado que o enchimento dos recipientes não exceda 1/3 da capacidade total, no caso dos vials e frascos (Kauppinen, 2015).

Normalmente o fecho dos frascos é feito pelo mecanismo de fecho do liofilizador através da compressão de cada prateleira que contém os frascos, no entanto existem linhas de enchimento em que o operador coloca o tampão manualmente em cada frasco. Este fato levanta problemas relacionados com a contaminação proveniente da presença de um

operador. Para oferecer uma máxima proteção durante o enchimento, esta operação deve ocorrer numa área asséptica provida de filtros HEPA (Hight efficiency particulate air) (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS, FDA*).

Quando os frascos se encontram cheios e parcialmente selados são posteriormente transportados para o liofilizador. Devido ao fato destes não se apresentarem completamente tapados quando ocorre o transporte para o liofilizador, deve existir uma câmara de fluxo laminar, equipada com filtros HEPA (Hight efficiency particulate air), entre o local de preparação das doses e o liofilizador. Esta permite a passagem contínua de ar estéril criando um ambiente esterilizado (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS, FDA)*. A área entre a linha de enchimento e o liofilizador deve prever uma proteção classe 100 (ISO 5) (Mourato, 2013). Um produto envasado assepticamente deve ser mantido num ambiente de classe A até ser liofilizado a vácuo. Um frasco que não apresente a tampa completamente ajustada é considerado aberto e por essa razão é requerido um ambiente controlado (ISO classe 5 / classe A). Após a liofilização, este deve ser mantido em abastecimento de ar com um ambiente classe A (ISO classe 5) até que esteja comprovado o completo ajuste da tampa nos frascos (Mourato, 2013).

Antes de ser concluído o fecho dos recipientes, que se encontram parcialmente tapados durante o processo de liofilização, a transferência destes deve ocorrer num ambiente de classe A, com uma envolvente de classe B, ou em tabuleiros de transferência herméticos num ambiente de classe B (*European Communities Commission*, *Manufacture of sterile medicinal products*, 2008).

Outro problema que pode surgir nesta operação reporta-se ao volume de enchimento. Para garantir as boas práticas de fabrico e uma operação de qualidade há uma necessidade de monitorizar frequentemente o volume de enchimento (a cada 15 minutos). Segundo as diretrizes regulamentares estabelecidas, devem existir secções isoladas quando ocorre um reduzido ou elevado enchimento (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS, FDA)*.

Liofilizadores

Normalmente os liofilizadores estão providos de um sistema interno que, automaticamente, realiza o fecho dos recipientes. Quando este mecanismo não está disponível, no final do

processo deverá ser introduzido nitrogénio ou ar seco filtrado na câmara do liofilizador, a fim de estabelecer a pressão atmosférica (Akers, 2013).

A câmara e as superfícies das prateleiras de um liofilizador devem ser mantidas limpas. A limpeza deve ser realizada no final de cada ciclo certificando que produtos derramados, vidro quebrado ou rolhas de frascos são completamente eliminados. É considerada uma boa prática certificar que o sistema de encontra devidamente limpo antes de iniciar cada ciclo de liofilização (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS, FDA)*.

Numa escala piloto e de produção, os liofilizadores normalmente encontram-se providos de um sistema de limpeza que elimina as fontes de contaminação e controla toda a esterilização. Estas ferramentas inovadoras, utilizadas durante o desenvolvimento dos ciclos de liofilização são o CIP (*clean in place*), o SIP (*sterelization in place*) e o VHP (*vaporized hydrogen peroxide*) (Kauppinen, 2015).

Controlo do ciclo de liofilização

É importante que o fabricante conheça a temperatura crítica do produto. O liofilizador tem que vir com a instrumentação necessária para ser possível controlar os parâmetros deste processo (temperatura do produto, temperatura da prateleira, temperatura do condensador, pressão da câmara e pressão do condensador). Este deve ser instalado em sala de maior pressão negativa e possuir linha de vácuo entre a câmara e a bomba de vácuo, protegida com filtros HEPA (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS, FDA)*.

É necessário incluir testes que controlem eventuais fugas de gases e vapores para manter a integridade do sistema (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA*)*.

Esterilização

Durante as inspeções, a esterilização dos liofilizadores é geralmente um problema. O método de esterilização mais aceitável é o calor húmido sob pressão. Embora se use também o método do óxido de etileno gasoso. Todavia, dado que este método necessita de

humidade torna-se difícil estabelecer humidade estéril com uniformidade (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA*)*.

A filtração também está associada a determinados riscos sendo que é recomendável a utilização de filtros redundantes (2 filtros em série) ou um filtro esterilizante adicional imediatamente antes do enchimento dos frascos (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA*)*. A indústria farmacêutica normalmente utiliza filtros de 0,2 µm mas como tem sido comprovado que estes podem não eliminar totalmente a contaminação microbiana optam por usar filtros redundantes de 0,2 µm (Akers, 2013). A filtração esterilizante final deverá ser o mais próximo possível da zona de enchimento. Os filtros devem ser submetidos a testes, após o seu uso, de forma a comprovar a sua integridade (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA*)*.

Os liofilizadores devem ser esterilizados depois de cada ciclo para evitar o risco de contaminação quando a haste do liofilizador entra na câmara no momento da aplicação da tampa nos frascos. O próprio ato físico de remoção dos frascos e limpeza da câmara podem contribuir par tal risco. Outro componente a considerar como possível fonte de contaminação é o sistema hidráulico utilizado para fecho dos frascos. Os liofilizadores deverão ser descarregados numa sala limpa a fim de minimizar a potencial contaminação (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA*)*.

Deve haver um espaço entre as prateleiras para permitir o fluxo de vapor durante a esterilização da câmara. Os tabuleiros que fazem o transporte dos frascos do local de enchimento para o liofilizador também devem ser esterilizados (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA*)*.

A esterilização dos condensadores é outro ponto a ter em conta. Os liofilizadores mais recentes têm uma maior garantia da esterilidade dos seus condensadores, pois são projetados de forma a que o processo de esterilização ocorra juntamente com a câmara. Nos equipamentos mais antigos, é muito difícil a esterilização dos condensadores, o que se traduz num grande problema (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA*)*.

Selagem e Embalagem Final

Quando os frascos são retirados do liofilizador são transferidos para a fase seguinte, onde é efetuada a aplicação do selo de alumínio através de uma máquina que lacra cada frasco individualmente. Esta fase do processo deve ocorrer num ambiente classe A. Seguidamente deve-se proceder à embalagem e rotulagem dos produtos liofilizados, que se encontram armazenados numa câmara fria, separados por lote. O rótulo deverá conter a identificação do produto, o número de lote, data de fabrico, data de validade, entre outros. É recomendado que a linha de embalagem esteja completamente isenta de qualquer produto anterior, que não faz parte do lote. Quando o produto estiver embalado, já se encontra numa sala limpa que não tem que respeitar as regras estabelecidas para uma área com ambiente classe A. Devem ser realizados testes para efetivar a integridade da selagem do sistema recipiente-fecho (Mourato, 2013).

Posteriormente será necessário averiguar todos os registos de controlo de qualidade (tabela 13), em processo e produto, para verificar se estes cumprem os requisitos exigidos e por conseguinte validar o produto final. Se assim for, o produto está apto para ser distribuído (Mourato, 2013).

Tabela 13 - Controlo de qualidade do processo. Adapatado de Maini; Jain; Sardana, 2013.

PROCESS	OBJECTIVE	VARIABLE (MONITOR)	TEST (RESPONSE)
Solution Preparation	To ensure a colorless/specified color solution with specified pH and % assay(specified % of labeled amount)	Load, Mixing time, Mixing Speed	Assay, Clarity, pH
Filtration	To comply the sterility test	Filtration Rate, Pressure	Sterility
Filling & Partial Stoppering	To ensure uniformity in filled volume and % assay	Filling Rate, Pressure,	Fill volume, % Assay
Lyophillization & Stoppering	To ensure uniformity in appearance of lyophillized cake and reconstitution time	Load, Vaccum, Time, Temp.	Water content, Cake formation, Reconstitution time, pH, weight, Appearance
Sealing	To ensure integrity of seal		Leak test, Seal Integrated

Produtos liofilizados

A análise do produto liofilizado final deve ser feita a partir de testes de uniformidade da dose, testes de estabilidade e testes de esterilidade, além dos ensaios estabelecidos para a forma farmacêutica (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS, FDA*).

a) Teste da uniformidade da dose

Este teste avalia se as unidades de um mesmo lote possuem uniformidade de peso. Esta avaliação pode ser feita a partir de dois métodos, a uniformidade de conteúdo e a variação de peso. Este último é aplicado a sólidos, que podem ter ou não substâncias adicionais, e são preparados a partir de soluções homogéneas liofilizadas nos recipientes finais. Já o teste da uniformidade de conteúdo é empregue a formas farmacêuticas que não obedecem às especificações imposta para o uso do teste de variação de peso (por exemplo, quando a dose ou proporção for <25% utiliza-se a uniformidade de conteúdo).

b) Teste de estabilidade

Os testes de estabilidade devem ser efetuados para o produto acabado e para o produto posteriormente reconstituído. A estabilidade de um produto está condicionada pela quantidade de humidade presente neste. O conhecimento do teor de humidade é de extrema importância na manutenção e armazenamento do produto.

Quando os produtos requerem uma reconstituição, há a necessidade de apresentar informações iniciais e finais do período de utilização pelo qual este se mantém estável.

A data de validade e estabilidade deve ser referida com base nos lotes com maior teor de humidade.

c) Teste de esterilidade

No que diz respeito à esterilidade, a solução utilizada para reconstituir o produto liofilizado é um aspeto a ter em conta. Alguns produtos podem ser reconstituídos a partir de água bacteriostática para injeção, mas dado toxicidade associada ao seu uso, a reidratação deve ser efetuada com água estéril para injeção (WFI).

Inspeção do produto final

O produto estéril liofilizado final deve ser submetido a uma inspeção que inclui a aparência do liofilizado, o volume correto, o conteúdo de água e o tempo de reconstituição deste (quanto maior for a área de superfície do produto, maior será a solubilidade) (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA*)*.

Os produtos liofilizados podem evidenciar dois tipos de problemas: o colapso do produto e o *meltback*. O colapso do produto ocorre quando este se sujeita a uma temperatura acima da temperatura de colapso. O *meltback* é uma forma de colapso do produto que se deve a uma mudança de estado sólido para o estado líquido (que resulta na entrada de humidade para o sistema), levando a uma sublimação incompleta (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA).

Estes problemas associados ao processo de liofilização comprometem o produto final quanto à estabilidade, degradação e solubilidade. (*GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS,* FDA).

O diagrama seguinte (figura 54) resume os passos a seguir para produzir produtos liofilizados.

