

João Pedro Rebelo da Silva

# Ciclodextrinas: Aplicações na Formulação Oral do Paclitaxel

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, João Pedro Rebelo da Silva, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010216, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

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

Coimbra, 18 de julho de 2014

Assinatura:

**O Tutor,**



(Professor Doutor João Canotilho)

**O Aluno,**

---

(João Pedro Rebelo da Silva)

## Índice

Abreviaturas .....	2
Resumo.....	3
Abstract.....	3
Introdução.....	4
Limitações da Via Intravenosa.....	5
A Via Oral como Alternativa Quimioterapêutica.....	5
Ciclodextrinas .....	7
Derivados Sintéticos .....	8
Formação de Complexos.....	8
Aplicações das Ciclodextrinas.....	8
Nanopartículas de CD-poli(anidrido) .....	9
Propriedades Físico-Químicas.....	9
Estudos de Libertação <i>In-Vitro</i> .....	10
Estudos de Permeabilidade em Câmaras de Ussing.....	10
Estudos Farmacocinéticos <i>In-Vivo</i> .....	10
Nanoesponjas.....	12
Propriedades Físico-Químicas.....	13
Estudos de Toxicidade .....	13
<i>Uptake</i> Celular .....	13
Estudos Farmacocinéticos <i>In-Vivo</i> .....	13
SLN modificadas por HP $\beta$ CD .....	14
Propriedades Físico-Químicas.....	14
Estudos de Libertação <i>In-Vitro</i> .....	14
Estudos de Toxicidade .....	14
<i>Uptake</i> Celular .....	15
Estudos Farmacocinéticos <i>In-Vivo</i> .....	15
Conclusão.....	17
Bibliografia .....	18

## Abreviaturas

CD – Ciclodextrina

C<sub>máx</sub> – Concentração máxima

FDA – Food and Drug Administration

HP $\beta$ CD – 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina

LD<sub>50</sub> – Dose letal para 50% da população

NH $\beta$ CD - 6-monodeoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina

P<sub>app</sub> – Coeficiente de permeabilidade aparente

PTX – Paclitaxel

T<sub>máx</sub> – Tempo máximo

WHO – World Health Organization

## Resumo

O paclitaxel é atualmente um dos fármacos antineoplásicos com maior eficácia, com actividade comprovada contra vários tipos de cancro. A formulação de paclitaxel atualmente comercializada, o Taxol<sup>®</sup>, para administração intravenosa, é formulado numa mistura de 1:1 de Cremophor<sup>®</sup> EL e de etanol. Contudo, este apresenta uma serie de efeitos adversos e, assim, a via oral apresenta-se como uma excelente alternativa, pelas muitas vantagens que oferece em relação à via parentérica.

Visto que o paclitaxel apresenta uma muito fraca biodisponibilidade oral, é necessário que se desenvolvam formulações que contornem este problema.

O objetivo desta monografia é o de avaliar o potencial das ciclodextrinas na criação de formulações orais de paclitaxel.

Palavras-Chaves: Ciclodextrinas, Paclitaxel, Administração Oral, Nanopartículas.

## Abstract

Paclitaxel is one of the most effective antineoplastic agents currently available, with proven activity against various types of cancer. The currently marketed form of paclitaxel, Taxol<sup>®</sup>, for intravenous administration, is formulated in a 1:1 mixture of Cremophor<sup>®</sup> EL and ethanol. However, this formulation presents several side effects, and so oral administration is presented as an excellent alternative for the many advantages it offers compared to the parenteral route.

Since paclitaxel has a very low oral bioavailability, it is necessary to develop formulations that circumvent this problem.

The aim of this work is to evaluate the potential of cyclodextrins in creating oral formulations of paclitaxel.

Keywords: Cyclodextrins, Paclitaxel, Oral Administration, Nanoparticles.

## Introdução

O cancro é definido como um conjunto complexo de doenças originadas por lesões permanentes nos tecidos, com a divisão descontrolada de células anormais que podem posteriormente invadir outros tecidos. Foi possível constatar, ao longo desta última década, um aumento do número de casos e da prevalência a nível mundial do cancro, levando a WHO a prever que venha a ocorrer um aumento de 45% no número de mortes por cancro até 2030 <sup>[1]</sup>.

O paclitaxel (PTX), extraído da casca do *Taxus brevifolia*, é um dos fármacos antineoplásicos com maior eficácia atualmente existentes, com actividade comprovada contra vários tipos de cancro, incluindo o pulmonar, o dos ovários e o da mama <sup>[2]</sup>. Contudo, esta molécula é altamente lipofílica e insolúvel em água (<0.03 mg/mL) <sup>[3]</sup>.

Por estes motivos, o paclitaxel é atualmente formulado numa mistura de Cremophor EL e etanol desidratado (50:50, v/v), sendo esta combinação conhecida comercialmente como Taxol<sup>®</sup>, administrado por via parenteral. No entanto, estes excipientes apresentam efeitos secundários bastante severos, além do desconforto que as formulações parenterais causam nos doentes sujeitos a estas terapias <sup>[3-5]</sup>.

