



Faculdade de Farmácia
Universidade de Lisboa

*Nanopartículas Lipídicas como sistemas
transportadores de fármacos para
administração pulmonar*

Mafalda de Castro Ascensão Marques Videira
Lisboa, 2008

Nanopartículas Lipídicas como sistemas transportadores de fármacos para administração pulmonar

Mafalda de Castro Ascensão Marques Videira
Licenciada em Ciências Farmacêuticas (U.L.)
Mestre em Engenharia Bioquímica (U.T.L.)

Dissertação para obtenção do grau de Doutor na
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
Orientada pelo Prof. Doutor António José das Neves Almeida



**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS COMO
SISTEMAS TRANSPORTADORES DE
FÁRMACOS PARA ADMINISTRAÇÃO
PULMONAR**

Ao Fernando
testemunha privilegiada da nossa
vida.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
ÍNDICE DE EQUAÇÕES.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIII
AGRADECIMENTOS	XV
RESUMO DA TESE	XVII
THESIS ABSTRACT	XIX
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	23
1.1. VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS E NANOMEDICINA	23
1.1.1. <i>Sistemas de veiculação de fármacos</i>	24
1.1.2. <i>Formulações lipídicas</i>	29
1.2. DISPERSÕES COLOIDAIS DE LÍPIDOS SÓLIDOS	31
1.3. VIA DE ADMINISTRAÇÃO	38
1.3.2. <i>Deposição de partículas inaladas</i>	46
1.3.3. <i>Absorção e eliminação</i>	49
1.3.4. <i>Região alveolar</i>	50
1.4. SISTEMA LINFÁTICO ASSOCIADO AO PULMÃO	54
1.4.1. <i>Função do sistema linfático pulmonar</i>	54
1.4.2. <i>Absorção linfática</i>	55
1.4.3. <i>Administração linfática</i>	58
1.4.4. <i>O interstício alveolar</i>	61
1.5. PACLITAXEL.....	62
1.5.1. <i>Os Taxanos com actividade terapêutica</i>	62
1.5.2. <i>Microtúbulos como alvo de agentes antineoplásicos</i>	63
1.5.3. <i>Paclitaxel (Ptx) versus Docetaxel</i>	64
1.6. NEOPLASIA.....	77
1.6.1. <i>Carcinoma do pulmão</i>	79
1.7. OBJECTIVOS	82
1.8. BIBLIOGRAFIA.....	84

CAPÍTULO 2. PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS	109
2.1. INTRODUÇÃO	109
2.1.1. <i>Vectores Coloidais</i>	109
2.1.2. <i>Produção de Nanopartículas lipídicas por emulsificação</i>	112
2.1.3. <i>Cristalinidade</i>	113
2.2. MATERIAIS	117
2.2.1. <i>Lípidos</i>	117
2.2.2. <i>Fase aquosa</i>	119
2.3. MÉTODOS	119
2.3.1. <i>Emulsificação/Solidificação</i>	119
2.3.2. <i>Caracterização</i>	126
2.4. RESULTADOS	129
2.4.1. <i>Efeito dos parâmetros de processo</i>	129
2.4.2. <i>Efeito da composição do sistema</i>	134
2.5. DISCUSSÃO	155
2.6. BIBLIOGRAFIA	163
CAPÍTULO 3. DETERMINAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS POR ADMINISTRAÇÃO PULMONAR	171
3.1. INTRODUÇÃO	171
3.1.1. <i>Veículos coloidais para administração pulmonar</i>	171
3.1.2. <i>Absorção no Pulmão profundo</i>	174
3.2. MATERIAIS	177
3.3. MÉTODOS	178
3.3.1. <i>Cintigrafia gama</i>	178
3.3.2. <i>Preparação do complexo [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp</i>	184
3.3.3. <i>Nebulização</i>	184
3.3.4. <i>Cinética de distribuição in vivo após administração pulmonar</i>	188
3.4. RESULTADOS	192
3.4.1. <i>Eficiência de marcação e pureza radioquímica</i>	192
3.4.2. <i>Nebulização</i>	194
3.4.3. <i>Cinética de distribuição das [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp inaladas</i>	195
3.4.4. <i>Cinética in vivo após administração endotraqueal de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp</i>	202
3.5. DISCUSSÃO	205
3.6. BIBLIOGRAFIA	214
CAPÍTULO 4. PREPARAÇÃO DE UM SISTEMA NSLP - PTX	221
4.1. INTRODUÇÃO	221
4.1.1. <i>Vectores Coloidais</i>	221
4.2. MATERIAIS	227

4.3.	MÉTODOS	228
4.3.1.	<i>Avaliação da solubilidade do PTX em diferentes lípidos</i>	228
4.3.2.	<i>Produção de nanopartículas contendo Ptx incorporado: nsLp-Ptx</i>	229
4.3.3.	<i>Caracterização de nanopartículas com Ptx incorporado: nsLp-Ptx</i>	232
4.3.4.	<i>Estabilidade das nsLp-Ptx</i>	233
4.3.5.	<i>Quantificação de Ptx</i>	233
4.4.	RESULTADOS	236
4.4.1.	<i>Solubilidade</i>	236
4.4.2.	<i>Eficiência de Incorporação</i>	238
4.4.3.	<i>Validação do método analítico</i>	239
4.4.4.	<i>Efeito da composição química do sistema no dm das partículas</i>	243
4.4.5.	<i>Determinação da concentração de Ptx incorporado nas nanopartículas</i>	247
4.4.6.	<i>Eficiência de recuperação</i>	250
4.4.7.	<i>Características físico-químicas das Ptx-nsLp</i>	251
4.5.	DISCUSSÃO.....	259
4.6.	BIBLIOGRAFIA.....	266
CAPÍTULO 5. DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DE NSLP-PTX		273
5.1.	INTRODUÇÃO	273
5.1.1.	<i>Quimioterapia em oncologia</i>	273
5.1.2.	<i>Terapêutica selectiva na célula neoplásica</i>	275
5.2.	MATERIAIS.....	278
5.2.1.	<i>Materiais</i>	278
5.2.2.	<i>Linha celular tumoral</i>	281
5.3.	MÉTODOS	282
5.3.1.	<i>Viabilidade celular</i>	282
5.3.2.	<i>Actividade antineoplásica in vivo</i>	284
5.4.	RESULTADOS.....	290
5.4.1.	<i>Determinação in vitro da toxicidade de nsLp</i>	290
5.4.2.	<i>Eficácia do sistema nsLp-Ptx</i>	295
5.5.	DISCUSSÃO.....	301
5.5.1.	<i>Citotoxicidade de nsLp in vitro</i>	301
5.5.2.	<i>Avaliação da actividade do sistema nsLp-Ptx</i>	302
5.6.	BIBLIOGRAFIA.....	309
CAPÍTULO 6. CONCLUSÃO GERAL		315

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1-1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA PARTÍCULA COLOIDAL E DO MICROAMBIENTE ELECTROQUÍMICO À SUPERFÍCIE. A CONCENTRAÇÃO DE CARGAS À SUPERFÍCIE DA PARTÍCULA CONFERE A ESTAS PARTÍCULAS PROPRIEDADES SEMELHANTES ÀS DOS MACROÍONS EM SOLUÇÃO. DISPONÍVEL EM: WWW.MRSEC.HARVARD.EDU/RESEARCH/IRG_3.HTML	26
FIGURA 1-2: ESTRUTURA DO PULMÃO. REPRODUZIDO COM AUTORIZAÇÃO DE: ATLAS OF HUMAN ANATOMY. IN: SECOND EDITION FRANK H. AND NETTER, M.D. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA LINFÁTICO PULMONAR AO LONGO DO QUAL SE ENCONTRAM NUMEROSOS GÂNGLIOS LINFÁTICOS. É VISÍVEL A ESTRUTURA DO PLEXO LINFÁTICO QUE CORRESPONDE A UMA REDE PROFUNDA DE ESTRUTURAS CONDUTORAS QUE ABRANGEM A REGIÃO PERIFÉRICA E CENTRAL DE CADA PULMÃO.	44
FIGURA 1-3: ALTERAÇÃO NA ESTRUTURA E ESPESSURA AO LONGO DO EPITÉLIO PULMONAR, RESPECTIVAMENTE AO NÍVEL DOS BRÔNQUIOS, BRONQUÍOLOS E ALVÉOLOS. ESTRUTURA CELULAR DOS TRÊS NÍVEIS E RESPECTIVA MEMBRANA BASAL, REPRESENTADA ESQUEMATICAMENTE, ONDE SE PODE VER AS CÉLULAS CILIADAS (CC), CÉLULAS GLOBULARES (CG), CÉLULA BASAL (CB), CÉLULAS MUCOSAS (CBR). NOS BRONQUÍOLOS TERMINAIS, OBSERVA-SE O EPITÉLIO SIMPLES CILIADO (ADAPTADO DE WWW.ACSESSEXCELLENCE.ORG.HTML). NA IMAGEM INFERIOR, ASPECTO MORFOLÓGICO DO EPITÉLIO DAS VIAS RESPIRATÓRIAS. O EPITÉLIO ALVEOLAR ESTÁ REPRESENTADO EM SECÇÃO TRANSVERSAL, ONDE SÃO VISÍVEIS OS NÚCLEOS DOS PNEUMÓCITOS TIPO I, CÉLULAS DE PNEUMÓCITOS TIPO II E CAPILARES SANGUÍNEOS (ADAPTADO DE: BLUE HISTOLOGY-RESPIRATORY SYSTEM).....	46
FIGURA 1-4: IMAGEM DE UM CORTE DE PULMÃO PROFUNDO EM MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO (SEM), ONDE É POSSÍVEL OBSERVAR UMA FIBRA DE VIDRO ($20,9\pm 8,3 \mu\text{m}$) RETIDA NA REGIÃO ALVEOLAR DE UM PULMÃO DE RATINHO. (A) ASPECTO DA ESPAÇO ALVEOLAR. EM DESTAQUE A LOCALIZAÇÃO DA FIBRA (BARRA=50 μm); PROJECCÃO DA FIBRA NO ESPAÇO ALVEOLAR ENTRE A TERMINAÇÃO DO DUCTO ALVEOLAR (AD) E O INÍCIO DOS ALVÉOLOS (A). ADAPTADO DE GEISER E COLABORADORES (GEISER <i>ET AL.</i> 2003).	48
FIGURA 1-5: NA FIGURA DA ESQUERDA ENCONTRA-SE REPRESENTADA ESQUEMATICAMENTE A REGIÃO ALVEOLAR E O INTERSTÍCIO ALVEOLAR; ADAPTADO DO ATLAS DE ANATOMIA HUMANA (NETTER 1998). DESTACAM-SE OS ALVÉOLOS, RESPECTIVOS SACOS ALVEOLARES E OS PLEXOS SANGUÍNEO E LINFÁTICO. NA FIGURA DA DIREITA, SECÇÃO TRANSVERSAL DA REGIÃO ALVEOLAR, AMPLIAÇÃO DO EPITÉLIO ALVEOLAR E DO SEPTO E PAREDE ALVEOLARES ($\times 400$)	50
FIGURA 1-6: MICROFOTOGRAFIA ONDE SE PODE OBSERVAR O ASPECTO MORFOLÓGICO DE UM MACRÓFAGO ALVEOLAR (REPRODUZIDO COM AUTORIZAÇÃO DA AUTORA DRA. SÍLVIA DIABATE). NA COLUNA DA DIREITA ESTÃO RESUMIDAS AS FUNÇÕES MAIS RELEVANTES DOS MACRÓFAGOS.	53
FIGURA 1-7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA MACROMOLECULAR DOS MICROTÚBULOS: OS PROTOFILAMENTOS SÃO HETERODÍMEROS DA TUBULINA CONSTITUÍDA PELAS SUBUNIDADES α - (A) E β - , (B). ARRANJO DOS DÍMEROS DE TUBULINA QUE ORIGINAM HETERODÍMEROS, QUE SE LIGAM ENTRE SI PARA FORMAR OS PROTOFILAMENTOS (C), O CONJUNTO DESTES, EM FORMAÇÃO RADIAL, ORIGINA A MACROMOLÉCULA (D). MICROFOTOGRAFIA ELECTRÓNICA DE SECÇÕES DE MICROTÚBULOS (E) E (F). ADAPTADO DE: MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL. GS FOURTH EDITION (2002) BY BRUCE ALBERTS, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS AND PETER WALTER.	63
FIGURA 1-8: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INTERACÇÃO ENTRE A MOLÉCULA DE PACLITAXEL (VERDE) E A α -TUBULINA, UM DÍMERO ESTRUTURAL DOS MICROTÚBULOS . ADAPTADO DE: NOGALES, E., <i>ET AL.</i> (1995) NATURE 375, 424-427.	65
FIGURA 1-9: ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE PACLITAXEL: $\text{C}_{47}\text{H}_{51}\text{NO}_{14}$ (MW=853.92). ESTRUTURA CRISTALINA DA MOLÉCULA DE PACLITAXEL [TAX-11-EN-9-ONA,5 β ,20-EPOXY-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -HEXAHYDROXY-4,10-	

DIACETATE-2-BENZOATE-13-(α -PHENYLHIPPURATE)] [J. LÖWE, H. LI, K. H. DOWNING AND E. NOGALES IN THE JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 2001, VOLUME 313, PAGES 1045-1057].....	66
FIGURA 2-1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA OPERATIVO NECESSÁRIO À PREPARAÇÃO DE UMA DISPERSÃO COLOIDAL DE PARTÍCULAS LIPÍDICAS-NSLP. O PROCESSO É DIVIDIDO EM TRÊS ETAPAS: (I) AQUECIMENTO DAS FASES ORGÂNICA E AQUOSA SEPARADAMENTE, (II) HOMOGENEIZAÇÃO APÓS MISTURA DAS FASES EM RECIPIENTE DE VIDRO COLOCADO NO INTERIOR DO REACTOR, (III) SOLIDIFICAÇÃO À TEMPERATURA AMBIENTE APÓS ACONDICIONAMENTO DO SISTEMA DISPERSO EM FRASCOS ROLHADOS E ENCAPSULADOS. A TEMPERATURA NO INTERIOR DA MISTURA É MANTIDA COM RECURSO À CIRCULAÇÃO DE ÁGUA QUENTE ATRAVÉS DE UM SUPORTE DE PAREDE DUPLA. A ALTURA DA HASTE É FIXADA DE MODO A PROMOVER A MESMA ÁREA DE AGITAÇÃO EM TODAS AS PREPARAÇÕES.	121
FIGURA 2-2: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS LÍPIDOS COMPRITOL® 888ATO E PRECIROL ATO 5®.	125
FIGURA 2-3: ASPECTO FINAL DAS DISPERSÕES DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PRODUZIDAS PELO MÉTODO DE FUSÃO/EMULSIFICAÇÃO. O ASPECTO FINAL DAS PREPARAÇÕES É FUNÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUANTITATIVA E EM CONSEQUÊNCIA DO <i>DM</i> DAS PARTÍCULAS DISPERSAS. NA IMAGEM PODEMOS OBSERVAR DA ESQUERDA PARA A DIREITA FORMULAÇÕES DE PRECIROL ATO5 A 8%, 6% E 3% DE LÍPIDO (M/V) RESPECTIVAMENTE, PREPARADAS COM 50% DE TENSIOACTIVO (M/M). A PREPARAÇÃO COM 3% DE LÍPIDO É A QUE SE APRESENTA MAIS TRANSLÚCIDA.	130
FIGURA 2-4: VALORES DE DIÂMETRO VOLUMÉTRICO D50 E D90 (μ M) PARA DISPERSÕES CONTENDO 6% DE LÍPIDO COMPRITOL 888ATO (P.F. 72°C) E 50% DE POLISSORBATO 80.	132
FIGURA 2-5: DADOS DE DIÂMETRO VOLUMÉTRICO (μ M) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE HOMOGENEIZAÇÃO, PARA 100ML DE UMA FORMULAÇÃO A 6%(M/V _{TOTAL}) DE COMPRITOL 888ATO COM 50% DE POLISSORBATO 80. A TEMPERATURA DO PROCESSO FOI FIXADA A 20°C ACIMA DO PONTO DE FUSÃO DO LÍPIDO.	133
FIGURA 2-6: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VALORES DE <i>DM</i> , EM FUNÇÃO DO LÍPIDO, CONTEÚDO LIPÍDICO E CONCENTRAÇÃO DE TENSIOACTIVO, PARA NANOPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR EMULSIFICAÇÃO APÓS FUSÃO.	137
FIGURA 2-7: PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS EM FUNÇÃO DA PERCENTAGEM DE LÍPIDO (PRECIROL ATO5), PARA PREPARAÇÕES A 3% (A), 6% (B) E 8% (C) DE LÍPIDO E 50% DE TENSIOACTIVO.	139
FIGURA 2-8: VARIAÇÃO DO <i>DM</i> POR INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DE TENSIOACTIVO (G/100ML) NO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE LÍPIDO.	140
FIGURA 2-9: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA CORRESPONDENTE AO AJUSTAMENTO DE UM MODELO QUADRÁTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS QUE CONTEMPLA A INTERACÇÃO ENTRE FACTORES. AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SÃO A CONCENTRAÇÃO DE LÍPIDO (%) E A PROPORÇÃO TENSIOACTIVO/LÍPIDO (T/L).....	144
FIGURA 2-10: DIFERENÇAS OBSERVADAS ENTRE OS VALORES DE <i>DM</i> DETERMINADOS E OS ESTIMADOS, ATRAVÉS DO MODELO ADOPTADO PARA INTERPRETAR OS DADOS EXPERIMENTAIS.....	146
FIGURA 2-11. ASPECTO MORFOLÓGICO DE PREPARAÇÕES 6PRE_50 (A) E 6COMP_50 (B). IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO-TEM.	149
FIGURA 2-12: PERFIL DOS FENÓMENOS TÉRMICOS EM TERMOGRAMAS OBTIDOS COM 20MG DE LÍPIDO PURO E TERMOGRAMAS OBTIDOS PARA AS RESPECTIVAS FORMULAÇÕES DE NANOPARTÍCULAS. (A1) COMPRITOL® PURO, (A2) 6CO_50, (B1) PRECIROL ATO5® PURO, (B2) 6PR_50, (C1) WITEPSOL E85, (C2) 6WI_50.	152
FIGURA 3-1: ESTRUTURA QUÍMICA DA EXAMETAZIMA. APÓS RECONSTITUIÇÃO DO LIOFILIZADO (CERETEC™) COM PERTECNETATO DE SÓDIO NUMA SOLUÇÃO ISOTÓNICA DE NaCl APIROGÉNICA, FORMA-SE O COMPLEXO ^{99m} Tc-EXAMETAZIMA. O RADIOFÁRMACO ADMINISTRADO POR VIA INTRAVENOSA É UTILIZADO PARA O ESTUDO DA DINÂMICA CEREBRAL. A ADMINISTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS MARCADOS COM O RADIOFÁRMACO É UTILIZADA PARA A DETECÇÃO DE FOCOS INFLAMATÓRIOS NA REGIÃO ABDOMINAL.	181
FIGURA 3-2: PERFIS DE DECOMPOSIÇÃO DA ASSOCIAÇÃO [^{99m} Tc]-HMPAO-NSLP, APÓS AJUSTAMENTO DE UM MODELO EXPONENCIAL UTILIZANDO UMA ANOVA DE DUAS ENTRADAS. NA IMAGEM SUPERIOR, PODEMOS OBSERVAR O PERFIL DE DECOMPOSIÇÃO NA DISPERSÃO ORIGINAL (□) E APÓS INCUBAÇÃO NUMA SOLUÇÃO DE ALBUMINA PREVIAMENTE TRATADA A 37°C (○) OU A 56°C (◇). NO GRÁFICO B, ENCONTRAMOS A	

REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO DA AMOSTRA INCUBADA EM PLASMA PREVIAMENTE TRATADO A 37°C (◇) OU A 56°C (○) E EM SORO TRATADO A 37°C (□).....	193
FIGURA 3-3: IMAGENS OBTIDAS ATÉ AOS 60 MINUTOS APÓS INALAÇÃO DE NSLP PRODUZIDAS COM COMPRITOL® 888ATO (I) E COM PRECIROL ATO5® (II). A AUSÊNCIA DE ACTIVIDADE NOS ÓRGÃOS DA CAVIDADE TORÁCICA, CONFIRMA QUE A DISTRIBUIÇÃO <i>IN VIVO</i> DO RADIOFÁRMACO, É ALTERADA PELA ASSOCIAÇÃO A NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E QUE ESTE FENÓMENO É INDEPENDENTE DA COMPOSIÇÃO DESTAS.	196
FIGURA 3-4: PERFIL DE DEPOSIÇÃO E RETENÇÃO DE ACTIVIDADE ATÉ AOS 20 MINUTOS APÓS INALAÇÃO DE NSLP PRODUZIDAS COM COMPRITOL® 888ATO (I) E COM PRECIROL ATO5® (II).	197
FIGURA 3-5: COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO EM ANIMAIS TRATADOS COM AEROSSOL DE RADIOFÁRMACO LIVRE (A) E DE RADIOFÁRMACO INCORPORADO NAS PARTÍCULAS DE COMPRITOL® 888ATO (B). IMAGENS DE CORPO INTEIRO, COM OS ANIMAIS EM DECÚBITO DORSAL, CORRESPONDENTES À AQUISIÇÃO DINÂMICA DURANTE 60 MINUTOS APÓS INALAÇÃO.	198
FIGURA 3-6: CONCENTRAÇÃO DE ACTIVIDADE NOS GÂNGLIOS LINFÁTICOS (A) GÂNGLIOS PERIAÓRTICOS, (B) INGUINAIS, (C) AXILARES) AOS 30 MIN (A) E 45 MIN (B) APÓS INALAÇÃO DO AEROSSOL DE [^{99m} Tc]-HMPAO-NSLP.	199
FIGURA 3-7. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA VARIACÃO DA ACTIVIDADE EM FUNÇÃO DO TEMPO DURANTE 60 MINUTOS DE AQUISIÇÃO DINÂMICA, PARA O AEROSSOL [^{99m} Tc]-HMPAO-NSLP COM PRECIROL ATO 5. ESTES RESULTADOS INCLUEM A CINÉTICA DE ABSORÇÃO, ELIMINAÇÃO E RETENÇÃO PULMONAR NAS REGIÕES CENTRAL E PERIFÉRICA, ASSIM COMO A CINÉTICA DE ACUMULAÇÃO DE PARTÍCULAS NOS GÂNGLIOS PERIAÓRTICOS, AXILARES E INGUINAIS.	200
FIGURA 3-8: PERFIL DE ELIMINAÇÃO PULMONAR OBTIDO PELA CONTAGEM DE ACTIVIDADE NO PULMÃO, EM COLHEITAS EFECTUADAS AOS 3; 8; 15; 30 E 60 MINUTOS, APÓS ADMINISTRAÇÃO ENDO-TRAQUEAL DE UMA AMOSTRA DE [^{99m} Tc]-HMPAO-NSLP. NA IMAGEM DA DIREITA, CORRESPONDENTE AO TEMPO ZERO, VERIFICA-SE A ACUMULAÇÃO DA ACTIVIDADE ADMINISTRADA NO ESPAÇO PULMONAR.	203
FIGURA 3-9: DISTRIBUIÇÃO DE ACTIVIDADE POR ÓRGÃO, AOS 3, 8, 15, 30 E 60 MINUTOS APÓS ADMINISTRAÇÃO ENDOTRAQUEAL DE [^{99m} Tc]-HMPAO-NSLP. APÓS ELIMINAÇÃO DA REGIÃO PULMONAR, A ACTIVIDADE ACUMULA-SE AO NÍVEL DOS GÂNGLIOS LINFÁTICOS MEDIASTÍNICOS E PERI-AÓRTICOS	204
FIGURA 4-1: CROMATOGRAMAS CORRESPONDENTES À INECÇÃO DE UMA SOLUÇÃO PADRÃO (15µg/ML) (A), UM SOBRENADANTE (I) DE UMA FORMULAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS VAZIAS (B), UM SOBRENADANTE (I) DE UMA FORMULAÇÃO 82,5_3-PTX (C), UM SOBRENADANTE (II) DE UMA FORMULAÇÃO 125_3-PTX (D).	239
FIGURA 4-2. GRÁFICO DOS RESÍDUOS DE 7 CURVAS DE CALIBRAÇÃO INDEPENDENTES, REALIZADAS EM DIAS DIFERENTES.	241
FIGURA 4-3. VALORES MÉDIOS E DESVIO-PADRÃO (BARRAS DE ERRO) DE 7 CURVAS DE CALIBRAÇÃO INDEPENDENTES, NO INTERVALO [1,25 , 15,0] µg/ML DE PTX.	242
FIGURA 4-4. VALORES MÉDIOS E DESVIO-PADRÃO (BARRAS DE ERRO) DE 7 CURVAS DE CALIBRAÇÃO INDEPENDENTES, NO INTERVALO [15,0 A 60,0] µg/ML DE PTX.	242
FIGURA 4-5: EXEMPLO DE UMA CURVA DE CALIBRAÇÃO, OBTIDA POR QUANTIFICAÇÃO DE 5 SOLUÇÕES-PADRÃO DE PTX (N=4), DE CONCENTRAÇÃO 15,0; 22,5; 30,0; 45,0 E 60,0 µg/ML.....	243
FIGURA 4-6: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE TENSIOACTIVO A (50%) E B (75%) NO COMPORTAMENTO DO <i>DM</i> POR AUMENTO DA PERCENTAGEM DE LÍPIDO, PARA OS LÍPIDOS C-COMPRITOL® 888ATO E P-PRECIROL ATO5®.	245
FIGURA 4-7. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PTX NO DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS LIPÍDICAS. EQUAÇÃO DA RECTA INCLUINDO OS INTERVALOS DE CONFIANÇA (A=0,05) PARA A ORDENADA NA ORIGEM E DECLIVE.	246
FIGURA 4-8. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PTX NA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO. RESULTADOS OBTIDOS APÓS FILTRAÇÃO, EXPRESSOS EM TERMOS DE PERCENTAGEM DE FÁRMACO LIGADO ÀS PARTÍCULAS, RELATIVO À CONCENTRAÇÃO DE PTX INICIAL POR VOLUME DE FORMULAÇÃO (N=2).	248
FIGURA 4-9 : ASPECTO MICROSCÓPICO DOS CRISTAIS DE PTX, NA PREPARAÇÃO 150_3-PTX, AOS 21 DIAS.	249

FIGURA 4-10: ASPECTO MORFOLÓGICO DAS FORMULAÇÕES DE NSLP PREPARADAS A PARTIR DOS LÍPIDOS COMPRITOL® 888ATO (A) E PRECIROL ATO5® (B), ANTES (À ESQUERDA) E DEPOIS (À DIREITA) DA INCORPORAÇÃO DE PTX. IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO-TEM. O PROCESSO É EFICAZ NO QUE RESPEITA À FORMAÇÃO DE UM COMPLEXO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO FÁRMACO NSLP-PTX, UMA VEZ QUE NÃO SE OBSERVOU A PRESENÇA DE CRISTAIS OU AGREGADOS DE PARTÍCULAS DE LÍPIDO.	252
FIGURA 4-11: TERMOGRAMAS OBTIDOS COM 20µG DE, (A) PTX SÓLIDO, (B) LÍPIDO PURO-PRECIROL ATO5®, (C) ETOH-NSLP, (D) E (E) PTX-NSLP RESPECTIVAMENTE, 82,5_3-PTX E 150_3-PTX.....	255
FIGURA 4-12. TEOR DE PTX AO LONGO DO TEMPO (30DIAS), NAS PREPARAÇÕES A 3% DE LÍPIDO (M/V); 82,5_NS LP-PTX (■) E 100_NS LP-PTX (O)	257
FIGURA 4-13. ESQUEMA DE UMA SIMULAÇÃO DOS POSSÍVEIS EQUÍLÍBRIOS A OCORRER NO SISTEMA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS COM PTX DURANTE A FASE DE SOLIDIFICAÇÃO. ONDE K ₁ E K ₂ CORRESPONDEM AO EQUILÍBRIO ENTRE MOLÉCULAS DE PTX ADSORVIDAS À SUPERFÍCIE DAS NSLP E AS DISSOVIDAS NA FASE AQUOSA. K ₃ E K ₄ REPRESENTAM O EQUILÍBRIO ENTRE AS MOLÉCULAS DE PTX DISSOLVIDAS E AQUELAS QUE PRECIPITAM SOB A FORMA DE CRISTAIS.....	261
FIGURA 5-1: (I) ACLIMATAÇÃO-7DIAS; (II) INOCULAÇÃO - APÓS 7 DIAS; (III) DISSEMINAÇÃO - 15 DIAS (IV) CRESCIMENTO - DOS 15 AOS 45 DIAS.	285
FIGURA 5-2: A DOSE UNITÁRIA E O NÚMERO DE TRATAMENTOS, VARIARAM PARA CADA GRUPO. O GRUPO CONTROLO, GA03, NÃO FEZ QUALQUER TIPO DE TRATAMENTO. O GRUPO AO QUAL FORAM ADMINISTRADAS PARTÍCULAS SEM FÁRMACO, GB03, RECEBEU O MESMO NÚMERO DE ADMINISTRAÇÕES QUE O GRUPO GE03.	287
FIGURA 5-3: O GRUPO CONTROLO, GA02, NÃO FEZ QUALQUER TIPO DE TRATAMENTO.	288
FIGURA 5-4: ESQUEMA DO PROTOCOLO UTILIZADO PARA A ADMINISTRAÇÃO DO AEROSOL DE NSLP E NSLP-PTX. SÃO IDENTIFICADOS NA IMAGEM, A CÂMARA DE INALAÇÃO, O NEBULIZADOR E A ANTECÂMARA DESTINADA A DIMINUIR O FLUXO DO AEROSOL FORMADO. O ESQUEMA PROPOSTO TEVE COMO OBJECTIVO A SATURAÇÃO DA CÂMARA DE INALAÇÃO DE MODO A QUE A VELOCIDADE DE INALAÇÃO FOSSE LIMITADA APENAS PELO FLUXO RESPIRATÓRIO DO ANIMAL (90 MOVIMENTOS POR MINUTO PARA UM VOLUME MÉDIO INALADO DE 200µL [ALEXANDER NEPOMUK,1998]).	289
FIGURA 5-5: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS SEM FÁRMACO NA VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATO.....	291
FIGURA 5-6: CÉLULAS EXPOSTAS A UMA SUSPENSÃO COM 9,7x10 ¹⁰ NANOPARTÍCULAS (NSLP: 3% PRECIROL ATO5) MARCADOS COM A SONDA DE FLUORESCÊNCIA DPH. AS IMAGENS FORAM OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA. A IMAGEM DA ESQUERDA CORRESPONDE A UMA CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATO. NA IMAGENS À DIREITA OBSERVAM-SE MACRÓFAGOS BRONCO-ALVEOLARES HUMANOS EM CULTURA.	292
FIGURA 5-7: PREPARARAM-SE AS AMOSTRAS A PARTIR DA REPRESENTAÇÃO LINEAR DA CONCENTRAÇÃO DE PTX INCORPORADO EM NSLP, DE FORMA A OBTER UMA DISTRIBUIÇÃO LOGARÍTMICA DAS CONCENTRAÇÕES.	293
FIGURA 5-8: MORTE CELULAR DAS CÉLULAS MXT-B2 EM CULTURA CELULAR PARA CONCENTRAÇÕES DE FÁRMACO EQUIVALENTES A µG PACLITAXEL/POÇO. OS PARÂMETROS CALCULADOS PELA ANOVA PARA A EQUAÇÃO5-1 SÃO: PARA AS NSLP-PTX, (A) -0,806 E (B) 0,752 E PARA O TAXOL® (A) 0,530 E (B) 0,438.	294
FIGURA 5-9: MICROFOTOGRAFIA DE CÉLULAS MXT-B2. AS IMAGENS CORRESPONDEM: CULTURA DE CÉLULAS CONTROLO (A), CÉLULAS INCUBADAS COM NSLP SEM FÁRMACO (B), CÉLULAS INCUBADAS COM NSLP-PTX (1µM) (C) E A MESMA AMOSTRA, MAS COM AS CÉLULAS OBSERVADAS COM UMA MAGNIFICÊNCIA DE 40x (D). AS SETAS APONTAM ESTRUTURAS QUE SE IDENTIFICAM COM CORPOS APOPTÓTICOS.	295
FIGURA 5-10: ASPECTO DOS PULMÕES DE RATINHO 30 DIAS APÓS INOCULAÇÃO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS MXT-B2. O APARECIMENTO DE METASTASES PULMONARES MÚLTIPLAS DE CARCINOMA DA MAMA, CONFIRMA QUE O MODELO É ADEQUADO AO ESTUDO DA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA TERAPÊUTICA DE UM AEROSOL DE NSLP-PTX.	297
FIGURA 5-11: NÚMERO MÉDIO DE METÁSTASES POR RATO EM CADA GRUPO.	298

FIGURA 5-12: MAGNITUDE DO EFEITO DE OBTIDO PARA CADA FORMULAÇÃO, NAS FASES DE PREVENÇÃO E DE TRATAMENTO ESTIPULADAS NO PROTOCOLO 01-03	298
FIGURA 5-13: VOLUME MÉDIO DAS METÁSTASE (MM ³) POR GRUPO DE ANIMAIS.....	299
FIGURA 5-14: VOLUME MÉDIO, EM MM ³ , DAS METÁSTASES POR GRUPO DE ANIMAIS. O VOLUME CORRESPONDENTE A TECIDO NEOPLÁSICO NOS PULMÕES DOS ANIMAIS TRATADOS COM NSLP-PTX É DESPREZÁVEL. IMAGENS DOS PULMÕES DE ANIMAIS NÃO TRATADOS (A), TRATADOS COM PARTÍCULAS VAZIAS (B) E COM NSLP-PTX (C), EM FOTOGRAFIAS OBTIDAS ATRAVÉS DE UMA CÂMARA FOTOGRÁFICA ACOPLADA A UMA LUPA DE MAGNIFICIÊNCIA (40X).	300

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1-1: FENÓMENOS RELACIONADOS COM AS INTERACÇÕES ENTRE PARTÍCULAS QUE INFLUENCIAM A ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS.....	25
TABELA 1-2: TRABALHOS PUBLICADOS SOBRE INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS COM ACTIVIDADE TERAPÉUTICA OU DE DIAGNÓSTICO EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS.	33
TABELA 1-3: ELEMENTOS ESTRUTURAIIS DO NÓDULO LINFÁTICO E COMPOSIÇÃO DA LÍMFA. AS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS PERMITEM QUE PARTÍCULAS ESTRANHAS RETIDAS NAS FIBRAS RETICULARES SEJAM DESTRUÍDAS POR FAGOCITOSE (MACRÓFAGOS FIXOS) OU ATRAVÉS DE UM MECANISMO MAIS COMPLEXO, POR RESPOSTA IMUNITÁRIA.	57
TABELA 1-4: VARIAÇÃO DE VALORES DE DOSE LETAL 50% (DL ₅₀) EM FUNÇÃO DA LINHA TUMORAL E DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO. EM QUE: A= µG/ML (x0,85), ND = NÃO DETERMINADO, H = HORAS, MIN = MINUTOS, SM = SEMANAS. ADAPTADO DE SPENCER AND FAULDS (1994) (SPENCER & FAULDS 1994).....	69
TABELA 1-5: EXEMPLOS DE SISTEMAS DE VEICULAÇÃO SELECTIVA DESENVOLVIDOS PARA INCORPORAÇÃO DE PACLITAXEL.	74
TABELA 2-1. IDENTIFICAÇÃO DOS LÍPIDOS E RESPECTIVO ÁCIDO GORDO (CADEIA CARBONADA:SATURAÇÃO). TEMPERATURAS DE FUSÃO (P.F.) PARA CADA LÍPIDO. R- CORRESPONDE AO ÁCIDO GORDO. VALOR DE ÍNDICE DE HIDROXILO (IH).	118
TABELA 2-2: PARÂMETROS OPERATIVOS ESTABELECIDOS PARA A PRODUÇÃO DE NSLP.	123
TABELA 2-3: CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO DAS PREPARAÇÕES, DE ACORDO COM O LÍPIDO UTILIZADO E COM A RELAÇÃO LÍPIDO/TENSIOACTIVO (L/T).	124
TABELA 2-4: DIÂMETROS VOLUMÉTRICOS, 10%, 50% E 90% EM FUNÇÃO DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO. DADOS OBTIDOS POR DIFRAÇÃO LASER EM FORMULAÇÕES PREPARADAS COM 6% DE LÍPIDO E 50% DE POLISSORBATO 80.	131
TABELA 2-5: DIÂMETRO VOLUMÉTRICO (NM) 50% E 90% EM FUNÇÃO DA INTENSIDADE DE AGITAÇÃO (10 MIN) PARA DISPERSÕES CONTENDO 6% E 8% DE COMPRITOL 888ATO PARA 50% (M/MLÍPIDO) DE TWEEN 80.	131
TABELA 2-6: VALORES DE POTENCIAL ZETA (ξ) PARA AS NANOPARTÍCULAS PREPARADAS COM DIFERENTES LÍPIDOS COM 50% DE POLISORBATO 80. VARIAÇÃO DE DM (NM) E IP EM FUNÇÃO DE ESTRUTURA DO LÍPIDO E DA PERCENTAGEM DE TENSIOACTIVO PARA 6% DE LÍPIDO.....	135
TABELA 2-7: EFEITO DA VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE LÍPIDO E DE TENSIOACTIVO (%), NOS VALORES DE POTENCIAL ZETA (ξ), DM (NM) E IP, PARA AS FORMULAÇÕES (N=6) DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PRODUZIDAS UTILIZANDO DIFERENTES LÍPIDOS BASE. O VALOR DE DM (NM) QUE APARECE ENTRE PARENTESIS REPRESENTA O MENOR VALOR OBTIDO NAS LEITURAS.....	136
TABELA 2-8: RESULTADOS DA ANOVA EXECUTADA AOS DADOS OBTIDOS COMO LÍPIDO COMPRITOL®888ATO. A PARCELA CORRESPONDENTE A WITHIN REPRESENTA A VARIABILIDADE ENTRE PREPARAÇÕES E ENTRE LEITURAS.....	140
TABELA 2-9: RESULTADOS DA ANOVA EXECUTADA AOS DADOS OBTIDOS COMO LÍPIDO PRECIROL®ATO5. A PARCELA CORRESPONDENTE A WITHIN REPRESENTA A VARIABILIDADE ENTRE PREPARAÇÕES E ENTRE LEITURAS.....	141
TABELA 2-10 RESULTADOS DO AJUSTAMENTO DO MODELO QUADRÁTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS.....	142
TABELA 2-11. ANOVA DO AJUSTAMENTO AOS DADOS EXPERIMENTAIS.	143
TABELA 2-12: CÁLCULO DO NÚMERO DE PARTÍCULAS POR ML DE NANOSUSPENSÃO COM 0,20% DE SÓLIDO EM ÁGUA, UTILIZANDO O MODELO DESENVOLVIDO E O VALOR DE DM OBTIDO POR PCS. COMPARAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS PRODUZIDAS COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE LÍPIDO.	146
TABELA 2-13: DADOS RELATIVOS A FORMULAÇÕES COM BASE NO LÍPIDO PRECIROL ATO5 A 6%, ONDE SE FEZ VARIAR A CONCENTRAÇÃO DE TENSIOACTIVO. AS AMOSTRAS SÃO DILUÍDAS EM ÁGUA A UMA CONCENTRAÇÃO DE 0,2%(M/V) DE SÓLIDOS, ANTES DAS LEITURAS.....	147

TABELA 2-14: NÚMERO DE PARTÍCULAS OBTIDO PARA FORMULAÇÕES A 6% DE LÍPIDO E 50% TENSIOACTIVO APÓS DILUIÇÃO EM ÁGUA PURIFICADA (0,2%).....	148
TABELA 2-15: VALORES DE TEMPERATURA DE FUSÃO E ÍNDICE DE CRISTALIZAÇÃO (IR%) DETERMINADOS PARA NANOPARTÍCULAS PREPARADAS COM 6% DE LÍPIDO E 50% DE TENSIOACTIVO.....	150
TABELA 2-16: VALORES DE TEMPERATURA DE FUSÃO DETERMINADOS (N=3) AO LONGO DO TEMPO PARA UMA PREPARAÇÃO COM BASE NO PRECIROL ATO5® A 6% (M/V).....	150
TABELA 2-17: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE LÍPIDO NA CRISTALINIDADE DA ESTRUTURA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDIAS COM BASE NO COMPRITOL® 888 ATO.....	151
TABELA 2-18. VALORES DE DIÂMETRO MÉDIO (DM) E ÍNDICE DE POLIDISPERSITIVIDADE (IP) OBTIDOS POR PSC AO TEMPO ZERO (72H), AOS TRÊS E 12 MESES DE ESTABILIDADE. MÉDIAS DE TRÊS LOTES PREPARADOS COM UMA PERCENTAGEM DE TENSIOACTIVO RELATIVA À MASSA DE LÍPIDO (T/L) DE 50 % (P/P).....	154
TABELA 2-19: ESTABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS 8% (M/VTOTAL) COM 50% DE TENSIOACTIVO EM FUNÇÃO DO TEMPO.	154
TABELA 3-1 COMPOSIÇÃO DOS SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS, IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES RADIOQUÍMICAS E COMPORTAMENTOS DE ELUIÇÃO [NEIRIX].	182
TABELA 3-2: EFEITO DO PROCESSO DE NEBULIZAÇÃO NOS VALORES DE ABSORVÊNCIA (ABS.), EM AMOSTRAS DILUÍDAS A 0.5% (P/V) E DE DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS DE [^{99m} Tc]-HMPAO-NSLP. VALORES CORRESPONDENTES ÀS NANOPARTÍCULAS PREPARADAS COM (A) COMPRITOL 888 ATO E (B) COM PRECIROL ATO 5	195
TABELA 3-3: ACTIVIDADE DETECTADA NAS AMOSTRAS COLHIDAS APÓS SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS, DUAS HORAS APÓS INALAÇÃO DE UM AEROSSOL DE [^{99m} Tc]-HMPAO-NSLP DE COMPRITOL@888ATO (N=3; MÉDIA±SD). A ACTIVIDADE CALCULADA FOI EXPRESSA EM PERCENTAGEM DA ACTIVIDADE INALADA POR GRAMA DE TECIDO. A ABREVIATURA N.D. CORRESPONDE A NÃO DETERMINADO.....	201
TABELA 4-1. LÍPIDOS UTILIZADOS NOS ESTUDOS DE SOLUBILIDADE DE PTX E RESPECTIVOS VALORES DE PONTO DE FUSÃO.....	228
TABELA 4-2. COMPOSIÇÃO EM LÍPIDO E TENSIOACTIVO DOS LOTES UTILIZADOS PARA O ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	231
TABELA 4-3: COMPOSIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS LOTES PRODUZIDOS EM TERMOS DE CONCENTRAÇÃO DE PTX EM NSLP A 3% E 6% DE LÍPIDO (M/V) COM BASE NO PRECIROL 5ATO®. TODAS AS FORMULAÇÕES FORAM PRODUZIDAS EM TRIPLICADO.	232
TABELA 4-4: IDENTIFICAÇÃO DAS FRACÇÕES OBTIDAS, APÓS PROCESSAMENTO DA AMOSTRA, NAS QUAIS SE DETERMINA A CONCENTRAÇÃO DE PACLITAXEL.	235
TABELA 4-5: AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA DISSOLUÇÃO DE PTX, TOTAL, PARCIAL E LIGEIRA, EM DIFERENTES LÍPIDOS FUNDIDOS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE PTX/LÍPIDO BASEADA NA OBSERVAÇÃO VISUAL. LEGENDA: A E B - VER TEXTO; N.OBS-NÃO SE OBSERVOU DISSOLUÇÃO DOS CRISTAIS, ND-NÃO DETERMINADO; DEC-DECOMPOSIÇÃO DO LÍPIDO (ACASTANHADO).....	237
TABELA 4-6. CONDIÇÕES ESTABELECIDAS EXPERIMENTALMENTE PARA A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE PTX EM AMOSTRAS DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS.	238
TABELA 4-7. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA REGRESSÃO EFECTUADA NO INTERVALO [1,25; 60] µG/ML. ONDE QM REPRESENTA O QUADRADO MÉDIO E O GL OS GRAUS DE LIBERDADE.	240
TABELA 4-8. VALORES DE DM (NM) E IP OBTIDOS POR PCS, PARA TRÊS LOTES INDEPENDENTES DE CADA FORMULAÇÃO (N=3). EFEITO DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA PARA UMA PERCENTAGEM DE TENSIOACTIVO RELATIVA À MASSA DE LÍPIDO (T/L) DE 50 E 75% (M/M) E UMA CONCENTRAÇÃO DE PTX DE 100µG/ML PARA FORMULAÇÕES COM LÍPIDO A 3% (M/V) OU 200 µG/ML PARA AS DE 6% (M/V).....	244
TABELA 4-9: FORMAÇÃO DE CRISTAIS NO TEMPO EM NSLP A 3% (M/V _{TOTAL}) DE LÍPIDO. TODAS AS PREPARAÇÕES APRESENTAVAM ÀS 72 HORAS AUSÊNCIA DE CRISTAIS (BRANCO). A INTENSIDADE DE	249

TABELA 4-10: BALANÇO DE MASSA PARA AS FRACÇÕES EXTRAÍDAS DAS FORMULAÇÕES 300_3-PTX, 125_3-PTX E 150_3-PTX. CONCENTRAÇÃO OBTIDA PELA QUANTIFICAÇÃO NAS VÁRIAS FRACÇÕES (A) LAVAGEM DE FILTRADO CORRESPONDENTE À DILUIÇÃO DOS CRISTAIS DE PTX RETIDOS (B) FRACÇÃO LIVRE OU SEJA PTX NÃO INCORPORADO, (C) FRACÇÃO INCORPORADA E (E) SOMATÓRIO DAS FRACÇÕES ANALISADAS.....	251
TABELA 4-11: VALORES DOS <i>DM</i> (NM) E <i>IP</i> CALCULADOS PARA AS FORMULAÇÕES A 3 E 6 % DE LÍPIDO PRECIROL ATO5® (N=3), COM AS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES FINAIS DE PTX EM µG/ML. POTENCIAL ZETA (ζ) (MV) DAS NANOPARTÍCULAS COM ETANOL E DAS PTX-NSLP.	253
TABELA 4-12. CÁLCULO DO NÚMERO DE PARTÍCULAS POR ML DE FORMULAÇÃO A 3% DE LÍPIDO PRECIROL® ATO5, UTILIZANDO O MODELO DESENVOLVIDO NO CAPÍTULO 2.	254
TABELA 4-13: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICA (T=24 MESES) DE PREPARAÇÕES COM (NSLP-PTX) E SEM PTX (NSLP). <i>DM</i> -DIÂMETRO MÉDIO, <i>IP</i> -ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE.....	258
TABELA 5-1: ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO E CÓDIGOS ATRIBUÍDOS DURANTE A FASE DE PREVENÇÃO E A DE TRATAMENTO.....	286
TABELA 5-2: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS UTILIZANDO O TESTE DE MTT DE RATO. DILUIÇÕES EM MEIO DE CULTURA A PARTIR DE UMA AMOSTRA COM 9,72 PARTÍCULAS×10 ¹² /ML.	291
TABELA 5-3: (I) PERCENTAGEM DE ANIMAIS POR GRUPO QUE APRESENTOU LESÃO PULMONAR. (II) NÚMERO DE METÁSTASES POR GRUPO.....	296
TABELA 5-4: VALORES DETERMINADOS PARA O VOLUME MÉDIO DE LESÃO NEOPLÁSICA NOS DOIS LOBOS PULMONARES APÓS SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS.	299

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 2-1: CÁLCULO DO ÍNDICE DE RECRISTALIZAÇÃO A PARTIR DO VALOR (J/G) DAS ENTALPIAS CORRESPONDENTES AO LÍPIDO PURO E ÀS NANOPARTÍCULAS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO LÍPIDO (%).	127
EQUAÇÃO 2-2: EQUAÇÃO UTILIZADA PARA CALCULAR O NÚMERO DE PARTÍCULAS EM SUSPENSÃO NUMA AMOSTRA (PN), COM DILUIÇÃO CONHECIDA, ONDE A CORRESPONDE À ABSORVÊNCIA DA AMOSTRA; P REPRESENTA O VALOR DETERMINADO DE DENSIDADE DA AMOSTRA; ϵ - CORRESPONDE À ABSORTIVIDADE ESPECÍFICA; R^3 -RAIO DA PARTÍCULA EM CM E K É A CONSTANTE QUE REPRESENTA $4\pi L/3$, EM QUE L=1CM.	128
EQUAÇÃO 2-3	141
EQUAÇÃO 2-4	142
EQUAÇÃO 3-1	183
EQUAÇÃO 3-2	183
EQUAÇÃO 3-3	189
EQUAÇÃO 3-4	190
EQUAÇÃO 4-1	235
EQUAÇÃO 4-2	262
EQUAÇÃO 5-1	284

ABREVIATURAS

DDS	<i>Drug Delivery System</i>
D _{ina}	Dose inalada
DL50	Dose Letal 50%
dm	Diâmetro Médio
DSC	Calorimetria Diferencial de Varrimento
EHL	Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo
EI%	Eficiência de Incorporação
EPR	Efeito de Permeação e Retenção
FP 8	Farmacopeia Portuguesa 8
HER	Receptor endothelial humano
HI	Índice Hidroxilo
HPH	Homogeneização a alta Pressão
Ip	Índice de Polidispersão
IR%	Índice de Cristalinidade
ITLC	Cromatografia em camada fina
LD	Limite de detecção
LOF	Falta de Ajustamento
LQ	Limite de Quantificação
LS	Difração <i>Laser</i>
MA's	Macrófagos Alveolares
MPS	Sistema Fagocitário Mononuclear
Mtb	Microtúbulos
MXT-B2	Variante de adenocarcinoma mamário de ratinho
nm	Nanometro
NLC	Transportadores Nanoestruturados
Np	Número de Partículas
nsLp	Nanopartículas Lipídicas Semisólidas
nsLp-Ptx	Ptx associado a nsLp
OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão fosfato salino
PCS	Espectroscopia de Correlação Fotónica
PEG	Polietilenoglicol
P-gp	Glicoproteína P
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)

Ptx	Paclitaxel
ROI	Regiões de Interesse
SEDDS	<i>Self Emulsified Drug Delivery Systems</i>
SLN	Nanopartículas de Lípidos Sólidos
SMEDDS	<i>Self Microemulsified Drug Delivery Systems</i>
SPA	Partículas Ultrafinas
T/L	Razão tensoactivo/Lípido
TEM	Microscopia Electrónica de Transmissão

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor António Almeida, expresso o meu agradecimento, por me ter dado esta oportunidade, pela sua constante disponibilidade, por ter criado condições para que o trabalho pudesse ser realizado, pela amizade e confiança sempre demonstradas.

À Doutora Angels Fabra, do Institut de Recerca Oncològica, do Hospital Duran Reynolds de Barcelona, o meu agradecimento pela possibilidade dada para executar uma fase fundamental deste trabalho. Pelo contributo científico, apoio inestimável e enorme amizade.

Ao Professor Doutor Luís Gouveia, quero expressar o meu profundo agradecimento pelo contributo imprescindível na análise estatística dos resultados aqui apresentados. Pelas horas incontáveis de discussão científica, pelo incentivo constante e pelo privilégio da sua amizade.

À Doutora Ana Cristina Santos, da FMUC-IBILI, pela indispensável colaboração na manipulação e procedimentos cirúrgicos nos animais, pelo apoio nos ensaios cintigráficos e pela total disponibilidade e amizade com que sempre se prontificou a receber-me, quero expressar o meu agradecimento.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Directora do Instituto de Biofísica/Biomatemática da FMUC-IBILI, não posso deixar de agradecer pelas facilidades concedidas e pela colaboração no desenvolvimento do projecto.

À Professora Doutora Maria dos Anjos e Professora Doutora Lurdes Gano do Instituto Tecnológico e Nuclear de Sacavém, gostaria de expressar o meu agradecimento pelas facilidades concedidas e discussões científicas.

À Doutora Eugénia Cruz e a todo o Grupo do INETI, o meu reconhecimento pela forma como disponibilizaram as instalações, pelas discussões científicas e pelos bons momentos que temos passado em comum.

Aos meus colegas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e do Institut de Recerca Oncològica do Hospital Duran Reynolds de Barcelona, pelo apoio e colaboração ao longo dos anos.

Aos meus alunos, alguns já colegas, pelo carinho com que enchem os meus dias e por me lembrarem que é ao serviço deles que me sinto realizada profissionalmente. Gostaria de agradecer especialmente à Helena Florindo, à

Rita Campos, ao Pedro Crisanto, ao Rodrigo Feliciano, à Marta Soares, à Maria João Pires, à Cláudia Oliveira, ao Daniel Brás, à Filipa Coelho e ao grupo das galinhas Sílvia, Inês, Joana e Nila.

Ao Fernando, ao Gonçalo e à Mariana, porque é na família que vamos buscar a força para suportar todas as adversidades e a alegria para viver intensamente todos os momentos da nossa vida.

À minha família, em particular aos meus pais e irmãos, pelo carinho constante e pelo apoio incondicional. Ao meu Pai em especial por me mostrar que ser Professor é um modo de vida.

Aos amigos, especialmente o P. Carlos Paes, o P. Manuel Vaz Pato, o P. Alberto Brito, a Maria Isabel Costa e Moura, a Suzana Dias Costa, à equipa de casais, ao grupo do Fórum e a todos os amigos do Colégio S. João de Brito fica aqui o meu muito obrigado, porque nós somos a imagem do que são as nossas relações.

À Rosário Lobato e à Ivone pelo carinho com que me mimam, pela amizade e pelo incentivo constante.

A todos os que me apoiam a mim e à minha família, a D. Henriqueta, a D. América, a Fernanda Canha, a Odete e a Nena, o meu muito obrigado pela dedicação e amizade.

À D. Fernanda Oliveira, pela alegria com que nos brinda todos os dias, por ser especial, e por tornar tudo possível, o meu muito obrigado.

A todos aqueles, que directa ou indirectamente, tornaram possível a execução deste projecto, o meu profundo reconhecimento.

RESUMO DA TESE

Assistimos no último século a um dos mais devastadores combates enfrentados pelo homem: a luta contra o cancro. O desenvolvimento tecnológico e a convergência de diversas áreas de investigação não têm sido suficientes para vencer este desafio, em particular, no que se refere às neoplasia pulmonares.

O paclitaxel representa um dos mais potentes agentes antineoplásicos a ser utilizado na prática clínica. O valor de índice terapêutico deste fármaco está, no entanto comprometido, pela toxicidade sistémica a ele associada.

O conceito de vectores coloidais é lato no que se refere à natureza química da matriz. A possibilidade de explorar diferentes tipos de matrizes é actualmente objecto de grande interesse, razão pela qual têm sido desenvolvidas formulações de paclitaxel em diversos transportadores coloidais.

O desenvolvimento de nanopartículas lipídicas, como vectores selectivos, traduz o interesse inerente ao estudo de alternativas terapêuticas, com especial referência para a modificação da biodistribuição do fármaco livre, constituindo este o objectivo do presente trabalho.

A possibilidade de serem adaptados a diversas vias de administração e o facto de estarem indicadas para veicular um número representativo de compostos entre proteínas, péptidos, agentes de imagiologia, fármacos, sequências de genes e DNA, indica que os sistemas com base em material de natureza lipídica, podem ser promissores para a veiculação selectiva de fármacos.

Os sistemas de veiculação de fármacos desenvolvidos neste trabalho são constituídos por partículas lipídicas de diâmetro nanométrico, com propriedades adaptadas à nebulização. As características físico-químicas das nsLp devem ser optimizadas no sentido de produzir um aerossol que apresente um padrão de deposição pulmonar, que abranja a região alveolar, e cuja a fracção respirável retida nos pulmões, ao ser objecto de um ou mais mecanismos de eliminação de partículas, venha a ser captada pelo sistema linfático.

A administração pulmonar e linfática, centrada de forma mais particular na região do pulmão profundo e no espaço intersticial pulmonar, associada ao linfotropismo das partículas coloidais, serão objecto de estudo com vista ao desenvolvimento de alternativas terapêuticas na doença oncológica.

A utilização de lípidos constituídos por triacilgliceróis tem implicações práticas importantes, nomeadamente no que respeita à internalização celular. De facto, com a utilização destes lípidos, a absorção pode estar facilitada ao nível das mucosas e do epitélio, uma vez que o carácter lipídico destes vectores e as dimensões submicrométricas das partículas que os constituem conferem-lhes uma maior capacidade de penetração nas membranas biológicas.

Consequentemente, esta disponibilidade de fármaco dentro da célula pode concorrer para aumentar de forma significativa a concentração de Ptx no seu interior, o que será um contributo relevante para o aumento do valor do índice terapêutico deste fármaco.

THESIS ABSTRACT

Lung chemotherapy, so far, presents low efficacy and lung cancer remains a leading cause of death each year. Clinical trials have been focused on intravenous administration, however advances in this field are needed, namely alternative administration routes.

Paclitaxel is an insoluble potent anticancer drug with activity against a several types of solid tumours in the breast, ovary, brain, and lung cancer, having stimulated an intense research effort over recent years. Solid lipid nanoparticles are potential carriers of protein antigens, being alternative biodegradable systems to the usual colloidal carriers, such as emulsions, liposomes and polymeric micro and nanoparticles. Due to their composition, they can combine protection of active ingredients against chemical and physical degradation, while reducing toxicity of several potent drugs, minimizing side effects and enhancing efficacy. Furthermore, lung administration will provide target administration which is expected to avoid high concentration of the drug at non-target tissues, reducing toxicity and increasing the therapeutic index.

Solid Lipid Nanoparticles (nsLp), which have been proposed as alternative colloidal drug carriers in human medicine, may be used to deliver anticancer drugs to the lungs and seem to fulfill the requirements for an optimum particulate carrier system. The present work was devised to study the possibility of producing stable paclitaxel-containing nanoparticles for inhalation purposes. Producing parameters were evaluated by their influence in particles physical characteristics such as surface morphology, particle size, zeta potential and entrapment efficiency. Long-term stability and in vitro studies were also performed.

The purpose of this study was to deliver a colloidal system to the lung lymphatics or for both medical imaging and cancer therapy. Hence, the lung administration of lipid nanoparticles followed by their in vivo distribution and effectiveness of anticancer drug delivery was evaluated.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Veiculação de fármacos e nanomedicina

O conceito de nanomedicina engloba diversas áreas científicas, como a nanotecnologia e a nanotoxicologia, às quais se associa a investigação e o desenvolvimento de nanoestruturas orgânicas ou inorgânicas bem como o estudo das interações destas com os organismos vivos. Os *drug delivery systems* (DDS) ou sistemas de veiculação de fármacos constituem uma área transversal a este universo e representam um dos focos intensamente explorados pela comunidade científica.

A crescente evolução em áreas da biologia molecular, como a genética e a imunologia, tem vindo a clarificar um número considerável de vias metabólicas essenciais, bem como a estrutura de moléculas e macromoléculas intervenientes. Consequentemente, os sistemas de veiculação podem, como potenciais transportadores de moléculas capazes de interagir com estes mecanismos, representar um importante contributo para a transferência de tecnologia da investigação até à prática terapêutica.

Sistemas de partículas coloidais, entre os quais se destacam as nanopartículas poliméricas, os sistemas micelares poliméricos, nanopartículas lipídicas e sistemas lipossomais, encontram na nanomedicina várias aplicações, nas quais é possível incluir o transporte selectivo de fármacos, a terapêutica imunológica, a imagiologia e o diagnóstico (Moghimi *et al.* 2005).

Em oncologia, especialmente no que diz respeito ao tratamento selectivo do tecido neoplásico, a aplicabilidade destas ferramentas à escala nanométrica traduz-se no desenvolvimento de sistemas coloidais para o transporte de agentes terapêuticos ou imagiológicos (Brannon-Peppas & Blanchette 2004; Heath & Davis 2008; Nie et al 2007; Zhang et al 2007).

Nas últimas décadas, devido a uma política intensa de pesquisa de novas moléculas activas e novos alvos terapêuticos, numerosos agentes anti-neoplásicos têm sido descobertos. Contudo, a sua utilização clínica permanece comprometida, não apenas devido à toxicidade da generalidade das moléculas com actividade citotóxica, mas também e não menos importante no caso de activos bioterapêuticos, pelas dificuldades relacionadas com o seu comportamento *in vivo*. A falta de selectividade relativamente à célula neoplásica, associada à utilização generalizada da via de administração sistémica, são factores que contribuem para as limitações da aplicabilidade de moléculas inovadoras, desenvolvidas nos últimos anos. Estes obstáculos e, sobretudo, a preocupação de restringir a acção farmacológica às células-alvo, contribuem para a urgência de encontrar novos sistemas terapêuticos que permitam uma aplicação clínica.

1.1.1. Sistemas de veiculação de fármacos

Em nanotecnologia, a noção de transportador abrange o desenvolvimento de dispersões de partículas submicrométricas, com capacidade para incorporar agentes terapêuticos ou imagiológicos (Portney & Ozkan 2006). Esta área tem crescido continuamente nas últimas décadas, mas apesar disso poucos sistemas de veiculação de fármacos estão actualmente aprovados para uso clínico.

A utilização de sistemas de partículas à escala nanométrica está fortemente dependente da sua capacidade de incorporar fármacos e da possibilidade de, após administração, os direccionar de forma selectiva (Moghimi *et al.* 2005). Por outro lado, as características físico-químicas da molécula a incorporar e o alvo biológico que se pretende atingir condicionam as opções em termos de matéria-prima de partida, bem como as técnicas de preparação que permitam obter dispersões coloidais.

Não obstante a diversidade de sistemas desenvolvidos, as dimensões submicrométricas da entidade dispersa, que é um parâmetro comum entre todos, concorrem para um elevado incremento da área de superfície, contribuindo para as propriedades únicas das dispersões coloidais. Nestes sistemas, a estabilidade depende da cinética de equilíbrio interação-repulsão, que se estabelece entre as partículas carregadas e entre estas e o meio que as rodeia (Florence & Attwood 2006; Heurtault *et al.* 2003b; Rojas *et al.* 2002). Na Tabela 1-1, estão enumerados fenómenos relativos ao tipo de interação que se estabelece entre partículas e que permitem obter a estabilidade de um sistema de partículas coloidais em fase dispersa.

Tabela 1-1: Fenómenos relacionados com as interações entre partículas que influenciam a estabilidade das suspensões coloidais.

Forças electrostáticas	Repulsão entre partículas com a mesma carga de superfície
van der Waals	Interações fracas entre dipólos induzidos ou permanentes
Volume de exclusão	Área em torno da partícula onde não é possível a permanência de outras entidades
Entropia do sistema	Maior estabilidade no estado de máxima entropia
Movimento Browniano	Mantém as partículas em suspensão
Solvatação	Alterações na fracção de solvente à superfície das partículas

Um aspecto importante das dispersões coloidais relaciona-se com a carga eléctrica da interfase. Este fenómeno não decorre da natureza das matérias-primas: após dispersão em fase aquosa, as partículas adquirem cargas à superfície, pelo que a interfase resultante de um sistema bifásico assume geralmente propriedades de um campo eléctrico (Florence & Attwood 2006; Klein & von Gruenberg 2001). Por este motivo, as partículas

constituintes de uma dispersão coloidal tendem a comportar-se como macroiões, espécies com diferente química de superfície, o que contribui para que os colóides apresentem atributos particulares (Messina *et al.* 2002b).

Uma das propriedades que distingue as dispersões coloidais é a estabilidade em solução aquosa, a qual, embora apoiada pela teoria de DLVO, não é por ela totalmente explicada (Grasso *et al.* 2002a; Russ *et al.* 2002). De facto, a massa das partículas coloidais é mínima, pelo que a energia cinética na interfase não é suficiente para contrariar as repulsões electrostáticas entre as cargas de superfície. No microambiente que envolve a partícula, não se verifica o decaimento da densidade de cargas em função do intervalo da distância, ao contrário do que é comum nos sistemas dispersos convencionais (Grasso *et al.* 2002a). Como a área de superfície é largamente superior à massa da partícula, a contribuição desta para a densidade de cargas superficiais é pouco relevante.

Neste caso, a partícula como entidade individual só é relevante na medida em que se encontra na vizinhança de outra de iguais características. Deste modo, o comportamento de um sistema coloidal, sobretudo em dispersões líquidas, é dominado pelo efeito de rede que daí advém, ao qual se soma a contribuição do volume de exclusão, subsequente à proximidade entre as partículas (Messina *et al.* 2002a). A imagem da Figura 1-1 corresponde à simulação de uma partícula coloidal e do microambiente que a envolve.

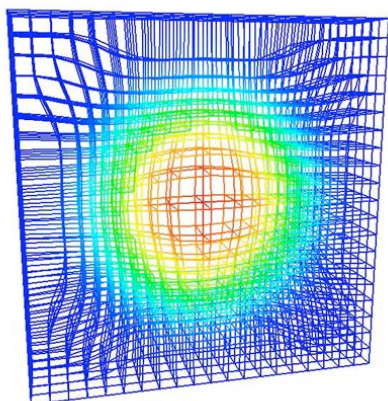


Figura 1-1: Representação esquemática de uma partícula coloidal e do microambiente electroquímico à superfície. A concentração de cargas à superfície da partícula confere a estas partículas propriedades semelhantes às dos macroiões em solução. Disponível em: www.mrsec.harvard.edu/research/IRG_3.html (acedido em 02/01/08).

Estas propriedades físicas, que se manifestam diâmetro-dependentes, consubstanciam em conjunto a existência de estados da matéria supranormais, como os sólidos *supercooled* (Blumer & Mader 2005), os cristais líquidos (Rizwan *et al.* 2007) ou estruturas metaestáveis (Hidalgo-Álvares *et al.* 1996; Roke *et al.* 2006). Hoogenboom e colaboradores (2002), ao estudarem o comportamento de sistemas coloidais, verificaram que nos casos em que ocorre cristalização a partícula comporta-se como uma estrutura estratificada, em que as diferentes camadas transitam por estados metaestáveis de forma independente (Hoogenboom *et al.* 2002). De uma forma geral, o aparecimento destas formas pode ser desencadeado por situações onde há mudanças de fase, como por exemplo durante uma ou mais etapas da preparação do sistema, acompanhadas na maioria dos casos pela formação de uma estrutura tridimensional ordenada, passível de ser caracterizada (Messina *et al.* 2001).

Outro aspecto relevante das partículas coloidais prende-se com o tipo de interacção com os sistemas biológicos, dado que a natureza do material-base, a carga de superfície e a dimensão da entidade dispersa influenciam especificamente a retenção, a absorção, a metabolização e a eliminação destes sistemas, ou seja, o seu comportamento *in vivo* (Messina *et al.* 2000). A diversidade e particularidades estruturais são a base para a aplicação dos sistemas coloidais em nanomedicina, particularmente na área da veiculação selectiva de fármacos (Barratt 2000; Hidalgo-Álvares *et al.* 1996; Wilbur *et al.* 1998).

Em suma, os colóides têm tido um papel significativo em áreas científicas distintas, da nanomedicina à biofísica, entre os quais se destacam o papel dos nanotubos de carbono (Tomblor *et al.* 2000), das cápsulas multicamada de polielectrólitos (Antipov & Sukhorukov 2004) e dos cristais líquidos (Haag 2004).

a. O sistema coloidal como base para veiculação de fármacos

Os sistemas de veiculação de fármacos constituem uma opção onde a nanotecnologia pode estar ao serviço da nanomedicina (Heath & Davis 2008; Kawasaki & Player 2005; Wang *et al.* 2007).

Ao desenvolver sistemas selectivos de veiculação de moléculas com actividade terapêutica, a comunidade científica pretende resolver duas questões. Por um lado, o transportador *per se* constitui uma barreira física e química que protege a molécula, no seu interior ou aprisionada na matriz, da degradação enzimática própria dos mecanismos fisiológicos. Por outro, poder-se-á direccionar o transportador e com isso restringir a actividade farmacológica ao órgão-alvo, limitando os efeitos adversos que podem advir da administração da forma livre (Ferrari 2005b; Gregoriadis 1977; Majeti & Kumar 2000). Este efeito é especialmente importante em oncologia, onde um elevado número de fármacos antineoplásico é, pelas suas características farmacológicas, potencialmente tóxico para células e órgãos saudáveis (Nie *et al.* 2007).

O grau de acumulação de actividade farmacológica no tecido-alvo, decorrente da incorporação e direccionamento de fármacos em matrizes coloidais, traduz-se em alterações sobre o valor do índice terapêutico da forma livre, especialmente importante no caso de agentes antineoplásicos (Guenca *et al.* 2006; Heath & Davis 2008). Aparentemente, esta situação surge em consequência das alterações na biodisponibilidade do fármaco, relacionadas sobretudo com a permeabilidade de tecidos lesados a partículas coloidais e com a facilidade destas em atravessar as membranas dos compartimentos celulares (Barratt 2000; Iyer *et al.* 2006; Torchilin 2006b). Adicionalmente, as partículas submicrométricas tendem a permanecer em circulação após administração intravenosa, uma vez que a eliminação renal está reservada a moléculas capazes de difundir pelo endotélio vascular. Os mecanismos envolvidos na exclusão de partículas do compartimento vascular contemplam a extravasão em regiões de vasculatura irregular, a degradação enzimática ou a fagocitose pelos macrófagos circulantes (Alonso 2004; Maeda *et al.* 2000; Nie *et al.* 2007).

A natureza das matérias-primas de suporte constitui um aspecto essencial no que se refere à capacidade de, após administração, direccionar o fármaco para alvos específicos. De facto, a estrutura destas partículas reflecte as suas capacidades de ultrapassar as membranas biológicas e condiciona as vias de administração possíveis (Ferrari 2005b; Mäder 2006; Moghimi *et al.* 2005; Torchilin & Trubetskoy 1995; Vasir & Labhassetwar 2007).

No final do século passado, o recurso a materiais poliméricos alternativos e biodegradáveis, assim como a intensa investigação desenvolvida com lipossomas, desencadearam o aparecimento de um elevado número de matrizes onde é possível incorporar fármacos (Torchilin 2006a). Esta multiplicidade produziu avanços notáveis na área dos sistemas de libertação controlada (Block 1989; Hillery *et al.* 2001; Kreuter 1994; Soppimath *et al.* 2001).

É vasta a natureza dos materiais disponíveis para desenhar matrizes biocompatíveis, susceptíveis de ser utilizados em tecnologia farmacêutica. Entre estes, destacam-se os materiais de natureza lipídica, que devem a sua importância ao facto de serem constituintes naturais dos organismos vivos, nos quais se apresentam sob diferentes formas e, por essa razão, desempenham funções diversas (Davis 2004; Fahy *et al.* 2005).

Em suma, o potencial de um transportador coloidal está relacionado com a organização da matriz que o constitui e com a capacidade deste em:

- não ser reconhecido pelo sistema imunológico;
- atingir selectivamente a região lesada;
- estar disponível durante um período de tempo adequado;
- libertar no tempo uma concentração terapêutica de fármaco;
- alterar o índice terapêutico dos fármacos a ele associados;
- proteger o fármaco da degradação enzimática.

1.1.2. Formulações lipídicas

Os lípidos, nomeadamente os triglicéridos e os fosfolípidos, têm vindo a suscitar uma atenção crescente dos meios científicos, dada a sua capacidade única de atingir compartimentos biológicos, incluindo a passagem pela barreira hemato-encefálica e a sua particular afinidade para o sistema linfático (Charman 2000; Humberstone & Charman 1997; O'Driscoll 2002; Porter & Charman 1997). Transportadores de natureza lipídica tais como as microemulsões (Lawrence 1996; Zhang *et al.* 2006), os SEDDS (Self-emulsifying drug delivery systems) (Bottle 2000), os lipossomas (Allen 1997a; Sharma *et al.* 1997), as liposferas (Perkins *et al.* 2000a), os NLC

(*Nanostructure Lipid Carriers*) (Souto & Müller 2007) e as SLN (*Solid Lipid Nanoparticles*) (Mehnert & Mader 2001; Muller *et al.* 2000; Westesen 2000; Wissing *et al.* 2004), são actualmente objecto de investigação, para fazer face a desafios em áreas diversas da nanomedicina, tais como a terapêutica direccionada, a reconstituição de tecidos, a imagiologia ou a terapia génica (Hou *et al.* 2003; Wissing *et al.* 2004; Zhang 2003).

A utilização de lípidos sólidos, nomeadamente os constituídos maioritariamente por triacilgliceróis, na preparação de partículas coloidais para a incorporação de fármacos pouco solúveis surge como alternativa aos materiais convencionalmente utilizados, como sejam os polímeros, os fosfolípidos, os tensoactivos e os lípidos líquidos (Bunjjes & Siekmann 2006; Davis 2004; Stuchlik & Zak 2001).

Dois aspectos fundamentais estão relacionados com a natureza lipídica destes transportadores: a tendência para apresentar linfotropismo e a cristalinidade da matriz. O linfotropismo assume um papel relevante em patologias onde há envolvimento do sistema linfático. Esta característica, embora mais pronunciada para triacilgliceróis de cadeia longa, também se revela em misturas de mono, di e triacilgliceróis de cadeia média (O'Driscoll 2002; Porter & Charman 2001).

As características dos acilgliceróis, especialmente no que diz respeito à sua cristalinidade, são determinadas pelos ácidos gordos que os constituem (Weil 1983). No entanto, a formação de cristais em preparações farmacêuticas com base em lípidos está dependente da presença dos chamados agentes plastificantes, entre os quais se encontra a água e os tensoactivos adicionados, bem como das mudanças de fase que ocorrem durante a preparação. Adicionalmente, a complexidade dos sistemas nanoestruturados influencia fortemente as características finais da matriz, exibindo estas propriedades distintas dos sistemas que, tendo a mesma composição, apresentam maiores dimensões de partícula. A interacção do fármaco com a estrutura formada e a mobilidade das moléculas no seu interior dependem de todos estes factores (Bekerman *et al.* 2004; Kuntsche *et al.* 2004; Muller-Goymann 2004).

De uma forma geral, dois mecanismos podem estar subjacentes à incorporação de fármacos na matriz ou partícula: a interacção física ou a

ligação química. Não importa aqui considerar a ligação química, covalente ou iónica, mais relacionada com o desenvolvimento de novas moléculas ou pró-fármacos. Pelo contrário, as interacções físicas são o principal mecanismo de ligação entre um fármaco e a matriz que lhe serve de suporte, quando consideramos sistemas de partículas ou conjugados de macromoléculas.

1.2. Dispersões coloidais de lípidos sólidos

O conceito de dispersões de lípidos sólidos é recente e o seu desenvolvimento causou grande expectativa ao nível da nanotecnologia, não apenas para os fármacos em geral, mas sobretudo pela sua adequabilidade aos compostos bioterapêuticos (Mäder & Mehnert 2004). Podemos resumir estes sistemas como uma dispersão lipídica que resulta, de uma forma geral, da homogenização de duas fases imiscíveis, uma constituída por um ou mais lípidos previamente fundidos ou dissolvidos em solvente apropriado e uma segunda fase que inclui uma solução aquosa de tensoactivo. Deste procedimento resultam sistemas de partículas sob a forma de SLN, NLC e nsLp (*nanosemisolid lipid particles*), estas últimas objecto do presente estudo (Mäder & Mehnert 2004; Muller *et al.* 2002; Souto & Muller 2005; Videira *et al.* 2002b; Wissing *et al.* 2004). O diâmetro submicrométrico e os componentes maioritariamente envolvidos na preparação destas partículas água, lípido e tensoactivo determinam a biocompatibilidade destes sistemas e a previsível facilidade em transpor as barreiras celulares (Mäder & Mehnert 2004; Mehnert & Mader 2001).

A investigação nesta área pode ser dividida em duas fases: a primeira na década de noventa, período em que se tentam harmonizar procedimentos no que respeita à preparação e caracterização das nanopartículas, e uma segunda fase no virar do século, que surge na sequência das informações obtidas acerca da estrutura cristalina das mesmas. De facto, no início dos anos noventa foram publicadas três patentes referentes a um novo transportador coloidal – as nanopartículas de lípidos sólidos (SLN) – tendo como base a preparação por homogeneização por alta pressão (HPH) (Domb & Maniar 1993; Müller & Lucks 1996; Speiser 1990).

Os grupos orientados por Westesen e por Müller marcaram a primeira fase, onde se destacou o empenho no desenho e caracterização de partículas submicrométricas. De facto, centrados na preparação de suspensões coloidais, produzidas a partir de lípidos sólidos formados por misturas de mono-, di- e triacilgliceróis, desenvolvem um transportador coloidal universalmente aceite, as SLN (Muller *et al.* 1997; Muller *et al.* 2000; Muller *et al.* 1995; Siekmann & Westesen 1992). O processo inicialmente descrito, HPH em processo a quente ou, alternativamente, a preparação a frio, originava formulações constituídas por partículas de diâmetros submicrométricos, o que as tornava indicadas para qualquer via de administração (Schwarz *et al.* 1994; Westesen 2000). No entanto, as dispersões de nanopartículas de lípidos sólidos já haviam sido descritas anteriormente por outro grupo de investigação (Gasco 1993; Gasco 1997). Este último foi desenvolvido com base nos métodos de preparação de sistemas micelares e, portanto, na base está a correspondência entre a concentração de tensoactivo e o tamanho de partícula (Cavalli *et al.* 1996; Gasco 1993).

Em simultâneo, numerosos investigadores concentram os seus estudos, fundamentalmente, na caracterização da estrutura matricial e nos aspectos relacionados com a cristalinidade das partículas lipídicas, após fusão e homogeneização por HPH (Siekmann & Westesen 1992; Siekmann & Westesen 1994; Westesen & Bunjes 1995; Westesen *et al.* 1993). Destes estudos, resultam as primeiras conclusões acerca da cristalinidade parcial da matriz e da existência de estados *supercooled*, nos quais a fase lipídica pode permanecer por tempo indeterminado. A partir deste ponto, à preparação de nanopartículas lipídicas está subjacente a sua total caracterização e a determinação da influência dos parâmetros relativos à composição e ao processo, nas características das nanopartículas em suspensão (Mehnert & Mader 2001; Westesen 2000).

As suspensões coloidais de lípidos sólidos, aparentemente matrizes cristalinas, foram desenvolvidas com o objectivo de aprisionar o fármaco durante o arrefecimento ou evaporação de solvente e, em consequência, poder vir a controlar a sua libertação após administração (Muller *et al.* 1995; Westesen *et al.* 1997b; zur Muhlen *et al.* 1998).

Ainda que adequados à veiculação de uma diversidade alargada de moléculas activas, os primeiros trabalhos envolveram sobretudo a incorporação de proteínas e péptidos, passando mais tarde a abranger um vasta gama de substâncias com actividade terapêutica, como se pode ver na Tabela 1-2.

Tabela 1-2: Trabalhos publicados sobre incorporação de compostos com actividade terapêutica ou de diagnóstico em nanopartículas lipídicas.

Péptidos e proteínas	(Almeida <i>et al.</i> 1997; Siekmann & Westesen 1995) (Cavalli <i>et al.</i> 1999a; Videira <i>et al.</i> 1998) (Garcia-Fuentes <i>et al.</i> 2003; Videira <i>et al.</i> 2002a) (Hu <i>et al.</i> 2004; Tabatt <i>et al.</i> 2004)
<u>Fármacos</u>	(zur Muhlen & Mehnert 1998) (Yang <i>et al.</i> 1999) (Cavalli <i>et al.</i> 1999b) (Cavalli <i>et al.</i> 2002) (Cavalli <i>et al.</i> 2000b) (Jenning <i>et al.</i> 2000b) (Bunjes <i>et al.</i> 2001) (Hu <i>et al.</i> 2002) (Videira <i>et al.</i> 2002b; Zara <i>et al.</i> 2002b) (Cavalli <i>et al.</i> 2003) (Hou <i>et al.</i> 2003) (Lim <i>et al.</i> 2004) (Lamprecht <i>et al.</i> 2004) (Kuntsche <i>et al.</i> 2004; Sivaramakrishnan <i>et al.</i> 2004) (Castelli <i>et al.</i> 2005; Souto <i>et al.</i> 2004) (Pandey & Khuller 2005) (Pandey <i>et al.</i> 2005) (Manjunath & Venkateswarlu 2005; Souto & Muller 2005) (Luo <i>et al.</i> 2006; Muller <i>et al.</i> 2006) (Jee <i>et al.</i> 2006; Kumar <i>et al.</i> 2007)
DNA	(Erni <i>et al.</i> 2002; Pedersen <i>et al.</i> 2006)
Agentes antineoplásicos	(zur Muhlen <i>et al.</i> 1998) (Fundaro <i>et al.</i> 2000) (Videira <i>et al.</i> 2000) (Cavalli <i>et al.</i> 2000a) (Serpe <i>et al.</i> 2004) (Zara <i>et al.</i> 2002b) (Harivardhan & Murthy 2005; Harivardhan <i>et al.</i> 2005) (Fontana <i>et al.</i> 2005) (Lu <i>et al.</i> 2006)

O primeiro produto industrial a chegar ao mercado, um complexo de SLN-ciclosporina, foi desenvolvido e patenteado por Muller e colaboradores (Muller *et al.* 2006). Este grupo, assumiu um papel fundamental na transposição de escala destas formulações, não apenas pela optimização do processo de produção mas também pelos estudos de estabilidade durante o armazenamento, esterilização e liofilização do produto final (Freitas & Muller 1998; 1999; Muller *et al.* 2000; Schwarz *et al.* 1994).

Inúmeras aplicações têm sido consideradas para as nanopartículas lipídicas, no entanto, a sua utilização está fundamentalmente relacionada com o desenvolvimento de veículos coloidais para terapêutica direccionada (Tabela 1-2). Em função da molécula retida por interacções físicas, no seu reticulado ou à superfície da partícula, estes sistemas podem ainda ser utilizados como agentes imagiológicos, como suporte de agentes de vacinação, em produtos veterinários, na indústria de cosméticos, entre outros.

As nanopartículas de lípidos sólidos podem ser definidas como entidades individuais, constituídas por um reticulado compacto que forma uma matriz de estrutura e densidade variável, de diâmetro sub-micrométrico, apresentando cada entidade características de superfície particulares (Mäder 2006; Mehnert & Mader 2001; Siekmann *et al.* 2002).

Relativamente às suspensões de nanopartículas sólidas, a natureza coloidal que lhes está subjacente permite antecipar a sua estabilidade, com base em eventos electroquímicos que se desenrolam na vizinhança da superfície das partículas e que, em última análise, justificam o equilíbrio que se estabelece entre elas (Barret 2004; Grasso *et al.* 2002b; Heurtault *et al.* 2003b; Kokkoli & van Swol 1998; Petris *et al.* 2003). Adicionalmente, nestas suspensões o movimento Browniano, característico das partículas submicrométricas, retarda o processo de sedimentação, contribuindo também para a elevada estabilidade destes sistemas.

Apesar do anteriormente exposto, factores como a adsorção de moléculas activas, a existência de um filme de tensioactivo à superfície da partícula e o estado da matéria em que a matriz se encontra podem alterar as propriedades do sistema e o seu comportamento *in vivo* (Heurtault *et al.* 2003a).

Os sistemas de lipídicos de veiculação de fármacos e as nsLp em particular, são constituídos por excipientes farmacêuticos, vulgarmente utilizados na tecnologia de formas sólidas e semi-sólidas, cuja compatibilidade biológica está há muito estabelecida. A avaliação da presença de mediadores inflamatórios em culturas de macrófagos peritoneais de ratinho, como resposta à presença de nanopartículas lipídicas, confirmou que estes não induzem processos inflamatórios nem mecanismos imunológicos (Scholer *et al.* 2002). De facto, os lípidos utilizados para o desenvolvimento destes sistemas são acilgliceróis ou ceras, sólidos à temperatura ambiente que, dada a sua lipofilia, constituem sistemas adequados sobretudo ao transporte de macromoléculas ou substâncias activas fracamente hidrosolúveis (Jenning & Gohla 2000; Jennings *et al.* 2000c). Uma selecção cuidadosa destes excipientes-base, permite preparar partículas de características adequadas ao fármaco a incorporar e à via de administração a ser utilizada (Mehnert & Mader 2001).

O número de lípidos disponíveis e as possíveis combinações lípido/tensioactivo reflectem-se numa enorme diversidade de formulações, mas implicam igualmente diferenças estruturais relevantes. Deste modo, torna-se necessária a avaliação, após preparação e ao longo do tempo, de parâmetros físico-químicos, como o diâmetro médio (dm), a carga de superfície, o estado de cristalinidade da matriz e a concentração de fármaco incorporado (Jores *et al.* 2004b; Kuntsche *et al.* 2004).