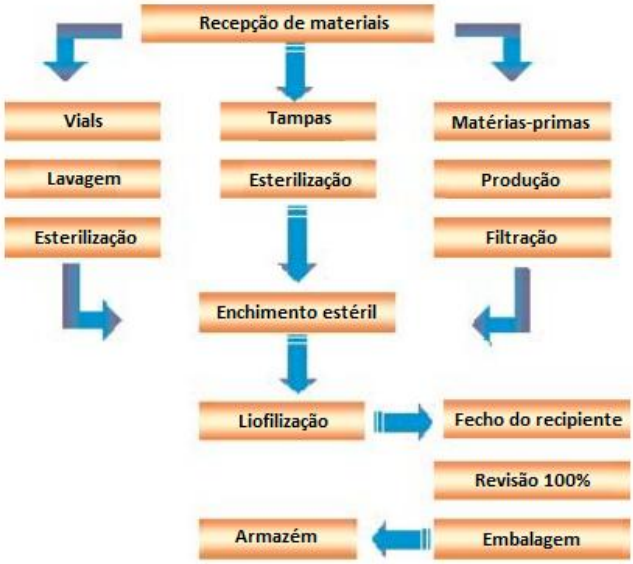


Figura 54 – Etapas envolvidas na produção de produtos liofilizados. (Adaptado de Mourato, 2013).

Capítulo 8

8. Nanopartículas liofilizadas com aplicação em Oncologia

8.1 Produtos comercializados

A nanotecnologia aplicada ao transporte de fármacos tem sido objeto de estudo com o intuito de solucionar os problemas das terapias oncológicas convencionais e limitar a sua exposição em locais mais críticos. Nos últimos tempos, a utilização de nanopartículas para o encapsulamento do fármaco revelou-se uma área promissora no tratamento tumoral. A possibilidade de conjugar ligandos aos nanosistemas vem permitir uma interação molecular entre as nanopartículas e os recetores presentes nas células alvo (Brochado, 2013). Na tabela seguinte estão apresentadas as formulações lipossomais atualmente comercializadas.

Tabela 14 – Formulações lipossomais atualmente comercializadas. Fonte Pillai, 2013; Chang; Yeh, 2012).

Formulações lipossomais atualmente comercializadas					
Nome comercial	**Fármaco**	**Fabricante**	**Forma Farmacêutica**	**Indicação**	**Fase de desenvolvimento**
Doxil® Caelyx®	Doxorrubicina (encapsulada em lipossoma de PEG)	*Orthobiotech, Schering-Plough.*	Suspensão	Cancro do ovário, mama metastático e sarcoma de kaposi.	Aprovado pela FDA (1995).
Myocet®	Doxorrubicina	*Elan Pharmaceuticals; Sopherion Therapeutics; Zeneus Pharma*	Liofilizado	Cancro da mama metastático em mulheres adultas.	Aprovado na Europa (2000) e no Canadá (1995) em combinação com ciclofosfamida.
Depocyt®	Citarabina	*Skye Pharma; Enzon Pharmaceuticals*	Suspensão	Meningite linfomatosa intratecal.	Aprovação Total pela FDA (2007).
Daunoxome ®	Doxorrubicina	*Gilead Science*	Emulsão	Sarcoma de Kaposi.	Aprovado pela FDA (1996).
Lipusu®	Paclitaxel	*Weijian Pharma; Luye Pharma Group*	Liofilizado	Cancro da mama, ovário e CPNPC metastático.	Aprovado nos EUA e na China.
Marqibo®	Sulfato de vincristina	*Talon Therapeutics*	Solução	Leucemia linfoblástica aguda com cromossoma filadélfia negativo (Ph-).	Aprovado pela FDA (2012).
Mepact®	Mifamurtida	*Takeda Pharmaceutical Company Ltd*	Liofilizado	Osteosarcoma não metastático	Aprovado na Europa (2009) e em Fase III nos EUA.

As antraciclinas representam uma classe de antibióticos antitumorais muito utilizadas no combate a diversos tipos de tumor. A doxorrubicina é um dos agentes anti-neoplásicos mais solicitado no tratamento oncológico. No entanto, este tipo de terapia levanta problemas relacionados com a cardiotoxicidade cumulativa induzida pela sua utilização (Brochado, 2013).

O Doxil®/ Caelyx® é um nanosistema que contém doxorrubicina e foi o primeiro a obter aprovação pela FDA, em 1995, para aplicação clínica. Esta formulação de doxorrubicina, por se apresentar na forma lipossomal (encapsulação lipossomal) revestida por polietilenoglicol (PEG), apresenta melhores resultados terapêuticos comparativamente à utilização da doxorrubicina livre. Os estudos clínicos efetuados para a encapsulação lipossomal de doxorrubicina revestida por PEG foram realizados em doentes com sarcoma de Kaposi, com tumores da mama metastático e ovário. Estes demostraram que o teor de doxorrubicina presente nos tecidos foi 5 a 11 vezes maior do que a doxorrubicina convencional, independentemente da dose (figura 55). A distribuição do fármaco encapsulado realiza-se preferencialmente nas regiões tumorais. Entre várias caraterísticas, o tamanho que estes lipossomas apresentam (aproximadamente 100nm) também explica a diminuição da toxicidade associada ao uso da terapia convencional (Brochado, 2013; Pillai, 2013).

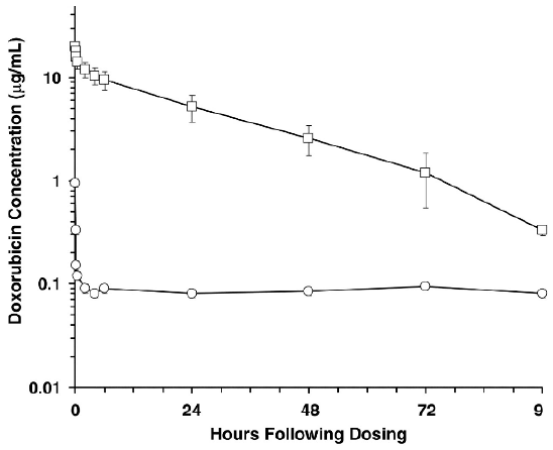


Figura 55 – Concentração plasmática de doxorrubicina após uma única administração de 1,5mg/kg de doxorrubicina lipossomal revestida por PEG (quadrados) versus doxorrubicina livre (círculos) em modelo animal. Adaptado de Brochado, 2013.

O Myocet®, outro sistema lipossomal de doxorrubicina, foi aprovado pela Comissão Europeia sendo que Autorização de Introdução no Mercado foi concedida a esta formulação em julho de 2000. Foram realizados 3 estudos para esta formulação que incluíram mulheres adultas portadoras de cancro da mama metastático. O primeiro estudo comparou a doxorrubicina livre com o Myocet, ambos em associação com a ciclofosfamida. O segundo avaliou a doxorrubicina livre comparativamente ao Myocet em monoterapia. E por último foi realizada uma comparação entre o Myocet e a epirrubicina (outra antraciclina), ambos em associação com a ciclofosfamida. Para os dois primeiros testes, cada grupo respondeu ao tratamento que lhe foi administrado, ao passo que no terceiro teste o Myocet revelou melhores resultados (Brochado, 2013; Pillai, 2013).

O Depocyt® é um composto lipossomal que contém citarabina. Os estudos clínicos e pré-clínicos relatam que esta formulação prolonga o tempo de exposição do tumor aos agentes citotóxicos em relação à administração de citarabina livre. Os doentes com meningite linfomatosa intratecal apresentam uma maior taxa de resposta quando são submetidos ao tratamento com Depocyt, relativamente ao tratamento convencional (Brochado, 2013; Pillai, 2013).

O Daunoxome® é uma formulação lipossomal que contém daunorrubicina (antraciclina antineoplásica) encapsulada. Este sistema terapêutico foi desenvolvido no sentido de dirigir o fármaco às células tumorais minimizando a sua concentração em células saudáveis. O tamanho desta forma terapêutica, 35 a 60nm, proporciona um aumento da permeabilidade do fármaco a partir dos vasos sanguíneos. Os testes realizados *in vivo* demonstram que a terapia lipossomal apresenta uma maior eficácia quando comparada à daunorrubicina livre. A comparação entre o Daunoxome e a daunorrubicina livre não foi realizada através de ensaios clínicos (Brochado, 2013; Pillai, 2013).

O Lipusu® é um sistema de encapsulação lipossomal que reveste o princípio ativo designado por paclitaxel e encontra-se aprovado nos EUA e na China. Esta formulação propõe modular a toxicidade do paclitaxel convencional sem que a sua atividade antitumoral seja alterada. O paclitaxel livre por ser um fármaco com baixa solubilidade limita a sua aplicabilidade clínica, sendo necessário a solubilização do composto em Cremophor® El e etanol (ambos podem originam efeitos adversos). Os lipossomas de taxanos têm revelado uma lenta eliminação da corrente sanguínea, alta atividade antitumoral e uma baixa toxicidade sistémica quando comparado ao paclitaxel livre. Os estudos clínicos demonstram que com esta nova formulação existe uma elevada concentração do paclitaxel nos nódulos linfáticos sendo

proposto como uma alternativa terapêutica promissora para doentes com cancro de pulmão de não pequenas células (NSCLC). A combinação lipossomal de paclitaxel com cisplatina é recomendável para o tratamento de primeira linha do cancro do pulmão de não pequenas células com metástases nos nódulos linfáticos regionais (Brochado, 2013).

O Marqibo® é o nome comercial referente ao genérico lipossomal de sulfato de vincristina que foi aprovado pela FDA em 2012. Esta forma de dosagem está indicada para doentes com leucemia linfoblástica aguda com cromossa filadélfia negativo (Ph-). Esta formulação lipossomal é desenvolvida à base de colesterol e esfingomielina sendo projetada para melhorar a farmacocinética e farmacodinâmica da vincristina convencional (Brochado, 2013).

Mepact® é um composto lipossomal liofilizado que contém a mifamurtida como princípio ativo. Este composto encontra-se aprovado para a União Europeia (2009) e em fase III de ensaios clínicos nos EUA. Este sistema terapêutico surgiu da necessidade de desenvolver uma terapêutica para doentes com osteossarcoma não metastático. Os estudos clínicos concluíram que esta terapia em combinação com outros agentes antineoplásicos aumenta o tempo de vida dos doentes sem a reincidência da doença (Brochado, 2013).

Outra classe de nanotransportadores com um grande potencial terapêutico tem sido desenvolvida nos últimos tempos. Os lipossomas com alta sensibilidade à temperatura permitem uma rápida libertação do fármaco nas células tumorais após serem submetidos a uma fonte de energia externa (figura 56). Como um exemplo desta nova nanotecnologia, o ThermoDox é um sistema lipossomal que liberta a doxorrubicina encapsulada quando é ativado pelo calor. A função deste sistema é libertar altas concentrações de fármaco na região tumoral. A aprovação deste ainda não foi concedida mas acredita-se que este será um sistema promissor na área oncológica. O estudo de fase III permite comparar a terapêutica ThermoDox em combinação com radiofrequência e a radiofrequência aplicada por si só a doentes (Brochado, 2013).