Assim, é fundamental que se encontrem formulações mais seguras e eficazes de paclitaxel. Mais recentemente foi aprovado pela FDA o Abraxane<sup>®</sup>, também parenteral, em que o paclitaxel se encontra combinado com albumina, e que mostra uma menor toxicidade em relação ao Taxol<sup>®</sup> <sup>[5]</sup>. Além desta, muitas outras formulações de paclitaxel encontram-se atualmente em estudo, e neste campo a via oral, visto que constitui uma excelente via para se alcançar a “Quimioterapia em Casa”, um sonho de uma grande maioria dos doentes oncológicos, assume particular destaque <sup>[6]</sup>.

O objetivo desta monografia é o de avaliar a viabilidade da via oral como opção para o desenvolvimento de novas terapias anticancerígenas, destacando o papel que as ciclodextrinas podem desempenhar na realização deste objetivo.

## Limitações da Via Intravenosa

Atualmente, a grande maioria dos agentes quimioterapêuticos são produzidos para serem administrados por via intravenosa. Esta via tem como principal vantagem a de permitir uma imediata e completa biodisponibilidade do fármaco, permitindo evitar a variabilidade de absorção e o metabolismo gastrointestinal. Contudo, esta via também acarreta graves efeitos secundários, porque origina uma elevada concentração de fármaco nos tecidos normais. Por outro lado, os excipientes utilizados na preparação dos injetáveis podem contribuir para a toxicidade da formulação final <sup>[7]</sup>. No Taxol<sup>®</sup> é utilizado o Cremophor EL, que é responsável por várias reações de hipersensibilidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade, levando à necessidade de pré-medicação com corticosteroides e anti-histamínicos, existindo ainda evidências de que este excipiente pode alterar a cinética do paclitaxel <sup>[4]</sup>.

Além disso, a quimioterapia intravenosa requer que esta seja feita em ambiente hospitalar e por pessoal especializado, levando os doentes oncológicos a revelar sinais de depressão, pois sentem que a sua vida diária é controlada pelo calendário de quimioterapia <sup>[1]</sup>.

Assim, olhando para o aumento na qualidade de vida, a diminuição na necessidade de *follow-up therapy* <sup>[1]</sup> e para o ganho económico <sup>[7]</sup>, a via oral têm ganho destaque em relação à via parentérica.

## A Via Oral como Alternativa Quimioterapêutica

O uso da via oral na quimioterapia apresenta várias vantagens clinicamente relevantes como <sup>[1]</sup>:

1. A manutenção de uma concentração plasmática de fármaco apropriada, através da modulação da libertação do fármaco, para que se consiga uma exposição prolongada das células cancerígenas, o que vai ser importante para aumentar a eficácia e diminuir os efeitos secundários dos fármacos anticancerígenos;
2. A maior facilidade de instauração de regimes terapêuticos crónicos;
3. A quimioterapia oral evita o desconforto da injeção e pode ser realizada em casa, sendo este um facto que pode contribuir de forma decisiva para o aumento da qualidade de vida dos doentes. É, no entanto, importante garantir que os doentes aderem completamente à terapêutica, pois nestas situações é mais complicado garantir a sua total *compliance* <sup>[7,8]</sup>;

4. A diminuição do risco de infecção associada aos processos de infusão intravenosa;
5. A redução de custos relacionados com a hospitalização, equipamentos de infusão e assistência por profissionais especializados.

No entanto, a quimioterapia por via oral apresenta ainda alguns desafios resultantes principalmente das características físico-químicas particulares dos agentes quimioterapêuticos, e também de barreiras fisiológicas como o metabolismo pré-sistêmico e a sua instabilidade gastrointestinal <sup>[1]</sup>. De facto, grande parte dos agentes quimioterapêuticos, incluindo o paclitaxel, pertence à classe IV do *Biopharmaceutical Classification System*, que contempla as substâncias com baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade aparente <sup>[7]</sup>. Por estes motivos, apenas uma muito pequena fração destes fármacos é absorvida por via oral <sup>[1]</sup>. No exemplo particular da administração oral do paclitaxel, a sua absorção é fortemente dificultada pela sua baixa solubilidade, pelo metabolismo resultante da ação das enzimas do citocromo P-450 (CYP-450) e pela sua grande afinidade com a glicoproteína-P (bomba de efluxo amplamente presente no lúmen intestinal). Além disso, é importante considerar a sua toxicidade, pois a administração oral deste fármaco pode originar danos na mucosa intestinal do trato gastrointestinal resultantes de uma elevada concentração do agente <sup>[9]</sup>. Também a sua limitada janela terapêutica, que pode levar à ocorrência de dosagens sub-terapêuticas ou tóxicas, deve ser considerada. De um ponto de vista económico, a principal desvantagem prende-se com o custo de produção de novas formulações de agentes intravenosos já existentes <sup>[1]</sup>.