Os estudos efectuados inicialmente indicavam, de uma maneira geral, que as SLN mantêm as suas características físicas ao longo do tempo (Freitas *et al.* 1994; Freitas & Muller 1999). Todavia, dois importantes fenómenos de instabilidade foram observados nestes sistemas: a formação de uma estrutura tipo gel e a expulsão do fármaco ao longo do tempo (Pietkiewicz *et al.* 2006; Westesen 2000; Westesen & Siekmann 1997). Aparentemente existe uma interligação entre eles, uma vez que as transições polimórficas que a matriz sofre durante a recristalização podem ser responsáveis pela expulsão das moléculas de fármaco à medida que se forma uma estrutura ordenada (Pietkiewicz *et al.* 2006). De facto, a mistura final, quando instável, adquire o referido aspecto gelificado, sendo este fenómeno também

influenciado pelas condições de armazenagem (Freitas & Muller 1998; 1999; Westesen & Siekmann 1997).

Embora a cristalinidade das nsLp constitua o ponto sobre o qual convergem os atributos destes sistemas, esta característica poderá estar condicionada pelas propriedades da matéria durante a fusão e pelos fenómenos de polimorfismo durante o arrefecimento. Um dos fenómenos universalmente aceite no comportamento de sólidos após fusão é a sua tendência para permanecer *supercooled* após arrefecimento, por períodos de tempo mais ou menos prolongados (Demo *et al.* 2003). A recristalização, a presença de polimorfos, assim como a existência de um estado *supercooled* das dispersões lipídicas coloidais, correspondem a variações no comportamento térmico relacionadas com o *dm* das partículas, com a presença de agentes tensioactivos e com a natureza do fármaco incorporado (Bunjes *et al.* 2001; Bunjes *et al.* 2000; Bunjes *et al.* 2002; Westesen *et al.* 1997a). A influência na estrutura final de SLN's, decorrente do processo de preparação ou da composição do sistema, foi extensivamente estudada pelo grupo de Karsten Mäder, o qual estabeleceu que, em determinadas combinações lípido/tensioactivo, há tendência para os lípidos fundidos permanecerem líquidos por longos períodos de tempo (Blumer & Mader 2005; Mehnert & Mader 2001). Também Kuntsche e colaboradores (2005) deram um importante contributo nesta matéria, ao demonstrar que os fenómenos térmicos observados, quando se utilizam combinações de lípidos, resultam da presença de uma complexa mistura de entidades polimórficas. Pelo contrário, como referem os mesmos autores, dispersões de triacilgliceróis puros apresentam de uma forma geral apenas um evento térmico e tendem a cristalizar (Bunjes & Unruh 2007; Kuntsche *et al.* 2005; Mehnert & Mader 2001).

Esta percepção da co-existência de uma estrutura mista dá origem a um novo conceito: veículos coloidais que, nas condições de armazenagem, se apresentam num estado metaestável, diferente das formas apresentadas pelo lípido livre (Bunjes *et al.* 1998; Jennings *et al.* 2000c; Kuntsche *et al.* 2004; Westesen 2000). Algumas abordagens passam pela utilização combinada de lípidos sólidos e semi-sólidos, como a lecitina, como forma de aumentar a

capacidade da matriz em acomodar o fármaco no seu interior (Jenning & Gohla 2000; Jennings *et al.* 2000a; Schubert *et al.* 2006).

Na sequência destes estudos, surge um sistema lipídico alternativo, representado por lípidos nanoestruturados, os NLC, que apresentam à temperatura ambiente uma nanoestrutura desordenada, formada possivelmente por cristais imperfeitos, com um conteúdo lipídico que pode chegar aos 80% (Muller *et al.* 2002). As vantagens destas nanopartículas, constituídas por uma mistura de lípidos líquidos e sólidos, estão fundamentalmente ligadas à possibilidade de controlar os processos de instabilidade ao longo do tempo e, simultaneamente, permitir incorporar concentrações de fármaco superiores às obtidas com SLN (Jenning *et al.* 2000c; Jores *et al.* 2004a; Muller *et al.* 2002; Souto & Müller 2007). De acordo com estes autores, durante a solidificação, num mecanismo semelhante ao de separação de fases, os lípidos líquidos tendem a interpôr-se entre as cadeias de ácidos gordos dos lípidos sólidos, o que leva à formação de partículas sólidas com nanogotículas de líquido no seu interior (16 a 38%). Deste modo, tornava-se possível colmatar uma desvantagem das SLN's relacionada com a necessidade de atingir uma maior percentagem de fármaco incorporado, a qual obriga a um aumento da fase lipídica. Este aumento, na maioria dos casos, dada a densidade de cargas e consequente aumento de interacção partícula-partícula, conduz a sistemas menos estáveis.

Porém, apesar do esforço feito no sentido de estabelecer as NLC como sistema de vectorização, a verdade é que este ainda não está totalmente elucidado. Para tal contribui o facto de terem sido publicados estudos que indicam que as NLC são, elas próprias, um sistema de duas fases, constituído por lípidos sólidos e lípidos líquidos que se mantêm independentes, mas não necessariamente a fracção líquida no interior da fracção sólida (Jenning *et al.* 2000c; Jores *et al.* 2004b; Pietkiewicz *et al.* 2006; Saupe *et al.* 2006).

Contudo, a incorporação de um fármaco num sistema de veiculação não deve ser considerada isoladamente quando se pretende alterar a biodisponibilidade deste, uma vez que a eficácia terapêutica também está fortemente dependente da via de administração utilizada.

Possivelmente, uma maior eficácia terapêutica só será encontrada através do balanço entre os novos sistemas terapêuticos e vias de administração alternativas. Esta abordagem, em paralelo com a incorporação de fármacos em matrizes coloidais, deve permitir controlar de forma selectiva a acção terapêutica e trazer benefícios em relação às terapêuticas convencionais.

Neste contexto, torna-se extraordinariamente importante uma vantagem atribuível às nanopartículas lipídicas: a possibilidade de serem administradas por diferentes vias de administração, entre quais a pulmonar, a intravenosa, a intranasal, a oral, a ocular e a transdérmica, as quais podem constituir alternativas à via parental no tratamento das mais diversas patologias (Almeida *et al.* 2004; Blasi *et al.* 2007; Cavalli *et al.* 2002; Cavalli *et al.* 2000b; Fundaro *et al.* 2000; Jennings *et al.* 2000b; Lippacher *et al.* 2002; Lu *et al.* 2006; Muller *et al.* 1995; Muller & Runge 1998; Siekmann & Westesen 1992; Souto *et al.* 2004; Videira *et al.* 1999; Videira *et al.* 2002b; Yang *et al.* 1999; Zara *et al.* 2002a).

1.3. Via de administração

A terapêutica direccionada é um assunto que a tecnologia define, tendo como base a encapsulação de fármacos simplificando deste modo a realidade dos factos concretos, como sejam os parâmetros relacionados com a administração, retenção do fármaco, duração do efeito e situação fisiopatológica do órgão-alvo.

A administração de moléculas activas incorporadas em sistemas transportadores físicos, biológicos e até mecânicos tem como finalidade alterar o perfil de distribuição nos vários compartimentos e simultaneamente diminuir ou evitar o contacto daquelas com os receptores biológicos e com as enzimas responsáveis pelo seu metabolismo. O desenvolvimento de transportadores coloidais, capazes de conduzir selectivamente agentes terapêuticos ou imagiológicos, utilizando vias de administração convencionais, tem sido exhaustivamente investigado com o objectivo de diminuir ou suprimir os efeitos colaterais e aumentar a eficácia terapêutica de fármacos não solúveis (Couvreur & Vauthier 2006; Kawasaki & Player 2005).

No entanto, após administração intravenosa de sistemas de partículas submicrométricas, estas são tendencialmente fagocitadas pelas células mononucleares do sistema fagocitário (MPS), principalmente pelos macrófagos residentes do fígado e baço. Este fenómeno, precedido pela opsonização das partículas coloidais, limita a aplicabilidade destes sistemas por administração sistémica, excepto em algumas situações particulares como seja para: (i) direccionar fármacos aos macrófagos circulantes, (ii) aumentar o tempo de circulação de fármacos lábeis ou que são rapidamente eliminados por via urinária, (iii) evitar concentrações tóxicas em determinados tecidos, especialmente fígado e baço.

Relativamente à incorporação de agentes antineoplásicos, numerosos sistemas de partículas submicrométricas têm sido propostos, especialmente para administração pela via intravenosa (Cuenca *et al.* 2006; Gregoriadis & Florence 1991; Kelly & Kim 2007; Maincent *et al.* 1992; Nishioka & Yoshino 2001; Portney & Ozkan 2006; Sakai *et al.* 1993; Sharma *et al.* 1996). Contudo, apesar de promoverem o aumento do tempo de circulação relativamente ao fármaco livre, verificou-se que a maioria das partículas se acumula no fígado e baço, confirmando a intervenção dos macrófagos circulantes. Em consequência, a eficiência terapêutica do sistema de veiculação revelou-se inferior ao previsto, devido à redução do tempo de circulação esperado e à ausência de selectividade da acção do fármaco, o que representa uma limitação da administração sistémica. Para obviar a este fenómeno, desenvolveram-se com sucesso os vectores *stealth*, que demonstraram a possibilidade de evitar a opsonização e, em consequência, a fagocitose dos transportadores, através da alteração das propriedades de superfície (Allen 1997b; Torchilin 2006a; Veronese & Pasut 2005).

Outro aspecto que importa salientar, relativamente à administração intravenosa, refere-se ao facto de o endotélio vascular não permitir a passagem de partículas coloidais. Este fenómeno é apenas possível em regiões onde a camada de células endoteliais se apresente descontínua: vasos linfáticos, fígado, medula e baço, ou em caso de lesão ao nível dos tecidos (Hillery *et al.* 2001; Langer 1999; 2005).

Neste contexto, a administração pulmonar emerge como uma opção à via sistémica, sendo porventura a alternativa mais promissora. Apresenta

vantagens significativas, relacionadas com as propriedades estruturais, funcionais e bioquímicas do aparelho respiratório (Koshkina & Kleinerman 2005; Labiris & Dolovich 2003a; Patton 1996). A mais significativa decorre do facto de esta barreira biológica, em contacto com o exterior, corresponder a uma elevada superfície de absorção ao nível do epitélio e do espaço intersticial. A superfície epitelial pulmonar, incluindo as vias condutoras e o pulmão profundo, nas suas diferentes apresentações, apesar de menos permeável a solutos do que o endotélio vascular, permite a passagem de moléculas, partículas coloidais e macromoléculas, mantendo estas as suas propriedades estruturais e antigénicas (Lauweryns & Baert 1977).

Convencionalmente, a administração pulmonar é utilizada essencialmente em patologias das vias respiratórias como a asma e a fibrose cística, entre outras (Labiris & Dolovich 2003a). No entanto, a nebulização de fármacos com a finalidade de obter um efeito sistémico, com base no facto de este ser um órgão intensamente vascularizado, representa um conceito terapêutico que tem evoluído ao longo dos anos, sobretudo em grupos particulares de fármacos, como por exemplo os anestésicos, analgésicos, insulina, estimuladores da produção de hormona de crescimento (GH), entre outros (Farr & Otulana 2006; Fiel 2001; Sharma *et al.* 2001). Esta via de administração apresenta, quando comparada com a via endovenosa, a vantagem de evitar o efeito de primeira passagem hepática, o que permite reduzir a dose administrada, uma vez que o fármaco inalado pode ser absorvido na sua totalidade em consequência da superfície epitelial pulmonar (Dailey *et al.* 2003). Uma característica igualmente relevante na administração pulmonar diz respeito à actividade enzimática, que apresenta níveis muito inferiores aos encontrados no tracto gastrointestinal. Isto torna possível a administração pulmonar de biomoléculas ou moléculas sensíveis como péptidos, proteínas e DNA (Agu *et al.* 2001; Byron & Patton 1994; Niven 1995).

A passagem de nanopartículas para o espaço extra-pulmonar, após inalação, abre novas perspectivas em áreas onde a nanomedicina enfrenta dificuldades na terapêutica local, destacando-se entre estas a passagem pela barreira hemato-encefálica (Pison *et al.* 2006) e o acesso ao sistema linfático (Nishioka & Yoshino 2001; Oberdorster *et al.* 2004).

A capacidade de partículas coloidais migrarem para nódulos linfáticos regionais, após serem administradas por via subcutânea, intramuscular, intradérmica e intraperitoneal, foi demonstrada em vários estudos (Illum *et al.* 2001; Maincent *et al.* 1992; Rao *et al.* 2003; Videira *et al.* 2002b; Videira *et al.* 2006; Wolf *et al.* 1994). Neste contexto, a via pulmonar e a elevada área correspondente ao espaço intersticial pulmonar surgem como alternativa às vias de administração que permitem o acesso de fármacos incorporados num transportador, ao sistema linfático (Hanatani *et al.* 1995; Rao *et al.* 2003; Videira *et al.* 2002b; Videira *et al.* 2006).

Do mesmo modo, a capacidade de nanosistemas ou partículas ultrafinas atravessarem as barreiras cerebrais, tem sido largamente avaliada como forma de veiculação de fármacos, principalmente através da utilização de nanosistemas lipídicos (Blasi *et al.* 2007; Kaur *et al.* 2008; Koziara *et al.* 2004; Oberdorster *et al.* 2004). A veiculação de nanopartículas para o cérebro, através da inalação de aerossóis, ficou demonstrada nos trabalhos de Kreuter e colaboradores (Kreuter 2001; 2004; Kreuter *et al.* 2002). Este transporte directo de fármacos reveste-se de enorme importância no caso de neoplasias e infecções cerebrais, como já haviam sustentado Gilbert e colaboradores (1985, 1988, 1991) num estudo sobre a eficácia do tratamento de encefalites em ratinho, com ribavirina sob a forma de partículas ultrafinas (*small aerosol particles* -SPA). Os autores confirmaram que o fármaco inalado atingiu rapidamente concentrações terapêuticas no cérebro, antes de ser detectada a sua presença ao nível do fígado e rins (Arensman *et al.* 1977; Gilbert *et al.* 1991).

Outra abordagem possível para a administração pulmonar diz respeito à sua aplicação para fármacos com acção sistémica (Brain & Valberg 1979; Hillery *et al.* 2001; Valentine & Kennedy Jr 2001). Em 1996, John S. Patton destacou, no que se refere à distribuição sistémica de macromoléculas, que se verificava uma maior biodisponibilidade destas através dos pulmões, relativamente a outras vias de administração. O autor demonstrou que a eficácia de absorção e distribuição de péptidos e insulina (<6kDa) é 100% superior à que se verifica após administração subcutânea (Patton 1996).

Entende-se por administração pulmonar a aplicação de fármacos ou transportadores na superfície das vias respiratórias, tendo como objectivo

atingir uma acção farmacológica regional, sistémica ou, mais raramente, a nível linfático (Hillery *et al.* 2001). Considerando o conjunto formado pelas vias aéreas e pulmões, reconhece-se que neste caso o conceito de disponibilidade e absorção de um fármaco é uma noção abrangente, que obriga a considerar a combinação de vários fenómenos. Devido ao contorno que a sua estrutura descreve e às diferentes barreiras existentes, esta via apresenta uma complexidade de mecanismos, particulares de cada segmentação da árvore respiratória. Contudo, como foi referido em uma revisão de conjunto de 1979 e confirmado por diversos autores, a administração pulmonar de fármacos, deverá conduzir localmente a uma concentração terapêutica elevada, sem os efeitos indesejáveis que essa mesma concentração produziria a nível sistémico (Brain & Valberg 1979; Pison *et al.* 2006).

Um dos objectivos dos sistemas terapêuticos está relacionado com a veiculação do fármaco ao órgão-alvo, restringindo desta maneira o local de acção à região do corpo onde há patologia. Neste contexto, administração regional ao nível do sistema respiratório pode traduzir-se num aumento da disponibilidade terapêutica dos fármacos, devido aos fenómenos de extensa deposição e retenção das partículas na superfície pulmonar.

Nos últimos anos, tem sido evidente a tendência para a conversão de formas farmacêuticas convencionais em preparações para inalação como forma de evitar a toxicidade sistémica do fármaco, a captação dos sistemas coloidais pelo MPS e a ausência de doses subterapêuticas no local de acção, aumentando desta forma o número de fármacos administrados por via pulmonar para actuar a nível local ou sistémico, de forma não invasiva (Pison *et al.* 2006).

a. Aerossol

Em termos farmacotécnicos um aerossol é definido como uma dispersão coloidal de partículas, no estado sólido ou líquido, no seio de uma fase gasosa contínua, absorvidas por inalação e incorporadas num certo volume de ar (Aulton & Collett 2002).

Às formas farmacêuticas para inalação em geral e aos aerossóis em particular são atribuídas inúmeras vantagens. Estas formulações apresentam

uma área de superfície elevada relativa à entidade dispersa, o que em conjunto com as características estruturais do pulmão, nomeadamente a área respirável disponível, as torna um sistema terapêutico de eleição. Um factor de excelência atribuível a esta forma farmacêutica é o facto de serem apropriadas para tratar doenças pulmonares e/ou outras patologias com envolvimento sistémico, tendo em conta as características de vascularização do pulmão, desde que sejam ultrapassadas as barreiras pulmonares: o surfactante pulmonar, as mucosas, os epitélios e a membrana basal e o espaço intersticial. A inalação de um fármaco gera uma acção terapêutica local rápida, mesmo por administração de doses inferiores às que seriam necessárias no caso da administração intravenosa ou pelo tracto gastrointestinal (Aulton & Collett 2002; Pison *et al.* 2006). A possibilidade de reduzir a concentração necessária para obter efeito farmacológico oferece ainda a vantagem de ser possível controlar a concentração de fármaco inalado, de modo a atingir concentrações sistémicas baixas, reduzindo a probabilidade de aparecimento de efeitos adversos.

Por ser uma técnica não invasiva, o que favorece uma maior adesão terapêutica, a inalação poderá constituir a via de eleição alternativa aos métodos convencionais, adequada inclusive ao tratamento ambulatorio, no caso de tratamentos prolongados (Aulton & Collett 2002; Drugs 1997).

b. Aparelho respiratório

A noção de aparelho respiratório engloba não apenas as vias aéreas condutoras de gases inalados, mas também as vias aéreas superiores representadas pelo conjunto das fossas nasais e fracção nasofaríngea. A integridade pulmonar é assegurada pela função respiratória e pela diversidade da população celular, estrutural e móvel, que intervêm a nível metabólico (homeostasia) e nos mecanismos de defesa (Cordeiro 1995; Crystal 1991b).

O tracto respiratório superior está fundamentalmente ligado à filtração, humidificação e ajuste da temperatura do ar inspirado. Pelo contrário, as vias aéreas inferiores estão directamente envolvidas na dinâmica funcional das trocas gasosas, que se processam entre as unidades respiratórias periféricas, os alvéolos e os capilares pulmonares.

Ao aparelho respiratório, além do papel essencial que desempenha no transporte e trocas gasosas, pode ser atribuído um papel funcional puramente mecânico, relacionado com as diferenças de pressão que promovem o retorno do sangue ao coração e da linfa aos ductos linfáticos.

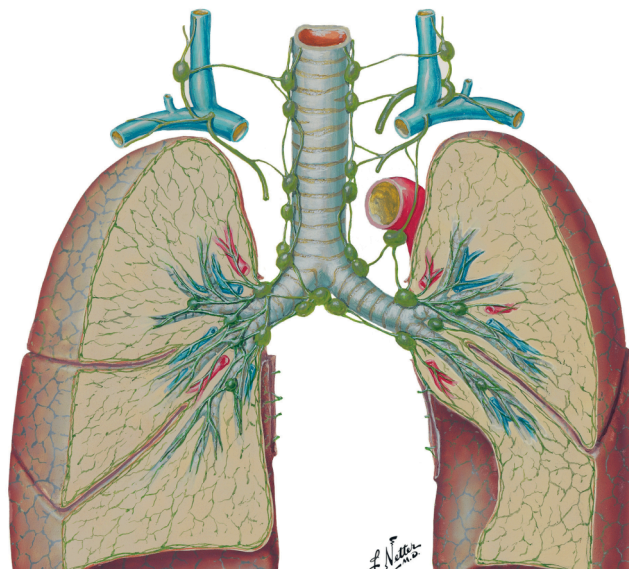


Figura 1-2: Estrutura do pulmão. Reproduzido com autorização de: *Atlas of Human Anatomy*. In: Second Edition Frank H. and Netter, M.D. Representação esquemática do sistema linfático pulmonar ao longo do qual se encontram numerosos gânglios linfáticos. É visível a estrutura do plexo linfático que corresponde a uma rede profunda de estruturas condutoras que abrangem a região periférica e central de cada pulmão.¹

Podemos portanto, distinguir duas regiões em termos de funcionalidade, as vias aéreas de condução (VACs) e o pulmão profundo. Esta divisão tem por base a bifurcação da traqueia, na zona extra pulmonar, dando origem aos brônquios de 1ª geração que penetram separadamente em cada pulmão (Figura 1-2) (Netter 1998; Williams *et al.* 1999).

Os pulmões constituem um órgão vital, responsável pelo transporte e trocas de gases – área respiratória. Em termos anatómicos, este órgão está dividido em duas partes: o pulmão direito e o pulmão esquerdo, ambos revestidos por

¹ O conteúdo do espaço intersticial do pulmão direito e do lobo inferior do pulmão esquerdo é transportado ao longo do plexo linfático profundo e nódulos hilares (intra e broncopulmonares), no sentido das cadeias ganglionares mediastínicas medianas, traqueobrônquicas, paratraqueais e através do tronco linfático broncomediastínico, para a veia braquiocefálica que drena no ângulo venoso jugulo-subclávio. O grupo paratraqueal esquerdo recebe a linfa proveniente do lobo superior do pulmão esquerdo e drena para o canal torácico através do tronco broncomediastínico Netter FH. 1998. *Atlas of Human Anatomy*. East Hanover, Germany: Novartis.

uma fina membrana serosa: a pleura. Os pulmões estão unidos à árvore respiratória principal pelos hilos, existindo também uma zona de ligação ao coração e à traqueia, assim como de passagem de fibras nervosas e das circulações sanguínea e linfática (Figura 1-2).

Cada pulmão apresenta-se ainda dividido por fendas, que dão origem ao lobo superior, médio e inferior, no caso do pulmão direito, e lobo superior e inferior no caso do pulmão esquerdo (Oberdorster *et al.* 2005; Williams *et al.* 1999).

A subdivisão dos brônquios de 1ª geração origina, já no espaço pulmonar, um número progressivamente maior de vias aéreas, brônquios e bronquíolos, num total de 16 ramificações até aos bronquíolos terminais. A porção inferior das vias aéreas intrapulmonares é formada pelos bronquíolos terminais, bronquíolos respiratórios, sacos alveolares e alvéolos, num total de aproximadamente 300 milhões de alvéolos que contribuem para aproximadamente 150 m² de área alveolar (Newman *et al.* 2000; Williams *et al.* 1999). Esta área de espessura mínima, que representa o revestimento contínuo de cada alvéolo, desempenha um papel importante nos mecanismos de eliminação de partículas que se depositam no pulmão profundo.

A segmentação dos canais condutores é acompanhada por uma alteração das características do revestimento epitelial. De forma progressiva, a espessura do epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado diminui entre o compartimento traqueobrônquico e o compartimento pulmonar, até à região alveolar (Figura 1-3). Da mesma forma, ao longo do compartimento traqueobrônquico, o número de células cilíadas e células caliciformes ou células *goblet*, vai diminuindo até se tornarem, na zona dos bronquíolos terminais e região alveolar, totalmente ausentes (Crystal 1991b; Farmer 1991; Oberdorster *et al.* 2005).

Nos bronquíolos as alterações estruturais traduzem-se pela substituição do epitélio pseudo-estratificado colunar e ciliado, existente ao nível dos brônquios, primeiro em epitélio simples cilíndrico com células ciliadas e raras células *goblet*, passando a epitélio simples cilíndrico e ciliado sem células *goblet* e substituído na região terminal por células cúbicas ciliadas e não ciliadas, as células clara. Estas células são as mais numerosas na porção mais distal desta secção, ou seja, os bronquíolos respiratórios.

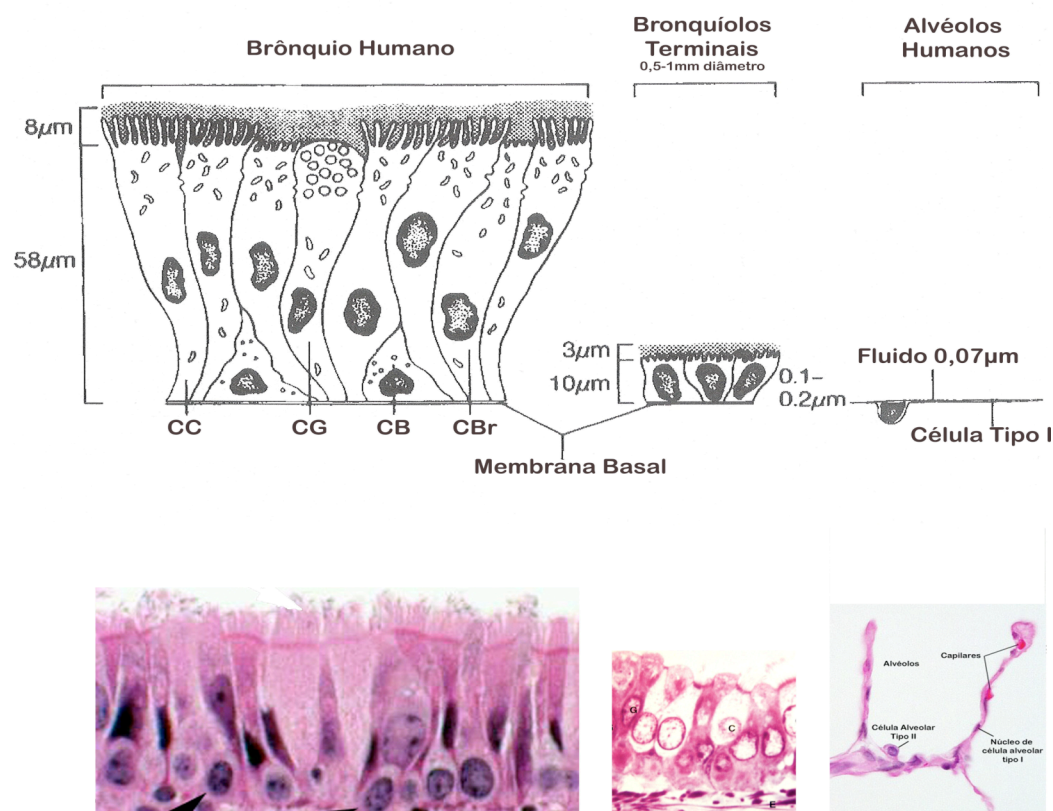


Figura 1-3: Alteração na estrutura e espessura ao longo do epitélio pulmonar, respectivamente ao nível dos brônquios, bronquíolos e alvéolos. Estrutura celular dos três níveis e respectiva membrana basal, representada esquematicamente, onde se pode ver as células ciliadas (CC), células globulares (CG), célula basal (CB), células mucosas (CBr). Nos bronquíolos terminais, observa-se o epitélio simples ciliado (adaptado de www.accessexcellence.org.html). Na imagem inferior, aspecto morfológico do epitélio das vias respiratórias. O epitélio alveolar está representado em secção transversal, onde são visíveis os núcleos dos pneumócitos tipo I, células de pneumócitos tipo II e capilares sanguíneos (adaptado de: Blue Histology-Respiratory System).

A progressão para a região alveolar é também acompanhada por uma alteração do epitélio, que assume uma estrutura de células pavimentosas cúbicas na zona dos bronquíolos terminais, adoptando na região alveolar características de epitélio pavimentoso simples, mais adequado aos processos de difusão que aí se processam (Figura 1-3).

1.3.2. Deposição de partículas inaladas

As partículas dispersas no aerossol inalado sujeitam-se aos movimentos do ar inspirado e, analogamente, ao fluxo de ar expirado. Qualquer material inalado, não gasoso, tende a depositar-se ao longo das vias respiratórias.

Considerando que as segmentações das vias respiratórias dão origem a níveis concretos, as gerações de ramificações, estes podem ser encarados como entidades separadas. A deposição do aerossol será assim tratada como um processo físico de chegada de partículas a cada nível de segmentação, onde se verificam fenómenos diferentes de deposição e absorção de partículas inaladas (Brain & Valberg 1979; Hillery *et al.* 2001).

O movimento de partículas inaladas ao longo do sistema respiratório obedece a diferentes fenómenos, na medida em que a velocidade do ar que as transporta e a espessura dos canais que percorrem não é a mesma ao longo do percurso. Os obstáculos a considerar neste caso envolvem barreiras físicas, próprias da anatomia do aparelho respiratório, e barreiras fisiológicas decorrentes do modelo de epitélio de cada geração de ramificações da árvore traqueobrônquica (Labiris & Dolovich 2003a).

Neste contexto, tendo em consideração o diâmetro aerodinâmico da partícula, o padrão fisiológico dos movimentos respiratórios e a anatomia do tracto respiratório, são considerados os seguintes mecanismos de deposição: por impacto, por sedimentação e por difusão (Brownian diffusion). Inicialmente, a mistura inalada tende a colidir com as paredes e bifurcações das vias respiratórias superiores, nasofaringe e território traqueobrônquico, devido à velocidade do ar e ao fluxo turbulento que aí se cria por inversão no sentido do movimento do ar. Nesta região ficam retidas partículas com diâmetro superior a 5 μm . Pelo contrário, nas regiões do pulmão onde a velocidade do ar é mais lenta, ao nível das vias condutoras (velocidade 100x inferior ao das VRs), as partículas menores que 5 μm tendem a depositar-se por sedimentação pelo efeito da força da gravidade.

Por último, consideramos a deposição por difusão Browniana. Este mecanismo está descrito como sendo um movimento aleatório da partícula inalada, de diâmetro aerodinâmico inferior a 1 μm , produzido pelo impacto com outras partículas ou com as moléculas de gás em movimento. Observa-se apenas em regiões onde o fluxo de ar é desprezável (velocidade 1000x inferior ao das VRs), ou seja, na região alveolar (Hillery *et al.* 2001).

Curiosamente, observou-se em partículas de diâmetro compreendido entre 0,1 μm e 0,5 μm um comportamento independente dos mecanismos referidos (Oberdorster *et al.* 2005). Partículas neste intervalo não exibem um padrão

referencial de deposição, pelo contrário, distribuem-se aleatoriamente ao longo do aparelho respiratório, sendo uma fracção significativa expelida durante a expiração. Isto confirma que na prática, existe uma dependência entre a anatomia do tracto respiratório e as características aerodinâmicas do aerossol (Hillery *et al.* 2001; Valentine & Kennedy Jr 2001). No percurso do ar para o pulmão profundo, o acesso de partículas às vias aéreas condutoras e região alveolar apenas pode ser considerado em função do seu diâmetro aerodinâmico, para o qual concorre a forma da partícula, como se pode observar na Figura 1-4 (Oberdorster *et al.* 2005).

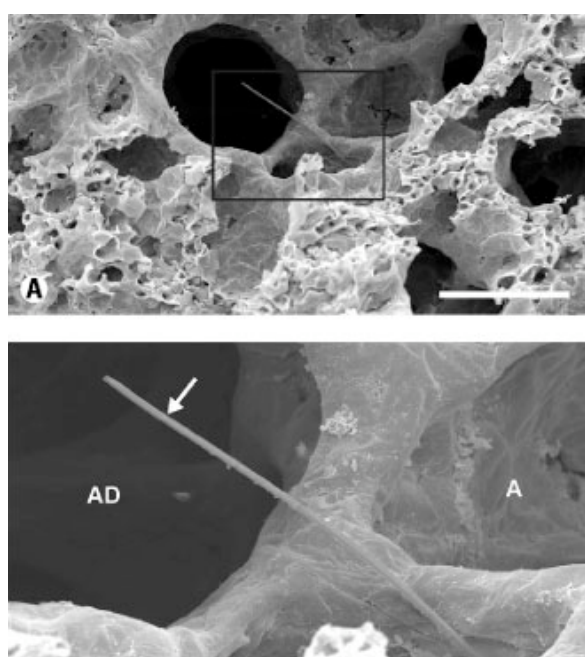


Figura 1-4: Imagem de um corte de pulmão profundo em microscopia electrónica de varrimento (SEM), onde é possível observar uma fibra de vidro ($20,9 \pm 8,3 \mu\text{m}$) retida na região alveolar de um pulmão de rato. (A) aspecto da espaço alveolar. Em destaque a localização da fibra (barra= $50\mu\text{m}$); projecção da fibra no espaço alveolar entre a terminação do ducto alveolar (AD) e o início dos alvéolos (A). Adaptado de Geiser e colaboradores (Geiser *et al.* 2003).

Partículas não esféricas depositam-se na região alveolar por impacto, após serem arrastadas pelo ar inspirado, bastando para que tal aconteça que uma das suas dimensões corresponda ao diâmetro aerodinâmico (Oberdorster *et al.* 2005).

Na nebulização de um produto farmacêutico é importante definir a noção de fracção respirável na mistura inalada. Este parâmetro corresponde à percentagem de partículas esféricas, com diâmetro médio compreendido entre $1 \mu\text{m}$ e $4 \mu\text{m}$, que tendem a depositar-se por sedimentação nas vias

aéreas condutoras, acrescido da fracção de partículas entre aproximadamente 0,3 μm e 0,01 μm , que se depositam maioritariamente na região alveolar, sobretudo por mecanismos de difusão Browniana (Brain & Valberg 1979; Hillery *et al.* 2001; Newman 2001; Valentine & Kennedy Jr 2001).

Quando consideramos dispersões coloidais, o número de variáveis que influenciam a deposição de um aerossol, por exemplo a carga e o número de partículas, contribuem para a dificuldade em determinar a fracção inalada e, em consequência, a concentração de fármaco administrada (Brain & Valberg 1979; Courrier *et al.* 2002; Hillery *et al.* 2001; Labiris & Dolovich 2003b; Rao *et al.* 2003; Valentine & Kennedy Jr 2001). Esta incerteza é porventura a maior desvantagem da administração pulmonar.

1.3.3. Absorção e eliminação

À semelhança do que ocorre na deposição pulmonar, os diferentes mecanismos de absorção e eliminação, após deposição de um aerossol, variam com o nível de ramificação, com a estrutura do epitélio e com as propriedades químicas das partículas inaladas (Newman 2001; Patton 1996). A remoção de partículas orgânicas, biológicas e inorgânicas, depositadas no espaço pulmonar é igualmente função do diâmetro das mesmas e envolve diversos processos, como a dissolução nos fluidos pulmonar ou intersticial, a fagocitose pelos macrófagos alveolares ou a difusão ou passagem pelo epitélio brônquico (Brain & Valberg 1979; Hillery *et al.* 2001).

Nas últimas décadas, a nanotoxicologia tem contribuído para elucidar o comportamento de partículas inaladas no seu percurso intrapulmonar e sistémico. De facto, a avaliação dos efeitos para a saúde pública da exposição aos chamados finos, partículas entre 0,1 μm e 1 μm , e ultrafinos, partículas menores que 0,1 μm (UFP-ultrafine particles), tem permitido obter informações sobre os mecanismos pulmonares de absorção e de defesa (Oberdorster *et al.* 2005; Valentine & Kennedy Jr 2001).

Consideram-se dois fenómenos fundamentais na absorção de partículas coloidais que atingem a região alveolar: a fagocitose pelos macrófagos alveolares (MA's) e a passagem ao interstício pulmonar. As partículas internalizadas em macrófagos, ou que passaram na forma livre para o espaço

intersticial, vão ser absorvidas pelo sistema vascular ou transportadas para o sistema linfático, sendo deste modo eliminadas do espaço pulmonar e distribuídas pelo organismo (Valentine & Kennedy Jr 2001).

1.3.4. Região alveolar

Está descrito que a região alveolar, também designada por pulmão profundo, tem início na 20ª bifurcação da árvore respiratória (Cordeiro 1995; Netter 1998; Weibel 1963). Nesta, os alvéolos encontram-se agrupados em estruturas conhecidas por sacos alveolares, que por sua vez estão ligados aos bronquíolos respiratórios pelos ductos alveolares. A parede externa destas estruturas, extensamente revestida por capilares sanguíneos e pelos linfáticos justa-alveolares, contacta com o interstício pulmonar (Figura 1-5).

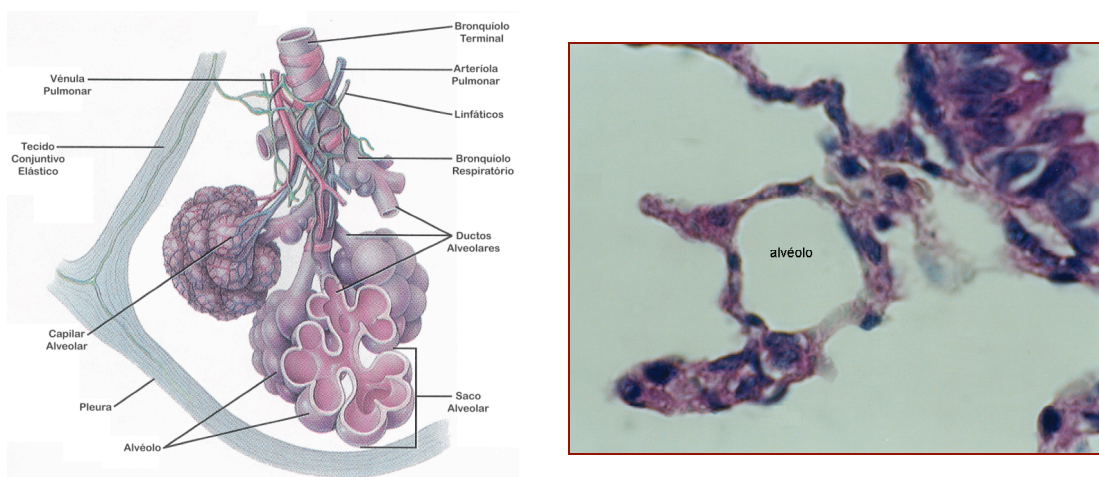


Figura 1-5: Na figura da esquerda encontra-se representada esquematicamente a região alveolar e o interstício alveolar; adaptado do Atlas de Anatomia Humana (Netter 1998). Destacam-se os alvéolos, respectivos sacos alveolares e os plexos sanguíneo e linfático. Na figura da direita, secção transversal da região alveolar, ampliação do epitélio alveolar e do septo e parede alveolares ($\times 400$).

A parede alveolar constitui, por um lado, uma das estruturas onde existe maior capacidade de difusão de metabolitos, sendo completamente permeável aos gases e água e, por outro lado, a maior barreira à administração sistémica de fármacos inalados (Rao *et al.* 2003). Este revestimento, formado por células epiteliais pavimentosas, tem um papel importante nos processos de absorção, endocitose e transcitose, que se processam entre o compartimento alveolar e o endotélio vascular ou o espaço intersticial (Cordeiro 1995; Hillery *et al.* 2001). Este último é caracterizado

pela sua complexidade quer em termos estruturais, quer em termos funcionais.

Em termos histológicos a parede alveolar é constituída por uma monocamada de células epiteliais, assentes numa membrana basal de tecido conjuntivo, morfológica e funcionalmente distintas: Pneumócitos tipo I e Pneumócitos tipo II. Directamente envolvidos com as trocas gasosas, os Pneumócitos I são células epiteliais pavimentosas de grandes dimensões, achatadas, cujo citoplasma plano e alongado parece ter sido especialmente concebido, não apenas para facilitar os processos de difusão subjacentes às trocas gasosas, mas também para cobrir a maior extensão possível de superfície alveolar. Estas últimas, que representam apenas 8% das células parenquimatosas alveolares, cobrem 90% da superfície alveolar, o que demonstra qual o papel fundamental do pulmão profundo: as trocas gasosas. Os Pneumócitos I intervêm ainda nos processos defensivos actuando como células apresentadoras de antigénios através da síntese de citocinas (Weibel 1986) . Mais numerosos que as células tipo I, os Pneumócitos II são células de forma cúbica de menores dimensões, através das quais se processa a maior parte do trânsito transepitelial de fluidos e electrólitos. Partículas ou moléculas que se encontrem no lúmen alveolar são internalizadas por estas células, através de vesículas endossómicas que se transformam em corpos vesiculares. Estas vesículas ou lisossomas têm por função degradar e descarregar o material nos corpos lamelares ou simplesmente transportar o material não degradado através da célula e libertá-lo no espaço intersticial, num fenómeno conhecido por transcitose (Crystal 1991b; Sun *et al.* 2007).

A função mais relevante atribuída aos Pneumócitos II está relacionada com o processo de síntese e excreção de substância tensioactiva que vulgarmente se designa por surfactante pulmonar. Contudo, encontram-se também envolvidas na síntese e excreção de proteínas funcionais e de estrutura, como a lisozima e a fibronectina, bem como na produção de mediadores do processo inflamatório-citoquinas (Cordeiro 1995; Crystal 1991b; Oberdorster *et al.* 2005). É atribuído às células tipo II um papel indispensável na regeneração do epitélio alveolar, não apenas por aumento da proliferação celular mas, fundamentalmente, pela sua capacidade de diferenciação em células tipo I (Farmer 1991; Weibel 1986).

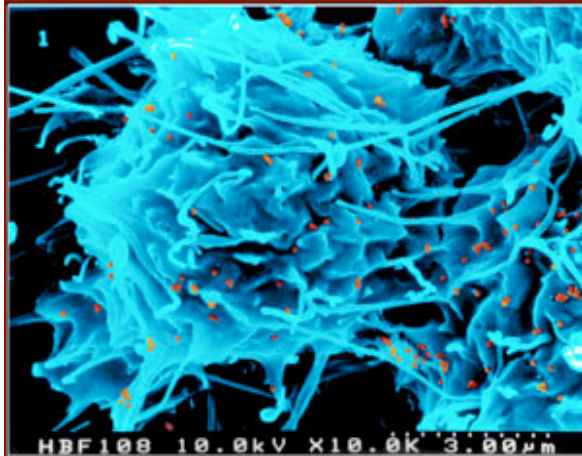
A variabilidade morfológica, que se observa entre as células epiteliais do revestimento alveolar, está relacionada com o papel que os Pneumócitos tipo I representam nos fenómenos respiratórios. De uma forma geral, as trocas gasosas são efectuadas através de um conjunto de três folhetos: a camada de células epiteliais da parede alveolar, a membrana basal e a camada de células endoteliais dos capilares sanguíneos (Valentine & Kennedy Jr 2001). No entanto, a eficácia deste processo deve-se igualmente à existência de regiões onde as membranas externas das células tipo I se encontram fundidas com os capilares sanguíneos (aproximadamente 0,1 μm).

A rede de capilares sanguíneos que reveste a superfície alveolar é responsável por uma área de contacto com o endotélio vascular de cerca de $102 \pm 21 \text{m}^2$ (Stone *et al.* 1992).

O terceiro grupo de células do espaço alveolar são os MA's, fixos ou circulantes. São células mononucleares do sistema imunitário (MPS-Mononuclear Phagocytic System), com origem na diferenciação de monócitos circulantes, regionais ou recrutados, no sistema vascular pulmonar. Constituem a população mais expressiva de células alveolares não fixas e caracterizam-se pela presença, no seu citoplasma, de um elevado número de organitos e corpos de inclusão (Brain & Valberg 1979; Crystal 1991a). Apesar de distribuídos por toda a região pulmonar, são no entanto mais abundantes na região alveolar, repartidos entre a superfície epitelial e o espaço intersticial (Bezdicek & Crystal 1991). Nesta região, à semelhança do que se verifica no espaço intra-pulmonar, os MA's estão presentes em grande quantidade, representando cerca de 20% das células não parenquimatosas aí residentes (Mills *et al.* 1999). Estas células desempenham um papel essencial na manutenção da funcionalidade e da estrutura pulmonar, papel esse que, embora se encontre intimamente relacionado com a sua mobilidade, se deve essencialmente às suas competências secretórias e reguladoras (Ishii *et al.* 2005; Shapiro 1999). De facto, esta população celular representa, independentemente do estímulo ser a fagocitose ou a produção de citocinas, um dos mecanismos fundamentais na remoção de corpos estranhos da superfície alveolar (Figura 1-6).

Vários fenómenos estão envolvidos neste processo, uma vez que, para além da fagocitose, estas células podem também expressar receptores específicos

de superfície, sintetizar e libertar uma vasta gama de mediadores, comportando-se como células apresentadores de antígenos (Goldsby *et al.* 2000; Oberdorster *et al.* 2005).



Segregar uma vasta gama de mediadores químicos, entre os quais, componentes do complemento, enzimas lisossomais, factores angiogénicos.

Fagocitar partículas estranhas e microrganismos.

Remover fragmentos celulares.

Produzir factores de inflamação, entre os quais as citocinas.

Activar outras células do sistema imunitário.

Manter e reparar a estrutura do parênquima celular.

Produção de factores de necrose tumoral.

Figura 1-6: Microfotografia onde se pode observar o aspecto morfológico de um macrófago alveolar (reproduzido com autorização da autora Dra. Sílvia Diabate). Na coluna da direita estão resumidas as funções mais relevantes dos macrófagos.

Na presença de partículas insolúveis ou microrganismos patogénicos, a actividade fagocitária dos MA's é estimulada, provocando a remoção do material estranho da superfície epitelial ou do interstício pulmonar, representando esta população celular a primeira linha de defesa da integridade do sistema respiratório (Cheung *et al.* 2000; Danelishvili *et al.* 2003; Oberdorster *et al.* 1992). Simultaneamente, segregam mediadores responsáveis pela activação de outras populações celulares do sistema imunitário e interagem com as restantes células epiteliais, de forma a iniciar a resposta inflamatória (Goldsby *et al.* 2000; Ishii *et al.* 2005).

Os MA's com material internalizado podem migrar para o sistema linfático pulmonar onde se comportam como apresentadores de antígenos, ou ser transportados através da drenagem mucociliar, sendo posteriormente eliminados pela expectoração ou deglutição. O papel dos MA's em transportar material fagocitado foi confirmado num estudo de 1984, onde se observou, após instilação de partículas nas vias respiratórias, a presença destas estruturas celulares, contendo numerosas vesículas endossómicas, nos vasos linfáticos pulmonares bem como nos nódulos hilares (Corry *et al.* 1984).

Na administração pulmonar de fármacos ou partículas coloidais, os macrófagos broncoalveolares, devido à sua actividade fagocitária não específica, podem ter um papel relevante como vectores para o sistema linfático (Bodega & Agostoni 2004; Hanatani *et al.* 1995; Langenback *et al.* 1990; Vyas *et al.* 2004).

1.4. Sistema linfático associado ao pulmão

1.4.1. Função do sistema linfático pulmonar

A abranger toda a região pulmonar identificam-se, de uma forma geral, três redes linfáticas: profunda, superficial e subpleural. O sistema linfático pulmonar pode, de acordo com a morfologia e funcionalidade, ser dividido em três elementos; uma complexa rede de vias de drenagem, os gânglios linfáticos, mediastínicos e paratraqueais e o tecido linfóide (Leak & Ferrans Lee 1991). Tal como em outros tecidos, o sistema linfático exerce um papel fundamental na reabsorção de proteínas e electrólitos, na remoção de fragmentos celulares e de partículas exógenas e na manutenção das pressões e volumes circulatórios. Em regiões onde ocorrer lesão, este sistema intervém não apenas ao nível da drenagem do excesso de fluido intersticial, desde a matriz extracelular até aos ductos torácicos, mas também como centro da actividade imunológica, na protecção contra agentes exteriores, organismos patogénicos e células tumorais (Leak & Ferrans Lee 1991).

Em contraste com a actividade fagocitária dos MA's, a resposta imunitária ao nível do sistema linfático representa um mecanismo específico de resposta, pelo qual é responsável um conjunto formado por tecidos e células especializadas (Corry *et al.* 1984). O papel imunológico está reforçado ao nível das mucosas, devido à presença de estruturas linfocitárias de origem subepitelial. A nível pulmonar estas estruturas estão localizadas na região bronco-alveolar e designam-se por BALT: tecido linfóide associado aos brônquio (Bienenstock *et al.* 1973; Cordeiro 1995). Estudos realizados com o objectivo de esclarecer os mecanismos de resposta imunológica ao nível das vias aéreas, após deposição de agentes infecciosos na mucosa traqueo-brônquica e bronco-alveolar, confirmam a relação com a presença de

tecido linfóide associado às mucosas. No entanto, mostram também o envolvimento dos gânglios linfáticos regionais, porventura mais relevante, e a relação destes com a actividade fagocitária e a mobilidade dos macrófagos alveolares (Moxon *et al.* 1974; Salit *et al.* 1984).

1.4.2. Absorção linfática

As vias de drenagem linfática têm início ao nível do canal torácico e descrevem, após numerosas segmentações, um percurso paralelo ao que se observa para o sistema broncovascular a partir da ramificação da artéria pulmonar. Os vasos linfáticos de menor calibre estão divididos em dois plexos, o profundo e o superficial, que acompanham os contornos da árvore brônquica e que confluem na zona hilar para, a partir daí, escoar a linfa para os canais de maior calibre, o ducto linfático direito e o canal torácico (Botelho *et al.* 1999; Leak & Ferrans Lee 1991). Admite-se que a circulação linfática pulmonar, nomeadamente no que diz respeito ao retorno linfático a partir das unidades terminais, é feita através de capilares linfáticos intrapulmonares profundos, incorporados na camada sub-mucosa do tecido conjuntivo, ao nível dos bronquíolos respiratórios. Contudo, localizados no espaço intersticial do parênquima alveolar, identificam-se microvasos ou fendas linfáticas, na vizinhança dos capilares sanguíneos. Estas estruturas, conhecidas por linfáticos justa-alveolares, sugerem que a absorção linfática de partículas estranhas se processa maioritariamente ao nível alveolar (Lauweryns & Baert 1977; Leak & Ferrans Lee 1991; Uren 2004).

A drenagem linfática é fundamental na remoção de partículas depositadas, representando esta via o mecanismo de eliminação predominante, sobretudo a nível alveolar (Lauweryns & Baert 1977; Oberdorster *et al.* 2005; Valentine & Kennedy Jr 2001). Para tal contribuem as diferenças estruturais entre o plexo alveolar profundo ao nível dos vasos linfáticos e dos capilares sanguíneos (Figura 1-5). O revestimento dos vasos e capilares linfáticos, à semelhança do sistema circulatório, é composto por uma camada de células endoteliais. No entanto, em contraste com o endotélio vascular, as células que revestem os vasos linfáticos possuem características morfológicas particulares. Por um lado, apresentam extensões citoplasmáticas irregulares (6nm), por outro, ligam-se entre si por junções intercelulares

(microfibrilhas), que abrem mediante condições de pressão favoráveis (Rodrigues *et al.* 1983). O revestimento celular, de espessura estreita, está assente numa membrana basal descontínua. Esta estrutura simples e desorganizada justifica o facto de os vasos linfáticos serem mais permeáveis do que os vasos sanguíneos.

Os linfáticos justa-alveolares situados à superfície da parede alveolar são extensões ultrafinas dos capilares linfáticos em que a membrana basal é praticamente inexistente. Observam-se nesta estrutura espaços intercelulares de dimensão significativa, o que explica igualmente a predominância da via linfática em relação aos capilares sanguíneos, como tem sido extensamente descrito (Lauweryns & Baert 1977).

A permeabilidade dos vasos linfáticos a macromoléculas e colóides aumenta a sua absorção. Porém, o transporte pelo sistema linfático está condicionado pela presença de estruturas altamente funcionais: os gânglios linfáticos. A função principal destas estruturas é a filtração, mas têm também um papel relevante como centros imunológicos, não apenas na produção e acumulação de sub-populações linfocitárias, mas também na resposta imunitária, por reconhecimento de antigénios e produção de anticorpos (Hawley *et al.* 1995). Partículas transportadas pela linfa podem ser retidas na passagem pela complexa rede de canais no interior dos nódulos linfáticos: os canais sinusais. Este processo pode ser puramente mecânico, retenção por filtração, ou pode envolver populações celulares linfocitárias residentes ou circulantes.

Partículas livres ou fagocitadas, microrganismos patogénicos e células apresentadoras de antigénios são conduzidas até aos gânglios linfáticos proximais, desempenhando o sistema linfático um importante papel como centro de defesa do organismo (Tabela 1-3). De facto, na presença de partículas opsonizadas, são activados processos de fagocitose que envolvem a presença de estruturas imunológicas residentes e circulantes: macrófagos, linfócitos B e T, células dendríticas, entre outras (Tabela 1-3) (Hawley *et al.* 1995; Uren 2004). Em sentido contrário, quando falham os mecanismos de defesa, o sistema linfático pode também funcionar como via de disseminação de patologias.

Tabela 1-3: Elementos estruturais do nódulo linfático e composição da linfa. As subpopulações linfocitárias permitem que partículas estranhas retidas nas fibras reticulares sejam destruídas por fagocitose (macrófagos fixos) ou através de um mecanismo mais complexo, por resposta imunitária.

	Função	População celular
Cápsula	Revestimento exterior	Tecido fibroso
Medula	Suporta os canais sinusais Produção de anticorpos	O seu parênquima: tecido linfóide Camadas de células reticulares, endoteliais, fibroblastos, colagénico e fibras elásticas
Canais sinusais	“Percolação” Difusão (espalhar o que entra) Actividade fagocitária	Revestimento: Células retículo-endoteliais e macrófagos circulantes
Tecido linfóide	Imunológica	Macrófagos, Linfócitos B e T e células dendríticas
Vasos : aferentes e eferentes	Fluxo de linfa	Células endoteliais
Cortex	Diferenciação e proliferação Linf-B Imunidade celular (região paracortical)	Linfócitos-B compactados (revestimento) Linfócitos-T (região paracortical)
Centro germinal	Maturação de linfócitos-B	Linfócitos-B
Linfa	Transporte (Difere do plasma principalmente na concentração de estruturas celulares).	Proteínas plasmáticas Electrólitos, glucose Imunoglobulinas Células linfocitárias Lípidos, na forma de complexos lipoproteicos. Ésteres de ácidos gordos (ésteres do colesterol; fosfolípidos; triglicéridos), mas também colesterol e ácidos gordos livres

Este fenómeno verifica-se quando os organismos patogénicos têm capacidade de se desenvolverem no interior dos macrófagos ou dos próprios gânglios linfáticos (Oussoren & Storm 2001), mas também quando a sua localização oferece um acesso privilegiado ao sistema linfático. É o que ocorre ao nível das vias respiratórias, como se verifica após inalação de aerossóis de *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* (cocos $\approx 0,5 \mu\text{m}$), *Bacillus subtilis*, entre outros microrganismos (Danelishvili *et al.* 2003).

O envolvimento do sistema linfático na disseminação de micrometastases é igualmente um exemplo da falência dos sistemas de defesa. Nestes casos, a linfa representa o papel de transportador determinante, por exemplo, na invasão pulmonar a partir de tumores extrapulmonares, como são os casos do carcinoma avançado da mama, melanoma e outras neoplasias (Adams & Dubeilzig 1978; Muranishi *et al.* 1997).

1.4.3. Administração linfática

De entre os factores que influenciam a absorção de fármacos livres ou encapsulados pelo sistema linfático, o local de administração é determinante, sobretudo no que diz respeito aos aspectos fisiológicos do espaço intersticial (Moghimi *et al.* 1994; Muranishi 1997; Nishioka & Yoshino 2001).

Embora de composição semelhante, um fluido gelatinoso de sustentação a inúmeras populações celulares onde podem existir microcanais hidrofílicos, a estrutura do interstício nos diferentes tecidos apresenta características próprias, que podem sofrer alterações em estados patológicos ou em virtude da presença de partículas insolúveis. Estes factores condicionam a mobilidade de uma partícula no espaço intersticial, estando relacionadas com a pressão exercida no fluido, no sangue e na linfa. O padrão do microfluxo em direcção aos capilares linfáticos e os gradientes de concentração podem igualmente sofrer alterações originadas pela presença de um sistema de partículas (Lauweryns & Baert 1977; Oussoren & Storm 2001; Uren 2004).

Estudos que envolveram a administração subcutânea ou intraperitoneal, como abordagem para veicular péptidos, proteínas (>20 kDa) ou colóides para o sistema linfático, levaram à identificação das potencialidades da via intraperitoneal. As vantagens, fundamentalmente relacionadas com a elevada concentração de partículas que pode ser administrada e com a reprodutibilidade no padrão de distribuição após administração, são minimizadas por este constituir um método de aplicação fortemente invasivo (Hawley *et al.* 1995); (Illum *et al.* 2001; Muranishi *et al.* 1997).

A administração intradérmica foi igualmente testada e demonstrou ser eficaz, devido à existência de numerosos vasos linfáticos nesta zona (O'Mahony *et al.* 2004). As vias subcutânea e intradérmica apresentam, no entanto, desvantagens. A mais relevante relaciona-se com a retenção de partículas no local de aplicação, que gera uma variação nas pressões locais e a consequente alteração dos gradientes de concentração e do padrão de microfluxo. Outra desvantagem está relacionada com a dificuldade encontrada por macromoléculas e por sistemas de partículas em ultrapassar a barreira epidérmica (Moore & Chien 1988; Oussoren & Storm 2001).

A administração pulmonar revela-se promissora, em primeiro lugar por ser não invasiva mas, talvez mais importante, pela extensão da área disponível,

o que pode evitar alterações fisiológicas nesta região, após administração de sistemas de partículas submicrométricas.

Embora não seja possível estabelecer com precisão um sistema terapêutico ideal para direccionar fármacos ao sistema linfático poder-se-á, no entanto, desenvolver veículos coloidais que apresentem, com base na natureza do material constituinte, um claro linfotropismo (Muranishi *et al.* 1997; Nishioka & Yoshino 2001).

De entre os parâmetros exógenos que influenciam a absorção e drenagem linfática, podemos identificar como mais relevantes a carga, a lipofilia e o diâmetro da partícula coloidal. Estas características físico-químicas determinam os fenómenos de difusão e os processos de fagocitose; deste modo, controlando o diâmetro e as propriedades de superfície, é possível prever o potencial de um sistema de partículas para migrar para os linfáticos. Relativamente à carga e à superfície da partícula, este parâmetro está sobretudo relacionado com fenómenos de aglutinação/adsorção, entre partículas ou entre estas e as estruturas celulares circulantes ou fixas dos tecidos, regulando desta forma os mecanismos de opsonização e fagocitose (Hawley *et al.* 1995). A lipofilia das partículas, por seu lado, se assumirmos apenas processos de difusão, é condição essencial para predizer a afinidade de uma partícula coloidal para o sistema linfático (Oussoren *et al.* 1997).

Esta relação tem sido demonstrada em numerosos estudos acerca da absorção linfática em geral através das vias de administração intersticial (subcutânea; intradérmica; intraperitoneal) e, em particular, sobre os mecanismos de absorção de moléculas pouco solúveis na rede linfática intestinal. Os resultados indicam que a lipofilia² de fármacos livres ou encapsulados é uma característica que concorre para a falta de afinidade pelos capilares sanguíneos e nesse sentido, promove a absorção selectiva dos mesmos pela circulação linfática (Hawley *et al.* 1995; Humberstone & Charman 1997; Muranishi *et al.* 1997; O'Driscoll 2002; Oussoren & Storm 2001).

² Moléculas hidrofílicas (p.m.<5000) são distribuídas igualmente pela circulação sanguínea e linfática onde não se ligam a proteínas endógenas. Deste modo, a concentração de moléculas hidrossolúveis de baixo peso molecular é independente da permeabilidade do endotélio.

Todavia, o diâmetro de partícula é porventura um parâmetro fundamental para a compreensão dos fenómenos envolvidos no acesso de dispersões coloidais ao sistema linfático. Afiguram-se contraditórias, no entanto, as opiniões quanto às dimensões que limitam a absorção linfática. Roger Uren (2004) salienta no seu estudo sobre drenagem linfática de colóides, ao nível da pele, a necessidade de as partículas apresentarem um diâmetro igual ou inferior a 100 nanómetros (nm) (Uren 2004). Em sentido contrário, foi defendido que partículas até 500 nm de diâmetro são removidas do espaço intersticial para o sistema linfático, após administração intraperitoneal e pulmonar (Leak & Ferrans Lee 1991; Maincent *et al.* 1992; McIntire *et al.* 1998; O'Driscoll 2002; Porter & Charman 1997; Videira *et al.* 2000; Videira *et al.* 2006).

Esta discrepância pode ser parcialmente justificada em função das alterações que se verificam na fluidez do líquido intersticial decorrentes da presença de partículas coloidais, como ficou demonstrado nos trabalhos de Hawley e colaboradores (1995) e Oussoren and Storm (2001). Os autores afirmam que a velocidade e a quantidade absorvida, para partículas coloidais, pode estar também relacionada com a fluidez e o microfluxo do líquido intersticial no local de administração e, conseqüentemente, com a pressão exercida sobre as junções intercelulares dos capilares linfáticos (Hawley *et al.* 1995; Oussoren & Storm 2001). Não existe aqui qualquer contradição, apenas se destaca o facto do tecido intersticial subcutâneo apresentar uma estrutura mais compacta do que a que se observa em distintos espaços intersticiais (Harivardhan *et al.* 2005).

Importa ainda distinguir a diferença entre a absorção ao nível dos capilares e vasos linfáticos regionais e o transporte pelo sistema linfático. Vamos excluir a influência do espaço intersticial, que já verificámos ser mais relevante na administração subcutânea. Sabe-se que partículas coloidais submicrométricas, desde que preenchidos os requisitos de linfotropismo, são absorvidas em grande extensão, no entanto, o seu percurso pelo sistema linfático é distinto. Nanopartículas da ordem dos 100 nm são transportadas livremente, e podem no limite, entrar novamente em circulação. Pelo contrário, partículas de diâmetro igual ou superior a 500 nm ficam retidas ao nível dos nódulos linfáticos adjacentes ao local de administração (Hawley *et*

al. 1995; Illum *et al.* 2001; Muranishi 1997). Um estudo de 1995 elucidou bem este fenómeno de retenção. Após administração intraperitoneal de partículas com aproximadamente 500 nm de diâmetro, observou-se uma absorção linfática significativa, no entanto, as partículas acumularam-se ao nível dos nódulos torácicos, mediastínicos e renais (Hanatani *et al.* 1995).

1.4.4. O interstício alveolar

No pulmão, o espaço intersticial estende-se por toda a matriz extracelular e pode, na região alveolar, representar a maior área de espaço intersticial a ser atingida com apenas uma administração de fármaco, limitando desta forma a elevada concentração de partículas na zona de aplicação.

O interstício alveolar apresenta ainda outra vantagem. A absorção linfática está dependente, como sabemos, da habilidade de macromoléculas ou colóides para atravessar barreiras biológicas. Em compartimentos como o pulmonar ou intestinal este fenómeno está particularmente limitado pela dinâmica do epitélio mucoso (Carter *et al.* 2006; Castella *et al.* 2005; Elder *et al.* 2005; Oberdorster 2002; Oberdorster *et al.* 2005). Pelo contrário, a ausência de mucosa no lúmen alveolar distingue esta área como uma via de administração de excelência para proteínas, péptidos e DNA.

Já foi referido que no espaço intersticial, em tecidos saudáveis, partículas coloidais são transportadas por difusão sob influência dos gradientes de concentração e do microfluxo do fluido, normalmente orientado para os canais linfáticos, num processo passivo que é função da produção de linfa (Hawley *et al.* 1995; Oussoren & Storm 2001). Contudo, na presença de processos inflamatórios ou durante o processo tumoral de crescimento e invasão dos tecidos adjacentes, verifica-se um desequilíbrio na drenagem linfática local (Illum *et al.* 2001; Maeda 1992). Este fenómeno provoca alterações significativas no microambiente da região afectada o que, aliado à estrutura dos vasos recém-formados, converge para o chamado efeito de permeabilidade e retenção (EPR) (Densmore 2003; Maeda *et al.* 2000). Nestas condições, partículas coloidais em circulação ou depositadas no tecido lesado, sofrem extravasão passiva para a matriz extracelular do tumor, o que consubstancia uma forma de veiculação selectiva de fármacos para células neoplásicas (Iyer *et al.* 2006; Shayan *et al.* 2006).

Igualmente interessante, poderá ser utilizar a veiculação para o sistema linfático, não apenas para o transporte de substâncias com actividade farmacológica ou antigénica, mas também como processo de transportar aos nódulos linfáticos compostos utilizados em imageologia (Illum *et al.* 2001; Kumagai *et al.* 2007).

Em síntese: da pesquisa realizada resultou a possibilidade de, neste contexto, a deposição no pulmão profundo de partículas inaladas ou instiladas representar a via mais favorável para atingir o interstício alveolar e, em consequência, veicular fármacos para a circulação linfática.

1.5. Paclitaxel

1.5.1. Os Taxanos com actividade terapêutica

Actualmente, áreas como a nanotecnologia dedicam uma fracção considerável da sua investigação ao desenvolvimento de novas formas farmacêuticas como sistemas de veiculação de fármacos já existentes no mercado (Couvreur & Vauthier 2006). O objectivo é o de condicionar a toxicidade do fármaco livre e, simultaneamente, concentrar a acção farmacológica no órgão alvo, alterando desta forma o respectivo valor de índice terapêutico (Hennenfent & Govindan 2006).

Entre os diversos agentes antineoplásicos candidatos a estabelecer complexos, com sistemas transportadores de fármaco para veiculação selectiva encontram-se os chamados fármacos que interferem com a tubulina. Constituem uma classe particularmente importante de agentes antineoplásicos que abrange o grupo dos taxanos, as epotilonas e os alcalóides da *vinca* (Beck *et al.* 2000; Jordan & Wilson 2004b; Kuppens 2006a). Os taxanos diterpenóides constituem um grupo de agentes antimetabólicos do qual fazem parte o paclitaxel (Ptx), um composto natural que representa um dos mais potentes agentes antineoplásicos e o docetaxel, um análogo semi-sintético que também apresenta elevada actividade citotóxica (Crown & O'Leary 2000). Devido ao seu potencial terapêutico, ambos têm sido objecto de um elevado número de estudos científicos que visam aumentar a sua eficácia (Jordan & Wilson 2004; Kuppens 2006a). Este

grupo de moléculas exerce a sua actividade farmacológica por interacção com os microtúbulos celulares, impedindo a despolimerização da tubulina e com isso a sua dinâmica funcional (Jordam & Wilson 2004; Kuppens 2006a; Vasey 2004). A actividade destes compostos, nomeadamente a indução de genes pró-inflamatórios, está igualmente a ser estudada para terapêutica de doenças auto-imunes, abrindo-se desta maneira uma linha mais recente de investigação para avaliação do potencial terapêutico dos taxanos (Fitzpatrick & Wheeler 2003).

1.5.2. Microtúbulos como alvo de agentes antineoplásicos

Os microtúbulos (Mtb) são macromoléculas integrantes do citoesqueleto da célula, cuja estrutura polimérica é predominantemente composta por dímeros de tubulina (α - e β -) (Amos 2004; Lodish *et al.* 1995). Os filamentos de duas cadeias de tubulina polimerizada dispõem-se paralelamente, ligados entre si por pontes de hidrogénio, o que lhes confere uma forma cilíndrica (Figura 1-7).

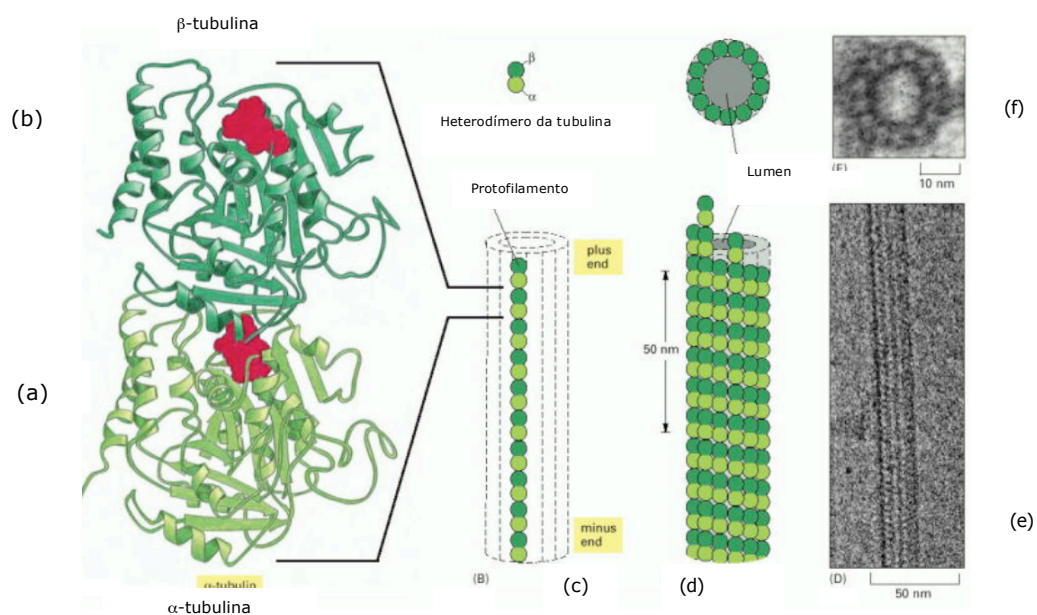


Figura 1-7: Representação esquemática da estrutura macromolecular dos microtúbulos: os protofilamentos são heterodímeros da tubulina constituída pelas subunidades α - (a) e β - (b). Arranjo dos dímeros de tubulina que originam heterodímeros, que se ligam entre si para formar os protofilamentos (c), o conjunto destes, em formação radial, origina a macromolécula (d). Microfotografia electrónica de secções de microtúbulos (e) e (f). Adaptado de: Molecular Biology of the Cell. GS fourth edition (2002) by Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and Peter Walter.

Durante o ciclo celular estas macromoléculas mantêm um equilíbrio dinâmico com as suas subunidades, isto é, consoante as condições da célula e a concentração dos dímeros livres, os microtúbulos polimerizam ou despolimerizam (Amos 2000; 2004).

Os Mtb exercem um papel determinante na mitose celular, embora também se reconheça o seu envolvimento em diferentes mecanismos da célula eucariota tais como a mobilidade, a manutenção da forma da célula e o transporte intracelular de metabolitos (Lodish *et al.* 1995).

Durante a fase M do ciclo celular, ou seja na mitose, a célula reorganiza-se. Os Mtb citoplasmáticos, parte integrante do citoesqueleto, formam o fuso mitótico. Esta estrutura bipolar, de elevada dinâmica, representa o centro dos fenómenos que se desenrolam durante a divisão mitótica: profase, metafase, anafase e telofase (Lodish *et al.* 1995).

A possibilidade de interferir com a dinâmica funcional dos microtúbulos, alterando o carácter hiperproliferativo das células neoplásicas, torna-os um alvo terapêutico de grande interesse (Jordam & Wilson 2004; Kuppens 2006a).

1.5.3. Paclitaxel (Ptx) versus Docetaxel

Os taxanos diterpenóides apresentam uma estrutura cíclica com vários anéis, que está intimamente ligada à actividade farmacológica exercida através de um mecanismo único a nível dos microtúbulos (Beck *et al.* 2000). Podem classificar-se como sendo ésteres de alcalóides, com um esqueleto de 20 carbonos, cuja estrutura apresenta um núcleo de três anéis característicos (Figura 1-9), esterificados no carbono C-13 e com um invulgar anel oxetano nos carbonos C-4 e C-5 (Beck *et al.* 2000).

Após internalização celular e em qualquer fase do ciclo celular, os taxanos ligam-se fortemente à subunidade- β da tubulina polimerizada (Figura 1-8), promovendo a polimerização e o alongamento dos microtúbulos a partir dos dímeros em solução, o que dá origem a filamentos longos associados lateralmente em forma de feixes (Jordan & Wilson 2004b). A presença destas estruturas, como os complexos estáveis de Ptx-microtúbulos, impede a progressão do ciclo celular, bloqueando a divisão da célula. Existem no entanto algumas diferenças entre os dois taxanos, no que respeita à

actividade farmacológica na célula (Gligorov & Lotz 2004). O alvo terapêutico do docetaxel (TAXOTERE®) é a organização do centrossoma, actuando este em três fases do ciclo celular: S/G2/M. O Ptx (TAXOL®), por sua vez, atinge o ciclo celular durante a formação do fuso mitótico, nas fases G2 e M (Gligorov & Lotz 2004; Miglietta *et al.* 2002).

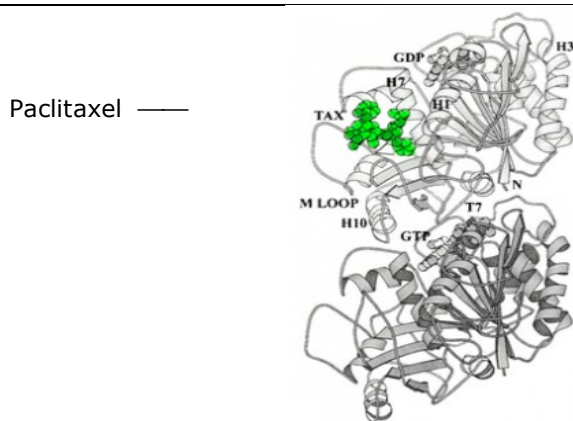


Figura 1-8: Representação esquemática da interacção entre a molécula de paclitaxel (verde) e a α -tubulina, um dímero estrutural dos Microtúbulos. Adaptado de: Nogales, E., *et al.*. (1995) Nature 375, 424-427.

As diferenças no mecanismo de acção e na estrutura das respectivas moléculas reflectem-se na eficiência terapêutica. Estudos comparativos revelaram que para algumas neoplasias a relação benefício-risco é mais vantajosa no caso do docetaxel, dado que apresenta maior tempo de semivida e cinética linear, o que permite uma maior flexibilidade nos esquemas terapêuticos (Crown *et al.* 2004; Gligorov & Lotz 2004; Hsu *et al.* 2004). No entanto, o paclitaxel continua a ser um dos agentes antineoplásicos com espectro de acção mais abrangente.

O paclitaxel (Ptx) é um composto de origem natural, o que condiciona a sua produção, uma vez que a fonte desta molécula está circunscrita à espécie *Taxus brevifolia*, vulgarmente denominada Teixo do Pacífico (cerca de 0,66 g/árvore). O processo de extracção apresenta baixo rendimento, cerca de 0,020-0,025% (m/m casca da árvore), o que aumenta as restrições à sua utilização, dado que esta é uma espécie de crescimento lento. Com o objectivo de encontrar novas fontes de taxanos, procuraram-se novas estratégias que incluem o recurso a culturas celulares (Seki & Furusaki 1996), ou a utilização de processos de semi-síntese a partir de precursores naturais.

Um exemplo da procura de alternativas é o caso da baccatina III, extraída das folhas de outras espécies de *Teixo*, que é utilizada como precursor da 10-desacetilbaccatina III (docetaxel) (Kuppens 2006a; Miglietta *et al.* 2002).

a. Actividade biológica

A molécula de Ptx é da família dos diterpenos tricíclicos, com fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$ (massa molecular: 853,92) e ponto de fusão de 216-217°C (Figura 1-9). A estrutura deste composto confere-lhe um carácter lipofílico, sendo portanto, uma substância pouco solúvel em solventes aquosos (0,3 a 0,7 µg/ml).

Está descrita a importância do grupo éster na posição C-13 da molécula na actividade farmacológica do paclitaxel. Também as posições C-2' e o C-3' parecem fundamentais na relação estrutura-actividade. O paclitaxel liga-se na proporção de 1 para 1 aos aminoácidos 31 N-terminais da subunidade β-tubulina dos oligómeros ou dos microtúbulos (Jordan & Wilson 2004a).

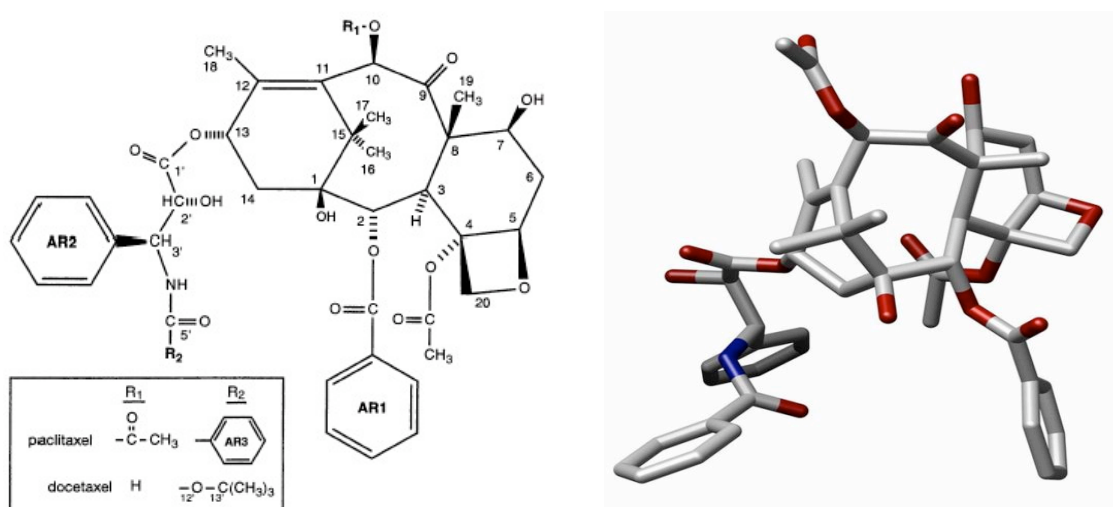


Figura 1-9: Estrutura da molécula de paclitaxel: $C_{47}H_{51}NO_{14}$ (MW=853.92). Estrutura cristalina da molécula de paclitaxel [tax-11-en-9-ona,5β,20-epoxy-1,2α,4,7β,10β,13α-hexahydroxy-4,10-diacetate-2-benzoate-13-(α-phenylhippurate)] [J. Löwe, H. Li, K. H. Downing and E. Nogales in the Journal of Molecular Biology, 2001, Volume 313, pages 1045-1057].

Dependendo da concentração intracelular de Ptx, as funções celulares conexas com esta macromolécula ficam afectadas, sendo no entanto o bloqueio da mitose celular o efeito mais importante.

Valores de Ptx entre 0,1 e 10 μM são geralmente reconhecidos como sendo a concentração farmacológica necessária para bloquear a dinâmica funcional de Mtb em culturas celulares (Kuppens 2006a).

Nas células, as velocidades de polimerização e despolimerização dos Mtb, bem como o intervalo entre os dois mecanismos, podem variar durante a mitose celular, dado que este é um processo rápido que exige mecanismos moleculares com elevada dinâmica (Amos 2000; 2004). De facto, no fim da interfase a reorganização do cito-esqueleto origina, já na mitose, um novo tipo de microtúbulos que são 4 a 100 vezes mais dinâmicos, dependendo do tipo de célula, processando-se as trocas entre os dímeros em solução e os polimerizados em cerca de 10 a 30 segundos. A energia livre de ligação ao paclitaxel é fraca, o que de alguma maneira favorece a taxa de polimerização; ao mesmo tempo que a despolimerização é fortemente afectada, nomeadamente por diminuição da constante de dissociação da tubulina (Jordan & Wilson 2004b). Ainda que seja reversível, este mecanismo produz um complexo Ptx-microtúbulo extremamente estável. Subsequente a este bloqueio, que impede a célula de progredir no ciclo mitótico durante a transição da metafase para a anafase, pode estar igualmente a indução da apoptose (Bhalla 2003; Huisman *et al.* 2002; Li *et al.* 2005).

Relativamente à actividade farmacológica, estão ainda descritas interacções deste fármaco com outros mecanismos a nível celular. Sabe-se que a exposição de células neoplásicas a concentrações de Ptx inferiores às consideradas farmacológicas (0,1-10 μM) estimula a actividade apoptótica e, simultaneamente, inibe a angiogénese e reduz a expressão do factor de crescimento vascular (VEGF) (Huisman *et al.* 2002; Li *et al.* 2005; Sunter *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003b; Wang *et al.* 2000). Igualmente, a estimulação da libertação pelos macrófagos de factores de necrose tumoral (TNF), a alteração da contractibilidade dos fibroblastos e a inibição da síntese de ADN são alguns dos mecanismos moleculares que podem ser activados pela presença de Ptx (Amos 2000; Jordan & Wilson 2004b).

b. Actividade farmacológica

Actualmente o Ptx é um dos principais agentes antineoplásicos a ser utilizado quer em monoterapia quer em associação (Kuppens 2006a). Inicialmente

indicado para o tratamento do carcinoma avançado do ovário e mama e, posteriormente, para o tumor de não pequenas células de pulmão e sarcoma de Kaposi, o alargamento da sua utilização a outras linhas celulares tem motivado a continuação de estudos com este fármaco.

O elevado número de ensaios clínicos actualmente a decorrer, relacionados com a actividade deste agente antineoplásico, na forma livre, conjugado com macromoléculas ou incorporado em sistemas de veiculação de fármacos, reflecte o potencial terapêutico do paclitaxel. Incluem-se nestes estudos o tumor de pequenas células do pulmão (Akerley 2000), as neoplasias do pescoço e cabeça (Schrijvers & Vermorken 2000), o melanoma (Legha *et al.* 1990), entre outros.

A resposta ao tratamento com Ptx varia consoante a natureza da célula neoplásica, as características da linha celular, o tecido que deu origem à massa tumoral, o órgão envolvido e a sua vizinhança. Esta dependência está relacionada com dois factores fundamentais: mutações resultantes da progressão da doença, com consequências na estrutura dos microtúbulos e fenómenos de resistência, decorrentes do facto de o Ptx ser um substrato da glicoproteína-P (Orr *et al.* 2003; Wood *et al.* 2001).

Num contexto de terapêutica celular ciclo-dependente é possível que, por vezes, a disponibilidade intracelular de fármaco seja insuficiente para exercer acção farmacológica (Drukman & Kavallaris 2002; Shah & Schwartz 2001). Este facto, que determina sobretudo a falência terapêutica, pode também provocar na célula fenómenos de resistência, associados principalmente à actividade da glicoproteína-P (Chavanpatil *et al.* 2006; Wood *et al.* 2001) (Dabholkar *et al.* 2006).

Embora com níveis de sensibilidade diferente, o Ptx demonstrou *in vitro* actividade frente a um elevado número de linhas celulares humanas de tumores sólidos, como se pode verificar na Tabela 1-4.

Tabela 1-4: Variação de valores de dose letal 50% (DL₅₀) em função da linha tumoral e do tempo de exposição. Em que: a = µg/ml (x0,85), nd = não determinado, h = horas, min = minutos, sm = semanas. Adaptado de Spencer and Faulds (1994) (Spencer & Faulds 1994).

Neoplasia (nomenclatura internacional)	DL₅₀ [nmol/L]^a (tempo de exposição)
Breast tumour tissue samples (n = 30)	4,91 (4 h)
Ovarian carcinoma tissue samples (n = 50)	0,2-2,7 (nd)
Sarcoma tissue samples (n = 5)	0,234 (nd)
Astrocytoma, grade III (U373)	4,2 (24 h)
Breast carcinoma (MCF-7)	7-10 (24 h)
Breast carcinoma (T47D, MCF-7, BT-20)	8-32 (90 min)
Breast carcinoma (MCF-7, T47D)	4,3 or 48,5 (90 min)
Breast adenocarcinoma (MCF-7)	2,5 (24 h)
Cervical carcinoma (Hela)	2,6 (24 h)
Cervical cancer (ME180, SIHA)	128 or 295 (90 min)
Colon carcinoma (HCT 116)	0,004 (72 h)
Colon carcinoma (Colo 201, HT29, SW1116)	0,43-3,05 (nd)
Colon adenocarcinoma (HT.29)	2,8 (24 h)
Endometrial adenocarcinoma (AE7, ECC1, HEC1A, HEC1B, AN3)	12,2-772,8 (90 min)
Gastric cancer (HM2, HM51)	100 or 200 (72 h)
Glioma (U87, U373, HBO)	280 (1 h) ou 29 (24 h)
Head and neck squamous cell carcinoma (UM-SCC-11B, UM-SCC-22B, UM-SCC-14C)	<0,001 (nd)
Leukaemia (CCRF-CEM)	4 (nd)
Lung carcinoma (H-125)	30 (nd)
Lung adenocarcinoma (A549)	4,1 (24 h)
Medulloblastoma (D324)	3,9 (1 sm)
Neuroblastoma (CHP100, CHP212, LAN-1)	0,61-3,10 (nd)
Non-small cell lung cancer (A459, H460, H322)	1,5-60 (16 h)
Non-small cell lung cancer (ABC-1, EBC-1)	6,91 or 7,89 (nd)
Ovarian carcinoma (TR170, JA-T, SKOV3, TR175)	0,53-9,95 (nd)
Ovarian carcinoma (OVCAR-5)	20 (nd)
Ovarian carcinoma (HXI62, SKOV-3, PXN/94, 41M, CH1, OVCAR-3)	13-110 (2 h) 0,5-2,8 (96 h)
Ovarian carcinoma (SHIN-3, MN-1)	500 or 900 (48 h)
Ovarian carcinoma (OVG-1)	4,0 (24 h)
Ovarian carcinoma (CAOV3, OVCAR3, SKOV3)	52,7-268,1 (90 min)
Pancreatic carcinoma (including MIA PaCa-2, PANC-1)	3-60 (nd)
Pancreatic adenocarcinoma (PC-Sh, PC-Zr)	4,0 or 7,5 (24 h)
Prostate cancer (hormone refractory; PC3, DU145, PC3M)	25,7-454,7 (nd)
Small cell lung cancer (SBC-2, SBC-3, SBC-4, SBC-7)	1,32-7,48 (nd)
Uterine leiomyosarcoma (SKUT1B)	283,4 (90 min)

Não obstante a importância dos factores enunciados, o estágio da doença, principalmente no que diz respeito à disseminação metastática, concorre de forma relevante para a eficácia do tratamento. Uma das principais questões relativamente à quimioterapia relaciona-se precisamente com a dificuldade em atingir células metastáticas circulantes. Embora por um mecanismo não totalmente esclarecido, a inibição da metastização tem sido associada à terapêutica com Taxol® (Wang *et al.* 2003a; Yin *et al.* 2006). Este facto pode ser parcialmente explicado pelo aumento da expressão da E-caderina, que se verifica em alguns tumores sólidos, como resposta à presença de Ptx (Johnson 1999; Wang *et al.* 2003b).