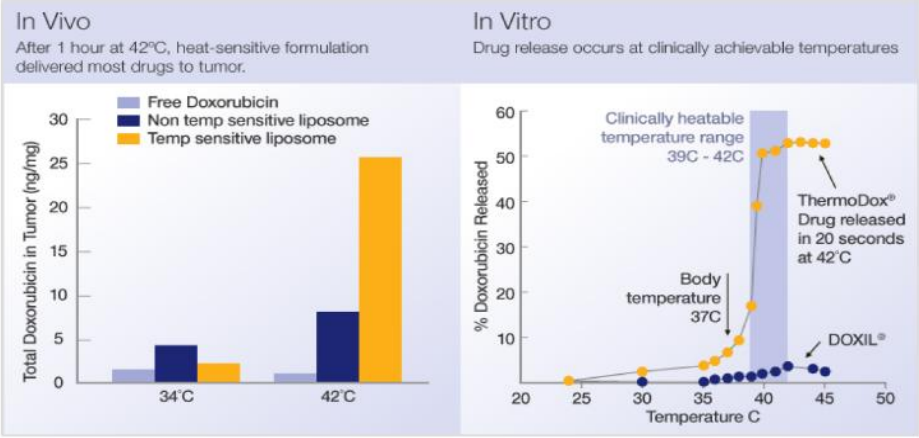


Figura 56 – *In vivo*, quantidade de doxorrubicina presente no tumor após o recurso a hipertermia. *In vitro*, percentagem de doxorrubicina libertada dos lipossomas de acordo com a variação da temperatura. Adaptado de Brochado, 2013.

A tabela seguinte (tabela 15) demostra as formulações de nanopartículas disponíveis no mercado.

Tabela 15 – Formulações de nanopartículas atualmente comercializadas. Fonte: Pillai, 2011.

Formulações nanoparticuladas atualmente comercializadas					
Nome comercial	**Fármaco**	**Fabricante**	**Forma Farmacêutica**	**Indicação**	**Fase de desenvolvimento**
Abraxane®	Albumina-Paclitaxel Nab paclitaxel em combinação com gencitabina	*Abraxis Bioscience; Astrazeneca* *Celgen*	Liofilizado	Cancro da mama metastático Cancro do pulmão Cancro pancreático	Aprovado pela FDA (2005) Aprovado pela FDA (2012) Aprovado pela FDA (2013)

O Abraxane® (figura 57) é uma formulação composta por nanopartículas de albumina do soro humano ligada ao paclitaxel. De forma a contornar o problema de toxicidade inerente à necessidade de utilizar o Cremophor® El nas formulações convencionais de paclitaxel, foi desenvolvido este novo nanosistema que está isento de solventes orgânicos. A presença de albumina na composição proporciona o transporte do paclitaxel através das células endoteliais. Este tratamento foi aprovado pela FDA (2005) e está direcionado para doentes que apresentem cancro da mama metastático, no caso de doentes adultos, que não respondiam à terapêutica de primeira linha e para os quais a terapêutica com antraciclinas

não seria indicada. Em 2008, a EMA (Agência Europeia de Medicamento) também aprovou a entrada deste no mercado europeu. Com base nos estudos clínicos de fase III, foi comprovado que esta nova terapêutica permite altas taxas de resposta, uma maior segurança e menores efeitos colaterais comparativamente à terapêutica convencional. Mais tarde, em 2012, também foi aprovado pela FDA com indicação para doentes com cancro de pulmão e, em 2013, recebeu aprovação para o tratamento do cancro pancreático em combinação com gencitabina (Barros, 2013; Pillai, 2013).

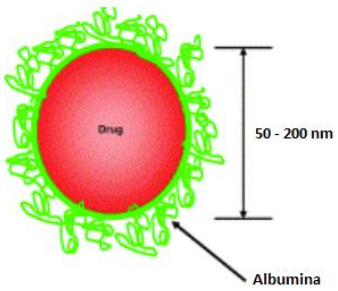


Figura 57 – Representação esquemática do Abraxane® (Barros, 2013).

No desenvolvimento de novos nanosistemas terapêuticos muitas vezes são utilizados polímeros sintéticos, que são projetados para que a formulação final assuma caraterísticas desejáveis de peso, tamanho, carga, maior estabilidade e menor imunogenicidade relativamente aos polímeros naturais.

A tabela 16 demonstra os conjugados polímero-proteína que se encontram aprovados para uso cínico.

Tabela 16 – Conjugados Polímero – Proteína. Fonte Pillai, 2013.

Conjugados Polímero - Proteína						
Nome comercial	**Fármaco**	**Polímero**	**Fabricante**	**Forma Farmacêutica**	**Indicação**	**Fase de desenvolvimento**
Zinostatin (Stimalmer®)	SMANCS	Estireno-anidrido maleico	*Yamanouchia Japan Astellas Pharm Inc.*	———	Carcinoma hepatocelular	Aprovado no Japão (1994)
Oncaspar®	L-asparaginasa	PEG	*Enzon Pharmaceuticals*	Liofilizado	Leucemia linfoblástica aguda	Aprovado pela FDA (1994)

Em 1994 foi aprovado pelo Japão o primeiro conjugado polimérico para o tratamento do carcinoma hepatocelular. O Zinostatin (Stimalmer®) é um conjugado de estireno-anidrido maleico e da proteína neocarzinostatina, que apresenta atividade antitumoral. Este sistema veio proporcionar um aumento do tempo de meia vida da proteína já que aumenta a sua lipofilicidade.

Um outro sistema, designado por Oncaspar®, recebeu a primeira aprovação pela FDA, em 1994, para o uso em doentes que apresentassem hipersensibilidade à forma nativa da aspaparaginase. Posteriormente, em 2006, foi aprovado para o tratamento de primeira linha em doentes com leucemia linfoblástica aguda. Este é um conjugado composto por a enzima L-asparaginase associada ao polietilenoglicol (PEG). Esta união promove o fenómeno de "peguilação" que é umas das estratégias adotadas no desenvolvimento de sistemas inovadores para diminuir a imunogenicidade. Além disso, esta associação ao polímero permite diminuir as reações de hipersensibilidade da enzina. O conjugado apresenta um tempo de circulação maior, o que se traduz numa reduzida frequência deadministração (Wang; Billone; Mullett, 2013; Pillai, 2013).

As formulações que são transportadas em sistemas micelares para tratamento oncológico, atualmente comercializadas, são apresentadas na tabela seguinte.

Tabela 17 – Formulações de micelas atualmente comercializadas. Fonte Pillai, 2013.

Formulações de micelas atualmente comercializadas						
Nome comercial	**Fármaco**	**Polímero**	**Fabricante**	**Forma Farmacêutica**	**Indicação**	**Fase de desenvolvimento**
Genexol – PM®	Paclitaxel	Ácido polilláctico-PEG	*Samyang Pharmaceuticals*	Liofilizado	Cancro da mama e NSCLC	Aprovado na Coreia do Sul (2008)
Paclical®	Paclitaxel	Derivado de vitamina A (plataforma denominada de XR-17)	*Oasmia*	Liofilizado	Cancro epitelial do ovário	Aprovado na Rússia (2015)[1]

[1]Em combinação com carboplatina

O Genexol-PM® (tabela 17) é uma micela polimérica que contém paclitaxel e encontra-se aprovada na Coreia do Sul (2008) para o tratamento do cancro da mama e cancro do pulmão de não pequenas células (NSCLC). Este sistema é hidrossolúvel o que elimina o uso de solvente, o Cremophor® EL. Este sistema é constituído por copolímeros de PEG e PLA e

apresenta um tamanho entre 20 a 50nm. Na presente data, encontra-se em fase II de ensaio clínico nos EUA e Rússia (Brochado, 2013).

O Paclical® (tabela 17) é uma micela polimérica produzida a partir de vitamina A, que transporta o paclitaxel para os tecidos tumorais. Foi recentemente aprovado na Rússia (2015) em doentes com cancro do ovário. Esta formulação elimina os efeitos secundários da terapia convencional de paclitaxel e não requer premedicação (*Oasmia Pharmaceutical*, 2015).

8.2 Produtos em ensaios clínicos

O desenvolvimento de novos sistemas transportadores de moléculas ativas tem sido uma área promissora para a indústria farmacêutica. A aplicação de nanosistemas capazes de encapsular o agente terapêutico vem permitir a reutilização de moléculas ativas que, na sua forma convencional, poderiam ter sido eliminadas devido à descoberta de eventuais efeitos colaterais ou baixa disponibilidade. As tabelas segintes mostram diversas formulações em fase de ensaios clínicos para aplicação oncológica. Ao longo do tempo têm sido desenvolvidas novas formulações que melhoram a eficácia do fármaco e diminuem a sua toxicidade.

A tabela seguinte (tabela 18) demostra a variedade de ensaios clínicos com lipossomas no transporte de agentes terapêuticos, com destaque para formulações liofilizadas (forma farmacêutica indicada a amarelo).

Tabela 18 – Formulações lipossomais em fase de desenvolvimento clínico. Fonte Pillai, 2013; Chang; Yeh, 2012.

Formulações lipossomais em fase de ensaios clínicos					
Nome comercial	**Fármaco**	**Fabricante**	**Forma Farmacêutica**	**Indicação**	**Estado**
MCC-465	Doxorrubicina	*Mitsubishi Pharma Corporation*	Liofilizado	Cancro do estômago metastático	Fase I
SGT53-01	Gene p53	*SynerGene Therapeutics*	_____	Tumores sólidos	Fase I
LEP-ETU	Paclitaxel	*Neopharma*	Liofilizado	Cancro pancreático, da mama e do pulmão.	Fase I-II Fase II na Índia.
LE-DT	Docetaxel	*NeoPharma*	Liofilizado	Tumores sólidos metastáticos	Fase I completa nos EUA.

EndoTAG-I	Paclitaxel	*Medigene AG*	Liofilizado	Cancro da mama e do pâncreas	Fase II
LEM-ETU	Mitoxantrona	*Medigene; SynCore Biotechnology*	_____	Leucemia, cancro da mama, fígado, estômago e ovário.	Fase I
Lipoplatin	Cisplatina	*Regulon*	Suspensão	Cancro do pâncreas, gástrico, cabeça, pescoço, mama e NSCLC.	Fase III
Thermodox	Doxorrubicina	*Celsion Corporation*	_____	Carcinoma Hepatocelular não ressecável.	Fase III aprovada pela FDA
INX-0125	Vinorelbina	*Inex Pharmaceuticals Corporation*	_____	Tumores sólidos avançados.	Fase I
INX-0076	Topotecano	*Inex Pharmaceuticals Corporation*	_____	Tumores sólidos avançados.	Fase I
OSI-211	Lurtotecan	*OSI*	_____	Cancro da cabeça, pescoço e ovário.	Fase II
Marqibo	Vincristina	*Talon Therapeutics*	_____	Melanoma metastático uveal maligno.	Fase II completo
Anamicina Lipossomal	Anamicina	*Callisto Pharmaceuticals*	Liofilizado	Crianças ou adultos jovens com Leucemia linfocítica aguda refratária ou recidiva	Fase I-II
Atragen	Tretinoína	*Aronex Pharmaceuticals*	_____	Leucemia promielocítica aguda, cancro da próstata.	Não aprovado
LE-SN38	SN-38	*NeoPharm*	Liofilizado	Carcinoma colorretal metastático	Fase I-II
Aroplatin	Cisplatina analógica	*Antigenics, Inc.*	_____	Carcinoma colorretal metastático	Fase II
SPI-077	Cisplatina	*Alza*	_____	Cancro da cabeça, pescoço e pulmão	Fase I-II
S-CKD602	Análogos da camptotecina	*Chong Kun Dang Pharmaceuticals*	Liofilizado	Carcinoma recorrente do colo do útero	Fase I-II

O MCC-465 (figura 58) é um sistema terapêutico lipossomal que contém a doxorrubicina encapsulada. Este lipossoma, além de se encontrar conjugado com polietilenoglicol (PEG), também tem associado o fragmento de um anticorpo monoclonal humano, GAH, que confere especificidade ao sistema ao reconhecer vários tipos de células tumorais. Os estudos pré-clínicos evidenciaram que a atividade citotóxica deste lipossoma é superior em comparação com um lipossoma-PEG de doxorrubicina não conjugado com o fragmento (Matsumura, 2004).