Portanto, a viabilidade desta via de administração vai depender da capacidade da formulação conseguir disponibilizar o fármaco no local certo no tempo certo e numa dosagem adequada à obtenção de uma resposta terapêutica. Neste sentido, várias estratégias têm sido desenvolvidas de forma a aumentar a viabilidade da entrega por via oral do paclitaxel. Foram desenvolvidos análogos como o BMS-275183 e o ortotaxel, que não é reconhecido pela glicoproteína-P, e ambos mostram um aumento significativo na biodisponibilidade oral do fármaco (24% e ~50%). No entanto, tanto para um como para o outro, a sua utilidade clínica é reduzida, pois o primeiro apresenta uma toxicidade bastante elevada, principalmente pela indução de neuropatias periféricas, e o ortotaxel revelou baixa eficácia na redução tumoral e um perfil hematológico desfavorável <sup>[5]</sup>. Também foi estudada a possibilidade de co-administrar o paclitaxel com inibidores da glicoproteína-P e do citocromo P450, como a ciclosporina A e o verapamil, mas os resultados foram

dececionantes devido à sua toxicidade e à alteração do perfil farmacocinético e da biodistribuição do paclitaxel verificada [2,4].

Assim, o desenvolvimento de uma formulação oral de paclitaxel é neste momento um grande desafio, e muitas opções têm sido testadas ou estão em investigação, sendo que as ciclodextrinas poderão ser mais uma importante ferramenta nesta área.

## Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CD's) foram descobertas por Villiers em 1891, durante os seus estudos acerca da digestão bacterial do amido, e são polissacarídeos cíclicos constituídos por unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosose com ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas. Os mais relevantes contêm seis, sete ou oito unidades, sendo denominados por  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ -CDs, respectivamente [8].

CD	Nº de unidades de glicose	Peso molecular	Diâmetro interno da cavidade (Å)	Volume da cavidade (Å³)	Solubilidade aquosa a 25°C (% m/v)
$\alpha$ CD	6	972	4,7-5,3	174	14,5
$\beta$ CD	7	1135	6,0-6,5	262	1,85
$\gamma$ CD	8	1297	7,5-8,3	427	23,2

Tab. I - Propriedades físico-químicas das CD's (adaptado de OLIVEIRA *et al*, 2009)

Estes compostos apresentam-se sob a forma de cone truncado, devido à conformação em cadeira das suas unidades e à ausência de rotação livre das ligações glicosídicas [8,10], e têm carácter anfifílico, com os grupos hidroxilo posicionados externamente a conferirem características hidrófilas às CD's, enquanto a cavidade, constituída por dois anéis de grupos C-H e por um anel de átomos de oxigénio glicosídicos, apresenta características hidrófobas [8,11]. Das CD's naturais, a  $\beta$ -CD's é claramente a mais utilizada, pois apresenta uma capacidade de complexação de um elevado número de fármacos hidrófobos, está disponível em grandes quantidades e a baixo custo e o seu uso está aprovado como excipiente para preparações farmacêuticas [11].

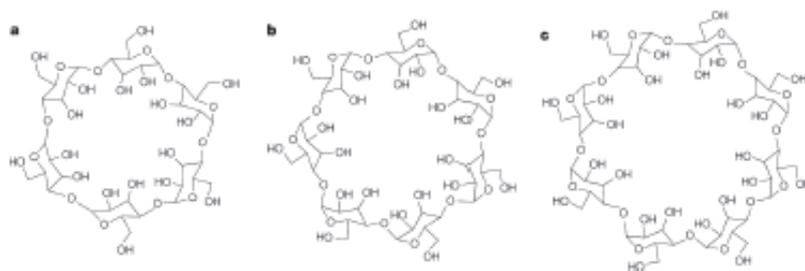


Fig. I – Representação esquemática da  $\alpha$  (a),  $\beta$  (b) e  $\gamma$ -CD (c) (adaptado de OLIVEIRA *et al*, 2009)

### **Derivados Sintéticos**

Têm sido desenvolvidos vários derivados quimicamente modificados destas CD's naturais no sentido de alargar as suas propriedades físico-químicas, principalmente através da introdução de grupos funcionais ao nível dos grupos hidroxilo externos. Estas modificações aumentam a sua capacidade de complexação e a sua solubilidade aquosa, reduzem a sua toxicidade (principalmente na administração intravenosa), melhoram a sua interação com as membranas biológicas e permitem-lhes garantir uma libertação controlada dos fármacos hospedeiros <sup>[11]</sup>.

### **Formação de Complexos**

A cavidade central das CD's possibilita a estas a incorporação de moléculas apolares (ou grupos funcionais de moléculas) de tamanhos moleculares apropriados, principalmente por via de interações hidrofóbicas e de van der Waals entre as CD's e a molécula hospedeira, formando-se assim os complexos de inclusão <sup>[10]</sup>. Estes complexos permitem alterar a solubilidade de fármacos, modelar a velocidade de dissolução, aumentar a estabilidade e proteger as mucosas da irritação causada por determinados fármacos <sup>[12]</sup>.

### **Aplicações das Ciclodextrinas**

Assim, as CD's são atualmente muito utilizadas na área farmacêutica como agentes complexantes para aumentar a solubilidade e estabilidade aquosa de fármacos lipofílicos. São também capazes de aumentar a biodisponibilidade oral destes fármacos, ao interagir com componentes específicos das membranas <sup>[8]</sup>, e ao aumentar o gradiente de concentração do fármaco à superfície da membrana <sup>[11]</sup>. Além disso, podem reduzir a irritação das mucosas gastrointestinais causadas pelos fármacos e controlar a sua libertação dos complexos de

inclusão, prevenir ou minimizar interações e mascarar sabores desagradáveis. Por último, é importante destacar que as CD's são ausentes de toxicidade quando administradas oralmente pois não são absorvidas pelo trato gastrointestinal [8].