No entanto, esta é uma questão comum a todos os tumores malignos sólidos e a sua resolução está francamente dependente da via de administração, como referimos anteriormente.

Assim, no caso de não ocorrerem fenómenos de resistência e sempre que houver um diagnóstico precoce, é possível a regressão completa de um carcinoma sensível ao Ptx (Kuppens 2006a).

c. Taxol®

Actualmente o Taxol® (Bristol-Myers Squibb Co, Princeton, USA) é o medicamento de referência disponível a nível clínico. Embora já haja genéricos, apresentam-se igualmente sob a forma de solução concentrada para perfusão intravenosa contendo 6 mg/ml de paclitaxel, em veículo não aquoso, formado por uma mistura 1:1 de etanol anidro e Cremophor EL® (óleo de rícino polioxetilado).

Em Portugal, a terapêutica com Taxol®, em monoterapia ou em associação, está indicada para o tratamento de primeira e segunda linha do carcinoma avançado da mama, do carcinoma do ovário em estágio avançado e do sarcoma de Kaposi associado à SIDA após falência da terapêutica com antraciclina em lipossomas (Taxol® 2005). Também está indicada em combinação com a cisplatina para o tratamento de neoplasias pulmonares, em doentes para os quais não é possível a intervenção cirúrgica (Zhao *et al.* 2005). O tumor de pequenas células de pulmão e os carcinomas da cabeça e pescoço são exemplos de neoplasias malignas para as quais este agente tem sido igualmente utilizado (Schrijvers & Vermorken 2000).

Na última década sucederam-se estudos clínicos para testar esquemas terapêuticos alternativos, com o objectivo de contornar as limitações deste fármaco, nomeadamente a sua toxicidade (Kuppens 2006b). A avaliação de alternativas aos esquemas terapêuticos clássicos, utilizando em simultâneo fármacos com actividade sobre diferentes mecanismos celulares, tem vindo também a ser aplicada. De uma maneira geral, a combinação do Taxol[®] com compostos de platina, aplicada no tratamento de alguns carcinomas recorrentes, como o carcinoma da mama e do ovário, apresenta melhores resultados do que os obtidos com os compostos administrados isoladamente (Bremnes *et al.* 2001; Cortes *et al.* 2003). Resultados inovadores foram igualmente obtidos com a utilização de paclitaxel em paralelo com a administração do anticorpo monoclonal anti-HER-2 (Baselga *et al.* 1998; Hayes *et al.* 2007), ou após administração prévia de ciclosporina A (Koshkina *et al.* 2004).

A solução de Taxol[®] é administrada por perfusão intravenosa segundo diferentes protocolos terapêuticos. Antes de ser administrada, a solução deve ser diluída em cloreto de sódio a 0,9% (m/v) ou, em alternativa, numa solução de dextrose a 5% (m/v), de forma a obter concentrações de Ptx dentro do intervalo entre 0,03 a 0,6 mg/ml. A duração da perfusão pode ser de 3 a 24h, em doses calculadas com base na superfície corporal do doente, variando de 110 a 250mg/m² (Resumo das características do medicamento-TAXOL[®] - 2005).

De acordo com a generalidade dos autores, a farmacocinética do Ptx pode ser descrita segundo um modelo bi- ou tri-compartimental. A distribuição e a eliminação são saturáveis, em particular quando a dose é administrada num intervalo de tempo inferior a 6 horas, o que origina concentrações plasmáticas mais elevadas. O volume de distribuição no equilíbrio (V_{ss}) varia entre 200 a 700 L/m², o que traduz uma extensa distribuição extra-vascular, com excepção do sistema nervoso central. De uma maneira geral, após administração intravenosa, 90 a 98% do Ptx encontra-se ligado às proteínas plasmáticas. Cerca de 70 % do fármaco administrado é eliminado por via hepática (CYP2C8 e CYP3A4) e excretado na biliar, maioritariamente sob a forma de 6 α -dihidroxitaxol, o seu principal metabolito. Apenas cerca de 5 a 10% do fármaco sofre excreção renal na sua forma inalterada. Doses de 135

a 275mg/m², administradas por perfusão intravenosa durante 3 a 24 horas, originam concentrações plasmáticas máximas entre 0,2 a 13,0 µmol/L, com tempos de semi-vida de 6,5 a 23,6 horas (Taxol® 2005; Wagner *et al.* 1999).

Após administração intravenosa de Taxol®, a ocorrência de mielossupressão é sem dúvida o efeito secundário mais relevante. Os doentes apresentam neutropenia acentuada, assim como anemia e trombocitopenia. A ocorrência de efeitos adversos está dependente, não apenas da concentração plasmática de paclitaxel, mas também do protocolo de administração (Rowinsky 1994). Estão ainda descritas como reacções adversas a neuropatia periférica, a neuropatia grave e a parestesia, as mialgias, a fadiga, a alopecia, a diarreia, as mucosites e as alterações nas unhas (Crown & O'Leary 2000; Jordan & Wilson 2004b; Slichenmyer & Von Hoff 1991). A hipersensibilidade aguda, diagnosticada durante os ensaios clínicos de fase I, obrigou à necessidade de os doentes fazerem pré-medicação com corticosteróides, anti-histamínicos e bloqueadores dos receptores H₂.

Aparentemente, a toxicidade observada durante os ensaios clínicos com esta formulação é em parte atribuída ao agente solubilizante, o Cremophor EL™, presente numa concentração de 50% (v/v). A administração deste veículo tem sido associada a episódios de nefrotoxicidade, neurotoxicidade, vasodilatação, problemas respiratórios, letargia e hipotensão, entre outros (Slichenmyer & Von Hoff 1991).

Apesar da acção comprovada do Ptx frente a diversos tumores malignos, subsistem outros factores limitantes, não apenas relativos à toxicidade da formulação actual, que têm comprometido a sua utilização de forma mais generalizada. Destaca-se pela sua importância a falta de selectividade que, associada ao elevado volume de distribuição do fármaco após administração sistémica, determina o contacto do paclitaxel com tecidos não alvo, verificando-se deste modo a interrupção das funções vitais em células saudáveis (Kuppens 2006a).

A formulação de compostos pouco solúveis implica a opção por uma de duas estratégias. A primeira abordagem tem a ver com a síntese de derivados mais hidrofílicos ou de pró-fármacos e, neste caso, serviria essencialmente para substituir a utilização de Cremophor™ na preparação final (Choi & Jo

2004; Dhanikula & Panchagnula 2005b; Dosio *et al.* 1997; Greenwald *et al.* 1996; Pendri *et al.* 1998; Seligson *et al.* 2001). Apesar dos esforços desenvolvidos, poucas soluções demonstraram ser suficientemente estáveis para serem testadas em ensaios clínicos, mantendo assim a necessidade de desenvolver novas formulações de paclitaxel e, com isso, alterar o valor de índice terapêutico deste fármaco (Adriance-Mejia *et al.* 2002; Ceruti *et al.* 2000; Kuppens 2006a; Nuijen *et al.* 2001).

Adicionalmente, é possível recorrer ao desenho de sistemas heterofásicos tais como emulsões, dispersões micelares, sistemas lipídicos ou poliméricos (Hennenfent & Govindan 2006 ; Nuijen *et al.* 2001) ou, ainda, desenvolver conjugados de Ptx com macromoléculas (Tishler 2003). O objectivo destes sistemas não se limita à substituição do agente solubilizante, pretende também restringir a actividade do fármaco no organismo e limitar os efeitos sistémicos indesejáveis. A Tabela 1-5 resume os trabalhos mais relevantes, relativamente à eficácia de incorporação e retenção de Ptx, em veículos coloidais e conjugados de macromoléculas.

Os resultados obtidos com a produção de emulsões, SEDDS e SMEDDS foram francamente animadores, revelando estes de uma maneira geral uma elevada capacidade de carga do paclitaxel. Contudo, os ensaios *in vivo* demonstraram que nestas formulações a libertação do Ptx era demasiado rápida, o que implica uma elevada concentração de fármaco na sua forma livre (Kan *et al.* 1999; Rodrigues *et al.* 2005; Singla *et al.* 2002). Outros sistemas lipídicos desenvolvidos para incorporar Ptx foram os lipossomas e as nanopartículas lipídicas. Quanto aos lipossomas, sobretudo os *stealth* e os catiónicos, apresentam longos tempos de circulação, mas fraca capacidade de reter o fármaco. As nanopartículas lipídicas, por sua vez, apresentam uma capacidade de incorporação inferior, mas o fármaco permanece ligado à matriz por mais tempo.

Os sistemas poliméricos, de nano e micropartículas, têm-se destacado, pela elevada capacidade de incorporação e pela estabilidade ao longo do tempo.

Tabela 1-5: Exemplos de sistemas de veiculação selectiva desenvolvidos para incorporação de Paclitaxel.

Micelas SEDDS/SMEDDS		Emulsões / microemulsões		Lípidos
(Sharma & Straubinger 1994)	(Dhanikula <i>et al.</i> 2005)	(Lundberg 1997)	(Kan <i>et al.</i> 1999)	
(Crosasso <i>et al.</i> 2000)	(Huh <i>et al.</i> 2005)	(Constantinides <i>et al.</i> 2000)		
(Ceruti <i>et al.</i> 2000)	(Yang <i>et al.</i> 2007b)	(He <i>et al.</i> 2003; Rodrigues <i>et al.</i> 2002)		
(Koshkina <i>et al.</i> 2001)	(Yang <i>et al.</i> 2007a)	(Han <i>et al.</i> 2004)	(Rodrigues <i>et al.</i> 2005)	
(He <i>et al.</i> 2003)	(Zhang <i>et al.</i> 2006)	(Nornoo & Chow 2007)		
(Venkatraman <i>et al.</i> 2005)		(Nornoo <i>et al.</i> 2007)		
Lipossomas		SLN/Liposferas		
(Crosasso <i>et al.</i> 2000)	(Schmitt-Sody <i>et al.</i> 2003)	(Cavalli <i>et al.</i> 2000a)	(Rodrigues <i>et al.</i> 2002)	
(Kunstfeld <i>et al.</i> 2003)	(Strieth <i>et al.</i> 2004)	(Perkins <i>et al.</i> 2000b)	(Miglietta <i>et al.</i> 2000)	
(Dhanikula & Panchagnula 2005a)		(Videira <i>et al.</i> 2000)	(Stevens <i>et al.</i> 2004)	
(Straubinger & Balasubramanian 2005)		(Chen <i>et al.</i> 2001)	(Lee <i>et al.</i> 2007)	
Nano e micropartículas				
(Sharma <i>et al.</i> 1996)	(Mu & Feng 2003)	(Chipman <i>et al.</i> 2006)		
(Feng <i>et al.</i> 2000)	(Tishler 2003)	(Chavanpatil <i>et al.</i> 2006)		
(Feng & Huang 2001)	(Ooya <i>et al.</i> 2003)	(Gibson <i>et al.</i> 2007)		
(Mu & Feng 2001)	(Gupte & Ciftci 2004)	(Bonomi 2007)		
(Liggins & Burt 2001)	(Potineni <i>et al.</i> 2003)	(Devalapally <i>et al.</i> 2007)		
(Kim & Lee 2001)	(Kang <i>et al.</i> 2004)	(Bae <i>et al.</i> 2007)		
(Chandy <i>et al.</i> 2001)	(Liggins & Burt 2004a)	(Xie <i>et al.</i> 2007)		
(Fonseca <i>et al.</i> 2002)	(Liggins & Burt 2004b)	(Lu <i>et al.</i> 2007)		
(Feng <i>et al.</i> 2002)	(Feng <i>et al.</i> 2004)	(Dong & Feng 2007)		
(Mu & Feng 2002)	(Dong & Feng 2004)	(Westedt <i>et al.</i> 2007)		
(Nsereko & Amiji 2002)	(Xu <i>et al.</i> 2005)	(Jackson <i>et al.</i> 2007)		
(Ruan & Feng 2003)	(Singer <i>et al.</i> 2005)	(Bae <i>et al.</i> 2007)		
Sistemas Micelares				
(Zhang 1996)	(Kim <i>et al.</i> 2004)	(Negishi <i>et al.</i> 2006)		
(Miwa <i>et al.</i> 1998)	(Wang <i>et al.</i> 2005)	(Dabholkar <i>et al.</i> 2006)		
(Kim <i>et al.</i> 2001)	(Huh <i>et al.</i> 2005)	(Cai <i>et al.</i> 2007)		
(Liggins & Burt H 2002)	(Soga <i>et al.</i> 2005)	(Xie <i>et al.</i> 2007)		
(Cheon <i>et al.</i> 2003)	(Park <i>et al.</i> 2005)	(Li <i>et al.</i> 2007b)		
Conjugados de macromoléculas/ Imunoconjugados				
(Jaime & Page 2001)	(Torchilin <i>et al.</i> 2003)	(Yin <i>et al.</i> 2006)		
(Guillemard & Saragovi 2001)	(Gao <i>et al.</i> 2003)	(Menger <i>et al.</i> 2007)		
(Bradley <i>et al.</i> 2001)	(Safavy <i>et al.</i> 2003)	(Li <i>et al.</i> 2007a)		
(Ojima <i>et al.</i> 2002)	(Ooya <i>et al.</i> 2003)	(Auzenne <i>et al.</i> 2007)		
(Lee <i>et al.</i> 2002)	(Safavy & Raisch 2005)			
CyD	Albumina			
(Cserhati <i>et al.</i> 1995)	(Dosio <i>et al.</i> 1997)	(Altundag <i>et al.</i> 2006)	(Green <i>et al.</i> 2006)	
(Sharma <i>et al.</i> 1995)	(Dosio <i>et al.</i> 2001)	(Henderson & Bhatia 2007)		
(Bilensoy <i>et al.</i> 2007)	(Moreno-Aspitia & Perez 2005)	(Altundag <i>et al.</i> 2007)		
Pastas/Hidrogeles		Stents		
(Winternitz <i>et al.</i> 1996)	(Dordunoo <i>et al.</i> 1997)	(Bennett 2003)	(Ruchin <i>et al.</i> 2007)	
(Ruel-Gariepy <i>et al.</i> 2004)	(Shim <i>et al.</i> 2007)	(Bhatia <i>et al.</i> 2004)	(Liu <i>et al.</i> 2007) (Colombo 2007)	
Implantes/Filmes				
(Park <i>et al.</i> 1998)	(Shi & Burt 2004)	(Kraitzer & Zilberman 2007)		
(Jackson <i>et al.</i> 2004)	(Ho <i>et al.</i> 2005)	(Westedt <i>et al.</i> 2007)		
(Dhanikula & Panchagnula 2004)	(Elkharraz <i>et al.</i> 2006)	(Margolis <i>et al.</i> 2007)		
Diversos				

Nos últimos anos, a utilização de polímeros tem sido estendida à preparação de dispersões micelares. Entre as vantagens que estes sistemas apresentam salientam-se entre outras: (a) a capacidade de aumentar a solubilidade de moléculas pouco solúveis; (b) a possibilidade de manipular a superfície das partículas; (c) o perfil de libertação controlada do fármaco; (d) o facto de permitir associar ligandos à sua superfície; (e) obter com estes sistemas longos tempos de circulação; (f) a acumulação nos tecidos lesados (Torchilin 2007).

No que se refere ao Ptx, os sistemas micelares têm demonstrado uma elevada capacidade de solubilização, cerca de três vezes superior ao valor obtido com a mistura Cremophor:etanol, mas dispensando o uso destes solventes (Tabela 1-5). Utilizando como modelo linhas celulares humanas de adenocarcinoma mamário e carcinoma do ovário, Wang e colaboradores demonstraram *in vitro* as capacidades destes sistemas (Wang *et al.* 2005). A resposta nas duas linhas celulares estudadas foi significativamente superior com as micelas poliméricas carregadas positivamente (PEG-PE; ST; Lipofectin®)³ relativamente ao Ptx livre. A estrutura polimérica confere estabilidade física ao sistema, a natureza coloidal permite a acumulação em tecidos neoplásicos e a componente lipídica facilita a entrada nas células (Moghimi *et al.* 2001). A ausência de toxicidade permite administrar doses superiores de Ptx, aumentando a eficácia, sem aumentar os efeitos adversos. Os conjugados com agentes antineoplásicos, igualmente utilizando polímeros ou em substituição macromoléculas, têm sido amplamente difundidos. A sua complexação com moléculas activas resulta geralmente em conjugados estáveis e, dependendo do polímero utilizado, não reconhecíveis pelo sistema fagocitário mononuclear - MPS (mononuclear phagocyte system). Esta estratégia tem proporcionado alterações consideráveis no tempo de circulação destas entidades, o que aumenta a concentração de fármaco em regiões onde existe patologia (Duncan 2006; Rajni *et al.* 2006; Sinha *et al.* 2006).

³ Composição das micelas poliméricas: polietilenoglicol, fosfatidiletanolamina, traciogliceróis sólidos e uma mistura de lípidos com carga positiva.

Em estudos de fase III e II encontram-se, respectivamente, o DHA-Paclitaxel (Taxopresin®) e o Paclitaxel-Poligumex (Xiotax™)(Bonomi 2007; Chipman *et al.* 2006). O primeiro produto, correspondente a um complexo entre um ácido gordo natural (DHA-docosahexaenoic acid) e o paclitaxel, tem demonstrado elevada afinidade para células neoplásicas. No entanto, inclui como solvente a mistura Cremophor™/etanol, pelo que obriga a que se proceda à administração de pré-medicação, à semelhança do que se verifica com o Taxol® (Wolff *et al.* 2003). O segundo composto, formado pela ligação do paclitaxel ao ácido glutâmico, está em ensaios de fase II, frente ao carcinoma de não pequenas células do pulmão (Bonomi 2007; Singer *et al.* 2005).

Não obstante o número de trabalhos publicados, apenas em 2005 foi aprovada a introdução no mercado de um sistema de veiculação selectiva de paclitaxel: o ABI-007, comercializado com o nome de Abraxane™ (ABRAXANE(TM) 2007). Este produto, formado por um complexo albumina-paclitaxel, tornou-se o primeiro sistema a entrar no mercado com o objectivo de aumentar a selectividade e o tempo de exposição de células malignas ao paclitaxel (Altundag *et al.* 2006; Altundag *et al.* 2007; Green *et al.* 2006). O Abraxane™ apresenta um elevado índice terapêutico, devido à passagem facilitada pelo endotélio vascular, que decorre da activação de um receptor celular para a albumina, a glicoproteína gp60 (Green *et al.* 2006). As indicações terapêuticas foram dirigidas inicialmente ao tumor da mama disseminado ou recorrente, depois de terem falhado outros regimes terapêuticos (Altundag *et al.* 2006; Ibrahim *et al.* 2005; Moreno-Aspitia & Perez 2005). No entanto, há já resultados em fase avançada para atribuir a este sistema outras indicações, incluindo o tratamento de tumores epiteliais do pulmão (Green *et al.* 2006)

Os sistemas de lípidos sólidos podem constituir a resposta às limitações mencionadas. A incorporação de Ptx em nSLp dispensa a utilização de agente solubilizante e altera a distribuição do fármaco. O facto de a matriz ser aparentemente sólida concorre para uma maior capacidade de reter o fármaco. Por último, considera-se que o fármaco incorporado pode apresentar tendência para a acumulação nos tecidos onde existe neoplasia e, deste modo, tornar possível a alteração do seu índice terapêutico.

1.6. Neoplasia

Os tumores sólidos correspondem a cerca de 90% das neoplasias malignas. Durante a progressão da doença a grande maioria destes tumores desenvolve a capacidade de evoluir fenotipicamente, de invadir tecidos adjacentes e disseminar-se para regiões distantes por metastização. Estes factos evidenciam a necessidade de encontrar soluções terapêuticas mais eficazes (Jain 2001).

Ainda que a capacidade hiperproliferativa, a capacidade de extravasar para fora do tecido lesado e a habilidade em bloquear as vias apoptóticas seja comum à generalidade dos tumores, é necessário encontrar estratégias inovadoras capazes de detectar e tratar a doença à escala molecular (Portney & Ozkan 2006). A diversidade e heterogeneidade genotípica dos tumores, a par com as alterações moleculares que vão ocorrendo durante a progressão da doença, fazem variar enormemente o objecto da terapia (Gottesman *et al.* 2002; Hahn & Weinberg 2002).

As estratégias até hoje delineadas têm-se mostrado insuficientes, em parte porque à escala molecular existem mecanismos ainda por esclarecer que envolvem o desenvolvimento e progressão de alguns carcinomas, mas também, porque o estágio da doença condiciona as alternativas terapêuticas (Murray & Carmichael 1995; Zochbauer-Muller *et al.* 2002). Deste modo, a terapia selectiva, no que diz respeito à interacção do sistema nanoestruturado com os mecanismos moleculares, pode constituir uma abordagem capaz de anular o fenótipo de agressividade das células neoplásicas e, conseqüentemente, diminuir a taxa de mortalidade relacionada com a doença (Kommareddy & Amiji 2004). Neste contexto, além dos alvos convencionais, surgem como potenciais factores de aplicabilidade dos sistemas transportadores de fármacos a inibição dos factores promotores de angiogénese, a estimulação da síntese de p53, a interacção com receptores de membrana, a saturação da glicoproteína-P e a interacção com proteínas pró-apoptóticas, entre outros alvos moleculares (Maeda 1992; Portney & Ozkan 2006; Sun *et al.* 2007; Thorpe 2004).

A maioria dos agentes quimioterápicos, entre os quais se inclui o Paclitaxel, apresenta um índice terapêutico desfavorável (≈ 1), para o qual contribui

O grandemente a falta de selectividade do fármaco relativamente às células neoplásicas. Estratégias que envolvem a modificação da biodistribuição destes agentes, entre as quais se incluem a conjugação de fármacos com macromoléculas ou o desenvolvimento de sistemas de veiculação selectiva, têm demonstrado ser fundamentais para uma maior eficácia terapêutica (Allen 2002; Duncan 2006; Feng & Chien 2003; Pendri *et al.* 1998; Sinha *et al.* 2006; Torchilin 2006a) .

Actualmente a terapêutica farmacológica em oncologia tem como alvo vários mecanismos bioquímicos fundamentais para o ciclo celular; comum a todas as abordagens está um só objectivo: a morte das células tumorais (Dubernet *et al.* 2000; Feng & Chien 2003; Ferrari 2005a; Rajni *et al.* 2006).

O carcinoma do pulmão é uma doença bastante heterogénea do ponto de vista genético, não só no que se refere aos tumores primários como também às metástases com origem em tumores extra-pulmonares (Cersosimo 2002; Johnson & Minna 1994; Zochbauer-Muller *et al.* 2002). Em todo o caso, quando a doença se encontra disseminada, embora não estando indicado como fármaco de primeira linha, o paclitaxel em combinação com a cisplatina tem sido um dos agentes anti-neoplásicos mais frequentemente utilizados em tratamentos de segunda linha, sendo parte da sua actividade atribuída à indução da apoptose (Huisman *et al.* 2002; Li *et al.* 2005; Murray & Turrisi 2006).

Para a generalidade das doenças neoplásicas, a actividade hiperproliferativa está associada a uma instabilidade nos mecanismos que regulam a morte celular programada (Vermeulen *et al.* 2005). Pelo que é de todo o interesse, que a resposta a agentes quimioterápicos, ainda que esta possa não constituir o mecanismo de acção primário destes, corresponda também a uma activação directa ou indirecta deste mecanismo. O papel das vias apoptóticas tem sido por isso investigado em vários tumores, como no caso, do tumor de não pequenas células do pulmão e do carcinoma da mama, através da avaliação da expressão de proteínas intracelulares, relacionadas com os mecanismos apoptóticos (Shivapurkar *et al.* 2003; Singhal *et al.* 2005; Sunters *et al.* 2003).

Um aspecto importante relacionado com a apoptose com envolvimento mitocondrial, ou seja, pela via intrínseca, prende-se com a relação deste

fenómeno com situações de *stress* celular, entre os quais se pode incluir o bloqueio da dinâmica dos microtúbulos, induzido pela exposição ao Ptx (Huisman *et al.* 2002).

No entanto, este padrão de resposta celular tem sido relacionado sobretudo com a presença da forma “*wild type*” da *p53*, um gene supressor de tumores, responsável pela síntese da proteína p53, fundamental na reparação do DNA e na regulação da síntese de diversas proteínas, das quais se destaca a Bax, uma proteína pró-apoptótica (De Feudis *et al.* 2000; Giannakakou *et al.* 2001; Viktorsson *et al.* 2005).

Embora aparentemente a perda do alelo “*wild Type*” do *p53* seja comum na maioria dos casos de carcinoma do pulmão (NSCLC e SCLC), há indícios que, mesmo nestes casos, a sensibilidade ao paclitaxel é determinada pelo genótipo da célula e, de uma forma geral, consubstancia-se no aumento da proteína bax e consequentemente na activação das vias apoptóticas (Das *et al.* 2001).

1.6.1. Carcinoma do pulmão

Às neoplasias pulmonares, primárias ou resultantes da fixação de metástases de carcinomas extrapulmonares, está associada uma elevada morbidade e mortalidade, constituindo uma das patologias mais agressivas na área de oncologia. Os dados da OMS revelam que cerca de 1/5 da população mundial pode vir a desenvolver esta doença, dependendo não apenas do contacto directo com agentes cancerígenos, mas também do sexo, da idade e do tipo de vida do paciente⁴.

A designação de carcinoma do pulmão engloba diferentes tumores malignos pulmonares, como o adenocarcinoma, o tumor de grandes células, o carcinoma de células escamosas (epidermóide) e o tumor de pequenas células, constituindo este último cerca de 20 a 25% dos novos casos (Cersosimo 2002; Cordeiro 1995; Johnson & Minna 1994). Entre estes, destaca-se pelo seu fenótipo o tumor de pequenas células do pulmão (Small Cell Lung Câncer-SCLC) (Johnson & Minna 1994). Trata-se de um tumor sólido endócrino, ao qual está associado uma mortalidade de cerca de 90%,

⁴ www.who.int/gender/documents/en/lungcancerlow.pdf; Janeiro de 2008

com uma taxa média de sobrevivência de 5 anos, em 10 a 20% dos doentes com diagnóstico de doença localizada e após regimes combinados de quimioterapia (Zochbauer-Muller *et al.* 2002). A rápida evolução metastática em estágios iniciais da doença constitui a principal causa da agressividade deste tumor epitelial, no qual apenas 3 a 5% dos doentes sobrevivem mais de 2 anos (Zangemeister-Wittke & Stahel 1999). Após diagnóstico de metástases extra-torácicas, o tempo médio de sobrevivência é de 5 semanas, para os doentes sem terapêutica e de 8 a 12 meses nos doentes sujeitos a tratamento (Clark & Ihde 1998; Zochbauer-Muller *et al.* 2002).

A localização do tumor na zona periférica dos bronquíolos, a dimensão e as propriedades histológicas das células tumorais do SCLC são as causas que determinam a precoce disseminação sistémica, inicialmente na zona do hemitórax e nódulos linfáticos pulmonares, para posteriormente alastrar, quer através do sistema linfático quer mesmo pela circulação sanguínea (Chen *et al.* 1996; Clark & Ihde 1998; Haque 1991; Zangemeister-Wittke & Stahel 1999).

Numerosos estudos evidenciaram a relação entre o sistema linfático e a progressão tumoral, o que significa que a circulação pelo sistema linfático é, porventura, a via mais representativa no transporte de micrometástases com origem em tumores primários (Shayan *et al.* 2006; Shimizu 2006).

Pela estrutura anteriormente descrita, torna-se claro que os nódulos linfáticos que se encontram ao longo das vias de drenagem podem constituir um alvo interessante na terapia oncológica. Este processo está fortemente dependente do envolvimento dos nódulos linfáticos e da drenagem linfática pulmonar (Nishioka & Yoshino 2001).

Por outro lado, tumores primários de órgãos que se situam na vizinhança da circulação linfática apresentam, em estadios avançados, desenvolvimento de neoplasia nos pulmões por fixação de metástases na região pulmonar, o que significa que o sistema linfático e o sistema sanguíneo estão intimamente envolvidos no transporte e disseminação de células neoplásicas.

Em comum, estas patologias apresentam o facto de as células malignas que lhes dão origem se instalarem na região do pulmão profundo, onde o acesso dos fármacos é limitado. Por este motivo, estes tumores estão

frequentemente associados a taxas de sobrevivência reduzidas, uma vez que a resposta à quimioterapia convencional é fraca ou mesmo nula.

Os tumores epiteliais malignos broncopulmonares (Shimizu 2006) e a disseminação de metástases, pulmonares ou extratorácicas, apresentam um quadro de dispersão relacionado com a dinâmica da região torácica e com a proximidade dos gânglios mediastínicos (Cersosimo 2002; Johnson & Minna 1994; Shimizu 2006). A associação de diferentes modalidades terapêuticas, como a quimioterapia isolada ou associada à radioterapia, a excisão da zona pulmonar afectada e o uso de fármacos com diferentes mecanismos de acção, têm constituído uma abordagem com algum impacto no prognóstico de doentes com neoplasia pulmonar (Cersosimo 2002). No entanto, apesar dos avanços nesta área, a mortalidade e a taxa de sobrevivência associada às neoplasias do pulmão profundo e aos tumores disseminados na superfície pulmonar é baixa. Este aspecto, bem como os riscos associados a uma recessão pulmonar, obrigam a considerar novos sistemas terapêuticos susceptíveis de melhorar o índice terapêutico dos fármacos convencionais. A utilização de sistemas transportadores pode alterar de forma significativa este parâmetro (Feng & Chien 2003; Moghimi *et al.* 2001), sobretudo se associada à administração regional pulmonar (Densmore 2003; Gautam *et al.* 2002; Knight 1999). No entanto, o combate à doença disseminada, tendo como base o desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos, representa um desafio para a nanomedicina (Portney & Ozkan 2006; Sun *et al.* 2007).

Já o afirmamos anteriormente, mas importa reiterar, que a este objectivo está subjacente a localização e acumulação do agente antineoplásico na região do tumor. O desenvolvimento de nanotransportadores tem na sua génese este conceito: direccionar o fármaco de modo a que este apresente afinidade para determinada região do organismo (Feng & Chien 2003; Ferrari 2005b; Nie *et al.* 2007). Para a escolha do sistema de veiculação e da via de administração é necessário considerar as barreiras fisiológicas a ultrapassar. A concentração de fármaco nas células-alvo tende ainda a ser incrementada por um mecanismo que assenta na subsequente extravasão passiva dos sistemas transportadores, do sistema circulatório para o interstício do tumor, com base no efeito EPR (Dreher *et al.* 2006; Iyer *et al.* 2006; Maeda *et al.* 2000).

No caso de tumores sólidos, a região lesada apresenta características próprias que podem ser utilizadas para aumentar a afinidade do transportador, como por exemplo as proteínas sobreexpressas à superfície da membrana citoplasmática ou na matriz extracelular (Jain 2001). Apesar de estes factores constituírem um estratégia promissora, a resposta ao tratamento pode ser pobre, especialmente quando a célula já adquiriu um fenótipo muito agressivo.

De facto, hoje em dia a maioria das estratégias adoptadas em terapêutica oncológica, mesmo que incluam a veiculação direccionada, não tem uma abordagem eficaz, no que se refere à propagação de metástases e micrometastases através do sistema linfático (Murray & Carmichael 1995; Shayan *et al.* 2006; Witte *et al.* 2006). Um sistema candidato à terapêutica oncológica deverá ser capaz de invadir, também ele, o sistema linfático adjacente, por onde aliás se movimentam as micrometástases (Shayan *et al.* 2006; Shimizu 2006). As partículas desenvolvidas com base em lípidos sólidos oferecem, com base no seu diâmetro e na lipofilia, grandes potencialidades terapêuticas na área da oncologia; daí o interesse que têm suscitado nas últimas décadas (Almeida *et al.* 2004; Hodoshima *et al.* 1997; Muller *et al.* 2000; Wang *et al.* 2007).

O desenvolvimento de vectores linfotrópicos e o estudo do seu perfil de biodistribuição é o objectivo deste trabalho. As características inovadoras que a nebulização de partículas coloidais com agentes citotóxicos comporta são igualmente avaliadas. Os estudos de eficácia da vectorização de fármacos antineoplásicos em modelos animais pretendem viabilizar, através da aquisição de dados experimentais, a transposição de conhecimento para a aplicação clínica dos sistemas desenvolvidos.

1.7. Objectivos

Este estudo pretende desenvolver sistemas de partículas lipídicas nanométricas, capazes de vectorizar fármacos para terapêutica e diagnóstico imageológico associados à circulação linfática pulmonar.

Em conjunto com o desenvolvimento tecnológico está a caracterização físico-química destes sistemas, antes e depois da incorporação do fármaco, bem como estudos *in vivo* de biodistribuição e de eficiência terapêutica.

O trabalho apresentado foi dividido em quatro fases e é apresentado em 5 capítulos.

O primeiro corresponde ao estado da arte, relativamente aos sistemas transportadores de agentes antineoplásicos e à inalação como via de administração pulmonar.

O capítulo 2 é dedicado ao desenvolvimento de nanopartículas lipídicas semi-sólidas, nsLp, por um processo de emulsificação/solidificação. A caracterização das partículas preparadas é igualmente objecto de estudo. Aborda-se um método de preparação alternativo aos descritos na literatura e são determinados os efeitos do processo e da composição do sistema nas características das partículas formadas.

A encapsulação de agentes anticancerígenos para terapêutica oncológica em vectores coloidais é uma das formas propostas para prolongar a sua eficácia, concentrando o fármaco no local de acção e diminuindo, nomeadamente nos órgãos saudáveis, a toxicidade característica destes agentes. Deste modo, no capítulo 3 a biodistribuição após administração pulmonar de partículas desenvolvidas sem fármaco foi avaliada utilizando um marcador de emissão gama.

O capítulo 4 é dedicado à incorporação do fármaco no veículo coloidal desenvolvido. Neste, avaliou-se a capacidade das nanopartículas em reter o Ptx, a estabilidade das preparações ao longo do tempo e a influência da presença do fármaco nas características das nanopartículas nsLp-Ptx.

No capítulo 5, tendo em consideração que a incorporação de agentes antineoplásicos em vectores coloidais é uma das formas propostas para aumentar o seu índice terapêutico, determinou-se a eficácia citotóxica do complexo nsLp-Ptx em linhas celulares de carcinoma da mama em ratinho (MXT-B2). O efeito terapêutico obtido por inalação do sistema desenvolvido foi também avaliado.

1.8. Bibliografia

- ABRAXANE(TM). 2007. Resumo das Características do Medicamento. *Abraxis BioScience Inc.*
- Adams WM, Dubeilzig R. 1978. Diffuse pulmonary alveolar septal metastases from mammary carcinoma in the dog. *J Am Vet Radiol Soc* 19:161-7
- Adriance-Mejia D, Benavidez S, Flynn T, Wells R. 2002. Alternative Formulations for the Anti-Cancer Drug Ptx (Taxol). *Cancer Treat Rev* 23:87-95
- Agu RU, Ugwoke MI, Armand M, Kinget R, Verbeke N. 2001. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respir Res* 2:198-209
- Akerley W, III. 2000. Paclitaxel in advanced non-small cell lung cancer : an alternative high-dose weekly schedule. *Chest* 117:152S-5S
- Allen TM. 1997a. Liposomes: Opportunities in drug delivery. *Drugs* 54:8-14
- Allen TM. 1997b. Liposomes. Opportunities in drug delivery. *Drugs* 54 Suppl 4:8-14
- Allen TM. 2002. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2:750-63
- Almeida AJ, Runge S, Muller RH. 1997. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN™): influence of production parameters. *Int J Pharm* 149:255-65
- Almeida AJ, Toscano C, Videira M. 2004. Therapeutic applications of lipid nanoparticles administered by alternative routes. In *Proc. XII International Workshop on Bioencapsulation* ed. JL Pedraz, Orive, G., Poncelet, D., pp. 69-72. (Vitória, Espanha)
- Alonso MJ. 2004. Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*:168-72
- Altundag K, Bulut N, Dizdar O, Harputluoglu H. 2006. Albumin-Bound Paclitaxel, ABI-007 May Show Better Efficacy Than Paclitaxel in Basal-Like Breast Cancers: Association Between Caveolin-1 Expression and ABI-007. *Breast Cancer Res Treat* 100:329-30
- Altundag K, Dede DS, Purnak T. 2007. Albumin-Bound Paclitaxel (ABI-007; Abraxane) in the Management of Basal-Like Breast Carcinoma. *J Clin Pathol* 60:958
- Amos LA. 2000. Focusing-in on microtubules. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 10:236-41
- Amos LA. 2004. Microtubule structure and its stabilisation. *Org.Biomol.Chem.* 2:2153-60
- Antipov AA, Sukhorukov GB. 2004. Polyelectrolyte multilayer capsules as vehicles with tunable permeability. *Adv Colloid Interface Sci* 111:49-61
- Arensman JB, Dominik JW, Hilmas DE. 1977. Effects of small-particle aerosols of rimantadine and ribavirin on arterial blood pH and gas tensions and lung water content of A2 influenza-infected mice. *Antimicrob Agents Chemother* 12:40-6
- Aulton M, Collett DM. 2002. *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*. Edinburgh: Churchill Livingstone
- Auzenne E, Ghosh SC, Khodadadian M, Rivera B, Farquhar D, et al.. 2007. Hyaluronic Acid-Paclitaxel: Antitumor Efficacy Against CD44(+) Human Ovarian Carcinoma Xenografts. *Neoplasia* 9:479-86
- Bae KH, Lee Y, Park TG. 2007. Oil-Encapsulating PEO-PPO-PEO/PEG Shell Cross-Linked Nanocapsules for Target-Specific Delivery of Paclitaxel. *Biomacromolecules* 8:650-6
- Barratt GM. 2000. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm Sci Technolo Today* 3:163-71
- Barret EB. 2004. Nanosuspensions in Drug Delivery. *Nature Reviews* 3:785-96
- Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y, Mendelsohn J. 1998. Recombinant Humanized Anti-HER2 Antibody (Herceptin) enhances the Antitumor Activity of Paclitaxel and

- Doxorubicin against HER2/neu Overexpressing Human Breast Cancer Xenografts. *Cancer Research* 58:2825-31
- Beck WT, Cass CE, Houghton PJ. 2000. Microtubule-targeting anticancer drugs derived from plants and microbes: vinca alkaloids, taxanes and epothilones. In *Cancer Medicine*, pp. 687-91
- Bekerman T, Golenser J, Domb A. 2004. Cyclosporin nanoparticulate lipospheres for oral administration. *J Pharm Sci* 93:1264-70
- Bennett M. 2003. In-Stent Stenosis: Pathology and Implications for the Development of Drug Eluting Stents. *Heart* 89:218-24
- Bezdicsek P, Crystal R. 1991. Pulmonary macrophages. In *The Lung: Scientific Foundations*, ed. RG Crystal, JB West, NS Cherniack, ER Weibel. New York: Raven Press
- Bhalla KN. 2003. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* 22:9075-86
- Bhatia V, Bhatia R, Dhindsa M. 2004. Drug-Eluting Stents: New Era and New Concerns. *Postgrad Med J* 80:13-8
- Bienenstock J, Johnston N, Perey DY. 1973. Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. *Lab Invest* 28:686-92
- Bilensoy E, Gurkaynak O, Dogan AL, Hincal AA. 2007. Safety and Efficacy of Amphiphilic β -cyclodextrin Nanoparticles for Paclitaxel Delivery. *Int J Pharm* 347:163-70
- Blasi P, Giovagnoli S, Schoubben A, Ricci M, Rossi C. 2007. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 59:454-77
- Block LH. 1989. *Emulsions and microemulsions*. New York: Marcel Dekker Inc. 335-78 pp.
- Blumer C, Mader K. 2005. Isostatic ultra-high-pressure effects on supercooled melts in colloidal triglyceride dispersions. *Pharm Res* 22:1708-15
- Bodega F, Agostoni E. 2004. Contribution of lymphatic drainage through stomata to albumin removal from pleural space. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 142:251-63
- Bonomi P. 2007. Paclitaxel Poliglumex (PPX, CT-2103): Macromolecular Medicine for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 7:415-22
- Botelho MF, Gomes CM, Marques MA, Lima JJP, Baganha MF. 1999. Drenagem linfática pulmonar. Estudo experimental. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 518
- Bowtle W. 2000. Lipid formulations for oral drug delivery. *Pharmaceutical Technology Europe* 12:20-30
- Bradley M, Webb NL, Anthony FH, Devanesan P, Witman PA, et al.. 2001. Tumor Targeting by Covalent Conjugation of a Natural Fatty Acid to Paclitaxel. *Clin Cancer Res* 7:3229-38
- Brain JD, Valberg PA. 1979. Deposition of aerosol in the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 120:1325-73
- Brannon-Peppas L, Blanchette JO. 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 56:1649-59
- Bremnes RM, Sundstrm S, Vilsvik J, Aaseb U. 2001. Multicenter Phase II Trial of Paclitaxel, Cisplatin and Etoposide With Concurrent Radiation for Limited-Stage Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 19:3532-8
- Bunjes H, Drechsler M, Koch MH, Westesen K. 2001. Incorporation of the model drug ubidecarenone into solid lipid nanoparticles. *Pharm Res* 18:287-93
- Bunjes H, Koch MH, Westesen K. 2000. Effect of Particle Size on Colloidal Solid Triglycerides. *Langmuir* 16:5234-41
- Bunjes H, Koch MH, Westesen K. 2002. Effect of surfactants on the crystallization and polymorphism of lipid nanoparticles. *Prog Colloid Polym Sci* 121:7-10
- Bunjes H, Siekmann B. 2006. Manufacture, Characterization and Applications of Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems. In *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, ed. S Benita, pp. 213-68

- Bunjes H, Siekmann B, Westesen K. 1998. Emulsions of super-cooled melts – A novel drug delivery system. In *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*, ed. S Benita, pp. 175-204. Switzerland: Harwood Academic Publishers
- Bunjes H, Unruh T. 2007. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv Drug Deliv Rev* 59:379-402
- Byron PR, Patton JS. 1994. Drug Delivery Via The Respiratory Tract. *J Aerosol Med* 7:49-75
- Cai S, Vijayan K, Cheng D, Lima EM, Discher DE. 2007. Micelles of Different Morphologies-Advantages of Worm-Like Filomicelles of PEO-PCL in Paclitaxel Delivery. *Pharm Res* 24:2099-109
- Carter JM, Corson N, Driscoll KE, Elder A, Finkelstein JN, *et al.*. 2006. A comparative dose-related response of several key pro- and antiinflammatory mediators in the lungs of rats, mice, and hamsters after subchronic inhalation of carbon black. *J Occup Environ Med* 48:1265-78
- Castella JV, Donato MT, Gomes-Lechón MJ. 2005. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Patho* 57:189-204
- Castelli F, Puglia C, Sarpietro M, Rizza L, Bonina F. 2005. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics* 304:231-8
- Cavalli R, Bargoni A, Podio V, Muntoni E, Zara GP, Gasco MR. 2003. Duodenal administration of solid lipid nanoparticles loaded with different percentages of tobramycin. *J Pharm Sci* 92:1085-94
- Cavalli R, Bocca C, Miglietta A, Caputo O, Gasco MR. 1999a. Albumin adsorption on stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. *S.T.P. Pharma Sci.* 9:183-9
- Cavalli R, Caputo O, Gasco MR. 2000a. Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur.J.Pharm.Sci.* 10:305-9
- Cavalli R, Gasco MR, Chetoni P, Burgalassi S, Saettone MF. 2002. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int J Pharm* 238:241-5
- Cavalli R, Marengo E, Rodriguez L, Gasco M. 1996. Effects of some experimental factors on the production process of solid lipid nanoparticles. *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43:110-5
- Cavalli R, Peira E, Caputo O, Gasco MR. 1999b. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with beta-cyclodextrins. *Int J Pharm* 182:59-69
- Cavalli R, Zara GP, Caputo O, Bargoni A, Fundaro A, Gasco MR. 2000b. Transmucosal transport of tobramycin incorporated in SLN after duodenal administration to rats. Part I-a pharmacokinetic study. *Pharmacol. Res.* 42:541-5
- Cersosimo R. 2002. Lung cancer: a review. *American Journal of Health-System Pharmacy* 59:611-42
- Ceruti M, Crosasso P, Brusa P, Arpicco S, Dosio F, Cattel L. 2000. Preparation, Characterization, Cytotoxicity and Pharmacokinetics of Liposomes Containing Water-Soluble Prodrugs of Paclitaxel. *J Control Release* 63:141-53
- Chandy T, Rao GH, Wilson RF, Das GS. 2001. Development of Poly(Lactic Acid)/Chitosan Co-Matrix Microspheres: Controlled Release of Taxol-Heparin for Preventing Restenosis. *Drug Deliv* 8:77-86
- Charman WN. 2000. Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts. *J Pharm Sci* 89:967-78
- Chavanpatil MD, Patil Y, Panyam J. 2006. Susceptibility of nanoparticle-encapsulated paclitaxel to P-glycoprotein-mediated drug efflux. *Int J Pharm* 320:150-6
- Chen D, Yang TZ, Lu WL, Zhang Q. 2001. In Vitro and in Vivo Study of Two Types of Long-Circulating Solid Lipid Nanoparticles Containing Paclitaxel. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 49:1444-7

- Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, *et al.*. 1996. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 2:1033-5
- Cheon LS, Kim C, Chan KI, Chung H, Young JS. 2003. Polymeric Micelles of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)-Block-Poly(Epsilon-Caprolactone) Copolymer as a Carrier for Paclitaxel. *J. Control Release* 89:437-46
- Cheung DO, Halsey K, Speert DP. 2000. Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 68:4585-92
- Chipman S, Oldham FB, Pezzoni G, Singer JW. 2006. Biological and Clinical Characterization of Paclitaxel Poliglumex (PPX, CT-2103), a Macromolecular Polymer-Drug Conjugate. *Int J Nanomedicine* 1:375-83
- Choi JS, Jo BW. 2004. Enhanced paclitaxel bioavailability after oral administration of pegylated paclitaxel prodrug for oral delivery in rats. *Int.J.Pharm.* 280:221-7
- Clark R, Ihde DC. 1998. Small-cell lung cancer: treatment progress and prospects. *Oncology (Williston Park)* 12:647-58; discussion 61-3
- Colombo A. 2007. Polymer-Based Paclitaxel-Eluting Stents Implantation in Unprotected Left Main. *Catheter Cardiovasc Interv* 69:378-9
- Constantinides PP, Lambert KJ, Tustian AK, Schneider B, Lalji S, *et al.*. 2000. Formulation development and antitumor activity of a filter-sterilizable emulsion of paclitaxel. *Pharm.Res.* 17:175-82
- Cordeiro AJSR. 1995. *Pneumologia Fundamental*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian
- Corry D, Kulkarni P, Lipscomb MF. 1984. The migration of bronchoalveolar macrophages into hilar lymph nodes. *Am J Pathol* 115:321-8
- Cortes J, Rodriguez J, Aramendia JM, Salgado E, Gurrpide A, *et al.*. 2003. Front-Line Paclitaxel/Cisplatin-Based Chemotherapy in Brain Metastases from Non-Small-Cell Lung Cancer. *Oncology* 64:28-35
- Courrier HM, Butz N, Vandamme TF. 2002. Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 19:425-98
- Couvreur P, Vauthier C. 2006. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharmaceutical Research* 23:1417-50
- Crosasso P, Ceruti M, Brusa P, Arpicco S, Dosio F, Cattel L. 2000. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *J.Control Release* 63:19-30
- Crown J, O'Leary M. 2000. The taxanes: an update. *Lancet* 355:1176-8
- Crown J, O'Leary M, Ooi WS. 2004. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *Oncologist* 9 Suppl 2:24-32
- Crystal RG. 1991a. Alveolar macrophages. In *The Lung: Scientific Foundations*, ed. RG Crystal, JB West, NS Cherniack, ER Weibel, pp. 527-38. New York: Raven Press
- Crystal RG. 1991b. *The Lung: Scientific Foundations*. New York: Raven Press
- Cserhati T, Forgacs E, Hollo J. 1995. Interaction of taxol and other anticancer drugs with alpha-cyclodextrin. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 13:533-41
- Cuenca AG, Jiang H, Hochwald SN, Delano M, Cance WG, Grobmyer SR. 2006. Emerging Implications of Nanotechnology on Câncer Diagnostics and Tehrapeutics. *Cancer* 107:459-66
- Dabholkar RD, Sawant RM, Mongayt DA, Devarajan PV, Torchilin VP. 2006. Polyethylene Glycol-Phosphatidylethanolamine Conjugate (PEG-PE)-Based Mixed Micelles: Some Properties, Loading With Paclitaxel, and Modulation of P-Glycoprotein-Mediated Efflux. *Int. J. Pharm.* 315:148-57
- Dailey LA, Schmehl T, Gessler T, Wittmar M, Grimminger F, *et al.*. 2003. Nebulization of biodegradable nanoparticles: impact of nebulizer technology and nanoparticle characteristics on aerosol features. *J. Control Release* 86:131-44

- Danelishvili L, McGarvey J, Li YJ, Bermudez LE. 2003. Mycobacterium tuberculosis infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell Microbiol* 5:649-60
- Das G, Holiday D, Gallardo R, Haas C. 2001. Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Letter* 165:147-53
- Davis SS. 2004. Coming of age of lipid-based drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 56:1241-2
- De Feudis P, Vignati S, Rossi C, Mincioni T, Giavazzi R, et al.. 2000. Driving p53 Response to Bax Activation Greatly Enhances Sensitivity to Taxol by Inducing Massive Apoptosis. *Neoplasia* 2:202-7
- Demo P, Sveshnikov AM, Nitsch K, Rodová M, Kožíšek Z. 2003. Determination Of Time Characteristics Of Solidification Of Supercooled Halide Melt From Measurements Of Its Electrical Conductivity. *Mater. Phys. Mech.* 6:43-8
- Densmore CL. 2003. The Re-Emergence of Aerosol Gene Delivery: A Viable Approach to Lung Cancer Therapy. *Current Cancer Drug Targets* 3:275-86
- Devalapally H, Shenoy D, Little S, Langer R, Amiji M. 2007. Poly(Ethylene Oxide)-Modified Poly(Beta-Amino Ester) Nanoparticles As a PH-Sensitive System for Tumor-Targeted Delivery of Hydrophobic Drugs: Part 3. Therapeutic Efficacy and Safety Studies in Ovarian Cancer Xenograft Model. *Cancer Chemother Pharmacol* 59:477-84
- Dhanikula A, Panchagnula R. 2005a. Preparation and Characterization of Water-Soluble Prodrug, Liposomes and Micelles of Paclitaxel. *Curr Drug Deliv* 2:75-91
- Dhanikula A, Singh DR, Panchagnula R. 2005. In Vivo Pharmacokinetic and Tissue Distribution Studies in Mice of Alternative Formulations for Local and Systemic Delivery of Paclitaxel: Gel, Film, Prodrug, Liposomes and Micelles. *Curr Drug Deliv* 2:35-44
- Dhanikula AB, Panchagnula R. 2004. Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of Paclitaxel. *AAPS.J.* 6:e27
- Dhanikula AB, Panchagnula R. 2005b. Preparation and characterization of Water-Soluble Prodrug, Liposomes and Micelles of Paclitaxel. *Current Drug Delivery* 2:75-91
- Domb AJ, Maniar M. 1993.
- Dong Y, Feng SS. 2004. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 25:2843-9
- Dong Y, Feng SS. 2007. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles prepared by high pressure homogenization for paclitaxel chemotherapy. *Int J Pharm* 342:208-14
- Dordunoo SK, Oktaba AMC, Hunter W, Min W, Cruz T, Burt HM. 1997. Release of taxol from poly(ϵ -caprolactone) pastes: effect of water-soluble additives. *J.Control Release* 44:87-94
- Dosio F, Arpicco S, Brusa P, Stella B, Cattel L. 2001. Poly(Ethylene Glycol)-Human Serum Albumin-Paclitaxel Conjugates: Preparation, Characterization and Pharmacokinetics. *J. Control Release* 76:107-17
- Dosio F, Brusa P, Crosasso P, Arpicco S, Cattel L. 1997. Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel-albumin conjugate. *J.Control Release* 47:293-304
- Dreher MR, Liu W, Michelich CR, Dewhirst MW, Yuan F, Chikoli A. 2006. Tumor Vascular Permeability, Accumulation and penetration of Macromolecular Drug Carriers. *Journal of National Cancer Institute* 98:35-344
- Drugs Co. 1997. Alternative Routes of Drug Administration—Advantages and Disadvantages (Subject Review). *American Academy of Pediatrics* 100:143-52
- Drukman S, Kavallaris M. 2002. Microtubule alterations and resistance to tubulin-binding agents (review). *Int J Oncol* 21:621-8

- Dubernet C, Fattal E, Couvreur P. 2000. Nanoparticulate controlled releases systems for câncer therapy. In *Handbook of pharmaceutical Controlled Release Technology*, ed. D Wise, pp. 287-300: Marcel Dekker Inc.
- Duncan R. 2006. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nat Rev Cancer* 6:688-701
- Elder A, Gelein R, Finkelstein JN, Driscoll KE, Harkema J, Oberdorster G. 2005. Effects of subchronically inhaled carbon black in three species. I. Retention kinetics, lung inflammation, and histopathology. *Toxicol Sci* 88:614-29
- Elkharraz K, Faisant N, Guse C, Siepmann F, Arica-Yegin B, et al.. 2006. Paclitaxel-loaded microparticles and implants for the treatment of brain cancer: preparation and physicochemical characterization. *Int. J. Pharm.* 314:127-36
- Erni C, Suard C, Freitas S, Dreher D, Merkle HP, Walter E. 2002. Evaluation of cationic solid lipid microparticles as synthetic carriers for the targeted delivery of macromolecules to phagocytic antigen-presenting cells. *Biomaterials* 23:4667-76
- Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Jr., et al.. 2005. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 46:839-61
- Farmer S. 1991. *The Airway Epithelium (Lung Biology in Health and Disease)*. New York: Informa Healthcare
- Farr S, Otulana B. 2006. Pulmonary delivery of opioids as pain therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 58:1076-88
- Feng S, Huang G. 2001. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *J.Control Release* 71:53-69
- Feng S, Mu L, Chen B-H, Pack D. 2002. Polymeric nanospheres fabricated with natural emulsifiers for clinical administration of an anticancer drug paclitaxel (Taxol r). *Materials Science and Engineering: C* 20:1831-42
- Feng S-S, Chien S. 2003. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science* 58:4087-114
- Feng SS, Huang GF, Mu L. 2000. Nanospheres of biodegradable polymers: a system for clinical administration of an anticancer drug paclitaxel (Taxol). *Ann.Acad.Med.Singapore* 29:633-9
- Feng SS, Mu L, Win KY, Huang G. 2004. Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel. *Curr. Med. Chem* 11:413-24
- Ferrari M. 2005a. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 5:161-71
- Ferrari M. 2005b. Nanovector therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 9:343-6
- Fiel SB. 2001. History and evolution of aerosolized therapeutics: overview and introduction. *Chest* 120:87S-8S
- Fitzpatrick FA, Wheeler R. 2003. The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere), and related agents. *Int.Immunopharmacol.* 3:1699-714
- Florence AT, Attwood D. 2006. *Physicochemical Principles of Pharmacy*: Pharmaceutical Press 492 pp.
- Fonseca C, Simões S, Gaspar R. 2002. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Control Release* 83:273-86
- Fontana G, Maniscalco L, Schillaci D, Cavallaro G, Giammona G. 2005. Solid Lipid Nanoparticles Containing Tamoxifen Characterization and In Vitro Antitumoral Activity. *Drug Deliv.* 12:385-92
- Freitas C, Lucks JS, Muller RH. 1994. Effect of storage conditions on long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) in aqueous dispersion. *Eur J Pharm Sci* 2:178
- Freitas C, Muller RH. 1998. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. *Int J Pharm* 168:221-9

- Freitas C, Muller RH. 1999. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur J Pharm Biopharm* 47:125-32
- Fundaro A, Cavalli R, Bargoni A, Vighetto D, Zara GP, Gasco MR. 2000. Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats. *Pharmacol Res* 42:337-43
- Gao Z, Lukyanov AN, Chakilam AR, Torchilin VP. 2003. PEG-PE/phosphatidylcholine mixed immunomicelles specifically deliver encapsulated taxol to tumor cells of different origin and promote their efficient killing. *J Drug Target* 11:87-92
- Garcia-Fuentes M, Torres D, Alonso MJ. 2003. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27:159-68
- Gasco MR. 1993. *United States Patent No. 5250236*
- Gasco MR. 1997. Solid Lipid Nanospheres from Warm Micro-Emulsion. *Pharm. Technol. Eur.* 9:52-8
- Gautam A, Waldrep JC, Densmore C, Koshkina N, Melton S, Knight V. 2002. Aerosol Delivery of PEI:p53 in Combination with Aerosol Liposomal 9-N-Camptothecin Inhibits B16-F10 Lung Metastases in Mice. *Gene Therapy* 9:353-7
- Geiser M, Matter M, Maye I, Im Hof V, Gehr P, Schurch S. 2003. Influence of airspace geometry and surfactant on the retention of man-made vitreous fibers (MMVF 10a). *Environ Health Perspect* 111:895-901
- Giannakakou P, Robey R, Fojo T, Blagosklonny MV. 2001. Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene* 20:3806-13
- Gibson JD, Khanal BP, Zubarev ER. 2007. Paclitaxel-Functionalized Gold Nanoparticles. *J Am Chem Soc* 129:11653-61
- Gilbert BE, Wyde PR, Wilson SZ, Robins RK. 1991. Aerosol and intraperitoneal administration of ribavirin and ribavirin triacetate: pharmacokinetics and protection of mice against intracerebral infection with influenza A/WSN virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1448-53
- Gligorov J, Lotz JP. 2004. Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences. *Oncologist*. 9 Suppl 2:3-8
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. 2000. Kuby Immunology. ed. RA Goldsby, Kindt, T. J., Osborne, B. A.: W. H. Freeman and Company
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP dependent transporters. *Nat. Rev Cancer* 2:48-58
- Grasso D, Subramaniam K, Butkus M, Strevett K, Bergendahl J. 2002a. A review of non-DLVO interactions in environmental colloidal systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*:17-38
- Grasso D, Subramaniam K, Butkus M, Strevett K, Bergendahl J. 2002b. A review of non-DLVO interactions in environmental colloidal systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 1:17-38
- Green MR, Manikhas GM, Orlov S, Afanasyev B, Makhson AM, et al.. 2006. Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 17:1263-8
- Greenwald RB, Gilbert CW, Pendri A, Conover CD, Xia J, Martinez A. 1996. Drug delivery systems: water soluble taxol 2'-poly(ethylene glycol) ester prodrugs-design and in vivo effectiveness. *J. Med. Chem.* 39:424-31
- Gregoriadis G. 1977. Targeting of drugs. *Nature* 265:407-11
- Gregoriadis G, Florence AT. 1991. Liposomes and cancer therapy. *Cancer Cells* 3:144-6

- Guenca AG, Jiang H, Hochwald SN, Delano M, Cance WG, Grobmeyr SR. 2006. Emerging Implications of Nanotechnology on Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Cancer* 107:459-66
- Guillemard V, Saragovi HU. 2001. Taxane-Antibody Conjugates Afford Potent Cytotoxicity, Enhanced Solubility and Tumor Target Selectivity. *Cancer Res.* 61:694-9
- Gupte A, Ciftci K. 2004. Formulation and Characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel + 5-FU Microspheres. *Int J Pharm* 276:93-106
- Haag R. 2004. Supramolecular drug-delivery systems based on polymeric core-shell architectures. *Angew Chem Int Ed Engl* 43:278-82
- Hahn WC, Weinberg RA. 2002. Modelling the Molecular circuitry of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2:331-41
- Han J, Davis SS, Papandreou C, Melia CD, Washington C. 2004. Design and evaluation of an emulsion vehicle for paclitaxel. I. Physicochemical properties and plasma stability. *Pharm Res* 21:1573-80
- Hanatani K, Takada K, Yoshida N, Nakasuji M, Morishita Y, et al.. 1995. Molecular weight-dependent lymphatic transfer of fluorescein isothiocyanate-labeled dextrans after intrapulmonary administration and effects of various absorption enhancers on the lymphatic transfer of drugs in rats. *J. Drug Target* 3:263-71
- Haque AK. 1991. Pathology of carcinoma of lung: an update on current concepts. *J Thorac Imaging* 7:9-20
- Harivardhan RL, Murthy RSR. 2005. Etoposide-Loaded Nanoparticles Made from Glyceride Lipids: Formulation, Characterization, in Vitro Drug Release, and Stability Evaluation. *AAPS PharmSciTech* 6:E158-E66
- Harivardhan RL, Sharma RK, Chuttani K, Mishra AK, Murthy RSR. 2005. Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice. *Journal of Controlled Release* 105:185-98
- Hawley AE, Davis SS, Illum L. 1995. Targeting of colloids to lymph nodes: influence of lymphatic physiology and colloidal characteristics. *Adv Drug Deliv Rev* 17:129-48
- Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, Weaver D, Edgerton S, et al.. 2007. HER2 and Response to Paclitaxel in Node-Positive Breast Cancer
. *New England Journal of Medicine* 357:1496-506
- He L, Wang GL, Zhang Q. 2003. An alternative paclitaxel microemulsion formulation: hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile. *Int J Pharm* 250:45-50
- Heath JR, Davis ME. 2008. Nanotechnology and cancer. *Annu Rev Med* 59:251-65
- Henderson I, Bhatia V. 2007. Nab-Paclitaxel for Breast Cancer: a New Formulation With an Improved Safety Profile and Greater Efficacy. *Expert Rev Anticancer Ther* 7:919-43
- Hennenfent K, Govindan R. 2006 Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle? *Ann Oncol* 17:735-49
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Benoit J, Proust J. 2003a. Interfacial stability of lipid nanocapsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 30:225-35
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. 2003b. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 24:4283-300
- Hidalgo-Álvares R, Martín A, Fernández A, Bastos D, Martínez F, Nieves FJ. 1996. Electrokinetic properties, colloidal stability and aggregation kinetics of polymer colloids. *Advances in colloid and interface science*:1-118
- Hillery A, Lloyd AW, Swarbrick J. 2001. *Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. London: Taylor & Francis
- Ho E, Vassileva V, Allen C, Piquette-Miller M. 2005. In Vitro and in Vivo Characterization of a Novel Biocompatible Polymer-Lipid Implant System for the Sustained Delivery of Paclitaxel. *Journal Control Release* 104:181-91

- Hodoshima N, Udagawa C, Ando T, Fuukuyasu H, Watanabe H, Nakabayashi S. 1997. Lipid nanoparticles for delivering antitumor drugs. *Int.J.Pharm.* 146:81-92
- Hoogenboom JP, Yethiraj A, Van Langen-Suurling AK, Romijn J, Van Blaaderen A. 2002. Epitaxial crystal growth of charged colloids. *Phys Rev Lett* 89:256104
- Hou D, Xie C, Huang K, Zhu C. 2003. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials* 24:1781-5
- Hsu Y, Sood AK, Sorosky JI. 2004. Docetaxel Versus Paclitaxel for Adjuvant Treatment of Ovarian Cancer: Case-Control Analysis of Toxicity. *American Journal of Clinical Oncology* 27:14-8
- Hu F, Yuan H, Zhang H, Fang M. 2002. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics* 239:121-8
- Hu FQ, Hong Y, Yuan H. 2004. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *Int J Pharm* 273:29-35
- Huh KM, Lee SC, Cho YW, Lee J, Jeong JH, Park K. 2005. Hydrotropic Polymer Micelle System for Delivery of Paclitaxel. *Journal of Control Release* 101:59-68
- Huisman C, Ferreira CG, Broker LE, Rodriguez JA, Smit EF, et al.. 2002. Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Clin Cancer Res* 8:596-606
- Humberstone AJ, Charman WN. 1997. Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 25:103-28
- Ibrahim N, Samuels B, Page R, Doval D, Patel K, et al.. 2005. Multicenter phase II trial of ABI-007, an albumin-bound paclitaxel, in women with metastatic breast cancer. *J. Oncol. Pract* 23:6019-26
- Illum L, Church AE, Butterworth MD, Arien A, Whetstone J, Davis SS. 2001. Development of systems for targeting the regional lymph nodes for diagnostic imaging: in vivo behaviour of colloidal PEG-coated magnetite nanospheres in the rat following interstitial administration. *Pharm Res* 18:640-5
- Ishii H, Hayashi S, Hogg JC, Fujii T, Goto Y, et al.. 2005. Alveolar macrophage-epithelial cell interaction following exposure to atmospheric particles induces the release of mediators involved in monocyte mobilization and recruitment. *Respir Res* 6:87
- Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. 2006. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today* 11:812-8
- Jackson JK, Hung T, Letchford K, Burt HM. 2007. The characterization of paclitaxel-loaded microspheres manufactured from blends of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and low molecular weight diblock copolymers. *Int J Pharm* 342:6-17
- Jackson JK, Smith J, Letchford K, Babiuk KA, Machan L, et al.. 2004. Characterization of perivascular poly(lactic-co-glycolic acid) films containing paclitaxel. *Int J Pharm* 283:97-109
- Jaime J, Page M. 2001. Paclitaxel Immunoconjugate for the Specific Treatment of Ovarian Cancer in Vitro. *Anticancer Research* 21:1119-28
- Jain RK. 2001. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46:149-68
- Jee JP, Lim SJ, Park JS, Kim CK. 2006. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 63:134-9
- Jenning V, Gohla S. 2000. Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Pharm* 196:219-22
- Jenning V, Mader K, Gohla SH. 2000a. Solid lipid nanoparticles (SLN) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a (1)H-NMR study. *Int J Pharm* 205:15-21
- Jenning V, Schafer-Korting M, Gohla S. 2000b. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *J Control Release* 66:115-26

- Jenning V, Thunemann AF, Gohla SH. 2000c. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharm* 199:167-77
- Johnson BE, Minna JD. 1994. Small Cell Lung Cancer. In *Lung Cancer*, ed. DH Johnson: Wiley-Liss
- Johnson J. 1999. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18:345-57
- Jordam MA, Wilson L. 2004. Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nature Reviews Cancer* 4:253-65
- Jordan MA, Wilson L. 2004a. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat.Rev.Cancer* 4:253-65
- Jordan MA, Wilson L. 2004b. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Review Cancer* 4:253-65
- Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mader K. 2004a. Investigation on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *Journal of controlled release* 95:217-27
- Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mader K. 2004b. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J Control Release* 95:217-27
- Kan P, Chen ZB, Lee CJ, Chu IM. 1999. Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system. *J.Control Release* 58:271-8
- Kang BK, Chon SK, Kim SH, Jeong SY, Kim MS, et al.. 2004. Controlled release of paclitaxel from microemulsion containing PLGA and evaluation of anti-tumor activity in vitro and in vivo. *Int.J.Pharm.* 286:147-56
- Kaur IP, Bhandari R, Bhandari S, Kakkar V. 2008. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *J Control Release* 127:97-109
- Kawasaki ES, Player A. 2005. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine* 1:101-9
- Kelly Y, Kim MA. 2007. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and Medicine* 3:103-10
- Kim SC, Kim DW, Shim YH, Bang JS, Oh HS, et al.. 2001. In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *Journal of Control Release* 72:191-202
- Kim SY, Lee YM. 2001. Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(epsilon-caprolactone) as novel anticancer drug carriers. *Biomaterials* 22:1697-704
- Kim TY, Kim DW, Chung JY, Shin SG, Kim SC, et al.. 2004. Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin.Cancer Res.* 10:3708-16
- Klein R, von Gruenberg HH. 2001. Charge-stabilized colloidal suspensions. Phase behavior and effects of confinement. *Pure Appl. Chem.* 73:1705-19
- Knight VK, N; Varchraegen, I; Waldrep, J; Gilbert, B. . 1999. Anticancer Effect of 9-Nitrocamptothecin Liposome Aerosol on Human Cancer Xenografts in Nude Mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 44:177-86
- Kokkoli E, van Swol F. 1998. Swelling of colloidal systems. *J Chem Physics* 108:4675-82
- Kommareddy S, Amiji M. 2004. Targeted Drug Delivery to Tumor Cells Using Colloidal Carriers. In *Cellular Drug Delivery*, ed. SO D. Robert Lu, pp. 181-215: Humana Press
- Koshkina NV, Golunski E, Roberts LE, Gilbert BE, Knight V. 2004. Cyclosporin A aerosol improves the anticancer effect of paclitaxel aerosol in mice. *J Aerosol Med* 17:7-14

- Koshkina NV, Kleinerman ES. 2005. Aerosol Therapy for Malignancy Involving the Lungs. *Int J Cancer* 116:458-63
- Koshkina NV, Waldrep JC, Roberts LE, Golunski E, Melton S, Knight V. 2001. Paclitaxel liposome aerosol treatment induces inhibition of pulmonary metastases in murine renal carcinoma model. *Clin Cancer Res* 7:3258-62
- Koziara JM, Lockman PR, Allen DD, Mumper RJ. 2004. Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors. *J Control Release* 99:259-69
- Kraitzer A, Zilberman M. 2007. Paclitaxel-Loaded Composite Fibers: Microstructure and Emulsion Stability. *J Biomed Mater Res A* 81:427-36
- Kreuter J. 1994. *Nanoparticles*. New York, Basel and Hong Kong: Marcel Dekker Inc. 219-342 pp.
- Kreuter J. 2001. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 47:65-81
- Kreuter J. 2004. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotechnol* 4:484-8
- Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, Ramge P, Cychutek K, et al.. 2002. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target* 10:317-25
- Kumagai M, Imai Y, Nakamura T, Yamasaki Y, Sekino M, et al.. 2007. Iron hydroxide nanoparticles coated with poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer as novel magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging. *Colloids Surf B Biointerfaces* 56:174-81
- Kumar V, Chandrasekar D, Ramakrishna S, Kishan V, Rao YM, Diwan PV. 2007. Development and Evaluation of Nitrendipine Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Influence of Wax and Glyceride Lipids on Plasma Pharmacokinetics. *Int J Pharm* 335:167-75
- Kunstfeld R, Wickenhauser G, Michaelis U, Teifel M, Umek W, et al.. 2003. Paclitaxel Encapsulated in Cationic Liposomes Diminishes Tumor Angiogenesis and Melanoma Growth in a "Humanized" SCID Mouse Model. *J Invest Dermatol* 120:476-82
- Kuntsche J, Koch MH, Drechsler M, Bunjes H. 2005. Crystallization behavior of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles containing phospholipids as stabilizers. *Colloids Surf B Biointerfaces* 44:25-35
- Kuntsche J, Westesen K, Drechsler M, Koch MH, Bunjes H. 2004. Supercooled smectic nanoparticles: a potential novel carrier system for poorly water soluble drugs. *Pharm Res* 21:1834-43
- Kuppens IE. 2006a. Current State of the Art of New Tubulin Inhibitors in the Clinic. *Current Clinical Pharmacology* 1:57-70
- Kuppens IELM. 2006b. Current State of the Art of New Tubulin Inhibitors in the Clinic. *Current Clinical Pharmacology* 1:57-70
- Labiris NR, Dolovich MB. 2003a. Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol* 56:588-99
- Labiris NR, Dolovich MB. 2003b. Pulmonary drug delivery. Part II: the role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol* 56:600-12
- Lamprecht A, Saumet JL, Roux J, Benoit JP. 2004. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int J Pharm* 278:407-14
- Langenback EG, Bergofsky EH, Halpern JG, Foster WM. 1990. Supramicron-sized particle clearance from alveoli: route and kinetics. *J Appl Physiol* 69:1302-8
- Langer R. 1999. Foreword. In *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, ed. E Mathiowitz. New York: Wiley-Interscience

- Lauweryns JM, Baert JH. 1977. Alveolar clearance and the role of the pulmonary lymphatics. *American Review of Respiratory Disease* 115:625-6883
- Lawrence MJ. 1996. Microemulsion as drug delivery vehicles. *Current Opin.Colloidal Interface Science* 826-32
- Leak LV, Ferrans Lee VJ. 1991. Lymphatics and Lymphoid Tissue. In *The Lung: Scientific Foundations*, ed. RG Crystal, JB West, NS Cherniack, ER Weibel, pp. 779-86. New York: Raven Press
- Lee JW, Lu JY, Low PS, Fuchs PL. 2002. Synthesis and evaluation of taxol-folic acid conjugates as targeted antineoplastics. *Bioorg.Med.Chem.* 10:2397-414
- Lee M, Lim SJ, Kim CK. 2007. Preparation, Characterization and in Vitro Cytotoxicity of Paclitaxel-Loaded Sterically Stabilized Solid Lipid Nanoparticles. *Biomaterials* 28:2137-46
- Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Raber M, Benjamin RS. 1990. A phase II trial of taxol in metastatic melanoma. *Cancer* 65:2478-81
- Li P, Jiang S, Pero SC, Oligino L, Krag DN, et al.. 2007a. Design and Synthesis of Paclitaxel Conjugated With an ErbB2-Recognizing Peptide, EC-1. *Biopolymers* 87:225-30
- Li R, Moudgil T, Ross HJ, Hu HM. 2005. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death Differ* 12:292-303
- Li S, Byrne B, Welsh J, Palmer AF. 2007b. Self-Assembled Poly(Butadiene)-b-Poly(Ethylene Oxide) Polymersomes As Paclitaxel Carriers. *Biotechnol Prog* 23:278-85
- Liggins R, Burt H M. 2002. Polyether-Polyester Diblock Copolymers for the Preparation of Paclitaxel Loaded Polymeric Micelle Formulations. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 54:191-202
- Liggins RT, Burt HM. 2001. Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: properties of microspheres made with low molecular weight polymers. *Int J Pharm* 222:19-33
- Liggins RT, Burt HM. 2004a. Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) (PLLA) microspheres. II. The effect of processing parameters on microsphere morphology and drug release kinetics. *Int J Pharm* 281:103-6
- Liggins RT, Burt HM. 2004b. Paclitaxel-Loaded Poly(L-Lactic Acid) Microspheres 3: Blending Low and High Molecular Weight Polymers to Control Morphology and Drug Release. *Int J Pharm* 282:61-71
- Lim S, Lee M, Kim C. 2004. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. *Journal Control Release* 100:53-61
- Lippacher A, Muller RH, Mader K. 2002. Semisolid SLN dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. *Eur J Pharm Biopharm* 53:155-60
- Liu J, Meisner D, Kwong E, Wu XY, Johnston MR. 2007. A Novel Trans-Lymphatic Drug Delivery System: Implantable Gelatin Sponge Impregnated With PLGA-Paclitaxel Microspheres *Biomaterials* 28:3236-44
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Darnell J. 1995. Microtubules and Intermediate Filaments. In *Molecular Cell Biology*, ed. H Lodish, D Baltimore, A Berk, S Zipursky, P Matsudaira, J Darnell. New York: Scientific American Books
- Lu B, Xiong SB, Yang H, Yin XD, Chao RB. 2006. Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. *Eur J Pharm Sci* 28:86-95
- Lu J, Jackson JK, Gleave ME, Burt HM. 2007. The preparation and characterization of anti-VEGFR2 conjugated, paclitaxel-loaded PLLA or PLGA microspheres for the systemic targeting of human prostate tumors. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 61:997-1005
- Lundberg B. 1997. A Submicron Lipid Emulsion Coated With Amphipathic Polyethylene Glycol for Parenteral Administration of Paclitaxel (Taxol). *J Pharm Pharmacol* 49:16-21.