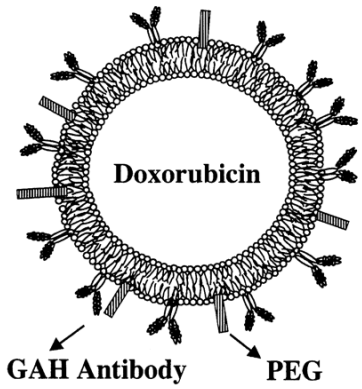


Figura 58 – Representação esquemática do MCC-465. Adapatdo de Matsumura, 2004.

O LEP-ETU é um lipossoma que contém paclitaxel e está em fase I/II de ensaios clínicos destinado ao tratamento do cancro da mama, pancreático e pulmão. Ainda está também em fase II de estudos clínicos na Índia. Esta terapia surge na tentativa de diminuir os efeitos secundários em relação ao paclitaxel convencional, assim como diminuir o tempo de infusão, não necessitar de pré-medicação e aumentar a efetividade do tratamento através da utilização de doses elevadas, sem que ocorra um aumento dos efeitos adversos. Este tipo de sistema é apresentado como uma formulação estéril, estável, independente do uso de Cremophor® EL e fácil de utilizar (Chang; Yeh, 2012).

O LE-DT® é um sistema lipossomal que se encarrega de encapsular o docetaxel. Este está em fase I de estudos clínicos nos EUA como tratamento de primeira linha de doentes com cancro do pâncreas localmente avançado ou metastático (Deeken, 2013).

O EndoTag®-1 é uma composição inovadora que combina o paclitaxel com lípidos de carga neutra e carga positiva. Esta carga que o sistema adquire faz com que este seja direcionado para as células endoteliais, recém formadas, que apresentam carga negativa. Ao ocorrer esta interação é previsto que o crescimento dos vasos sanguíneos que alimentam o tumor seja inibido, diminuindo assim o crescimento do tumor. Esta formulação está na fase II de ensaios clínicos e é indicada para o tratamento do cancro da mama e do pâncreas (Awada, 2014; Pillai, 2013).

A anamicina lipossomal é uma composição que contém anamicina encapsulada em lipossomas. Esta é dotada de atividade antitumoral e actua inibindo a topoisomerase II, que consequentemente inibe a replicação e reparação do DNA (ácido desoxirribonucleico). Esta nova formulação demontra uma maior atividade antineoplásica e menor toxicidade em relação à anamicina livre. A formulação está em ensaio clínico (fase I/II) e está indicada para

crianças ou adultos jovens com leucemia linfocítica aguda refratária ou recidiva (Wetzler, 2013; Pillai, 2013).

LE-SN38 é um sistema que surge para encapsular um agente ativo insolúvel, SN38, num lipossoma. O SN38 é um metabolito ativo do CPT-11 (irinotecano) que, por não necessitar de ser convertido, pode ser mais eficaz e seguro do que o CPT-11. Esta composição está em fase I/II dos ensaios clínicos e está indicada para o tratamento do cancro colorretal metastático (Lei, 2004).

S-CKD602 é uma formulação lipossomal que contém CKD-602, um análogo da camptotecina com capacidade de inibir a topoisomerase I. Esta terapêutica é composta por fosfolípidos ligados covalentemente ao metoxopolietileno glicol (MPEG). Esta composição inovadora prolonga a circulação do CKD-602 na corrente sanguínea, aumenta a exposição da molécula ativa aos tecidos tumorais mostrando-se mais eficaz relativamente ao fármaco livre. Está atualmente em desenvolvimento clínico (fase I/II) e a sua atividade citotóxica está indicada para o carcinoma recorrente do colo do útero (Zamboni, 2009).

A tabela seguinte apresenta algumas das formulações nanoparticuladas em fase de ensaios clínicos destinadas ao combate de vários tipos de tumores.

Tabela 19 – Formulações de nanopartículas em fase de ensaios clínicos. Fonte Pillai, 2013; Ventola, 2012.

Formulações nanoparticuladas em fase de ensaios clínicos						
Nome comercial	**Fármaco**	**Composição da nanopartícula**	**Fabricante**	**Forma farmacêutica**	**Indicação**	**Estado**
Livatag® Transdrug®	Doxorrubicina	Polialquilcianocrilatos	*Onxeo*	_____	Hepatocarcinoma	Fase III
NBTXR3		Cristais de óxido de háfnio	*Nanobiotix*	_____	Sarcoma do tecido mole.	Fase I
Panzem®	Metoxi-estradiol	Dispersão nanocristalina de 2-metoxiestradiol	*CASI Pharmaceuticals*	_____	Cancro do ovário, glioblastoma multiforme, do cérebro, da próstata, mieloma múltiplo.	Fase II
Aurimmune®	Fator de necrose tumoral	Nanopartículas de ouro	*Cytimmune Sciences*	_____	Tumores sólidos	Fase I

BIND-14	Docetaxel	Nanoparticula PLGA-PEG **Ligando:** PSMA	*BIND Biosciences*	———	Tumores sólidos. Cancro da próstata e CPNPC.	Fase I Fase II
Cydosert® (CALAA-01)	siRNA	Nanoparticula polimérica-ciclodextrina **Ligando:** Transferrina	*Calando Pharmaceuticals*	———	Tumor sólido	Fase I
AuroShell®		Nanopartículas de sílica revestidas por ouro	*Nanospectra Bioscience*	———	Tumores sólidos, cancro do pescoço e cabeça	Fase I

O Livatag® (tabela 19) é formado por doxorrubicina adsorvida em nanopartículas de cianoacrilato e está indicada para o carcinoma hepatocelular. O estudo clínico de fase II foi suspenso devido ao aparecimento de uma grave reação respiratória aguda em 3 doentes causando a morte de 2 indivíduos. Apesar deste desfecho, a terapia demonstrou um aumento da sobrevivência global comparativamente ao grupo controlo. Com isto, a empresa responsável pela formulação resolveu investir num novo ensaio melhorando o perfil de segurança desta nova terapia. Neste momento, o Livatag® encontra-se em fase III dos ensaios clínicos sendo que o anterior foi aprovado (Brochado, 2013).

As tabelas seguintes (tabela 20 e 21) demostram os conjugados polímero–proteína e polímero-fármaco, respetivamente, que estão em desenvolvimento clínico. A aplicação de polímeros associados a fármacos deve-se à sua biodegradabilidade, toxicidade nula e solubilidade em água. Além disso, permitem a modificação da superfície do sistema terapêutico ("peguilação") e possuem uma vectorização específica para células do tumor (Brochado, 2013).

Tabela 20 – Conjugados Polímero – Proteína. Fonte: Lyrdal; Stierner; Lundstam, 2009; Motzer, 2002.

Conjugados Polímero - Proteína						
Nome comercial	**Proteína**	**Polímero**	**Fabricante**	**Forma farmacêutica**	**Indicação**	**Estado**
PEG-Asys®	Interferão α – 2a	PEG	*Genentech*	Liofilizado	Melanoma, leucemia mieloide crónica e carcinoma renal.	Fase I - II
PEG-Intron®	Interferão α – 2b	PEG	*Merck*	Liofilizado	Melanoma, leucemia mieloide múltipla e carcinoma renal.	Fase I - II

O PEG-Asys® (peginterferão alfa-2a) é um conjugado da proteína interferão alfa-2a com o bis-[monometoxipolietilenoglicol]. Esta composição está em fase I/II de ensaios clínicos para ser averiguada a sua eficácia e segurança, após a sua administração em doentes com melanoma, leucemia mieloide crónica e carcinoma renal.

O PEG-Intron® é também um conjugado que utiliza a proteína interferão alfa-2b como agente ativo e é associado ao polietilenoglicol para prolongar a circulação da terapia no plasma.

Os conjugados polímero-fármaco apresentam grandes vantagens relativamente ao sistema de entrega convencional. Estes são compostos por um espaçador degradável que faz com que o sistema seja excretado, após a libertação da molécula ativa e ainda permite controlar a velocidade de libertação desta (Lopes, 2012).

Tabela 21 – Conjugados Polímero – Fármaco. Fonte: Domb; Khan, 2014.

Conjugados Polímero - Fármaco						
Nome comercial	**Fármaco**	**Polímero**	**Fabricante**	**Forma farmacêutica**	**Indicação**	**Estado**
Xyotax®	Paclitaxel	Poliglutamato PGA	*Cell Therapeutics*	Liofilizado	Cancro da mama. Cancro do ovário e NSCLC	Fase II Fase III
PNU166945	Paclitaxel	HPMA	*Pfizer*	_____	Tumores sólidos	Fase I Descontinuada
Prolindac® (AP5346)	Platino - DACH	HPMA	*Access Pharmaceuticals*	Liofilizado	Cancro do ovário	Fase II
PK1 (FCE28068)	Doxorrubicina	HPMA	*Pfizer*	Liofilizado	Cancro da mama, pulmão e cólon	Fase II
PK2 (FCE28069)	Doxorrubicina	HPMA - Galactosamida	*Pfizer*	_____	Carcinoma hepatocelular	Fase I/II
AD-70 DOX-OXD	Doxorrubicina	Dextrano	_____	_____	Vários cancros	Fase I
Prothecan® (Pegamotecan)	Camptotecina	PEG	*Enzon Pharmaceuticals*	_____	Cancro gástrico e esófago	Fase II Descontinuado
NKTR-102	Irinotecano	PEG	*Nektar Therapeutics*	Liofilizado	Cancro da mama. Cancro do ovário e colorectal. NSCLC e SCLC	Fase III Fase II Fase II

CRLX-101	Camptotecina	Ciclodextrinas	*Cerulean Pharma Inc.*	Liofilizado	Cancro do ovário Linfoma	Fase II FaseI/II
AP5280	Carboplatina	HPMA	*Access Pharmaceuticals*	Liofilizado	Vários tumores	Fase I/II
CT-2106	Camptotecina	Poliglutamato PGA	*Cell Therapeutics*	Liofilizado	Vários tumores	Fase I
XMT-1001	Camptotecina	Fleximer®	*Mersana*	_____	Tumores sólidos	Fase I
MAG-CPT PNU166148	Camptotecina	HPMA	*Pfizer*	_____	Tumores sólidos	Fase I
DE-310	Exatecano (DX-8951f)	Carboxilmetil-dextrano	*Daiichi Pharmaceutical*	Liofilizado	Tumores sólidos avançados	Fase I
EZN2208	SN38	PEG	*Enzon Pharmaceuticals*	_____	Crianças com cancro. Carcinoma coloretal metastático.	Fase I/II Fase II

O Xyotax® foi o primeiro nanosistema obtido pela conjugação polímero-fármaco a alcançar a fase III dos ensaios clínicos. É composto pelo ácido poli (glutâmico) associado ao agente ativo, paclitaxel. Esta formulação anula a utilização de solventes pois confere solubilidade ao fármaco e confere um aumento da sua eficácia antitumoral. Está em fase de desenvolvimento clínico sendo que o estudo em fase II destina-se ao tratamento de doentes com cancro da mama e o de fase III está indicado para o tratamento do cancro do ovário e cancro do pulmão de não pequenas células.