Paralelamente, existem estudos que demonstram a capacidade das CD's inibirem a actividade das glicoproteínas-P e do CYP-450, grandes responsáveis pela baixa biodisponibilidade oral de vários compostos hidrofóbicos, entre os quais o paclitaxel [11].

As CD's podem ainda ser utilizadas na construção de vários tipos de nanopartículas, aumentando significativamente a eficácia do *uptake* de fármacos lipofílicos como o paclitaxel nestes transportadores [4].

Por tudo isto, as CD's apresentam-se como uma alternativa interessante para o desenvolvimento de formulações orais de paclitaxel.

## Nanopartículas de CD-poli(anidrido)

Uma das possibilidades para ultrapassar os problemas acima referidos e aumentar a biodisponibilidade oral do paclitaxel pode passar pela utilização de nanopartículas de poli(anidrido), que apresentam uma toxicidade oral bastante reduzida (LD50 em porquinhos-da-índia é de ~8-9 g/Kg *per os*). Estes polímeros apresentam a capacidade de proteger o fármaco da degradação e as suas propriedades físico-químicas, como o tamanho e a superfície, podem ser moduladas de forma a aumentar as suas interações bioadesivas com as células da mucosa intestinal. Esta imobilização transitória resulta num aumento do tempo de trânsito intestinal destas nanopartículas que vai aumentar o gradiente de concentração entre o lúmen e a mucosa e aumentar o contacto direto do fármaco com o epitélio intestinal, facilitando a sua absorção [3,4].

No entanto, estes transportadores apresentam um inconveniente importante, que diz respeito à sua fraca capacidade de encapsular compostos lipofílicos como o paclitaxel. Assim, como forma de contornar este problema, foi proposto a associação destes copolímeros às CD's, de forma a aumentar a capacidade de incorporação do paclitaxel nas nanopartículas resultantes. Também a inibição das glicoproteínas-P e do citocromo P450 por parte das ciclodextrinas foram fatores tidos em conta nesta formulação [3].

### **Propriedades Físico-Químicas**

Estas nanopartículas apresentaram um tamanho de ~300 nm, tendo-se formado num *ratio* de 1:1 entre o paclitaxel e as ciclodextrinas. O *drug loading* dependeu do tipo de CD

utilizada na preparação dos complexos, sendo este mais elevado na presença de CD's. Assim, a HP $\beta$ CD demonstrou ser a mais eficaz neste parâmetro ( $\sim 170 \mu\text{g}/\text{mg}$ ). Para os complexos de PTX-NH $\beta$ CD e PTX- $\beta$ CD, estes valores foram de 90 e 40  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , respetivamente. A utilização de complexos PTX-HP $\beta$ CD permitiu aumentar cerca de 500 vezes a incorporação do fármaco, quando comparado com o controlo (fármaco isolado). As nanopartículas de CD-poli(anidrido) mostraram ainda maior capacidade de estabelecer interações bioadesivas com a mucosa que as nanopartículas de controlo (sem CD's) <sup>[3-5]</sup>.

### **Estudos de Libertação In-Vitro**

Quando as nanopartículas foram dispersas num meio gástrico simulado, não foi observada libertação de fármaco. No entanto, quando estas foram transferidas para um meio simulado intestinal (pH 7,5), verificou-se a libertação do fármaco das nanopartículas de PTX-HP $\beta$ CD numa forma bifásica. Inicialmente, o paclitaxel foi libertado da formulação de uma forma lenta, tendo esta fase ocorrido nas primeiras 6-7h. Posteriormente, a taxa de libertação aumentou drasticamente durante as 11h seguintes até à completa extração do fármaco. Isto deve-se ao facto de os polímeros de poli(anidrido) apenas sofrerem hidrólise a pH's mais elevados <sup>[3]</sup>.

### **Estudos de Permeabilidade em Câmaras de Ussing**

Estes estudos foram conduzidos com o recurso a tecido do jejuno de rato. Sob a forma de Taxol<sup>®</sup>, o paclitaxel mostrou uma permeabilidade aparente bastante baixa ( $P_{app} \sim 1.4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ), tendo-se verificado valores semelhantes para o complexo de inclusão PTX-CD. Pelo contrário, para as nanopartículas PTX-HP $\beta$ CD a permeabilidade intestinal registou um aumento superior a 12 vezes relativamente ao Taxol<sup>®</sup>. Quando as interações bioadesivas das nanopartículas foram impedidas pela adição de uma membrana semipermeável, o  $P_{app}$  diminuiu drasticamente, sendo mesmo 25 vezes inferior ao do Taxol<sup>®</sup>. Todos estes dados realçam o efeito positivo na permeabilidade intestinal da associação entre as HP $\beta$ CD e as nanopartículas de poli(anidrido) <sup>[3,4]</sup>.