- Luo Y, Chen D, Ren L, Zhao X, Qin J. 2006. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. *J Control Release* 114:53-9
- Mäder K. 2006. Solid Lipid nanoparticles as drug carriers. In *Nanoparticulates as drug carriers* ed. V.Torchilin, pp. 187-212: Imperial College Press
- Mäder K, Mehnert W. 2004. Solid Lipid Nanoparticles — Concepts, Procedures and Physicochemical Aspects. In *Lipospheres in Drug Targets and Delivery*, ed. C Nastruzzi, pp. 1-22: Routledge, USA
- Maeda H. 1992. The tumor blood vessel as an ideal target for macromolecular anticancer agents. *Journal of Controlled Release* . 19:315-24
- Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65:271-84
- Maincent P, Thouvenot P, Amicabile C, Hoffman M, Kreuter J, *et al.*. 1992. Lymphatic targeting of polymeric nanoparticles after intraperitoneal administration in rats. *Pharm Res* 9:1534-9
- Majeti NV, Kumar R. 2000. Nano and Microparticles as controlled Drug Delivery Devices. *Journal of Pharm Pharmaceutic Science* 3:234-58
- Manjunath K, Venkateswarlu V. 2005. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. *J Control Release* 107:215-28
- Margolis J, McDonald J, Heuser R, Klinke P, Waksman R, *et al.*. 2007. Systemic Nanoparticle Paclitaxel (Nab-Paclitaxel) for in-Stent Restenosis I (SNAPIST-I): a First-in-Human Safety and Dose-Finding Study. *Clin Cardiol* 30:165-70
- McIntire GL, Bacon ER, Toner JL, Cornacoff JB, Losco PE, *et al.*. 1998. Pulmonary delivery of nanoparticles of insoluble, iodinated CT X-ray contrast agents to lung draining lymph nodes in dogs. *J Pharm Sci* 87:1466-70
- Mehnert W, Mader K. 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 47:165-96
- Menger FM, Zhang H, de Joannis JJ, Kindt JT. 2007. Solubilization of Paclitaxel (Taxol) by Peptoad Self-Assemblies. *Langmuir* 23:2308-10
- Messina M, Gonzalez Tovar E, Lozada-Cassou M, Holm C. 2002a. Overcharging: The Crucial Role of Excluded Volume. *Europhys. Lett.* 60:383-9
- Messina M, Holm C, Kremer K. 2000. Strong attraction between charged spheres due to metastable ionized states *Phys. Rev. Lett* 85:872-5
- Messina R, Holm C, KREMER K. 2001. Strong electrostatic interactions in spherical colloidal systems. *Phys. Rev.E* 64:1-32
- Messina R, Holm C, Kremer K. 2002b. Conformation of a polyelectrolyte complexed to a like-charged colloid. *Physical Review E* 65:041805
- Miglietta A, Bocca C, Gabriel L. 2002. Comparative studies on biological activity of certain microtubule-interacting taxanes. *Chem.Biol.Interact.* 139:283-99
- Miglietta A, Cavalli R, Bocca C, Gabriel L, Gasco MR. 2000. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *Int.J.Pharm.* 210:61-7
- Mills PR, Davies RJ, Devalia JL. 1999. Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants. *Am J Respir Crit Care Med* 160:S38-43
- Miwa A, Ishibe A, Nakano M, Yamahira T, Itai S, *et al.*. 1998. Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol. *Pharm.Res.* 15:1844-50
- Moghimi SM, Hawley AE, Christy NM, Gray T, Illum L, Davis SS. 1994. Surface engineered nanospheres with enhanced drainage into lymphatics and uptake by macrophages of the regional lymph nodes. *FEBS Lett* 344:25-30
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 53:283-318

- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. 2005. Nanomedicine: current Status and future prospects. *Faseb J.*:311-30
- Moore L, Chien YW. 1988. Transdermal drug delivery: a review of pharmaceuticals, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 4:285-349
- Moreno-Aspitia A, Perez EA. 2005. Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel (ABI-007): a Newer Taxane Alternative in Breast Cancer. *Future Oncol* 1:755-62
- Moxon ER, Smith AL, Averill DR, Smith DH. 1974. Haemophilus influenzae meningitis in infant rats after intranasal inoculation. *J Infect Dis* 129:154-62
- Mu L, Feng SS. 2001. Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers. *J.Control Release* 76:239-54
- Mu L, Feng SS. 2002. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol). *J.Control Release* 80:129-44
- Mu L, Feng SS. 2003. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J.Control Release* 86:33-48
- Muller RH, Luck M, *et al.*. 1997.
- Müller RH, Lucks JS. 1996. *Patent No. EP 0 605 497 B1*
- Muller RH, Mader K, Gohla S. 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 50:161-77
- Muller RH, Mehnert W, Lucks JS, Schwarz C, zur Muhlen A, *et al.*. 1995. Solid lipid nanoparticles (SLN) - an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41:62-9
- Muller RH, Radtke M, Wissing SA. 2002. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm* 242:121-8
- Muller RH, Runge S. 1998. Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN™) for topical, oral and parenteral products. *Pharm Tech Conf*:45-6
- Muller RH, Runge S, Ravelli V, Mehnert W, Thunemann AF, Souto EB. 2006. Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. *Int J Pharm* 317:82-9
- Muller-Goymann CC. 2004. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58:343-56
- Muranishi S. 1997. Drug Targeting Towards The Lymphatics. In *Advances in Drug Research*, ed. B Testa, UA Meyer, p. 340. New York: Academic Press
- Muranishi S, Fujita T, Murakami M, Yamamoto A. 1997. Potential For Lymphatic Targeting of Peptides. *J Control Release* 46:157-64(8)
- Murray J, Carmichael J. 1995. Targeting solid tumours: challenges, disappointments, and opportunities. *Adv Drug Deliv Rev* 17:117-27
- Murray N, Turrisi A. 2006. A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 1:270-8
- Negishi T, Koizumi F, Uchino H, Kuroda J, Kawaguchi T, *et al.*. 2006. NK105, a Paclitaxel-Incorporating Micellar Nanoparticle, Is a More Potent Radiosensitising Agent Compared to Free Paclitaxel. *British Journal Cancer* 95:601-6
- Netter FH. 1998. *Atlas of Human Anatomy*. East Hanover, Germany: Novartis
- Newman S, Wilding I, Hirst PH. 2000. Human lung deposition data: the bridge between in vitro and clinical evaluations for inhaled drug products? *Int J Pharm* 208:49-60
- Newman SP. 2001. Lung distribution of inhaled drugs. *Br J Clin Pharmacol* 52:716-9
- Nie S, Xing Y, Kim GJ, Simons JW. 2007. Nanotechnology Applications in Cancer. *Annual Review of Biomedical Engineering* 9:257-88

- Nishioka Y, Yoshino H. 2001. Lymphatic targeting with nanoparticulate system. *Adv Drug Deliv Rev* 47:55-64
- Niven RW. 1995. Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosol. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 12:151-231
- Nornoo AO, Chow DS. 2007. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel II. Stability, in vitro release and pharmacokinetics. *Int J Pharm* 349:117-23
- Nornoo AO, Osborne DW, Chow DS. 2007. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel I: formulation, cytotoxicity and hemolysis. *Int J Pharm* 349:108-16
- Nsereko S, Amiji M. 2002. Localized delivery of paclitaxel in solid tumors from biodegradable chitin microparticle formulations. *Biomaterials* 23:2723-31
- Nuijen B, Bouma M, Schellens JH, Beijnen JH. 2001. Progress in the development of alternative pharmaceutical formulations of taxanes. *Invest New Drugs* 19:143-53
- O'Driscoll CM. 2002. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *Eur J Pharm Sci* 15:405-15
- O'Mahony S, Rose SL, Chilvers AJ, Ballinger JR, Solanki CK, et al.. 2004. Finding an optimal method for imaging lymphatic vessels of the upper limb. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31:555-63
- O'Driscoll CM. 2002. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *Eur J Pharm Sci* 15:405-15
- Oberdorster G. 2002. Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. *Inhal Toxicol* 14:29-56
- Oberdorster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J. 1992. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 97:193-9
- Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823-39
- Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, et al.. 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16:437-45
- Ojima I, Geng X, Wu XY, Qu C, Borella CP, et al.. 2002. Tumor-Specific Novel Taxoid-Monoclonal Antibody Conjugates. *Journal Med Chem* 45:5620-3
- Ooya T, Lee J, Park K. 2003. Effects of Ethylene Glycol-Based Graft, Star-Shaped, and Dendritic Polymers on Solubilization and Controlled Release of Paclitaxel. *Journal of Control Release* 93:121-7
- Orr G, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. 2003. Mechanism of Taxol Resistance related to microtubules. *Oncogene* 22:7280-95
- Oussoren C, Storm G. 2001. Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Adv Drug Deliv Rev* 50:143-56
- Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJ, Storm G. 1997. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochim Biophys Acta* 1328:261-72
- Pandey R, Khuller GK. 2005. Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis. *Tuberculosis* 85:227-34
- Pandey R, Sharma S, Khuller GK. 2005. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. *Tuberculosis* 85:415-20
- Park EK, Lee SB, Lee YM. 2005. Preparation and Characterization of Methoxy Poly(Ethylene Glycol)/Poly(Epsilon-Caprolactone) Amphiphilic Block Copolymeric Nanospheres for Tumor-Specific Folate-Mediated Targeting of Anticancer Drugs. *Biomaterials* 26:1053-61

- Park ES, Maniar M, Shah JC. 1998. Biodegradable polyanhydride devices of cefazolin sodium, bupivacaine, and taxol for local drug delivery: preparation, and kinetics and mechanism of in vitro release. *J.Control Release* 52:179-89
- Patton JS. 1996. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv Drug Deliv Rev* 19:3-36
- Pedersen N, Hansen S, Heydenreich AV, Kristensen HG, Poulsen HS. 2006. Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA, streptavidin and biotinylated ligands. *Eur J Pharm Biopharm* 62:155-62
- Pendri A, Conover C, Greenwald R. 1998. Antitumor activity of paclitaxel-2-glycinate conjugated to poly(ethylene glycol): a water-soluble prodrug. *Anti-Cancer Drug Design* 13:387-95
- Perkins WR, Ahmad I, Li X, Hirsh DJ, Masters GR, et al.. 2000a. Novel therapeutic nanoparticles (lipocores): trapping poorly water soluble compounds. *Int.J.Pharm.* 200:27-39
- Perkins WR, Ahmad I, Li X, Hirsh DJ, Masters GR, et al.. 2000b. Novel therapeutic nanoparticles (lipocores): trapping poorly water soluble compounds. *Int J Pharm* 200:27-39
- Petris SN, Stankovich J, Chan DYC, Ottewill RH. 2003. Modeling the Structure of Charged Binary Colloidal Dispersions. *Langmuir* 19:1121-6
- Pietkiewicz J, Sznitowska M, Placzek M. 2006. The expulsion of lipophilic drugs from the cores of solid lipid microspheres in diluted suspensions and in concentrates. *Int J Pharm* 310:64-71
- Pison U, Welte T, Giersig M, Groneberg DA. 2006. Nanomedicine for respiratory diseases. *Eur J Pharmacol* 533:341-50
- Porter CJ, Charman WN. 2001. Intestinal lymphatic drug transport: an update. *Adv Drug Deliv Rev* 50:61-80
- Porter CJH, Charman WN. 1997. Uptake of drugs into the intestinal lymphatics after oral administration. *Adv Drug Deliv Rev.* 25:71-89
- Portney NG, Ozkan M. 2006. Nano-oncology: drug delivery, imaging and sensing. *Anal. Bioanal Chem* 384:620-30
- Potineni A, Lynn DM, Langer R, Amiji MM. 2003. Poly(Ethylene Oxide)-Modified Poly(Beta-Amino Ester) Nanoparticles As a PH-Sensitive Biodegradable System for Paclitaxel Delivery. . *Journal of Control Release* 86:223-34.
- Rajni S, Gloria JK, Shuming N, Dong MS. 2006. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther* 5:1909-17
- Rao RD, Markovic SN, Anderson PM. 2003. Aerosol therapy for malignancy involving the lungs. *Curr Cancer Drug Targets* 3:239-50
- Remington. 2005. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*: Lippincott Williams & Wilkins. 2393 pp.
- Rizwan SB, Dong YD, Boyd BJ, Rades T, Hook S. 2007. Characterisation of bicontinuous cubic liquid crystalline systems of phytantriol and water using cryo field emission scanning electron microscopy (cryo FESEM). *Micron* 38:478-85
- Rodrigues D, Maria, DA, Fernandes D, VALDUGA CJ, Couto RD, et al.. 2005. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 55:565-76
- Rodrigues DG, Covolan CC, Coradi ST, Barboza R, Maranhao RC. 2002. Use of a Cholesterol-Rich Emulsion that Binds to Low-Density Lipoprotein Receptors as a Vehicle for Paclitaxel. *Journal Pharm Pharmacol* 54:765-72
- Rodrigues NG, Ribeiro J, Soares M, Carvalho E. 1983. The lymphatic vessels of the lung: morphological study. *Acta Anat (Basel)* 115:302-9

- Rojas LF, Urban C, Scurtenberger P, Gisler T, Grunger HH. 2002. Reappearance of structure in colloidal suspensions. *Europhys.Lett* 60:802-8
- Roke S, Berg O, Buitenhuis J, van Blaaderen A, Bonn M. 2006. Surface molecular view of colloidal gelation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13310-4
- Rowinsky EK. 1994. Update on the antitumor activity of paclitaxel in clinical trials. *Ann.Pharmacother.* 28:S18-S22
- Ruan G, Feng SS. 2003. Preparation and characterization of poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) (PLA-PEG-PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel. *Biomaterials* 24:5037-44
- Ruchin PE, Faddy SC, Muller DW, Baron DW, Roy PR, Wilson SH. 2007. Clinical Follow-Up of Paclitaxel-Eluting (TAXUSTM) Stents for the Treatment of Saphenous Vein Graft Disease. *J Interv Cardiol* 20:258-64
- Ruel-Gariepy E, Shive M, Bichara A, Berrada M, Le GD, et al.. 2004. A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 57:53-63
- Russ C, von Grunberg HH, Dijkstra M, van Roij R. 2002. Three-body forces between charged colloidal particles. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 66:011402
- Safavy A, Bonner JA, Waksal HW, Buchsbaum DJ, Gillespie GY, et al.. 2003. Synthesis and Biological Evaluation of Paclitaxel-C225 Conjugate As a Model for Targeted Drug Delivery. *Bioconjug Chem* 14:302-10
- Safavy A, Raisch KP. 2005. Synthesis and Biological Evaluation of a Paclitaxel Immunoconjugate. *Methods Mol Med* 109:375-88
- Sakai A, Mori N, Shuto S, Suzuki T. 1993. Deacylation-reacylation cycle: a possible absorption mechanism for the novel lymphotropic antitumor agent dipalmitoylphosphatidylfluorouridine in rats. *J Pharm Sci* 82:575-8
- Salit IE, Van Melle E, Tomalty L. 1984. Experimental meningococcal infection in neonatal animals: models for mucosal invasiveness. *Can J Microbiol* 30:1022-9
- Saupe A, Gordon K, Rades T. 2006. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics* 314:56-62
- Schmitt-Sody M, Strieth S, Krasnici S, Sauer B, Schulze B, et al.. 2003. Neovascular targeting therapy: paclitaxel encapsulated in cationic liposomes improves antitumoral efficacy. *Clin.Cancer Res.* 9:2335-41
- Scholer N, Hahn H, Muller R, Liesenfeld O. 2002. Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. *International Journal of Pharmaceutics* 231:167-76
- Schrijvers D, Vermorcken JB. 2000. Role of taxoids in head and neck cancer. *Oncologist.* 5:199-208
- Schubert MA, Harms M, Muller-Goymann CC. 2006. Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27:226-36
- Schwarz C, Mehnert W, Lucks J, Muller RH. 1994. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I: Production, characterization and sterilization. *Journal of Controlled Release* 30:83-96
- Seki M, Furusaki S. 1996. An immobilized cell system for taxol production. *Chemtec* 26:41-5
- Seligson AL, Terry RC, Bressi JC, Douglass JG, III, Sovak M. 2001. A new prodrug of paclitaxel: synthesis of Protaxel. *Anticancer Drugs* 12:305-13
- Serpe L, Catalano MG, Cavalli R, Ugazio E, Bosco O, et al.. 2004. Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *Eur J Pharm Biopharm* 58:673-80

- Shah MA, Schwartz GK. 2001. Cell Cycle-mediated Drug Resistance: An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* 7:2168-81
- Shapiro SD. 1999. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 160:S29-32
- Sharma A, Straubinger RM. 1994. Novel taxol formulations: preparation and characterization of taxol-containing liposomes. *Pharm.Res.* 11:889-96
- Sharma D, Chelvi TP, Kaur J, Chakravorty K, De TK, et al.. 1996. Novel Taxol® formulation: polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulated Taxol® for drug delivery in cancer therapy. *Oncol Res.* 8:281-6
- Sharma S, White D, Imondi AR, Placke ME, Vail DM, Kris MG. 2001. Development of inhalational agents for oncologic use. *J Clin Oncol* 19:1839-47
- Sharma US, Balasubramanian SV, Straubinger RM. 1995. Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (Taxol) complexes with cyclodextrins. *J.Pharm.Sci.* 84:1223-30
- Sharma US, Sharma A, Chau RI, Straubinger RM. 1997. Liposome-mediated therapy of intracranial brain tumors in a rat model. *Pharm.Res.* 14:992-8
- Shayan R, Achen M, Stacker S. 2006. Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. *Carcinogenesis* 27:1729-38
- Shi R, Burt HM. 2004. Amphiphilic dextran-graft-poly(epsilon-caprolactone) films for the controlled release of paclitaxel. *Int.J.Pharm.* 271:167-79
- Shim WS, Kim JH, Kim K, Kim YS, Park RW, et al.. 2007. PH- and Temperature-Sensitive, Injectable, Biodegradable Block Copolymer Hydrogels As Carriers for Paclitaxel. *Int J Pharm* 331:11-8
- Shimizu K, Morishita, Yasuo, Yoshida, Junji, Nagai, Kanji 2006. Mediastinal Lymph Node Metastases and Visceral Pleural Invasion in Non-small Cell Lung Cancer Patients. *Annals of Thoracic Surgery* 81:1947
- Shivapurkar N, Reddy J, Chaudhary PM, Gazdar AF. 2003. Apoptosis and lung cancer: A review. *Journal of Cellular Biochemistry* 88:885-98
- Siekmann B, Bunjes H, Koch MH, Westesen K. 2002. Preparation and structural investigations of colloidal dispersions prepared from cubic monoglyceride-water phases. *Int J Pharm* 244:33-43
- Siekmann B, Westesen K. 1992. Sub-micron sized parenteral carrier systems based on solid lipids. *Pharm Pharmacol Lett* 1:123-6
- Siekmann B, Westesen K. 1995. Preparation and physicochemical characterization of aqueous dispersions of coenzyme Q10 nanoparticles. *Pharm Res* 12:201-8
- Siekmann B, Westesen S. 1994. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 3:159-75
- Singer J, Shaffer S, Baker B, Bernareggi A, Stromatt S, et al.. 2005. Paclitaxel poliglumex (XYOTAX; CT-2103): an intracellularly targeted taxane. *Anticancer Drugs* 16:243-54
- Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. 2005. Prognostic Implications of Cell Cycle, Apoptosis and Angiogenesis Biomarkers in Non-Small Lung Cancer: A Review. *Clinical Cancer Research* 11:3974-84
- Singla AK, Garg A, Aggarwal D. 2002. Paclitaxel and its formulations. *Int.J.Pharm.* 235:179-92
- Sinha R, Kim J, Nie S, Shin D. 2006. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Therapeutics* 5:1909-17
- Sivaramakrishnan R, Nakamura C, Mehnert W, Korting H, Kramer KD, Schafer-Korting M. 2004. Glucocorticoid entrapment into lipid carriers — characterisation by preelectric spectroscopy and influence on dermal uptake. *Journal Controlled Release* 97:493-502
- Slichenmyer WJ, Von Hoff DD. 1991. Taxol: a new and effective anti-cancer drug. *Anticancer Drugs* 2:519-30

- Soga O, van Nostrum CF, Fens M, Rijcken CJ, Schiffelers RM, *et al.*. 2005. Thermosensitive and Biodegradable Polymeric Micelles for Paclitaxel Delivery. *Journal of Control Release* 103:341-53
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 70:1-20
- Souto EB, Muller RH. 2005. SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole. *J Microencapsul* 22:501-10
- Souto EB, Müller RH. 2007. Lipid nanoparticles (SLN and NLC) for drug delivery. In *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications*, ed. AJ Domb, Tabata, Y., Ravi Kumar, M.N.V., Farber, S, pp. 103-22: American Scientific Publishers
- Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Muller RH. 2004. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm* 278:71-7
- Speiser P. 1990. *Patent No. EP 0167825*
- Spencer CM, Faulds D. 1994. Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs* 48:794-847
- Stevens PJ, Sekido M, Lee RJ. 2004. A folate-receptor-targeted lipid nanoparticle formulation for a lipophilic paclitaxel prodrug. *Pharm Res* 21:2153-7
- Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD. 1992. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:235-43
- Straubinger R, Balasubramanian S. 2005. Preparation and characterization of taxane-containing liposomes. *Methods Enzymol* 391:97-117
- Strieth S, Eichhorn ME, Sauer B, Schulze B, Teifel M, *et al.*. 2004. Neovascular targeting chemotherapy: encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature. *Int J Cancer* 110:117-24
- Stuchlik M, Zak S. 2001. Lipid-based vehicle for oral drug delivery. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 145:17-26
- Sun S, Schiller J, Spinola M, Minna J. 2007. New molecularly targeted therapies for lung cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 117:2740-50
- Sunters A, Mattos SF, Stahl M, Brosens J, Zoumpoulidou G, *et al.*. 2003. FoxO3a transcriptional regulation of BIM controls apoptosis in paclitaxel treated breast cancer cell lines. *J Biol. Chem.* 278:49795-805
- Tabatt K, Kneuer C, Sameti M, Olbrich C, Muller RH, *et al.*. 2004. Transfection with different colloidal systems: comparison of solid lipid nanoparticles and liposomes. *J Control Release* 97:321-32
- Taxol®. 2005. Resumo das Características do Medicamento. *Bristol Meyers-Squibb Company*
- Thorpe PE. 2004. Vascular Targeting Agents as Câncer therapeutics. *Clinical Câncer Research* 10:415-27
- Tishler R. 2003. Polymer-Conjugated Paclitaxel As a Radiosensitizing Agent--a Big Step Forward for Combined Modality Therapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55:563-4
- Tombler TW, Zhou C, Alexseyev L, Kong J, Dai H, *et al.*. 2000. Reversible electromechanical characteristics of carbon nanotubes under local-probe manipulation. *Nature* 405:769-72
- Torchilin V, Lukyanov AN, Gao Z, Papahadjopoulos-Sternberg B. 2003. Immunomicelles: Targeted Pharmaceutical Carriers for Poorly Soluble Drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6039-44
- Torchilin V, Trubetskoy V. 1995. Wich polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating. *Adv Drug Deliv Rev* 16:141-55
- Torchilin VP. 2006a. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58:1532-55

- Torchilin VP. 2006b. Recent Approaches to Intracellular Delivery of Drugs and DNA and Organelle Targeting. *Annual Review of Biomedical Engineering* 8:343-75
- Torchilin VP. 2007. Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives *Pharm Res* 24:1-16.
- Uren RF. 2004. Lymphatic drainage of the skin. *Ann Surg Oncol* 11:179S-85S
- Valentine R, Kennedy Jr GL. 2001. Inhalation Toxicology. In *Principles and Methods of Toxicology*, ed. AW Hayes, pp. 1085-143. Philadelphia: Taylor and Francis
- Vasey PA. 2004. Microtubule Stabilization in the treatment of solid Tumors: Role of the Taxanes. *The Oncologist* 9:1-2
- Vasir JK, Labhasetwar V. 2007. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 59:718-28
- Venkatraman SS, Jie P, Min F, Freddy BY, Leong-Huat G. 2005. Micelle-like nanoparticles of PLA-PEG-PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. *Int J Pharm* 298:219-32
- Vermeulen K, Bockstaele DV, Berneman ZN. 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84:627-3
- Veronese FM, Pasut G. 2005. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 10:1451-8
- Videira M, Almeida AJ, Müller RH. 2000. Formulation and physical stability assessment of SLN containing paclitaxel. Incorporation of paclitaxel in SLN: assessment of drug-lipid interaction. *Proceed. 3rd World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (Berlin)*:453-4
- Videira M, Azevedo AF, Almeida AJ. 1998. Entrapment of a high molecular weight protein into solid lipid nanoparticles (SLN). *II World Meeting APGI/APV*, pp. 629-30. Paris
- Videira M, Florindo H, Almeida AJ. 2002a. Preparation of solid lipid nanoparticles (SLN): a potential protein delivery system, . In *V Spanish-Portuguese Conf. Control. Drug Deliv.* , pp. 69-70. Seville
- Videira MA, Almeida AJ, Botelho MF, Santos AC, Gomes CM, Pedroso Lima JJ. 1999. Lymphatic uptake radiolabelled solid lipid nanoparticles administered by the pulmonary route. *Eur J Nuclear Medicine* 26:1168
- Videira MA, Botelho MF, Santos AC, Gouveia LF, de Lima JJ, Almeida AJ. 2002b. Lymphatic uptake of pulmonary delivered radiolabelled solid lipid nanoparticles. *J Drug Target* 10:607-13
- Videira MA, Gano L, Santos C, Neves M, Almeida AJ. 2006. Lymphatic uptake of lipid nanoparticles following endotracheal administration. *J Microencapsul* 23:855-62
- Viktorsson K, De Petris L, Lewensohn R. 2005. The role of p53 in the treatment responses of lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331:868-80
- Vyas SP, Kannan ME, Sannyog Jain, Mishra V, Singh P. 2004. Design of liposomal aerosol for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages. *International Journal Of Pharmaceutics* 269:37-49
- Wagner A, Hempel G, Gumbinger HG, Jurgens H, Boos J. 1999. Pharmacokinetics of anticancer drugs in vitro. *Adv.Exp.Med.Biol.* 457:397-407
- Wang F, Cao Y, Zhao W, Liu H, Fu Z, Han R. 2003a. Taxol inhibits melanoma metastases through apoptosis induction, angiogenesis inhibition, and restoration of E-cadherin and nm23 expression. *J.Pharmacol.Sci.* 93:197-203
- Wang F, Cao Y, Zhao W, Liu H, Fu Z, Han R. 2003b. Taxol inhibits melanoma metastases through apoptosis induction, angiogenesis inhibition, and restoration of E-cadherin and nm23 expression. *J Pharmacol Sci* 93:197-203
- Wang J, Mongayt D, Torchilin VP. 2005. Polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs: preparation and anticancer activity in vitro of paclitaxel incorporated into mixed micelles based on poly(ethylene glycol)-lipid conjugate and positively charged lipids. *J Drug Target* 13:73-80

- Wang MD, Shin DM, Simons JW, Nie S. 2007. Nanotechnology for targeted cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 7:833-7
- Wang TH, Wang HS, Soong YK. 2000. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 88:2619-28
- Weibel ER. 1963. *Morphometry of the Human Lung*. New York: Academic Press
- Weibel ER. 1986. Integrity of lung structure: the role of cells and tissue. *Bull Eur Physiopathol Respir* 22:235s-9s
- Weil JH. 1983. *Bioquímica Geral*: Fundação Calouste Gulbenkian
- Westedt U, Kalinowski M, Wittmar M, Merdan T, Unger F, et al.. 2007. Poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for local delivery of paclitaxel for restenosis treatment. *J Control Release* 119:41-51
- Westesen K. 2000. Novel lipid-base colloidal dispersions as potential drug administration systems-expectations and reality. *Colloid and Polymer Science* 278:609-18
- Westesen K, Bunjes H. 1995. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? *International Journal of Pharmaceutics* 115:129-31
- Westesen K, Bunjes H, Koch MH. 1997a. Physicochemical Characterization of Lipid Nanoparticles and Evaluation of Their Drug Loading Capacity and Sustained Release Potential. *Journal of Controlled Release* 48:223-36
- Westesen K, Bunjes H, Koch MHJ. 1997b. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their loading capacity and sustained release potential. *Journal of Controlled Release* 48:223-36
- Westesen K, Siekmann B. 1997. Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 151:5-45(11)
- Westesen K, Siekmann B, Koch M. 1993. Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction. *International Journal of Pharmaceutics* 93:189-99
- Wilbur DS, Pathare PM, Hamlin DK, Buhler KR, Vessella RL. 1998. Biotin reagents for antibody pretargeting. 3. Synthesis, radioiodination, and evaluation of biotinylated starburst dendrimers. *Bioconjug Chem* 9:813-25
- Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, et al.. 1999. Respiratory System. In *Gray's Anatomy : The Anatomical Basis of Medicine and Surgery*, ed. PL Williams. Edinburgh: Churchill Livingstone
- Winternitz CI, Jackson JK, Oktaba AM, Burt HM. 1996. Development of a polymeric surgical paste formulation for taxol. *Pharm.Res.* 13:368-75
- Wissing SA, Kayser O, Muller RH. 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 56:1257-72
- Witte MH, Jones K, Wilting J, Dictor M, Selg M, et al.. 2006. Structure function relationships in the lymphatic system and implications for cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 25:159-84
- Wolf GL, Gazelle GS, McIntire GL, Bacon ER, Toner JL, et al.. 1994. Percutaneous computed tomography lymphography in the rabbit by subcutaneously injected nanoparticulates. *Acad Radiol* 1:352-7
- Wolff AC, Donehower RC, Carducci MK, Carducci MA, Brahmer JR, et al.. 2003. Phase I Study of Docosahexaenoic Acid-Paclitaxel: a Taxane-Fatty Acid Conjugate with a Unique Pharmacology and Toxicity Profile. *Clinical Cancer Research* 9:3589 -97
- Wood K, Cornwell W, Jackson J. 2001. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. *Current Opinion in Pharmacology* 1:370-7
- Xie Z, Guan H, Chen X, Lu C, Chen L, et al.. 2007. A Novel Polymer-Paclitaxel Conjugate Based on Amphiphilic Triblock Copolymer. *J Control Release* 117:210-6
- Xu Z, Gu W, Huang J, Sui H, Zhou Z, et al.. 2005. In vitro and in vivo evaluation of actively targetable nanoparticles for paclitaxel delivery. *Int J Pharm* 288:361-8

- Yang SC, Lu LF, Cai Y, Zhu JB, Liang BW, Yang CZ. 1999. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J Control Release* 59:299-307
- Yang T, Choi MK, Cui FD, Lee SJ, Chung SJ, et al.. 2007a. Antitumor Effect of Paclitaxel-Loaded PEGylated Immunoliposomes Against Human Breast Cancer Cells. *Pharmaceutical Research* 24:2402-11
- Yang T, Cui FD, Choi MK, Lin H, Chung SJ, et al.. 2007b. Liposome Formulation of Paclitaxel With Enhanced Solubility and Stability. *Drug Delivery* 14:301-8
- Yin D, Ge Z, Yang W, Liu C, Yuan Y. 2006. Inhibition of tumor metastasis in vivo by combination of paclitaxel and hyaluronic acid. *Cancer Letters* 243:71-9
- Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. 1999. Novel approaches to the treatment of small-cell lung cancer. *Cell Mol Life Sci* 55:1585-98
- Zara GP, Bargoni A, Cavalli R, Fundaro A, Vighetto D, Gasco MR. 2002a. Pharmacokinetics and tissue distribution of idarubicin-loaded solid lipid nanoparticles after duodenal administration to rats. *J Pharm Sci* 91:1324-33
- Zara GP, Cavalli R, Bargoni A, Fundaro A, Vighetto D, Gasco MR. 2002b. Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and other tissues. *J Drug Target* 10:327-35
- Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. 2007. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 83:761-9
- Zhang S. 2003. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature biotechnology* 21
- Zhang XJ, J.K.; Burt H.M. 1996. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *International Journal of Pharmaceutics* 132 195-206
- Zhang XN, Tang LH, Gong JH, Yan XY, Zhang Q. 2006. An Alternative Paclitaxel Self-Emulsifying Microemulsion Formulation: Preparation, Pharmacokinetic Profile and Hypersensitivity Evaluation. *J Pharm Sci Technol* 60:89-94
- Zhao J, Kim JE, Reed E, Li QQ. 2005. Molecular mechanism of antitumor activity of taxanes in lung cancer (review). *International Journal of Oncology* 27:247-56
- Zochbauer-Muller S, Gazdar A, Minna J. 2002. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol* 64:681-708
- zur Muhlen A, Mehnert W. 1998. Drug release and release mechanism of prednisolone loaded solid lipid nanoparticles. *Pharmazie* 53:552-5
- zur Muhlen A, Schwarz C, Mehnert W. 1998. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism. *Eur J Pharm Biopharm* 45:149-55(7)

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO
LIPÍDICAS

DE

NANOPARTÍCULAS

2.1. Introdução

2.1.1. Vectores Coloidais

Os sistemas transportadores assumem uma enorme importância na área dos novos sistemas terapêuticos, sobretudo quando há necessidade de direccionar o fármaco, tanto quanto possível, para região específica de um órgão ou tecido, preservando a sua actividade e tornando-o disponível em dose terapêutica (Zhang *et al.* 2007). De uma forma geral, são constituídos por partículas coloidais, desenvolvidos com base em excipientes biocompatíveis, sendo concebidos de modo a apresentarem selectividade em relação ao alvo biológico (Couvreur & Vauthier 2006; Davis 2004; Hillery 2001; Kawashima 2001; Nishioka & Yoshino 2001; Torchilin 2006).

A associação de um fármaco a um sistema transportador tem como objectivo alterar o seu comportamento farmacocinético, de modo a aumentar a eficiência terapêutica e, em simultâneo, diminuir ou evitar os efeitos secundários provocados pelo fármaco na forma livre.

Sistemas dispersos constituídos por partículas lipídicas, tais como as SLN ou as NLC, podem ser definidos como suspensões nanométricas, organizados aparentemente como uma estrutura compacta, com capacidade de aprisionar moléculas no reticulado da matriz formada (Mehnert & Mader 2001; Muller *et*

al. 2000; Wissing *et al.* 2004). O carácter sólido atribuído às nanopartículas formadas após homogenização, consequência da estrutura cristalina das matérias-primas de base, confere a estes sistemas a capacidade de reter fármacos e permite ainda, prever a ausência de fenómenos de instabilidade ao longo do tempo. Neste contexto, é evidente que a caracterização das partículas dispersas assume, em paralelo com o seu desenvolvimento, um papel fundamental.

Muito embora se antecipe uma ampla gama de aplicações, resultante sobretudo da possibilidade de incorporação de diferentes fármacos, ainda existe alguma controvérsia, relacionada sobretudo com estrutura das nanopartículas e com a influência, que os diferentes processos de preparação, exercem na sua organização (Mehnert & Mader 2001; Muller *et al.* 2000).

De facto a tecnologia de produção destas partículas lipídicas está longe de estar totalmente estabelecida (Wissing *et al.* 2004). Adaptaram-se à produção e à incorporação de fármacos em matrizes submicrométricas abordagens frequentemente utilizadas na produção de sistemas dispersos convencionais. Técnicas como a sonicação, a extrusão, a evaporação/difusão de solventes, a utilização de fluídos supercríticos, o método de fusão/emulsificação, o *spray-drying* e a homogeneização sob alta pressão - HPH (High Pressure Homogenization), são actualmente aplicadas à produção dos novos sistemas terapêuticos. A técnica de preparação seleccionada depende das características da matriz envolvida e da natureza do fármaco a incorporar (Bunjes & Siekmann 2006; Sjöström & Bergenstahl 1992; Trotta *et al.* 2003; Wissing *et al.* 2004). No entanto, foi principalmente o conhecimento adquirido durante décadas, através da produção de sistemas dispersos, que permitiu desenvolver com rapidez métodos de preparação de nanopartículas de lípidos sólidos (Florence & Attwood 2006a).

Na maioria dos casos, os procedimentos descritos envolvem um processo de fusão de modo a permitir a dispersão da matéria-prima. Segue-se uma fase de solidificação, da qual resulta a cristalização da fase dispersa, que traduz a estrutura final das nanopartículas e condiciona o grau de retenção do fármaco (Mehnert & Mader 2001; Muller *et al.* 2000; Wissing *et al.* 2004).

Os fenómenos subjacentes à mudança de fases, sobretudo quando envolvem a recristalização, promovem o aparecimento de formas polimórficas, que podem

apresentar-se metastáveis ou, pelo contrário, dependendo da temperatura e da pressão, tender para estados mais estáveis, através de uma ou várias formas intermédias (Bunjes & Unruh 2007b; Mehnert & Mader 2001; Westesen *et al.* 1997a). Estes acontecimentos, consequência não apenas dos eventos térmicos, mas também do método e das condições de produção, promovem frequentemente o aparecimento de mesofases, estruturas intemédias, com a fluidez própria de um líquido, embora com um arranjo molecular semelhante ao de um sólido.

Não obstante a vasta gama de métodos já descritos, é interessante verificar que a preparação de nanopartículas lipídicas recorre aos fundamentos subjacentes à preparação de emulsões ou microemulsões. Encontram-se nestas condições os métodos propostos por Gasco (1993) e Muller (1996), ambos objecto de patente na década de noventa (Gasco 1993; Müller & Lucks 1996).

A utilização de HPH proposta por Muller e colaboradores (1996), que pode ocorrer por duas vias, respectivamente, a frio ou a quente, consiste na dispersão de duas fases imiscíveis (Müller & Lucks 1996). Esta técnica tem sido amplamente descrita como processo de preparação de SLN, NLC, nansuspensões e emulsões (Mehnert & Mader 2001; Muller *et al.* 2000; Siekmann & Westesen 1992; Westesen 2000; Westesen *et al.* 1997b). O processo demonstrou ser um método eficaz, como comprovam os numerosos estudos publicados nas últimas décadas, não apenas no que se refere ao valor de *dm* das partículas dispersas, como também da distribuição de tamanho de partícula (Mehnert & Mader 2001; Muller *et al.* 2000; Saupe *et al.* 2006; Wissing *et al.* 2004). Ocasionalmente, a dispersão da mistura lípido(s)-fármaco por HPH induz alterações estruturais acentuadas, possivelmente devido à pressão elevada, que se revelam pela falta de cristalinidade da matriz e, por vezes, pela formação de nanosuspensões de fármaco livre (Jores *et al.* 2004; Westesen 2000).

Na preparação de SLN a partir de microemulsões, outra técnica empregue na incorporação de numerosos fármacos, os mecanismos envolvidos são semelhantes aos observados durante a formação de micelas (Cavalli *et al.* 1993; Cavalli *et al.* 2002; Cavalli *et al.* 1995; Cavalli *et al.* 1999). Apesar da simplicidade do método, este tem como desvantagens a necessidade de

quantidades elevadas de agente emulsivo e o facto do processo originar uma preparação com uma baixa concentração de partículas (Gasco 1997; Gasco 2001) .

A evaporação ou difusão de solvente após emulsificação, métodos associados à microencapsulação de fármacos em matrizes poliméricas, estão a ser adaptados à tecnologia de preparação de SLN, como comprovado pelo crescente número de trabalhos publicados (Hu *et al.* 2004; Reithmeier *et al.* 2001a; b; Trotta *et al.* 2003). Outros métodos têm sido pontualmente utilizados, como por exemplo a preparação por extrusão (Wang *et al.* 2005), por *spray-drying* (Freitas & Mullera 1998), pelo método de fluídos supercríticos (Chattopadhyay *et al.* 2007), precipitação por solventes (Hu *et al.* 2004) ou ainda por difusão através de membranas (Charcosset *et al.* 2006).

O desenvolvimento de um método de produção alternativo tem como objectivo possibilitar a sistematização de procedimentos operativos, de modo a garantir a reprodutibilidade de todo o processo. A optimização será avaliada através das características do produto final. Esta necessidade, está relacionado sobretudo com duas questões não esclarecidas, originadas por particularidades dos métodos já existentes: (i) poderá ser atribuída à pressão, no processo por HPH, um efeito de instabilidade por promover de forma mais rápida fenómenos de sobrefusão? (ii) Qual o efeito da elevada concentração de agentes emulsivos, presente nas SLN produzidas por microemulsão?

A introdução da emulsificação de lípidos após fusão pretende constituir uma alternativa válida aos métodos existentes. Neste capítulo desenvolveram-se nanopartículas lipídicas com base em lípidos sólidos e estudou-se a alteração das propriedades das partículas em função da variação da composição e dos parâmetros do processo.

2.1.2. Produção de Nanopartículas lipídicas por emulsificação

Em sistemas de duas ou mais fases imiscíveis, a ruptura da interface é obtida geralmente através do fornecimento de energia mecânica e da utilização de um agente de superfície ou estabilizador. Este fenómeno, que está na base do processo de emulsificação, permite, após dispersão de fases, aumentar a área de superfície da fase interna, o que se consubstancia na formação de gotículas dispersas, de forma e diâmetro homogéneo, em consequência da agitação

enérgica (Aulton & Collett 2002). A escolha deste método justifica-se também pela simplicidade do processo de aumento de escala, uma vez que é amplamente utilizado pela indústria farmacêutica, inclusive na produção de formas estéreis (Puel *et al.* 2006).

No caso de lípidos sólidos, a homogeneização a quente de duas fases imiscíveis promove a formação de gotículas ou seja de uma emulsão, que posteriormente por arrefecimento da fase dispersa, dá origem a partículas individualizadas em suspensão (Hou *et al.* 2003; Videira & Almeida 1998).

No desenvolvimento destas estruturas é indispensável a compreensão dos mecanismos que têm lugar no decurso da sua produção, o que implica o estudo dos parâmetros de processo, que interferem não apenas a nível da estrutura das partículas, como também nas características do produto final. A influência das condições de preparação nas características finais do produto, em qualquer método, tem sido largamente demonstrada (Cavalli *et al.* 1996; Schwarz *et al.* 1994; Unruh *et al.* 1999; Wissing *et al.* 2004).

A emulsificação abrange uma série de questões básicas, relacionadas sobretudo com a natureza dos constituintes e com método de preparação, das quais depende a estabilidade do produto final (Bouchemal *et al.* 2004; Heurtault *et al.* 2003). É portanto fundamental estabelecer os parâmetros do processo utilizado de modo otimizar o resultado final.

2.1.3. Cristalinidade

Muito embora o estado cristalino seja uma presunção, no que se refere às SLN, a sua natureza coloidal sugere que o estado físico da matriz pode apresentar formas estruturais e comportamentos térmicos distintos dos apresentados pela matéria-prima inicial (Bunjjes & Unruh 2007a; Roke *et al.* 2006). Contribuem para esta diferença o diâmetro médio das nanopartículas e a concentração final da dispersão, mas é sobretudo o seu carácter lipídico que condiciona as alterações no arranjo molecular durante a solidificação (Bunjjes & Siekmann 2006; Rojas *et al.* 2002).

Para Westesen e colaboradores (1995) a estrutura final das SLN apresenta, para cada valor de temperatura e de pressão, uma forma polimórfica diferente. Decorre desta hipótese, a possibilidade da matriz formada não apresentar uma

estrutura cristalina (Bunjes & Unruh 2007a; Jennings *et al.* 2000b; Siekmann *et al.* 2002; Westesen & Bunjes 1995; Worle *et al.* 2007).

a. Influência da temperatura de fusão

Para preparar nanopartículas a partir de lipídios sólidos é necessário proceder à fusão do lípido. O aquecimento de triacilgliceróis promove, de uma maneira geral, o aparecimento de três formas polimórficas: (i) a forma α -, que corresponde a um estado em que as moléculas se podem mover livremente; (ii) a forma β' -, que surge após arrefecimento da forma α - e corresponde à fase em que a cadeia carbonada já não pode sofrer qualquer rotação; (iii) a forma β -, mais tardia, que correspondente ao polimorfo mais estável, o qual apresenta na sua estrutura cadeias empacotadas de forma ordenada (Bunjes *et al.* 2007; Bunjes *et al.* 1996; Freitas & Muller 1999a; Sato & Ueno 2001; Saupe *et al.* 2006; Westesen & Siekmann 1997).

Os triacilgliceróis de cadeia longa, ao contrário dos mono e diacilgliceróis exibem, após fusão, tendência para atingir a estrutura correspondente à forma estável β -, o que pode condicionar a concentração de fármaco incorporado na matriz ao longo do tempo uma vez que a cristalização é mais rápida (Bunjes *et al.* 1996; Pietkiewicz *et al.* 2006). A taxa de alterações entálpicas que se desenrolam à medida que a amostra é aquecida, condiciona igualmente a cristalinidade do suporte sólido, após preparação (Brubach *et al.* 2007; Bunjes *et al.* 1996; Florence & Attwood 2006b).

De uma forma geral, este parâmetro depende da natureza e polimorfismo da fase lipídica e da temperatura de fusão. Porém, esta relação, só se verifica quando a fusão da matéria-prima é considerada isoladamente. De facto, como foi demonstrado sobretudo pelos trabalhos de Westesen e colaboradores, num sistema bifásico, este fenómeno é igualmente função da espessura e área de superfície das partículas formadas, da concentração de lípido e ainda da presença e natureza do fármaco e do agente tensioactivo (Bunjes *et al.* 2007; Mehnert & Mader 2001; Westesen 2000; Wissing *et al.* 2004).

b. Influência do método de produção

Os métodos de preparação de nanopartículas lipídicas englobam passos críticos, tais como, a utilização de pressão, de elevadas concentrações de

tensioactivo ou o uso de solventes orgânicos, que afectam de forma significativa a reorganização estrutural do sólido fundido (Mehnert & Mader 2001; Muller *et al.* 2000; Schwarz *et al.* 1994). Numerosos estudos têm demonstrado que as alterações estruturais que ocorrem ao longo do tempo, estão efectivamente dependentes das condições operativas e da presença de outros compostos (Blumer & Mader 2005a; Bunjes *et al.* 2001; Bunjes *et al.* 2002; 2003; Bunjes *et al.* 2000b; Bunjes & Unruh 2007a; Freitas *et al.* 1994; Freitas & Muller 1999a; Westesen *et al.* 1993).

Estes estudos, que incidiram em particular sobre o método de HPH para preparação de SLN, demonstraram que o tipo de transições polimórficas que ocorrem na estrutura da partícula, a co-existência de diferentes espécies e, sobretudo, a gelificação ao longo do tempo, são consequência dos parâmetros de produção estabelecidos, tais como a temperatura de fusão, o número de ciclos de homogeneização e a pressão utilizada (Bunjes & Unruh 2007a; Kuntsche & Bunjes 2007; Mehnert & Mader 2001; Muller *et al.* 2000; Westesen & Siekmann 1997).

Relativamente ao método de emulsificação/solidificação, a preparação de nanopartículas lipídicas resultará da relação entre a força de agitação e a dispersão obtida. Deste modo, o processo dispensa o uso de condições extremas, como a pressão ou elevadas concentrações de tensioactivo.

Todavia, a optimização do método de preparação, envolvendo a utilização de tecnologia que possibilite a automatização do processo, o aumento de escala e a estabilidade da preparação final, é uma etapa fundamental. Para tal, é necessário ter em conta a contribuição dos parâmetros de produção, de modo a seleccionar as condições que promovam o melhor equilíbrio entre as densidades electrónicas das fases contínua e dispersa. Garantindo, ao mesmo tempo, que a partícula resultante da solidificação não sofre alterações de estrutura ao longo do tempo.

c. *Influência da natureza lipídica na cristalinidade das nanopartículas*

A cristalinidade da matriz preparada será igualmente influenciada pela natureza lipídica da matéria-prima base e, especialmente, pela composição desta em ácidos gordos. A relação entre o conteúdo de mono, di e triacilgliceróis da fase lipídica e as micropropriedades físicas da matriz, tem

sido amplamente descrita e discutida (Charman 2000; Stuchlik & Zak 2001). Desde do aparecimento, na década de noventa, de dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas, para as quais o conceito de SLN encerra em si mesmo a existência de uma estrutura sólida, que o grupo de Westesen têm vindo a evidenciar a importância da proporção de triacilgliceróis (Westesen & Bunjes 1995). Estes, após fusão, apresentam maior capacidade para formar cristais contribuindo desta forma para a solidificação da partícula lipídica (Blumer & Mader 2005b; Jennings *et al.* 2000b; Jores *et al.* 2004; Siekmann *et al.* 2002; Siekmann & Westesen 1994a; Westesen *et al.* 1997a).

Aparentemente, tal como acontece nas membranas biológicas, onde a fracção lipídica pode exibir um comportamento de cristal líquido, os transportadores coloidais, condicionadas pela natureza do ácido gordo constituinte e respectivo grau de insaturação, apresentam diferenças na fluidez da estrutura molecular (Blumer & Mader 2005b; Bunjes *et al.* 2007; Saupe *et al.* 2006; Unruh *et al.* 2001; Vyas *et al.* 1997).

As alterações observadas na estrutura lipídica após dispersão, são decorrentes da natureza do lípido utilizado. Porém, como já o afirmamos, estão igualmente relacionadas com a temperatura de fusão e com a presença de tensoactivo (Bunjes *et al.* 2003; Mäder & Mehnert 2004; Westesen *et al.* 1997b). Esta relação ficou amplamente demonstrado pelos trabalhos de Mäder e Bunjes sobre as características das nanopartículas lipídicas sólidas (Blumer & Mader 2005b; Bunjes & Unruh 2007a; Siekmann *et al.* 2002). Para estes autores, em função das condições de pressão e temperatura, é possível a co-existência de estados intermédios da matéria, como o de cristal líquido, espécies de sobrefusão, sólidos amorfos e estrutura cristalina.

A total caracterização das nanopartículas lipídicas tornou-se um objectivo fundamental, quando se demonstrou a ausência de cristalinidade da matriz, para o qual se concentraram esforços, de modo a adaptar à análise de dispersões nanométricas, métodos de análise convencionalmente utilizados para caracterizar estruturas moleculares, entre os quais se destacam, as técnicas de difracção de luz (PCS; X-ray) e a calorimetria diferencial - DSC (Differential Scanning Calorimetry) (Bunjes & Unruh 2007a; Jores *et al.* 2004). Curiosamente, a preparação de dispersões de lípidos sobrefundidos, um objectivo que resulta dos estudos anteriores, veio renovar as expectativas na

utilização de nanopartículas lipídicas para veiculação de fármacos. Aparentemente, estas partículas possuem as vantagens inerentes aos dois estados da matéria, sólido e líquido (Bunjes *et al.* 1998; Kuntsche & Bunjes 2007; Kuntsche *et al.* 2004). De facto, a existência desta inerente mesoestrutura, não cristalina, pode contribuir não só para a eficácia das nanopartículas lipídicas no que respeita à retenção do fármaco no seu interior, como também para o seu desempenho como transportador *in vivo* facilitando a passagem pelas barreiras biológicas (Hafez & Cullis 2001).

O desenvolvimento das NLC abrange este conceito de estruturas mistas, ao afirmar que a sua organização resulta da presença de triacilgliceróis de cadeia média no interior da estrutura sólida, o que lhes confere simultaneamente um carácter sólido e líquido (Jenning & Gohla 2000; Jennings *et al.* 2000a; Muller *et al.* 2002; Uner 2006). Contudo, em vez de uma estrutura ordenada, trata-se de um sistema de duas fases separadas (Jores *et al.* 2004).

A cristalinidade da matriz, o *dm* e a distribuição granulométrica de dispersões de nanopartículas lipídicas são, neste trabalho, os parâmetros utilizados para a selecção de um sistema de veiculação de fármacos para administração pulmonar.

2.2. Materiais

2.2.1. Lípidos

As nanopartículas lipídicas são preparadas com base em lípidos, concretamente acilgliceróis, sólidos à temperatura ambiente. Também chamados lípidos simples, estes resultam da esterificação do glicerol com ácidos gordos de cadeia curta, média ou longa (Lehninger 2004). As matérias-primas empregues, descritas na Farmacopeia Europeia EP 5 (2005) como excipientes farmacêuticos, são lípidos maioritariamente utilizados em formulações de fármacos pouco solúveis com o fim de diminuir os problemas de solubilidade e melhorar a sua biodisponibilidade (Pouton 2006). Estes compostos diferem entre si na razão de mono, di e triacilgliceróis e, especialmente, na estrutura da cadeia alifática de ácido gordo. Tal diversidade concorre para que estes apresentem um enorme potencial, pelo que a correcta selecção do lípido base

permite o desenvolvimento de sistemas transportadores de fármacos adequados aos fins a que se destinam (Charman 2000; Davis 2004; Stuchlik & Zak 2001).

Para a preparação de nanopartículas lipídicas seleccionaram-se acilgliceróis de cadeia média e de cadeia longa, entre C₁₂ e C₂₂, que apresentam uma temperatura de fusão entre os 40°C e 75°C (Tabela 2-1).

Tabela 2-1. Identificação dos lípidos e respectivo ácido gordo (cadeia carbonada:saturação). Temperaturas de fusão (p.f.) para cada lípido. R- corresponde ao ácido gordo. Valor de índice de Hidroxilo (IH).

R-	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COO ⁻	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COO ⁻	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COO ⁻	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COO ⁻
Ác. gordo	Palmítico (16:0)	Esteárico (18:0)	Esteárico (18:0)	Behénico (22:0)
P.f. (°C)	55-64,0	43,0-44,5	54,5-58,5	69-71,5
Lípido	Precirol ATO5®	Witepsol E85	Geleol®	Compritol®888 ATO
EHL	2	-	3,6	2
IH	60-115	5-15	70-120	145-165

A natureza anfifílica, traduzida pelo valor de índice de hidroxilo e a percentagem de triacilgliceróis na sua constituição, foram factores igualmente utilizados para a selecção dos lípidos de partida.

Os lípidos Compritol® 888 ATO e Precirol ATO5® foram oferecidos pela Gattefossé (França). O Compritol® 888 ATO (behenato de acilglicerol,) composto por > 87% de ácido behénico em uma mistura de mono- (12-18%) di- (52-54%) e triacilgliceróis (28-32%), apresenta após dispersão um elevado índice de recristalização (75-80%). O Precirol ATO5® é um éster do ácido palmítico (palmitoestearato de glicerido-64,0°C) composto por cerca de 80% de ácido palmítico mono, di e triesterificado.

Os lípidos Witepsol E85 e Geleol® foram adquiridos à Hüls (Espanha). O Witepsol E85 (estearato de glicerol F.P.VIII), composto por uma mistura de mono- (1-5%) di- (10-35%) e triacilgliceróis (65-80%), apresenta uma composição variada em óleos e ceras. O Geleol® (monoestearato de glicerol),

uma base gelificante não iónica, contém cerca de 42 a 51% de ácido esteárico, 44 a 51% de ácido palmítico, entre outros ácidos gordos.

2.2.2. Fase aquosa

As formulações foram estabilizadas recorrendo a um agente tensioactivo não iónico, o polissorbato 80 (Monooleato de polioxietileno (20) sorbitano) que apresenta um valor de EHL= 15 (Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo) Farmacopeia Portuguesa 8 (FP 8). Este agente possui a capacidade de formar uma película resistente na região da interface, o que confere maior estabilidade às formulações das quais faz parte. É um excipiente sobejamente conhecido, sendo utilizado na indústria farmacêutica, alimentar e cosmética. O polissorbato 80 foi adquirido à Sigma Chemical Company (Espanha).

Para a fase aquosa, e para as diluições necessárias aos métodos de caracterização, utilizou-se água purificada de acordo com a monografia água para preparações injectáveis (FP8).

2.3. Métodos

2.3.1. Emulsificação/Solidificação

Prepararam-se nanopartículas lipídicas a partir de um método de homogeneização/emulsificação. Este método consiste na dispersão de fases através da agitação vigorosa da mistura, por intermédio de um rotor hidráulico (Silverson Machines Ltd, Waterside, Inglaterra).

O estudo envolveu duas fases: (i) estimar a influência dos parâmetros físicos, relacionados com o processo de fabrico, nas características da dispersão, (ii) avaliar a capacidade dos diferentes lípidos em formar nanopartículas dispersas numa fase aquosa contendo tensioactivo. Esta fase caracterizou-se fundamentalmente pelo estudo de diferentes misturas lípido/polissorbato 80, no que se refere à composição qualitativa e quantitativa, avaliando a sua influência nas características físico-químicas das partículas preparadas.

Aos dados experimentais obtidos foi ajustado um modelo quadrático de modo a avaliar a influência dos parâmetros envolvidos e a sua significância estatística.

a. Processo de preparação

O método proposto no presente trabalho pode ser dividido em seis etapas:

- (A) preparação da solução aquosa de tensoactivo;
- (B) fusão da fase lipídica a uma temperatura superior em 20°C à descrita como necessária para fundir o lípido e aquecimento da solução aquosa de tensoactivo à mesma temperatura;
- (C) mistura a quente, seguida de homogeneização por emulsificação das fases (Silverson Machine, Inglaterra), em reactor de vidro tipo I desenhado especialmente para o efeito;
- (D) embalagem e arrefecimento da preparação de nanopartículas;
- (E) caracterização físico-química:
 - diâmetro médio- dm (nm);
 - potencial Zeta- ξ (mV);
 - absorvência-abs;
 - microscopia electrónica-TEM.
- (F) tratamento dos dados experimentais.

Na Figura 2-1 encontra-se a representação esquemática do protocolo e equipamento necessário à preparação das nanopartículas lipídicas por emulsificação seguida de solidificação.

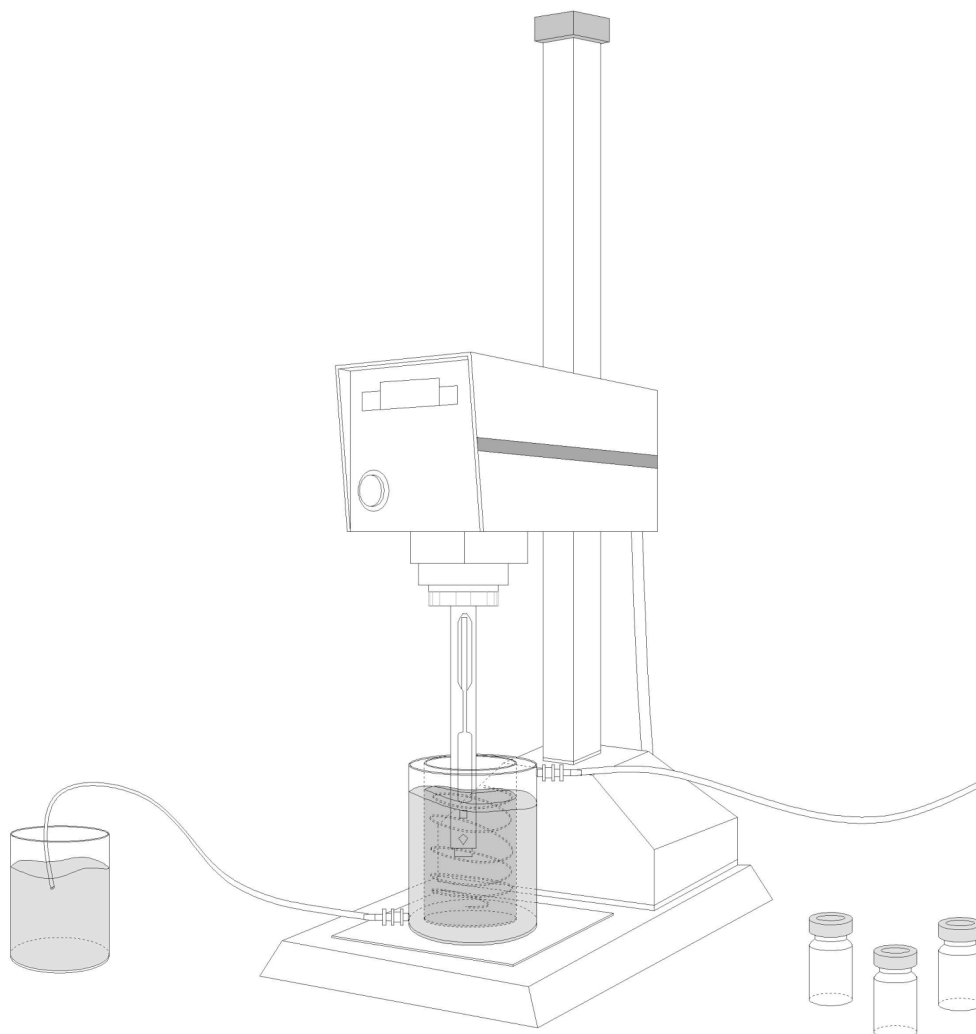


Figura 2-1: Representação esquemática do sistema operativo necessário à preparação de uma dispersão coloidal de partículas lipídicas-nsLp. O processo é dividido em três etapas: (i) aquecimento das fases orgânica e aquosa separadamente, (ii) homogeneização após mistura das fases em recipiente de vidro colocado no interior do reactor, (iii) solidificação à temperatura ambiente após acondicionamento do sistema disperso em frascos rolhados e encapsulados. A temperatura no interior da mistura é mantida com recurso à circulação de água quente através de um suporte de parede dupla. A altura da haste é fixada de modo a promover a mesma área de agitação em todas as preparações.

De modo a diminuir a variabilidade entre preparações foram estabelecidos alguns procedimentos operativos, que a seguir se descrevem:

- Em banho termostaticado (80°C) e com um intervalo de 10 minutos (min) entre as duas fases, ambas seladas após pesagem, procede-se ao aquecimento da fase aquosa seguida da fusão do lípido.
- A mistura e dispersão de fases ocorre imediatamente após fusão do lípido, de modo a evitar fenómenos de microcristalização e (re)fusão.
- O processo de dispersão é realizado em circuito semi-fechado. Para este efeito, a boca de entrada do reactor é fechada durante a homogeneização de forma a evitar perdas por evaporação.
- O elemento rotor/estator é rigorosamente colocado a 3 cm do fundo do reactor de mistura, para que a agitação (turbina) seja idêntica em todas as preparações.
- Finalizada a mistura, cessam de imediato e em simultâneo a agitação e o aquecimento, de modo a que o arrefecimento se realize apenas em função da temperatura ambiente e da massa de lípido.
- Enchimento a quente em frasco de vidro, a 1/3 da capacidade do volume total, vidro tipo I siliconado de acordo com Freitas e Muller (1999)
- Os frascos, previamente identificados, são rolhados, capsulados e armazenados à temperatura ambiente ao abrigo da luz.
- Considerou-se o tempo de 72h após preparação como o t_0 , para permitir a formação de polimorfos (instáveis) que cristalizam mais rapidamente.

b. Estudo da influência dos parâmetros de processo

Prepararam-se (n=6) sistemas de nanopartículas dispersas numa fase aquosa contendo o polisorbato 80, a partir dos lípidos Compritol® 888ATO e Precirol ATO5®. Com excepção do ponto (i), a carga de lípido e a concentração de tensoactivo mantiveram-se constantes, 50% (m/m_{lípido}) de polissorbato 80 para 6% (m/v_{total}) de lípido.

Para estabelecer a dependência do dm de partículas, assim como do perfil da distribuição de tamanho, avaliaram-se como variáveis independentes três parâmetros de processo.

- Mantendo constante a temperatura de fusão do lípido (mais 20°C do que o ponto de fusão) e o tempo de homogeneização (10 min), fez-se variar

a **intensidade de agitação** entre 8 000, 10 000, 14 000 e 20 000 r.p.m.. Repetiu-se o procedimento para formulações com base no lípido Compritol® 888ATO a 8% (m/v_{total}) e 50% (m/m_{lípido}.) de tensoactivo, a 6 000, 10 000 e 14 000 r.p.m..

- Produziram-se diferentes preparações utilizando uma velocidade de agitação de 14 000 r.p.m. durante 10 minutos, fazendo-se variar a **temperatura** de fusão para valores entre 10° a 25°C superiores ao ponto de fusão do lípido.
- Mantendo constante a temperatura de fusão do lípido (mais 20°C do que o ponto de fusão) e a intensidade da agitação (14 000 r.p.m.) fez-se variar o **tempo de homogeneização** entre 5, 10, 15 e 20 minutos (min).

c. Estudo da influência da composição do sistema

Avaliou-se a dependência das características físico-químicas das nanopartículas com a composição do sistema, fazendo-se variar a composição qualitativa e quantitativa do mesmo, tendo-se mantido constantes os parâmetros relacionadas com o processo como está descrito na Tabela 2-2.

Tabela 2-2: Parâmetros operativos estabelecidos para a produção de nSLp.

Condições do método fusão/emulsificação	
Volume	100 ml
Agitação	14 000 (r.p.m.)
Tempo de preparação	10 min
Temperatura	Superior em 20°C ao p.f. do(s) lípido(s)

Em lotes de 100ml, preparados segundo o método estabelecido no ponto anterior, estudou-se a influência da composição química.

- **Natureza do(s) lípido(s)**. Estudo do efeito do lípido no *dm* e largura da distribuição granulométrica, uma vez que as propriedades que

apresentam, nomeadamente ponto de fusão e polaridade, são função do ácido gordo que os compõem. Para este estudo a carga em massa de lipídeo e a percentagem de tensioactivo mantiveram-se constantes, 50% ($m/m_{\text{lipídeo}}$) de polissorbato 80 para 6% (m/v_{total}) de lipídeo.

- **Carga de sistema em fase lipídica.** Prepararam-se lotes de nanopartículas lipídicas a partir dos lípidos Compritol® 888ATO, Precirol® ATO5 e Witepsol E85, em concentrações crescentes a 3%, 6%, 8% e 10% (m/v_{total}).
- **Percentagem do tensioactivo.** A percentagem de tensioactivo foi estudada como variável independente em relação à concentração de lipídeo. A relação lípido/tensioactivo representa a percentagem de tensioactivo em relação à massa de lipídeo. Utilizaram-se para este estudo os lípidos Compritol® 888ATO, Precirol® ATO5 e Witepsol E85.

Às formulações preparadas foram atribuídos códigos de acordo com o exposto na Tabela 2-3. Na designação apresentada a primeira fracção corresponde à composição lipídica, percentagem de lípido ($m/m_{\text{lipídeo}}$) e abreviatura do nome, seguido da percentagem de tensioactivo (m/v_{total}).

Tabela 2-3: Código de identificação das preparações, de acordo com o lípido utilizado e com a relação lípido/tensioactivo (L/T).

Lípido	Compritol 888 ATO			Precirol ATO 5			Witepsol E85		
	<i>L/T</i>								
(%)	25%	50%	75%	25%	50%	75%	25%	50%	75%
3	3co_25	3co_50	3co_75	3pr_25	3pr_50	3pr_75	3w_25	3w_50	3w_75
6	6co_25	6co_50	6co_75	6pr_25	6pr_50	6pr_75	6w_25	6w_50	6w_75
8	8co_25	8co_50	8co_75	8pr_25	8pr_50	8pr_75	8w_25	8w_50	8w_75
10	10co_25	10co_50	10co_75	10pr_25	10pr_50	10pr_75	10w_25	10w_50	10w_75

Foi elaborado um plano experimental que permitiu integrar a informação fornecida pelos dados recolhidos, de forma a estabelecer possíveis dependências entre parâmetros distintos.

d. Análise da interação entre os efeitos

Tendo em conta a influência relativa dos parâmetros atrás estudados, elaborou-se um planeamento experimental de modo avaliar a magnitude do efeito causado por cada factor na variável dependente. Na Figura 2-2 encontra-se representado o planeamento para uma série de experiências, onde se fez variar a concentração de lípido (três níveis) e a relação tensoactivo/lípido (três níveis) para os lípidos Compritol® 888ATO e Precirol AT05®.

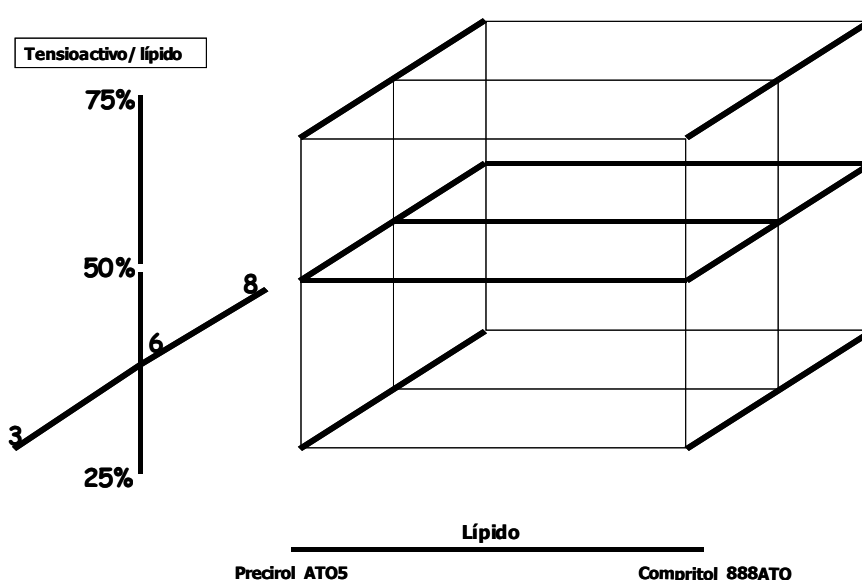


Figura 2-2: Estudo comparativo entre os lípidos Compritol® 888ATO e Precirol AT05®.

Estabeleceu-se o valor de $p < 0,05$ como o limite para concluir acerca da significância de cada factor.

Dado que a variabilidade associada ao processo pode influenciar de forma significativa as características físicas das partículas, procedeu-se à execução das diferentes preparações de nanopartículas de forma aleatória. Deste modo pretende-se evitar a introdução de um potencial viés nos dados a determinar.

2.3.2. Caracterização

a. Determinação do diâmetro médio

Nas nanopartículas lipídicas o diâmetro da entidade dispersa confere, como já foi referido, propriedades especiais, consequência do seu estado coloidal. O estudo da distribuição de diâmetros numa população de partículas tem sido utilizado, não apenas para prever a estabilidade da dispersão, mas também como critério de adaptabilidade às diferentes vias de administração. O método utilizado para determinar o diâmetro de partícula durante a primeira fase foi a espectroscopia de difracção *laser* (Coulter Electronics LS 130, U.K. com sistema PIDDS integrado). As leituras feitas numa amostra de partículas ao $t=0$ permitiram caracterizar o padrão de distribuição da população de partículas e o conteúdo em micropartículas de cada formulação, através da percentagem de partículas que apresentam diâmetros inferiores 50% (D50), 90% (D90) 10% (D10).

Para a segunda fase, que teve como objectivo a caracterização total das partículas, utilizou-se a espectrofotometria de correlação de fotões – PCS (Photon Correlation Spectroscopy; Autosizer Malvern Instruments IV, Reino Unido) para determinar o diâmetro médio (dm) e o índice de polidispersão (I_p) de cada formulação.

b. Determinação da carga eléctrica superficial

Nestes sistemas, a carga de superfície corresponde ao somatório do contributo da polaridade dos lípidos e da estabilização electroquímica, promovida pelo agente tensioactivo e pela camada difusa de iões que se instala na vizinhança da partícula (Freitas & Muller 1999b; Grasso *et al.* 2002). A carga superficial, traduzida pelo valor do potencial Zeta (ξ -mV), foi medida após diluição das amostras em água purificada (20 μ l:1ml) (Malvern Zetasizer IV, Reino Unido). À célula electroforética foi aplicado um campo eléctrico de 15,24 V/cm .

c. Análise Calorimétrica Diferencial de Varrimento

Os fenómenos térmicos, intervalo de fusão e o índice de cristalinidade (IR%), foram determinados utilizando a calorimetria diferencial de varrimento (Differential Scanning Calorimetry- DSC: Mettler Toledo TA 4000 ligado a um

processador Mettler TA, Alemanha). As amostras de matéria-prima e as da formulação foram rigorosamente pesadas em cápsula de alumínio. A panela selada é sujeita a aquecimento a uma taxa de 10K/min, no intervalo de 20°C a 95°C. Foram comparados termogramas obtidos com 20mg de uma mistura física de lípido puro com os obtidos com a dispersão coloidal. O índice de cristalinidade (IR%) foi calculado a partir dos valores da entalpia de fusão da suspensão lipídica, da entalpia de fusão molecular do lípido puro e da concentração da fase lipídica, utilizando a seguinte equação:

$$IR\% = \frac{Entalpia_{dispersãodelípido}}{Entalpia_{lípidopuro} \times conc_{lípido}} \times 100$$

Equação 2-1: Cálculo do índice de recristalização a partir do valor (J/g) das entalpias correspondentes ao lípido puro e às nanopartículas em função da concentração do lípido (%).

d. Análise morfológica

A análise morfológica das partículas foi executada por análise de microfotografias obtidas por microscopia electrónica de transmissão (TEM; Philips, CM 120 Biotwin), com as amostras colocadas sobre grelhas de cobre revestidas a carbono (300 mesh). Depois de retirado o excesso de amostra adicionou-se ácido fosfotúngstico 1%, que funciona como agente de contraste. Um feixe de electrões de alta voltagem (80-200 keV) incide sobre a amostra (50-200 nm). O contraste resulta da difracção de electrões pelos átomos constituintes do material.

e. Determinação do número de partículas

Com o objectivo de estimar o número de partículas (N_p) presentes nas suspensões de nanopartículas e, em simultâneo, detectar alterações na estabilidade da preparação, desenvolveu-se um método espectrofotométrico baseado nos valores de dm e na turbidez da amostra, à semelhança do método utilizado para determinar o número de células em suspensões celulares (Lorian V., 2005).

Após diluição em água desionizada, em HEPES 0,025M ou em cloreto de sódio a 0,9%, procedeu-se à determinação da turbidez de amostras de

nanopartículas a um comprimento de onda de 600nm (Ultrasppec II-LKB Biochrom 4050 Cambridge, Inglaterra). Não se observaram alterações nas amostras diluídas em água nem nas obtidas com Tampão HEPES 0,025M, o que indica que estes solventes não interagem com as partículas em suspensão. Para cada lípido base e para a mesma relação lípido/tensioactivo foram preparados padrões com concentrações crescentes de partículas, de modo a elaborar uma curva de calibração. O factor de diluição, entre 1:6 e 1:60, foi ajustado de modo a evitar zonas de não linearidade.

As curvas de valores das absorvências em função da percentagem de sólidos foram obtidas por leitura das amostras diluídas em água purificada, após imersão em banho termostaticado (23°C) por 5 minutos, no comprimento de onda seleccionado. Os dados determinados indicam que o método apresenta um adequado grau de precisão, tendo os coeficientes de regressão linear variado entre 0,994 a 0,998. Observou-se uma falta de linearidade significativa (determinada após ANOVA) para valores de diluição entre 0,1 a 1,0%. Para intervalos de concentração entre 0,2 e 1,0% e 0,2 a 0,7% de sólido, os valores das médias dos resíduos são inferiores a, respectivamente 5% e 2,6% e, nestes intervalos, a falta de linearidade não é detectada pela ANOVA. Deste modo assumindo uma distribuição estreita com $I_p < 0,250$, utilizou-se a Equação 2-2 para determinar o N_p a partir das absorvências e do diâmetro médio volumétrico, calculado por PCS.

$$N_p = \frac{A}{\rho \epsilon K r^3}$$

Equação 2-2: equação utilizada para calcular o número de partículas em suspensão numa amostra (N_p), com diluição conhecida, onde A corresponde à absorvência da amostra; ρ representa o valor determinado de densidade da amostra; ϵ - corresponde à absorvidade específica; r^3 - raio da partícula em cm e K é a constante que representa $4\pi l/3$, em que $l=1\text{cm}$.

A análise de regressão linear permite concluir que existe linearidade entre as absorvências e a concentração de partículas, tendo-se observado igualmente a dependência entre o declive da recta e a concentração inicial de lípido (resultados não apresentados).

f. Estabilidade físicas das preparações

Para avaliar o intervalo de tempo ao longo do qual as nsLp se mantinham inalteradas, procedeu-se a estudos de estabilidade nas preparações com 3% e 6% de conteúdo lipídico e 50% de polissorbato 80. Utilizando as metodologias anteriormente descritas, avaliou-se a integridade dos sistemas nsLp aos tempos (t) 30 dias e aos 3, 12 e 24 meses, com as preparações mantidas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, para os lípidos Compritol® 888ATO, Precirol ATO5® e Witepsol E85. Os parâmetros aqui monitorizados foram aqueles previamente indicados como determinantes na escolha da formulação, designadamente a alteração do dm e o valor de I_p . Também a estabilidade da dispersão em termos de gelificação ao longo do tempo, bem como a contaminação microbiológica, foi avaliada de modo a estimar o tempo de vida das formulações.

Utilizou-se a análise por turbidimetria como uma alternativa rápida para o estudo da estabilidade física das preparações. Deste modo, avaliou-se a variação do número de partículas ao longo do tempo e compararam-se estes valores com os obtidos nas preparações ao $t=0$, de modo a detectar a possível formação de agregados.

A estabilidade microbiológica das preparações foi avaliada seguindo o protocolo da Farmacopeia Portuguesa 8 (FP 8), referente à Qualidade microbiológica de preparações farmacêuticas - formas líquidas não estéreis (monografia 2.6.12 - Controlo Microbiológico de produtos não estéreis. Determinação do número total de germes aeróbios viáveis). Todas as preparações apresentaram resultados negativos para as estirpes testadas.

2.4. Resultados

2.4.1. Efeito dos parâmetros de processo

Após arrefecimento as formulações preparadas apresentaram-se líquidas, levemente translúcidas de aspecto homogéneo (Figura 2-3). A viscosidade do sistema variou com o conteúdo lipídico ($m_{\text{lípido}}/V_{\text{total}}$), apresentando-se fluidas as preparações contendo 3% e 6% de lípido, ligeiramente viscosas as

preparações contendo 8% e viscosas com tendência a gelificar, as preparações contendo 10% de lípido. Nesta primeira fase, foram determinados por difracção *laser*, os valores de diâmetro de partícula correspondentes a D_{10} , D_{50} e D_{90} . Os resultados obtidos revelaram que os valores de diâmetros de partículas expressos em volume e os expressos por número de partículas não são directamente comparáveis. Não obstante, os resultados obtidos por difracção *laser* permitem estabelecer que todas as formulações apresentaram partículas nanométricas, independentemente da amplitude da distribuição e da presença de micropartículas.



Figura 2-3: Aspecto final das dispersões de nanopartículas lipídicas produzidas pelo método de fusão/emulsificação. O aspecto final das preparações é função da composição quantitativa e em consequência do dm das partículas dispersas. Na imagem podemos observar da esquerda para a direita formulações de Precirol ATO5 a 8%, 6% e 3% de lípido (m/v) respectivamente, preparadas com 50% de tensoactivo (m/m). A preparação com 3% de lípido é a que se apresenta mais translúcida.

a. (i) Velocidade de agitação

A intensidade da energia fornecida ao sistema afecta consideravelmente a distribuição de diâmetros das partículas constituintes da fase dispersa (Tabela 2-4).

Como esperado, as dispersões obtidas com menor agitação, 6 000 r.p.m., originaram uma distribuição alargada onde aparentemente estão presentes subpopulações de micropartículas.

Tabela 2-4: Diâmetros volumétricos, 10%, 50% e 90% em função da velocidade de agitação. Dados obtidos por difracção *laser* em formulações preparadas com 6% de lípido e 50% de polissorbato 80.

Agitação (r.p.m.)	Compritol 888ATO			Precirol ATO 5		
	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀
6 000	10,90	2,114	1,458	6,610	1,037	0,724
10 000	4,781	0,316	0,118	1,310	0,299	0,199
14 000	0,470	0,240	0,124	0,386	0,196	0,113
20 000	0,404	0,253	0,134	0,400	0,203	0,134

O aumento da velocidade de agitação para 14 000 r.p.m. reduziu drasticamente a largura da distribuição, como se pode observar na Tabela 2-4, embora com pouca influência sobre o valor de D₅₀. Este comportamento sugere que a velocidade de agitação pode actuar directamente na dispersão de agregados ou na subdivisão de micropartículas. Não se registaram, relativamente ao observado para velocidades mais baixas, alterações relevantes nas populações de partículas por aumento da velocidade de 14 000 para 20 000 r.p.m..

Tabela 2-5: Diâmetro volumétrico (nm) 50% e 90% em função da intensidade de agitação (10 min) para dispersões contendo 6% e 8% de Compritol 888ATO para 50% (m/mlípido) de Tween 80.

Velocidade de agitação (r.p.m.)		6 000	10 000	14 000
6%	D₅₀	0,463	0,368	0,217
	D₉₀	0,412	0,216	0,145
8%	D₅₀	3,47	0,764	0,262
	D₉₀	1,62	0,470	0,190

Paralelamente, observou-se uma interacção entre a concentração de lípido e a intensidade de agitação (Tabela 2-5). Com efeito, os valores de diâmetro médio volumétrico das nanopartículas contendo 8% (m/v) de fase lipídica são mais sensíveis à variação da velocidade de agitação que as preparadas com 6% (m/v) de lípido, observando-se que, nestas, a variação de 10 000 para 14

000 r.p.m. tem pouca influência no *dm*. Estes resultados podem estar relacionados com as microalterações de viscosidade, por aumento da concentração de lípido, que, por sua vez, podem afectar a eficiência de agitação.

b. (ii) Temperatura das fases

Verificou-se a diminuição acentuada do valor de D_{50} e da fracção de micropartículas presentes na população, quando a temperatura de fusão sofre um incremento de 10°C para 20°C acima da temperatura de fusão do lípido.

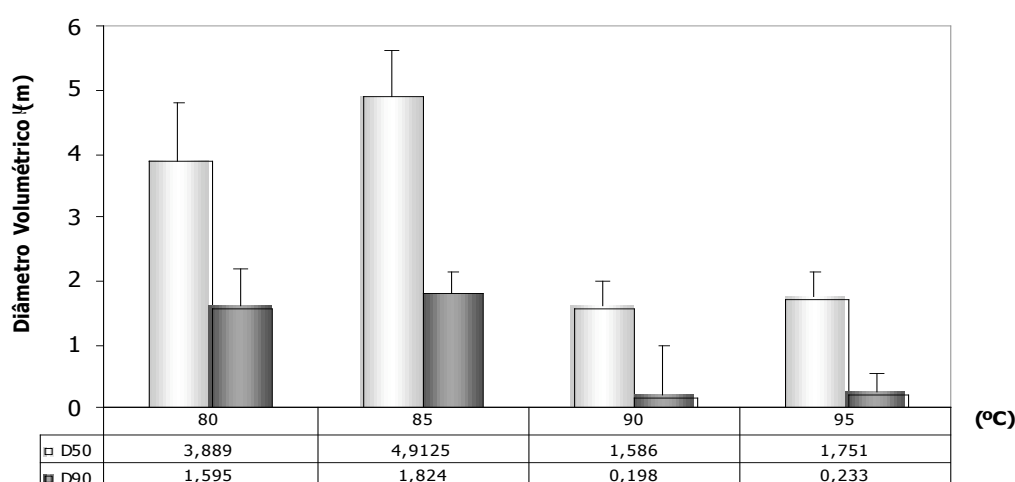


Figura 2-4: Valores de diâmetro volumétrico D_{50} e D_{90} (μm) para dispersões contendo 6% de lípido Compritol 888ATO (p.f. 72°C) e 50% de polissorbato 80.

Os dados obtidos confirmam a necessidade de utilizar temperaturas superiores à temperatura de fusão do lípido, não apenas para diminuir a probabilidade de encontrar fracções de sólido não fundido, mas também pelo efeito destas no valor de diâmetro volumétrico das partículas.

Observou-se uma diminuição dos valores de D_{50} e D_{90} quando se utilizam temperaturas 20°C superiores ao intervalo de fusão do lípido. Por outro lado, alterações da temperatura de fusão para valores entre 20°C a 25°C acima do intervalo de fusão do lípido demonstraram não ter qualquer influência significativa no valor de *dm*, como se pode observar na Figura 2-4.

Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos na literatura, em que se estabelece para a fusão destes excipientes temperaturas 20°C superiores ao

respectivo ponto de fusão, como forma de garantir a fusão de toda a massa lipídica e a ausência de núcleos de cristalização (Bunjes *et al.* 1996; Siekmann & Westesen 1994b; Bunjes *et al.* 2007; Hoogenboom *et al.* 2002).

c. (iii) Tempo de homogeneização

As alterações registadas nos valores de diâmetro de partícula em função do tempo de homogeneização estão representadas na Figura 2-5.

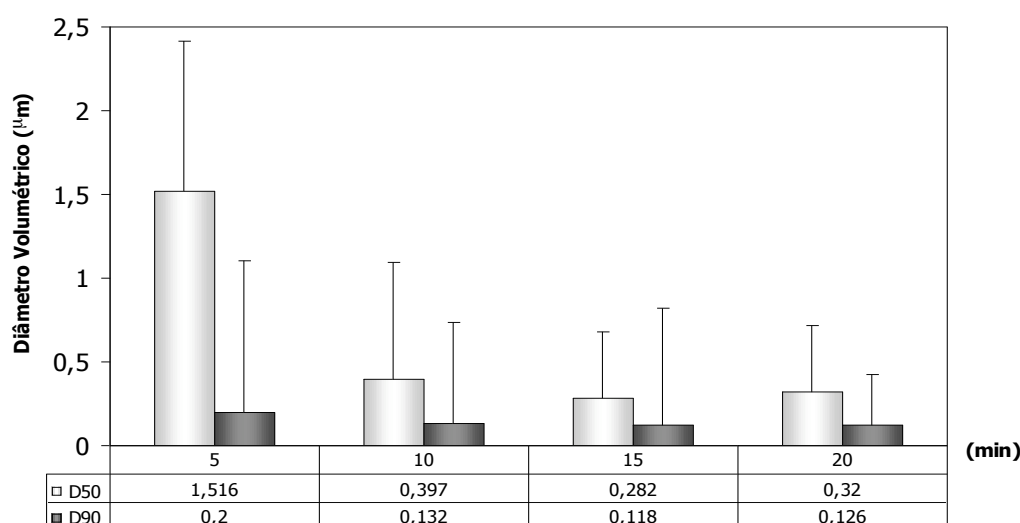


Figura 2-5: Dados de diâmetro volumétrico (μm) em função do tempo de homogeneização, para 100ml de uma formulação a 6%(m/v_{total}) de Compritol 888ATO com 50% de polissorbat 80. A temperatura do processo foi fixada a 20°C acima do ponto de fusão do lípido.

Os valores de D_{50} e D_{90} das formulações correspondentes a 5 minutos de homogeneização demonstraram que este intervalo é insuficiente para produzir um sistema homogéneo. Pelo contrário, o valor determinado para 50% da população, nas formulações sujeitas a 10 minutos de homogeneização, revela a presença de nanopartículas. Este resultado indica que nas condições pré-definidas, temperatura e volume da amostra, o período de agitação utilizado é eficaz. No entanto, a partir deste valor, um incremento de 5 ou 10 minutos na duração da homogeneização, respectivamente 15 e 20 minutos, não altera de forma relevante o diâmetro das partículas dispersas (Figura 2-5).

2.4.2. Efeito da composição do sistema

Com o objectivo de seleccionar o sistema de vectorização mais adequado aos estudos *in vitro* e *in vivo* foram preparados lotes em que a composição lipídica variou qualitativa e quantitativamente. A análise dos dados obtidos por PCS, diâmetro médio (dm) e índice de polidispersão (Ip) foi executada de forma a relacionar as variáveis dependentes.

a. Natureza do lípido

Prepararam-se de acordo com as condições experimentais previamente estabelecidas (Figura 2-1), sistemas de partículas constituídas pelos diferentes lípidos. A influência da estrutura molecular do lípido foi avaliada a diferentes concentrações de tensoactivo, isto é, 25% e 50% ($m/m_{\text{lípido}}$).

A análise comparativa dos valores de dm e Ip determinados por PCS permite seleccionar o lípido que se adapta melhor ao método utilizado e ao tensoactivo escolhido.

Os dados da Tabela 2-6 indicam que o aumento do dm e a largura da distribuição de tamanhos das partículas é função da estrutura do lípido, mesmo para concentrações superiores de tensoactivo. Nas condições estudadas o lípido Precirol® ATO5 parece ser o mais adequado ao processo de produção e ao agente estabilizante utilizado. No entanto, apesar de originar partículas com valores de dm superiores, o Compritol® 888ATO apresenta valores de Ip aceitáveis para administração intravenosa. Pelo contrário os lípidos Geleol® e Witepsol E85 produziram dispersões de partículas polimodais com valores de dm superiores. Dada a proximidade na temperatura de fusão, entre os lípidos Precirol® ATO5 e Geleol®, optou-se por rejeitar este último, tendo em conta a correspondente distribuição de tamanhos e o facto ser mais rico em monoacilgliceróis o que pode dificultar a recristalização.

Tabela 2-6: Valores de potencial Zeta (ξ) para as nanopartículas preparadas com diferentes lípidos com 50% de polisorbato 80. Variação de dm (nm) e I_p em função de estrutura do lípido e da percentagem de tensoactivo para 6% de lípido.

Lípido (6%)	ξ (mV)	Polissorbato 80 (%)			
		25		50	
		dm (nm)	I_p	dm (nm)	I_p
Precirol ATO 5®	-21±0,4	159,4±4,82	0,259±0,021	153,4±3,86	0,102±0,023
Compritol® 888 ATO	-32±0,2	296,4±6,53	0,250±0,017	204,6±3,19	0,200±0,036
Geleol®	-19±0,7	302,9±5,63	0,314±0,016	222,3±4,51	0,303±0,013
Witepsol E85	-41±1,0	322,7±5,40	0,634±0,028	330,0±6,80	0,420±0,034

O valor de potencial zeta determinado para formulações com 6% (m/v_{total}) de lípido e 50% de tensoactivo (m/ml_{lípido}) confirma que os lípidos polares originam dispersões de partículas negativas. O valor determinado para a carga eléctrica das partículas dispersas não sofreu variações assinaláveis com as alterações de composição do sistema, o que sugere que este valor está directamente relacionado com a estrutura do lípido, nomeadamente do ácido gordo, e com a natureza do tensoactivo (Tabela 2-7).

b. Influência do conteúdo lipídico e da relação tensoactivo/lípido

Na Tabela 2-7 estão condensados os resultados correspondentes ao estudo comparativo entre lípidos Compritol® 888ATO, Precirol® ATO5 e Witepsol E85. A determinação de dm e I_p , foi executada às 72 horas após preparação das nanopartículas pelo método de fusão/emulsificação utilizando uma temperatura 20°C superior ao intervalo de fusão do respectivo lípido base, uma velocidade de agitação de 14 000 r.p.m. e 10 minutos de homogeneização.

A carga eléctrica superficial, representada pelo valor de potencial zeta, foi determinada com base na mobilidade electroforética das nanopartículas.

Tabela 2-7: Efeito da variação na concentração de lípido e de tensoactivo (%), nos valores de potencial zeta (ξ), dm (nm) e I_p , para as formulações (n=6) de nanopartículas lipídicas produzidas utilizando diferentes lípidos base. O valor de dm (nm) que aparece entre parentesis representa o menor valor obtido nas leituras.