O Prolindac® é um conjugado polimérico obtido a partir da associação do (hidroxipropil)meta-acrilamila (HPMA) com um análogo do platino, oxaliplatino. Esta formulação visa aumentar a eficácia do fármaco. Também se encontra em fase de estudos clínicos (fase II) para ser direcionado a doentes com cancro do ovário.

Este polímero, o HPMA, também pode ser associado com a doxorrubicina para originar formulações em fase de estudo clínico, como por exemplo, o PK1 e PK2. O primeiro está na fase II do ensaio que se direciona ao tratamento do cancro da mama, pulmão e cólon e foi desenvolvido para diminuir os efeitos nefastos que a doxorrubicina livre desencadeia. O segundo, por apresentar na sua constituição resíduos de galactosamida confere-lhe especificidade para as células tumorais do fígado e portanto encontra-se na fase I-II do ensaio clínico que se destina ao tratamento do carcinoma hepatocelular

O Prothecan® é uma composição que se encontra descontinuada mas que apostava numa estratégia que merece destaque. Esta formulação utiliza o PEG aliado à camptotecina com o intuito de aumentar o tempo de circulação do agente ativo na corrente sanguínea e por outro lado oferecer proteção à molécula ativa, camptotecina.

O NKTR-102 é outro nanosistema que recorre à estratégia da "peguilação" para formular um conjugado entre o irinotecano e o PEG. Esta composição está na fase II do ensaio que é destinado ao tratamento do cancro do ovário e colorretal, bem como, para o cancro do pulmão de não pequenas células (NSCLC) e cancro do pulmão de pequenas células (NSCLC) e em fase III para o tratamento do cancro da mama. Uma maior concentração deste fármaco no tumor vem proporcionar o desenvolvimento de uma terapia mais eficaz (Pillai, 2013).

O CRLX-101 (anteriormente denominado por IT-101) é também uma formulação em que o seu nome original era IT-101com base na conjugação polímero-fármaco em que utiliza como molécula ativa, a camptotecina, e o polímero é a ciclodextrina. Este está indicado para o tratamento do cancro do pulmão e encontra-se na fase II do ensaio clínico onde evidencia uma maior acumulação do fármaco.

Na tabela seguinte (tabela 22) podem ser observadas algumas das formulações de micelas em fase de desenvolvimento clínico e a sua respetiva indicação. Este tipo de sistemas além de serem adequados para fármacos insolúveis em água também possuem alto potencial de vetorização. Estes apresentam ainda biocompatibilidade, biodegradabilidade e facilidade na modificação funcional.

Tabela 22 – Formulações de micelas em fase de ensaios clínicos. Fonte: Carballo, 2007.

Formulações de micelas em fase de ensaios clínicos						
Nome comercial	**Fármaco**	**Composição da micela**	**Fabricante**	**Forma farmacêutica**	**Indicação**	**Estado**
Genexol – PM®	Paclitaxel	Ácido polilíctico-PEG	*Samyang Pharmaceuticals*	Liofilizado	Cancro da mama e ovário. Cancro do ovário. Cancro do pulmão. Cancro pancreático.	Fase II Fase I-II[1] Fase II[1] Fase III[2]

NK105	Paclitaxel	PEG-Poliaspartato	*Nippon Koyaku*	Liofilizado	Cancro do estômago. Cancro da mama.	Fase II Fase III
NK012	SN 38	PEG-Poliglutamato	*Nippon Koyaku*	Liofilizado	Cancro da mama	Fase II
Nanoxel - PM®	Docetaxel	PEG-Ácido-poli-(D-L-láctido)	*Dabur Pharma*	Formulação líquida	Cancro da mama	Fase I
Nanoplatin® NC-6004	Cisplatina	Ácido poliglutámico-PEG	*Nanocarrier; Orient Europharma*	Solução para injeção	Cancro pancreático, NSCLC e tumores sólidos.	Fase III na Ásia, Fase II no Japão, Fase I e II nos EUA.
SP1049C	Doxorrubicina	Pluronic L61 e F127	*Supratek Pharma*	Liofilizado	Cancro do esófago e estômago	Fase II
NK911	Doxorrubicina	Ácido poliaspártico-PEG	*Nippon Koyaku*	Liofilizado	Tumores sólidos	Fase I

[1]Terapia combinada com a administração de carboplatina
[2]Terapia combinada com a administração de gemcitabina

O Genexol-PM® além de estar aprovado na Coreia do sul, também se encontra em estudos clínicos para diversas indicações. Trata-se de uma micela que é composta por um polímero de dibloco PLA-PEG em que este conté o paclitaxel encapsulao. Uma das indicações que apresenta é o tratamento do cancro da mama e ovário estando na fase II do ensaio clínico. Em fase I-II está outro estudo onde combina esta terapia com a administração de carboplatina e direciona-se a doentes com cancro do ovário. Existe ainda outro estudo em fase II que combina a administração de carboplatina com este fármaco para aplicar a doentes com cancro do pulmão. Por último, existe outro estudo em fase III que envolve esta terapia juntamente com a administração de gencitabina para ser aplicada a doentes com cancro pancreático.

Outra micela polimérica que transporta o paclitaxel é o NK105, em que este é constituído por PEG-Piloaspartato e está em fase II de ensaios clínicos, estando indicado para tratamento do cancro do estômago.

Uma outra micela polimérica é o NK102, que inclui o PEG-Poliglutamato na sua constituição. Esta vesícula permite transportar o SN38 que se refere a um análogo da camptotecina (metabolito do irinotecano). Está em fase II de ensaios clínicos como uma terapêutica para o cancro da mama. Este nanosistema permite uma lenta libertação do fármaco já que a sua molécula ativa está ligada covalentemente ao copolímero através dos seus resíduos hidrofóbicos, e a libertação dá-se conforme a degradação da vesícula. Uma mistura de polímeros, Pluronic L61 e Pluronic F127, que compõe uma micela polimérica para o sistema de transporte da doxorrubicina está em ensaio clínico fase II com indicação para o

tratamento do cancro do esófago e estômago. O SP1049C surge para combater a resistência adquirida pelos tumores à doxorrubicina livre, apresentando simultaneamente um melhor perfil de toxicidade.

Uma outra molécula formulada com o princípio de melhorar a entrega da doxorrubicina é o NK911. Este é um sistema micelar composto por ácido poliaspártico-PEG que se mostra eficiente quanto à acumulação da doxorrubicina nos tecidos tumorais (Matsumura, 2004).

8.3 Produtos em fase de desenvolvimento pré – clínico

A veiculação de fármacos através de sistemas de transporte como os dendrímeros, está em fase pré-clínica e poderá prosseguir para os ensaios seguintes consoante os resultados que forem obtidos. A tabela seguinte demostra os dendrímeros que estão em estudo clínico.

Tabela 23 – Produtos em fase pré – clínica. Fonte: Chen, 2010.

Sistemas de entrega de fármacos antitumorais em fase pré-clínica					
Nome comercial	**Fármaco**	**Sistema de entrega**	**Forma farmacêutica**	**Indicação**	**Estado**
PAMAM-MTX®	Metotrexano	Dendrímero de poliamidoamina (PAMAM).	_____	_____	Pré-clínico
PAMAM-Platinate	Cisplatina	Dendrímero de poliamidoamina (PAMAM).	_____	_____	Pré clínico

O PAMAM MTX® é um dendrímero obtido pela conjugação de poliamidoamina (PAMAM) com o metotrexano, através da interação dos grupos amino do PAMAM com os grupos carboxilo do MTX (metotrexano). Esta nova terapia direcionada ao tratamento tumoral está em fase de ensaios pré-clínicos. A alta densidade de grupos amino nos dendrímeros PAMAM permite que estes consigam encapsular uma quantidade alargada de moléculas ativas (Kojima, 2015). Um outro estudo associou o polietilenoglicol ao complexo anterior para originar PAMAM-PEG/MTX. Os resultados deste evidenciaram que o complexo PAMAM-PEG/MTX apresentor uma maior atividade antitumoral mostrando um grande potencial no que respeita ao transporte de fármacos (Kong, 2009).

O PAMAM-Platinate é um inovador sistema terapêutico que está em fase pré - clínica. A geração 3.5 de dendrímeros PAMAM são conjugados dendrímero-*platinate* que se destinam a entregar moléculas ativas às células do tumor. Este dendrímero é composto pela

poliamidoamina, com grupos carboxilatos à superfície, conjugado com a cisplatina. Este demonstra ser um polímero altamente solúvel em água e, *in vitro*, desencadeia uma libertação lenta do fármaco (Malik; Evagorou; Dancun, 1999).

8.4 Patentes de produtos liofilizados

A tabela seguinte sistematiza a informação sobre o seu método de liofilização de nanosistemas liofilizados que se encontram patenteados. Todo o conteúdo da tabela foi obtido a partir de uma base de dados de patentes europeia, Espacenet (Europen Patente Register), e uma internacional, World Intellectual Property Organization.

Tabela 24 – Patentes de produtos liofilizados e o seu respetivo método. Fonte *Espacenet*; WIPO, 2015.

Patente / Titular da patente	**Descrição e Revindicação da patente**	**Método de produção/ liofilização**	**Data de priorida de**
US 8211473 **Formulações estáveis para a liofilização de partículas terapêuticas** Greg Troiano Young-Ho Song Stephen E. Zale James Wright Christina Hoven	**Descrição:** Formação de uma composição liofilizada constituída por uma concentração de 10-100 mg/mL de nanopartículas poliméricas num meio aquoso, 4-6 em peso percentual de trealose ou sacarose e 7-12 em peso percentual de hidroxipropil-β-ciclodextrina. **Revindicacão:** Uma composição farmacêutica liofilizada reconstituída apropriada para administração parentérica que compreende: um de 10-100 mg / mL de concentração de nanopartículas poliméricas em um meio aquoso; em que as nanopartículas poliméricas compreendem: um poli (láctico) ácido-bloco-poli (etileno) glicol ou copolímero de poli (ácido láctico) -co-poli (glicólico) ácido copolímero de glicol-bloco-poli (etileno), e um agente terapêutico.	Na preparação das nanopartículas, é formada uma emulsão composta por uma fase orgânica, mistura do docetaxel com um polímero (homopolímero, copolímero e copolímero com o ligando), e uma fase aquosa constituída por um surfactante e um solvente dissolvido na proporção de 1:5. No processo de liofilização, a solidificação da composição pode dar-se a uma temperatura superior a -40^0 C ou inferior a -30^0 C. A etapa de secagem pode ocorrer acerca de 50mTorr, a uma temperatura de -25^0 C a -34^0 C, ou de -30^0 C a -34^0 C.	11-12-2009