### **Estudos Farmacocinéticos In-Vivo**

Todos estes resultados obtidos *in-vitro* foram confirmados por estudos farmacocinéticos. Aqui, foram administradas doses unitárias de 10 mg/Kg de todas as formulações por via oral. Quando a formulação comercial Taxol<sup>®</sup> foi administrada a ratos, os

níveis plasmáticos permaneceram sempre abaixo do limite de quantificação da técnica analítica cromatográfica utilizada. Resultados similares foram obtidos quando estes foram tratados com complexos PTX-HP $\beta$ CD ou com nanopartículas sem a presença de CD's. Pelo contrário, quando os complexos de PTX-HP $\beta$ CD foram incorporados em nanopartículas de poli(anidrido), foram observados níveis plasmáticos de fármaco durante cerca de 24h. Em todos os casos, o perfil destas curvas pode ser dividido em três fases (Fig.2). Na primeira os níveis plasmáticos de paclitaxel aumentam progressivamente até alcançarem a  $C_{m\acute{a}x}$  ( $T_{m\acute{a}x}$  ~ 4-6h). Na segunda fase, que decorre desde este  $T_{m\acute{a}x}$  até 24h após a administração, verifica-se uma manutenção dos níveis plasmáticos do fármaco, com valores próximos da  $C_{m\acute{a}x}$  para as nanopartículas de PTX- $\beta$ CD e PTX-HP $\beta$ CD, sendo estes valores entre 27 a 33 vezes superiores ao valor reportado de atividade citotóxica do paclitaxel. Na terceira fase, ocorre um rápido declínio na concentração do fármaco. Para os murganhos foram obtidas curvas plasmáticas semelhantes (Fig.3) [3,5].

Comparando as diferentes nanopartículas estudadas, os níveis plasmáticos de paclitaxel alcançados com as de PTX- $\beta$ CD ou PTX-HP $\beta$ CD ( $AUC - 65 \mu\text{g h/ml}$ ) foram 3-4 vezes superiores aos conseguidos para as nanopartículas com PTX-NH $\beta$ CD ( $AUC - 14 \mu\text{g h/ml}$ ), demonstrando assim uma maior capacidade de promover a absorção *in-vivo* do paclitaxel [3,5].

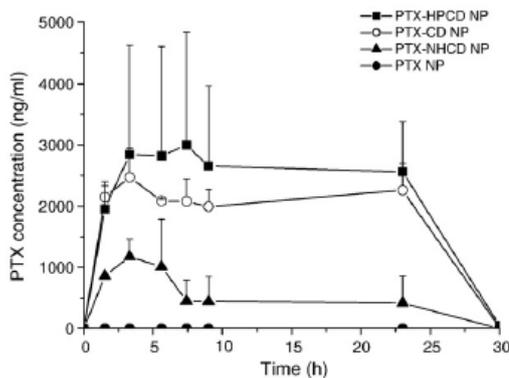


Fig.2 – Cinética de absorção do paclitaxel em ratos (adaptado de AGUEROS *et al*, 2010)

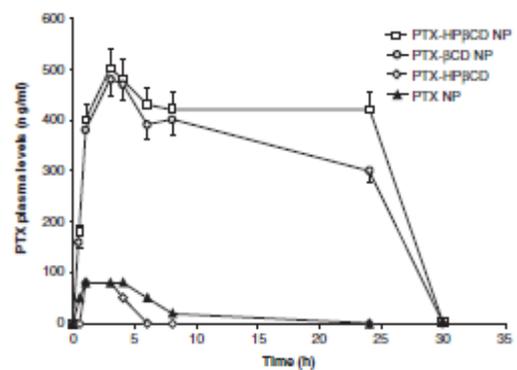


Fig.3 - Cinética de absorção do paclitaxel em murganhos (adaptado de AGUEROS *et al*, 2011)

Relativamente à biodisponibilidade oral relativa do paclitaxel em ratos, esta foi de aproximadamente 80% tanto para as nanopartículas de PTX- $\beta$ CD como para as de PTX-HP $\beta$ CD, enquanto nos murganhos esta foi um pouco inferior (~60%) [3,5].

Com base nestes resultados, AGÜEROS *et al* (2011) sugeriram a hipótese de que as nanopartículas transportariam os complexos PTX-CD até à superfície da mucosa, permanecendo imobilizados nesse local devido às suas propriedades bioadesivas. Posteriormente, estas libertariam progressivamente o seu conteúdo, e o fármaco seria absorvido, enquanto as CD's interagiriam com os componentes lipídicos da membrana, perturbando a ação das glicoproteínas-P e do CYP-P450, contornando assim um dos principais fatores que contribuem para a baixa absorção intestinal do paclitaxel. Estas nanopartículas são deste modo capazes de aumentar a permeabilidade intestinal do paclitaxel, sendo que as CD's são necessárias para aumentar o *drug loading* [3-5].

## Nanoesponjas

As nanoesponjas (Fig.4) são um derivado polimérico das CD's, obtidas através da reação das CD's com um agente de *cross-linking*, dando assim origem a uma estrutura nanoporosa *sponge-like*. Estas nanoesponjas apresentam uma grande capacidade de incluir na sua matriz pequenas moléculas, tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, e são capazes de formar rapidamente suspensões coloidais quando dispersas em água. A libertação dos fármacos pode ser modulada através da modificação da estrutura da nanoesponja [13,14].