		TS_25%			TS_50%			TS_75%		
		dm	I_p	ξ (mV)	dm	I_p	ξ (mV)	dm	I_p	ξ (mV)
Compritol 888 ATO	3%	203,0±47,0 (110,2)	0,187±0,017	-16,4±0,8	204,6±40,0 (107,4)	0,207±0,016	-19,5±4,1	200,7±9,4 (180,4)	0,168±0,018	-17,1±0,4
	6%	303,4±50,1 (202,3)	0,250±0,025	-15,4±0,3	212,4±40,1 (143,7)	0,244±0,026	-14,4±0,4	212,6±23,0 (189,3)	0,204±0,021	-14,6±6,4
	8%	312,8±79,0 (278,4)	0,396±0,014	-16,9±2,8	276,0±66,0 (205,2)	0,384±0,015	-15,3±7,1	286,3±45,7 (243,2)	0,273±0,027	-17,3±1,9
	10%	473,3±96,6 (385,3)	0,401±0,031	-14,7±0,7	291,6±28,3 (263,3)	0,458±0,031	-14,9±3,8	271,4±23,6 (256,7)	0,344±0,041	-14,7±0,6
Precirol ATO5	3%	157,5±12,0 (145,7)	0,224±0,011	-19,1±7,6	114,2±17,0 (103,0)	0,117±0,019	-20,1±7,6	111,4± 7,2 (93,0)	0,105±0,017	-18,2±7,6
	6%	169,7±16,1 (153,7)	0,259±0,015	25,7±6,7	133,4±20,3 (84,6)	0,122±0,012	-22,7±6,7	104,6±1,4 (100,2)	0,120±0,018	-18,1±0,1
	8%	283,0±60,2 (200,0)	0,320±0,011	-18,5±3,4	161,9±±19,6 (138,1)	0,178±0,015	-26,4±6,7	174,0±11,7 (165,3)	0,146±0,013	-20,4±0,4
	10%	297,4±27,6 (273,5)	0,370±0,019	-22,3±0,7	200,3±28,4 (168,7)	0,243±0,014	-21,6±1,3	177,6±18,4 (169,8)	0,202±0,016	-19,7±0,4
Witepsol E85	3%	290,3±16,9 (269,4)	0,471±0,024	-34,2±0,2	281,3±26,1 (253,9)	0,386±0,037	-30,5±0,7	252,6±10,0 (246,3)	0,384±0,031	-36,1±2,1
	6%	314,7±20,6 (298,6)	0,682±0,040	-37,1±0,6	326,0±57,6 (252,7)	0,472±0,018	-35,1±1,4	260,0±10,7 (247,6)	0,303±0,028	-33,8±6,8
	8%	422±80,0 (328,4)	0,836±0,027	-36,1±0,1	340,2±84,4 (260,3)	0,420±0,014	-34,6±1,7	300,0±10,9 (289,4)	0,404±0,042	-34,1±1,3
	10%	532,3±104,6 (453,9)	0,857±0,063	-35,5±1,2	370±82,6 (289,1)	0,670±0,036	-29,4±2,0	384,0±16,7 (373,9)	0,412±0,046	n,d,

O aumento da fase lipídica provoca, em termos teóricos, um aumento da fase dispersa e em consequência, uma alteração na área de superfície. Em sistemas muito concentrados, as interações partícula-partícula são mais frequentes, o que sugere que o incremento observado nos valores de dm e no I_p , para sistemas de nanopartículas preparadas com percentagens elevadas de lípido (8%, 10%), pode dever-se a fenómenos de agregação entre nanopartículas. Por outro lado, a proporção de fase lipídica tem um efeito directo na viscosidade do sistema (dados não apresentados), o que pode, nas condições testadas, promover o alargamento da distribuição granulométrica e aumentar a proporção de micropartículas.

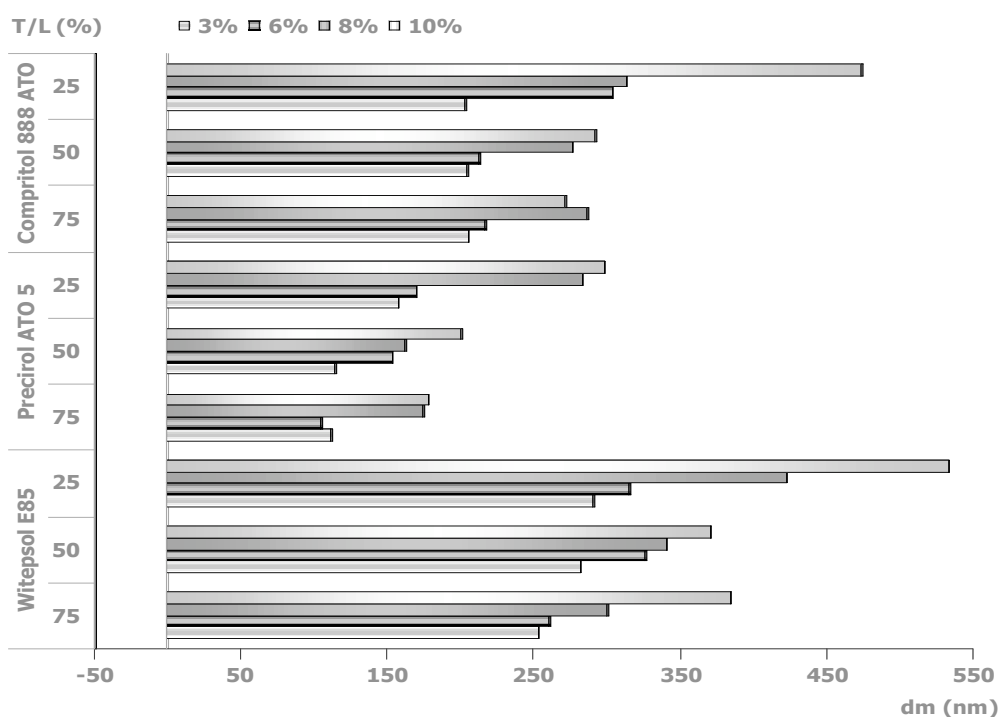


Figura 2-6: Representação gráfica dos valores de dm , em função do lípido, conteúdo lipídico e concentração de tensoactivo, para nanopartículas produzidas por emulsificação após fusão.

A representação gráfica dos valores determinados demonstra claramente que a composição do sistema influenciou as distribuições de tamanhos de partícula. A tendência, comum aos lípidos estudados, para um desvio para valores superiores de dm em função do conteúdo lipídico, varia na intensidade do efeito com a concentração de tensoactivo e com o lípido utilizado.

A estrutura dos lípidos, uma vez que os triacilgliceróis são moléculas anfifílicas, pode influenciar estes sistemas devido às suas propriedades tensoactivas intrínsecas. A influência do lípido sobre a distribuição granulométrica do sistema de partículas pode ser atribuída a possíveis diferenças na capacidade emulsiva, traduzida pelo respectivo valor de índice de hidroxilo (HI) (Tabela 2-1). Este princípio justificaria o facto de o Witepsol E85, que apresenta um valor de baixo IH (5-15), apresentar valores de dm e I_p superiores. Assim, este lípido parece ser o menos apropriado para a preparação de nanopartículas pelo método descrito. Por outro lado, uma provável explicação para o facto de as dispersões lipídicas de Precirol® ATO5 (IH-60-115) apresentarem valores de dm inferiores assim como uma elevada estabilidade no tempo, pode estar relacionada com a presença de grupos hidróxido, não esterificados, que conferem a este lípido uma forte natureza anfifílica.

c. Efeito da proporção tensoactivo/lípido e da percentagem de lípido

A análise dos valores de dm (nm), em função da percentagem de tensoactivo, revela que para cada teor de lípido, o perfil de distribuição de tamanhos é dependente da concentração de tensoactivo. O aumento da concentração de tensoactivo, em relação à massa de lípido, deu origem a distribuições mais uniformes e valores inferiores de dm (Figura 2-6). Esta observação vem reforçar a hipótese de que a ausência de agregados se deve principalmente à existência de um filme ininterrupto à superfície das partículas. Este efeito é ainda confirmado pela diminuição progressiva observada na largura da distribuição, em função do aumento da concentração de polissorbato 80, expressa pelos valores de I_p .

Todavia, este comportamento é menos pronunciado para concentrações superiores de lípido, o que parece indicar que a percentagem de fase lipídica pode representar o efeito principal. De facto, como se verifica nas preparações com base no Precirol® ATO 5, mesmo na presença de elevadas percentagens de tensoactivo, 50% ($m/m_{\text{lípido}}$), o aumento da fracção lipídica para 8% (m/v_{total}) promove o alargamento da distribuição.

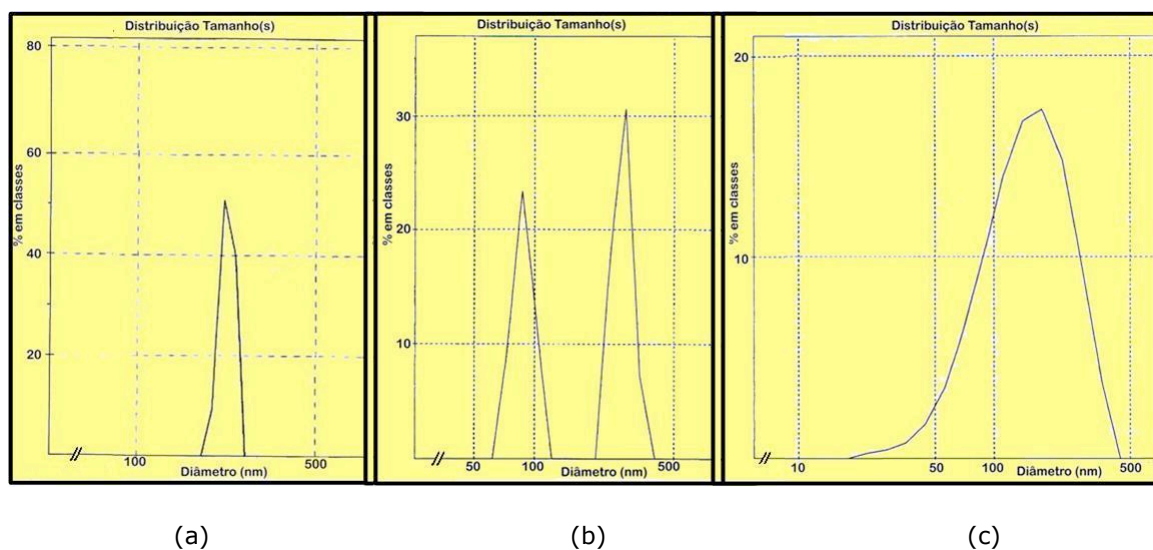


Figura 2-7: Perfil de distribuição de tamanhos em função da percentagem de lípido (Precirol ATO5), para preparações a 3% (a), 6% (b) e 8% (c) de lípido e 50% de tensoactivo.

Um efeito semelhante foi observado com nanopartículas preparadas a partir de Compritol® 888ATO. Nestes sistemas, o aumento da fase lipídica para 8% (m/v_{total}) promove um deslocamento do dm para valores superiores, cerca de 300nm, em oposição aos observados em preparações com menor conteúdo lipídico 3% (m/v_{total}), onde se pode verificar que, para o mesmo valor de concentração de tensoactivo, a distribuição está centrada na zona dos 200nm. Como demonstram os resultados da Tabela 2-7, ao contrário do efeito observado por aumento da proporção tensoactivo/lípido de 25 para 50%, a variação para 75% ($m/m_{\text{lípido}}$) não promove uma redução expressiva quer nos valores de dm quer ao nível do I_p , quando estão envolvidas elevadas concentrações de fase lipídica. Este fenómeno, que pode traduzir uma escassez de tensoactivo perante o aumento da fase dispersa, é acompanhado por uma alteração na fracção de sub-populações. De facto, para valores elevados de lípido as amostras deixam de ser monomodais, apresentando-se bimodais ou polimodais (Figura 2-7).

d. Análise da interacção entre os efeitos

Realizou-se um terceiro conjunto de preparações de modo a avaliar a influência média que tem um determinado factor na variável em estudo (dm) assim como as possíveis interacções entre os diversos parâmetros.

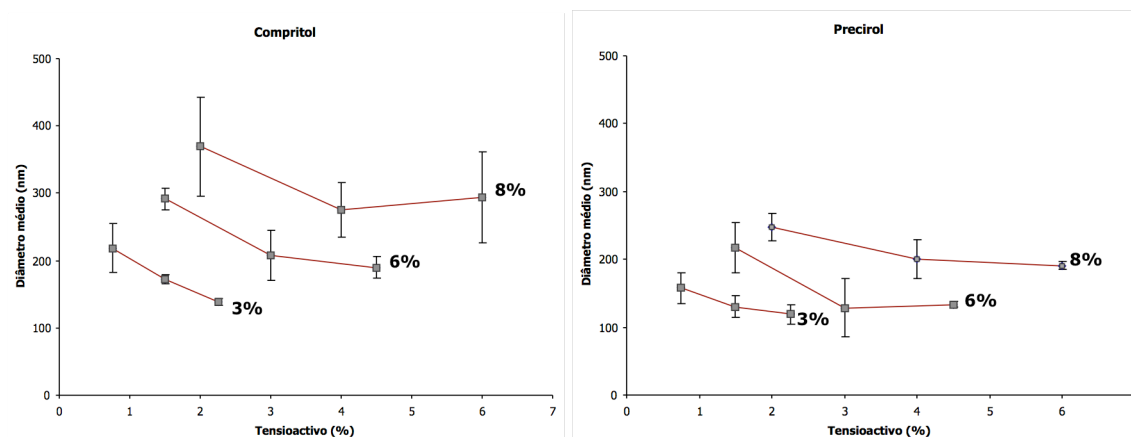


Figura 2-8: Variação do *dm* por influência da variação de tensioactivo (g/100ml) no aumento da concentração de lípido.

Apesar das diferenças observáveis, tanto ao nível de estrutura como do ponto de fusão, os lípidos Compritol® 888 ATO e Precirol ATO 5® apresentam comportamentos similares no que respeita à resposta do sistema às variações dos factores. Aparentemente, no total das formulações preparadas, observou-se uma relação entre as variáveis testadas e o valor de *dm* da população de partículas.

A análise de variância (ANOVA) permite concluir que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores de *dm* entre as várias preparações de Compritol®888ATO (Tabela 2-8) e que estas dependem efectivamente da variação da concentração de lípido (%L) e da proporção tensioactivo/lípido (T/L).

Tabela 2-8: Resultados da ANOVA executada aos dados obtidos como lípido Compritol®888ATO. A parcela correspondente a *within* representa a variabilidade entre preparações e entre leituras.

Fonte de Variância	SQ	gl	QM	F	P-value	F crit
T/L	49982.44	2	24991.2	11.027	0.001	3.204
L%	179705.74	2	89852.9	39.647	0.000	3.204
Interação	7604.50	4	1901.1	0.839	0.508	2.579
<i>Within</i>	101983.94	45	2266.3			
Total	339276.62	53				

O mesmo comportamento pode ser observado em relação às formulações com base no lípido Precirol ATO5® (Tabela 2-9).

Tabela 2-9: Resultados da ANOVA executada aos dados obtidos como lípido Precirol®ATO5. A parcela correspondente a *within* representa a variabilidade entre preparações e entre leituras.

Fonte de Variância	SQ	gl	QM	F	P-value	F crit
T/L	37419.95	2	18710.0	27.446	0,001	3.204
%L	55153.82	2	27576.9	40.454	0.000	3.204
Interação	5973.71	4	1493.4	2.191	0.085	2.579
<i>Within</i>	30676.10	45	681.7			
Total	129223.59	53				

A falta de significância que se observa para a interação (p=0,085 na Tabela 2-9), pode estar relacionada com a elevada variabilidade encontrada entre preparações e entre leituras.

Para determinar se existe uma dependência entre factores, que pode ter a sua expressão afectada pela variabilidade entre preparações e leituras, procedeu-se à análise dos parâmetros e da interação entre eles. Esta análise permitiu avaliar a significância de cada um dos factores e a da sua interacção.

Aos dados observados, foi ajustado um modelo⁵ quadrático com interacção (Equação 2-3) que inclui o tipo de lípido (Compritol®888ATO ou Precirol ATO5®), a quantidade de lípido (%L) e o quociente tensioactivo/lípido (T/L).

$$y = a + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + c_1x_1^2 + c_2x_2^2 + c_3x_3^2 \quad \text{Equação 2-3}$$

x1 = Tipo de lípido, x2=quantidade de lípido, x3=quociente quantidade de tensioactivo/lípido

Onde *a* corresponde à intercepção, *b*₁ e *c*₁ ao tipo de lípido, *b*₂ e *c*₂ à percentagem de lípido, *b*₃ e *c*₃ à fracção tensioactivo e os factores *b*₁₂, *b*₂₃, *b*₁₃ à interacção entre os factores, na sua componente linear.

⁵ As variáveis foram normalizadas antes do ajustamento do modelo. O tipo de lípido, sendo uma variável dicotómica, foi codificado como 0 e 1 para o Compritol e Precirol respectivamente.

A análise de variância mostra que relativamente aos parâmetros do modelo, para os dois lípidos estudados (“Tipo de lípido”), a proporção de tensoactivo/lípido (T/L) tem um efeito superior à percentagem de lípido (%L). No entanto, a influência dos factores combinados é superior à dos mesmos quando considerados isoladamente.

De facto, após ajustamento do modelo verificou-se que apenas as variáveis T/L (x_3) linear e quadrático, a quantidade de lípido %L (x_2) quadrático e a interacção “Tipo de lípido” x %L ($x_1 x_2$) eram significativas, o que deu origem à Equação 2-4.

$$y = a + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad \text{Equação 2-4}$$

Observou-se que, muito embora o valor determinado para o diâmetro médio (dm) de partícula se revele diferente para os dois lípidos, a análise do resultado do ajustamento deste modelo revela que o tipo de lípido, isoladamente, não influencia significativamente o diâmetro das partículas obtidas. No entanto, a sua interacção com a quantidade de lípido presente é estatisticamente significativa (Tabela 2-10).

Tabela 2-10 Resultados do ajustamento do modelo quadrático aos dados experimentais.

Fonte de variância	Coef.	EP	t Stat	p
Intercepção	220.27	11.70	18.833	< 0.001
T/L	-216.44	54.84	-3.947	< 0.001
Tipo x %L	-129.81	16.06	-8.083	< 0.001
%L ²	198.32	14.56	13.618	< 0.001
(T/L) ²	137.56	53.43	2.574	0.015

Este aspecto confirma que a influência do aumento da quantidade de lípido, no diâmetro das partículas, não é similar para os dois lípidos em estudo. Como observável na Figura 2-8, a variação do dm das partículas dispersas para um mesmo aumento da %L, é mais intensa quando o lípido base é o Compritol®888ATO relativamente ao mesmo valor quando se parte do Precirol AT05®.

A razão T/L, a quantidade de lípido (termo quadrático - x_2^2) e a interacção "Tipo de lípido" x %L revelaram-se os factores com maior influência no diâmetro médio das partículas.

A partir dos valores determinados de acordo com a Equação 2-4 observou-se que a razão T/L apresenta um coeficiente com sinal negativo o que demonstra, tal como esperado, a diminuição do dm com o aumento de T/L. De modo inverso, o termo correspondente a %L² (sinal positivo) reflecte o aumento do dm com o aumento da percentagem de lípido. A interacção "Tipo de lípido" x %L, com sinal negativo, não pode ser interpretada de modo semelhante dado que, a variável "tipo de lípido" é dicotómica contrariamente às variáveis anteriores que são contínuas.

O termo da ANOVA correspondente à falta de ajustamento do modelo (LOF, *lack of fit*) não é significativa, o que indica que este modelo pode, dentro dos limites experimentalmente testados, ser usado para descrever a relação entre o dm e os factores em estudo, sem viés significativo.

Tabela 2-11. Anova do ajustamento aos dados experimentais.

<i>Fonte de variância</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Regressão	136667.1	4	34166.8	57.554	0.000
LOF	7440.8	13	572.4	0.964	0.517
Residual	10685.6	18	593.6		
Total	154793.5	35			

O desvio-padrão residual é de 24nm ($QM_{residual}^{1/2}$) e inclui, além da variabilidade associada à determinação do dm , aquela associada à preparação dos lotes em duplicado.

O modelo apresentado explica 88% da variabilidade observada, sendo os restantes 12% relativos à variabilidade associada à preparação dos lotes e posterior determinação do dm .

As superfícies de resposta deste modelo, para cada um dos lípidos estudados, encontram-se na Figura 2-9. Como se pode observar, o diâmetro das partículas das preparações contendo Precirol ATO5® é menos sensível a

variações quer da quantidade de lípido quer do quociente T/L, relativamente às preparações contendo Compritol® 888 ATO.

Os gráficos exibidos na Figura 2-9 reflectem as observações experimentais provenientes de um planeamento factorial realizado com três níveis e dois factores. A partir destes é possível interpolar a composição do sistema que, utilizando as mesmas condições de preparação, origina uma população de partículas com determinado valor de dm .

Os resultados descritos indicam que o método de emulsificação após fusão permite o desenvolvimento de um sistema de nanopartículas lipídicas com uma distribuição granulométrica adequada à utilização para veiculação de fármacos.

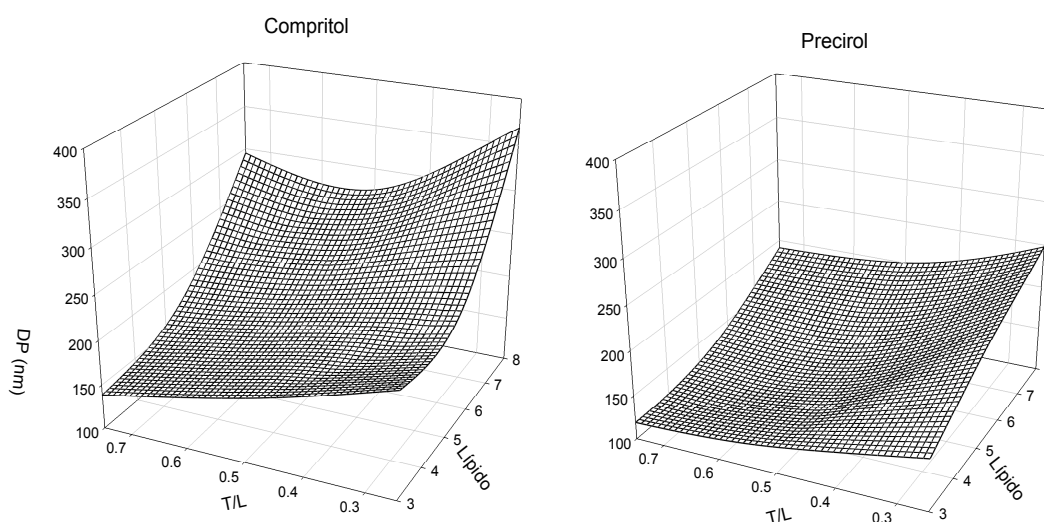


Figura 2-9: Superfície de resposta correspondente ao ajustamento de um modelo quadrático aos dados experimentais que contempla a interacção entre factores. As variáveis independentes são a concentração de lípido (%) e a proporção tensoactivo/lípido (T/L).

A representação da resposta do dm , tendo em conta os três níveis de variação, mostra claramente que é possível ajustar o dm por manipulação dos factores que influenciam a dispersão. Adicionalmente, a análise das propriedades das formulações acima descritas, feita com base no valor do

diâmetro médio, confirma a influência do lípido base, como está representado na Figura 2-8.

As nanopartículas preparadas com Precirol ATO5® apresentaram em todas as combinações tensioactivo/lípido melhores distribuições granulométricas e valores de dm inferiores, quando comparadas com as de Compritol® 888ATO.

De salientar que para 8% de lípido a relação do dm com o aumento de tensioactivo deixa de ser linear e que este efeito é mais acentuado para as nanopartículas preparadas com Compritol® 888ATO (Figura 2-8). Esta observação sugere uma vez mais que, para a área de superfície da interface, a concentração de tensioactivo pode ser insuficiente para formar um filme protector, o que facilita os fenómenos de agregação de partículas.

No que respeita ao estudo de reprodutibilidade do método, a repetição do método de preparação, a partir de um sequência aleatória pré-definida, demonstrou que a variabilidade do processo é também dependente do lípido utilizado.

De facto, quando comparadas com as formulações obtidas com Compritol 888 ATO®, as nanopartículas preparadas com Precirol ATO5® apresentam maior reprodutibilidade, com um coeficiente de variação combinado⁶ de apenas 4,9%. As formulações com este lípido evidenciaram menor sensibilidade a variações de composição, como prova a semelhança encontrada nos valores de dm obtidos com preparações a 3pr_50, 3pr_75, 6pr_50 e 6pr_75 (Figura 2-8). No caso do Compritol® 888 ATO, a variabilidade, no valor dm , entre preparações replicadas é em média de 13,9%, sendo que 86% deste valor é devido às formulações contendo 8% de lípido.

Apesar da diferença encontrada entre os dois lípidos, a representação do valor do dm observado, relativamente ao dm estimado, confirma que o modelo descreve adequadamente os dados experimentais Figura 2-10.

Pela optimização do processo e de acordo com a interpretação dos dados obtidos, é possível controlar os factores que afectam a variável independente (dm). Isto significa que, com base no modelo e nas representações anteriores,

⁶ O desvio-padrão combinado reflecte a variabilidade observada entre os replicados de todas as preparações.

é possível determinar os parâmetros ótimos para obter preparações com uma população determinada de nanopartículas para um dado valor de dm .

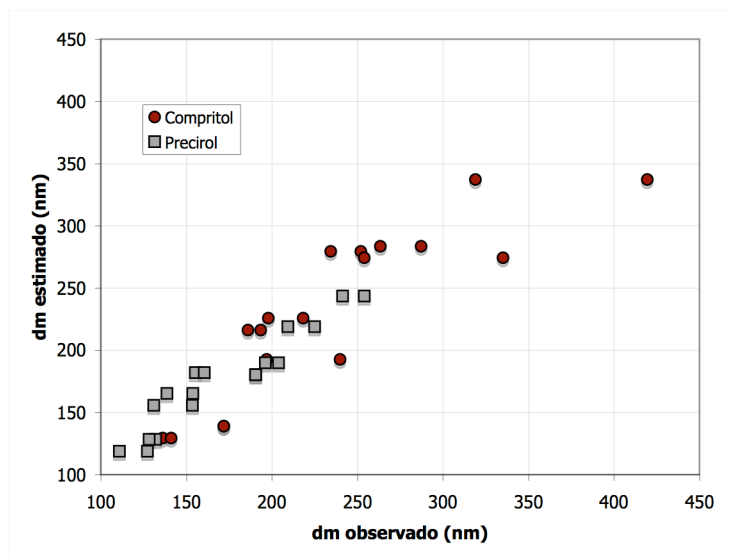


Figura 2-10: Diferenças observadas entre os valores de dm determinados e os estimados, através do modelo adoptado para interpretar os dados experimentais.

A determinação do número de partículas em suspensão revelou que existe correlação entre este valor e a composição do sistema, mantendo constantes as variáveis de processo. Estes resultados corroboram as observações anteriores, ou seja, que a distribuição granulométrica está fortemente dependente da razão T/L (Tabela 2-12).

Tabela 2-12: Cálculo do número de partículas por ml de nanosuspensão com 0,20% de sólido em água, utilizando o modelo desenvolvido e o valor de dm obtido por PCS. Comparação entre nanopartículas produzidas com concentrações crescentes de lípido.

	dm (nm)	I_p	abs	N_p/ml ($\times 10^{12}$)
3pr_50	150,2	0,108	0,440	9,72
6pr_50	180,7	0,246	0,189	2,77
8pr_50	287,0	0,390	0,243	1,54

Aparentemente a variação no número de partículas em função da concentração de lípido ocorreu não por aumento da fase interna, tal como era

de esperar, mas por diminuição do dm , como ficou demonstrado pelo elevado Np presente nas preparações a 3% (m/v_{total}) de lípido (Tabela 2-12). De facto, a variação observada no Np após ajuste da percentagem de fase dispersa (0,2%-m/v), poderá ser atribuída a diferenças no dm , uma vez que partículas de menores dimensões têm um forte efeito no segundo termo da Equação 2-2 (página 128). Neste contexto, o dm relacionado com o conteúdo lipídico será porventura o factor mais importante, como indicado pela amplitude de variação de Np , cerca de nove vezes superior, entre 3% e 6% (m/v_{total}) de lípido (Tabela 2-12).

A resposta à variação da concentração de tensoactivo é, também aqui, de menor intensidade quando comparada com a variação observada em função da carga de lípido. O aumento do número de partículas por aumento da concentração de tensoactivo é acompanhado pela diminuição do valor de Ip , o que pode, uma vez mais, estar relacionado com uma diminuição nos fenómenos de agregação (Tabela 2-13).

Tabela 2-13: Dados relativos a formulações com base no lípido Precirol ATO5 a 6%, onde se fez variar a concentração de tensoactivo. As amostras são diluídas em água a uma concentração de 0,2%(m/v) de sólidos, antes das leituras.

	dm (nm)	Ip	abs	Np/ml ($\times 10^{12}$)
6pr_75	137,3	0,189	0,181	5,15
6pr_50	172,6	0,250	0,196	2,39
6pr_25	181,7	0,290	0,300	1,98

Como se pode verificar, mesmo para concentrações de fase lipídica intermédia, 6% (m/v_{total}), o número de partículas obtido representa uma elevada concentração de nanopartículas dispersas. Estes valores reflectem uma área de superfície elevada, o que pode explicar a insuficiência de tensoactivo e, em consequência, a formação de agregados atrás referida.

O valor obtido de Np , utilizando as mesmas condições, difere consideravelmente com o lípido utilizado (Tabela 2-14), o que sugere, mais uma vez, que a natureza deste é determinante no resultado final, especialmente devido ao efeito sobre o dm . A dependência do número de

partículas com o dm é confirmada pela variação observada nos valores obtidos com 0,2% de partículas suspensas para os diferentes lípidos.

Tabela 2-14: Número de partículas obtido para formulações a 6% de lípido e 50% tensoactivo após diluição em água purificada (0,2%).

	6co_50	6pr_50
dm (nm)	153,4	138,9
Np/ml	$1,674 \times 10^{11}$	$4,24 \times 10^{12}$

e. Análise morfológica

A análise das populações relativa à distribuição de tamanhos, feita com base em microfotografias, mostra que as suspensões coloidais desenvolvidas correspondem a um sistema disperso de entidades bem individualizadas que apresentam uma distribuição homogénea.

Nas imagens de microscopia electrónica de transmissão (TEM) das formulações *6pr_50* e *6co_50* identificam-se partículas nanométricas, não esféricas (Figura 2-11), com forma ovalada, de contornos mal definidos, provavelmente associada a uma solidificação rápida. Curiosamente, observou-se uma diferença na superfície das partículas, que poderá ser atribuída a diferenças de cristalinidade. Aparentemente as partículas apresentam estrutura compacta, com dimensões nanométricas entre 10 a 200 nm.

A comparação destes resultados com os obtidos por PCS indica que os valores de dm calculados apresentam um desvio para valores superiores. Este fenómeno, descrito anteriormente (Groves 1984), deve-se em parte à contribuição que partículas maiores, ainda que raras, podem ter no resultado final de uma análise indirecta, nomeadamente no caso de distribuições alargadas expressas em volume.

O facto de a técnica de PCS ter como base uma determinação indirecta do tamanho de partícula, através do coeficiente de difusão aparente, pode também originar desvios positivos no cálculo do dm .

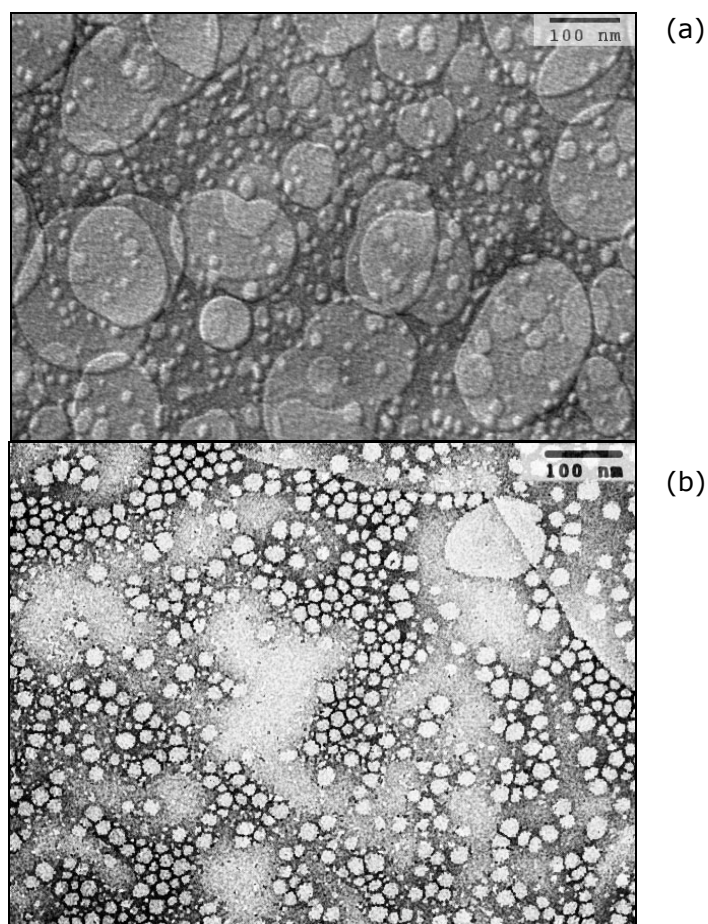


Figura 2-11. Aspecto morfológico de preparações 6pre_50 (a) e 6comp_50 (b). Imagens obtidas por microscopia electrónica de transmissão-TEM.

f. Análise térmica

A análise térmica foi realizada com os seguintes objectivos: (i) determinar se a matriz formada se apresenta sólida e (ii) comparar a cristalinidade das matrizes preparadas com os diferentes lípidos.

Para os lípidos Compritol® 888ATO e Precirol ATO5®, utilizou-se a técnica de DSC, para determinar o efeito da concentração de lípido na cristalinidade da matriz e a variação de cristalinidade ao longo de 12 meses.

Nos termogramas representados na Figura 2-12 observa-se que, com o aumento da temperatura, as nSLp exibem eventos endotérmicos e que estes são característicos da natureza do lípido.

Numa primeira abordagem podemos afirmar que as partículas após arrefecimento se apresentam sólidas à temperatura ambiente. No entanto, o

perfil do pico correspondente à fusão das nanopartículas é, para todos os lípidos base, mais alargado e apresenta um desvio da temperatura de fusão, o que indica que a sua cristalização ocorre a uma temperatura cerca de 2 a 6°C inferior àquela necessária para fundir o lípido correspondente. Está descrito que o índice de recristalização, que contempla o efeito associado à presença de tensoactivo, à temperatura de armazenamento, à presença de fármaco e à composição da matriz das partículas lipídicas dispersas é, em geral, inferior ao obtido com o material de partida (Freitas & Muller 1999a). Este comportamento varia com o lípido base, como se verifica na Tabela 2-15 através do valor do índice de cristalinidade. O deslocamento para valores inferiores de temperatura de fusão que se observa nas nanopartículas, confirma igualmente que a fase lipídica, relativamente à matéria-prima, se apresenta menos cristalina.

Tabela 2-15: Valores de temperatura de fusão e índice de cristalização (IR%) determinados para nanopartículas preparadas com 6% de lípido e 50% de Tensoactivo.

Lípido	Ácido gordo	p.f. (°C)	Entalpia (J/g)	IR%
Compritol® 888ATO	Ác. behénico	70,34	6,16	71,88
Precirol ATO5®	Ác. palmítico	55,71	11,21	68,75
Witepsol E85	Ác. esteárico	43,28	6,17	48,65

A determinação do ponto de fusão de *6pr_50* ao longo do tempo mostra que praticamente não há variação na temperatura de fusão, o que sugere que as partículas podem estar num estado metaestável (Tabela 2-16).

Tabela 2-16: Valores de temperatura de fusão determinados (n=3) ao longo do tempo para uma preparação com base no Precirol ATO5® a 6% (m/v).

Tempo	Temperatura de fusão
0 (72 horas)	53,46 ± 0,24
7 dias	54,46 ± 0,32
30 dias	54,61 ± 0,31
12 meses	55,62 ± 0,18
24 meses	56,11 ± 0,13

Paralelamente, o facto de a temperatura de fusão se apresentar continuamente inferior à obtida com a matéria-prima, indica que podem ter ocorrido fenómenos de sobrefusão durante o processo de preparação.

Os valores determinados mostram, no entanto, uma tendência de aproximação ao valor de ponto de fusão da matéria-prima, o que parece corresponder a um processo de recristalização lento, que pode estar associado à existência de formas metaestáveis.

Este processo é visível em nanopartículas preparadas com Compritol® 888ATO. Foram detectados fenómenos de gelificação nas preparações mais concentradas, podendo a variação da IR% com a percentagem de lípido contribuir para explicar os mecanismos envolvidos (Tabela 2-17).

Tabela 2-17: Influência da concentração de lípido na cristalinidade da estrutura de nanopartículas lipídicas com base no Compritol® 888 ATO

Concentração de lípido nas dispersões de nanopartículas				
	3%	6%	8%	10%
IR%	64,06	67,41	71,88	76,99

Os estudos do comportamento térmico desta matéria prima, indicam um comportamento idêntico ao que se observa para misturas de triacilgliceróis que, como está descrito na literatura, exibem três formas cristalinas, α -, β' - e β - (Bunjés *et al.* 2007; Mäder & Mehnert 2004; Muller-Goymann 2004). O Compritol® 888ATO, enquanto matéria-prima, funde a 72,2°C e recristaliza a 68.7°C (Brubach *et al.* 2007). As dispersões de nanopartículas com base neste lípido, recristalizam sob a forma metastável β' - que, ao longo do tempo, tende para a forma β -, mais estável, mas com forte tendência para exibir fenómenos de gelificação (Bunjés & Unruh 2007a; Jennings & Gohla 2000).

A análise dos traçados dos termogramas obtidos com os diferentes lípidos (Figura 2-12) confirmou que os fenómenos endotérmicos, bem como o perfil dos picos correspondentes, são característicos de cada lípido, quer na matéria-prima, quer nas nanopartículas em suspensão.

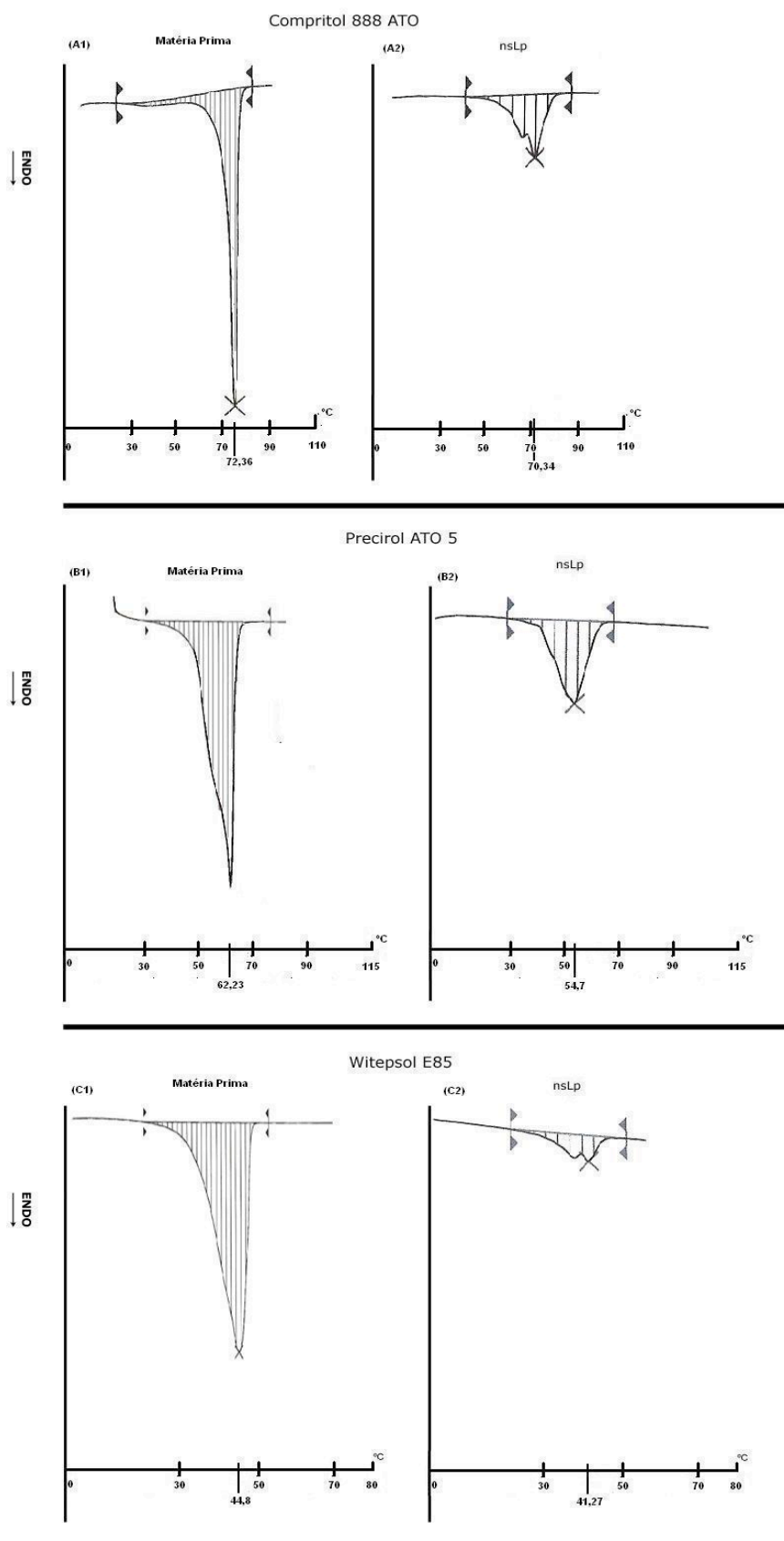


Figura 2-12: Perfil dos fenômenos térmicos em termogramas obtidos com 20mg de lípido puro e termogramas obtidos para as respectivas formulações de nanopartículas. (A1) Compritol® puro, (A2) 6co_50, (B1) Precirol ATO5® puro, (B2) 6pr_50, (C1) Witepsol E85, (C2) 6wi_50.

A relação entre o lípido e o comportamento térmico é, como já referimos, consequência das diferenças nas cadeias de ácido gordo e da proporção de mono, di e triacilgliceróis constituintes.

Nas dispersões de nanopartículas, o traçado é contudo diferente do observado na matéria-prima, possivelmente devido à presença de outros constituintes e, de forma mais relevante, à presença de espécies polimórficas.

Os traçados dos termogramas não exibem apenas uma diferença de amplitude resultante da concentração da amostra de nSLp. É a presença de tensoactivo e, fundamentalmente, a elevada área de superfície das nanopartículas, que origina um alargamento da base do pico endotérmico e esta, é acompanhada por uma alteração do perfil do termograma.

A existência de uma saliência à esquerda da curva endotérmica, observável apenas nas curvas correspondentes às dispersões de nanopartículas, está relacionada com a presença de água. As saliências à direita da mesma curva, reflectem a presença de formas polimórficas instáveis e, como tal, com entalpias de transição inferiores

A ocorrência de polimorfismo confirma a influência dos parâmetros do processo, no arranjo molecular do lípido durante a sua recristalização.

g. Estabilidade física das preparações.

Nas condições de armazenamento estudadas, 25°C e ausência de luz, as formulações a Compritol® 888ATO e Precirol ATO5® a 3% e 6% (m/v_{total}) apresentam-se estáveis, como se pode concluir por comparação dos valores de *dm* das preparações frescas e após 12 meses (Tabela 2-18).

Pelo contrário, as formulações com Compritol® 888ATO e Precirol ATO5® a 8% e 10% (m/v_{total}) apresentaram-se instáveis. Tendo estas formulações adquirido em aspecto tipo gel em menos de seis e três meses respectivamente (resultados não apresentados).

Tabela 2-18. Valores de diâmetro médio (*DM*) e índice de polidispersividade (*IP*) obtidos por PSC ao tempo zero (72h), aos três e 12 meses de estabilidade. Médias de três lotes preparados com uma percentagem de tensoactivo relativa à massa de lípido (T/L) de 50 % (p/p).

		Compritol® 888ATO		Precirol® ATO5		Witepsol E85	
T/L		<i>dm</i>	<i>Ip</i>	<i>dm</i>	<i>Ip</i>	<i>dm</i>	<i>Ip</i>
3%	T0	146,4	0,204	106,2	0,164	260,0	0,394
	T3	146,0	0,204	115,0	0,157	284,2	0,403
	T12	152,8	0,231	126,1	0,170	689,4	n,d,
6%	T0	153,4	0,265	138,9	0,156	327,3	0,420
	T3	168,3	0,294	130,0	0,164	379,0	0,433
	T12	171,0	0,304	128,1	0,183	989,4	n.d

O agente tensoactivo tem uma influência considerável na estabilidade de sistemas dispersos (Aulton & Collett 2002). O polissorbato 80 é caracterizado por formar um filme líquido eficaz à superfície das partículas. No entanto, em presença de elevadas áreas de superfície a concentração de polissorbato 80 pode ser insuficiente, com consequente ausência de estabilidade ao longo do tempo. No caso do Precirol ATO5® tendo em conta o elevado índice de hidroxilo, cadeia carbonada mais curta e temperatura de fusão intermédia, foi estudada a estabilidade em tempo real de preparações a 8% (m/v_{total}) com 50% de tensoactivo (Tabela 2-19).

Tabela 2-19: Estabilidade de nanopartículas lipídicas 8% (m/v_{total}) com 50% de tensoactivo em função do tempo.

T/L		<i>dm</i>	<i>i.p.</i>
8%	T0	184,1	0,201
	T30	196,1	0,240
	T12	205,4	0,317

Os valores de absorvências determinados aos tempos estipulados não sofrem variação em relação ao t₀, tal como seria de prever, uma vez que não se

verifica aumento do dm ao longo do tempo. A ausência de variação na turbidez da amostra pode ser associada à ausência de agregados.

Os ensaios microbiológicos revelaram ausência de microrganismos até aos 12 meses em todas as preparações.

2.5. Discussão

Os resultados obtidos indicam que após arrefecimento houve formação de uma dispersão coloidal, constituída por partículas possivelmente com estrutura reticulada sólida, ou parcialmente sólida, a qual permite antever a possibilidade de reter fármacos na sua matriz e promover, a partir dela, a libertação lenta dos mesmos.

A emulsificação de duas fases, seguida de arrefecimento da mistura resultante, provou ser um método eficaz de homogeneização na produção de uma dispersão aquosa de nanopartículas lipídicas. No entanto, as condições de fabrico preparação têm uma influência considerável nas distribuições granulométrica, à semelhança do que se verifica na produção por HPH (Mehnert & Mader 2001; Muller *et al.* 2000).

A caracterização da população de partículas por difracção *laser* revelou que, relativamente à velocidade de agitação, este parâmetro influencia o valor de dm e, principalmente, a presença de micropartículas. Todavia, não se observam diferenças significativas nos valores de dm nas formulações sujeitas a agitação entre 14 000 e 20 000 r.p.m..

Nestes sistemas, a energia fornecida durante a produção é por eles absorvida, o que pode contribuir para fenómenos de instabilidade física. De facto, observou-se que no caso da preparação por HPH, a repetição dos ciclos de homogeneização e a elevada pressão, necessária para obter dispersões monomodais, podem significar uma forte aquisição de energia por parte do sistema e, como tal, este poderá tender para uma situação de instabilidade ao longo do tempo (Heurtault *et al.* 2003).

Parâmetros de processo considerados agressivos foram anteriormente apontados como uma situação de *stress*, com consequências na estabilidade das preparações (Jores *et al.* 2004; Westesen & Siekmann 1997).

Tendo em conta que este é um sistema fortemente dinâmico, a emulsificação por agitação mecânica representa uma vantagem por ser um processo mais suave do que a clássica homogeneização por HPH. Ainda assim, é fundamental, sempre que possível, controlar a energia fornecida ao sistema durante a preparação, tendo em conta que a estabilidade físico-química de um sistema coloidal está condicionada entre outros factores pela componente energética da fase interfacial (Heurtault *et al.* 2003). Deste modo, é provável que neste processo a escolha de uma velocidade intermédia, cerca de 14 000 r.p.m., favoreça a estabilidade da dispersão.

A estabilidade de um sistema bifásico pode ser estimada com base na teoria de DLVO. Porém, como foi referido no capítulo anterior, esta teoria não é totalmente aplicável a sistemas coloidais, uma vez que o diâmetro das partículas, e nomeadamente a respectiva densidade, condiciona os fenómenos de interacção-repulsão (Messina *et al.* 2002; Messina *et al.* 2001). Assim, o valor de potencial zeta fornece informação acerca da estabilidade da suspensão coloidal, que será tanto maior quanto mais este valor se afastar da neutralidade. Por outro lado, tem sido sublinhado que partículas coloidais neutras são menos susceptíveis à opsonização, o que se reflecte na capacidade para circularem sem serem fagocitadas pelas células do sistema MPS, especialmente pelas células de Kupffer no fígado e pelos macrófagos esplénicos (Owens & Peppas 2006). Neste contexto valores compreendidos entre -20 e -30 mV, determinados respectivamente nas suspensões de Compritol® 888ATO e de Precirol ATO5®, representam sem dúvida um bom compromisso entre estabilidade do sistema terapêutico e a capacidade de evitar a opsonização após administração intravenosa (Heurtault *et al.* 2003).

A análise dos valores de dm , obtidos por PCS, confirmou, em relação aos lípidos Compritol® 888ATO e Precirol ATO5®, que o processo de emulsificação após fusão é eficaz para preparar nanopartículas de lípidos sólidos. A variação na concentração de tensioactivo e, particularmente, a composição e percentagem da fase lipídica, têm um efeito considerável nas características das partículas dispersas. Esta variabilidade determinada em termos dos valores de dm em função da composição química, demonstrou a importância da selecção do lípido base, como aliás tem sido sublinhado por

diversos autores (Radomska-Soukharev & Muller 2006). O efeito da concentração de lípido sobre a distribuição granulométrica, demonstrou que podemos preparar diferentes sistemas de veiculação de fármacos a partir de um mesmo lípido, fazendo variar apenas o volume de fase dispersa. Com efeito verificou-se pela representação das distribuições granulométricas (PCS) que os sistemas com 3% e 8% (m/v_{total}) de lípido exibem uma distribuição monomodal (Figura 2-7), embora estes últimos apresentem uma acentuada diferença entre os resultados expressos em volume e em número de partículas (dados não apresentados). Este facto deve-se à contribuição que partículas de elevado diâmetro têm na distribuição, quando esta é função do volume (Aires & Figueiredo 1997; Frantzen *et al.* 2003; Tscharnuter 2000). Neste contexto, para preparações com elevada percentagem de fase lipídica 8% (m/v_{total}), onde os fenómenos de interacção partícula-partícula são mais frequentes, é possível que a fracção de micropartículas mascare a população submicrométrica. Isto não significa a ausência de nanopartículas, efectivamente a sua presença em preparações com elevado conteúdo lipídico é confirmada pela distribuição relativa ao número.

Pelo contrário, para dispersões de partículas pouco concentradas, as interacções são menos frequentes e, caso a preparação se apresente estável, o conteúdo de nanopartículas tende a ser superior ao de micropartículas. Consequentemente, as nanopartículas obtidas com 3% (m/v_{total}) de fase lipídica apresentaram um padrão de distribuição monomodal para valores inferiores a cerca de 200nm (Figura 2-7). Estas preparações mostraram ser as mais reprodutíveis e como tal, afiguram-se porventura como as mais indicadas para proceder à transposição de escala com segurança.

As formulações preparadas com 6% (m/v_{total}) de fase lipídica apresentam dm semelhantes aos obtidos com 3% (m/v_{total}) de lípido, embora exibam, em termos de distribuição, um comportamento intermédio, bimodal quando em representado por volume (Figura 2-7) e um padrão monomodal na distribuição expressa por número (dados não apresentados).

A presença de partículas com cerca de 50nm de diâmetro médio entre as populações descritas na análise por volume é relevante, uma vez que para que tal se verifique, é necessário que estas se encontrem numa elevada

proporção relativamente às partículas de maior diâmetro (Aires & Figueiredo 1997).

O efeito da percentagem de lípido na distribuição de diâmetro das partículas está também relacionado da concentração de tensoactivo. A presença de tensoactivo a uma concentração eficaz é essencial, como ficou demonstrado pela sua influência na distribuição de tamanhos e na estabilidade do sistema de partículas dispersas. Na realidade, a presença de moléculas de tensoactivo na interface altera a dinâmica de superfície, estabiliza o sistema e concorre para o valor da carga superficial o que está de acordo com a teoria clássica de preparação de emulsões e suspensões (Aulton & Collett 2002; Heurtault *et al.* 2003). No entanto, as interacções entre partículas contribuem para a formação de agregados, sobretudo por insuficiência de tensoactivo, o que se reflecte no aumento do dm de partícula e na presença de micropartículas. Provavelmente, esta é a razão, pela qual as formulações lipídicas com menor concentração de tensoactivo ou com elevada percentagem de fase interna apresentaram os valores mais elevados de dm e I_p (Tabela 2-7).

É possível que os valores inadequados de I_p encontrados nas distribuições de tamanho das dispersões com base no lípido Witepsol E85, se devam a fenómenos de agregação causados pela presença de formas polimórficas instáveis, mais frequentes em lípidos que apresentem temperaturas de fusão mais baixas, tal como foi descrito anteriormente (Bunjes *et al.* 2003; Westesen 2000). Razão pela qual, este lípido não foi posteriormente considerado para a produção de nanopartículas pelo método aqui desenvolvido.

a. Cristalinidade

Numa dispersão coloidal as partículas apresentam propriedades distintas do material de partida, como por exemplo as transições polimórficas e a temperatura de fusão. No caso de lípidos sólidos à temperatura ambiente, após fusão, são determinantes para a reorganização da estrutura cristalina da matriz, a composição em triacilgliceróis e o ácido gordo constituinte.

Na preparação de nanopartículas lipídicas por fusão/emulsificação, dois fenómenos de separação de fases ocorrem em paralelo, os quais implicam

alterações na organização estrutural da matriz: (i) durante a emulsificação por acção de forças disruptivas as fases separam-se e subdividem-se, de modo a formar gotículas dispersas no seio de uma fase líquida, do qual resulta um sistema de duas fases de estrutura desordenada, (ii) no arrefecimento, ocorre outro fenómeno de separação de fases, que acompanha a solidificação da matriz. Esta, em teoria, deveria corresponder a um reordenamento até formar a estrutura cristalina.

Oscilações de temperatura ao longo da massa de lípido, durante o aquecimento a temperaturas superiores ao ponto de fusão, podem provocar o aparecimento de regiões de sobre arrefecimento (Kuntsche *et al.* 2005). Este fenómeno pode desencadear a formação de uma estrutura lamelar, onde regiões do tipo metaestável concorrem em paralelo com espécies de cristal líquido. A estrutura mista resultante, tem implicações na capacidade para reter o fármaco, embora não interfira no dm e I_p da preparação. A influência do lípido no produto final, e em particular a relação entre a cadeia de ácidos gordos e a cristalinidade da matriz, explica as variações no padrão de cristalinidade sobretudo entre o Compritol® 888 ATO (C:20) e o Precirol ATO5® (C:16).

Observou-se no entanto, que o fenómeno endotérmico correspondente ao ponto de fusão dos lípidos Compritol® 888 ATO, Precirol ATO5® e Witepsol E85, sob a forma de suspensão coloidal, ocorre a temperaturas inferiores às observadas na matéria-prima, exibindo um perfil mais alargado nos picos correspondentes às transições entálpicas, tal como foi sustentado por Bunjes e colaboradores (1997 e 2007). Do mesmo modo a ocorrência de “bossas” na região correspondente a temperaturas superiores ao ponto de fusão, já havia sido relacionada com a presença de água (Siekman & Westesen 1994b). O alargamento do pico endotérmico que se verifica com as nanopartículas lipídicas traduz uma diminuição de energia do fenómeno térmico, que pode ocorrer não só pela presença de tensoactivo, mas também pelo diâmetro nanométrico das partículas (Bunjes *et al.* 2000a; Bunjes *et al.* 2003; Bunjes & Unruh 2007a).

A diferença na cristalinidade das partículas preparadas com Precirol ATO 5® relativamente à matéria-prima inicial, pode ser atribuída a uma reorganização das moléculas durante o arrefecimento. Esta estrutura,

possivelmente metaestável, pode constituir uma vantagem se possibilitar a incorporação de maior quantidade de fármaco no interior da matriz e, após administração, promover a libertação prolongada deste. A literatura refere esta vantagem sublinhando que as formas metaestáveis podem apresentar-se relativamente estáveis por longos períodos de tempo, desde que armazenadas em condições favoráveis (Blumer & Mader 2005b; Hoogenboom *et al.* 2002; Jennings & Gohla 2000) 4. O significado desta conclusão é evidente, havendo regiões de sobrefusão ao nível da matriz, estas apresentam maior fluidez e, como tal, permitem a permanência do activo no seu interior. Também pode representar uma vantagem na libertação do fármaco, uma vez que matrizes cristalinas podem dificultar a libertação do mesmo, fenómeno aliás sobejamente descrito na formulação de supositórios, onde o aumento do índice de gordura sólida (solid fat index-SFI) provoca uma diminuição da libertação de fármaco (Saito *et al.* 1994).

Recentemente ficou demonstrado que, no caso de nanopartículas lipídicas, a existência de polimorfos não cristalinos poderia ser vantajosa, sendo esta aliás a base para o desenvolvimento dos NLC (Jennings & Gohla 2000; Jores *et al.* 2004).

b. Estabilidade

Como em qualquer sistema bifásico, a estabilidade da formulação depende do diâmetro médio da partícula, da carga de superfície e do perfil de distribuição de diâmetros (Saupe *et al.* 2006; Uner 2006). Durante o período de armazenagem, as preparações em estudo revelaram um aumento do índice de cristalinidade. Este facto está relacionado sobretudo com a solidificação da matriz, uma vez que os triacilgliceróis apresentam três formas polimorfas α , β' e β . A sua transformação em estruturas cristalinas anisotrópicas pode demorar meses, dependendo do conteúdo em triacilgliceróis e do tamanho da cadeia carbonada (Blumer & Mader 2005b; Westesen 2000).

De facto os vários fenómenos que ocorrem durante o armazenamento podem depender dos lípidos de cadeia curta, que tendem a permanecer líquidos após arrefecimento (Bunjjes & Unruh 2007a; Mehnert & Mader 2001). Triacilgliceróis de cadeia média ou longa funcionam como iniciadores do processo de cristalização por nucleação e portanto tendem a atingir a forma

estável α . Em preparações de nanopartículas lipídicas com elevada proporção de triacilgliceróis, a cristalização pode corresponder a um fenómeno de gelificação da formulação, o que aliás já foi observado em formulações com base no lípido Compritol® 888ATO. Este fenómeno de cristalização, que em termos macroscópicos se traduz num aumento da viscosidade aparente como consequência gelificação, está relacionado também com a presença de tensoactivo, como referido em numerosos estudos (Bunjjes *et al.* 2002; 2003; Freitas & Muller 1999a). Em sistemas gelificados estão descritos valores de índice de cristalinidade que podem atingir os 100% a 103% (Jenning & Gohla 2000; Unruh *et al.* 2001).

A observação de que este efeito é mais pronunciado para formulações com maior percentagem de lípido, sugere que as interacções partícula-partícula desempenham um papel importante, sobretudo em situações em que o filme de tensoactivo apresente zonas descontínuas. Deste modo, tal como os resultados indicam, é pouco provável que este fenómeno se verifique em formulações a 3 e 6% (m/v_{total}) de lípido, principalmente quando preparadas pelo método de fusão e emulsificação. Admite-se que fenómenos de instabilidade, relacionados com as condições de preparação, poderão ser diminuídos ou suprimidos com a escolha deste processo, claramente mais suave, como aliás ficou provado pela ausência de fenómenos de gelificação ao longo de 12 meses nas preparações de nanopartículas lipídicas com menos de 8% (m/v_{total}) de carga de lípido. Mais uma vez, as formulações a 3% (m/v) destacam-se, especialmente devido a uma maior estabilidade, uma vez que a interacção entre partículas está diminuída. A estabilidade em tempo real (36 meses) das preparações 50pre_3 e 50pre_6 pode estar relacionada com a co-existência na fase lipídica, de fracções no estado *supercooled* com zonas de estrutura cristalina.

Os resultados obtidos com as fases lipídicas de Compritol® 888ATO e Precirol® ATO5 a 3% e 6% (m/v_{total}) sugerem que as formas polimórficas presentes são estáveis à temperatura de armazenamento e que, na realidade, as partículas podem ser consideradas semi-sólidas. Por este motivo no presente trabalho, as nanopartículas lipídicas em fase dispersa, passaram a ser designadas por nsLp (nano semisolid lipid particles).

c. Análise morfológica

O aspecto morfológico das partículas e a distribuição de tamanhos, que se observaram na análise por microscopia electrónica (TEM), confirmam que os lípidos Precirol ATO5® e Compritol® 888ATO dão origem a sistemas de nanopartículas com uma densidade compatível com o estado sólido ou semi-sólido.

O perfil ovalado que as partículas exibem sugere que durante o arrefecimento se verifica a reorganização da estrutura lipídica, num processo aparentemente rápido, o que dá origem à formação de cristais anisotrópicos, fenómeno anteriormente sublinhado (Blumer & Mader 2005b; Hoogenboom *et al.* 2002; Mäder & Mehnert 2004).

Relativamente ao valor de dm estimado por microscopia electrónica, observou-se que este valor ($\leq 50\text{nm}$) é inferior ao determinado por PCS ($\leq 200\text{nm}$). Esta diferença está relacionada fundamentalmente com o método de PCS, não apenas pelo o facto de este último representar um diâmetro hidrodinâmico, mas também com a contribuição causada pela presença de micropartículas ou agregados de partículas no valor de dm (Bunjes & Unruh 2007a; Elizalde *et al.* 2001).

As formulações 3pr_50, 6pr_50, 3co_50 e 6co_50, apresentaram-se estáveis em tempo real, facto confirmado pelos valores de dm e pela turbidez das amostras, o que os torna adequados como sistemas terapêuticos para preparação industrial. Pelo contrario, as formulações preparadas com 10% de lípido, apresentam fenómenos de instabilidade que, embora reversíveis após diluição, determinaram o seu afastamento por não serem indicadas para o presente estudo .

O diâmetro médio é porventura o parâmetro mais importante a ter em conta na escolha de um sistema de veiculação de fármacos para inalação. No entanto, a estabilidade de uma qualquer dispersão está profundamente dependente da obtenção de uma distribuição. A selecção de um sistema de nanopartículas para administração pulmonar será feita com base nestes dois parâmetros.

O estudo realizado aponta claramente para o Precirol ATO5® como base para a preparação de nsLp, por ser mais reprodutível e apresentar, após dispersão, valores de dm adequados a todas as vias de administração.

2.6. Bibliografia

- Aires M, Figueiredo M. 1997. Sizing bimodal distributions in the submicron range. *AIDIC (Associazione Italiana di Ingegneria Chimica) Conferences Series* 2:167-74
- Aulton M, Collett DM. 2002. *Pharmaceutics: The Science Of Dosage Form Design*. Edinburgh: Churchill Livingstone
- Blumer C, Mader K. 2005a. Isostatic Ultra-High-Pressure effects on Supercooled Melts in Colloidal Triglyceride Dispersions. *Pharmaceutical Research* 22:1708-14
- Blumer C, Mader K. 2005b. Isostatic ultra-high-pressure effects on supercooled melts in colloidal triglyceride dispersions. *Pharm Res* 22:1708-15
- Bouchemal K, Briancon S, Perrier E, Fessi H. 2004. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm* 280:241-51
- Brubach JB, Jannin V, Mahler B, Bourgaux C, Lessieur P, *et al.*. 2007. Structural and thermal characterization of glyceryl behenate by X-ray diffraction coupled to differential calorimetry and infrared spectroscopy. *Int J Pharm* 336:248-56
- Bunjes H, Drechsler M, Koch MH, Westesen K. 2001. Incorporation of the model drug ubidecarenone into solid lipid nanoparticles. *Pharm Res* 18:287-93
- Bunjes H, Koch MH, Westesen K. 2000a. Effect of Particle Size on Colloidal Solid Triglycerides. *Langmuir* 16:5234-41
- Bunjes H, Koch MH, Westesen K. 2002. Effect of surfactants on the crystallization and polymorphism of lipid nanoparticles. *Prog Colloid Polym Sci* 121:7-10
- Bunjes H, Koch MH, Westesen K. 2003. Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles. *J Pharm Sci* 92:1509-20
- Bunjes H, Koch MH, Westesen K. 2000b. Effect of particle size on colloidal solid triglycerides. *Langmuir* 16:5234-41
- Bunjes H, Siekmann B. 2006. Manufacture, Characterization and Applications of Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems. In *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, ed. S Benita, pp. 213-68
- Bunjes H, Siekmann B, Westesen K. 1998. Emulsions of super-cooled melts – A novel drug delivery system. In *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*, ed. S Benita, pp. 175-204. Switzerland: Harwood Academic Publishers
- Bunjes H, Steiniger F, Richter W. 2007. Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications. *Langmuir* 23:4005-11
- Bunjes H, Unruh T. 2007a. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv Drug Deliv Rev* 59:379-402
- Bunjes H, Unruh T. 2007b. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59:379-402
- Bunjes H, Westesen K, Koch MH. 1996. Crystallization Tendency And Polymorphic Transitions In Triglyceride Nanoparticles. *Int J Pharm* 129:159-73
- Cavalli R, Caputo O, Gasco MR. 1993. Solid Lipospheres Of Doxorubicin And Idarubicin. *Int J Pharm* 89:R9-R12
- Cavalli R, Gasco MR, Chetoni P, Buralassi S, Saettone MF. 2002. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int J Pharm* 238:241-5
- Cavalli R, Marengo E, Rodriguez L, Gasco M. 1996. Effects of some experimental factors on the production process of solid lipid nanoparticles. *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43:110-5

- Cavalli R, Morel S, Gasco MR, Chetoni P, Saettone MF. 1995. Preparation And Evaluation In Vitro Of Colloidal Lipospheres Containing Pilocarpine As Ion Pair. *Int J Pharm* 117:243-6
- Cavalli R, Peira E, Caputo O, Gasco MR. 1999. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with beta-cyclodextrins. *Int J Pharm* 182:59-69
- Charcosset C, El-Harati A, Fessi H. 2006. A Membrane Contactor For The Preparation Of Solid Lipid Nanoparticles. *Desalination* 200:570-1
- Charman WN. 2000. Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts. *J Pharm Sci* 89:967-78
- Chattopadhyay P, Shekunov BY, Yim D, Cipolla D, Boyd B, Farr S. 2007. Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. *Adv Drug Deliv Rev* 59:444-53
- Couvreur P, Vauthier C. 2006. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharmaceutical Research* 23:1417-50
- Davis SS. 2004. Coming of age of lipid-based drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 56:1241-2
- Elizalde O, Leal gP, Leiza JR. 2001. Particle Size Distribution Measurements of Polymeric Dispersions: A Comparative Study. *Particle and Particle Systems Characterization* 17:236-43
- Florence A, Attwood D. 2006a. Emulsions, suspensions and other disperse systems. In *Physicochemical Principles of Pharmacy*, ed. ATFaD Attwood: Pharmaceutical Press
- Florence AT, Attwood D. 2006b. *Physicochemical Principles of Pharmacy*: Pharmaceutical Press 492 pp.
- Frantzen CB, Ingebrigtsen L, Skar M, Brandl M. 2003. Assessing the accuracy of routine photon correlation spectroscopy analysis of heterogeneous size distributions. *AAPS PharmSciTech* 4:E36
- Freitas C, Lucks JS, Muller RH. 1994. Effect of storage conditions on long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) in aqueous dispersion. *Eur J Pharm Sci* 2:178
- Freitas C, Muller RH. 1999a. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur J Pharm Biopharm* 47:125-32
- Freitas C, Muller RH. 1999b. Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLN) in aqueous dispersion after addition of electrolyte. *J Microencapsul* 16:59-71
- Freitas C, Muller RH. 1998. Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLN TM). *Eur J Pharm Biopharm* 46:145-51
- Gasco MR. 1997. Solid Lipid Nanospheres from Warm Micro-Emulsion. *Pharm. Technol. Eur.* 9:52-8
- Gasco MR. 2001. Solid Lipid Nanoparticles for drug delivery. *Pharmaceutical technology Europe* 13:32-40
- Gasco MRLPA, 207 - 10153 Torino, IT). 1993. *United States Patent No. 5250236*
- Grasso D, Subramaniam K, Butkus M, Strevett K, Bergendahl J. 2002. A review of non-DLVO interactions in environmental colloidal systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*:17-38
- Groves MJ. 1984. The application of particle characterization methods to submicron dispersions and emulsions. In *Modern Methods of Particle Size analysis*, ed. HGBJWa Sons
- Hafez I, Cullis P. 2001. Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 47:139-48
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. 2003. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 24:4283-300

- Hillery A. 2001. Heat-sensitive liposomes for tumour targeting. *Drug Discov Today* 6:224-5
- Hoogenboom JP, Yethiraj A, Van Langen-Suurling AK, Romijn J, Van Blaaderen A. 2002. Epitaxial crystal growth of charged colloids. *Phys Rev Lett* 89:256104
- Hou D, Xie C, Huang K, Zhu C. 2003. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials* 24:1781-5
- Hu FQ, Hong Y, Yuan H. 2004. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *Int J Pharm* 273:29-35
- Jenning V, Gohla S. 2000. Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Pharm* 196:219-22
- Jenning V, Mader K, Gohla SH. 2000a. Solid lipid nanoparticles (SLN) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a ¹H-NMR study. *Int J Pharm* 205:15-21
- Jenning V, Thunemann AF, Gohla SH. 2000b. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharm* 199:167-77
- Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mader K. 2004. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J Control Release* 95:217-27
- Kawashima Y. 2001. Nanoparticulate Systems For Improved Drug Delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 47:1-2
- Kuntsche J, Bunjes H. 2007. Influence of preparation conditions and heat treatment on the properties of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 67:612-20
- Kuntsche J, Koch MH, Drechsler M, Bunjes H. 2005. Crystallization behavior of supercooled smectic cholesteryl myristate nanoparticles containing phospholipids as stabilizers. *Colloids Surf B Biointerfaces* 44:25-35
- Kuntsche J, Westesen K, Drechsler M, Koch MH, Bunjes H. 2004. Supercooled smectic nanoparticles: a potential novel carrier system for poorly water soluble drugs. *Pharm Res* 21:1834-43
- Lehninger. 2004. *Principles of Biochemistry*. 1100 pp.
- Lorian V, ed. 2005. *Antibiotics in Laboratory Medicine*
- Mäder K, Mehnert W. 2004. Solid Lipid Nanoparticles — Concepts, Procedures, and Physicochemical Aspects. In *Lipospheres in Drug Targets and Delivery*, ed. C Nastruzzi, pp. 1-22: Routledge, USA
- Mehnert W, Mader K. 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 47:165-96
- Messina M, Gonzalez Tovar E, Lozada-Cassou M, Holm C. 2002. Overcharging: The Crucial Role of Excluded Volume. *Europhys. Lett.* 60:383-9
- Messina R, Holm C, KREMER K. 2001. Strong electrostatic interactions in spherical colloidal systems. *Phys. Rev.E* 64:1-32
- Müller RH, Lucks JS. 1996. *Patent No. EP 0 605 497 B1*
- Muller RH, Mader K, Gohla S. 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 50:161-77
- Muller RH, Radtke M, Wissing SA. 2002. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm* 242:121-8
- Muller-Goymann CC. 2004. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58 (2004) 343-356

- Nishioka Y, Yoshino H. 2001. Lymphatic targeting with nanoparticulate system. *Adv Drug Deliv Rev* 47:55-64
- Owens D, Peppas N. 2006. Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 307:93-102
- Pietkiewicz J, Sznitowska M, Placzek M. 2006. The expulsion of lipophilic drugs from the cores of solid lipid microspheres in diluted suspensions and in concentrates. *Int J Pharm* 310:64-71
- Pouton CW. 2006. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur J Pharm Sci* 29:278-87
- Puel F, Briançon S, Fessi H. 2006. Industrial Technologies and Scale Up. In *Microencapsulation : Methods and Industrial Implications*, ed. S Benita, pp. 149-82
- Radomska-Soukharev A, Muller RH. 2006. Chemical stability of lipid excipients in SLN-production of test formulations, characterisation and short-term stability. *Pharmazie* 61:425-30
- Reithmeier H, Herrmann J, Gopferich A. 2001a. Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin. *Int J Pharm* 218:133-43
- Reithmeier H, Herrmann J, Gopferich A. 2001b. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *J Control Release* 73:339-50
- Rojas LF, Urban C, Scurtenberger P, Gisler T, Grunger HH. 2002. Reappearance of structure in colloidal suspensions. *Europhys.Lett* 60:802-8
- Roke S, Berg O, Buitenhuis J, van Blaaderen A, Bonn M. 2006. Surface molecular view of colloidal gelation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13310-4
- Saito H, Kitamura K, Higashi T, Nakamura Y. 1994. Influence of solid fat index in triglyceride suppository bases on drug release. *Chemical and Pharmaceutical bulletin* 42:1501-5
- Sato K, Ueno S. 2001. Molecular interactions and phase behavior of polymorphic fats. In *Crystallization Processes in Fats and Lipid Systems*, ed. SK Garti N, pp. 177-209: Marcel Dekker
- Saupe A, Gordon KC, Rades T. 2006. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. *Int J Pharm* 314:56-62
- Schwarz C, Mehnert W, Lucks J, Muller R. 1994. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I: Production, characterization and sterilization. *Journal of controlled release* 30:83-96
- Siekmann B, Bunjes H, Koch MH, Westesen K. 2002. Preparation and structural investigations of colloidal dispersions prepared from cubic monoglyceride-water phases. *Int J Pharm* 244:33-43
- Siekmann B, Westesen K. 1992. Sub-micron sized parenteral carrier systems based on solid lipids. *Pharm Pharmacol Lett* 1:123-6
- Siekmann B, Westesen K. 1994a. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 3:159-75
- Siekmann B, Westesen S. 1994b. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 3:159-75
- Sjöström B, Bergenstahl B. 1992. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies
- of the precipitation of cholesteryl acetate. *Int. J. Pharm* 88:53-62
- Stuchlik M, Zak S. 2001. Lipid-based vehicle for oral drug delivery. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 145:17-26
- Torchilin VP. 2006. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58:1532-55

- Trotta M, Debernardi F, Caputo O. 2003. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm* 257:153-60
- Tscharnutter W. 2000. Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, ed. RA Meyers, pp. 5469-85: John Wiley & Sons Ltd, Chichester
- Uner M. 2006. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie* 61:375-86
- Unruh T, Bunjes H, Westesen K. 1999. Observation of size-dependent melting in lipid nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry. B, materials, surfaces, interfaces & biophysical* 103:10373-7
- Unruh T, Bunjes H, Westesen K, Koch M. 2001. Investigation on the melting behaviour of triglyceride nanoparticles. *Colloid Polym Science* 279:398-403
- Videira M, Almeida AJ. 1998. Can solid lipid nanoparticles be produced by a simple emulsion/solidification technique? *Proceed. III Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery (Lisbon)*:125-6
- Vyas SP, Jaitely V, Kanaujia P. 1997. Self-assessing supramolecular biovectors: a new dimension in novel drug delivery systems. *Pharmazie* 52:259-67
- Wang J, Mongayt D, Torchilin VP. 2005. Polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs: preparation and anticancer activity in vitro of paclitaxel incorporated into mixed micelles based on poly(ethylene glycol)-lipid conjugate and positively charged lipids. *J Drug Target* 13:73-80
- Westesen K. 2000. Novel lipid-base colloidal dispersions as potential drug administration systems-expectations and reality. *Colloid and Polymer Science* 278:609-18
- Westesen K, Bunjes H. 1995. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? *International Journal of Pharmaceutics* 115:129-31
- Westesen K, Bunjes H, Koch MH. 1997a. Physicochemical Characterization Of Lipid Nanoparticles And Evaluation Of Their Drug Loading Capacity And Sustained Release Potential. *J Control Release* 48:223-36
- Westesen K, Bunjes H, Koch MHJ. 1997b. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their loading capacity and sustained release potential. *Journal of Controlled Release* 48:223-36
- Westesen K, Siekmann B. 1997. Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 151:5-45(11)
- Westesen K, Siekmann B, Koch M. 1993. Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction. *International Journal of Pharmaceutics* 93:189-99
- Wissing SA, Kayser O, Muller RH. 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 56:1257-72
- Worle G, Drechsler M, Koch MH, Siekmann B, Westesen K, Bunjes H. 2007. Influence of composition and preparation parameters on the properties of aqueous monoolein dispersions. *Int J Pharm* 329:150-7
- Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. 2007. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 83:761-9

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS POR
ADMINISTRAÇÃO PULMONAR

3.1. Introdução

3.1.1. Veículos coloidais para administração pulmonar

Diversos materiais e diferentes métodos de preparação permitem, hoje em dia, obter uma variedade considerável de transportadores coloidais de fármacos, tendo como objectivo a terapêutica direccionada. Apesar da evolução nesta área, parte dos fármacos associados a veículos coloidais não produzem *in vivo* os resultados farmacológicos expectáveis (Moghimi *et al.* 2001; Moghimi *et al.* 2005). Muito embora em termos clínicos a eficiência desta estratégia dependa aparentemente do sistema transportador (Torchilin 2005; Torchilin 2007), pode também variar consideravelmente com a via de administração utilizada para veicular o fármaco (Alonso 2004).

De uma forma geral, o perfil de biodistribuição *in vivo* dos sistemas transportadores tem sido avaliado utilizando diferentes vias de administração. No entanto, os veículos coloidais são maioritariamente desenvolvidos para administração intravenosa o que explica o facto de esta, independentemente da região afectada, ser claramente uma das vias de administração mais explorada (Moghimi *et al.* 2005). Todavia, existem fenómenos subjacentes a

esta via de administração, designadamente a captura de partículas coloidais pelos órgãos do sistema MPS e o efeito de primeira passagem, que são responsáveis, em última análise, por uma concentração farmacológica no órgão alvo inferior ao valor esperado, comprometendo assim a eficácia do sistema transportador (Owens & Peppas 2006).

A necessidade de estudar vias de administração alternativas, no sentido de promover o máximo de eficácia na veiculação de fármacos, torna-se particularmente relevante na terapêutica antineoplásica, onde a magnitude do efeito terapêutico é determinada em função da interação de uma concentração farmacológica do fármaco com os mecanismos moleculares ao nível da célula alvo (Gopalan *et al.* 2004 ; Torchilin 2007 ; Zhang *et al.* 2007). A administração regional de transportadores coloidais de fármacos, particularmente a administração pulmonar, representa uma estratégia que pode traduzir-se numa maior precisão de disposição do agente terapêutico no tecido alvo ou na sua vizinhança (Pison *et al.* 2006).

Numerosos trabalhos têm demonstrado que com esta estratégia, é possível melhorar a acção terapêutica local e, paralelamente, atenuar os efeitos secundários do fármaco na forma livre, sendo para tal determinante a retenção deste na matriz do veículo coloidal (Barker *et al.* 1994; Juliano & McCullough 1980; Koshkina & Kleinerman 2005; Pison *et al.* 2006; Poyner *et al.* 1995). A acumulação do transportador no tecido alvo poderá ser responsável por uma possível diminuição na concentração de fármaco a administrar, especialmente, quando comparada com a dose que seria necessário administrar por via sistémica para obter o mesmo efeito (Labiris & Dolovich 2003 ; Pandey & Khuller 2005).

Adicionalmente, a partir do espaço pulmonar é possível estender a veiculação de fármacos à circulação sistémica ou ao sistema linfático, beneficiando das propriedades de absorção do epitélio pulmonar e da existência de uma elevada área de interstício no espaço pulmonar (Agu *et al.* 2001).

Este aspecto é particularmente relevante, dado que a constituição do espaço intersticial, determina a eficácia do sistema transportador em atingir o sistema linfático (Nishioka & Yoshino 2001). Através da superfície pulmonar, a terapêutica com veículos coloidais pode ser extensível ao sistema linfático, beneficiando de condições excepcionais, relativamente à fisiologia do espaço

intersticial que envolve a região alveolar (Liu *et al.* 2006; Videira *et al.* 2006). Partículas coloidais transportando fármacos ou agentes de diagnóstico podem ser dirigidas aos gânglios linfáticos regionais após administração pulmonar, sendo este aliás o mecanismo subjacente às linfocintigrafias pulmonares (Barker *et al.* 1994; Hanatani *et al.* 1995; Lehnert *et al.* 1986; McIntire *et al.* 1998; Videira *et al.* 2002b). Este fenômeno pode tornar-se especialmente importante nas patologias em que há envolvimento do sistema linfático pulmonar, como é o caso do tumor de pequenas células e/ou de metástases pulmonares (Rao *et al.* 2003).

Relativamente à administração pulmonar de sistemas coloidais, como transportadores de fármacos citostáticos, esta estratégia pode constituir uma alternativa à via endovenosa, sobretudo no caso de neoplasia pulmonar por envolvimento primário ou por disseminação metastásica extra-torácica (Ally *et al.* 2005; Koshkina & Kleinerman 2005; Koshkina *et al.* 2003; Rao *et al.* 2003). Dados preliminares de estudos em ratinho, após nebulização de agentes antineoplásicos incorporados em lipossomas, confirmam a eficácia do tratamento de metástases pulmonares através da inalação de veículos coloidais (Koshkina *et al.* 2000; Koshkina *et al.* 2003).

A especificidade dos mecanismos de deposição, retenção e absorção de dispersões coloidais, na sua passagem pelas vias respiratórias, tem sido relacionada com o diâmetro aerodinâmico das partículas inaladas e com as características estruturais e funcionais das diferentes regiões pulmonares (Oberdorster *et al.* 2005; Pison *et al.* 2006).

De uma forma geral, partículas submicrométricas, são transportadas pelo fluxo de ar, inicialmente com velocidade elevada no compartimento nasofaríngeo e distribuídas, após passagem pela traqueia e bifurcação dos brônquios, até atingir o pulmão profundo, onde encontram um epitélio mais permeável à passagem de solutos ou partículas insolúveis (Lauweryns & Baert 1977; Valentine & Kennedy Jr 2001).

A biodisponibilidade de um fármaco após administração pulmonar, é função não apenas das características deste, mas também da fórmula farmacêutica e das barreiras fisiológicas que tem que ultrapassar (Liu *et al.* 2008). Na generalidade dos casos, quando se pretende atingir selectivamente um espaço da região pulmonar, é necessário considerar as áreas do sistema respiratório

de acordo com o nível de bifurcação da árvore respiratória e a velocidade do fluxo de ar nessa secção (Torchilin 2007).

Conhecendo as características fisiológicas e funcionais do aparelho respiratório torna-se possível desenvolver e veicular selectivamente fármacos para regiões particulares do pulmão e, mais especificamente, para populações celulares do espaço pulmonar como, os macrófagos e as células epiteliais, ou para células neoplásicas ou metástases pulmonares (Pison *et al.* 2006; Rao *et al.* 2003).

3.1.2. Absorção no Pulmão profundo

A absorção e permeabilidade pulmonar de partículas exógenas está condicionada pelas características do local onde estas se depositam e, em consequência, depende das diferentes vias de eliminação. O pulmão profundo apresenta uma estrutura anatomo-fisiológica que está directamente relacionada com a dinâmica dos fenómenos de absorção que aí se desenrolam (Crystal 1991b; Oberdorster *et al.* 2005). É possível direccionar fármacos para a circulação sistémica ou para a circulação linfática pulmonar desde que as partículas inaladas atinjam a região alveolar. Uma vez aí, deverão ser envolvidas nos processos habituais de eliminação de partículas insolúveis, enquadrados nos mecanismos de defesa pulmonares (Crystal 1991b; Langenback *et al.* 1990; Lauweryns & Baert 1977; Lehnert *et al.* 1986; Shapiro 1999).

Numerosos autores demonstraram a dependência entre a deposição de partículas inaladas no pulmão profundo e o seu diâmetro aerodinâmico. Experimentalmente, observou-se que partículas, com dimensões superiores a 0,5 μm tendem a depositar, por impacto, na cavidade nasofaríngea e nas vias aéreas superiores. Pelo contrário, aerossóis de nanopartículas com dimensões inferiores a 0,3 μm apresentam uma deposição elevada no pulmão profundo, cerca de 50% do total da amostra inalada (Brain & Valberg 1979; Valentine & Kennedy Jr 2001). Este padrão de deposição confirma que, contrariamente ao verificado para partículas de maiores dimensões, onde o diâmetro aerodinâmico constitui o parâmetro mais relevante, nos aerossóis de partículas ultrafinas é sobretudo o diâmetro geométrico que determina o local e a extensão de deposição, independentemente da sua forma (Geiser *et al.* 2003). Todavia, nas dispersões coloidais, os efeitos que condicionam a

respectiva passagem e deposição na superfície pulmonar, são determinados por um complexo conjunto de factores, dos quais resulta a deposição em toda a região pulmonar (Oberdorster *et al.* 2005).

Após a deposição das partículas inaladas na zona alveolar, a passagem pelo epitélio alveolar é determinada por características físico-químicas associadas à própria partícula, tais como o tamanho, a carga, a forma geométrica e a solubilidade (Lauweryns & Baert 1977). Porém, o estado fisiológico do espaço alveolar pode alterar o fluxo de materiais, especialmente, em casos de edema, descontinuidade da membrana basal ou hiperplasia dos tecidos (Cordeiro 1995a).