Patente / Titular da patente	Descrição e Revindicação da patente	Método de produção/ liofilização	Data de prioridade
EP 2328557 **Formulações orais de agentes quimioterapêuticos.** David Bonnafous Guy Caverna Assia Dembri Sophie Lebel-Binay Gilles Ponchel Emilienne Soma	**Descrição:** Formulação de nanopartículas liofilizadas que compreendem um agente quimioterapêutico, um polímero, o poli (isohexil cianoacrilato), e um oligossacarideo cíclico (hidroxipropil-β-ciclodextrina e/ou β-ciclodexrina metilada (RAMEB) e/ou γ-ciclodextrina) e ainda pode ser usado um agente tensioactivo (poloxâmero 188). **Revindicacão:** Nanopartículas compostas por um derivado de camptotecina, o ingrediente ativo, de pelo menos um polímero e de um oligossacárido cíclico capaz de complexar o referido derivado de camptotecina, sendo as referidas nanopartículas utilizadas para o tratamento e/ou prevenção do cancro através da administração oral.	É desenvolvido um meio de polimerização onde são adicionados 0,1M de ácido cítrico, 0,5 a 15% de poloxâmero 188 e 0,1 a 70% de ciclodextrina sob agitação até que ocorra a dissolução completa. De seguida ocorrem os seguintes passos: -Mistura do agente terapêutico ao meio de polimerização. -Adiciona-se à mistura o monómero (50 a 200 ul) do referido polímero. -Permitir que a polimerização ocorra num período de 24h. No processo de liofilização são delineadas as seguintes etapas: - Solidificação: temperaturas compreendidas entre -80^0 C e -30^0 C (de preferência 55^0 C). Realizado durante períodos de 10min em 10 dias, geralmente durante 5h. -Secagem primária: temperaturas compreendidas entre 5^0 C a 50^0 C (valor preferencial 20^0 C), a pressões reduzidas num intervalo de valores entre 50 a 200 μBar (valor ideal 120 μBar). Pode ser realizada desde alguns minutos até alguns dias (1 dia de preferência). -Secagem secundária: condições preferenciais incluem uma fase com uma temperatura acerca de 20^0 C e uma pressão de 80μBar e uma segunda fase com uma temperatura de 35^0 C e uma pressão de 80μBar. Pode ser realizada desde alguns minutos até alguns dias tendo uma duração ideal de 5h.	6-08-2008
WO 2008105852 **Nanopartículas mucoadesivas para o tratamento do cancro** Alekha K Dash William J. Trickler Univ Creighton	**Descrição:** Formação de nanoparticulas compostas por um mono-éster de ácidos gordos com glicerol, quitosano e o agente terapêutico (taxano). **Revindicacão:** Uma composição farmacêutica composta por nanopartículas, em que estas compreendem: um éster de ácido gordo de glicerilo, mono - um quitosano; e um agente terapêutico para cancro.	O método relata a incorporação do agente terapêutico num monoéster líquido para formar uma mistura. É formada uma emulsão água-óleo pela junção da mistura anterior numa solução aquosa que inclui um álcool polivinílico. A emulsão resultante é adicionalmente emulsionada numa solução ácida aquosa contendo quitosano para formar uma emulsão múltipla. O produto resultante é liofilizado sob condições apropriadas: - Temperatura acerca de -50^0 C (antes de ser liofilizada, é congelada a -80^0 C). - Vácuo <0,0056 mBar.	26-10-2006
US 7985426 **Nanopartículas direcionadas para células de hepatoma e formas de entrega.** Hsing-Wen Sung Mei-Chin Chen Hosheng Tu	**Descrição:** Preparação de nanopartículas utilizando poli (ácido γ-glutâmico), (γ-PGA) e poli (láctico) (PLA) para sintetizar copolímeros de bloco pela ocorrência de uma reação de acoplamento entre γ-PGA e PLA. Estas nanopartículas são depois conjugadas com galactosamina. **Revindicação:** Uma composição farmacêutica de nanopartículas, composta de poli (ácido γ-glutâmico), (γ-PGA) e poli (láctico) (PLA) que formam copolímeros de bloco que são conjugados com um ligando, em que este tem uma afinidade para se ligar a um recetor de superfície de uma célula, e as referidas nanopartículas compreendem um núcleo interno hidrofóbico e um invólucro exterior hidrofílico.	Para sintetizar os copolímeros em bloco dos compostos γ-PGA e PLA foi utilizado CDI para ativar o grupo hidroxilo terminal do PLA. Dissolveu-se o CDI em 1,4-dioxano, numa atmosfera de azoto, e adicionou-se PLA à solução. Esta foi agitada à temperatura de 37^0 C durante 2h e dialisada com água destilada. A forma acidificada do hidrolisado γ-PGA foi dissolvida em DMSO numa atmosfera de azoto. Após a dissolução de DMAP, foi adicionado à solução o PLA ativado. A mistura final foi dialisada durante 2 dias com água destilada a 4^0 C. O produto final (copolímeros em bloco de γ-PGA-PLA) foi liofilizado e armazenado a -20^0 C até ser utilizado.	5-10-2004

Patente / Titular da patente	Descrição e Revindicação da patente	Método de produção/ liofilização	Data de prioridade
US 20030187062 **Formulação anti-tumoral baseada em paclitaxel.** Maurizio Zenoni Simone Maschio	**Descrição:** Mistura de uma solução estéril de paclitaxel com uma solução aquosa estéril de albumina do soro humano (HSA). É adicionado um ácido biocompatível à solução aquosa de albumina antes de misturar o fármaco em questão. **Revindicação:** Uma formulação antitumoral que consiste num pó liofilizado de nanopartículas de paclitaxel e albumina do soro humano, em que o paclitaxel está presente em uma quantidade entre 1 a 20%, e a albumina entre 60 a 98%, de peso percentual, e o tamanho médio das nanopartículas será inferior a 0,2 microns, em que o referido pó liofilizado contém entre 1 a 20% em peso de sais biocompatíveis, obtidos por salificação de pelo menos um ácido biocompatível ou devido à presença de pelo menos uma substância tampão ácida biocompatível. O ácido ou a substância tampão deve estar presente numa quantidade tal que o pH da mistura aquosa injectável reconstituída estará entre 5,4 e 5,8.	Uma solução aquosa de HSA é diluída em água desmineralizada estéril, sendo o seu pH corrigido para um valor dependente do ácido utilizado. A mistura é homogeneizada a alta pressão (4000-90000 psi) até obter uma nanoemulsão (MPS < 0,2 micrómetros), sendo rapidamente congelada a -80^0 C e liofilizada durante 58h sob condições estéreis, enquanto a temperatura vai aumentando para 30^0 C.	29-03-2002
US 20080253961 **Formulação de um agente ativo encapsulado em nanopartículas de PLGA activadas para atingir o cancro.** Arthur Braden Jamboor Vishwanatha Erica Kafka	**Descrição:** Formação de uma nanopartícula composta por um polímero biodegradável, um agente estabilizador anfifílico (poliol) não covalentamente associado com um composto espaçador, na sua forma liofilizada. Este sistema permite anexar qualquer ligando nucleofílico na superfície da nanopartícula. **Revindicação:** Uma nanopartícula de polímero ativado para entrega de fármacos específicos, que compreende: um polímero biocompatível e um agente estabilizador anfifílico não-covalentemente associado com um composto espaçador que contém, pelo menos, um electrófilo que reage seletivamente com um agente nucleófilo para ser direcionado à superfície exterior de um nanoconcha biodegradável, em que um agente ativo é carregado na *nanoshell.*	Formulação das nanopartículas compreende a formação de uma emulsão primária e secundária. - 30 mg de PLGA foram dissolvidos em 1 ml de clorofórmio a 4°C. - Desenvolvimento de uma solução de curcumina por dissolução desta em água sob condições alcalinas (NaOH). - Formação de uma emulsão primária pela junção da curcumina na solução de PLGA/clorofórmio. Para gerar a segunda solução é necessário: - 2 ml de 2% w/v de solução de água destilada/ PVA é formada. - Adição de etanol na dissolução do PVA em água. - Acrescentou-se o agente ativo BS3 à solução PVA/etanol. Procedeu-se à mistura da emulsão primária com a solução BS3/PVA/etanol. As nanopartículas foram expostas so processo de liofilização: - Foram colocadas a -80°C durante 1h e liofilizadas durante a noite. - Vácuo de 250 mT.	13-04-2007

Patente / Titular da patente	Descrição e Revindicação da patente	Método de produção/ liofilização	Data de prioridade
20130115274 **Método de produção de nanopartículas lipídicas para entrega de fármacos** Victor Knopov Richard P. Witte Priya Karmali Robin Lee David Webb Violetta Akopia	**Descrição:** Método para a preparação de uma nanopartícula lipídica capaz de encapsular uma molécula de RNA. É realizada uma mistura de lípidos dissolvida num solvente orgânico (etanol) e uma solução aquosa tamponada contendo uma molécula de RNA e ainda um polissacarideo. A primeira solução é injetada na solução aquosa para se obter a solução final. As nanopartículas lipídicas são posteriormente submetidas ao processo de liofilização. **Revindicação:** Um método para a preparação de uma nanopartícula lipídica com o intuito de encapsular uma molécula de RNA, compreendendo a preparação de uma solução de lípido que é composta de um lípido catiónico, um lípido auxiliar, um esterol e um lípido PEG dissolvido num solvente orgânico miscível com a água.	É preparada uma mistura de lípidos que contém um lípido catiónico, um lípido neutro, um esterol, e um lípido conjugado com PEG e que são solubilizados num solvente orgânico (etanol). Esta mistura é filtrada e combinada com uma solução aquosa tamponada (preferencialmente tampão citrato) em que a quantidade de ácido nucleico no tampão é de 0,08 a 0,8 mg/ml. Pode ser adicionado um agente crioprotetor ou soluto não iónico para equilibrar o potencial osmótico existente através da membrana da partícula. Na etapa da liofilização, a composição é submetida a uma temperatura superior a -40^0 C e inferior a -30^0 C para se obter o composto congelado. Pode ser usado 12-15% de sacarose, onde o passo de secagem dá-se a 50-150 mTorr, primeiro a uma baixa temperatura de -15^0 C a -35^0 C, e seguidamente a uma alta temperatura, acerca de 25^0 C, onde ficará finalizada passado 3-7 dias. De outra forma, pode ser utilizada a trealose, onde a etapa de secagem se dá a 50-100 mTorr, primeiro a uma baixa temperatura, 0^0 C a -15^0 C, e posteriormente a uma temperatura mais elevada.	4-11-2011

Conclusão

A nanotecnologia tem sido uma área desafiante para a indústria farmacêutica e a sua translação para a prática clínica é evidente. O desenvolvimento de nanosistemas de transporte de fármacos demonstra ser uma ferramenta muito útil na vectorização da molécula ativa ao tumor. Contudo, as nanodispersões aquosas estão susceptíveis a uma rápida perda de estabilidade durante o seu armazenamento. Esta problemática levanta algumas questões relativamente à sua eficácia terapêutica e aplicabilidade clínica. A liofilização surge neste contexto como um método de desidratação utilizado para ir ao encontro da estabilidade das nanodispersões aquosas. A aplicação deste processo suscita alguma preocupação por envolver um controlo de vários parâmetros e conhecimento das caraterísticas do produto. A necessidade de uma formulação racional, a complexidade e custos do processo, a estabilidade e segurança do produto são fatores que podem condicionar a produção de nanosistemas com qualidade.

Desta forma, é imperativo o cumprimento das diretrizes normativas, que estão estabelecidas para que o produto seja desenvolvido de acordo com as boas práticas laboratoriais (BPL) e de fabrico (BPF). Este estudo demonstra a importância e a variedade de requisitos normativos que estão associados à aplicabilidade do processo de liofilização.