Relativamente à sua segurança, foram feitos estudos de toxicidade aguda em murganhos, não se tendo verificado efeitos secundários aparentes, e os estudos de toxicidade crónica estão neste momento a decorrer, sendo que os resultados preliminares não mostraram qualquer reação tóxica.

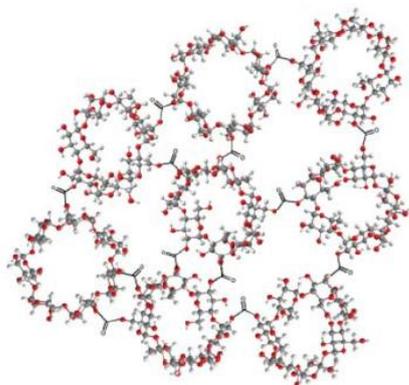


Fig.4 - Representação esquemática da estrutura de uma nanoesponja (adaptado de TROTTA *et al*, 2014)

### **Propriedades Físico-Químicas**

As nanoesponjas carregadas com paclitaxel (PLN) foram formadas segundo um *ratio* de 1:1 entre as nanoesponjas e o paclitaxel. A incorporação do paclitaxel foi bastante eficiente, como o demonstra a elevada eficiência de encapsulação ( $99.1 \pm 1.0\%$ ) [13].

### **Estudos de Toxicidade**

Estudos *in-vitro* realizados em linhas celulares AT84 mostraram que, após 72h de incubação, as PLN inibiram significativamente a proliferação celular a uma concentração de 1.9 nM. A toxicidade do paclitaxel livre foi significativo apenas a concentrações iguais ou superiores a 31.5 nM [14].

### **Uptake Celular**

Quando as células foram incubadas com paclitaxel livre, foram extraídas apenas  $0.2 \times 10^{-8}$  µg/célula, enquanto para as PLN, este valor foi de  $3.6 \times 10^{-8}$  µg/célula [14].

### **Estudos Farmacocinéticos In-Vivo**

A concentração plasmática de paclitaxel obtida após a administração oral da formulação de nanoesponjas (10 mg/kg) foi muito superior à obtida para o Taxol® na mesma dose (10 mg/kg) (Fig.5) [13,14].

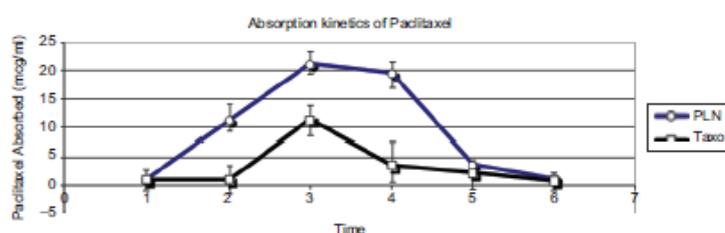


Fig.5 – Cinética de absorção do paclitaxel (adaptado de TORNE *et al*, 2010)

A AUC da curva concentração plasmática-tempo após administração oral para o Taxol® foi  $5975.25 \pm 485$  µg/ml, enquanto para as PLN foi de  $6520.31 \pm 752$  µg/ml h. Para o Taxol® administrado por via parentérica, a AUC foi de  $6477.88 \pm 382$  µg/ml h. As  $C_{m\acute{a}x}$  por via oral foram de  $11.41 \pm 2.5$  µg/ml e  $21.2396 \pm 3.5$  µg/ml para o Taxol® e as PLN, respectivamente. Em termos de biodisponibilidade absoluta, a registrada para as PLN foi 0.521,

sendo este valor 2.5 vezes superior ao registado para o Taxol® administrado por via parentérica [14].

## SLN modificadas por HPβCD

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) constituem um potente sistema transportador para vários compostos farmacêuticos, apresentando inúmeras vantagens como uma elevada biocompatibilidade e biodisponibilidade, a possibilidade de obtenção de perfis de libertação controlada e a capacidade de proteção de compostos lábeis. A sua associação com a HPβCD tem como objetivo aumentar a solubilidade e o *uptake* celular do paclitaxel [15,16].

### Propriedades Físico-Químicas

As nanopartículas de SLN-PTX modificadas com HPβCD (smPSH) apresentaram um tamanho de  $251.40 \pm 12.0$  nm, 0,83 vezes inferior ao tamanho das SLN-PTX (PS). Além disso, as smPSH mostraram ainda uma elevada eficiência de encapsulação de  $71.02 \pm 0.70\%$ , superior à mostrada pelas PS ( $66.20 \pm 0.14\%$ ). Foram também conduzidos estudos de solubilidade que revelaram que as PS e as smPSH mostraram um aumento de solubilidade do paclitaxel de 15 e 17 vezes, respetivamente. Em ambas as partículas se verificou uma quase completa libertação do fármaco [16].