São múltiplas as vias de eliminação de partículas exógenas depositadas na superfície pulmonar, pelo que se impõe a necessidade da sua compreensão no que respeita à região alveolar. Teoricamente, as partículas que atingem a região alveolar sofrem um ou mais dos seguintes mecanismos de eliminação fundamentais:

- saída do lúmen alveolar, dissolvidas no fluído surfactante, através de um efeito de sucção causada pela pressão no interstício alveolar ou interiorizados nos MA's, atingindo a drenagem mucociliar com subsequente eliminação pela traqueia;
- passagem através do epitélio alveolar para a circulação sanguínea através da rede de capilares que envolve a região alveolar;
- difusão para o interstício alveolar e subsequente drenagem pelos capilares linfáticos justa-alveolares, por simples arrastamento no fluído intersticial ou internalizadas em macrófagos;
- mecanismos de transcitose que envolvem a passagem de moléculas insolúveis ou de elevado peso molecular, como por exemplo macromoléculas, proteínas e péptidos, para a circulação sanguínea (Adjei & Gupta 1997; Agu *et al.* 2001; Niven 1995).

A utilização de transportadores coloidais na administração selectiva de fármacos para o sistema linfático pulmonar, está dependente em larga escala da interacção das partículas inaladas com os mecanismos de fagocitose, nos casos em que existe interacção com os MA's e, mais raramente, com

fenómenos de endocitose que envolvem os pneumócitos tipo II (Corry *et al.* 1984; Langenback *et al.* 1990). Inúmeros estudos referem que a presença de partículas coloidais no sistema linfático pulmonar, após deposição destas nas vias respiratórias, envolve os macrófagos e os mecanismos de fagocitose (Hanatani *et al.* 1995; McIntire *et al.* 1998; Renwick *et al.* 2001; Videira *et al.* 2002b). Os fenómenos que ocorrem neste caso são em tudo semelhantes aos que se observam após inalação de partículas tóxicas ou agentes infecciosos que, como está demonstrado, acedem ao sistema linfático através dos MA's (Cheung *et al.* 2000; Ishii *et al.* 2005; Oberdorster *et al.* 2005; Valentine & Kennedy Jr 2001).

Com base no diâmetro submicrométrico das nsLp é possível prever que a deposição de nanopartículas lipídicas na superfície pulmonar após inalação, corresponda aos mecanismos de difusão Browniana considerados para partículas ultra-finas, que ocorrem predominantemente na região alveolar (Aulton & Collett 2002; Oberdorster *et al.* 2005). A natureza lipídica das nanopartículas sugere por sua vez, que estas poderão vir a apresentar uma forte tendência para, ao deixar o espaço alveolar, se dirigirem para o sistema linfático pulmonar.

A possibilidade de nebulizar nanopartículas lipídicas, como um sistema terapêutico para administração pulmonar e linfática, foi investigada através da análise de parâmetros, tais como, a eficácia da nebulização, o perfil de deposição pulmonar e a posterior via de eliminação.

Mediante o recurso à análise imageológica, o padrão de biodistribuição *in vivo* das nsLp inaladas foi avaliado. A nebulização de uma suspensão coloidal, composta pela associação entre um marcador radioactivo e as nsLp, permitiu obter imagens cintigráficas e dados farmacocinéticos correspondentes a esta formulação. Adicionalmente, foi explorada a hipótese de utilizar estas partículas como meio de diagnóstico, uma vez que às características físico-químicas das nanopartículas lipídicas, estão associadas valores de diâmetro médio compatíveis com os sistemas fisiológicos de drenagem linfática pulmonar.

3.2. Materiais

a. Materiais

Os lípidos Compritol® 888 ATO e Precirol ATO5® foram oferecidos pela Gattefossé (França). O tensoactivo Tween 80 (polissorbato 80) foi adquirido à Sigma Chemical Company (Espanha). Utilizaram-se como anestésicos a Ketamina (Imalgene 1000, Merial, Portugal) e o cloridrato de cloropromazina (Largactil, Laboratórios Vitória, Portugal). O marcador lipófilo D,L-hexametilpropileno amina oxima (HMPAO-exametazima), para a preparação de uma forma injectável de tecnécio [^{99m}Tc]-exametazima, foi adquirido na forma de mistura liofilizada contendo já o agente redutor necessário à complexação (cloreto estanhoso) e cloreto de sódio (Cerotec™; GE Healthcare Limited Amersham, UK). Para resuspende o liofilizado utilizaram-se monodoses de cloreto de sódio isotónico estéril (B-Braun Medical, Portugal). A solução de pertecnetato de sódio (^{99m}TcO₄⁻), resultante da eluição com cloreto de sódio a partir de um gerador de molibdénio [⁹⁹Mo/^{99m}Tc], (Ultratechnekow SM DTON 4329, Marlinckrodt Medical BV, Holanda), foi utilizada imediatamente depois da contagem de actividade (liquid scintillation counter-LS6500 Beckman). O estudo da eficiência de marcação e pureza radioquímica foi realizado através de uma combinação de cromatografia em papel e cromatografia em camada fina (ITLC-Instant thin-layer chromatography). Utilizaram-se como suporte cromatográfico, o papel Watman n°1 (BIODEX Medical System Inc., Reino Unido) e placas de fibra de vidro cobertas com sílica gel (SG) (ITLC/SG (Gelman Sciences Inc. Ann Arbor, Estados Unidos) com a dimensão de 100mm×10mm. Como eluentes utilizaram-se butanona (MEK [metil-etil-cetona]) e acetoneitrilo a 50%, Merck (Darmstadt, Alemanha) e cloreto de sódio a 0,9% (B-Braun Medical, Portugal). Todos os reagentes não mencionados são de grau de pureza analítico. As amostras biológicas, albumina, sangue e soro, utilizadas nos ensaios de estabilidade, foram preparadas nos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC).

b. Animais

Utilizaram-se animais saudáveis mantidos a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ com 50% de humidade relativa em gaiolas de polipropileno ($120\times 23\text{ cm}^2$), com acesso livre a comida e água (*ad libitum*). O estudo A (administração por nebulização) realizou-se em ratos machos adultos ($\pm 400\text{g}$) *Wistar* (Harlan Ibérica, Espanha) acondicionados em grupos de dois animais. O estudo B (administração endotraqueal) realizou-se em ratos machos jovens ($\pm 250\text{g}$) *Wistar* (Harlan Ibérica, Espanha) acondicionados em grupos de cinco animais.

Para os estudos *in vivo* os animais foram previamente anestesiados por injeção intramuscular de uma mistura (10:3) de ketamina[®](50mg/ml) e cloridrato de clorpromazina (2,5% m/v).

Todas as técnicas utilizadas obedeceram à legislação vigente, nacional e internacional, relativa às normas de protecção de animais utilizados para fins experimentais e/ou outros fins científicos (Dec-Lei nº129/92 de 06/07; Portaria nº1005/92 de 23/10; Portaria nº1131/97 de 07/11, Directiva 86/609/CEE, de 24/11).

3.3. Métodos

3.3.1. Cintigrafia gama

O exame cintigráfico imageológico, tem vindo a ser utilizado em medicina nuclear como método de diagnóstico de patologias, por avaliação do estado funcional de órgãos, tecidos, sistema linfoganglionar, entre outros (Botelho *et al.* 1999; Colonna *et al.* 1978; Morgan *et al.* 2004; Strand & Larsson 1978). Os mecanismos fisiológicos dos estados patológicos, como as neoplasias, provocam alterações morfológicas que se revelam indispensáveis para o diagnóstico e podem, na maioria dos casos, ser detectadas através de técnicas imageológicas. Actualmente os exames efectuados com radiofármacos não visam apenas a determinação da integridade e funcionalidade de órgãos específicos. Aplicam-se igualmente para a avaliação de vias de absorção e/ou eliminação de um fármaco, como marcadores em técnicas analíticas e, de modo menos frequente, para acompanhar a pesquisa e desenvolvimento de

novos sistemas terapêuticos (Aulton & Collett 2002; Saha 2004b; Teran *et al.* 2004). De facto, apesar de amplamente utilizada para diagnóstico, esta técnica só mais tarde viria a ser utilizada no desenvolvimento galénico como ferramenta útil de avaliação de novos sistemas terapêuticos. O comportamento dinâmico de uma fórmula farmacêutica, no seu percurso *in vivo* após administração, pode ser avaliado através de uma sequência de imagens obtidas por emissão do sinal gerado por um radionúclido emissor gama. A cinética de distribuição do fármaco marcado na sua passagem e permanência no organismo, desde a administração até há eliminação pelo corpo humano, pode ser caracterizada qualitativamente e quantitativamente em vários modelos biológicos (Matteucci & Thrall 2000; McDougall *et al.* 1975; Newman *et al.* 2003; Wilding & Newman 1998).

Em pneumologia, a inalação de partículas ultra finas marcadas com elementos emissores de radiação gama é um procedimento comum para avaliar o estado morfológico e funcional do sistema respiratório, com base na observação regional do perfil de deposição pulmonar e movimento das partículas (Inoue *et al.* 1995; Saha 2004a). A aquisição de dados sobre deposição pulmonar é também fundamental no desenvolvimento de fármacos para inalação. Entre os métodos disponíveis destaca-se a análise cintigráfica. Através de uma câmara de detecção de raios gama e de um sistema processador de dados é possível a observação bidimensional das projecções anteriores e posteriores do pulmão, assim como a quantificação da deposição regional, após divisão da imagem em regiões de interesse (ROI) (Barker *et al.* 1994; Newman *et al.* 2000; Newman 2001; Sebti & Amighi 2006)

a. Marcação

Um número considerável de radiofármacos está disponível em medicina nuclear. No entanto o tecnécio é talvez o radionuclido mais utilizado em imageologia, devido não apenas ao facto de formar complexos estáveis com diferentes traçadores, mas também pela facilidade de obtenção, baixo custo e curto período de semi-vida (6h). Por esta razão, seleccionou-se para este trabalho um isótopo metaestável do tecnécio ^{99m}Tc , o ião pertecnetato de sódio $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (FP 8). O radionuclido Tecnécio-99m desintegra-se emitindo

radiação gama ($\gamma=140\text{KeV};87.87\%$), com um período de meia vida de 6h ($T_{1/2}$), adequado ao estudo que decorre. O ião ^{99m}Tc é produzido a partir da reacção de desintegração do nuclido pai o Molibdénio (^{99}Mo). É eluído diariamente com uma solução de cloreto de sódio a 9% estéril e apirogénica, sob a forma de solução salina ($^{99m}\text{Tc}-\text{NaTcO}_4$) no estado de oxidação VII. A actividade do nuclido em solução foi determinada num contador de cintilações, imediatamente após eluição (activímetro- Medisystem-Medi 202, Satis, Portugal). O composto $^{99m}\text{Tc}-\text{NaTcO}_4$ corresponde a uma espécie quimicamente inerte, ou seja, não forma complexos com agentes ligantes. Por este motivo, é necessário um agente redutor (Sn^{2+}) para reduzir o Tc^{+7} a Tc^{+5} , a espécie que permite a formação do complexo emissor: o radiofármaco (Saha 2004a).

b. Complexo ^{99m}Tc -HMPAO

Os ligandos que formam o radiofármaco transportam o nuclido radioactivo e condicionam, pela sua natureza, a biodistribuição deste.

Foi escolhido como agente ligante a hexametilpropileno amino oxima (HMPAO-exametazima), uma molécula lipofílica capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. O complexo tecnécio ^{99m}Tc -exametazima, neutro e lipófilo, é utilizado em medicina nuclear, sobretudo para análise cintigráfica do fluxo cerebral e para marcação de leucócitos *in vitro*, embora possa ter outras aplicações. Para preparar o radiofármaco partimos do Ceretec™, que contém uma mistura de exametazima, cloreto estanhoso dihidratado e cloreto de sódio. O liofilizado é reconstituído com 1 ml de solução de cloreto de sódio estéril e fraccionado em duas aliquotas de 0,5 ml. Adiciona-se à solução anterior o volume de pertecnetato de sódio eluído fresco correspondente a aproximadamente 10 mCi ($^{99m}\text{TcO}_4^-$). O complexo neutro lipofílico ^{99m}Tc -HMPAO obtido em solução, pela ligação do tecnécio reduzido ao agente quelante, é rigorosamente analisado de modo a determinar a eficiência de marcação e a pureza radioquímica.

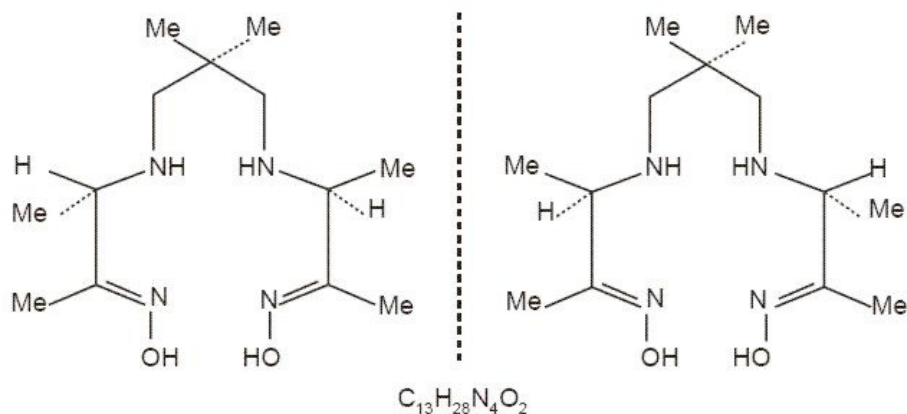


Figura 3-1: Estrutura química da exametazima. Após reconstituição do liofilizado (Cerotec™) com pertecnetato de sódio numa solução isotônica de NaCl apirogênica, forma-se o complexo ^{99m}Tc -exametazima. O radiofármaco administrado por via intravenosa é utilizado para o estudo da dinâmica cerebral. A administração de leucócitos marcados com o radiofármaco é utilizada para a detecção de focos inflamatórios na região abdominal.

c. Pureza radioquímica

A percentagem de radioatividade atribuível ao nuclido, relativa à actividade total determinada no eluato, exprime a pureza radioquímica deste. Esta pureza condiciona a formação do complexo lipófilo [^{99m}Tc]-HMPAO (I) e a composição radioquímica da solução final.

Podemos considerar três espécies contaminantes, estando a presença destas impurezas relacionada com a eficiência de marcação ou com a instabilidade da preparação do radiofármaco no tempo:

- Tecnécio-99m livre na forma de TcO_4^- que não foi reduzido pelo Sn^{2+} (II).
- Tecnécio-99m hidrolisado: ^{99m}Tc (IV). Formas de tecnécio que não reagem com o ligando, como o $^{99m}\text{TcO}_2$. Entre outras inclui o ^{99m}Tc ligado ao Sn^{2+} hidrolisado ($\text{Sn}(\text{OH})_2$) (III).
- Pertecnetato de sódio ^{99m}Tc -HMPAO secundário, hidrófilo, resultante da decomposição no tempo do complexo primário (IV).

A pesquisa de impurezas radioactivas é utilizada para determinar a pureza radioquímica das diferentes preparações, assim como a eficiência de ligação e estabilidade do complexo radiofármaco-nsLp.

Para a identificação das diferentes espécies presentes nas amostras preparadas utilizou-se um método cromatográfico. As amostras são identificadas através de um sistema de cromatografia em camada fina (ITLC), com base num protocolo analítico composto por três sistemas distintos de acordo com as especificações do produto [Ceretec®].

Na Tabela 3-1 estão descritos os sistemas, as espécies detectadas e respectivos valores de *Rf* após eluição.

Tabela 3-1 Composição dos sistemas cromatográficos, identificação das espécies radioquímicas e comportamentos de eluição [Neirix].

	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3
Tiras	ITLC/SG Metil etil cetona (MEK)	ITLC/SG NaCl 0,9% (m/v)	Watman Nº.1 Acetonitrilo 50% (v/v)
Frente Rf= 0.8 a 1.0	Tc-99m-HMPAO lipofílico $^{99m}\text{TcO}_4^-$	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Tc-99m-HMPAO secundário Tc-99m-HMPAO lipofílico $^{99m}\text{TcO}_4^-$
Origem Rf=0	^{99m}Tc reduzido hidrolisado Tc-99m-HMPAO secundário	$^{99m}\text{Tc-HMPAO-nsLp}$ Tc-99m-HMPAO secundário Tc-99m-HMPAO lipofílico	^{99m}Tc reduzido hidrolisado

Os suportes cromatográficos são marcados a 20mm e 80mm da base. Após aplicação da amostra (10µl), na marca inferior do suporte, este é colocado em câmara de eluição saturada com o solvente apropriado. Após eluição das amostras procede-se à sinalização da frente do solvente, secagem das tiras e

posterior determinação de actividade correspondente a cada região através de radiocromatógrafo (Bioscan AR-2000, Bioscan; USA).

A partir da representação gráfica da distribuição de contagens em função do R_f é possível calcular a percentagem de cada espécie relativamente ao valor inicialmente eluído do nuclido [^{99m}Tc].

A interpretação dos resultados obtidos nos três sistemas cromatográficos permite, não apenas a identificação das espécies presentes na amostra em cada momento, como também a quantificação, em percentagem, de cada espécie relativa à actividade inicial ao tempo $t=0$.

Os valores em percentagem de eficiência de marcação, no que diz respeito ao radiofármaco, foram calculados em relação à actividade total inicial, recorrendo à equação que a seguir se descreve:

$$100-(A\%+B\%)=^{99m}\text{Tc-exametazina} \quad \text{Equação 3-1}$$

O resultado do sistema 1 permite calcular a percentagem de actividade (A%) devida a ambos os complexos de [^{99m}Tc]-exametazima (lipófilo e hidrófilo). A actividade (B%) correspondente à presença de pertecnetato livre é obtida através do sistema 2.

A percentagem de actividade atribuída às nanopartículas resultante da incorporação do radiofármaco pode ser calculada através da seguinte fórmula:

$$^{99m}\text{Tc-exametazina-nsLp} = E_m(\%) - (C\%+D\%+E\%+F\%) \quad \text{Equação 3-2}$$

As actividades D% e E% são calculadas através do sistema 2 (frente) e sistema 3 (origem) e correspondem respectivamente à presença de tecnécio livre e hidrolisado. Para o cálculo da percentagem de actividade correspondente ao complexo [^{99m}Tc]-exametazima lipófilo (C%) é necessário subtrair o valor da actividade D% à percentagem correspondente à frente do solvente do sistema 1. Por último, a actividade devida à presença do complexo hidrófilo pode ser calculada a partir do valor de C%, depois de descontada a actividade correspondente à frente do sistema 3. A fracção correspondente às

nanopartículas com o radiofármaco incorporado pode ser determinada a partir da percentagem de actividade correspondente à origem no sistema 2 ao qual se subtrai o valor de $[C\%+E\%+F\%]$.

3.3.2. Preparação do complexo $[^{99m}\text{Tc}]\text{-HMPAO-nsLp}$

a. Protocolo de marcação: nanopartículas-radiofármaco

Para avaliar o efeito da composição química na eficácia de marcação, no processo de nebulização e no perfil de biodistribuição, foram produzidas nanopartículas com os lípidos Compritol 888® ATO e Precirol ATO 5®, de acordo com os procedimentos descritos no capítulo 2. As suspensões coloidais de nsLp (3% m/v de lípido e 50% m/m de tensoactivo) integralmente caracterizadas apresentavam um diâmetro médio compreendido entre 180-230 nm e um valor de potencial zeta, respectivamente $-24\pm 2\text{mV}$ para o Compritol 888® ATO e $-31\pm 2\text{mV}$ para o Precirol ATO 5®.

As partículas foram marcadas por incubação com a solução de radiofármaco $[^{99m}\text{Tc}]\text{-HMPAO}$, isenta de impurezas radioquímicas, como determinado pelo valor correspondente à eficiência de marcação, cerca de $97\pm 2\%$. Depois de determinada a actividade e pureza radioquímica do complexo radionuclido-traçador, adicionou-se 1ml de suspensão de nsLp, previamente preparada e caracterizada, a 0,5ml da solução de $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ com cerca de 10mCi. A mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 15min. Após este período determinou-se actividade da amostra num contador de cintilações (Medisystem-Medi 202, Satis, Portugal), calculando-se de seguida a eficiência de marcação e a pureza radioquímica do complexo $^{99m}\text{Tc-HMPAO-nsLp}$. As formulações utilizadas para administração nos estudos *in vivo* apresentaram valores de eficiência de associação dentro do intervalo de $98\pm 1\%$.

3.3.3. Nebulização

Para um alargado número de fármacos a nebulização é uma opção que visa diminuir os efeitos adversos a eles associados após administração intravenosa. A concentração de um fármaco na região pulmonar é mais elevada quando

administrado por aerossol, o que aumenta a capacidade terapêutica do produto e reduz os efeitos secundários sistémicos (Khanna *et al.* 1997).

A distribuição das partículas inaladas e o perfil de deposição traqueo-brônquica e intrapulmonar estão, como já referido, regulados por diferentes factores. São eles a forma galénica, as características da dispersão inicial, o mecanismo de atomização e, não menos importante, as características anatomofisiológicas do aparelho respiratório.

Devido à carga superficial, densidade e diâmetro das nsLp, a nebulização destas partículas suscita grande interesse como potencial meio de administração por via pulmonar, pelo que a sua capacidade para formar um aerossol por nebulização da amostra é aqui avaliada.

A nebulização deve produzir um aerossol reprodutível no que respeita ao diâmetro médio de partículas na fracção respirável, já que o perfil de deposição está, como se sabe, intimamente relacionado com o tamanho da partícula inalada. As características do aerossol formado são função não apenas do diâmetro e carga das partículas dispersas, como também do equipamento de nebulização e sobretudo do mecanismo de disrupção do líquido a atomizar (Dailey *et al.* 2003).

Para examinar a capacidade de nebulização e a integridade do aerossol de partículas coloidais utilizou-se um nebulizador ultrassónico (OMRON NE U07. Omron Healthcare Europe, Portugal. 3,5 μ m MMD-Mass Median Diameter). Neste nebulizador a amostra líquida é atomizada, após ruptura das forças de coesão no líquido, através da energia ultra-sónica (2,4MHz) produzida por vibração de um cristal piezoeléctrico. O aerossol produzido por este mecanismo é vaporizado a uma taxa constante e independente do fluxo respiratório (1,0ml/min) do animal. De acordo com as especificações do aparelho, o diâmetro médio da fase dispersa pode variar entre 1 e 5 μ m. Esta variação está relacionada com o sistema a nebulizar, podendo este ser uma solução, um sistema coloidal ou um sistema de partículas micrométricas (Dailey *et al.* 2003; Hillery *et al.* 2001).

a. Caracterização do aerossol de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp

Com o objectivo de determinar a influência da composição lipídica das nanopartículas nas características do aerossol, as formulações correspondentes a cada lípido foram previamente diluídas (0,5:1,0) em água para injectáveis e de seguida nebulizadas.

Amostras de 15 ml de nsLp (n=3) foram nebulizadas a uma taxa constante, cerca de 1,0ml/minuto, durante 10 minutos. O volume de amostra nebulizado foi calculado a partir da diferença entre os volumes inicial e residual. Os valores de diâmetro médio e absorvência de cada amostra de nsLp (n=3), antes e depois da nebulização, foram utilizados para determinar a concentração de amostra nebulizada. A absorvência de cada amostra de nsLp foi determinada por espectrofotometria (Shimatzu, Reino Unido), de acordo com o protocolo apresentado no capítulo 1 para a determinação do número de partículas.

Com base no princípio de difracção de luz, por interacção desta com partículas suspensas numa amostra, determinou-se o diâmetro médio do aerossol de nsLp. O nebulizador utilizado neste estudo foi posicionado de modo a que o fluxo do aerossol formado interrompa perpendicularmente o feixe de luz laser do contador de partículas (Spraytec. Malvern Instruments, UK). Os resultados obtidos correspondem a um modelo log-normal que descreve a distribuição de tamanhos da população, relativa ao diâmetro médio das partículas/gotículas que constituem o aerossol.

b. Estabilidade da ligação [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp

O efeito do método de nebulização sobre as características físico-químicas da suspensão coloidal de nanopartículas foi avaliado por análise do diâmetro médio e determinação da turbidez, em ambas as amostras: a inicial e a correspondente ao volume residual após nebulização.

Este estudo foi executado com dois objectivos: (i) controlar fenómenos de agregação, (ii) determinar se ambas as fases são atomizadas. A alteração do valor da absorvência na amostra inicial pode corresponder a um fenómeno de concentração da mesma, se apenas a fase contínua da suspensão de nanopartículas tiver sofrido atomização. A turbidez da suspensão de nsLp marcadas com o radiofármaco foi medida ao longo do tempo (c.d.o.= 540

nm), de modo a controlar fenómenos de agregação ou aglutinação das partículas.

A estabilidade do complexo [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp, nomeadamente no que diz respeito à presença de impurezas, afecta significativamente a análise da cinética de distribuição *in vivo*. A decomposição do complexo formado pode interferir no sinal, uma vez que a intensidade da resposta correspondente às partículas será menor e o sinal correspondente às formas de nuclido livre ou hidrolisado e ao traçador na sua forma hidrofílica, será ampliado. Por outro lado, devido a características físico-químicas específicas, estas espécies dão origem a perfis de biodistribuição distintos do apresentado pelo radiofármaco original (Neirinckx *et al.* 1987).

Calculou-se a pureza radioquímica e eficiência de marcação das amostras aos 0 minutos. A pesquisa de impurezas radioquímicas ao longo do tempo foi avaliada aos 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 minutos após incubação do radiofármaco com as nsLp.

Determinou-se *in vitro* a influência dos componentes fisiológicos na estabilidade de nanopartículas de Compritol 888ATO com radiofármaco incorporado. A cinética de decomposição destas amostras foi posteriormente comparada com uma alíquota de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp diluída em água estéril (0,125:1,00) e mantida sob as mesmas condições. Utilizaram-se amostras humanas de plasma, soro e albumina (20%) previamente mantidas a 37°C e 56°C (Borchard & Kreuter 1993; Scieszka & Cho 1988; Scieszka *et al.* 1991). Imediatamente após associação ao radiofármaco, uma fracção de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp foi adicionada sob agitação suave a cada amostra (0,125:1,00). A mistura foi mantida ao abrigo da luz e a uma temperatura constante de 23°C \pm 2°C. Amostras de 20 μ l foram recolhidas aos 5, 10, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos, sendo de seguida submetidas à análise cromatográfica em camada fina, como descrito anteriormente para a determinação da pureza radioquímica e estabilidade da associação radiofármaco-nsLp.

3.3.4. Cinética de distribuição *in vivo* após administração pulmonar

a. Inalação de um aerossol de [^{99m}Tc]-HMPAO-nSLp

Relativamente aos estudos de biodistribuição, as condições experimentais determinaram que os animais fossem previamente anestesiados e imobilizados sobre um suporte, de modo a permitir a sua manipulação. O suporte, forrado com material absorvente para evitar contaminações pela urina, com o animal imobilizado e posicionado em decúbito dorsal, foi colocado directamente sobre o colimador da câmara gama.

Após dispersão em água para injectáveis do complexo formado pela associação do radiofármaco às nanopartículas (0,5:1,0), uma amostra com cerca de 4 ± 1 mCi foi usada para se proceder à nebulização. O aerossol com um fluxo de 1,0 ml/minuto, percorre um circuito fechado (5cm), até ser administrado através de uma máscara, adaptada à zona da boca e nariz do animal. Cada animal está aproximadamente três minutos a inalar a mistura, até se atingir um valor de actividade de 200 K/cpm, no campo correspondente à região pulmonar. A nebulização é interrompida e a máscara é retirada, deixando o animal respirar livremente. Durante o ensaio, a região da cabeça é coberta com uma placa de chumbo para impedir que esta zona funcione como *background* positivo. Para determinação da actividade nos órgãos e tecidos, considerou-se a actividade na região pulmonar após três minutos de inalação (t_0), como 100% da dose administrada. A determinação da actividade na amostra inicial e, após nebulização, na amostra residual, permitiu calcular a dose inalada.

O protocolo de nebulização e inalação, executado com as diferentes dispersões de nanopartículas com o radiofármaco associado, foi integralmente reproduzido com a solução de radiofármaco livre. Deste modo, ao grupo controle (n=3) foi administrado por inalação, sob as mesmas condições, o radiofármaco ^{99m}Tc-HMPAO livre, de modo a caracterizar o padrão de distribuição deste.

A dose inalada (D_{ina}) foi calculada de acordo com a Equação 3-3, onde a_{tt} e a_{rd} correspondem respectivamente à actividade medida na amostra antes da nebulização e à actividade medida no volume residual de amostra que não foi inalada.

$$D_{\text{ina}} = a_{\text{tt}} - a_{\text{rd}}$$

Equação 3-3

Com os animais colocados em posição de decúbito dorsal sobre o colimador da câmara gama (Maxi camera digital GE 400AC, Milwaukee, USA, ligada a um computador - Genie Processing Station) procedeu-se aos estudos de biodistribuição. Durante 60 minutos adquiriram-se imagens dinâmicas (matrizes 64×64, 2 imagens/min). Depois deste período, imagens estáticas (128×128, 2 minutos/imagem) foram captadas aos 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos pós-inalação. As imagens sequenciais, obtidas durante a aquisição dinâmica, foram utilizadas para obter curvas actividade/tempo. Sobre as imagens foram delineadas regiões de interesse (ROI's) correspondentes à região pulmonar e gânglios linfáticos. A análise imageológica da deposição e eliminação de partículas, a partir da região esquerda e direita da imagem planar de pulmão, foi executada após subtracção da actividade correspondente ao ruído de fundo (músculo e pele) e correcção do valor de decaimento radioactivo.

A eliminação das partículas da região pulmonar foi quantificada e expressa em percentagem de actividade por minuto. Curvas de enchimento foram desenhadas, considerando a percentagem de aumento de actividade por minuto, nas regiões de gânglios linfáticos.

De forma a estabelecer os contributos do radiofármaco livre e das impurezas formadas ao longo da experiência, no perfil imageológico obtido pós-inalação de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp, foi determinada *in vitro* a radioactividade presente em órgãos considerados relevantes. Os animais foram sacrificados duas horas após o início da inalação, tendo sido realizadas colheitas de amostras de urina, sangue, estômago, tiróide, fígado, baço, pulmões, gânglios axilares, abdominais, periaórticos e inguinais.

Para quantificar a actividade nos órgãos colhidos, o peso de cada amostra foi rigorosamente determinado e a sua actividade medida num contador gama (Gamma C-12, USA). Os resultados foram expressos em percentagem de actividade por grama de tecido, relativa à actividade inicial, depois de feita a correcção do decaimento radioactivo. Para o cálculo do decaimento radioactivo

utilizou-se a Equação 3-4, onde A_t corresponde ao número de contagens por segundo e F ao factor de conversão para se obter o valor de actividade em mCi

$$A_a = (A_t / e^{-0,1155t}) \times 10^{-6} \times 0,27 \times F \quad \text{Equação 3-4}^7$$

b. Administração endo-traqueal de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp

A emissão de radiação gama, a partir da associação do radiofármaco [^{99m}Tc]-HMPAO a dispersões de nsLp, foi também utilizada para estudar os mecanismos de distribuição, absorção e eliminação a partir da zona intermédia do sistema respiratório.

Forçada pela corrente de ar inspirado, no seu percurso pelo pulmão e especialmente nas vias aéreas de condução, qualquer partícula inalada está sob o efeito de um fluxo turbulento. Este fenómeno provoca o impacto das partículas com as paredes do epitélio e pode ser responsável pela deposição, nesta região, de uma percentagem elevada da amostra inalada. De forma a isolar de modo sistemático estes fenómenos, procedeu-se à administração endotraqueal de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp, simulando desta forma a deposição por impacto, que ocorre na região traqueo-brônquica, após inalação de um aerossol.

Utilizaram-se formulações de nanopartículas de Compritol® 888ATO, marcadas e caracterizadas. Após dispersão em água para injectáveis (0,5:1,0), as dispersões de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp com cerca de 4 ± 1 mCi de actividade, foram imediatamente administradas.

Os animais foram anestesiados e mantidos imóveis em decúbito dorsal, sobre suportes cobertos com material absorvente, como descrito anteriormente. Cada animal foi sujeito a uma traqueotomia através de um procedimento cirúrgico (em colaboração com a Dra. Ana Cristina Santos, do Serviço de Biofísica do IBILI/FMUC). Pelo orifício, entre os anéis da traqueia, foi introduzido um tubo de polietileno (sonda-26G), até aproximadamente 0,5cm

da bifurcação dos brônquios. A este tubo é adaptada uma agulha de silicone acoplada a uma seringa contendo 1,5ml da suspensão de nanopartículas [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp e uma pequena quantidade de ar, cerca de 1ml.

Para a administração da amostra foi exercida pressão sobre o êmbolo da seringa de modo a obter o esvaziamento do seu conteúdo (Poyner *et al.*, 1995). A partir de um movimento brusco, o ar força a amostra a sair, provocando, na zona de instilação, um fenómeno de aspersão.

Após este procedimento, retirou-se a seringa e suturou-se a zona de incisão, deixando uma abertura de pequena dimensão, apenas para fixar a sonda, cobrindo-se a zona suturada com uma compressa estéril humidificada com soro fisiológico estéril. O animal retoma imediatamente a respiração normal e permanece desta forma durante todo o ensaio. O procedimento foi executado de modo a evitar danificar vasos sanguíneos adjacentes, o que poderia provocar a contaminação radioactiva de órgãos e tecidos através da circulação sanguínea.

Grupos de cinco animais foram distribuídos aleatoriamente de modo a determinar a actividade a diferentes tempos pós-administração. O primeiro grupo (n=5), correspondente à administração do traçador livre, funcionou como controlo negativo. Foram constituídos mais quatro grupos de cinco animais, correspondentes aos tempos pós-instilação de 3, 8, 15 e 60 minutos (n=5).

Ao tempo zero, foi administrada uma dose equivalente a todos os animais, cerca de $4,0 \pm 0,5$ mCi. Em cada período de tempo estabelecido no protocolo, foi sacrificado um animal do grupo respectivo. Procedeu-se de imediato à colheita e pesagem dos órgãos (pulmão, fígado, estômago e gânglios aórticos, inguinais e axilares). A actividade das amostras foi determinada num contador gama (Gamma C-12-acoplado a um computador Compaq Deskpro e impressora HP Deskjet 690-DPC, Los Angeles, CA, USA). A partir do registo de contagens determinou-se a distribuição de radioactividade, expressa em percentagem de actividade por grama de órgão, em função da dose total administrada.

⁷ Equação retirada do livro Saha, G.B. (2004) in: Fundamentals of Nuclear Pharmacy. Fifth Edition Springer, NY.

3.4. Resultados

3.4.1. Eficiência de marcação e pureza radioquímica

A eficiência de incorporação do radiofármaco pelas nanopartículas, determinada ao $t=0$, apresenta valores de $98\pm 1\%$ ($n=10$). Para atingir estes valores de marcação contribuiu o facto de se ter utilizado uma concentração elevada de partículas relativa à solução de radiofármaco (1:0,5). Este procedimento provoca o consumo total de radiofármaco no interior da mistura e diminui a probabilidade de formação do complexo secundário.

Os valores de eficiência de associação e a estabilidade observada do complexo $[^{99m}\text{Tc}]\text{-HMPAO-nsLp}$ ao longo do tempo, demonstram a importância dos fenómenos de adsorção na incorporação do radiofármaco, potenciados evidentemente pela elevada área de superfície disponível.

O controlo de qualidade e determinação da pureza radioquímica envolveu os sistemas cromatográficos (1) ITLC/SG(butanona), (2) ITLC/SG (NaCl 0,9%) e (3) Whatman Nº1/ acetonitrilo (50%), tal como descrito anteriormente.

Nos cromatogramas correspondentes ao tempo zero não se observou a presença de pertecnetato livre (imagens não apresentadas). Nos sistemas 1 e 3, devido à presença das nanopartículas, o pico aparece arrastado, respectivamente com $R_f=0,4$ e $0,7$. Na imagem cintigráfica da tira cromatográfica correspondente ao sistema 2, ao tempo zero e 30 minutos após aplicação das partículas com o radiofármaco incorporado, observou-se actividade na zona correspondente ao ponto de aplicação, onde se concentram as espécies que não migram com o solvente NaCl (0,9%).

Aparentemente, a associação do radiofármaco às nsLp forma um complexo estável, o que se consubstancia na alteração da cinética de degradação deste aos 30 e 60 minutos, quando comparado com a sua forma livre, onde se verifica, para os mesmos tempos, o aparecimento de espécies livres.

O estudo da pureza radioquímica em amostras de $[^{99m}\text{Tc}]\text{-HMPAO-nsLp}$, incubadas em diferentes tipos de meios biológicos, confirmou a tendência do complexo em permanecer estável, por períodos de tempo superiores aos obtidos com o radiofármaco livre.

Na Figura 3-2 encontram-se representados os gráficos que descrevem o perfil de decomposição *in vitro* das [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp, com e sem incubação em amostras biológicas.

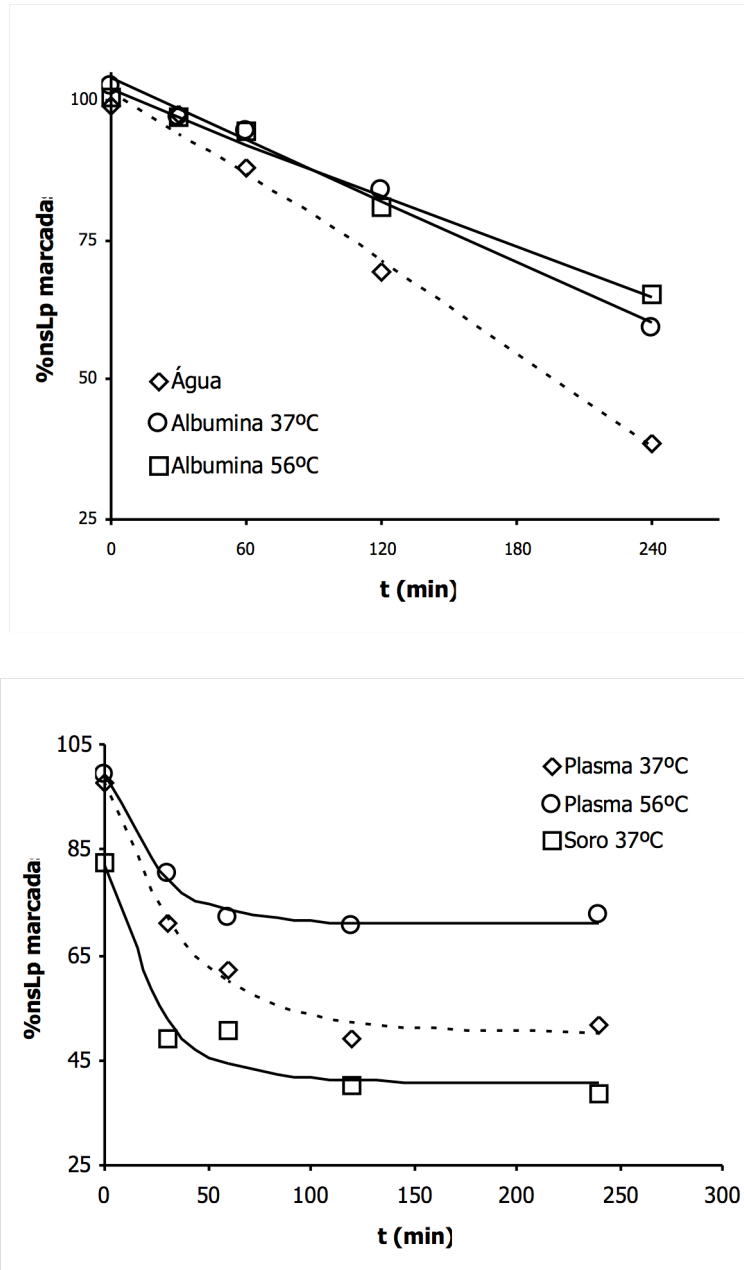


Figura 3-2: Perfis de decomposição da associação [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp, após ajustamento de um modelo exponencial utilizando uma ANOVA de duas entradas. Na imagem superior, podemos observar o perfil de decomposição na dispersão original (□) e após incubação numa solução de albumina previamente tratada a 37°C (○) ou a 56°C (◇). No gráfico B, encontramos a representação gráfica da cinética de decomposição da amostra incubada em plasma previamente tratado a 37°C (◇) ou a 56°C (○) e em soro tratado a 37°C (□).

Verificou-se, nas amostras correspondentes à dispersão original e à amostra incubada numa solução de albumina, um perfil de decomposição semelhante. No entanto, possivelmente devido a fenómenos de adsorção, a taxa de decomposição apresentou-se ligeiramente inferior nas partículas incubadas na solução de albumina. A incubação em soro e plasma, parece não promover qualquer efeito protector nos primeiros 60 minutos mas, após esse período, é atingido um equilíbrio e a decomposição do complexo parece diminuir significativamente (Figura 3-2).

3.4.2. Nebulização

a. Aerossol

A análise das características físico-químicas de cada aerossol, demonstrou que a nebulização das nsLp se processou de forma eficaz e reprodutível e que esta capacidade é independente da composição lipídica.

Durante o intervalo de tempo, aproximadamente três minutos, que as preparações estiveram sujeitas à atomização, não se observaram fenómenos de agregação ou aglutinação de partículas, como confirmam os resultados apresentados na Tabela 3-2.

A análise dos valores de dm e absorvência, obtidos antes e após nebulização da suspensão coloidal, confirma que o processo escolhido para administrar as nsLp é adequado e que a nebulização não tem qualquer efeito negativo na estabilidade da dispersão de nanopartículas (Tabela 3-2).

As nanopartículas lipídicas produziram, independentemente do lípido base, um aerossol monodisperso ($n=3$), com diâmetro aerodinâmico superior ao determinado na preparação original, sendo o dm determinado no aerossol, 30s após o início da nebulização, cerca de $1,53 \pm 0,42 \mu\text{m}$ ($n=4$).

Os valores determinados para a distribuição do dm da amostra nebulizada, mostram um aumento deste parâmetro, relativamente à dispersão original, que pode ser atribuído ao facto do mecanismo de atomização ter promovido a formação de um aerossol constituído por gotículas de água, contendo no seu interior a dispersão de nsLp's. Hipótese que foi confirmada, pelo facto de este valor ser inferior ao determinado para um aerossol formado por uma solução de NaCl (0,9%), utilizando o mesmo equipamento, cerca de $2,83 \pm 0,17 \mu\text{m}$.

Tabela 3-2: Efeito do processo de nebulização nos valores de absorvência (Abs.), em amostras diluídas a 0.5% (p/v) e de diâmetro médio das partículas de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp. Valores correspondentes às nanopartículas preparadas com (A) Compritol 888 ATO e (B) com Precirol ATO 5

	(nm)	IP	Abs
(A)			
Antes de nebulização	197,5	0,231	0,599
	194,8	0,291	0,593
	196,1	0,261	0,601
Depois da nebulização	218,3	0,378	0,597
	220,3	0,379	0,599
	219,3	0,379	0,598
(B)			
Antes de nebulização	130,4	0,198	0,594
	128,7	0,200	0,597
	133,7	0,201	0,593
Depois da nebulização	138,5	0,212	0,596
	136,7	0,219	0,594
	138,7	0,212	0,594

3.4.3. Cinética de distribuição das [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp inaladas

a. Eliminação pulmonar

A percentagem de radioactividade inalada foi calculada de acordo com a equação 3. O valor de 4 ± 2 mCi (n=6) foi determinado a partir da média dos valores obtidos em seis experiências diferentes.

Da análise das imagens cintigráficas, no que respeita à influência da composição lipídica no perfil de deposição do aerossol e cinética de distribuição, conclui-se que as duas formulações apresentam uma elevada percentagem de retenção de actividade nas regiões central e periférica dos pulmões (Figura 3-3).

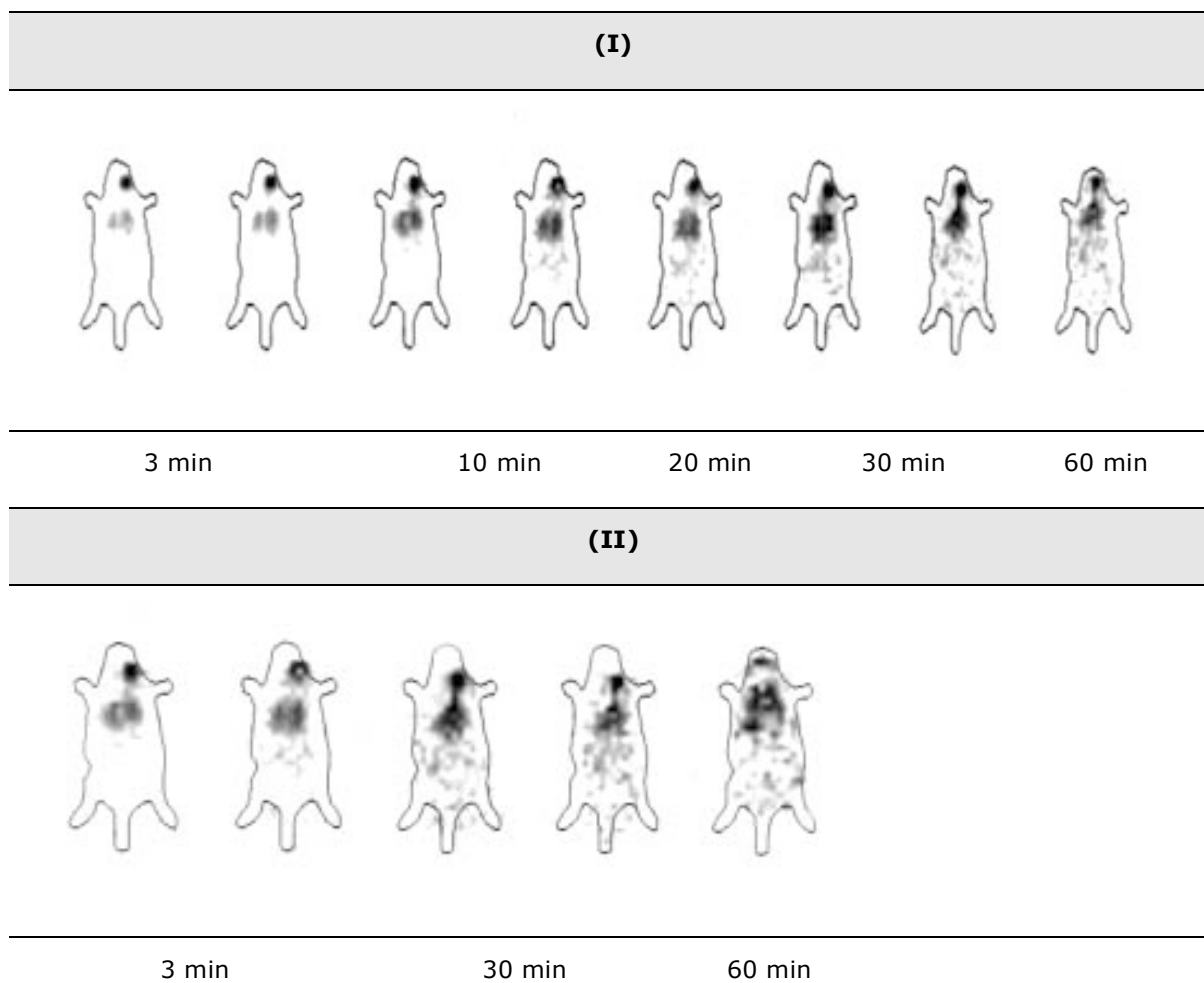


Figura 3-3: Imagens obtidas até aos 60 minutos após inalação de nSLp produzidas com Compritol® 888ATO (I) e com Precirol ATO5® (II). A ausência de actividade nos órgãos da cavidade torácica, confirma que a distribuição *in vivo* do radiofármaco, é alterada pela associação a nanopartículas lipídicas e que este fenómeno é independente da composição destas.

Estes resultados, indicam que as nanopartículas transportadas pelas gotículas de aerossol atingem rapidamente (3min) as vias respiratórias e a zona alveolar, o que sugere que os mecanismos de deposição pulmonar, para estas partículas, poderão ser função do diâmetro médio e da sua natureza coloidal e independentes da composição lipídica (Figura 3-4).

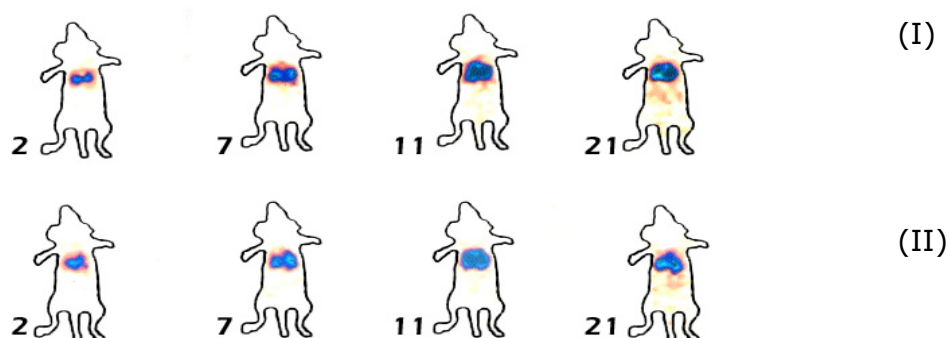


Figura 3-4: Perfil de deposição e retenção de actividade até aos 20 minutos após inalação de nsLp produzidas com Compritol® 888ATO (I) e com Precirol ATO5® (II).

O perfil de eliminação e distribuição das preparações que foram comparadas indicou que os mecanismos envolvidos na eliminação e distribuição das nsLp, são independentes do lípido utilizado. Esta circunstância, que se manifesta sobretudo pela ausência de actividade no fígado e coração, está aparentemente relacionada com o padrão de deposição, correspondendo este a um elevado conteúdo de nanopartículas na região alveolar (Figura 3-3).

A análise das imagens cintigráficas, adquiridas durante os primeiros minutos de inalação, indica que os aerossóis produzidos, radiofármaco livre [^{99m}Tc]-HMPAO ou associado às partículas [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp (A) e (B), exibem uma deposição regional acentuada na superfície pulmonar, nomeadamente, abrangendo a região alveolar (Figura 3-5).

Na Figura 3-5A, observam-se as imagens relativas ao percurso *in vivo* radiofármaco livre. As zonas de actividade confirmam que a biodistribuição deste por inalação está de acordo com o descrito na literatura após administração intravenosa, onde se reconhece uma tendência evidente para os órgãos da cavidade abdominal, especialmente fígado, baço e coração (Sharp *et al.* 1986) (Ceretec™). Por inalação, este radiofármaco distribuiu-se inicialmente pela região pulmonar, apresentando um máximo de actividade aos 3 minutos. No entanto, a eliminação através da circulação sanguínea, foi confirmada aos 30 minutos, com o aparecimento de actividade na região do fígado, baço e mais tarde na região do estômago, possivelmente devido à formação de impurezas. Não são visíveis nas imagens zonas de actividade associadas a gânglios linfáticos.

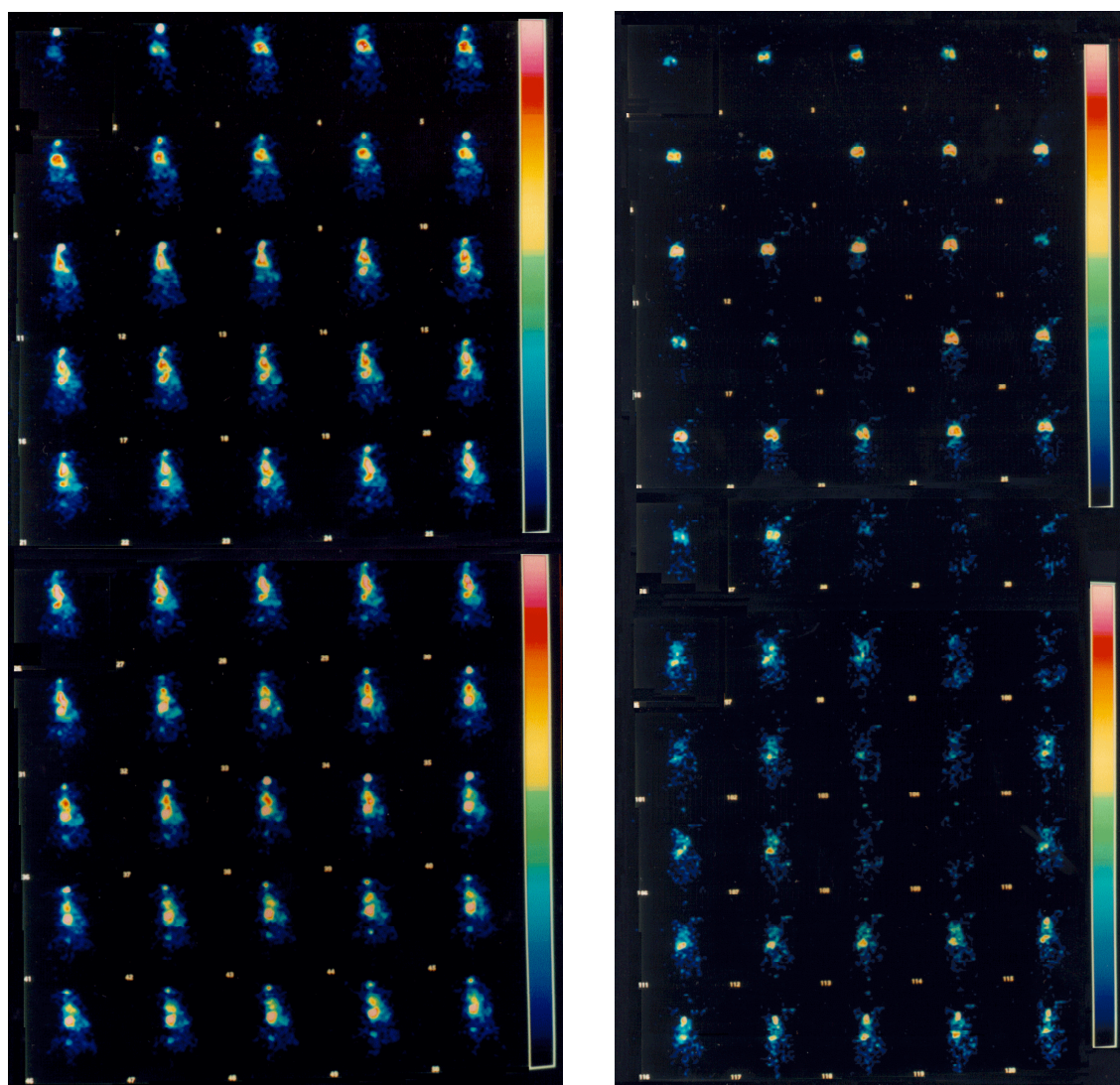


Figura 3-5: Comparação entre o perfil de distribuição em animais tratados com aerossol de radiofármaco livre (A) e de radiofármaco incorporado nas partículas de Compritol® 888ATO (B). Imagens de corpo inteiro, com os animais em decúbito dorsal, correspondentes à aquisição dinâmica durante 60 minutos após inalação.

O conjunto de imagens que corresponde a 60 minutos de aquisição dinâmica após inalação de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp evidencia que as nanopartículas com o radiofármaco incorporado, exibem um padrão de distribuição claramente diferente do apresentado por inalação do aerossol de radiofármaco livre (Figura 3-5B). Muito embora o padrão de deposição seja semelhante, como comprovam as imagens correspondentes aos primeiros minutos, torna-se claro

que os mecanismos de drenagem são diferentes e, especialmente, que a eliminação do espaço pulmonar não ocorreu através da circulação sanguínea. Esta hipótese é evidenciada, sobretudo, pela ausência de actividade nos órgãos da cavidade abdominal, dado que as regiões associadas ao sistema linfático não exibem zonas de intensa actividade.

b. Biodistribuição das [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp

Para o estudo da cinética de eliminação e distribuição *in vivo* do complexo de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp inalado, foram delimitadas regiões de interesse (ROI) sobre as imagens, como indicado na Figura 3-6.

Observou-se que, efectivamente, durante os primeiros 30 minutos após inalação, a actividade que é eliminada da região pulmonar concentra-se ao nível do sistema linfático, principalmente nos gânglios linfáticos inguinais, periaórticos e axilares, o que indica que a via de eliminação pulmonar pode ser a drenagem linfática (Figura 3-6).

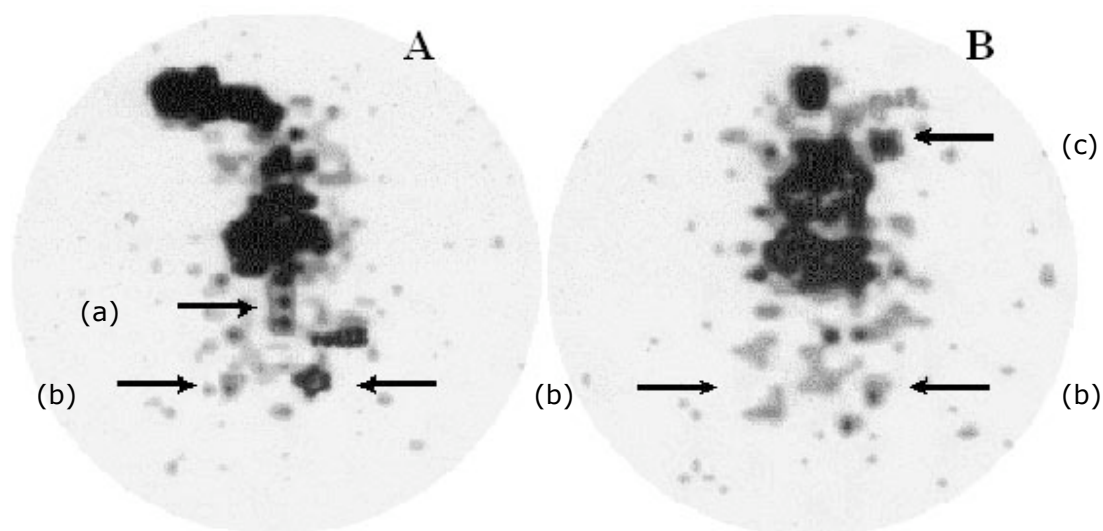


Figura 3-6: Concentração de actividade nos gânglios linfáticos (a) gânglios periaórticos, (b) inguinais, (c) axilares) aos 30 min (A) e 45 min (B) após inalação do aerossol de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp.

Os valores de actividade média por pixel em cada ROI, delineada nas imagens resultantes da aquisição dinâmica, originaram curvas regionais de actividade vs tempo (Figura 3-7).

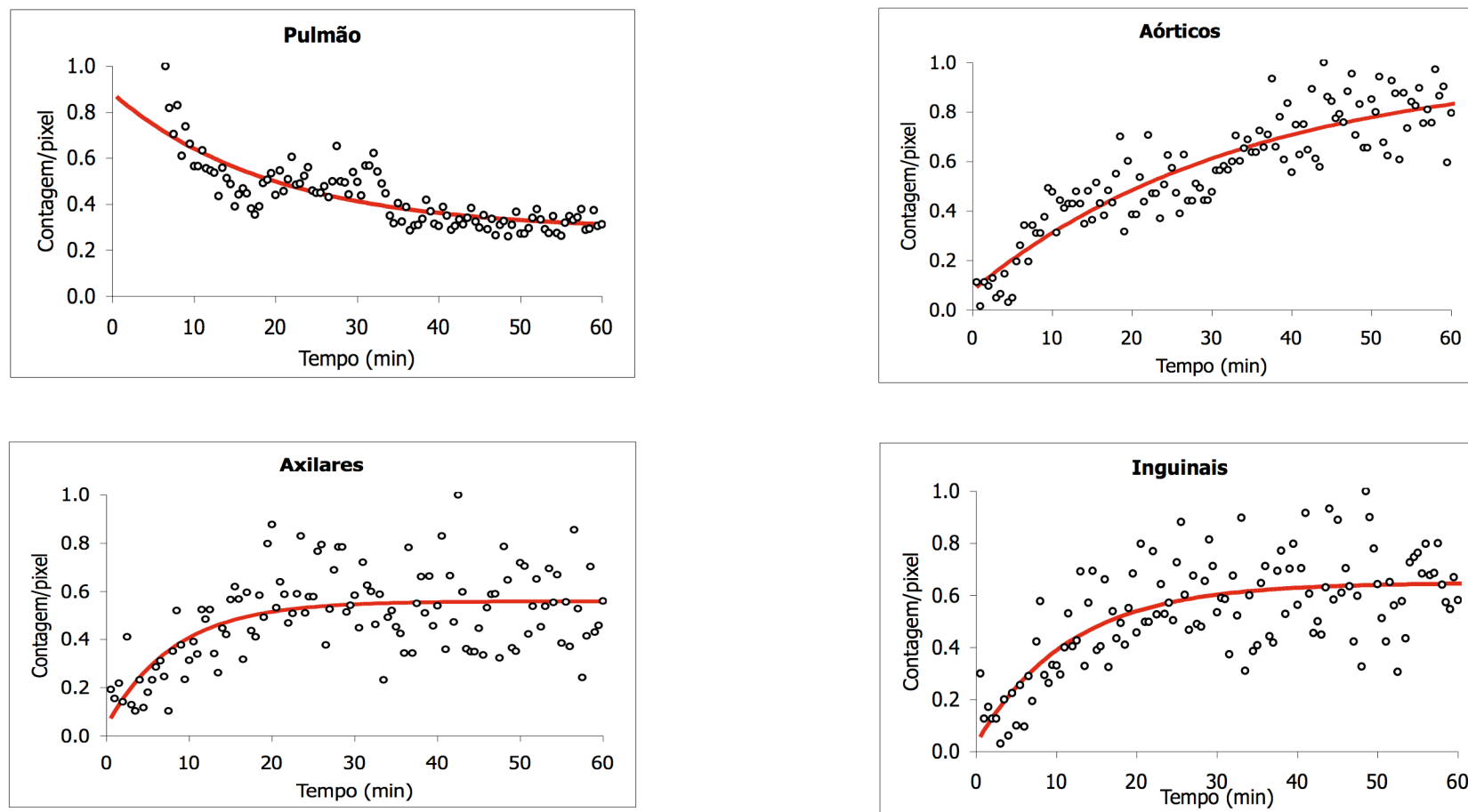


Figura 3-7. Representação gráfica da variação da actividade em função do tempo durante 60 minutos de aquisição dinâmica, para o aerossol ^{99m}Tc -HMPAO-nsLp com Precirol ATO 5. Estes resultados incluem a cinética de absorção, eliminação e retenção pulmonar nas regiões central e periférica, assim como a cinética de acumulação de partículas nos gânglios periaórticos, axilares e inguinais.

Como se pode verificar, quando a nebulização é interrompida (3min) a actividade total inalada concentra-se nos pulmões. Observou-se imediatamente a seguir, um período de eliminação relativamente rápido, que se prolongou por aproximadamente 10 minutos ($t_{1/2} = 14$ min). Este fenómeno, provocou uma diminuição acentuada da actividade no espaço pulmonar, que adquiriu um valor residual de aproximadamente 25%. Em simultâneo, verificou-se um aumento da intensidade do sinal nas regiões correspondentes aos gânglios periaórticos abdominais, axilares e inguinais, que apresentaram um valor máximo de actividade nos gânglios axilares e inguinais aos 40 min (Figura 3-7).

c. Distribuição da actividade por tecido

Na Tabela 3-3 estão representados os valores de contagem de actividade acumulada nas amostras de órgãos recolhidos, em animais sacrificados 2h após inalação.

Tabela 3-3: Actividade detectada nas amostras colhidas após sacrifício dos animais, duas horas após inalação de um aerossol de ^{99m}Tc -HMPAO-nsLp de Compritol@888ATO (n=3; média±SD). A actividade calculada foi expressa em percentagem da actividade inalada por grama de tecido. A abreviatura n.d. corresponde a não determinado.

Actividade (%)/ tecido (g)		
Pulmão	Fígado	Baço
23,3±7,6	6,5±1,9	2,7±0,5
Gânglios Inguinais	Gânglios Periaórticos	Gânglios Axilares
3,2±2,0	7,0±1,9	6,4±1,2
Estômago	Urina	Rins
1,6±0,9	18,0±9,2	9,1±1,9
Intestino Delgado	Intestino Grosso	Coração
4,6±2,5	3,1±1,1	1,7±0,3
Cérebro	Soro	Gordura
0,3±0,2	4,8±3,0	n.d.

As partículas marcadas parecem acumular-se ao nível dos gânglios linfáticos uma vez que as amostras recolhidas dos animais sacrificados 2h pós inalação apresentaram um nível de actividade elevado, correspondente a um total de $16,7 \pm 3,0\%$ linfáticos abdominais, periaórticos, axilares e inguinais, comparativamente à actividade encontrada nos órgãos constituintes do MPS, um total de $9,2 \pm 2,0\%$ para o fígado e baço. A actividade correspondente à região pulmonar, cerca de $23,3 \pm 7,6$, indicou que pode existir uma fracção de partículas retidas nos pulmões, o que está de acordo com as imagens e os dados obtidos durante a aquisição dinâmica (Figura 3-7).

Observou-se igualmente um valor elevado de actividade nas amostras de urina ($18,0 \pm 9,2\%$) e sangue ($4,8 \pm 3,0\%$), o que coincide com a diminuição da pureza radioquímica da amostra ao longo do tempo e, portanto, com o aparecimento de espécies mais hidrófilas, respectivamente o radionuclido livre nas suas diferentes formas e o complexo secundário.

3.4.4. Cinética *in vivo* após administração endotraqueal de $[^{99m}\text{Tc}]\text{-HMPAO-nsLp}$

Os dados obtidos no estudo da cinética *in vivo*, resultantes da administração endotraqueal do complexo formado pela associação de radiofármaco com nanopartículas lipídicas, permitiram distinguir a importância das características intrínsecas das nanopartículas.

De facto, mesmo simulando a hipótese de toda a amostra ou parte dela, ficar retida na região tráqueo-brônquica, observou-se a partir da actividade determinada nas amostras de pulmão recolhidas nos animais sacrificados aos três minutos, que praticamente toda a dose administrada se encontra distribuída a nível pulmonar ($94,4 \pm 1,5\%$). Os dados obtidos estão de acordo com a imagem correspondente ao tempo zero, verificando-se níveis de actividade elevados circunscritos à zona pulmonar, incluindo a região alveolar (Figura 3-8).

A eliminação pulmonar das partículas administradas por instilação endo-traqueal apresentou um perfil de decréscimo em ordem ao tempo que pode ser considerado como correspondente a duas fases. Uma fase inicial mais rápida, seguida de uma fase lenta até atingir um valor residual, aos 60

minutos, correspondente à acumulação no pulmão de cerca de 10% da actividade total administrada (Figura 3-8).

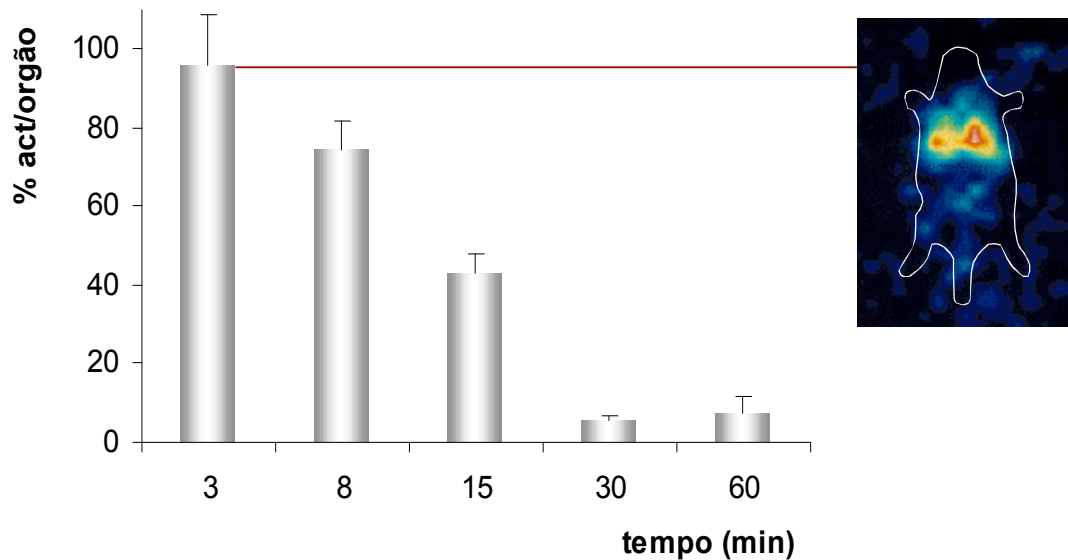


Figura 3-8: Perfil de eliminação pulmonar obtido pela contagem de actividade no pulmão, em colheitas efectuadas aos 3; 8; 15; 30 e 60 minutos, após administração endo-traqueal de uma amostra de $[^{99m}\text{Tc}]$ -HMPAO-nsLp. Na imagem da direita, correspondente ao tempo zero, verifica-se a acumulação da actividade administrada no espaço pulmonar.

Na Figura 3-9 estão representados os valores de actividade determinados ao longo do tempo nos órgãos previamente seleccionados. O cálculo da actividade nas amostras correspondentes aos gânglios linfáticos, estômago e fígado indicam, uma vez mais, que a eliminação pulmonar das $[^{99m}\text{Tc}]$ -HMPAO-nsLp ocorre preferencialmente pelo sistema linfático.

Os valores de actividade relativos ao fígado e estômago, podem ser associados a origens diferentes. Uma das hipóteses, corresponde à contribuição da deglutição da amostra radioactiva, eliminada do espaço pulmonar pela drenagem mucociliar. Num cenário alternativo, esta actividade pode estar relacionada com a formação de impurezas radioquímicas que, pelas suas propriedades, se difundem pela circulação sanguínea.

Pelo contrário, o valor de actividade que foi encontrada ao nível dos gânglios linfáticos, está aparentemente, associado à actividade que foi eliminada do

espaço pulmonar. Também neste estudo, à semelhança do que se verificou após inalação de nsLp marcadas, foi visível um perfil de enchimento dos gânglios linfáticos (Figura 3-9), em função da eliminação no tempo, da actividade acumulada no compartimento pulmonar (Figura 3-8).

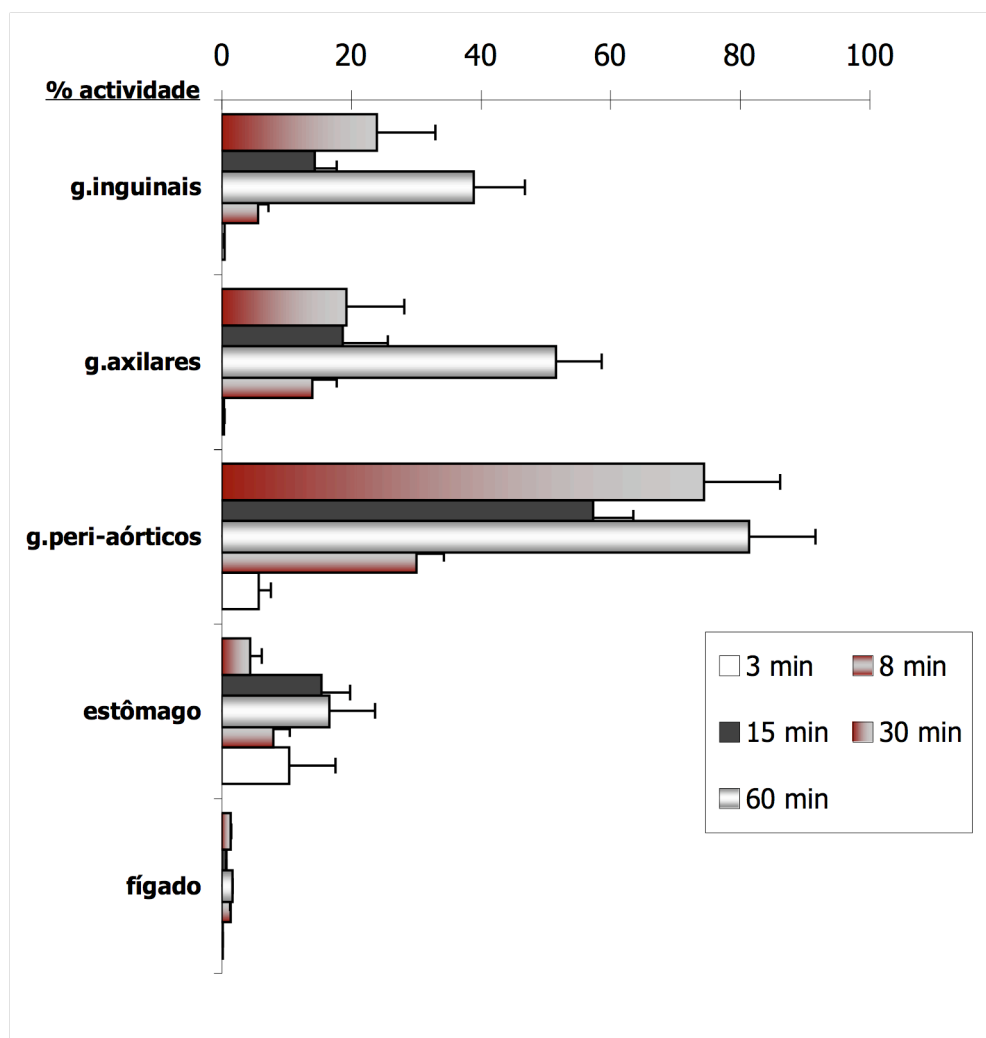


Figura 3-9: Distribuição de actividade por órgão, aos 3, 8, 15, 30 e 60 minutos após administração endotraqueal de $[^{99m}\text{Tc}]$ -HMPAO-nsLp. Após eliminação da região pulmonar, a actividade acumula-se ao nível dos gânglios linfáticos mediastínicos e peri-aórticos

A análise dos resultados indica que as partículas se mantêm no sistema linfático, como indicado não apenas pela acumulação de actividade na zona torácica e gânglios mediastínicos até aos 60 minutos, mas também pelos valores de actividade, determinados ao nível dos gânglios axilares e inguinais (Figura 3-9).

Deste modo, tudo indica que o comportamento do sistema transportador no espaço pulmonar é independente da via de administração pulmonar. Estes resultados sugerem que, para sistemas coloidais com aproximadamente 200nm de diâmetro médio, os fenómenos de deposição e transporte de partículas nas vias respiratórias podem não estar subordinados apenas às diferentes regiões do pulmão ou à velocidade do ar circulante. A tendência das nsLp em atingirem a região alveolar, evidencia a importância das suas propriedades, nomeadamente, o diâmetro médio e a carga de superfície.

3.5. Discussão

As propriedades de adsorção de sistemas de nanopartículas são há muito utilizadas para melhorar a eficiência de incorporação de moléculas. De facto, as propriedades de adsorção das nsLp foram confirmadas anteriormente, num estudo sobre incorporação de proteína, utilizando ovalbumina como molécula modelo (Videira *et al.* 2002a). Com base nesses estudos e tendo em conta as características lipófilas das partículas, seleccionou-se um radiofármaco lipófilo para incorporar nas nanopartículas, utilizando a técnica da adsorção por incubação. Obteve-se com este radiofármaco um elevado valor de eficiência de incorporação ($98\pm 1\%$), associado à ausência de impurezas radioquímicas. A variação no tempo, da percentagem de actividade atribuída ao radiofármaco incorporado, demonstra que a ligação que se estabelece é estável e que a amostra apresenta um nível de pureza radioquímica elevado, durante os primeiros 60 minutos. Estes resultados sugerem que a incorporação do radiofármaco nas nanopartículas tem um efeito protector da integridade do complexo, uma vez que este no seu estado livre, apresenta cerca de 50% de degradação nos primeiros 30 minutos. Aos 60 minutos após marcação, apenas 20% da amostra corresponde ao complexo lipófilo (Ceretek™; GE Healthcare Limited Amersham, UK) (Saha 2004b). Adicionalmente, observou-se uma diminuição da cinética de decomposição do radiofármaco incorporado, após incubação das [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp em albumina humana, o que pode ser atribuído a fenómenos de adsorção de proteínas à superfície das partículas, promovendo

de alguma maneira o aprisionamento do radiofármaco que aí se encontra (Borchard & Kreuter 1993; Videira *et al.* 1998).

Os resultados da avaliação do comportamento da ligação nsLp-radiofármaco, em plasma e soro, apresentam uma cinética distinta da observada nos casos anteriores (Figura 3-2). A taxa de decomposição das [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp é acentuada durante os primeiros 60 minutos, altura em que se inicia um período onde praticamente não se regista o aumento da presença de impurezas, o que indica a ausência de degradação do radiofármaco incorporado até aos 240 minutos. Os mecanismos de instabilidade, que promovem a decomposição do complexo até aos 60 minutos, podem estar relacionados com fenómenos de competição à superfície das partículas, sejam eles interacções entre o radiofármaco e as proteínas plasmáticas ou entre estas e as nanopartículas. A intensidade é no entanto variável o que sugere uma possível influência da concentração de opsoninas presentes nos diferentes meios. De facto, quando se utiliza soro (37°C), a taxa de decomposição é elevada (70%) e apenas 30% da actividade é atribuída ao [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp. Apesar de ser um valor relativamente baixo é, no entanto, superior ao descrito na literatura para o radiofármaco livre, de apenas 20% da actividade aos 60 minutos (Ivancevic *et al.* 1990; Nakamura *et al.* 1989). Pelo contrário, quando se procede à inactivação do complemento (plasma a 56°C) associada à ausência de cálcio no meio, essencial para activar as fracções C3 e C5, apenas se observa 25% de decomposição do complexo aos 60 minutos, seguindo-se um período de estabilidade. No caso em que não se procedeu à inactivação do complemento (plasma a 37°C), mas em que o cálcio foi retirado do meio, pode-se observar uma taxa de decomposição de 50%. A este período inicial segue-se uma fase onde a composição da mistura não sofre praticamente alteração, podendo este equilíbrio ser atribuído à adsorção a estruturas celulares plasmáticas, para as quais o radiofármaco apresenta afinidade elevada (Ceretec™; GE Healthcare Limited Amersham, UK), o que justifica que o grau de estabilidade induzido por este fenómeno seja superior ao observado quando se utiliza apenas uma solução de albumina.

A inalação de [^{99m}Tc]-HMPAO-nsLp originou uma concentração elevada de partículas no espaço pulmonar. As partículas atingiram a região central e

periférica e, como consequência, diferentes mecanismos de absorção de partículas podem ter sido activados.

As características do aerossol formado demonstram que a nebulização dos sistemas dispersos constituídos pelos lípidos em estudo foi eficaz e reprodutível. O padrão de deposição pulmonar e perfis de biodistribuição, resultantes da inalação dos aerossóis de nsLp de Compritol® 888 ATO e de Precirol ATO5®, demonstraram que a composição das nanopartículas não influencia o aerossol formado (Figura 3-5). Pelo contrário, a variação do valor do diâmetro aerodinâmico do aerossol, que se observou entre o valor teórico descrito para o nebulizador e o valor obtido na presença de nanopartículas, indica que estas determinam o diâmetro da gotícula do aerossol formado, possivelmente por se encontrarem incorporadas no seu interior, alterando as forças intermoleculares existentes à superfície da gotícula (Dailey *et al.* 2003).

A ausência de diferenças, relacionadas com a variação da composição das partículas, confirma a importância do *dm* da dispersão inicial e sugere que a área e os mecanismos de absorção/eliminação serão semelhantes.

Esta dependência já havia sido demonstrada utilizando partículas de poliestireno com 2,85µm. Langenback e colaboradores (1990) provaram que, após inalação, estas partículas não atingiram o interstício alveolar e que a drenagem mucociliar foi a via de eliminação utilizada. Em sentido contrário, a translocação de nanopartículas (<0,5 µm) e drenagem pelos gânglios linfáticos locais após deposição pulmonar, está descrita para vários tipos de materiais inalados (Harmsen *et al.* 1985; McIntire *et al.* 1998; Oberdorster *et al.* 2005). O mesmo se verifica em medicina nuclear, onde o uso de radiofármacos sob a forma de dispersões coloidais é frequente. Nesta técnica, a região visualizada após administração intravenosa está directamente relacionada com o *dm* da entidade dispersa. Partículas de dimensões micrométricas, aproximadamente 5µm, ficam retidas no pulmão, sendo por isso utilizadas para imagem pulmonar. Para partículas compreendidas entre 0,5 a 5µm, como os colóides de tecnécio (^{99m}Tc), os mecanismos de eliminação envolvem a fagocitose pelas células do MPS e são portanto adequadas para a obtenção de imagem do fígado, baço e medula óssea (Saha 2004b). Todavia, partículas com dimensões submicrométricas

($\leq 50\text{nm}$), como o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sulfureto de antimónio coloidal, são regularmente utilizadas para linfocintigrafias (Hung *et al.* 1995).

Adicionalmente, a extensa deposição de nsLp na zona alveolar, obtida por inalação e por administração endotraqueal, confirma que a difusão terá sido o principal mecanismo de deposição das nanopartículas, uma vez que, como demonstram os estudos de Oberdorster e colaboradores (2005), nesta região os mecanismos de sedimentação, impacto e intercepção, não contribuem para a deposição de partículas nanométricas (1-100nm) (Oberdorster *et al.* 2005). A associação do radiofármaco à matriz lipídica e o seu transporte *in vivo* foram confirmadas pela alteração do perfil de distribuição deste, que na sua forma livre apresenta uma clara afinidade para a circulação sanguínea, com acumulação a nível hepático e urinário (Figura 3-5). A ausência de actividade nestes órgãos, observada até aos 60 minutos pós-inalação nos animais tratados com as nanopartículas marcadas, sugere que a ligação às partículas altera o comportamento farmacocinético do radiofármaco. Este fenómeno era esperado, uma vez que a associação de fármacos a veículos coloidais, quando bem sucedida, altera o perfil de absorção, distribuição e eliminação dos mesmos (Moghimi *et al.* 2001).

Os dados obtidos durante a aquisição dinâmica, para os animais tratados com nanopartículas marcadas, demonstraram que existe uma fase de eliminação pulmonar rápida, em que cerca de 50% da actividade total inalada é eliminada aos 13,4 min. A esta fase inicial sucede-se um período onde a taxa de eliminação pulmonar das partículas inaladas vai diminuindo, restando no pulmão cerca de 25% da actividade total aos 120 minutos. Os pulmões dos animais sacrificados após 2h apresentam um valor de actividade por grama de tecido de $23,3 \pm 7.6\%$, o que confirma que parte da amostra inalada fica retida no espaço pulmonar. Esta fracção pode constituir um reservatório de fármaco no pulmão, promovendo um efeito de libertação controlada, o que pode ter interesse em algumas situações clínicas onde são necessários tratamentos prolongados, como é o caso de neoplasias, infecções crónicas, transplantes, asma, entre outros.

Os mecanismos de eliminação de partículas nanométricas inaladas foram elucidados por vários autores, tendo sido demonstrada a sua capacidade de penetrar no espaço intersticial alveolar e atingir, em seguida, o sistema

linfático pulmonar (Langenback *et al.* 1990; McIntire *et al.* 1998; Oberdorster *et al.* 2005; Valentine & Kennedy Jr 2001). Neste contexto, as características de hidrofobicidade e as dimensões submicrométricas apresentadas pelas nsLp são factores que fundamentam a possibilidade destas partículas atingirem o espaço alveolar e daí passarem para o interstício. As imagens obtidas durante a aquisição dinâmica confirmam que as nsLp atingem os alvéolos, de onde passam para o espaço intersticial, por mecanismos que podem envolver a extravasar passiva, a endocitose, ou a fagocitose por macrófagos (Lauweryns & Baert 1977; Oberdorster *et al.* 2005). O aumento de actividade nos gânglios linfáticos periaórticos, que acontece simultaneamente com o esvaziamento do pulmão, vem confirmar que a eliminação ocorre por via linfática a partir da região alveolar e, posteriormente, pelas vias de drenagem torácica no exterior do pulmão. De facto, observou-se nos primeiros minutos de aquisição dinâmica (7 ± 2 min) a presença quase imediata de actividade nos gânglios linfáticos regionais.

Como referido anteriormente, a fisiologia do espaço intersticial condiciona a eficácia da absorção linfática (Bargoni *et al.* 1998; Hawley *et al.* 1995). No interstício as partículas coloidais movimentam-se no sentido do microfluxo intersticial, de acordo com as pressões locais e os gradientes de concentração. A passagem ao sistema linfático pode ser feita por difusão passiva, acompanhando a entrada de líquido intersticial nos linfáticos justa-alveolares, ou por intermédio dos MA's, após fagocitose. No pulmão, devido à elevada área de espaço intersticial, as partículas inaladas não devem causar alterações nas características fisiológicas deste espaço, quer do gradiente de concentração quer do microfluxo, o que pressupõe que as nsLp são englobadas no processo normal de drenagem do líquido intersticial, o qual de acordo com o que está descrito, é favorável à passagem ao sistema linfático (Hawley *et al.* 1995; Nemmar *et al.* 2003; Oussoren & Storm 2001). A acumulação de actividade que se verifica nos gânglios linfáticos extrapulmonares até às 2h após inalação, sugere igualmente a possível intervenção dos MA's. Um mecanismo semelhante é estabelecido durante a eliminação de agentes tóxicos ou patogénicos, em que partículas inaladas são fagocitadas pelos MA's, os quais atravessam o epitélio bronco-alveolar, atingem os vasos linfáticos pulmonares e migram através destes para os

gânglios regionais, onde normalmente se comportam como células apresentadoras de antígenos (Brain & Valberg 1979; Crystal 1991a; Lauweryns & Baert 1977).