As nanopartículas liofilizadas estão a assumir um papel importante na produção de sistemas inovadores por um número crescente de empresas na indústria farmacêutica. Face às necessidades médicas, estão em curso estudos clínicos com formulações liofilizadas que demostram ser terapias desafiantes no combate ao cancro. Existe uma ampla variedade de nanosistemas terapêuticos em diversas fases de estudo clínico, com indicações diversas, que se encontram em processo de validação. Um exemplo recente, é o caso do Paclical que recebeu a sua aprovação na Rússia no ano corrente (2015). Atualmente, as nanopartículas aplicadas à prática clínica utilizam uma molécula ativa cuja atividade já é conhecida. Estes sistemas não apresentam um agente terapêutico inovador mas sim um sistema de transporte que conforme já foi descrito neste estudo, apresenta resultados promissores relativamente à terapêutica do cancro e ainda uma alternativa subjacente aos sistemas convencionais.

A liofilização associada ao desenvolvimento de nanopartículas revela ser uma estratégia com grande potencial para obter produtos de qualidade, com atividade farmacológica eficaz, sendo que os investimentos nesta área estão em ordem crescente.

As patentes aplicadas aos demais processos de liofilização de nanopartículas oferecem informações relativas às variáveis do processo, como por exemplo, os componentes usados na formulação, as condições em que ocorre a solidificação, a secagem primária e secundária, e o tipo de nanopartículas usadas.

A dimensão que a nanotecnologia está a ganhar, associada à vectorização de terapias, está a abrir uma nova esperança no tratamento de tumores, com ganhos de eficácia e segurança.

Referências

AKERS, Michael J. – Parenteral Preparations. In: FELTON, Linda. Remington: Essentials of Pharmaceutics. London: Pharmaceutical Press, 2013. ISBN 978-0-85711-105-0, p. 495-532.

ALONSO, M.J. - Nanoparticulate drug carrier technology, in: S. Cohen, H. Bernstein (Eds.), Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines, Marcel Dekker, New York, 1996, p. 203–242.

ALONSO, M. et al. - Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles. International Journal Pharmaceutical. Vol. 68, n° 1-3 (1991), p. 69–76.

AWADA, A. et al. - A randomized controlled phase II trial of a novel composition of paclitaxel embedded into neutral and cationic lipids targeting tumor endothelial cells in advanced triple-negative breast cancer (TNBC). Annals of Oncology. Vol. 25, n° 4 (2014), p. 824-831.

BANSAL, Arvind K. ; KUMAR, Lokesh; BAHETI, Ankit – Excipients used in lyophilization of small molecules. J. Excipients and Food Chem. Vol. 1, n° 1 (2010), p. 41-54.

BARROS, Eva – Nanomedicinas para o cancro: o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Porto: [s.n.], 2013. Tese de mestrado.

BELBELLA, A. - In vitro degradation of nanospheres from poly(D,Llactides) of different molecular weights and polydispersities, Int. J. Pharm. 129 (1996), p. 95–102.

BHAMBHANI, Akhilesh; MEDI, Babu M. - Selection of Containers/Closures for Use in Lyophilization Applications: Possibilities and Limitations. The review of American Pharmaceutical Business & Technology (2010). [Consult.17/04/2015]. Disponível em www.americanpharmaceuticalreview.com

BROCHADO, Patrícia – Nanotecnologia e a sua aplicação à terapèutica oncológica. Lisboa: [s.n.], 2013. Tese de mestrado.

CARBALLO, S. M. - Conjugados poliméricos y su utilización como nanomedicinas anticancerígenas. Revista Iberoamericana de Polímeros. Vol. 8, n° 5 (2007), p. 374-390.

CHANG, B.S.; PATRO, S.Y. Freeze-drying Process Development for Protein Pharmaceuticals. Lyophilization of Biopharmaceuticals (Costantino, H.R. and Pikal, M.J. eds) American Association of Pharmaceutical Scientists. 2004, p.113-138.

CHANG, Hsin-I; YEH, Ming-Kung - Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. International Journal of Nanomedicine. Vol. 7 (2012), p. 49-60.

CHASTEIGNER, S. - Gastro-intestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocapsules, STP Pharma Science. Vol. 5, n° 3 (1995) 242–246. ISSN 1157 – 1489.

CHEN, Zhuo G. - Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy.Trends in Molecular Medicine. Vol. 16, n° 12 (2010), p. 594-602. doi:10.1016/j.molmed.2010.08.001.

COFFIN, M.D., MCGINITY, J.W. - Biodegradable pseudolatexes: the chemical stability of poly (D,L-lactide) and poly (ε-caprolactone) nanoparticles in aqueous media, Pharm. Res. 9 (1992) 200–205.Delivery of Proteins and Vaccines, Marcel Dekker, New York, 1996, p. 203–242.

COOK, Isabel – Applications oh headspace moisture analysis for investigation the water dynamics within a sealed vial containing freeze dried material. Biopharma Technology Limited – specialists in freeze drying research and development, 2010.

COOK, Isabel – Moisture mapping use headspace moisture analysis. In:,Cambridge. Emerging Technologies in Freeze Drying. Biopharma process system, 2011.

CROWE, Lois M.; CROWE, John H. – Method for preserving lipossomes. United States Patent. Patent number 4,857,319 (1989).

DATE, Praveen V.; SAMAD, Abdul; DEVARAJAN, Padma V. - Freeze-thaw: a simple approach for prediction of the optimal cryoprotectant for freeze-drying. AAPS PharmSciTech, vol. 11, n° 1, p. 304-313.

DAVE et al. - Effect of cryoprotectant on lyophlisation of doxorubicin –HCl loaded chitosan nanoparticles. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY & LIFE SCIENCES. Vol. 3, n° 6 (2012), p. 1769-1772. [Consult.17/12/2014]. Disponível em www.ijpls.com. ISSN: 0976-7126.

DEEKEN, John F. et al. - A phase I study of liposomal-encapsulated docetaxel (LE-DT) in patients with advanced solid tumor malignancies. Cancer chemotherapy and pharmacology. Vol. 71, n° 3 (2013), p. 627-633.

DEGOBERT, Ghania et al. – Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. Vol. 58, n° 15 (2006), p. 1688-1713. [Consult. 17/12/2014]. Disponível em www.sciencedirect.com. doi:10.1016/j.addr.2006.09.017.

DÍAZ, Mónica; MEJIA, Pablo E. - Nanoparticles as Drug Delivery Systems in Cancer Medicine: Emphasis on RNAi-Containing Nanoliposomes. Pharmaceuticals. Vol. 6 (2013), p. 1361-1380. [Consult.13/01/2015]. Disponível em www.mdpi.com/journal/pharmaceuticals. ISSN 1424-8247.

DOMB, Abraham; KHAN, Wahid – Focal Controlled Drug Delivery. Advances in Delivery Science and Technology. London: Springer, 2014. ISSN 2192-6212.
Drug Development & Delivery. LYOPHILIZATION PACKAGING - Packaging Freeze-Dried Substances - LYOPHILIZATION-PACKAGING-Packaging-FreezeDried Substances. 2014. [Consult. 24/05/2015]. Disponível em http://drug-dev.com/.

DURU, C. et al. - Analytical Options for the Measurement of Residual Moisture Content in Lyophilized Biological Materials. The Review of American Pharmaceutical Business & Technology, 2010.

Espacenet. Patente search. [Consult. 26/03/2015]. Disponível em http://worldwide.espacenet.com.

European Communities Commission - Directorate-General for Industry, "Eudralex,The rules governing medicinal products in the European Union, Volume 4 - EU Guideline to Good Manufacturing Practice medicinal products for human and veterinary use, Annex 1 - Manufacture of sterile medicinal products", 2008.

FAIRHURST, David; LEE, Robert - The Zeta Potential & its Use in Pharmaceutical Applications - Part 1: Charged Interfaces in Polar & Non-Polar Media & the Concept of the Zeta Potential. Drug Delivery & Delivery. Vol. 11, n° 6 (2011), p. 60-64.

Farmacopeia Portuguesa VIII. Lisboa: Infarmed - Ministério da Saúde, 2005.

GIESELER, Henning; HIBLER, Susanne; WAGNER, Christophe – Vial Freeze-Drying, Part 1: New Insights into Heat Transfer Characteristics of Tubing and Molded Vials. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 101, n° 3 (2012), p. 1189-1201.

GRABERG, Silja - Freeze Drying from Small Containers: Heat and Mass Transfer and Implications on Process Design. Hamburg [s.n.], 2011. Tese de doutoramento.

GUIDE TO INSPECTIONS OF LYOPHILIZATION OF PARENTERALS. Lyophilization of Parenteral. *Food and Drug Administration (FDA). [*Consult. 18/02/2015] Disponível em http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074909.htm.

Guideline for the determination of residual moisture in dried biologics products. Center for biologics and research (1990).

GUTERRES, Sílvia S.; SCHAFFAZICK, Scheila R. - Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. Química Nova. Vol. 26, n° 5 (2003), p. 726-737.

HEURTAULT B. et al. - Physico-chemical stability of colloidal lipid particles, Biomaterials 24 (2003), p. 4283–4300.

HIBLER, Susanne; WAGNER, Christophe; HENNING, Gieseler - Vial freeze-drying, part 1: New insights into heat transfer characteristics of tubing and molded vials. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 101, n° 3 (2012), p. 1189-1201.

ISO 13408. *Aseptic processing of health care products – Part 3: Lyophilization (2006).*

JADHAV, Tushar; MOON, R. S. – Review on Lyophilization Technique. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol. 4, n° 5 (2015), p. 1906-1928. [Consult. 13/12/2014]. Disponível em www.wjpps.com. ISSN 2278-4357.

JAIN, R. K. et al. – Angiogenesis in brain tumours. Nature Reviews Neuroscience. Vol. 8, n° 8 (2007), p. 610-622.

JENNINGS, Thomas A. – Lyophilization – Introduction and Basic Principles. London: Informa Healthcare, 2008. ISBN- 13: 978- 1-5749-1081-0.

JUNIOR, V. – Efeito da liofilização sobre a estrutura e mudanças de fase da albumina buvina modificada por reação com metoxi-polietilenoglicol. São Paulo [s.n.], 2004. Tese de Mestrado.

KASPER, J. C.; FRIESS, W. - The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Vol. 78 (2011), p. 248-263.

KAUPPINEN, Ari - Raman and Near-Infrared Spectroscopic Methods for In-Line Monitoring of Freeze-Drying Process. Publications of the University of Eastern Finland - Dissertations in Health Sciences. N° 273 (2015), p. 1-138. [Consult.23/06/2015]. Disponível em. ISSN 1798-5714.

KHAIRNAR, Sandip et al. - A Review on Freeze Drying Process of Pharmaceuticals. International journal of research in Pharmacy and Science. Vol. 4, n° 1 (2013), p. 76 -94. [Consult. 13/12/2014]. Disponível em www.ijrpsonline.com. ISSN 2249-3522.

KOJIMA, Chie - Preclinical studies of dendrimer prodrugs. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology (2015).

KONG, S. Y. et al. - PEGylated polyamidoamine dendrimer/methotrexate complex: pharmacokinetics and anti-tumor activity in normal and tumor-bearing rodents. Yao Xue Xue Bao. Vol. 44, n° 1 (2009), p. 85-90.