### Estudos de Libertação In-Vitro

A solução de paclitaxel mostrou uma libertação rápida de 90% do paclitaxel durante a primeira hora. As smPSH e as PS mostraram uma libertação controlada de  $89.70 \pm 3.99\%$  e  $92.90 \pm 3.55\%$  do PTX durante 24h, com uma libertação inicial de  $36.54 \pm 4.81\%$  e  $25.56 \pm 3.61\%$  durante a primeira hora. O *burst* de libertação ocorrido para as smPSH durante a 1h pode ser explicado pela presença de PTX em bolsas de HPβCD formadas durante a produção destas nanopartículas [16].

### Estudos de Toxicidade

Estes estudos foram realizados com o intuito de avaliar a toxicidade das smPSH contra células Caco-2 (Fig.6). Numa concentração equivalente a  $5 \mu\text{M}$  PTX, as smPSH permitiram uma viabilidade celular de  $52.7 \pm 1.82\%$ , 1,2 vezes superior às PS ( $64.0 \pm 5.47\%$ ),

devendo-se este facto principalmente ao aumento da solubilidade do paclitaxel nas primeiras. Como referência, uma solução de PTX exibiu uma viabilidade celular de 71.45% [17].

### Uptake Celular

Este parâmetro foi medido mantendo uma concentração de 5  $\mu\text{M}$  PTX (Fig.7). Aqui, as PS mostraram uma *uptake* celular de  $0.30 \pm 0.13$   $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  e as smPSH  $1.12 \pm 0.21$   $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ . O valor registado para a solução de PTX foi de  $0.21 \pm 0.1$   $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  (Fig.8). Assim, o *uptake* celular das smPSH foi 3.7 e 5.3 vezes superior ao das PS e da solução de PTX [16].

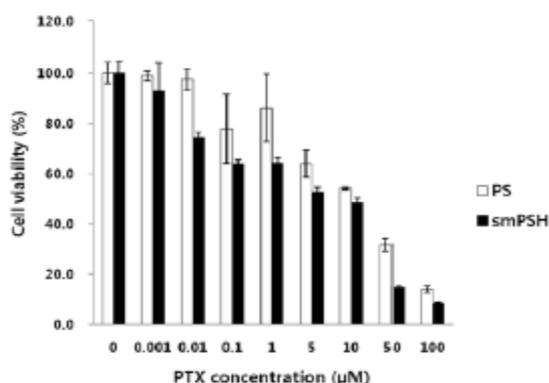


Fig.6 – Citotoxicidade do paclitaxel nas PS e smPSH (adaptado de BAEK *et al*, 2012)

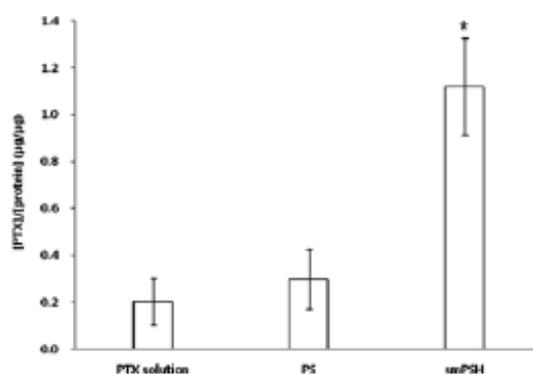


Fig.7 – *Uptake* celular do paclitaxel na solução de paclitaxel, PS e smPSH (adaptado de BAEK *et al*, 2012)

### Estudos Farmacocinéticos In-Vivo

Estes estudos foram realizados em ratos, após a administração oral de 25 mg/kg sob a forma de solução de paclitaxel, PS e smPSH (Fig.8).

As AUC para as smPSH, as PS e a solução de paclitaxel foram  $5.43 \pm 0.51$ ,  $4.54 \pm 0.72$  e  $1.81 \pm 0.24$   $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$  e as  $C_{\text{máx}}$  foram de  $1.44 \pm 0.28$ ,  $1.29 \pm 0.35$  e  $0.73 \pm 0.14$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respetivamente. A AUC das smPSH registou um aumento de 3 e 1.2 vezes e a  $C_{\text{máx}}$  um aumento de 2 ou 1.1 vezes em relação à solução de paclitaxel e às PS, respetivamente [16].

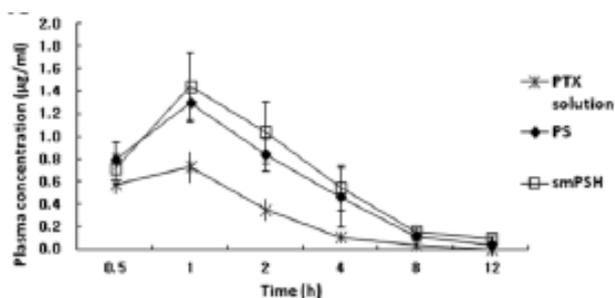


Fig.8 – Perfis de concentração plasmática-tempo do paclitaxel na solução de paclitaxel, PS e smPSH (adaptado de BAEK *et al*, 2012)

As concentrações de PTX encontradas nos nódulos linfáticos dos ratos, para a solução de paclitaxel, as PS e as smPSH, foram de  $0.89 \pm 0.75$ ,  $9.05 \pm 1.54$  e  $11.12 \pm 4.45$  ng/mg, respetivamente. Este valor mais elevado para as smPSH que para as restantes formulações pode ajudar a explicar a maior biodisponibilidade revelada pelas smPSH, pois estudos recentes mostram que a via linfática pode ser de grande utilidade na administração oral de fármacos, pois permite contornar o efeito de primeira passagem hepático, e o facto de as smPSH serem transportadores lipídicos facilita a sua entrada no sistema linfático <sup>[16]</sup>.