A difusão passiva e o transporte pelos MA's não serão no entanto os únicos mecanismos envolvidos. A distribuição extra-pulmonar, nomeadamente a visualização de gânglios mediastínicos, sugere que a drenagem transdiafragmática está também envolvida na eliminação das nsLp, possivelmente através do plexo linfático subpleural, justificando o aparecimento posterior de radioactividade nos gânglios inguinais (Liu *et al.* 2006)

Um outro mecanismo de eliminação que podemos considerar diz respeito às partículas que atravessam o epitélio alveolar, provavelmente através de vesículas de endocitose dos pneumócitos tipo II, atingindo os capilares sanguíneos que revestem extensamente a membrana basal dos alvéolos (Corry *et al.* 1984; Langenback *et al.* 1990). No entanto, a biodistribuição das nsLp parece ocorrer maioritariamente através do sistema linfático e não pela corrente sanguínea, o que é confirmado não só porque paralelamente ao esvaziamento do pulmão são visíveis gânglios extrapulmonares, mas também pelo facto de a actividade calculada para o sistema linfático ($16,7 \pm 3,0$ %) apresentar valores marcadamente diferentes dos encontrados no fígado e baço ($9,2 \pm 2,0$ %).

Outro facto interessante está relacionado com a reduzida actividade detectada no cérebro ($0,3 \pm 0,2$ %), apesar de o ^{99m}Tc -HMPAO ser um radiofármaco lipófilo com boa penetração na barreira hemato-encefálica (Nowotnik 1992). Aparentemente, a ligação com as partículas coloidais modificou as suas características, alterando a sua cinética de distribuição e, em consequência, a sua capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica.

Os valores de actividade detectada nos órgãos dos tractos urinário e gastrointestinal, 2h após o início da experiência ($18,0 \pm 9,2$ % na urina, $7,7 \pm 2,7$ % no intestino e $1,6 \pm 0,9$ % no estômago), podem estar relacionados com a formação do complexo secundário de HMPAO, na sua forma hidrofílica, ou com a presença de pertecnetato livre, ou podem, por outro lado, ser atribuídos à activação da drenagem mucociliar.

Os resultados obtidos por administração endo-traqueal corroboram as observações efectuadas utilizando partículas inaladas. A actividade observada nos pulmões após instilação endotraqueal, aproximadamente 94% da dose inicial aos três minutos, demonstra que as partículas se dispersaram por toda a região pulmonar, o que se confirma pela imagem da Figura 3-8, onde a região correspondente ao pulmão profundo exhibe níveis de actividade elevados. Os valores determinados nas amostras de pulmão colhidas nos animais sacrificados aos 8 e 15 minutos são indicadores de uma rápida eliminação pulmonar, representando cerca de metade ($43,7 \pm 4,7\%$) da dose administrada aos 15 minutos. Aos 30 minutos apenas 20% de actividade permanece na região pulmonar, o que é comparável com os resultados obtidos após inalação. À semelhança do que se verificou para as partículas inaladas, a distribuição de partículas instiladas apresenta maior afinidade para o sistema linfático quando comparado com a retenção ao nível dos órgãos do sistema MPS. Os valores de actividade que se observam aos 60 minutos são indicativos de um processo de acumulação, ao nível dos gânglios linfáticos, correspondendo a um fenómeno, ao que tudo indica, pode estar directamente relacionado com a drenagem do espaço intersticial pulmonar.

A presença de actividade no estômago com um perfil bastante irregular, determinada quer após administração pulmonar quer após instilação endotraqueal, está possivelmente relacionada com a actividade do transporte mucociliar (Cordeiro 1995b). Este mecanismo, seguido da deglutição da amostra, justifica a presença de radioactividade no estômago e, mais tarde, na urina e fezes, confirmando deste modo, que a via de eliminação mucociliar pode também ter sido activada pela presença de partículas no espaço pulmonar.

Aparentemente as nanopartículas administradas por instilação endotraqueal apresentam uma cinética de eliminação compatível com as vias de drenagem linfática, à semelhança do que havia sido observado com as nanopartículas inaladas. Estes resultados confirmam que as características das nsLp, nomeadamente dm e carga de superfície, podem ser as variáveis que determinam o perfil de biodistribuição, mesmo no caso da nebulização envolver fenómenos de deposição tráqueo-brônquica.

Este comportamento, intimamente ligado à composição lipídica das nsLp (O'Driscoll 2002), pode também ser atribuído à constituição das paredes dos vasos linfáticos, isto é, uma fina camada de células epiteliais, que em último caso é responsável pela diferença de permeabilidade entre o endotélio capilar e as membranas dos capilares linfáticos justa-alveolares (Lauweryns & Baert 1977). A existência de uma vasta rede de vasos linfáticos pulmonares, superficial e profunda, responsável pelo transporte de substâncias de elevado peso molecular e partículas insolúveis (Nishioka & Yoshino 2001) para os gânglios linfáticos mediastínicos, contribui para explicar a eliminação das nsLp para o espaço extra-pulmonar pela via linfática. A possibilidade de veicular fármacos para o sistema linfático pulmonar após instilação endotraqueal já tinha sido explorada por alguns autores (Corry *et al.* 1984), os quais observaram, após instilação endotraqueal de partículas coloidais em modelos animais, macrófagos com partículas internalizadas ao nível dos vasos linfáticos pulmonares e dos gânglios hilares (Corry *et al.* 1984).

Relativamente à terapêutica direccionada para o sistema linfático, no caso de ocorrer invasão dos gânglios linfáticos, os resultados obtidos demonstram a possibilidade de estender a funcionalidade das nsLp como agentes de diagnóstico para visualização do sistema ganglionar, o que seria igualmente relevante. Durante as últimas décadas, a utilização de vectores coloidais marcados, especialmente lipossomas, tem sido explorada como meio de diagnóstico em imageologia em oposição à utilização de macromoléculas (Caride *et al.* 1976; Illum *et al.* 2001; Matteucci & Thrall 2000; Oku *et al.* 1993). A visualização de células tumorais por retenção de lipossomas marcados com tecnécio foi apresentada como técnica cintigráfica de diagnóstico. Os autores salientaram o facto de a biodistribuição e eficácia destes lipossomas como agentes imageológicos estar dependente do *dm* e da sua composição (Goins *et al.* 1994; Kubo *et al.* 1993; Lopez-Berestein *et al.* 1984). Também Beth Goins e colaboradores (1996), utilizaram com bastante sucesso, lipossomas *stealth* para visualizar a perfusão sanguínea em contraposição os agentes tradicionalmente utilizados (Goins *et al.* 1996). Um sector alternativo de investigação, tendo em vista a utilização de lipossomas como agentes de imagiologia, está relacionado com as zonas de inflamação. Utilizando modelos de infecção localizada em animais, ficou demonstrado que

a administração de lipossomas *stealth* marcados com tecnécio permitiu, após acumulação destes nos focos inflamatórios, a sua detecção a partir de imagens de elevada qualidade (Goins *et al.* 1993; Laverman *et al.* 2001; Oyen *et al.* 1996). Actualmente numerosos agentes para linfocintigrafia estão a ser associados a veículos de administração direccionada, no entanto a sua utilização envolve a aplicação do agente no espaço intersticial próximo à zona a visualizar, o que normalmente representa uma administração por técnicas invasivas (O'Mahony *et al.* 2004).

As nsLp marcadas surgem como uma possível alternativa a estes agentes, especialmente num contexto de administração pulmonar, dada a eficácia do processo de marcação e a capacidade respirável do aerossol formado. Nesta via de administração, a área atingida em termos de espaço intersticial é considerável, a rede linfática pulmonar é abundante e a presença de partículas coloidais não promove desequilíbrios na pressão fisiológica, ao contrário do que sucede por exemplo na administração subcutânea de partículas coloidais (Oussoren & Storm 2001).

3.6. Bibliografia

- Adjei AL, Gupta PK. 1997. *Inhalation Delivery Of Therapeutics Peptids And Proteins*. New York: Marcel Dekker
- Agu RU, Ugwoke MI, Armand M, Kinget R, Verbeke N. 2001. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respir Res* 2:198-209
- Ally J, Martin B, Khamesee MB, Roa W, Amirfazli A. 2005. Magnetic Targeting Of Aerosol Particles For Cancer Therapy. *J Magn Magn Mater* 293:442-9
- Alonso MJ. 2004. Nanomedicines for overcoming biological barriers. . *Biomedicine & Pharmacotherapy*: 168-72
- Aulton M, Collett DM. 2002. *Pharmaceutics: The Science Of Dosage Form Design*. Edinburgh: Churchill Livingstone
- Bargoni A, Cavalli R, Caputo O, Fundaro A, Gasco MR, Zara GP. 1998. Solid lipid nanoparticles in lymph and plasma after duodenal administration to rats. *Pharm Res* 15:745-50
- Barker SA, Taylor KMG, Short MD. 1994. The deposition and clearance of liposome entrapped ^{99m}Tc-DTPA in the human respiratory tract. *Int J Pharm* 102:159-65
- Borchard G, Kreuter J. 1993. Interaction of serum components with poly(methylmethacrylate) nanoparticles and the resulting body distribution after intravenous injection in rats. *J Drug Target* 1:15-9
- Botelho MF, Gomes CM, Marques MA, Lima JJP, Baganha MF. 1999. Drenagem linfática pulmonar. Estudo experimental. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 518
- Brain JD, Valberg PA. 1979. Deposition of aerosol in the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 120:1325-73
- Caride VJ, Taylor W, Cramer JA, Gottschalk A. 1976. Evaluation of liposome-entrapped radioactive tracers as scanning agents. Part 1: Organ distribution of liposome (^{99m}Tc-DTPA) in mice. *J Nucl Med* 17:1067-72
- Cheung DO, Halsey K, Speert DP. 2000. Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 68:4585-92
- Colonna P, Rain JD, Pecking A, Briere J, Najean Y. 1978. Double medular scintigraphy using ^{99m}Tc-colloids and ¹¹¹In-transferrin in myeloid splenomegaly. *Nouv Rev Fr Hematol* 20:455-64
- Cordeiro AJAR. 1995a. *Pneumologia Fundamental* Fundação Calouste Gulbenkian
- Cordeiro AJSR. 1995b. *Pneumologia Fundamental*. Lisbon: Fundação Calouste Gulbenkian
- Corry D, Kulkarni P, Lipscomb MF. 1984. The migration of bronchoalveolar macrophages into hilar lymph nodes. *Am J Pathol* 115:321-8
- Crystal RG. 1991a. Alveolar macrophages. In *The Lung: Scientific Foundations*, ed. RG Crystal, JB West, NS Cherniack, ER Weibel, pp. 527-38. New York: Raven Press
- Crystal RG. 1991b. *The Lung: Scientific Foundations*. New York: Raven Press
- Dailey LA, Schmehl T, Gessler T, Wittmar M, Grimminger F, et al. 2003. Nebulization of biodegradable nanoparticles: impact of nebulizer technology and nanoparticle characteristics on aerosol features. *J Control Release* 86:131-44
- Geiser M, Matter M, Maye I, Im Hof V, Gehr P, Schurch S. 2003. Influence of airspace geometry and surfactant on the retention of man-made vitreous fibers (MMVF 10a). *Environ Health Perspect* 111:895-901
- Goins B, Klipper R, Rudolph AS, Cliff RO, Blumhardt R, Phillips WT. 1993. Biodistribution and imaging studies of technetium-^{99m}-labeled liposomes in rats with focal infection. *J Nucl Med* 34:2160-8

- Goins B, Klipper R, Rudolph AS, Phillips WT. 1994. Use of technetium-99m-liposomes in tumor imaging. *J Nucl Med* 35:1491-8
- Goins B, Phillips WT, Klipper R. 1996. Blood-pool imaging using technetium-99m-labeled liposomes. *J Nucl Med* 37:1374-9
- Gopalan B, Ito I, Branch CD, Stephens C, Roth JA, Ramesh R. 2004 Nanoparticles based systemic gene therapy for lung câncer: molecular mechanisms and mechanisms and strategies to suppress nanoparticle mediated inflammatory response. . *Technol. Câncer Res. Treat.*: 647-57
- Hanatani K, Takada K, Yoshida N, Nakasuji M, Morishita Y, et al. 1995. Molecular weight-dependent lymphatic transfer of fluorescein isothiocyanate-labeled dextrans after intrapulmonary administration and effects of various absorption enhancers on the lymphatic transfer of drugs in rats. *J Drug Target* 3:263-71
- Harmesen AG, Muggenburg BA, Snipes MB, Bice DE. 1985. The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science* 230:1277-80
- Hawley AE, Davis SS, Illum L. 1995. Targeting of colloids to lymph nodes: influence of lymphatic physiology and colloidal characteristics. *Adv Drug Deliv Rev* 17:129-48
- Hillery A, Lloyd AW, Swarbrick J. 2001. *Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. London: Taylor & Francis
- Hung JC, Wiseman GA, Wahner HW, Mullan BP, Taggart TR, Dunn WL. 1995. Filtered technetium-99m-sulfur colloid evaluated for lymphoscintigraphy. *J Nucl Med* 36:1895-901
- Illum L, Church AE, Butterworth MD, Arien A, Whetstone J, Davis SS. 2001. Development of systems for targeting the regional lymph nodes for diagnostic imaging: in vivo behaviour of colloidal PEG-coated magnetite nanospheres in the rat following interstitial administration. *Pharm Res* 18:640-5
- Inoue T, Shigeta M, Mochizuki H, Shimizu T, Morikawa A, et al. 1995. Effect of inhaled furosemide on lung clearance of technetium-99m-DTPA. *J Nucl Med* 36:73-7
- Ishii H, Hayashi S, Hogg JC, Fujii T, Goto Y, et al. 2005. Alveolar macrophage-epithelial cell interaction following exposure to atmospheric particles induces the release of mediators involved in monocyte mobilization and recruitment. *Respir Res* 6:87
- Ivancevic V, Dodig D, Livakovic M, Hancevic J, Ivancevic D. 1990. Comparison of three-phase bone scan, three-phase 99m-Tc-HM-PAO leukocyte scan and 67-gallium scan in chronic bone infection. *Prog Clin Biol Res* 355:189-98
- Juliano RL, McCullough HN. 1980. Controlled delivery of an antitumor drug: localized action of liposome encapsulated cytosine arabinoside administered via the respiratory system. *J Pharmacol Exp Ther* 214:381-7
- Khanna C, Waldrep JC, Anderson PM, Weichelbaum RW, Hasz DE, et al. 1997. Nebulized interleukin 2 liposomes: aerosol characteristics and biodistribution. *J Pharm Pharmacol* 49:960-71
- Koshkina NV, Kleinerman ES. 2005. Aerosol Therapy For Malignancy Involving The Lungs. *Int J Cancer* 116:458-63
- Koshkina NV, Kleinerman ES, Waldrep C, Jia S, Worth LL, et al. 2000. 9-Nitrocamptothecin Liposome aerosol Treatment of Melanoma and Osteosarcoma Lung metástases in Mice. *Clinical Cancer Research* 6:2876-80
- Koshkina NV, Waldrep JC, Knight V. 2003. Camptothecins and Lung Cancer: Improved Delivery Systems by Aerosol. *Curr Cancer Drug Targets* 3:251-364
- Kubo A, Nakamura K, Sammiya T, Katayama M, Hashimoto T, et al. 1993. Indium-111-labelled liposomes: dosimetry and tumour detection in patients with cancer. *Eur J Nucl Med* 20:107-13
- Labiris NR, Dolovich MB. 2003 Physiological factors affecting effectiveness of inhaled drugs. . *Br J Clin Pharmacol*:588-99.

- Langenback EG, Bergofsky EH, Halpern JG, Foster WM. 1990. Supramicron-sized particle clearance from alveoli: route and kinetics. *J Appl Physiol* 69:1302-8
- Lauweryns JM, Baert JH. 1977. Alveolar clearance and the role of the pulmonary lymphatics. *American Review of Respiratory disease* 115:625-6883
- Laverman P, Dams ET, Storm G, Hafmans TG, Croes HJ, et al. 2001. Microscopic localization of PEG-liposomes in a rat model of focal infection. *J Control Release* 75:347-55
- Lehnert BE, Valdez YE, Stewart CC. 1986. Translocation of particles to the tracheobronchial lymph nodes after lung deposition: kinetics and particle-cell relationships. *Exp Lung Res* 10:245-66
- Liu J, Gong T, Fu H, Wang C, Wang X, et al. 2008. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *Int J Pharm*
- Liu J, Wong HL, Moselhy J, Bowen B, Wu XY, Johnston MR. 2006. Targeting colloidal particles to thoracic lymph nodes. *Lung Câncer* 51:377-86
- Lopez-Berestein G, Kasi L, Rosenblum MG, Haynie T, Jahns M, et al. 1984. Clinical pharmacology of 99mTc-labeled liposomes in patients with cancer. *Cancer Res* 44:375-8
- Matteucci ML, Thrall DE. 2000. The role of liposomes in drug delivery and diagnostic imaging: a review. *Vet Radiol Ultrasound* 41:100-7
- McDougall IR, Dunnick JK, Goris ML, Kriss JP. 1975. In vivo distribution of vesicles loaded with radiopharmaceuticals: a study of different routes of administration. *J Nucl Med* 16:488-91
- McIntire GL, Bacon ER, Toner JL, Cornacoff JB, Losco PE, et al. 1998. Pulmonary delivery of nanoparticles of insoluble, iodinated CT X-ray contrast agents to lung draining lymph nodes in dogs. *J Pharm Sci* 87:1466-70
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 53:283-318
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. 2005. Nanomedicine: current Status and future prospects. *Faseb J*:311-30
- Morgan L, Pearson M, de Iongh R, Mackey D, van der Wall H, et al. 2004. Scintigraphic measurement of tracheal mucus velocity in vivo. *Eur Respir J* 23:518-22
- Nakamura K, Tukatani Y, Kubo A, Hashimoto S, Terayama Y, et al. 1989. The behavior of 99mTc-hexamethylpropyleneamineoxime (99mTc-HMPAO) in blood and brain. *Eur J Nucl Med* 15:100-7
- Neirinckx RD, Canning LR, Piper IM, Nowotnik DP, Pickett RD, et al. 1987. Technetium-99m d,l-HM-PAO: a new radiopharmaceutical for SPECT imaging of regional cerebral blood perfusion. *J Nucl Med* 28:191-202
- Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Vermeylen J, Nemery B. 2003. Size effect of intratracheally instilled particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 186:38-45
- Newman S, Wilding I, Hirst PH. 2000. Human lung deposition data: the bridge between in vitro and clinical evaluations for inhaled drug products? *Int J Pharm* 208:49-60
- Newman SP. 2001. Lung distribution of inhaled drugs. *Br J Clin Pharmacol* 52:716-9
- Newman SP, Hirst PH, Wilding IR. 2003. New developments in radionuclide imaging for assessing drug delivery in man. *Eur J Pharm Sci* 18:19-22
- Nishioka Y, Yoshino H. 2001. Lymphatic targeting with nanoparticulate system. *Adv Drug Deliv Rev* 47:55-64
- Niven RW. 1995. Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosol. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 12:151-231
- Nowotnik DP. 1992. Technetium-based brain perfusion agents. In *Radiopharmaceuticals: Chemistry and Pharmacology*, ed. AD Nunn, pp. 37-95. New York: Marcel Dekker, Inc.

- O'Mahony S, Rose SL, Chilvers AJ, Ballinger JR, Solanki CK, et al. 2004. Finding an optimal method for imaging lymphatic vessels of the upper limb. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31:555-63
- O'Driscoll CM. 2002. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *Eur J Pharm Sci* 15:405-15
- Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823-39
- Oku N, Namba Y, Takeda A, Okada S. 1993. Tumor imaging with technetium-99m-DTPA encapsulated in RES-avoiding liposomes. *Nucl Med Biol* 20:407-12
- Oussoren C, Storm G. 2001. Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Adv Drug Deliv Rev* 50:143-56
- Owens D, Peppas N. 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 307:93-102
- Oyen WJ, Boerman OC, Storm G, van Bloois L, Koenders EB, et al. 1996. Detecting infection and inflammation with technetium-99m-labeled Stealth liposomes. *J Nucl Med* 37:1392-7
- Pandey R, Khuller GK. 2005 Solid Lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis. *Tuberculosis*:227-34
- Pison U, Welte T, Giersig M, Groneberg DA. 2006. Nanomedicine for respiratory diseases. *Eur J Pharmacol* 533:341-50
- Poyner EA, Alpar HO, Almeida AJ, Gamble MD, Brocon MRW. 1995. A comparative study on the pulmonary delivery of tobramycin encapsulated into liposomes and PLA microspheres following intravenous and endotracheal delivery. *J Control Release* 31:41-8
- Rao RD, Markovic SN, Anderson PM. 2003. Aerosol therapy for malignancy involving the lungs. *Curr Cancer Drug Targets* 3:239-50
- Renwick LC, Donaldson K, Clouter A. 2001. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 172:119-27
- Saha G. 2004a. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. New York: Springer-Verlag New York Inc.
- Saha GB. 2004b. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy* New York: Springer Science
- Scieszka JF, Cho MJ. 1988. Cellular uptake of a fluid-phase marker by human neutrophils from solutions and liposomes. *Pharm Res* 5:352-8
- Scieszka JF, Maggiora LL, Wright SD, Cho MJ. 1991. Role of complements C3 and C5 in the phagocytosis of liposomes by human neutrophils. *Pharm Res* 8:65-9
- Sebti T, Amighi K. 2006. Preparation and in vitro evaluation of lipidic carriers and fillers for inhalation. *Eur J Pharm Biopharm* 63:51-8
- Shapiro SD. 1999. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 160:S29-32
- Sharp PF, Smith FW, Gemmell HG, Lyall D, Evans NT, et al. 1986. Technetium-99m HM-PAO stereoisomers as potential agents for imaging regional cerebral blood flow: human volunteer studies. *J Nucl Med* 27:171-7
- Strand SE, Larsson I. 1978. Image artifacts at high photon fluence rates in single-crystal NaI(Tl) scintillation cameras. *J Nucl Med* 19:407-13
- Teran M, Savio E, Paolino A, Frier M. 2004. Usage of radiopharmaceuticals in the development of pharmaceutical drug delivery systems: validation of [99mTc]DTPA and [99mTc]ECD. *Eur J Pharm Biopharm* 57:347-52
- Torchilin VP. 2005. Recent Advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.*:145-60.
- Torchilin VP. 2007 Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal* 9 p.E12

- Valentine R, Kennedy Jr GL. 2001. Inhalation Toxicology. In *Principles and Methods of Toxicology*, ed. AW Hayes, pp. 1085-143. Philadelphia: Taylor and Francis
- Videira M, Azevedo AF, Almeida AJ. 1998. Entrapment of a high molecular weight protein into solid lipid nanoparticles (SLN). *II World Meeting APGI/APV*, pp. 629-30. Paris
- Videira M, Florindo H, Almeida AJ. 2002a. Preparation of solid lipid nanoparticles (SLN): a potential protein delivery system, . In *V Spanish-Portuguese Conf. Control. Drug Deliv.* , pp. 69-70. Seville
- Videira MA, Botelho MF, Santos AC, Gouveia LF, de Lima JJ, Almeida AJ. 2002b. Lymphatic uptake of pulmonary delivered radiolabelled solid lipid nanoparticles. *J Drug Target* 10:607-13
- Videira MA, Gano L, Santos C, Neves M, Almeida AJ. 2006. Lymphatic uptake of lipid nanoparticles following endotracheal administration. *J Microencapsul* 23:855-62
- Wilding I, Newman S. 1998. Saving Time In The Drug Development Process Using Gamma Scintigraphy. In *Pharmaceutical Profiles in Pharmaceutical Technology*. Europe
- Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. 2007. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 83:761-9

CAPÍTULO 4

PREPARAÇÃO DE UM SISTEMA NSLP - PTX

4.1. Introdução

4.1.1. Vectores Coloidais

Os sistemas transportadores assumem uma enorme importância na área dos novos sistemas terapêuticos, sobretudo quando há necessidade de levar o fármaco o mais próximo possível do órgão ou tecido alvo, preservando a sua actividade e tornando-o disponível em dose terapêutica.

O desenvolvimento e avaliação de vectores coloidais, constituídos por partículas submicrométricas e biodegradáveis, com capacidade de incorporar fármacos no seu interior, adsorvidos à superfície da partícula, ou ainda aprisionados na matriz do vector, tem sido amplamente proposto por vários autores como uma estratégia para encontrar formulações inovadoras de agentes antineoplásicos (Kim *et al.* 2004; Kuppens 2006; Singla *et al.* 2002). Pretende-se com esta abordagem, não só seleccionar o local onde o fármaco deve permanecer na forma livre para exercer a sua actividade, mas também, obter através do transportador um efeito de libertação controlada, promovendo o aumento do tempo de exposição das células neoplásicas ao fármaco. Subsequente a esta estratégia está também o objectivo de maximizar a eficiência terapêutica ao fazer depender a biodistribuição do fármaco das características físico-químicas do transportador e não apenas

das propriedades da molécula farmacologicamente activa (Kawasaki & Player 2005; Moghimi *et al.* 2005).

As moléculas lipofílicas exigem, ao conceber a sua formulação, formas farmacêuticas mais complexas que obrigam ao desenvolvimento de ideias e conceitos alternativos no âmbito dos quais se inserem os sistemas transportadores de fármacos. Nos últimos anos a incorporação de Ptx, uma molécula fortemente lipofílica, em sistemas transportadores tem sido objecto de intenso estudo no sentido de minimizar os seus efeitos secundários. Diversas formulações foram propostas nas últimas décadas como sistemas transportadores de Ptx de forma a encontrar formulações alternativas ao Taxol[®], (Adriance-Mejia *et al.* 2002; Dhanikula & Panchagnula 2005b; Nuijen *et al.* 2001; Singla *et al.* 2002). O objectivo principal é o de suprimir a utilização do veículo constituído pela mistura de Cremophor[™] e etanol. Na verdade, prevê-se que a ausência de Cremophor EL[™], contribua para que a maioria destes sistemas apresente menor toxicidade, quando comparados com a formulação comercial (Taxol[®]).

De uma maneira geral, os sistemas desenvolvidos, apresentam-se como sistemas bifásicos, com a forma molecular de Ptx dispersa numa das fases, mantendo com esta, interacções fracas do tipo Van der Waals (Adriance-Mejia *et al.* 2002).

Não obstante a aplicação deste conceito ser inovador, a veiculação de fármacos tem como base sistemas vulgarmente utilizados em tecnologia farmacêutica, tais como, emulsões, lipossomas, dispersões micelares, ciclodextrinas, partículas poliméricas ou lipídicas. Assim a eficácia e estabilidade do complexo de Ptx está subordinada às características do sistema que lhe serve de suporte.

Entre os parâmetros que permitem estabelecer a competência de um transportador encontram-se a capacidade de carga e eficiência de incorporação, a estabilidade do sistema ao longo do tempo, a capacidade de vectorização, a velocidade de difusão do fármaco, a toxicidade do excipiente e a actividade farmacológica frente a linhas celulares.

Os primeiros trabalhos de desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármacos para incorporação e administração de Ptx, debruçaram-se sobre transportadores lipofílicos. Entre estes assumem particular relevância as

emulsões, os sistemas micelares e os SEDDS ou SMEDDS, por apresentarem elevada capacidade de incorporação de Ptx e estabilidade ao longo do tempo (Alkan-Onyuksel *et al.* 1994). Todavia, estes sistemas são rapidamente eliminados pelo organismo, sem que o fármaco exerça a sua actividade terapêutica, o que se traduz em baixos tempos semi-vida biológica.

De forma a ultrapassar este inconveniente, Kang e colaboradores (2004) produziram SMEDDS com um perfil de libertação controlada (144 horas), utilizando PLGA e Ptx. Obtiveram com este sistema resultados promissores *in vitro*, em ensaios com linhas celulares de carcinoma da mama (MCF7) e também *in vivo*, tendo estas partículas demonstrado actividade antineoplásica relativa ao carcinoma humano do ovário (SKOV-3) (Kang *et al.* 2004). Estes sistemas micelares poliméricos conjugados com Ptx, foram introduzidos por Zhang e colaboradores (1996) (Zhang *et al.* 1997; Zhang *et al.* 1996; Zhang 1996), tendo este grupo alcançado excelentes resultados no que respeita à solubilização do Ptx, embora nos estudos em animais os resultados atingidos inicialmente não tenham superado os obtidos com o medicamento de referência (Zhang *et al.* 1997). No entanto, estes sistemas têm sido destacados devido a características tais como, a elevada taxa de incorporação de fármaco, associada ao facto de os sistemas preparados apresentarem uma boa estabilidade ao longo do tempo e forte retenção do fármaco no interior das micelas. Estas condições permitiram aumentar a dose de Ptx administrada sem que se verificassem efeitos secundários, o que aparentemente originou um bom comportamento *in vivo* (Huh *et al.* 2005; Li *et al.* 2007; Liggins & Burt H 2002; Menger *et al.* 2007; Wang *et al.* 2005).

Os lipossomas constituíram outra abordagem pioneira. No entanto, muito embora nos primeiros sistemas desenvolvidos o Ptx mantivesse a sua actividade farmacológica, a estabilidade destes lipossomas revelou-se extremamente reduzida, variando entre 24h a 3 semanas (Bartoli *et al.* 1990). Sharma e colaboradores (1994) exploraram a possibilidade de diminuir a toxicidade e modificar a biodistribuição do Taxol[®] através da incorporação de Ptx em lipossomas convencionais. No entanto, revelaram uma vez mais, estabilidade limitada e fraca capacidade de retenção do fármaco, o qual uma vez fora da matriz, cristaliza rapidamente (Dhanikula & Panchagnula 2005a; Sharma & Straubinger 1994; Sharma *et al.* 1997).

Adicionalmente, os resultados *in vitro* não se mostraram promissores, principalmente quando comparados com os obtidos com o fármaco livre. Posteriormente, estudos de fase I mostraram que, muito embora se verifique uma diminuição da toxicidade associada ao fármaco, estes lipossomas não só não aumentam a eficácia terapêutica como são rapidamente captados pelo sistema MPS (Treat *et al.* 2001). Um modelo mais complexo, proposto por Crosasso e colaboradores (2000), inclui lipossomas peguizados, o que conduziu a um aumento do tempo de circulação dos lipossomas e diminuição da captação pelos órgãos do sistema MPS, comparativamente aos lipossomas convencionais, (Crosasso *et al.* 2000; Yang *et al.* 2007). Uma eficiência de encapsulação reduzida (0,5mg/ml) e uma estabilidade limitada ao tempo de 7 dias, tornaram estes veículos pouco adequados, embora a actividade *in vitro*, cerca de 100 vezes superior à actividade apresentada pelos lipossomas convencionais, seja relevante (Crosasso *et al.* 2000). Posteriormente a encapsulação de Ptx em lipossomas catiónicos, com o objectivo de direccionar o fármaco para a vascularização num modelo de tumor de endotélio, resultou *in vivo* numa diminuição aparente no crescimento do tumor e num atraso no aparecimento de metástases. Estes resultados que se justificam pela afinidade entre os lipossomas catiónicos e as células do endotélio vascular do tumor, podem ser encarados como uma forma de veiculação direccionada (Strieth *et al.* 2004). A substituição de fosfolípidos por lisolípidos, no desenvolvimento de lipossomas, foi investigada de forma a melhorar a estabilidade, a eficiência de encapsulação e a capacidade de reter o fármaco no interior dos lipossomas (Fuller & Rand 2001). A utilização destes lípidos permitiu aumentar a estabilidade e a retenção de Ptx, contudo a estes compostos está associada alguma toxicidade (Sarpal & Needham 1998; Straubinger & Balasubramanian 2005).

Muito embora a optimização de parâmetros relativos à composição tenda a melhorar os aspectos relativos à estabilidade do sistema lipossomal como suporte de Ptx, a implementação destes sistemas na prática clínica pode estar a ser limitada por factores relacionados com os custos que envolvem a produção industrial, geralmente associados à especificidade do processo (Straubinger & Balasubramanian 2005).

A utilização de polímeros, como base de nano ou micropartículas, micelas ou conjugados com fármacos, tem sido amplamente analisada. No caso das partículas poliméricas foi já publicado um número considerável de estudos, que abrange uma enorme variedade de polímeros como referido no Capítulo 1. Amplamente avaliadas, como forma de incorporar o Ptx, foram as nanopartículas compostas por poli(α -hidroxiácidos), ácido poliláctico (PLA) e ácido poli(D,L-lactico-co-glicólico) (PLGA), às quais está associada sobretudo uma estabilidade elevada (Dong & Feng 2004; Fonseca *et al.* 2002; Kang *et al.* 2004; Mu & Feng 2001; 2003; Ruan & Feng 2003). Nesta matéria, foram testadas diferentes tecnologias de preparação e diversos agentes emulsivos, com vista à obtenção de um sistema transportador mais eficaz. Muito embora as eficiências de encapsulação atingidas e o grau de estabilidade obtido, levassem a considerar estes sistemas como os mais eficazes na incorporação de Ptx, também aqui importa considerar alguns inconvenientes. O principal diz respeito à terapêutica intracelular, que pode estar dificultada, não apenas no que respeita à entrada na célula, mas sobretudo no que diz respeito à difusão do fármaco pela matriz durante o transporte intracelular (Jones *et al.* 2003; Vasir & Labhassetwar 2007).

Também a biocompatibilidade dos polímeros empregues e a toxicidade associada aos solventes orgânicos utilizados no processo, levanta algumas dúvidas quanto à utilização destes sistemas (Jianga *et al.* 2005).

A formação de complexos com ciclodextrinas (CyD), tendo em vista principalmente a alteração da solubilidade da molécula, foi igualmente avaliada. Os resultados em termos de aumento da solubilidade em sistemas aquosos são prometedores, dado que a solubilidade do Ptx aumentou quase 950 vezes. No entanto, o complexo CyD-Ptx só é estável enquanto se encontra no estado sólido, apresentando instabilidade após diluição em água que se traduz pela precipitação do Ptx (Bilensoy *et al.* 2008; Sharma *et al.* 1995). O comportamento *in vitro* demonstrou ainda que, embora a actividade citotóxica do Ptx sofresse alteração após formação do complexo, a concentração necessária de CyD para administrar a dose efectiva de fármaco, era por si só responsável por alguma toxicidade (Sharma *et al.* 1995).

Os trabalhos descritos, abrem caminho para o desenvolvimento racional de um sistema transportador de Ptx, incluindo a escolha de excipientes e o

processo de preparação. Este último, por técnicas que podem ir desde a complexação, a dissolução em solventes orgânicos até à modificação química. Na maioria dos casos, as principais dificuldades que limitam a aplicação generalizada dos sistemas desenvolvidos, estão relacionadas com a concentração de Ptx incorporada nas preparações, com a estabilidade dos sistemas desenvolvidos ou com o tempo de semi-vida destes.

Todavia, apesar da escassez de alternativas à formulação actualmente em utilização clínica, foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) em 2005 um complexo de Paclitaxel com albumina para utilização clínica (Damascelli *et al.* 2001; Green *et al.* 2006; Moreno-Aspitia & Perez 2005). Trata-se de uma suspensão para administração intravenosa, comercializada com o nome de Abraxane™ (ABRAXIS, Oncology, USA), aprovada e comercializada nos Estados Unidos da América e Canadá desde 2005. O sistema é constituído por um conjugado de paclitaxel com albumina humana, com indicação para a terapêutica de segunda linha, no carcinoma da mama avançado ou em recidiva. Muito embora apresente vantagens quando comparada com a formulação de Taxol®, nomeadamente uma velocidade de eliminação mais rápida e um volume de distribuição elevado, a dose de abraxane™ indicada, é em média superior, 260 mg/m² contra 175 mg/m² (Ibrahim *et al.* 2002). A este aspecto, convém acrescentar o facto da albumina de origem humana poder actuar como veículo de infecções virais (Dosio *et al.* 1997; Ibrahim *et al.* 2002; Lovich *et al.* 2001).

O recurso a partículas lipídicas sólidas como veículo de agentes antineoplásicos tem sido pouco explorado (Cavalli *et al.* 2000; Miglietta *et al.* 2000), quando comparado por exemplo com a encapsulação em transportadores poliméricos, como demonstram o número de publicações nos últimos anos referidas no Capítulo 1.

A possibilidade de incorporar moléculas de Ptx nas nanopartículas lipídicas desenvolvidas (nsLp), é estudada e discutida neste capítulo. Pretendeu-se, com este trabalho, obter um sistema transportador de Ptx estável, com capacidade de incorporação do fármaco comparável aos sistemas lipídicos mas com capacidade de o reter na sua estrutura semelhante aos sistemas poliméricos e que apresente ainda selectividade para células neoplásicas.

Este estudo descreve também o desenvolvimento de um método de produção de nanopartículas lipídicas com Ptx incorporado na sua estrutura, baseado na técnica de emulsificação/solidificação. A preparação envolve a dispersão do fármaco na fase lipídica e posterior incorporação, através de interações físicas, no seio da rede que forma a estrutura sólida da partícula. Lípidos sólidos formados por misturas diferentes de tri, di e mono acilglicerídeos de cadeia hidrocarbonada mais ou menos longa, compõem estes transportadores os quais se comportam como um depósito de fármaco após produção e durante a veiculação.

A caracterização físico-química e a avaliação da estabilidade da ligação Ptx-nanopartículas foram objecto de estudo, bem com a eficiência do processo em termos de quantidade de Ptx incorporado. Este estudo envolveu o desenvolvimento de um método analítico para quantificar o Ptx ligado às nanopartículas lipídicas.

Relativamente a outros métodos de incorporação descritos, a técnica de emulsificação/solidificação aplicada à produção de nsLp's com Ptx incorporado, na realidade um sistema óleo em água, apresenta-se como uma tecnologia simples a qual pode ser sujeita a aumento de escala de forma simples.

4.2. Materiais

Os lípidos Compritol® 888 ATO (behenato de acilglicerilo-71,5°C) e Precirol ATO5® (palmitoestearato de glicerol-64,0°C) foram oferecidos gentilmente pela Gattefossé (França). Witepsol E85 (43,0°C) Geleol® (monoestearato de acilglicerilo 54,5 a 58,5°C) e Imwitor 900 (monoestearato de acilglicerilo, 56 a 61°C) foram obtidos através da Hüls (Espanha) (Tabela 4-1).

O tensoactivo Tween 80 (polissorbato 80) foi adquirido à Sigma Chemical Company (Espanha). O Ptx (99%) usado nos ensaios de solubilidade e na preparação das soluções-padrão foi adquirido à Indena (Milão, Itália).

Os solventes, etanol e acetonitrilo, foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha). Nas diluições de nsLp-Ptx e na preparação de fase móvel utilizou-se água desionizada (sistema Milli-Q, Millipore; $18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) e filtrada por filtro com um poro de $0,22\mu\text{m}$ (Millipore).

Os reagentes utilizados para a preparação de soluções são de grau de pureza *p.a.* ou equivalente como descrito na FP 8.

4.3. Métodos

4.3.1. Avaliação da solubilidade do PTX em diferentes lípidos

Geralmente, o desenvolvimento de vectores coloidais pressupõe a existência de interacção entre a matriz do vector e a molécula do fármaco. Uma vez que os dados existentes na literatura, acerca do comportamento do Ptx em soluções lipídicas são escassos, procedeu-se ao estudo preliminar de solubilidade com o objectivo de seleccionar o lípido ou mistura de lípidos que for mais adequado a servir de estrutura base na preparação das nanopartículas com Ptx incorporado.

O Ptx é insolúvel em água (<0,7µg/ml) (Liggins *et al.* 1997) e pouco solúvel em solventes aquosos (3,0µg/ml em PBS) (Lovich *et al.* 2001). É no entanto solúvel em álcoois e solventes orgânicos (The Merck Index 1989).

A avaliação qualitativa da solubilidade do Ptx em diferentes lípidos foi levada a cabo com (i) Ptx puro e (ii) solução alcoólica de Ptx (SAP) utilizando o etanol como co-solvente.

De forma a seleccionar os lípidos para os quais o Ptx exibisse maior afinidade, utilizaram-se lípidos constituídos por misturas de mono, di e triacilgliceróis. A escolha do lípido foi feita com base na respectiva polaridade e ponto de fusão, de modo a abranger uma gama de temperaturas de 45°C a 75°C.

Tabela 4-1. Lípidos utilizados nos estudos de solubilidade de Ptx e respectivos valores de ponto de fusão.

Ponto de fusão (°C) dos lípidos sólidos	
Compritol® 888 ATO	71,5
Imwitor 900	56,0 - 61,0
Precirol ATO5®	64,0
Geleol	54,5 - 58,5
Witepsol E85	43,0

Quantidades crescentes, respectivamente de 3, 6 e 8g de cada lípido ou mistura de lípidos, foram adicionadas a 7,5 mg de Ptx sólido. Procedeu-se ao

aquecimento da mistura com agitação suave até fusão do lípido. À semelhança das condições descritas no capítulo 2, fixou-se uma temperatura 20°C acima do ponto de fusão do respectivo lípido ou mistura de lípidos, de forma a assegurar a fusão de toda a massa lipídica. Os dados registados através da observação visual do desaparecimento de cristais de fármaco no lípido fundido foram expressos em termos de dissolução parcial, total ou nula. Considerou-se nula quando não se observou diminuição do número e volume dos cristais.

Recorrendo-se à dissolução prévia do Ptx em etanol obteve-se uma solução com uma concentração de 15mg/ml [Solução mãe]. A miscibilidade da solução alcoólica de Ptx nos diferentes lípidos foi avaliada por observação visual, após adição de 1 ml da solução mãe ao lípido fundido (3g).

4.3.2. Produção de nanopartículas contendo Ptx incorporado: nsLp-Ptx

A preparação de Ptx-nsLp obedeceu às regras de manipulação de agentes citostáticos segundo as directivas Europeias em vigor (Hazardous Drugs 2007).

Para tal foi utilizado um sistema de isoladores (*Pilot-scale isolator system*) com ar controlado (- 40 Pa e 100m³/h) e filtros HEPA (Luwa JK 1940) de modo a reter 99,9% de partículas de diâmetro $\geq 0,5\mu\text{m}$. Uma pré-câmara, também sob pressão negativa, permite a entrada e saída de matéria-prima, produto acabado e equipamento. Consegue-se desta forma evitar o contacto com o operador e impedir contaminação de superfícies e equipamentos.

a. Preparação das soluções stock de Ptx

Prepararam-se soluções padrão de Ptx em etanol, com concentrações finais de 5,0; 7,5 e 15,0 mg/ml. As soluções obtidas por agitação suave da mistura até completa dissolução e mantidas a -4°C e ao abrigo da luz demonstraram ser estáveis pelo menos durante 12 meses, como se comprovou pela determinação da concentração ao longo do tempo.

b. Preparação e optimização das nsLp-Ptx

Para a preparação da fase lipídica, a solução alcoólica de Ptx foi adicionada de uma só vez ao lípido fundido, mantendo-se a mistura aquecida com

agitação suave até completa dissolução. O método de preparação de nanopartículas consiste na fusão e dispersão do lípido numa fase aquosa de tensoactivo, como descrito no Capítulo 2. Após mistura das fases, a uma temperatura correspondente a um incremento de 20°C no valor da temperatura de fusão do(s) lípido(s), estas foram submetidas a agitação enérgica em homogeneizador de alta rotação a 14 000 r.p.m. (Silverson Machine, Inglaterra), durante 10 minutos. Obtém-se deste modo a dispersão da fase lipídica com Ptx, na solução aquosa de tensoactivo. A dispersão coloidal é dividida em alíquotas de 5 e 10 ml, que são imediatamente acondicionadas em frascos de vidro tipo I siliconados e capsulados com rolhas de *Teflon*. Os frascos são mantidos à temperatura ambiente e protegidos da luz durante 12 horas, de modo a permitir a solidificação das gotículas dispersas. Todo o processo decorre em ambiente estéril.

c. Efeito da composição qualitativa e quantitativa do sistema no diâmetro médio das partículas nsLp-Ptx

Compararam-se preparações tendo como base os lípidos Compritol® 888ATO e Precirol ATO5®, uma vez que estes haviam sido previamente escolhidos tendo em conta o *dm*, as características físico-químicas e o comportamento *in vivo* das nanopartículas sem fármaco. Utilizando uma concentração fixa de Ptx fez-se variar, para cada lípido estudado, o conteúdo em massa de forma a determinar o efeito da concentração lipídica no *dm* das partículas preparadas (Tabela 4-2).

A influência da concentração de tensoactivo foi também avaliada, uma vez que os estudos com partículas sem fármaco demonstraram existir uma relação directa entre esta concentração e o perfil de distribuição do tamanho das partículas. O tensoactivo tem sido também relacionado com a eficiência de encapsulação de fármacos em sistemas transportadores bifásicos, não apenas pela sua natureza mas também a concentração em que está presente, como foi exposto anteriormente no Capítulo 1. É portanto expectável que, um compromisso óptimo entre maior eficiência de incorporação (EI%) e o valor óptimo de *dm*, obrigue a ajustar a concentração de tensoactivo (Tabela 4-2).

Tabela 4-2. Composição em lípido e tensioactivo dos lotes utilizados para o estudo da influência da composição química.

Precirol ATO5® (m/v)		Compritol® 888ATO (m/v)	
3%		3%	
Tween 80 % (p/p)			
50%	75%	50%	75%
6%		6%	
Tween 80 % (p/p)			
50%	75%	50%	75%

Foi também avaliada a influência da concentração de Ptx no *dm* e *IP* das partículas, com base o lípido Precirol ATO5® (3% lípido:50% tensioactivo). Para tal produziram-se preparações contendo 82,5; 100 e 300 µg de Ptx /ml de formulação.

Para avaliar a influência do etanol nas características físico-químicas das partículas lipídicas, prepararam-se com este álcool formulações nsLp de Precirol 5ATO® (3% lípido:50 % tensioactivo), seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. Para preparar estes lotes, 1 ml de etanol é adicionado à fase lipídica fundida imediatamente antes da dispersão com a fase aquosa.

d. Estudo da capacidade de incorporação do sistema

Determinou-se a capacidade das partículas lipídicas em aprisionar as moléculas de Ptx. Para tal estudou-se a relação entre a (EI%) do fármaco e a percentagem mássica de lípido. Para nanopartículas compostas por Precirol ATO5® produziram-se lotes de partículas com 3 e 6% (m/v) de lípido, mantendo a razão lípido/tensioactivo a 50% (m/m). Prepararam-se formulações nsLp-Ptx a partir de soluções mãe de 7,5 a 15 mg/ml de Ptx em etanol, mantendo constante o volume (1ml) de solução alcoólica de Ptx adicionada à fase lipídica, o que corresponde a uma concentração final de Ptx entre 82,5 e 300 µg/ml. A concentração teórica de Ptx na formulação e a identificação dos lotes resumem-se na Tabela 4-3.

Tabela 4-3: Composição e identificação dos lotes produzidos em termos de concentração de Ptx em nsLp a 3% e 6% de lípido (m/v) com base no Precirol 5ATO®. Todas as formulações foram produzidas em triplicado.

lípido	Concentração teórica de Ptx ($\mu\text{g/ml}$) em % lípido-Ptx					
3 %	82.5_3- Ptx	100_3-Ptx	125_3-Ptx	150_3-Ptx	-	300_3-Ptx
6%	-	100_6-Ptx	-	-	180_6-Ptx	300_6-Ptx

4.3.3. Caracterização de nanopartículas com Ptx incorporado: nsLp-Ptx

As características físico-químicas das partículas Ptx-nsLp foram avaliadas e comparadas com as nsLp vazias. A espectrofotometria de correlação de fotões (PCS; Autosizer Malvern Instruments IV, Reino Unido) foi utilizada para determinar o *dm* e o *IP* de cada formulação. A carga superficial, traduzida pelo valor do potencial Zeta, foi medida após diluição das amostras em água e cloreto sódio (20 μl :1ml) (Malvern Zetasizer IV, Reino Unido). À célula electroforética foi aplicado um campo eléctrico de 15,24 V/cm.

Para avaliar o comportamento térmico das Ptx-nsLp utilizou-se um calorímetro diferencial de varrimento (Differential Scanning Calorimetry-Mettler DSC 25 ligado a um processador Mettler TA, Alemanha). As amostras foram sujeitas a aquecimento, num intervalo de temperaturas entre 20°C e 240°C, a uma taxa de 10K/min. Foram comparados termogramas obtidos com 20mg das matérias-primas puras, Ptx e Precirol ATO5®, com os obtidos para as formulações Ptx-nsLp: 82,5_3-Ptx e 150_3-Ptx. O comportamento térmico das preparações nsLp sem fármaco foi também avaliado de modo a estudar a influência do etanol na estrutura lipídica.

Para a análise morfológica das partículas com Ptx recorreu-se ao microscópio electrónico de transmissão (TEM; Philips, CM 120 Biotwin, Germany).

O modelo desenvolvido no Capítulo 2 para determinar o número de partículas dispersas presentes num volume conhecido de formulação, foi utilizado para estimar o número de partículas de formulações com Ptx incorporado em matrizes com base no lípido Precirol ATO5®, designadamente 82,5_3-Ptx e 180_6-Ptx. Os valores determinados por espectrofotometria a 540nm, como descrito no capítulo 2 para as partículas vazias (Shimazu, USA), foram comparados com os valores encontrados para as partículas contendo Ptx.

Resumidamente as amostras com Ptx foram diluídas em água desionizada em concentrações crescentes de modo a construir curvas de calibração e a partir destas calcular a concentração da preparação.

4.3.4. Estabilidade das nsLp-Ptx

A estabilidade de preparações Ptx-nsLp (82,5_3- Ptx) foi avaliada ao longo do tempo. Os parâmetros monitorizados, alteração do *dm* e índice de polidispersão, crescimento de cristais, contaminação microbiológica e formação de agregados, foram avaliados em preparações mantidas à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

As alterações no tamanho e carga das partículas foram determinadas aos 30 dias e aos 3, 12 e 24 meses, através da leitura do diâmetro médio e potencial zeta, usando as metodologias anteriormente descritas após diluição das formulações.

De modo a controlar possíveis fenómenos de agregação das partículas, procedeu-se à análise turbidimétrica de formulações com Ptx aos 3, 12 e 24 meses. A avaliação foi feita por comparação do valor das absorvências ao longo do tempo de formulações 82,5_3-Ptx, diluídas de acordo com o método descrito anteriormente para a determinação do número de partículas.

Para detectar a eventual formação de cristais de Ptx, as preparações foram monitorizadas ao longo do tempo por microscopia óptica (DPC-gamma C-12, Los Angeles, EUA).

4.3.5. Quantificação de Ptx

a. Método de determinação

Vários têm sido os métodos propostos para a determinação da concentração de Ptx, praticamente todos com base na cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). A maioria dos métodos aplica-se no entanto à determinação do Ptx em matrizes biológicas, apresentando limites de detecção compreendidos entre os 7 a 30 nM (Longnecker *et al.* 1987; Moreira *et al.* 2001; Willey *et al.* 1993).

O processo analítico, desenvolvido para a determinação da concentração de Ptx em nanopartículas lipídicas, baseia-se nos métodos acima descritos,

tendo-se adaptado de acordo com a matriz em causa e o intervalo de concentrações a quantificar.

Uma vez que se trata de um sistema bifásico com elevado conteúdo em partículas lipídicas, torna-se necessário proceder previamente ao seu processamento. As formulações de nsLp sem fármaco, com e sem etanol, foram sujeitas ao mesmo tratamento, de modo a avaliar a presença de interferentes. Os sobrenadantes de partículas vazias foram utilizados como brancos e, tal como no caso dos padrões, foram injectados aleatoriamente durante o estudo.

b. Preparação das soluções-padrão

Para os estudos de validação do método prepararam-se soluções-padrão de Ptx em etanol com concentrações crescentes (1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 22,5; 30,0; 45,0 e 60,0 µg/ml), a partir de uma solução-mãe a 7,5 mg/ml. As soluções-padrão de concentração intermédia foram quantificadas de forma aleatória ao longo do trabalho.

c. Preparação da amostra

Foram utilizadas duas metodologias, consoante se pretendeu determinar o Ptx livre ou o total, nomeadamente: (i) separação do sobrenadante por ultrafiltração/centrifugação, (ii) separação efectuada por centrifugação após destruição do sistema coloidal pela adição de etanol. As formulações foram previamente diluídas em água desionizada e bidestilada (2:1).

o **Ultrafiltração/centrifugação (Ptx livre)**

A extracção do analito envolve a separação do sobrenadante que constitui a fase contínua da suspensão de nanopartículas. Para a separação da fase contínua das formulações, sem tratamento prévio, recorreu-se ao método de ultrafiltração/centrifugação. O dispositivo utilizado (Centricon, Amicon®) possui uma membrana de ultrafiltração com um *cut-off* de 45 000 kDa. A suspensão de partículas previamente diluída é centrifugada a 6 000 r.p.m durante 20 minutos a 18°C, o que permite obter a separação de uma fracção com cerca de 200 µl de fase externa aquosa. A solução assim obtida pode ser injectada directamente no sistema de HPLC.

o **Destruição do sistema de partículas (Ptx incorporado)**

A extracção do analito envolve a determinação do Ptx nas várias fracções após destruição prévia da formulação por adição de um agente flocculante (Tabela 4-4).

O Ptx ligado às partículas foi extraído após destruição do sistema, por adição de 400µl de etanol a um volume de 250µl da suspensão de nanopartículas. O etanol funciona como solvente extractor e agente destabilizante. A mistura foi submetida a agitação horizontal durante 30 minutos a 200 r.p.m. num agitador orbital *Heidolph Promax 1020* (Heidolph Instruments, Alemanha) à temperatura ambiente. Posteriormente as amostras são centrifugadas durante 45 minutos a 3 500 r.p.m. de modo a obter a separação do sobrenadante contendo o Ptx. São transferidos 75µl de sobrenadante para *vials* do injector automático do HPLC e quantificados em triplicado.

Tabela 4-4: Identificação das fracções obtidas, após processamento da amostra, nas quais se determina a concentração de paclitaxel.

Fracção analisada	Conteúdo da fracção
Etanol da lavagem dos filtros	Ptx em cristais formados por precipitação na fase aquosa
Fase aquosa	Ptx dissolvido na fase aquosa
Nanopartículas lipídicas	Ptx incorporado nas partículas lipídicas

As formulações com cristais foram utilizadas para calcular eficiência de recuperação através do balanço de massa entre as várias fracções. As preparações foram filtradas em filtro de vidro (Glass Microfibre Filters 30µm de poro; Whatman GF/D, Reino Unido). Uma vez que a concentração inicial de Ptx é conhecida, pode calcular-se a fracção de Ptx incorporado determinando a sua concentração na fase aquosa (Ptx_{Diss}) e no precipitado ($Ptx_{Cristal}$), utilizando a equação que a seguir se descreve:

$$Ptx_{Incorporado} = 100 - (Ptx_{Diss} + Ptx_{Cristal}) \quad \text{Equação 4-1}$$

d. Condições cromatográficas

Para a análise da concentração de Ptx nas diferentes fracções obtidas através do processamento das nanopartículas lipídicas, desenvolveu-se um método de HPLC adaptado de modo a abranger o intervalo de concentrações esperado, o qual foi definido tendo como limite 50% de eficiência de incorporação, correspondente a um valor de 60µg/ml de Ptx.

O sistema cromatográfico é composto por um detector espectrofotométrico U.V./VIV modelo HP 1100, por uma bomba isocrática Hewlett Packard 1050 e um injetor automático HP 1100 (Hewlett-Packard GmbH, Germany).

Para a separação dos componentes da amostra, recorreu-se a uma coluna de fase reversa, Waters Nova-Pack C-18 (150mm×4.6mm, 5µm, Waters Corporation, Massachusetts, EUA), com pré-coluna Waters Nova-Pack C-18.

A fase móvel, composta por uma mistura de água:acetonitrilo (55:45), foi previamente filtrada (poro 0,22µm) e desgaseificada em banho de ultra sons durante 10min. O *software* utilizado, HP ChemStation, para cromatografia líquida, define a linha de base, calcula o tempo de retenção e a área dos picos cromatográficos. No decorrer da quantificação das amostras, soluções-padrão foram intercaladas de 10 em 10 determinações.

4.4. Resultados

4.4.1. Solubilidade

a. Estudos com Paclitaxel sólido

Os resultados descritos na Tabela 4-5 foram obtidos a temperaturas 20°C superiores ao ponto de fusão do lípido ou, no caso de misturas, do lípido com ponto de fusão mais elevado. Como se pode observar, para 2,5% (m/m) de Ptx obteve-se apenas uma ligeira diminuição do número de cristais nos lípidos Precirol ATO5®, Precirol ATO5®/Geleol® (70:30) e Compritol® 888 ATO/Geleol® (70:30) (coluna A-Tabela 4-5).

Tabela 4-5: Avaliação qualitativa da dissolução de Ptx, total, parcial e ligeira, em diferentes lípidos fundidos com diferentes proporções de Ptx/lípido baseada na observação visual. Legenda: A e B – ver texto; n.obs-não se observou dissolução dos cristais, nd-não determinado; dec-decomposição do lípido (acastanhado).

Ptx/lípido	2,5%		1,25%	0,25%
	A	B		
Precirol ATO 5	n.obs	n.obs	parcial	parcial
Compritol 888 ATO	n.obs	dec	nd	nd
Imwitor 900	n.obs	parcial	baixa	baixa
Geleol	n.obs	parcial	baixa	parcial
Witepsol E85	parcial	dec	nd	nd
Precirol ATO5®/Imwitor900 (70:30)	n.obs	parcial	n.obs	n.obs
Precirol ATO 5®/Geleol (70:30)	ligeira	parcial	parcial	parcial
Compritol® 888 ATO/Geleol (70:30)	ligeira	dec	nd	nd

Com base neste facto, mantendo constante a percentagem de Ptx (2,5%), procedeu-se ao aumento gradual da temperatura em intervalos de 10°C (coluna B-Tabela 4-5), até ser visível a dissolução total ou, pelo contrário, ocorrer a decomposição do lípido.

Observou-se a quase total dissolução do Ptx (Coluna B-Tabela 4-5), no caso da mistura Precirol ATO5®/Geleol (70:30), para temperaturas cerca de 40°C superiores à temperatura inicial. Nas restantes preparações, o aumento de temperatura não produziu alterações significativas no comportamento de dissolução do composto, observando-se nalguns casos, a decomposição do lípido e do Ptx a temperaturas próximas dos 240°C.

A diminuição da concentração de Ptx para 1/2 e, posteriormente para 1/10 da percentagem inicial na mistura, à temperatura inicial, não favorece a dissolução deste, excepto no caso da mistura Precirol ATO5®/Geleol onde a dissolução é quase total.

b. Estudos com a solução alcoólica de Ptx:

Ao contrário dos ensaios efectuados anteriormente, obteve-se a dissolução completa da solução mãe de paclitaxel em lípido fundido como solvente, a uma temperatura de 20°C superior ao do ponto de fusão do lípido, para a concentração de 1 mg de Ptx para 200mg de lípido.

4.4.2. Eficiência de Incorporação

A determinação da eficiência de incorporação (EI%) obrigou ao desenvolvimento e validação de um método analítico capaz de dosar a concentração de Ptx em amostras lipídicas.

A metodologia desenvolvida, com base em procedimentos descritos anteriormente, foi aplicada às várias fracções das amostras, estabelecendo-se experimentalmente as condições cromatográficas descritas na Tabela 4-6.

Tabela 4-6. Condições estabelecidas experimentalmente para a análise cromatográfica de Ptx em amostras de nanopartículas lipídicas.

Condições da análise cromatográfica	
Fase móvel	Água:acetoneitrilo (55:45)
Caudal	1,3 ml/min
Volume de injeção	20 µl
Detecção	Espectrofotometria UV/Vis ($\lambda = 227\text{nm}$)

Foram analisados os sobrenadantes de partículas sem fármaco bem como os de nsLp-Ptx, extraídos pelos dois métodos a ultrafiltração/centrifugação (i) e a destruição/centrifugação (ii). As amostras (nsLp-Ptx) apresentam um elevado número de partículas lipídicas em suspensão. Embora o pré-processamento da amostra elimine ou reduza o seu número, optou-se por utilizar uma pré-coluna, de modo a excluir a possibilidade de introduzir estas partículas na coluna.

Na Figura 4-1 estão representados os perfis cromatográficos das diferentes fracções analisadas. Na Figura 4-1-(A), está representado o cromatograma obtido por injeção directa de uma solução padrão a 15 µg/ml. Nas condições experimentais, observa-se o pico correspondente ao Ptx com um tempo de retenção de 8 minutos. As áreas dos picos correspondentes ao Ptx foram calculadas usando o *software* HP ChemStation. A concentração das amostras foi determinada através de curva de calibração realizada previamente (Figura 4-4). As amostras que contêm o analito (Ptx), apresentam um único pico, com perfil e tempo de retenção idênticos ao pico obtido com a injeção de soluções-padrão de Ptx.

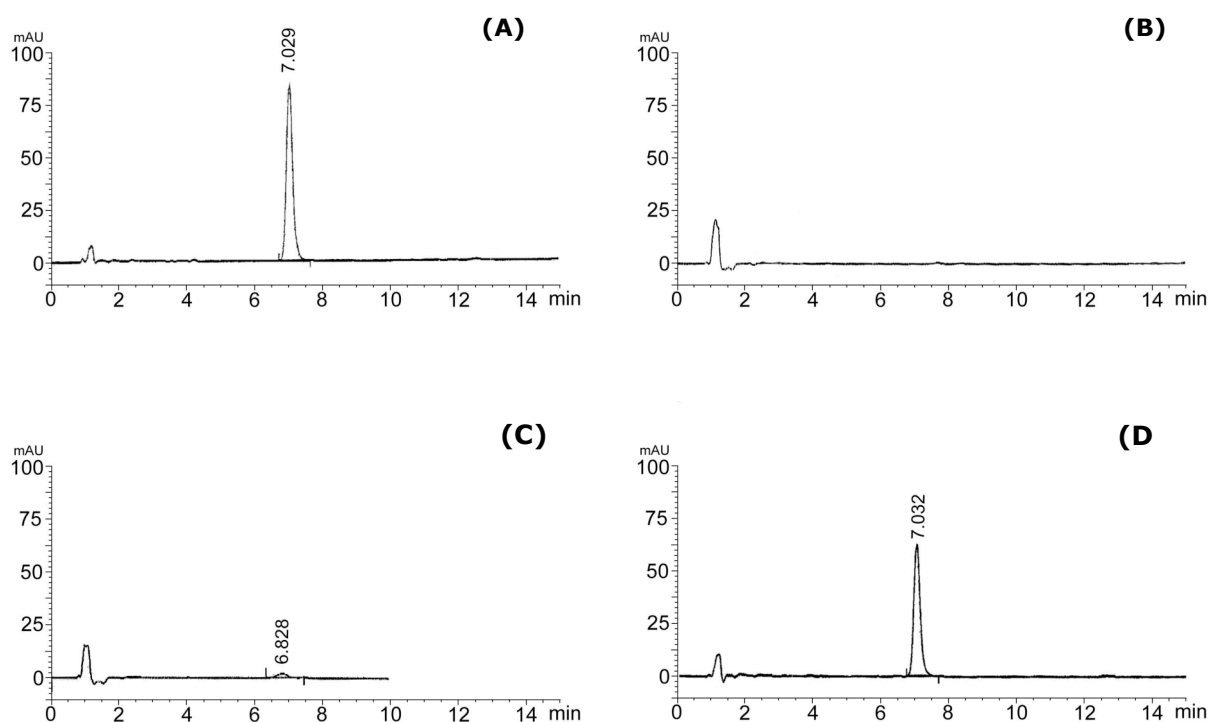


Figura 4-1: Cromatogramas correspondentes à injeção de uma solução padrão (15µg/ml) (A), um sobrenadante (i) de uma formulação de nanopartículas lipídicas vazias (B), um sobrenadante (i) de uma formulação 82,5 µg-Ptx (C), um sobrenadante (ii) de uma formulação 125 µg-Ptx (D).

Tendo em consideração a composição da matriz, a utilização de etanol e a potencial degradação da matriz e/ou do Ptx, avaliou-se a presença de interferentes.

Os cromatogramas correspondentes à injeção de soluções de sobrenadante, provenientes de amostras de partículas sem fármaco e com etanol, envolvendo os dois métodos de extração não exibem qualquer pico, revelando a ausência de interferentes e a adequabilidade das condições cromatográficas (Figura 4-1).

4.4.3. Validação do método analítico

a. Precisão

A repetibilidade foi avaliada de acordo com as recomendações da ICH (Q2A e Q2B), (EMA 2007 [cited 2005]-a; EMA 2007 [cited 2005]-b; Willey *et al.*

1993) ou seja, por quantificação em triplicado de soluções-padrão de concentração compreendida entre 1,25 e 60,0 µg/ml. A precisão, expressa como desvio-padrão relativo (dpr) foi de 1,18% (10,0 µg/ml)

A precisão inter-diária, avaliada pelo declive de 7 curvas de calibração (cada uma com 7 soluções de concentração compreendida entre 1,25 e 60 µg/ml), realizadas em dias consecutivos, apresenta um desvio-padrão relativo de 2,70%.

b. Exactidão

A exactidão foi avaliada pela adição de Ptx a nanopartículas vazias e posterior cálculo da recuperação (n=3).

Adicionaram-se soluções-padrão de 2,5, 10,0 e 30,0µg/ml a um branco de 3% de lípido Precirol ATO 5®. Obtiveram-se taxas de recuperação de 96% para adição de 30,0µg/ml (28,2± 0,3) a 99% para a adição de 2,5 µg/ml (2,4±0,8).

c. Linearidade

A linearidade da relação área de pico vs concentração de Ptx foi avaliada graficamente através dos resíduos da regressão, bem como através da ANOVA da regressão. Os resultados obtidos encontram-se indicados na Tabela 4-7 .

Tabela 4-7. Análise de variância da regressão efectuada no intervalo [1,25; 60] µg/ml. Onde QM representa o quadrado médio e o gl os graus de liberdade.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F _{calc}	p	F _{crit 95.0%}
Regressão	9709542	1	9709542	12863	<0.001	4,062
Falta de ajustamento	18099,95	8	2262,494	2,997	0,009	2,157
Erro	33212,83	44	754,837			
Total	9760855	53				

Verifica-se que os resíduos apresentam um padrão curvilíneo que é típico do ajustamento de um modelo inadequado (Figura 4-2).

A ANOVA correspondente apresenta um F_{cal} significativo o que reforça a interpretação de não linearidade da relação área de pico vs concentração, no intervalo [1,25-60] $\mu\text{g/ml}$.

No entanto, a não linearidade observada previamente, não se verifica nos intervalos [1,25; 15] $\mu\text{g/ml}$ e [15; 60] $\mu\text{g/ml}$, como se pode observar nas Figura 4-3 e Figura 4-4.

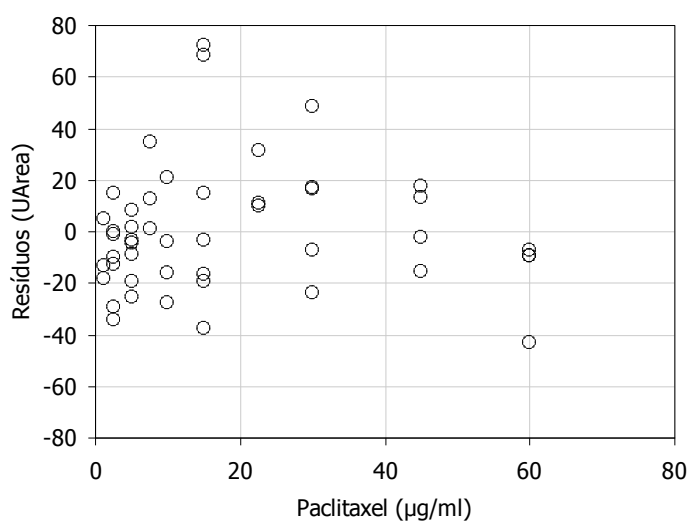


Figura 4-2. Gráfico dos resíduos de 7 curvas de calibração independentes, realizadas em dias diferentes.

A ANOVA das regressões lineares realizadas sobre os resultados correspondentes aos intervalos de [1,25 a 15,0] $\mu\text{g/ml}$ e [15,0 e 60,0] $\mu\text{g/ml}$ não revela falta de ajustamento, pelo que se podem estabelecer dois intervalos de trabalho limitados pelo LQ e pela linearidade, respectivamente [LQ, 15] e [15,0 e 60,0] $\mu\text{g/ml}$.

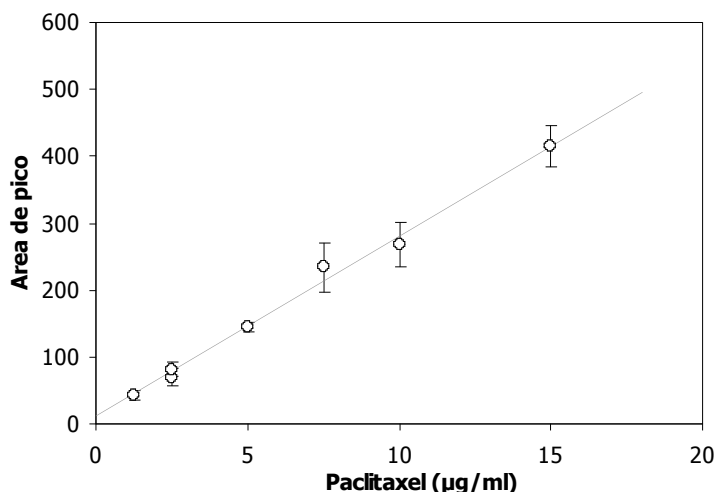


Figura 4-3. Valores médios e desvio-padrão (barras de erro) de 7 curvas de calibração independentes, no intervalo [1,25 , 15,0] µg/ml de Ptx.

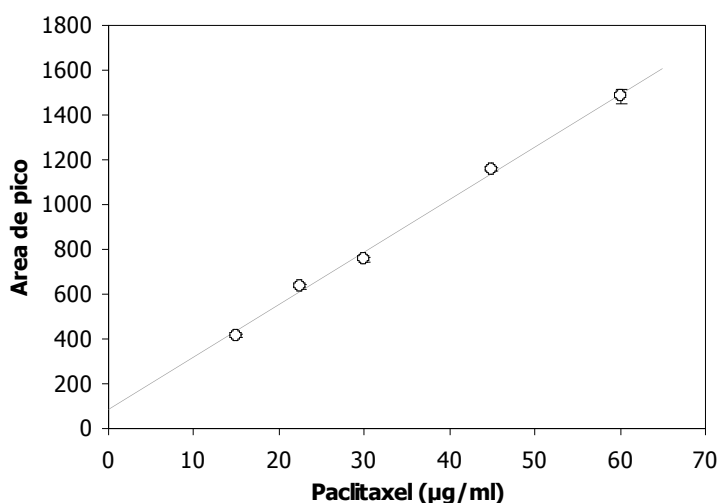


Figura 4-4. Valores médios e desvio-padrão (barras de erro) de 7 curvas de calibração independentes, no intervalo [15,0 a 60,0] µg/ml de Ptx.

d. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com a recomendação da directriz ICH (Q2A e Q2B) (EMEA 2007 [cited 2005]-a; EMEA 2007 [cited 2005]-b; Willey *et al.* 1993). Esta recomendação, requer a avaliação da incerteza associada à quantificação de um branco. No entanto, nos métodos cromatográficos é recomendado avaliar a incerteza de soluções de concentração próxima de zero. Assim, calculou-se o

desvio-padrão combinado de 17 determinações de soluções-padrão de concentração compreendida entre 1,25 e 7,5 µg/ml, sendo esta a estimativa da incerteza associada à quantificação de um branco. Os valores de LD e LQ assim calculados foram de 1,09 e 1,81 µg/ml, respectivamente.

e. Intervalo de determinação

Como referido anteriormente, foram identificadas duas regiões lineares, nomeadamente a baixa, de 1,25 a 15 µg/ml, e a alta, de 15,0 a 60,0 µg/ml. Deste modo, a concentração de Ptx nas amostras foi calculada com base nas curvas de calibração correspondentes respectivamente à zona de baixa ou alta concentração consoante a área de pico registada.

f. Curva de Calibração

Prepararam-se em dias alternados 7 curvas de calibração, por injeção directa das soluções padrão, cobrindo o intervalo de concentrações [15,0-60,0] µg/ml (Figura 4-5).

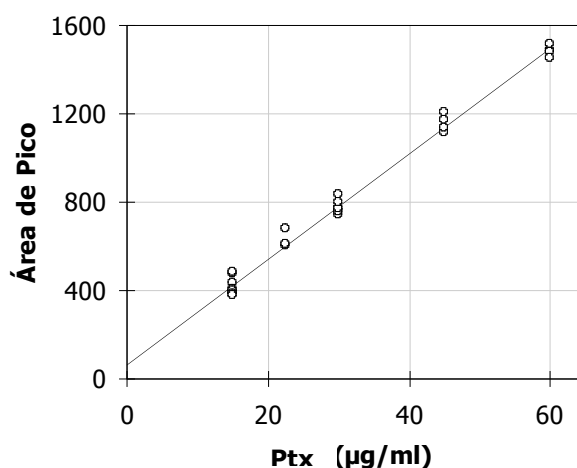


Figura 4-5: Exemplo de uma curva de calibração, obtida por quantificação de 5 soluções-padrão de Ptx (n=4), de concentração 15,0; 22,5; 30,0; 45,0 e 60,0 µg/ml.

4.4.4. Efeito da composição química do sistema no dm das partículas

Com o objectivo de seleccionar o sistema transportador mais adequado aos estudos *in vitro* e *in vivo*, foram preparados lotes em que a composição

lipídica variou qualitativa e quantitativamente. Para todas as composições lipídicas fez-se variar a percentagem de tensoactivo, de modo a estabelecer o grau de influência deste em cada preparação. A influência da composição no perfil de distribuição de diâmetros e no valor de diâmetro médio para cada sistema de nanopartículas, foi avaliada por comparação entre os valores de *dm* e *IP* (Tabela 4-8).

Tabela 4-8. Valores de *dm* (nm) e *IP* obtidos por PCS, para três lotes independentes de cada formulação (n=3). Efeito da composição lipídica para uma percentagem de tensoactivo relativa à massa de lípido (T/L) de 50 e 75% (m/m) e uma concentração de Ptx de 100µg/ml para formulações com lípido a 3% (m/v) ou 200 µg/ml para as de 6% (m/v).

Precirol AT05®					
T/L		nsLp 3%	nsLp 6%	nsLp-Ptx 3%	nsLp-Ptx 6%
50%	<i>dm</i>	146,4±13,0	162,4±20,7	92,6±15,5	114,8±16,4
	<i>IP</i>	0,232±0,015	0,221±0,070	0,180±0,098	0,200±0,102
75%	<i>dm</i>	128,1±9,6	138,9±20,3	109,5±3,8	119,8±7,9
	<i>IP</i>	0,117±0,057	0,154±0,094	0,156±0,071	0,173±0,077
Compritol® 888ATO					
		3%	6%	nsLp-Ptx 3%	nsLp-Ptx 6%
50%	<i>dm</i>	153,4±15,6	363,8±19,4	126,1±9,21	274,0±19,2
	<i>IP</i>	0,272±0,162	0,272±0,121	0,220±0,090	0,250±0,096
75%	<i>dm</i>	125,3±15,4	221,0±18,6	106,2±12,2	164,6±17,9
	<i>IP</i>	0,204±0,042	0,213±0,096	0,194±0,079	0,257±0,098

O aumento do *dm* em função do aumento da percentagem de lípido, registou-se de forma semelhante nas preparações com os diferentes lípidos. Os valores de *dm* encontrados para as partículas nsLp-Ptx, quando é utilizado o Precirol AT05®, são muito próximos para 3% e 6 % (m/v_{total}) respectivamente 92,6 e 114,8 nm com 50% (m/m_{lípido}) de tensoactivo e 109,5 e 119,8 nm para 75% (m/m_{lípido}). Pelo contrário, na presença de Ptx, verificou-se uma diferença considerável entre os valores de *dm* obtidos com 3% ou 6% de lípido para o Compritol® 888ATO (Tabela 4-8).

Relativamente aos dois lípidos estudados verificou-se uma diminuição dos valores de *dm* e *IP* das nsLp-Ptx, em função da percentagem de tensoactivo. No entanto, a intensidade do efeito parece estar, uma vez mais, relacionada com o aumento da percentagem de lípido (Figura 4-6). Observou-se que para 50% de tensoactivo relativo à massa de lípido, a alteração que se verifica do *dm* com a % de lípido é considerável. Mais 148 nm no caso do Compritol® 888 ATO e um acréscimo de 22,2 nm no *dm* das nsLp-Ptx preparadas com Precirol ATO5®. Esta tendência apresenta-se atenuada para concentrações superiores de tensoactivo (75% m/m_{lípido}), observando-se, respectivamente, aumentos de apenas 58,4 nm e 10,3 nm no *dm*, em função do aumento de % de lípido.

Efectivamente obtiveram-se com as formulações a 75% (m/m) de tensoactivo, independentemente da percentagem de lípido presente, valores de *dm* da mesma ordem de grandeza (Figura 4-6).

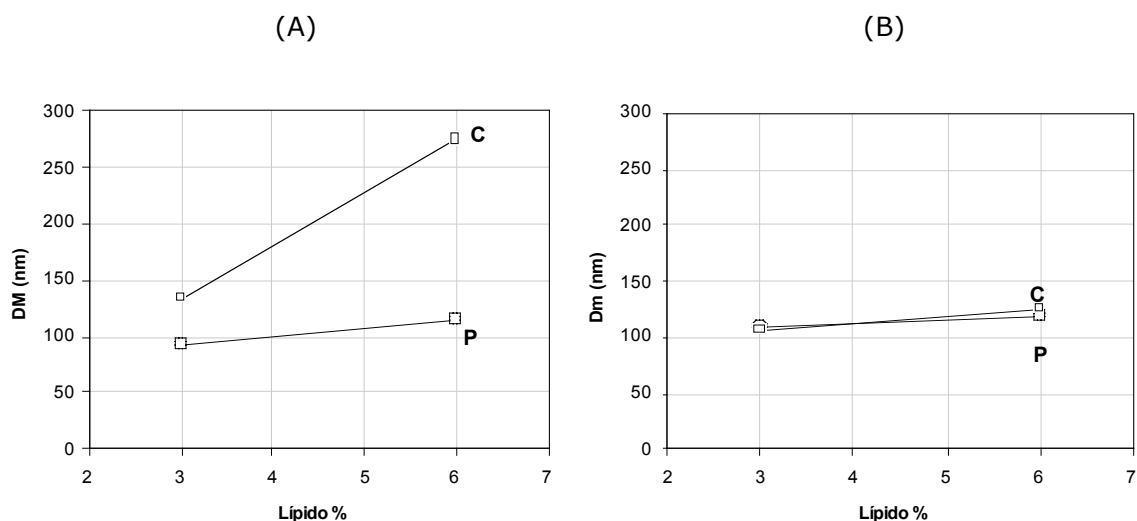


Figura 4-6: Influência da concentração de tensoactivo A (50%) e B (75%) no comportamento do *dm* por aumento da percentagem de lípido, para os lípidos C-Compritol® 888ATO e P-Precirol ATO5®.

No entanto, à escala industrial é desejável obter preparações com o mesmo grau de qualidade dispendendo o menor número de recursos, quer em termos de quantidades de matéria prima, quer em número de operações. Este factor é preponderante na escolha da composição quantitativa da preparação, a qual deverá ser a que, com menor percentagem de tensoactivo, permita atingir os mesmos objectivos. Dado que para 50%

(m/m) de tensoactivo, as preparações de Precirol ATO5® se apresentam menos sujeitas a variações de dm em função da percentagem de lípido, torna-se evidente que estas se apresentam mais robustas e reproduzíveis.

O valor de dm não é por si só critério de escolha da composição das nanopartículas. Uma distribuição de tamanhos demasiado heterógenea é igualmente um factor de exclusão. As formulações de Ptx preparadas com Precirol ATO5® apresentam um valor de dm adequado a qualquer via de administração assim como um intervalo de valores de IP que traduzem uma distribuição mais uniforme das populações presentes. Este lípido é, portanto, a escolha mais indicada para prosseguir com os estudos de veiculação do fármaco, uma vez que a percentagem final de lípido será apenas função da concentração de Ptx que se pretende administrar. Mais uma vez se conclui que o Precirol ATO5® é o lípido mais adequado ao presente trabalho e que a matriz a utilizar, para veiculação de Ptx nos estudos *in vitro* e *in vivo*, terá como base este lípido.

Por outro lado, parece existir uma dependência do valor de dm das partículas relativamente à concentração de Ptx incorporada como se pode observar na Figura 4-7.

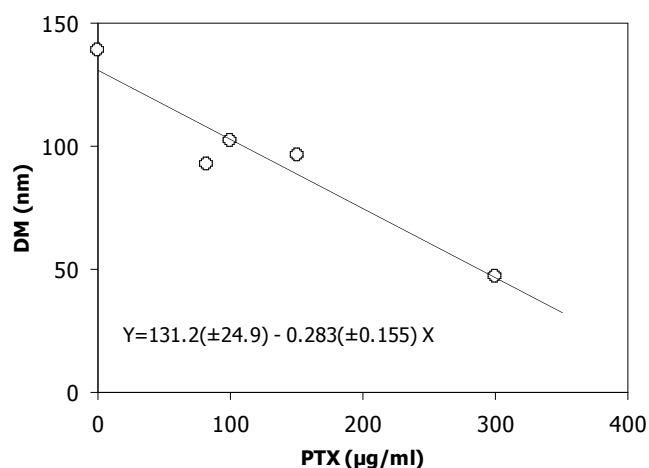


Figura 4-7. Efeito da concentração de Ptx no diâmetro médio das partículas lipídicas. Equação da recta incluindo os intervalos de confiança ($\alpha=0,05$) para a ordenada na origem e declive.

De facto, a variação de 146,4nm para 96,3 nm observada nas preparações de Precirol ATO5® (3/50), quando se faz variar a concentração de Ptx de

82,5 para 150µg/ml, parece ser uma tendência que se acentua nas preparações com 300µg/ml de Ptx, onde os valores obtidos são de 46,8±15nm (Figura 4-6). No entanto, como será discutido posteriormente, as preparações com 150 e 300µg/ml foram rejeitadas devido à presença de cristais.

4.4.5. Determinação da concentração de Ptx incorporado nas nanopartículas

Para estudar o efeito do aumento de concentração inicial de Ptx na capacidade de carga das nsLp, prepararam-se lotes em triplicado de Precirol ATO5® com quantidades crescentes de Ptx incorporado: 82,5; 100; 125; 150 e 300 µg/ml. Pretendeu-se determinar a quantidade máxima de Ptx susceptível de ser incorporada na massa de lípido, assim como a concentração de Ptx que origina a saturação do sistema e, deste modo, promove a precipitação do fármaco.

A análise por microscopia óptica, realizada 72 horas após a preparação, revelou ausência de cristais para todas as concentrações testadas de Ptx. O aparecimento de cristais de Ptx na formulação com concentração mais elevada 300_3-Ptx, registou-se às 168 horas após preparação, devido à provável saturação do sistema. Deste modo, determinou-se que os sete dias correspondem ao tempo zero para se proceder à quantificação da capacidade de carga do sistema.

Todas as formulações foram previamente filtradas (Glass Microfibre Filters 30µm de poro; Whatman GF/D, Reino Unido) antes de se proceder ao doseamento do Ptx. Os eventuais cristais retidos no filtro foram dissolvidos em etanol (1 ml/12 h). Após análise por HPLC das diferentes fracções, calculou-se a concentração efectiva de Ptx incorporado nas partículas: (a) Ptx cristais: correspondente à solução de lavagem do filtro, (b) Ptx livre: sobrenadante de centrifugação/ultrafiltração da formulação total (c) Ptx ligado: sobrenadante de centrifugação das partículas destruídas com etanol após filtração prévia.

Observou-se que a eficiência de incorporação (EI%) aos sete dias atinge o seu valor máximo, aproximadamente 100%, para as formulações correspondentes a 82,5 e 100µg/ml, apresentando estas a melhor relação entre a concentração teórica inicial e a concentração observada (Figura 4-8).