KUMAR, G. P.; PRASHANTH, N.; KUMARI, B. C. - Fundamentals and Applications of Lyophilization. Journal of Advanced Pharmaceutical Research. Vol. 2, n°4 (2011), p. 157-169. [Consult. 28/07/2015]. Disponível em www.pharmresfoundation.com. ISSN 2229-3787.

LAPENDA, Taciana – Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo desidrocrotonina e avaliação da actividade antitumoral. Recife: [s.n.], 2010. Tese de mestrado.

LAVAKUMAR, V. et al. – Lyophilization/Freeze Drying – An Review. Vol. 3, n° 4 (2013), p. 87-98. [Consult. 13/12/2014]. Disponível em www.ijntps.org. ISSN 2277-2782.

LEI, S. et al. - Enhanced therapeutic efficacy of a novel liposome-based formulation of SN-38 against human tumor models in SCID mice. ANTI-CANCER DRUGS. Vol. 15, n° 8 (2004), p. 773-778.

LEMOINE D. et al. - Stability study of nanoparticles of poly (ε-caprolactone), poly (D, L-lactide) and poly (D,L-lactide-coglycolide). Biomaterials. Vol. 17, n° 22 (1996), p. 2191–2197.

LOPES, Joana - Novos sistemas farmacêuticos para administração oral. Porto 2012

Lyostar™3. Research & Development Freeze Drier developed with SMART™ and Praxair ControLyo™. SP Scientific – Making time for science.

LYRDAL, D.; STIERNER, U.; LUNDSTAM, S. - Metastatic renal cell carcinoma treated with Peg-interferon alfa-2b. Acta Oncologica. Vol. 48, n° 6 (2009), p. 901-908.

MAINI, Nitish; JAIN, Saroj; SARDANA, Satish - Process Validation of Liquid Lyophillized Formulation: A Review. Journal of Advanced Pharmacy Education & Research. Vol. 13, n° 2 (2013), p. 46-54. [Consult. 24/02/2015]. Disponível em www.japer.in.

MALIK, N.; EVAGOROU, E.G.; DUNCAN, R. - Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. Anticancer Drugs. Vol. 10, n° 8 (1999), p. 767–776.

MANUAL BÁSICO DE LIOFILIZACIÓN. LIOFILIZADORES TERRONI. P. 1-8. [Consult. 12/04/2015]. Disponível em http://www.terroni.com.br.

MANUAL DE BOAS PRÁTICAS DE FABRICO - REVISÃO DO ANEXO 1. Fabrico de Medicamentos Estéreis, Comissão Europeia, (2003). [Consult.]. Disponível em www.infarmed.pt.

MATSUMURA, Y. - Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. Annals of Oncology. Vol. 15, n°3 (2004), p. 517-525.

MATSUMURA, Y. Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin. British Journal of Cancer. Volume 91, n° 10 (2004), p. 1775-1781.

MIGUEL, Carla – Síntese e Caracterização de Nanopartículas FeO_x/Au/Ag em Multicamada Núcleo-concha. Madeira: [s.n.], 2012. Tese de mestrado.

MINHAJ, Akram et al. – Development and optimization of lyophilization cycle. World journal of pharmaceutical research. Vol. 4, n° 2 (2015), p. 1053-1062. [Consult. 5/03/2015]. Disponível em www.wjpr.net. ISSN 2277-7105.

MOTZER, R. J. et al. - Phase II trial of branched peginterferon-α 2a (40 kDa) for patients with advanced renal cell carcinoma. Annals of Oncology. Vol. 3 (2002), p. 1799-1805.

MOURATO, Beatriz – Controlo de qualidade de formas farmacêuticas estéreis. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde. Lisboa (2013).

NAIL, S. L.; GATIN, L. A. - Freeze drying: principles and practice, in Avis KE, Lieberman HA and Lechman L (eds): Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, New York, NY, Vol. 2, pp 163-233, 1993.

Oasmia Pharmaceutical. Oasmia's lead cancer product Paclical® receives market approval in the Russian Federation. Sweden (2015). [Consult. 25/04/2015]. Disponível em http://www.oasmia.com/html/upl/579/paclical%20approved%20in%20russia.pdf

OH, K.S. - Formation of core/shell nanoparticles with a lipid core and their application as a drug delivery system. Biomacromolecules. Vol. 6, n° 2 (2005), p. 1062–1067.

OLIVEIRA, L.C.; TAVEIRA, E.J.F.; SOUZA, L.G.; MARRETO, R.N.; LIMA, E.M.; TAVEIRA, S.F. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 58, n. 4 (2012), p. 695-701.

PAI, Girish; VIBHA, V.; REDDY, M. - Lyophilization: An Emerging Trend in Formulation of Parenterals. Internacional Journal for Pharmaceutical Research Scholars. Vol. e, n° 3 (2014), p. 393-402. [Consult. 13/02/2015]. Disponível em www.ijprs.com. ISSN 2277-7873.

PARREIRA, Diana; EUGÉNIO, Joana – Nanopartículas para aplicação oncológica. Instituto Nacional da Propriedade Industrial (2011).

PATEL, S. M.; PIKAL, M. - Emerging Freeze-Drying Process Development and Scale-up Issues. AAPS PharmSciTech. Vol. 12, n° 1 (2011), p. 372-378.

Physical Stability of Disperse Systems. PARTICLE SCIENCES. Technical Brief: 2009. Vol. 1. Disponível em www.particlesciences.com

PIKAL, M. J.; DOEN, T.; PATEL, S. J. - Determination of End Point of Primary Drying in Freeze-Drying Process Control. AAPS PharmSciTech. Vol. 11, n° 1 (2010), p. 73-84.

PIKAL, Michael J.; ROY, Michael L.; SHAH, Saroj - Mass and Heat Transfer in Vial Freeze-Drying of Pharmaceuticals: Role of the Vial. Journal of Pharmaceutical Sciences. Indianápolis. Vol. 73, n° 9 (1984), p. 1224-1237. doi: 10.1002 / jps.2600730910.

PILLAI, Gopalakrishna - Nanomedicines for Cancer Therapy: An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development. SOJ Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, Vol. 1, n° 2 (2013), p. 1-13.

PRAMANICK, Sougata; SINGODIA, Deepack; CHANDEL, Vikas – Excipint Selection In Parenteral Formulation Development. Vol. 45, n° 3 (2013), p.65-77.

PRZIC, Dejan S., RUZIC, Nenad LJ., PETROVIC, Slobodan D. – Lyophilization – the process and industrial use. Vol. 58, n° 12 (2004), p. 552-562.

RÉFEGA, Ricardo – Nanopartículas para Aplicação Biomédica. Lisboa [s.n.], 2010. Tese de mestrado.

REY, Louis; MAY, Joan C. – Freeze Drying/ Lyophilization of Pharmaceutical and Biologic Products. 3ª Ed. London: Informa Healthcare, 2010. ISBN-13: 9781439825754.

ROY, D. et al. - On shelf stability of freeze-dried poly(methylidene malonate 2.1.2) nanoparticles. International Journal Pharmaceutical. Vol 148, n° 2 (1997), p. 165–175.

RUSHIL, Shah; PRITI, Mehta - Effect of cryoprotectant on lyophlisation of doxorubicin –HCl loaded chitosan nanoparticles. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol. 6, n° 9 (2014), p. 3-7. ISSN- 0975-1491.

SANTOS, Filipa R. A. – Emulsões múltiplas: formulação, caracterização, estabilidade e aplicações. Porto [s.n.], 2011. Tese de mestrado.

SCHNEID, S. C. - Investigation of Novel Process Analytical Technology (PAT) Tools for Use in Freeze-Drying Processes. Germany [s.n], 2009. Tese de Doutoramento.

SCHRAMM, Laurier L. – Colloid Stability. In « Emulsions, Foams and suspensions: Fundamentals and Applications. 1.ª ed. Weinheim : Wiley-VCH, 2005. ISBN 3-527-30743-5 Pt. 5.

SHAH, A.; LOBO, B.; PATEL, S. M. - Practical Considerations for Freeze-Drying Process Design, Development and Scale-Up. The Review of American Pharmaceutical Business & Technology, 2013.

SHARMA, Ashutosh – Introduction to Colloid and Interface Science and Engineering. Module 8: Stability of Colloids. Nacional Programme on Technology Enhanced Learning, 2012. [Consut. 13/12/2014]. Disponível em http://www.nptel.ac.in/courses/103104045/pdf_version/lecture37.pdf.

SILVA, Ricardo - Complexos de inclusão de fármacos com Ciclodextrinas e Cucurbiturilos. Aplicações Farmacoterapêuticas. Faro: [s.n.], 2011. Tese de mestrado.

THAKOR, Avnesh S. - Nanooncology: The Future of Cancer Diagnosis and Therapy. Ca Cancer Journal. Vol. 63, n° 6 (2013), p. 395-418. [Consult. 20/3/2015]. Disponível em cacancerjournal.com.

TROY, David B.; Beringer, Paul– Remington: The Science and Practice oh Pharmacy. 21st Edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. ISBN 0-7817-4673-6.

VARSHNEY, D.; SINGH, M. – Lyophilized Biologics and Vaccines. Modality-Basead Approaches. New York: Springer Science, 2015. ISBN 978-1-4939-2382-3

VENTOLA, C. L. - The Nanomedicine Revolution - Part 2: Current and Future Clinical Applications. Pharmacy and Therapeutics. Vol. 37, n° 10 (2012), p. 582-591.

VIZZOTTI, Emanuel J. - Production of stable bcs class ii drug suspensions by melt emulsification and subsequent incorporation into polymer strip films. New Jersey : [s.n], 2013. Tese de mestrado.

WALTHER, M. - SCHOTT type I plusTM containers for pharmaceutical packaging. In: Bach H, Krause D, eds. Thin Films on Glass. Berlin: Springer, 1997:370–377.

WANG, Ruibing; BILLONE, Paul S.; MULLETT, Wayne M. - Nanomedicine in Action: An Overview of Cancer Nanomedicine on the Market and in Clinical Trials. Journal of Nanomaterials. 2013, p. 1-12. [Consult. 20/03/2015]. Disponível em http://dx.doi.org/10.1155/2013/629681.

WANG, Wei; CHEN, Mo; CHEN, Guohua - Issues in freeze drying of aqueous solutions. Chinese Journal of Chemical Engineering. Vol. 20, n° 3 (2012), p. 551-559. [Consult. 27/01/2015]. Disponível em http://www.cjche.com. ISSN 1004-9541.

WETZLER, M. et al. - Phase I/II trial of nanomolecular liposomal annamycin in adult patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. Clinical lymphoma, myeloma & leukemia. Vol. 13, n° 4 (2013), p. 430-434.

WILCZEWSKA, Agnieszka Z. et al. - Nanoparticles as drug delivery systems. Nanoparticles and drugs. Vol. 64 (2012), p. 1020-1037. ISSN 1734-1140

World Intelectual Property Organization. Patent Scope. [Consult. 26/03/2015]. Disponível em http://www.wipo.int/patentscope/en/.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. – Physical and chemical stability of drug nanoparticles. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 63, n° 6 (2011), p. 456-469. Disponível em www.elsevier.com . Doi: 10.1016/j.addr.2011.02.001.

ZAMBONI, W.C. et al. - Pharmacokinetic study of pegylated liposomal CKD-602 (S-CKD602) in patients with advanced malignancies. Clinical Pharmacology & Therapeutics. Vol. 86, n° 5 (2009), p. 519-526.