Com base nestes resultados, BAEK *et al.* (2012) sugeriram que, uma vez administradas as smPSH, ocorreria em simultâneo a dissolução das HP $\beta$ CD no fluido extracelular e a entrada na célula das PS resultantes por endocitose. Assim, as PS, constituídas por ácidos gordos de cadeia longa, levaram a que mais paclitaxel fosse distribuído na circulação linfática, enquanto o paclitaxel complexado com as HP $\beta$ CD foi distribuído pela circulação sanguínea. Por outro lado, o facto de o paclitaxel estar sob a forma de smPSH levou a que este fosse reconhecido pelas glicoproteínas-P numa extensão menor. Além disso, a HP $\beta$ CD pode ter funcionado como inibidora da glicoproteína-P <sup>[16]</sup>.

## Conclusão

As formulações de nanopartículas podem oferecer inúmeras vantagens na entrega de fármacos anticancerígenos por via oral, como por exemplo a proteção da molécula, perfis de libertação controlada, a capacidade de ultrapassar as barreiras biológicas e o aumento da biodisponibilidade. No entanto, a sua aplicação à terapia quimioterapêutica oral encontra-se ainda numa fase inicial, sendo fundamental que as investigações continuem e que estas nanopartículas prossigam para ensaios clínicos.

Contudo, os resultados já alcançados são de facto bastante promissores e o seu potencial é inegável, existindo neste momento todas as razões para acreditar que estas formulações poderão vir a constituir uma excelente alternativa terapêutica, mais eficaz, segura e cómoda, para os milhões de doentes oncológicos que todos os dias sonham com uma cura para o cancro.

## Bibliografia

- 1 - THANKI, K., GANGWAL, R., SANGAMWAR, A., JAIN, S. - Oral delivery of anticancer drugs: Challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release*, 170 (2013) 15–40.
- 2 – MA, P., MUMPER, R. - Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review. *J Nanomed Nanotechol*, 4 (2013) 1-16.
- 3 – AGÜEROS, M., RUIZ-GATÓN, L., VAUTHIERB, C., BOUCHEMAL, K., ESPUELAS, S., PONCHEL, G., IRACHE, J. - Combined hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and poly(anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38 (2009) 405–413.
- 4 - AGÜEROS, M., ESPUELAS, S., ESPARZA, I., CALLEJA, P., PEÑUELAS, I., PONCHEL, G., IRACHE, J. - Cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles as new vehicles for oral drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 8 (2011) 721-734.
- 5 - AGÜEROS, M., ZABALETA, V., ESPUELAS, S., CAMPANERO, M., IRACHE, J. - Increased oral bioavailability of paclitaxel by its encapsulation through complex formation with cyclodextrins in poly(anhydride) nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 145 (2010) 2–8.
- 6 - MEI, L., ZHANG, Z., ZHAO, I., HUANG, L., YANG, X., TANG, J., FENG, S. - Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (2013) 880–890.
- 7 – MAZZAFERRO, S., BOUCHEMAL, K., PONCHEL, G., - Oral delivery of anticancer drugs I: general considerations. *Drug Discovery Today*, Vol. 18, 1–2 (2013) 25-34.
- 8 - CALLEJA, P., HUARTE, J., AGÜEROS, M., RUIZ-GATÓN, L., ESPUELAS, S., M., IRACHE, J. - Molecular buckets: cyclodextrins for oral cancer therapy. *Therapeutic Delivery*, 3 (2012) 43–57.

9 – LUO, C., SUN, J., DUA, Y., HE, Z. - Emerging integrated nanohybrid drug delivery systems to facilitate the intravenous-to-oral switch in cancer chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, 176 (2014) 94–103.

10 – WANG, L., LI, L., FAN, Y., WANG, H. - Host–Guest Supramolecular Nanosystems for Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Adv. Mater.*, 25 (2013) 3888–3898.

11 – OLIVEIRA, R., SANTOS, D., COELHO, P. - Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN 1646-0480. 6 (2009) 70-83.

12 – VEIGA, F., SALTÃO, R. - Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37 (2001) 1-17.

13 – TORNE, S., ANSARI, K., VAVIA., TROTTA, F., CAVALLI, C. - Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded nanosponges. *Drug Delivery*, 17 (2010) 419–425.

14 – TROTTA, F., DIANZIANI, C., CALDERA, F., MOGNETTI, B., CAVALLI, R. - The application of nanosponges to cancer drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 11 (2014) 931-941.

15 – BAEK, J., CHO, C. - 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin-modified SLN of paclitaxel for overcoming p-glycoprotein function in multidrug-resistant breast cancer cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65 (2012) 72–78.

16 – BAEK, J., SO, J., SHIN, S., CHO, C. - Solid lipid nanoparticles of paclitaxel strengthened by hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as an oral delivery system. *International Journal Of Molecular Medicine*, 30 (2012) 953-959.