O aumento da concentração inicial de 125µg/ml para 150µg/ml de Ptx mostra claramente uma diminuição na eficiência de incorporação que, neste caso, decresce para os 80%. As formulações com 300 µg/ml apenas atingem cerca de 14% de incorporação, o que corresponde a aproximadamente 41 µg/ml de Ptx, sendo em termos absolutos o valor mais baixo de Ptx ligado às partículas.

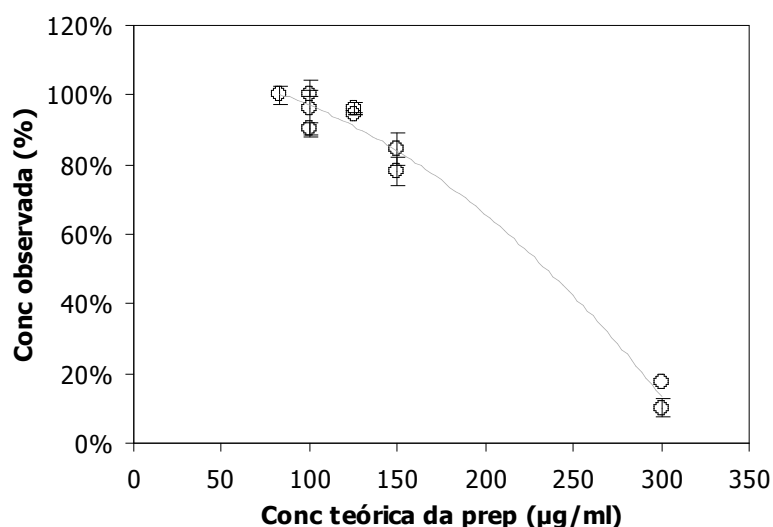


Figura 4-8. Efeito da concentração inicial de Ptx na eficiência de incorporação. Resultados obtidos após filtração, expressos em termos de percentagem de fármaco ligado às partículas, relativo à concentração de Ptx inicial por volume de formulação (n=2).

No que respeita à eficácia de incorporação de um fármaco numa matriz esta pode ser avaliada por parâmetros distintos: (i) a capacidade de carga do sistema, definida como o limite máximo de fármaco que permanece ligado ao transportador e (ii) a eficiência relativa ao processo de incorporação, que diz respeito à quantidade de fármaco inicial que foi incorporado na matriz.

Os sistemas de partículas contendo 3 e 6% de lípido permitiram obter sistemas estáveis, com quantidades de Ptx entre 82,5 a 180 µg/ml, respectivamente, correspondendo estes valores a cerca de 100% de eficiência de incorporação (Figura 4-8). A concentração de Ptx dissolvido na fase lipídica (cerca de 5mg/g de lípido) deu origem, após produção das nSLp, a concentrações até 180µg de Ptx/ml na suspensão de nanopartículas. A capacidade das partículas lipídicas em reter o Ptx após dispersão na fase

aquosa é de cerca de 2,8 % (m/v) e parece estar dependente da acomodação da molécula de Ptx pela matriz lipídica, após contracção desta, resultante da solidificação das moléculas de triacilgliceróis com a consequente reorganização da estrutura cristalina.

a. Crescimento de cristais

Os fenómenos de precipitação ao longo do tempo foram registados até ao limite de trinta dias. Nessa altura, verificou-se que se mantinha a ausência de formação de cristais nas preparações 82,5_3-Ptx, 100_6-Ptx e 180_6-Ptx. O controlo da presença de cristais nestas últimas preparações, foi monitorizado por observação microscópica, realizada em intervalos de trinta dias durante um período de 24 meses, não tendo ocorrido formação de cristais durante este tempo. A formulação 300_3-Ptx apresentou ao tempo zero um elevado conteúdo em cristais (Figura 4-9). Nas restantes formulações, o processo de cristalização decorre ao longo do tempo, aparentemente em função da quantidade inicial de Ptx, como se pode observar na Tabela 4-9.

Tabela 4-9: Formação de cristais no tempo em nsLp a 3% (m/V_{total}) de lípido. Todas as preparações apresentavam às 72 horas ausência de cristais (branco). A intensidade de cristais, em escala qualitativa, é representada em tons de cinza

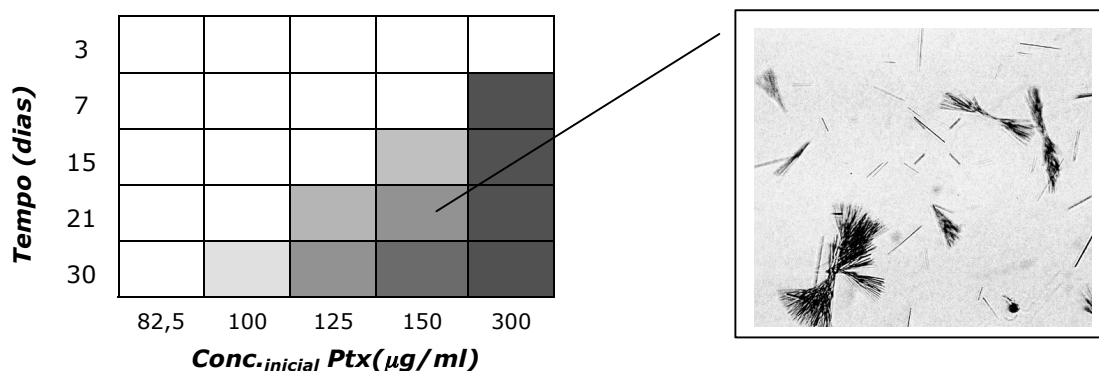


Figura 4-9 : Aspecto microscópico dos cristais de Ptx, na preparação 150_3-Ptx, aos 21 dias.

Nas formulações correspondentes a 150_3-Ptx e 125_3-Ptx, as quais inicialmente apresentavam ausência de cristais e elevada capacidade de

incorporação, verifica-se o crescimento de cristais ao longo do tempo, respectivamente aos dezasseis e aos vinte e um dias.

Os resultados da Tabela 4-10, revelam que em ambos os casos os cristais correspondem a 60% da concentração inicial de Ptx. Também nestas formulações a fracção livre de Ptx dissolvido na fase aquosa é baixa, o que pode estar relacionado com a escassez de volume livre de água na fase contínua externa, após emulsificação, tornando-a menos disponível para participar em interações com as moléculas dispersas.

Não se registou formação de cristais até aos 21 dias em nenhum dos lotes correspondentes a formulações 100_3-Ptx (n=3). No entanto, o aparecimento aos 30 dias de cristais raros, em apenas um dos lotes, levou a rejeitar esta formulação.

Na formulação 82,5_3-Ptx com 3% (m/v) de lípido e nas formulações com 6% de lípido, respectivamente 100_6-Ptx e 180_6-Ptx, não se observaram cristais até aos 24 meses. A imagem de microscopia electrónica de transmissão (TEM), obtida com a formulação 82,5_3-Ptx aos 6 meses, mostra que não há vestígios de cristais ou microcristais (Figura 4-10). Pelo contrário, na imagem por microscopia electrónica (TEM) relativa à preparação 100_3-Ptx, observou-se um elevado conteúdo de microcristais (imagem não incluída) embora ao microscópio óptico apenas fossem visíveis cristais raros.

4.4.6. Eficiência de recuperação

As análises foram sendo feitas à medida que as formulações apresentaram cristais, nomeadamente 300_3-Ptx aos 7 dias, 150_3-Ptx aos 15 dias e 125_3-Ptx aos 21 dias.

Os resultados apresentados na Tabela 4-10 revelam que a perda de matéria-prima durante o processo de fabrico não foi relevante e que o Ptx que não se encontra ligado às partículas, se encontra maioritariamente sob a forma de cristais (78%). A fracção que se encontra livre, dissolvida na fase aquosa, é inferior a 2% do Ptx total.

Tabela 4-10: Balanço de massa para as fracções extraídas das formulações 300_3-Ptx, 125_3-Ptx e 150_3-Ptx. Concentração obtida pela quantificação nas várias fracções (a) lavagem de filtrado correspondente à diluição dos cristais de Ptx retidos (b) fracção livre ou seja Ptx não incorporado, (c) fracção incorporada e (e) somatório das fracções analisadas.

nsLp_Ptx	Conc. µg/ml			
	(a)	(b)	(c)	(e)
300_3-Ptx	236,0	<1,25	62,0	≅ 300,0
150_3-Ptx	93,3	<1,25	60,4	≅ 153,7
125_3-Ptx	73,2	<1,25	51,6	≅ 121,1

A metodologia seguida para o estudo de balanço de massa revelou-se adequada, uma vez que a quantidade de Ptx presente nas fracções analisadas, totaliza a concentração de substância adicionada inicialmente. O protocolo de extracção e quantificação de Ptx em partículas lipídicas está correcto, podendo ser utilizado para o cálculo da capacidade de incorporação das diferentes formulações.

4.4.7. Características físico-químicas das Ptx-nsLp

O sistema desenvolvido corresponde a uma suspensão de partículas lipídicas, com Ptx incorporado, dispersas numa fase aquosa. Em termos macroscópico a formulação apresenta-se líquida, de aspecto homogéneo ligeiramente leitoso, à semelhança do que se verificou para as preparações sem fármaco. A nível microscópico, trata-se de um sistema coloidal de partículas carregadas negativamente, de dimensões nanométricas e estrutura compacta, aparentemente sólidas, que formam uma população polidispersa de entidades bem individualizadas.

Na imagem de microscopia electrónica (TEM) identificam-se partículas nanométricas não esféricas, apresentando as formulações com e sem fármaco, uma distribuição homogénea. (Figura 4-10). Verificou-se que amostra nsLp-Ptx, analisada através da imagem de microscopia electrónica, apresentou uma distribuição de tamanhos mais uniforme, relativamente às nanopartículas sem fármaco. É de referir a ausência de agregados, o que se reflecte no valor de *IP* das populações, como se pode verificar na Tabela 4-11.

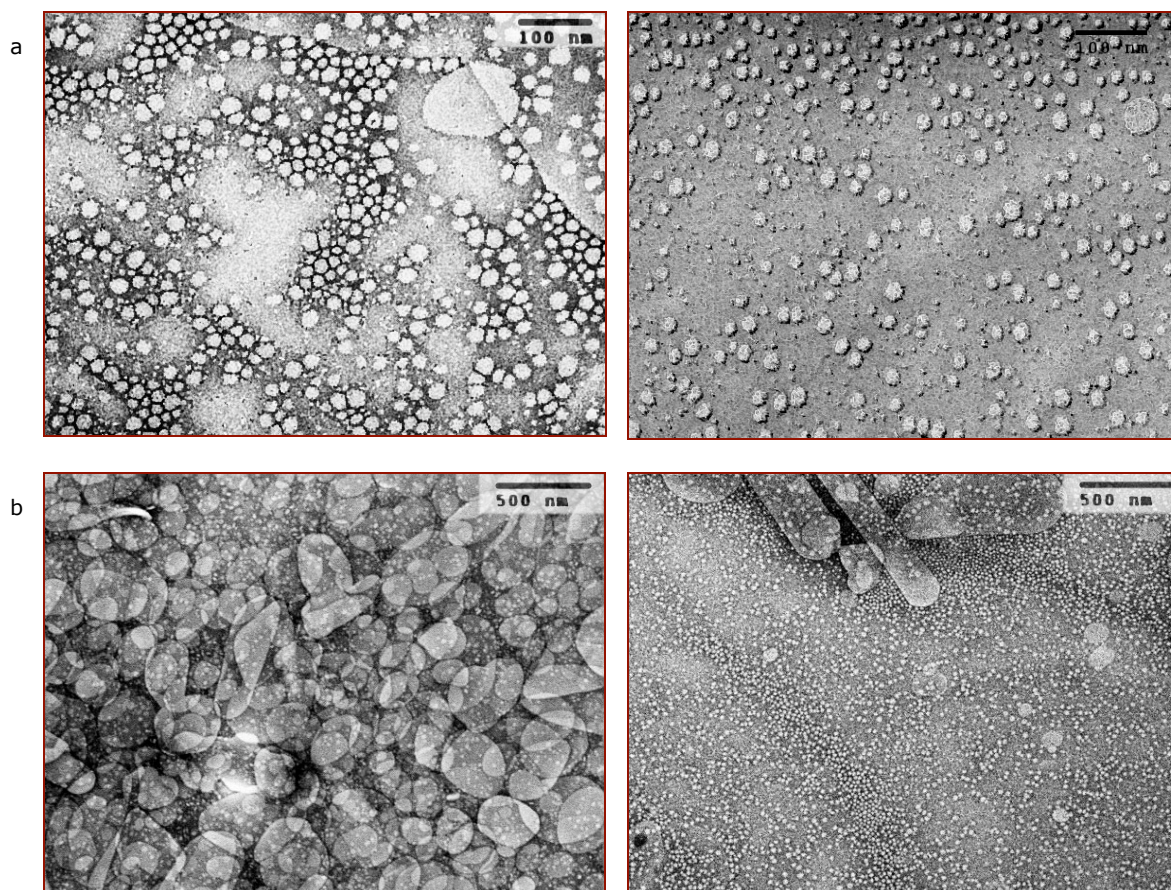


Figura 4-10: Aspecto morfológico das formulações de nSLp preparadas a partir dos lípidos Compritol® 888ATO (a) e Precirol ATO5® (b), antes (à esquerda) e depois (à direita) da incorporação de Ptx. Imagens obtidas por microscopia electrónica de transmissão-TEM. O processo é eficaz no que respeita à formação de um complexo de nanopartículas contendo fármaco nSLp-Ptx, uma vez que não se observou a presença de cristais ou agregados de partículas de lípido.

Este resultado, foi confirmado pela presença de apenas um pico na distribuição de diâmetros, determinada por PCS, apresentando a formulação nSLp-Ptx um diâmetro médio aparente da ordem dos 150nm.

O valor de dm , estimado pelas imagens obtidas sugere que as formulações são constituídas por partículas nanométricas com aproximadamente 30 nm, o que representa um desvio considerável aos valores obtidos por PCS. A Tabela 4-11 resume os resultados em termos de dm , IP e potencial zeta, correspondentes a formulações sem cristais de Ptx, com base no Precirol® ATO5 a 3 e 6% (m/v). A análise das populações relativa à distribuição de tamanhos, feita com base nos relatórios obtidos, indícia que, apesar de o

histograma de frequências apresentar apenas um pico, estão presentes duas populações distintas (resultados não incluídos).

Tabela 4-11: Valores dos *dm* (nm) e *IP* calculados para as formulações a 3 e 6 % de lípido Precirol ATO5® (n=3), com as respectivas concentrações finais de Ptx em µg/ml. Potencial zeta (ζ) (mv) das nanopartículas com etanol e das Ptx-nsLp.

%	nsLp			Ptx	Ptx-nsLp		
	<i>dm</i>	<i>IP</i>	(ζ)		<i>Dm</i>	<i>IP</i>	(ζ)
3	138,9 ± 10,0	0,230 ± 0,04	-20,7	(82.5)	92,6 ± 6,0	0,156 ± 0,03	-15,7
				(100)	102,2 ± 8,0	0,335 ± 0,03	-14,6
6	162,4 ± 15,0	0,400 ± 0,03	-21,4	(100)	114,8 ± 6,0	0,380 ± 0,04	-13,6
				(180)	119,8 ± 4,0	0,372 ± 0,03	-14,8

As partículas evidenciam uma redução de *dm* acentuado observando-se o aumento das populações com partículas de diâmetro inferior a 50 nm. Esta observação não está de acordo com os valores de *IP* determinados para as nsLp-Ptx, mas podem no entanto ser explicados pela ausência de agregados (Figura 4-10).

A análise percentual das populações em termos de volume, mostra claramente que, no caso de Ptx-nsLp, há um deslocamento do grupo correspondente às populações com diâmetros da ordem dos 100 nm, característico das partículas sem fármaco, como referido no Capítulo 2, para valores entre 17 e 50 nm no caso das nsLp-Ptx. O grupo populacional correspondente a valores de *dm* entre 200 e 400 nm não sofre alterações significativas no sentido de valores superiores ou inferiores, apresentando no entanto, uma diminuição na percentagem de partículas com diâmetro superior a 200 nm.

Relativamente ao valor de potencial zeta das nsLp-Ptx observou-se uma alteração pouco acentuada, quando comparado com o valor determinado para as preparações de partículas sem fármaco. Esta variação pode estar relacionada com a presença de moléculas de Ptx à superfície das partículas, a qual induz um rearranjo da carga superficial, tornando-as mais negativas.

A aplicação da análise turbidimétrica à quantificação do número de partículas por volume de suspensão mostra que, este valor é ligeiramente superior ao obtido com as preparações equivalentes mas sem Ptx (Tabela 4-12). O valor obtido está directamente relacionado com a turbidez da amostra e uma vez mais, pode estar associado à diminuição do *dm* e sobretudo, à ausência de agregados.

Tabela 4-12. Cálculo do número de partículas por ml de formulação a 3% de lípido Precirol® ATO5, utilizando o modelo desenvolvido no capítulo 2.

	nsLp	Pac-nsLp
<i>dm</i> (nm)	138,9	102,2
Abs ($\lambda=600\text{nm}$)	0,437	0,415
Partículas/ml	$1,674 \times 10^{12}$	$4,24 \times 10^{12}$

A determinação da associação do fármaco-nsLp e a influência da presença deste, nas características físico-químicas da partícula, foi avaliada por análise térmica. Nos termogramas apresentados na Figura 4-11, verifica-se que no caso dos materiais puros, (A) Ptx e (B) Precirol ATO5®, os picos endotérmicos correspondem aos pontos de fusão, respectivamente, Ptx (p.f.= 210°C) e Precirol ATO5® (p.f.= 60°C).

No caso das formulações de Ptx-nsLp, a presença ou ausência de cristais de Ptx conduz a resultados diferentes. De facto, a formulação 82,5_3-Ptx dá origem a um termograma (D) em que o pico correspondente à fusão do fármaco não aparece (A). Como o ponto de partida do processo de produção das Ptx-nsLp foi a solução lipídica de Ptx é de prever que este, após produção, se encontre sob a forma de dispersão molecular.

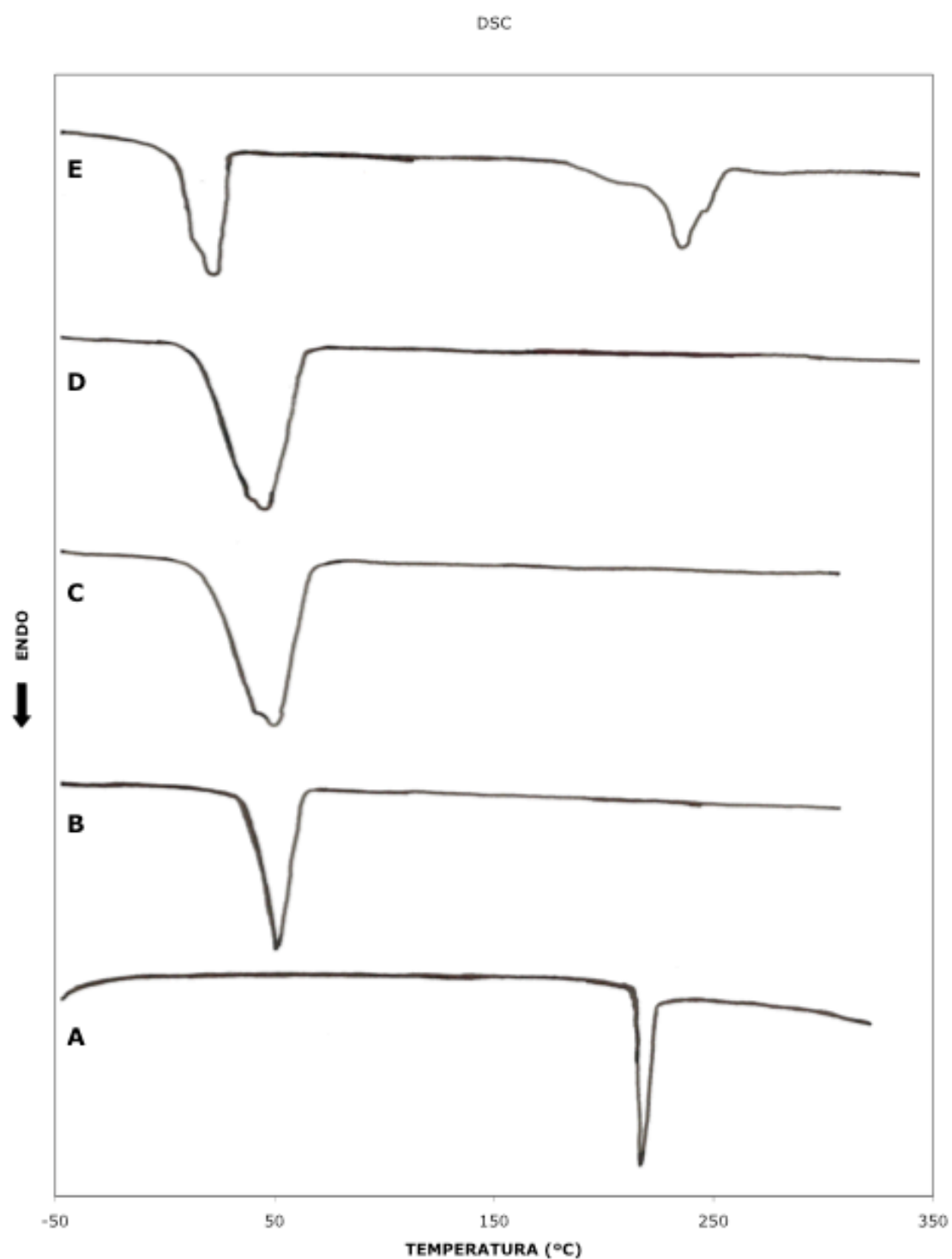


Figura 4-11: Termogramas obtidos com 20 μ g de, (A) PTX sólido, (B) lípido puro-Precirol ATO5®, (C) EtOH-nsLp, (D) e (E) Ptx-nsLp respectivamente, 82.5_3-Ptx e 150_3-Ptx.

Em relação ao suporte lipídico, sob a forma de partículas com Ptx incorporado, este não parece sofrer alteração na sua estrutura relativamente

ao lípido na matéria-prima, uma vez que não se verificou o deslocamento do pico endotérmico correspondente ao seu ponto de fusão (B). Esta observação sugere que entre os dois elementos pode estar em jogo uma ligação física, do tipo interações hidrofóbicas. Por outro lado, no termograma (E) correspondente à preparação 150_3-Ptx, a qual contém cristais de fármaco, observou-se, para além do pico endotérmico correspondente à fusão do lípido, um segundo pico endotérmico na região dos 210°C, indicativo da presença de Ptx no estado sólido. A análise do termograma obtido com a preparação nsLp com etanol sugeriu que a estrutura lipídica não sofre alteração devido à presença deste solvente, uma vez que não se verifica deslocamento do pico correspondente ao ponto de fusão do lípido (C).

As possíveis alterações decorrentes da utilização de etanol durante a preparação das partículas, foram avaliadas por determinação das características físico-químicas do sistema. As partículas nsLp preparadas com etanol, são comparáveis às partículas vazias, uma vez que os valores obtidos de potencial zeta e diâmetro médio são da mesma ordem de grandeza. Do mesmo modo, o perfil do termograma efectuado com esta preparação apresenta os mesmos eventos térmicos que as nanopartículas sem fármaco. Estes resultados indicam que ou o etanol não provoca alteração na estrutura do lípido e como tal, durante a solidificação as partículas formadas são independentes da presença deste solvente, ou que se dá a evaporação do álcool durante a adição à fase lipídica quente (>80°C), uma vez que o valor do ponto de ebulição para o Etanol puro é de 78,1°C (1989), não estando portanto disponível para estabelecer qualquer interacção com as espécies constituintes do sistema.

O espectro de RMN de uma formulação nsLp-Ptx a 3% (m/v) apresentou o pico correspondente ao fármaco, o que indica a presença de Ptx molecular (dados não incluídos). O mesmo espectro não se mostrou conclusivo quanto ao estado da matéria no caso do suporte lipídico, não sendo de excluir que as partículas possam apresentar uma situação intermédia entre o estado sólido e o estado de sobrefusão.

a. Estabilidade

A ausência de cristais observada até aos 24 meses nas formulações 82,5_3-Ptx, 100_6-Ptx e 180_6-Ptx, revela que estabilidade da preparação depende da concentração inicial de Ptx e que esta, por sua vez, determina não apenas a capacidade da partícula em incorporá-lo, mas também influencia o processo de saturação da fase aquosa. O fenómeno de formação de cristais parece ter cinética não linear e, apesar de indirectamente estar dependente da capacidade das partículas incorporarem o fármaco, é fundamentalmente função da sua concentração na fase aquosa. Para elevadas concentrações de Ptx no sistema, a precipitação ocorre rapidamente numa reacção que parece interferir nas velocidades de equilíbrio dos outros fenómenos, nomeadamente entre o fármaco adsorvido à superfície da partícula e o fármaco em solução. É possível que precipitação de Ptx ao longo do tempo, ocorra em função da concentração inicial de cristais e da sua influência nas diferentes velocidades de equilíbrio. Assim, a inexistência de cristais, imediatamente após produção, pode ser a razão pela qual as formulações com 3% (m/v_{total}) de lípido a 125 e 100 ug/ml de Ptx permaneceram estáveis durante aproximadamente três semanas. Possivelmente pela mesma razão as formulações com 82,5 e 180 ug/ml, respectivamente com 3 e 6% lípido (m/v_{total}), apresentaram-se estáveis por 24 meses (Figura 4-12).

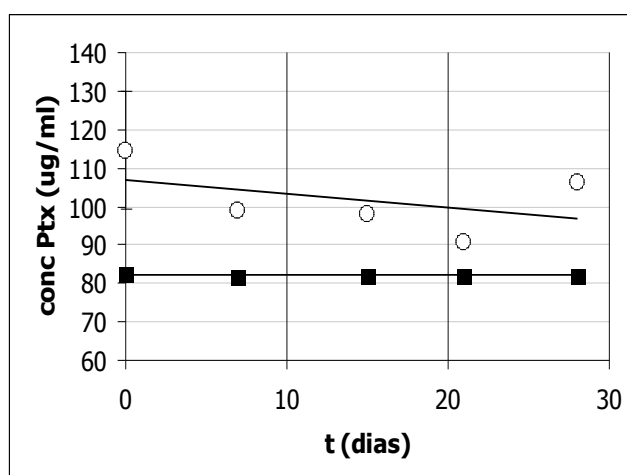


Figura 4-12. Teor de Ptx ao longo do tempo (30dias), nas preparações a 3% de lípido (m/v); 82,5_nsLp-Ptx (■) e 100_nsLp-Ptx (○) .

Aos trinta dias, a observação das formulações ao microscópio óptico revela a presença de cristais nas formulações a 6% (m/v_{total}) de lípido com 300µg/ml de Ptx e, embora não sejam visíveis cristais, verifica-se uma diminuição da concentração de Ptx incorporado. Pelo contrário, nas preparações 82,5_3-Ptx e 180_6-Ptx não se registam alterações, neste intervalo de tempo, situação que se mantém aos 12 meses (81,4µg/ml e 179,6µg/ml).

Os resultados indicam que nestas preparações não se produziram fenómenos de instabilidade química ou alteração da concentração de Ptx, o que também contribui para a ausência de cristais aos 12 meses.

O diâmetro médio das partículas nas formulações 82,5_3-Ptx e 180_6-Ptx, não apresentou alteração significativa durante a avaliação no tempo como se pode observar na Tabela 4-13.

Tabela 4-13: Avaliação da estabilidade física (t=24 meses) de preparações com (nsLp-Ptx) e sem Ptx (nsLp). *dm*-diâmetro médio, *IP*-Índice de polidispersidade.

Lípido	nsLp		nsLp-Ptx	
	<i>dm</i> (nm)	IP	<i>dm</i> (nm)	IP
3%	138,9 ± 10,0	0,230 ± 0,04	92,6 ± 6,0	0,156 ± 0,03
6%	162,4 ± 15,0	0,400 ± 0,03	114,8 ± 6,0	0,380 ± 0,04

Aparentemente a presença de Ptx, no interior e/ou à superfície da partícula, parece estabilizar a suspensão promovendo maior separação entre as partículas no seio do líquido e por conseguinte ausência de agregados. Em valores absolutos, as nsLp-Ptx apresentam aos 24 meses, menores dimensões do que os brancos correspondentes, como se pode ver na Tabela 4-13.

A avaliação microbiológica das formulações nsLp-Ptx aos 30 dias, 3 e 24 meses, foi executada de acordo com a monografia 2.6.1 da FP 8 (ensaios de esterilidade) (Remington 2005). O resultado foi negativo para todos os microorganismos pesquisados. A estabilidade da preparação em termos microbiológicos está possivelmente relacionada com dois factores. O primeiro está associado ao facto de o sistema ser preparado em condições assépticas, o outro factor prende-se com a possibilidade de o Ptx funcionar ele mesmo como anti-fúngico e anti-bacteriano.

4.5. Discussão

Dado que os lípidos Compritol® 888ATO e Precirol ATO5® revelaram ser os mais adequados à produção de nsLp por emulsificação/solidificação (Videira & Almeida 1998) foram estes que serviram de base ao estudo do desenvolvimento de matrizes lipídicas como suporte de Ptx. No entanto, os estudos de solubilidade de Ptx foram executados com uma amostra mais alargada de lípidos.

Na tentativa de resolver a dificuldade em dissolver o Ptx nos lípidos fundidos, optou-se por utilizar como ponto de partida para os estudos de solubilidade, uma solução alcoólica de Ptx. Após a análise dos resultados, ficou claro que é possível ultrapassar a baixa solubilidade de Ptx nos lípidos, nas condições estudadas, se este for previamente dissolvido em etanol. Deste modo, a solubilidade deixou de constituir um critério crítico para a selecção do lípido a utilizar na incorporação do fármaco.

A dispersão molecular de Ptx em fases aquosas foi obtida por ligação a proteínas séricas, como descrito por Lovich e colaboradores (2001). Nestas matrizes, atingiram-se valores de Ptx de cerca de 64,5µg/ml, por oposição ao valor encontrado após ligação ao soro total que foi de 171µg/ml de Ptx, (Lovich *et al.* 2001). Ensaio com o fármaco complexado com Ciclodextrinas (α e β -Cyd) deram origem a soluções onde a solubilidade do fármaco aumentou cerca de 950 vezes (Bilensoy *et al.* 2008; Cserhati *et al.* 1995), correspondendo estes sistemas porventura aos que possibilitam maior concentração de Ptx em DDS. Da utilização da solução alcoólica resultou, no presente estudo, a dissolução do Ptx até 10mg/ml de etanol em 3g de lípido fundido, para os lípidos e misturas de lípidos estudados e cerca de 0,1mg/ml para o sistema nsLp imediatamente após produção. Estes valores estão longe de permitirem uma comparação com o obtido pelo sistema Abraxane™ que, após dispersão numa solução de NaCl a 0,9%, dá origem a uma suspensão contendo 5mg Ptx/ml, no entanto também este produto apresenta limitações, não apenas de estabilidade após reconstrução mas também efeitos adversos importantes, que não importa aqui discutir.

No que diz respeito à incorporação de um fármaco em sistemas transportadores é essencial distinguir que os sistemas heterofásicos, em

termos genéricos, têm características termodinâmicas particulares cujo comportamento traduz os diversos equilíbrios em jogo, condicionando assim a eficiência de incorporação do fármaco.

Obtiveram-se nas dispersões preparadas, em veículo isento de Cremophor™ EL, concentrações de cerca de 5mg de Ptx/g de lípido na dispersão lipídica e, até cerca de 180µg de Ptx/ml na dispersão aquosa.

Relativamente a anteriores abordagens para encapsular Ptx, o protocolo proposto origina uma elevada eficiência de incorporação e estabilidade (Cavalli *et al.* 2000; Videira *et al.* 2000). Esta diferença, que pode ser atribuída sobretudo às diferenças nos métodos de preparação, está também relacionada com os lípidos utilizados na preparação das nanopartículas.

Dado que o comportamento de uma molécula num sistema heterogéneo é governado pelo coeficiente de partilha (K_p), a eficiência do processo poderá eventualmente ser melhorada através da optimização de parâmetros que permitam minimizar o deslocamento do Ptx para a fase aquosa durante a solidificação das partículas.

A composição da matriz influencia significativamente a capacidade de reter o Ptx, o que pode levar a diferenças consideráveis nos valores de incorporação para os diferentes suportes. No caso de sistemas lipídicos, verifica-se que os valores médios de incorporação determinados são mais elevados em emulsões ou sistemas micelares relativamente aos lipossomas ou SLN™ observando-se regra geral eficiências de incorporação de Ptx inferiores (Han *et al.* 2004). Resultados interessantes foram obtidos em partículas lipídicas, nomeadamente em liposferas, partindo de derivados hidrofóbicos do Ptx (Perkins *et al.* 2000; Stevens *et al.* 2004).

Relativamente à utilização de veículos poliméricos para encapsular Ptx, particularmente em sistemas micelares poliméricos, foram alcançadas eficiências de incorporação elevadas, condicionadas no entanto, pela concentração de agente anfifílico (Wang *et al.* 2005).

No presente trabalho, em termos de EI%, o rendimento está possivelmente relacionado com a capacidade das partículas, em aprisionar as moléculas de Ptx durante a solidificação do lípido. Este encontra-se inicialmente dissolvido na fase lipídica e, tendo em conta as suas características hidrofóbicas, deveria para permanecer dissolvido após dispersão das duas fases.

A ausência de cristais nas formulações preparadas, durante as primeiras horas, indica que este comportamento de partição se verifica enquanto as duas fases se encontram no estado líquido. Contudo, o aparecimento de cristais decorrente da solidificação da matriz, sugere a expulsão da molécula de Ptx, não estando esclarecidos os fenómenos que ocorrem quando uma das fases solidifica.

A simulação dos possíveis equilíbrios que se estabelecem durante o período de arrefecimento, encontra-se representada esquematicamente na Figura 4-13.

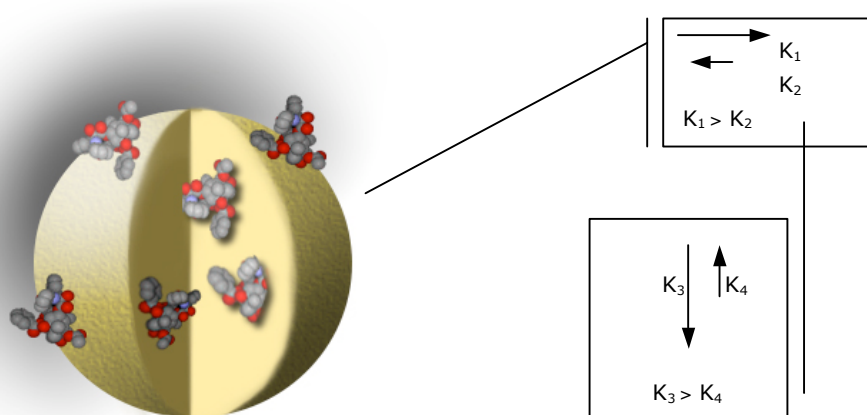


Figura 4-13. Esquema de uma simulação dos possíveis equilíbrios a ocorrer no sistema de nanopartículas lipídicas com Ptx durante a fase de solidificação. Onde K_1 e K_2 correspondem ao equilíbrio entre moléculas de Ptx adsorvidas à superfície das nsLp e as dissolvidas na fase aquosa. K_3 e K_4 representam o equilíbrio entre as moléculas de Ptx dissolvidas e aquelas que precipitam sob a forma de cristais.

Durante a solidificação, os processos termodinâmicos desencadeiam um rearranjo das interações existentes, podendo o lípido perder a capacidade de reter as moléculas de Ptx dissolvidas. O Ptx livre, dissolvido ou suspenso na fase aquosa, é forçado a estabelecer novas interações para diminuir a energia livre do sistema e atingir desta forma novos estados de equilíbrio. É provável que parte das moléculas seja aprisionada no interior da matriz lipídica em formação, enquanto que outra fracção de Ptx será adsorvida à superfície das partículas lipídicas (Han *et al.* 2004).

Devido à baixa solubilidade do Ptx na fase aquosa e à aparente expulsão deste da matriz, atinge-se com facilidade a "concentração de saturação" na fase aquosa. Quando isto acontece o composto precipita, dando origem a

cristais de 15 a 30 μ m em forma de agulhas, visíveis ao microscópio óptico (Figura 4-9).

O estudo do conteúdo das várias fracções indica que a concentração média de Ptx na preparação corresponde à soma das concentrações pontuais em cada fracção (Equação 4-2). A fracção livre que corresponde ao Ptx dissolvido ou suspenso na fase aquosa, nas formulações estáveis 82,5_3-Ptx e 180_6-Ptx, apresenta valores da ordem dos 1,5 μ g/ml, o que se deve não só à lipofília do Ptx, mas também à ausência de volume livre na fase aquosa contínua.

$$\begin{aligned} conc.incorp_{teórica} &= conc.inicial - (conc.cristais(a) + conc.sobrenadante(b)) \times 100 && \text{Equação 4-2} \\ conc.incorp_{observada} &= (c) \end{aligned}$$

$$conc.incorp_{teórica} = conc.incorp_{observada}$$

A concentração correspondente ao Ptx ligado às partículas nas preparações com cristais é inferior (18 a 40 μ g/ml) àquela observada em formulações estáveis, onde o valor obtido se encontra compreendido entre 82,5 e 100 μ g/ml (Figura 4-8). Este fenómeno pode estar relacionado com a concentração de fármaco livre, na fase aquosa. De facto, a presença de uma elevada quantidade de cristais (240 μ g/ml) na formulação 300_3-Ptx aos sete dias demonstra claramente que, durante a solidificação e respectiva formação da partícula lipídica, se estabelecem novos equilíbrios, nomeadamente entre a fase aquosa saturada e os cristais de Ptx. A velocidade de aparecimento de cristais nesta preparação parece estar ligada à rápida saturação da fase aquosa e à consequente modificação da velocidade de equilíbrio entre as moléculas aprisionadas na matriz e as moléculas em solução na fase contínua.

É provável que a produção de complexos fármaco-partícula de composição lipídica, dispersos numa fase aquosa, pela técnica de fusão/emulsificação seguida de solidificação das partículas, produza na fase lipídica onde o Ptx estava dissolvido efeitos de "salting out", por cristalização da matriz, por diminuição de temperatura ou ainda por fenómenos de partilha.

A ausência de volume livre na fase aquosa, característica de sistema coloidais e a lipofília do Ptx, concorrem para a falta de solubilidade na vizinhança da superfície das partículas e o consequente aparecimento de cristais (Lekkerkerker & Oversteegen 2002). Assim, a intensidade de cristais que se observa imediatamente após preparação (t_7 dias) quando se partiu de 300 $\mu\text{g/ml}$ de fármaco, pode dever-se a uma elevada concentração inicial de Ptx na fase aquosa, resultante da solidificação do lípido por abaixamento da temperatura.

Pelo contrário, nas formulações com menor concentração inicial, o aparecimento de cristais após duas ou três semanas, sugere uma menor velocidade de expulsão do Ptx por parte da matriz. Deste modo, para a preparação de matrizes estáveis, sem que ocorra formação de cristais, é necessário ajustar a concentração inicial de Ptx à capacidade de incorporação das partículas.

Os valores obtidos de fármaco incorporado nas nsLp-Ptx, são compatíveis com a actividade farmacológica descrita para este fármaco. De facto, com este processo o valor observado para a incorporação de Ptx na formulação com menor percentagem de lípido (3%) corresponde a concentrações superiores aos valores descritos como terapeuticamente significativos, nomeadamente concentrações plasmáticas entre 0,1 a 0,6 $\mu\text{mol/L}$ consideradas clinicamente relevantes (Jordan & Wilson 2004). Mais significativos são os estudos acerca da interacção do paclitaxel com as sub-unidades da tubulina, que revelaram que concentrações compreendidas no intervalo de 0,1 a 10 $\mu\text{mol/L}$, são eficazes para interromper o ciclo celular, com subsequente formação dos feixes de microtubulos e perda das funções associadas a esta macromolécula (0,25 μM) ou na indução da morte celular programada (Beck *et al.* 2000).

A dependência observada entre a concentração de Ptx incorporado e a percentagem de lípido inicial permite a preparação de diferentes dosagens, uma vez que a concentração de fármaco pode ser aumentada (82,5 para 180 $\mu\text{g/ml}$) por aumento da percentagem de lípido de 3 para 6% (m/v).

A presença de Ptx altera não apenas o diâmetro médio (mediano), mas também a distribuição de tamanhos, apresentando as amostras de partículas Ptx-nsLp valores inferiores de dm e IP , quando comparados com os

encontrados para as partículas vazias. Este último aspecto, também indicador de uma maior estabilidade destas formulações, pode estar relacionado com a presença de moléculas de fármaco à superfície das partículas. A alteração da carga superficial, confirmada pela variação no valor de potencial zeta das partículas com fármaco, pode, ao impedir a formação de agregados, favorecer a dispersão de partículas como entidades independentes. Sabendo que a agregação representa um fenómeno frequente aquando do armazenamento de sistemas coloidais, mesmo no caso de sistemas de partículas em equilíbrio, estes resultados são promissores no que respeita à estabilidade do produto (Hidalgo-Álvares *et al.* 1996). Efectivamente não foram observadas alterações nos valores de absorvência, de dm ou do valor de potencial Zeta, durante um período de armazenamento de 24 meses, para as formulações acima referidas. A ausência de cristais nestas preparações, sugere que o(s) equilíbrio(s) que se estabelecem no seio da dispersão, são independentes do tempo.

A diminuição do dm devido à presença de Ptx e o aumento da fracção de partículas com diâmetro inferior a 50 nm foi observada, sem excepção, nos sistemas preparados. Em todo o caso, mantém-se a tendência observada em estudos anteriores, na qual o dm da preparação é fortemente influenciado pela percentagem de lípido.

As alterações no comportamento térmico do lípido após incorporação do fármaco, sugerem que este mantém as suas características de cristalinidade, embora a variação que se observa entre o perfil do pico obtido com o lípido puro e o perfil apresentado pelo pico endotérmico das nsLp-Ptx, possa traduzir mais uma vez a presença de polimorfos, à semelhança do que se verificou com as nsLp vazias. A ausência de um pico correspondente à temperatura de fusão do Ptx indica que este se encontra dissolvido ou, como outra hipótese a considerar, num estado de sobrefusão.

Qualquer que seja a forma em que o fármaco se encontra, este não sofre degradação após ser submetido ao processo de fabrico desenvolvido, como se verifica através dos cromatogramas obtidos com as Ptx-nsLp aos 7 dias e aos 24 meses, onde o pico correspondente ao Ptx apresenta o mesmo perfil, assim como o mesmo tempo de retenção das soluções padrão. Também o período de armazenagem não provocou degradação dos constituintes, não

sendo detectáveis picos correspondentes a metabolitos secundários ou produtos de decomposição, mesmo após 12 meses.

O estudo das características físico-químicas das PTX-nsLp, permite concluir que, entre o lípido Precirol ATO5® e a molécula de Ptx, se forma uma ligação fraca provavelmente do tipo forças de *van der Waals*.

A análise comparativa das características em função da composição da fracção lipídica indica que as partículas com base no Precirol ATO5® resultam em formulações mais reproductíveis e aparentemente com melhor *IP* e, por esta razão, os estudos subseqüentes serão realizados utilizando este lípido como suporte ao Ptx.

4.6. Bibliografia

- EMA 2007 [cited 2005]-a. ICH Topic Q2A Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology.
- EMA 2007 [cited 2005]-b. ICH Topic Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology.
- Adriance-Mejia D, Benavidez S, Flynn T, Wells R. 2002. Alternative Formulations for the Anti-Cancer Drug Ptx (Taxol). *Cancer Treat Rev* 23:87-95
- Alkan-Onyuksel H, Ramakrishnan S, Chai HB, Pezzuto JM. 1994. A mixed micellar formulation suitable for the parenteral administration of taxol. *Pharm.Res.* 11:206-12
- Bartoli MH, Boitard M, Fessi H, Beriel H, Devissaguet JP, et al. 1990. In vitro and in vivo antitumoral activity of free, and encapsulated taxol. *J.Microencapsul.* 7:191-7
- Beck PWT, Cass PCE, Houghton PPJ. 2000. Microtubule-targeting anticancer drugs derived from plants and microbes: vinca alkaloids, taxanes, and epothilones. In *Cancer Medicine*, pp. 687-91
- Bilensoy E, Gurkaynak O, Dogan AL, Hincal AA. 2008. Safety and efficacy of amphiphilic beta-cyclodextrin nanoparticles for paclitaxel delivery. *Int J Pharm* 347:163-70
- Cavalli R, Caputo O, Gasco MR. 2000. Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur.J.Pharm.Sci.* 10:305-9
- Crosasso P, Ceruti M, Brusa P, Arpicco S, Dosio F, Cattel L. 2000. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *J.Control Release* 63:19-30
- Cserhati T, Forgacs E, Hollo J. 1995. Interaction of taxol and other anticancer drugs with alpha-cyclodextrin. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 13:533-41
- Damascelli B, Cantu G, Mattavelli F, Tamplenizza P, Bidoli P, et al. 2001. Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007): Phase II study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: preliminary evidence of clinical activity. *Cancer* 92:2592-602
- Dhanikula A, Panchagnula R. 2005a. Preparation and Characterization of Water-Soluble Prodrug, Liposomes and Micelles of Paclitaxel. *Curr Drug Deliv* 2:75-91
- Dhanikula AB, Panchagnula R. 2005b. Preparation and characterization of Water-Soluble Prodrug, Liposomes and Micelles of Paclitaxel. *Current Drug Delivery* 2:75-91
- Dong Y, Feng SS. 2004. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 25:2843-9
- Dosio F, Brusa P, Crosasso P, Arpicco S, Cattel L. 1997. Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel-albumin conjugate. *J.Control Release* 47:293-304
- Fonseca C, Simoes S, Gaspar R. 2002. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J.Control Release* 83:273-86
- Fuller N, Rand RP. 2001. The Influence of Lysolipids on the Spontaneous Curvature and Bending Elasticity of Phospholipid Membranes. *Biophysical Journal* 81:243-54
- Green MR, Manikhas GM, Orlov S, Afanasyev B, Makhson AM, Bhar PH, M. J. 2006. Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 17:1263-8
- Han J, Davis SS, Papandreou C, Melia CD, Washington C. 2004. Design and evaluation of an emulsion vehicle for paclitaxel. I. Physicochemical properties and plasma stability. *Pharm Res* 21:1573-80
- Hazardous Drugs. 2007. ASHP Guidelines on Handling Hazardous Drugs. *American Society of Health-System Pharmacists*

- Hidalgo-Álvares R, Martín A, Fernández A, Bastos D, Martínez F, Nieves FJ. 1996. Electrokinetic properties, colloidal stability and aggregation kinetics of polymer colloids. *Advances in colloid and interface science*:1-118
- Huh KM, Lee SC, Cho YW, Lee J, Jeong JH, Park K. 2005. Hydrotropic Polymer Micelle System for Delivery of Paclitaxel. *Journal of Control Release* 101:59-68
- Ibrahim N, Desai N, Legha S, Soon-Shiong P, Theriault R, et al. 2002. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin Cancer Res.* 8:1038-44
- Jianga W, Guptab RK, Deshpandec MC, Schwendemanc SP. 2005. Biodegradable poly(lactico-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews*: 391-410
- Jones AT, Gumbleton M, Duncan R. 2003. Understanding endocytic pathways and intracellular trafficking: a prerequisite for effective design of advanced drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1353-7
- Jordan MA, Wilson L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Review Cancer* 4:253-65
- Kang BK, Chon SK, Kim SH, Jeong SY, Kim MS, et al. 2004. Controlled release of paclitaxel from microemulsion containing PLGA and evaluation of anti-tumor activity in vitro and in vivo. *Int.J.Pharm.* 286:147-56
- Kawasaki ES, Player A. 2005. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine* 1:101-9
- Kim TY, Kim DW, Chung JY, Shin SG, Kim SC, et al. 2004. Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin.Cancer Res.* 10:3708-16
- Kuppens IE. 2006. Current State of the Art of New Tubulin Inhibitors in the Clinic. *Current Clinical Oharmacology* 1:57-70
- Lekkerkerker H, Oversteegen S. 2002. Free-volume approximations for predicting the phase behaviour of asymmetric hard-sphere mixtures. *Journal of Physics-Condensed Matter* 14:9317-22
- Li P, Jiang S, Pero SC, Oligino L, Krag DN, et al. 2007. Design and Synthesis of Paclitaxel Conjugated With an ErbB2-Recognizing Peptide, EC-1. *Biopolymers* 87:225-30
- Liggins R, Burt H M. 2002. Polyether-Polyester Diblock Copolymers for the Preparation of Paclitaxel Loaded Polymeric Micelle Formulations. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 54:191-202
- Liggins RT, Hunter WL, Burt HM. 1997. Solid-state characterization of paclitaxel. *J.Pharm.Sci.* 86:1458-63
- Longnecker SM, Donehower RC, Cates AE, Chen TL, Brundrett RB, et al. 1987. High-performance liquid chromatographic assay for taxol in human plasma and urine and pharmacokinetics in a phase I trial. *Cancer Treat.Rep.* 71:53-9
- Lovich MA, Creel C, Hong K, Hwang CW, Edelman ER. 2001. Carrier proteins determine local pharmacokinetics and arterial distribution of paclitaxel. *J.Pharm.Sci.* 90:1324-35
- Menger FM, Zhang H, de Joannis JJ, Kindt JT. 2007. Solubilization of Paclitaxel (Taxol) by Peptoad Self-Assemblies. *Langmuir* 23:2308-10
- Miglietta A, Cavalli R, Bocca C, Gabriel L, Gasco MR. 2000. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *Int.J.Pharm.* 210:61-7
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. 2005. Nanomedicine: current Status and future prospects. *Faseb J.*:311-30
- Moreira A, Lobato R, Morais J, Silva S, Ribeiro J, et al. 2001. Influence of the interval between the administration of doxorubicin and paclitaxel on the pharmacokinetics of these drugs in patients with locally advanced breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 48:333-7

- Moreno-Aspitia A, Perez EA. 2005. Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel (ABI-007): a Newer Taxane Alternative in Breast Cancer. *Future Oncol* 1:755-62
- Mu L, Feng SS. 2001. Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers. *J.Control Release* 76:239-54
- Mu L, Feng SS. 2003. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J.Control Release* 86:33-48
- Nuijen B, Bouma M, Schellens JH, Beijnen JH. 2001. Progress in the development of Alternative Pharmaceutical Formulations of Taxanes. *Investigational New Drugs*, 19:143-53
- Perkins WR, Ahmad I, Li X, Hirsh DJ, Masters GR, et al. 2000. Novel therapeutic nanoparticles (lipocores): trapping poorly water soluble compounds. *Int J Pharm* 200:27-39
- Remington. 2005. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*: Lippincott Williams & Wilkins. 2393 pp.
- Ruan G, Feng SS. 2003. Preparation and characterization of poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) (PLA-PEG-PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel. *Biomaterials* 24:5037-44
- Sarpal R, Needham D. 1998. Binding of paclitaxel to lipid interfaces: correlations with interface compliance. *J.Liposome Research* 8:147-64
- Sharma A, Straubinger RM. 1994. Novel taxol formulations: preparation and characterization of taxol-containing liposomes. *Pharm.Res.* 11:889-96
- Sharma US, Balasubramanian SV, Straubinger RM. 1995. Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (Taxol) complexes with cyclodextrins. *J.Pharm.Sci.* 84:1223-30
- Sharma US, Sharma A, Chau RI, Straubinger RM. 1997. Liposome-mediated therapy of intracranial brain tumors in a rat model. *Pharm.Res.* 14:992-8
- Singla AK, Garg A, Aggarwal D. 2002. Paclitaxel and its formulations. *Int.J.Pharm.* 235:179-92
- Stevens PJ, Sekido M, Lee RJ. 2004. A folate-receptor-targeted lipid nanoparticle formulation for a lipophilic paclitaxel prodrug. *Pharm Res* 21:2153-7
- Straubinger R, Balasubramanian S. 2005. Preparation and characterization of taxane-containing liposomes. *Methods Enzymol* 391:97-117
- Strieth S, Eichhorn ME, Sauer B, Schulze B, Teifel M, et al. 2004. Neovascular targeting chemotherapy: encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature. *Int J Cancer* 110:117-24
- The Merck Index. 1989. *The Merck Index*. 11 ed. U.S.A.
- Treat J, Damjanov N, Huang C, Zrada S, Rahman A. 2001. Liposomal-encapsulated chemotherapy: preliminary results of a Phase I study of a novel liposomal paclitaxel. *Oncology (Huntingt)* 15:44-8
- Vasir JK, Labhassetwar V. 2007. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 59:718-28
- Videira M, Almeida AJ. 1998. Can solid lipid nanoparticles be produced by a simple emulsion/solidification technique? *Proceed. III Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery (Lisbon)*:125-6
- Videira M, Almeida AJ, Müller RH. 2000. Formulation and physical stability assessment of SLN containing paclitaxel. Incorporation of paclitaxel in SLN: assessment of drug-lipid interaction. *Proceed. 3rd World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (Berlin)*:453-4
- Wang J, Mongayt D, Torchilin VP. 2005. Polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs: preparation and anticancer activity in vitro of paclitaxel incorporated into mixed micelles based on poly(ethylene glycol)-lipid conjugate and positively charged lipids. *J Drug Target* 13:73-80

- Willey TA, Bekos EJ, Gaver RC, Duncan GF, Tay LK, et al. 1993. High-performance liquid chromatographic procedure for the quantitative determination of paclitaxel (Taxol) in human plasma. *J.Chromatogr.* 621:231-8
- Yang T, Cui FD, Choi MK, Lin H, Chung SJ, et al. 2007. Liposome Formulation of Paclitaxel With Enhanced Solubility and Stability. *Drug Delivery* 14:301-8
- Zhang X, Burt HM, Mangold G, Dexter D, Von Hoff D, et al. 1997. Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel. *Anticancer Drugs* 8:696-701
- Zhang X, Jackson JK, Wong W, Min W, Cruz T, et al. 1996. Development of biodegradable polymeric paste formulations for taxol: An in vitro and in vivo study. *Int.J.Pharm.* 137:199-208
- Zhang XJ, J.K.; Burt H.M. 1996. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *International Journal of Pharmaceutics* 132 195-206

CAPÍTULO 5

DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA
TERAPÊUTICA DE NSLP-PTX

5.1. Introdução

5.1.1. Quimioterapia em oncologia

Actualmente, a quimioterapia tem demonstrado ser eficaz no tratamento de numerosas neoplasias, especialmente quando diagnosticadas em fases precoces da doença. No entanto, à medida que esta progride a célula neoplásica adquire diferentes características fenotípicas, das quais a capacidade de disseminação e metastização, é sem dúvida responsável por um prognóstico mais reservado (Witte *et al.* 2006a).

Nas últimas décadas observaram-se avanços significativos relativamente às tecnologias que envolvem os meios de diagnóstico, a elucidação das vias bioquímicas, a selecção de possíveis alvos terapêuticos e a introdução de novas moléculas. No entanto, é fundamentalmente uma abordagem de todo o processo à escala nanométrica que mais tem contribuído para os progressos nesta área (Cuenca *et al.* 2006; Ferrari 2005; Zhang *et al.* 2007). Em consequência um maior número de neoplasias podem ser combatidas sempre que sejam diagnosticados em estadios iniciais da doença. No entanto, a este grupo escapam alguns carcinomas mais agressivos, dos quais se destacam os tumores do pulmão, especialmente o tumor de pequenas células

e as metástases pulmonares resultantes de neoplasia avançada da mama, ovário e testículos.

Entre as neoplasias pulmonares, os carcinomas situados no pulmão profundo apresentam geralmente baixas taxas de resposta à quimioterapia convencional (Sharma *et al.* 2001). Através da administração pulmonar espera-se atingir todo o pulmão, especialmente a região alveolar, aumentando marcadamente a exposição ao fármaco (Ally *et al.* 2005; Koshkina & Kleinerman 2005; Koshkina *et al.* 2003; Rao *et al.* 2003). Este fenómeno foi aliás confirmado pelos dados farmacocinéticos obtidos por cintigrafia no Capítulo 3, onde é visível a presença de nanopartículas na região pulmonar, duas horas após nebulização (Videira *et al.* 2002).

Um outro aspecto relacionado com a inalação de sistemas de veiculação de fármacos está ligado ao sistema linfático associado ao pulmão. Estudos sobre a inalação de dispersões coloidais, especialmente as constituídas por partículas com diâmetro médio na ordem dos 100nm, cujo linfotropismo já havia sido destacado (Illum *et al.* 2001), demonstraram a capacidade destes sistemas atingirem o sistema linfático com posterior acumulação ao nível dos nódulos linfáticos regionais e extra pulmonares (Videira *et al.* 2000; Witte *et al.* 2006b).

A quimioterapia com Taxol® está indicada para o tratamento da neoplasia da mama em estadio avançado. Os resultados clínicos confirmam a eficácia deste fármaco em travar a disseminação metastática, limitar a progressão da doença e aumentar o tempo de sobrevivência dos doentes (Crown *et al.* 2004). Embora utilizado de forma mais condicionada, está também descrita para este fármaco actividade antineoplásica em casos de carcinoma do pulmão (Ettinger 1999; Murphy *et al.* 1993)

O paclitaxel isoladamente apresenta actividade farmacológica *in vitro*, frente a diversos carcinomas. Embora a interacção deste com a tubulina se dê através de uma ligação estequiométrica, a inibição da dinâmica dos microtúbulos e conseqüente bloqueio da mitose ocorre mesmo a baixas concentrações de paclitaxel (Giannakakou *et al.* 2001). No entanto, tal como acontece com outros agentes citostáticos, este fármaco interage igualmente com outros mecanismos intracelulares, dos quais se destaca a estimulação das vias apoptóticas, através da fosforilação do bcl-2, gene que codifica a

oncoproteína que inibe a apoptose e que está sobreexpresso na maioria dos tumores sólidos ou pela indução da proteína *p53* (Huisman *et al.* 2002; Li *et al.* 2005; Murphy *et al.* 1996; Wang *et al.* 2003; Wang *et al.* 2000; Zaffaroni *et al.* 1998).

No entanto, apesar de ser considerado um fármaco eficaz, registam-se com frequência fenómenos de resistência, relacionados sobretudo com a estimulação da glicoproteína-P (Chavanpatil *et al.* 2006; Kondratov *et al.* 2001). Este facto associado à sua elevada toxicidade, sobretudo por administração sistémica, justifica a relevância do desenvolvimento de uma matriz nanométrica visando uma maior biodisponibilidade intracelular a partir da veiculação selectiva deste fármaco.

Neste contexto, torna-se fundamental desenvolver novos sistemas transportadores com afinidade para lesar selectivamente alvos moleculares ao nível celular, principalmente frente a células neoplásicas (Brannon-Peppas & Blanchette 2004; Duncan 2006; Gabizon 2001; Leroux *et al.* 2006; Nie *et al.* 2007).

5.1.2. Terapêutica selectiva na célula neoplásica

Geralmente, a terapêutica da doença neoplásica pressupõe a vectorização celular, isto é, o transportador deve ultrapassar as barreiras biológicas, não ser fagocitado precocemente e, finalmente, ser internalizado na célula, utilizando para isso os mecanismos celulares (Jones *et al.* 2003; Torchilin 2006b). A difusão do sistema nsLp-Ptx no tecido lesado, ainda que aparentemente se deva a um fenómeno de extravasão passiva, está facilitada por alguns aspectos importantes que se materializam nas características fisiológicas da região lesada, nomeadamente edema da matriz extracelular e irregularidades na estrutura de vascularização do tumor (Fang *et al.* 2003; Iyer *et al.* 2006; Maeda *et al.* 2000; Nie *et al.* 2007).

A interacção com os sistemas biológicos depende das propriedades de superfície da partícula coloidal, não sendo por isso estranho que a alteração das propriedades de superfície, nomeadamente em sistemas coloidais, constitua objecto de intenso estudo (Veronese & Pasut 2005; Vonarbourg *et al.* 2006).

A estrutura matricial dos transportadores coloidais, bem como a natureza química dos materiais que lhe dão origem, parece contribuir decisivamente para a sua capacidade de passar ao espaço intracelular e, uma vez no seu interior, permitir a libertação do agente terapêutico (Brannon-Peppas & Blanchette 2004; Torchilin 2006a).

Tendo em consideração o carácter lipófilo do sistema nsLp poder-se-á antecipar a sua tendência para sofrer internalização celular, ou seja, desconhecendo se há interferência de mediadores de membrana, a entrada e o transporte intracelular deverá ser modulado pelas vias endocíticas. Este facto pode contribuir para uma veiculação direccionada para alvos celulares, aumentando a cedência intracelular de fármaco, potenciando desta maneira a actividade antineoplásica (Hodoshima *et al.* 1997; Jones *et al.* 2003; Vasir & Labhassetwar 2007).

Tal como acontece com outros sistemas de veiculação de fármacos, ao tráfego intracelular está associado um processo de digestão da matriz. Contudo, para que este se verifique é necessário que o transportador seja incluído nas vias metabólicas da célula (Jones *et al.* 2003). Alguns autores como Westesen (1997), Videira (2002), Manjunath and Venkateswarlu (2005) e Karsten Mader (2006) têm vindo a destacar a biocompatibilidade deste sistema de partículas, sobretudo devido à natureza lipídica da matriz (Mader 2006; Manjunath & Venkateswarlu 2005; Videira *et al.* 2002; Westesen *et al.* 1997). Considerando que estão activos os mecanismos bioquímicos necessários à digestão intracelular, a sua estimulação resulta na degradação selectiva dos acilgliceróis presentes, da qual resulta a libertação do fármaco no interior do citoplasma. Este fenómeno, que deve ocorrer no espaço intracelular, concorre para que aí se atinja uma concentração elevada. Simultaneamente, a supressão de fármaco a nível sistémico pode promover a diminuição de efeitos secundários associados à forma livre.

A associação de fármacos a sistemas de veiculação, sobretudo quando se trata de agentes antineoplásicos, associa a redução da toxicidade ao aumento do tempo de circulação *in vivo* (Duncan 2006; Nie *et al.* 2007). Adicionalmente, pelas características fisiológicas do tecido com neoplasia e tendo em conta as possíveis alterações das características de permeabilidade e retenção dos tecidos é possível que se observe para as nsLp uma tendência

para se acumularem nessa região (Fang *et al.* 2003; Iyer *et al.* 2006; Maeda *et al.* 2000).

A conjugação desta hipótese com o perfil de deposição pulmonar e o linfotropismo associado às nanopartículas lipídicas sugerem que este sistema pode contribuir para diminuir a concentração de fármaco a administrar, ao otimizar quer a selectividade para tumores sólidos, quer a concentração local de fármaco.

Considerando o padrão de deposição e eliminação pulmonar do sistema nsLp é possível que a concentração de nanopartículas nos espaços alveolar e intersticial, contribua ainda para:

- inibir a progressão das micrometástases pulmonares
- impedir a fixação de micrometástases de tumores primários residentes em outros órgãos

Neste capítulo, a eficácia do Ptx após incorporação no sistema nsLp foi testada em modelos de disseminação neoplásica na região pulmonar e comparada com a administração intravenosa do medicamento de referência, o Taxol®.

Para o efeito delinearam-se dois protocolos experimentais fazendo variar o início do tratamento e o número de administrações.

Os resultados foram avaliados através da análise de 3 parâmetros: (i) taxa de sobrevivência, (ii) diminuição do tamanho dos tumores e (iii) ausência de neoplasia.

Pretendeu-se com este estudo avaliar a possível afinidade para tumores sólidos de um sistema de veiculação de fármacos e o efeito terapêutico obtido a partir da deposição e acumulação local de Ptx associado a nanopartículas lipídicas.

A monitorização do estado geral do modelo animal serviu para a determinação da toxicidade sistémica, subjacente à administração pulmonar de nanopartículas lipídicas, de forma a permitir que num futuro próximo se torne possível desenhar com este sistema protocolos de tratamento menos agressivos para os doentes em oncologia.

O trabalho experimental foi realizado no Institut de Recerca Oncològica (Barcelona) sob a orientação da Doutora Angels Fabra.

5.2. Materiais

5.2.1. Materiais

O sistema nsLp-ptx, com base no lípido Precirol® ATO 5, foi preparado com descrito no capítulo 4, com 3% (m/v) de lípido e 50% (m/m) tensoactivo. A solução de Taxol® (paclitaxel 6mg/ml) foi adquirida à Bristol-Myers Squibb Farmacêutica Portuguesa SA (Portugal). A solução de tripsina (DIFCO) foi preparada a 0,15% em PBS com 0,08% de EDTA. Os reagentes, tampão fosfato salino pH=7,4 (PBS), ácido etileno-diaminotetracético (EDTA), ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfónico (HEPES), Azul de tripano, dimetilsulfóxido (DMSO) e 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio (MTT), foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Barcelona, Espanha).

Para a observação celular e caracterização morfológica das preparações frescas, utilizou-se um microscópio de contraste de fase (Axiovert 135 Zeiss, Berlin, Alemanha, com máquina fotográfica acoplada). Para a preparação e manutenção das culturas celulares, utilizaram-se frascos de cultura de 75 cm³ e placas de 96 poços estéreis (Costar, UK).

a. Animais

Utilizaram-se ratinhos fêmea da estirpe B6D2F1 (IFFA-CREDO, Lyon, França) com cerca de 6 semanas (18-20g), instalados em jaulas de Makrolon® (220cm× 220cm×145cm).

b. Linhas celulares

Seleccionou-se como modelo experimental celular a variante MXT-B2 (Llorens *et al.* 1997). Trata-se de uma subpopulação celular de adenocarcinoma de mama de ratinho, com elevada potencial metastático (secção 5.2.2).

Todos os procedimentos para cultivo e manutenção de células foram realizados em câmara estéril (class II biological safety: Nuair Biological Safety Cabinets, Class II Type CZ, Plymouth, MN, USA).

As células em cultura foram mantidas em estufa a 37°C com humidade relativa de 95% e atmosfera de 5% de CO₂ (Heraeus Instruments, South

Plainfield, UK). Em todos os meios de cultura foi efectuado o rastreio de Mycoplasma.

c. *Macrófagos peritoneais de rato*

Macrófagos peritoneais de rato foram obtidos após injeção intraperitoneal de 10ml de uma solução de tampão fosfato isotónico (PBS) 0,15M a pH=7,2 . Com o animal anestesiado foram realizados movimentos nos membros inferiores durante aproximadamente 1 minuto. Com o auxílio de uma seringa (19G*1) recolheu-se o exsudado peritoneal de macrófagos residentes para tubos de centrifuga estéreis. A suspensão celular foi centrifugada a 1200 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos. Depois de rejeitar o sobrenadante, as células foram dispersas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado (Roswell Park Memorial Institute), semeadas e incubadas por 12h . A viabilidade celular foi determinada através do ensaio colorimétrico do reagente MTT.

d. *Macrófagos bronco-alveolares humanos.*

Os lavados brônquicos foram gentilmente cedidos pelo serviço de análise patológica do Hospital Pulido Valente (Lisboa). Dada a fragilidade desta linha celular apenas se procedeu à centrifugação dos mesmos a 1400 r.p.m., seguido da suspensão das células em meio RPMI-1640 suplementado, cultura em placa de 96 poços e 72h de incubação.

e. *Meios de cultura*

Culturas de macrófagos peritoneais de rato e de macrófagos bronco-alveolares humanos foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) adquirido à Gibco-BRL/life Technologies (Invotrogen S.A., Espanha) previamente suplementado com FBS inactivado 10% (Soro Fetal Bovino), HEPES (10mM), L-Glutamina 0,3% (Sigma-Aldrich, Espanha) piruvato de sódio (1mM), estreptomina (100µg/ml) e penicilina (100U/ml), todos adquiridas à Sigma-Aldrich (Espanha).

As suspensões celulares em PBS (1ml) utilizaram-se para estimar o número de células viáveis. As células foram contadas em câmara de Neubauer após adição da solução de azul de tripano em PBS (1:1).

As células MXT-B2 (Llorens *et al.* 1997) foram semeadas em frasco de cultura de 75 cm³ (Costar, High Wycombe, UK) e mantidas em meio mínimo essencial Dulbecco's e Ham's F-12 (1:1 (v/v)) ambos adquiridos à (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), suplementado com 10% FCS inactivado (Fetal Calf Serum), 1% piruvato de sódio (1mmol/L) e 1% L-Glutamina (2mmol/L) todos adquiridos à Sigma-Aldrich (Espanha), solução de vitaminas (GIBCO, BRL) e 1% penicilina-streptomina (50 µg/mL) Sigma-Aldrich, (Espanha). Na preparação dos inóculos de MXT-B2 para administração intravenosa utilizou-se o mesmo meio, mas sem adição de FCS.

f. Ensaio de viabilidade celular pelo reagente MTT

Utilizou-se um método colorimétrico (MTT) (Mosmann 1983), que se baseia na capacidade que células viáveis e metabolicamente activas apresentam em reduzir os sais de tetrazólio (amarelos) a cristais insolúveis de formazan (púrpura), através da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. A absorvência determinada a 540nm foi convertida em percentagem de células viáveis que por comparação com um controlo não incubado com partículas, expressa o efeito do fármaco na viabilidade celular.

Resumidamente, a cada poço foram adicionados 45µl de uma solução de MTT (5mg MTT/ml em tampão fosfato a pH=7.4), seguido de homogeneização e incubação durante 2h. Adicionaram-se 100 µl de uma solução de DMSO às células aderentes, depois de lavadas com PBS e secas, para promover a dissolução dos cristais de formazan formados. A absorvência da solução em cada poço é lida a 540nm num leitor de placas (DYNATECH MR7000 Instruments, Germany), após calibração do aparelho com meio de cultura não exposto à amostra de nanopartículas.

g. Fluorescência

A avaliação da internalização celular das nanopartículas lipídicas foi feita com recurso a um marcador de fluorescência. Partindo da dissolução prévia de DPH (1,6-diphenyl-1,5-hexatriene. P.M.=232.32; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) em etanol obteve-se uma solução com uma concentração de [0,01M]. Produziram-se as formulações com sonda de fluorescência, nsLp-DPH, com 3% Precirol ATO5 e 50%(m/m) tensioactivo. Utilizou-se o

método descrito no Capítulo 2: homogeneização por 10 minutos a 14.000 r.p.m. a uma temperatura 20°C superior ao ponto de fusão do lípido. Todas as células foram expostas a uma concentração de 5×10^{10} nanopartículas (nsLp-DPH), no entanto o procedimento variou com a linha celular, como a seguir se descreve.

- A suspensão celular de macrófagos peritoneais foi semeada a uma densidade de 5×10^4 células por poço, no qual havia sido previamente colocada uma lamela estéril. Para observação da população de macrófagos bronco-alveolares foram utilizadas culturas de células aderentes. Após incubação (1 hora) com cerca de 5×10^{10} nanopartículas (nsLp-DPH) por poço, procedeu-se à lavagem e reposição de meio essencial suplementado, seguido de outro período de incubação (12 horas) As lamelas foram retiradas, lavadas em PBS e montadas em lâmina, com 4µl de fluoroprep (bioMerieux S.A., França).
- Utilizando uma suspensão celular de MXT-B2, em meio mínimo essencial, incubaram-se 2×10^4 de células em lamelas colocadas em placas de 6 poços (Costar®; Sigma-Aldrich, UK). Às células aderentes em monocamada, adicionaram-se 100µl da suspensão de nsLp-DPH diluída em PBS, de modo a obter aproximadamente 5×10^6 nanopartículas por poço. As placas foram levadas ao incubador por 1 hora a 37°C em atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂. Após este período, o meio foi removido e às células aderentes foi adicionada uma solução de glicerol a 5%, depois de lavadas duas vezes com PBS.

Para observação das células aderentes, utilizou-se um microscópio confocal de fluorescência equipado com um filtro de excitação (452nm) Axiovert 35 (LSM-510. Carl Zeiss Medi Inc., Jena, Germany) ligado a um sistema de imagem ApoTome Imaging System (Carl Zeiss Medi Inc., Jena, Germany).

5.2.2. Linha celular tumoral

Uma considerável diversidade de modelos tem sido desenvolvido para o estudo de tumores humanos, dos quais os mais comuns incluem células epiteliais hiperproliferativas. A variante MXT-B2 (Llorens *et al.* 1997) provém de células isoladas de tecido epitelial de carcinoma da mama de ratinho

(murine mammary adenocarcinoma-MXT), que correspondem a subpopulações celulares representativas de diferentes estadios da doença. O modelo, constituído por células epiteliais com elevada capacidade hiperproliferativa e elevado grau de malignidade, apresenta capacidade para induzir o aparecimento de metástases pulmonares experimentais, após administração intravenosa da suspensão celular. Mais tarde, o mesmo grupo isolou outra variante, a linha celular MXT-C1.1, que após implantação sub-epitelial desenvolve carcinoma da mama localizado. Esta variante desenvolve-se rapidamente a nível local, sem no entanto apresentar indícios de metastização até à excisão do tumor primário. Nesta altura, dá-se o desenvolvimento de metástases espontâneas ao nível pulmonar.

Selecionou-se para este estudo a linha celular MXT-B2, devido ao padrão de reprodutibilidade que apresenta no desenvolvimento de metástases experimentais, após inoculação intravenosa em ratinhos. As células, foram mantidas em cultura aderente em meio mínimo essencial suplementado. A suspensão celular (com viabilidade superior a 90%), a uma densidade de 50.000 células por 100µl de meio mínimo não suplementado, foi preparada a partir de células em fase de crescimento exponencial. As células aderentes tratadas com uma solução de tripsina a 0,1% (p/v), foram lavadas e suspendidas em meio mínimo essencial não suplementado. A contagem das células viáveis foi feita utilizando o corante azul de Tripano.

Após inoculação das células pela veia da cauda os animais desenvolveram metástases experimentais ao nível do pulmão, como confirmado pelo grupo controlo, aos 30 dias do ensaio.

5.3. Métodos

5.3.1. Viabilidade celular

A determinação *in vitro* da percentagem de células viáveis com capacidade proliferativa, com base em métodos previamente descritos, foi utilizada em:

- estudo de citotoxicidade por incubação de nsLp em populações celulares de macrófagos peritoneais de rato;

- estudos de eficácia citotóxica de nsLp-Ptx frente a culturas de células com actividade hiperproliferativa.

a. Estudos de internalização de nsLp em cultura celulares de macrófagos

Foram plaqueadas 10^4 células por poço e incubar em estufa por 12 horas (5% CO₂, 85%HR). As células não aderentes foram removidas por lavagem dos poços com PBS pH 7,4. As células foram expostas a concentrações crescentes de nsLp diluídas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado ($9,72 \times 10^7$ a $4,86 \times 10^{11}$ partículas/100µl), por um período de 2h à temperatura ambiente. O meio foi substituído por meio fresco seguindo-se um período de incubação de 12h. A viabilidade celular, avaliada pelo método do corante MTT, foi expressa em percentagem de sobrevivência referente às células controlo consideradas 100%.

Nos estudos em cultura de macrófagos bronco-alveolares humanos a viabilidade celular foi avaliada por observação microscópica. Foram adicionados 100µl de nsLp ($4,86 \times 10^{10}$ partículas/ml) à cultura aderente e após 1h de tempo de contacto, o meio foi substituído e as células incubadas por 24h.

b. Estudos de internalização de nsLp em linha celulares MXT B2

A citotoxicidade das partículas nsLp-Ptx foi avaliada por comparação com a solução de Taxol®, após exposição das células neoplásicas MXT-B2 a concentrações crescentes de fármaco. Partindo da suspensão de nsLp, nsLp-Ptx e da solução de Taxol®, prepararam-se amostras com concentrações crescentes de paclitaxel, por diluição em meio fresco da solução mãe de fármaco livre (0,5; 5,0 e 50 µg/ml) ou encapsulado (0,1; 1,0 e 10 µg/ml). Utilizou-se o ensaio de MTT, tal como descrito anteriormente, para determinar a viabilidade celular.

A suspensão celular, com um mínimo de 90% de viabilidade celular, deve ser ajustada a uma concentração de 5000 células por 100 µl de meio mínimo essencial suplementado. Em placas de 96 poços, 5000 células por poço (100 µl) foram semeadas em meio mínimo essencial suplementado e incubadas por 24h. Após este período, foram adicionados 100 µl de cada amostra (n=3), equivalentes a concentrações crescentes de fármaco livre e

incorporado. A exposição ao fármaco decorreu durante duas horas, depois das quais o meio foi substituído por meio fresco seguindo-se um período de incubação de 12 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do corante MTT.

c. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média e o desvio padrão de replicados (n=4). A significância das diferenças entre amostras de nsLp-Ptx e Taxol® foi determinada, por ajustamento de um modelo sigmóide aos dados obtidos, utilizando regressão não linear, de acordo com a Equação 5-1:

$$Y=100/(1+10^{-(x-a)/b}) \qquad \text{Equação 5-1}$$

A Equação 5-1 representa um modelo dose-resposta onde (a) reflecte a DL50 e (b) representa o declive.

A qualidade do ajustamento foi avaliada através da realização de uma ANOVA.

5.3.2. Actividade antineoplásica in vivo

A completa supressão de metástases alojadas na região pulmonar foi avaliada em modelo animal, após inoculação de células neoplásicas. Os animais foram divididos aleatoriamente, em grupos de 5 animais, após inoculação intravenosa de 5000 células viáveis da linha MXT-B2. Considerando o padrão de fixação e desenvolvimento destas células (Llorens *et al.* 1997) desenvolveram-se dois protocolos, para os quais variou a hipótese colocada.

Para a determinação da dose a administrar utilizaram-se os dados recolhidos nos testes *in vitro*. Nos estudos que envolveram a administração intravenosa da solução de Taxol® a dose administrada foi extrapolada a partir da concentração média frequentemente utilizada em tratamentos clínicos; 175mg/m² de superfície corporal (Bristol-Myers Squibb Company, UK. Taxol® - Resumo das características do medicamento-2005) e corrigida de acordo com o valor calculado de IC50.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em grupos de 5 animais por gaiola, devidamente identificados. As gaiolas de Makrolo^R

(220cm×220cm×145cm) foram instaladas em ambiente controlado (22±2°C; humidade relativa, 50 a 70%). A luz foi fornecida em ciclos de 12 horas e os animais tiveram acesso livre à água e à ração.

Os procedimentos experimentais tiveram em consideração o bem estar dos animais, tendo sido aprovados pela comissão de Ética do Institut de Recerca Oncològica em Barcelona. Todas as práticas foram realizadas de acordo com as normas internacionais que regulam o alojamento, ensaios e tratamento de animais de laboratório nomeadamente a Directiva Europeia 86/609/CEE.

a. Planeamento experimental

Os animais foram sujeitos a uma fase de aclimação antes do início do trabalho experimental (Fase I). A cada animal foram administradas, através da veia da cauda (Fase II), 50.000 células MXT-B2, correspondendo este passo ao tempo zero do estudo. Relativamente ao modelo, este progride para o desenvolvimento de metástases experimentais em duas fases: (i) disseminação e fixação metastática (Fase III), (ii) desenvolvimento de tumores (Fase IV).

"End point"- O tempo estimado para a recolha de dados relevantes para as hipóteses em estudo foi de 45 dias. A perda de mais de 10% de massa corporal e, ou o aparecimento de lesões exteriores, foram considerados parâmetros limite do modelo, determinantes para a continuidade do estudo. Por este motivo a leitura do peso dos animais foi realizada semanalmente.

A Figura 5-1 representa esquematicamente as diferentes fases do modelo testado e os tempos correspondentes a cada fase.

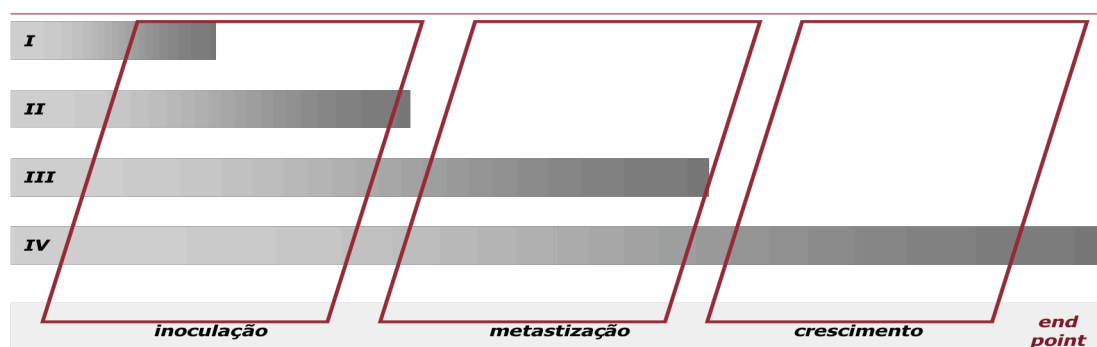


Figura 5-1: (I) aclimação-7dias; (II) inoculação - após 7 dias; (III) disseminação - 15 dias (IV) crescimento - dos 15 aos 45 dias.

Após sacrifício dos animais, os pulmões são isolados e observados para determinação do número e tipo de lesão. No caso de pulmões onde não foram observadas lesões recorreu-se a uma segunda observação com o auxílio de uma lupa (lupa binocular SZ 4045TR-CTV (Olympus, Tokyo), com a ampliação máxima (40x).

Foram definidos, para a aquisição de dados, os seguintes padrões de lesão pulmonar: (i) lesões contáveis e mensuráveis com diâmetro superiores a 0,1mm, (ii) lesão extensa ou maior ou igual a 20, (iii) ausência de lesão por observação macroscópica e com auxílio de lupa (40x).

Parâmetros a avaliar no estudo:

- taxa de supressão total de metástases pulmonares;
- número de animais sem metástases em cada grupo;
- incidência de metástases em cada grupo de animais inoculados;
- pulmão com metástases/animais inoculados;
- animais com metástases pulmonares:
 - volume médio do tumor (mm³) em cada grupo.

b. Protocolo 01

Pretendeu-se determinar a actividade terapêutica das diferentes formulações, em termos de supressão total ou diminuição do número de metástases, relativamente ao grupo controlo. Para isto, os tratamentos foram desdobrados como descrito na Tabela 5-1, de modo a simular uma fase de tratamento puramente preventiva (t0-t15) e uma fase terapêutica, onde, de acordo com as fases de progressão da doença esperadas para o modelo (Figura 5-1), já haverá metástases disseminadas a nível pulmonar (t15-t45).

Tabela 5-1: Esquema representativo dos grupos de tratamento e códigos atribuídos durante a fase de prevenção e a de tratamento.

Protocolo 01	Prevenção	Terapêutico
Taxol®	GC01	GE01
nsLp-Ptx por inalação	GD01	GF01

Os animais foram distribuídos aleatoriamente, por grupos de 5 animais, de acordo com o número e classe do tratamento administrado, como esquematizado na Figura 5-2.

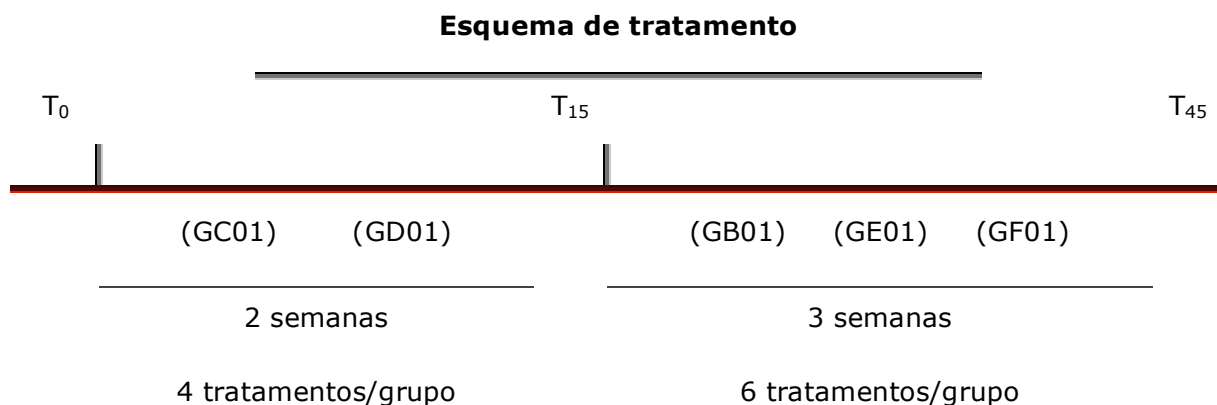


Figura 5-2: A dose unitária e o número de tratamentos, variaram para cada grupo. O grupo controle, GA03, não fez qualquer tipo de tratamento. O grupo ao qual foram administradas partículas sem fármaco, GB03, recebeu o mesmo número de administrações que o grupo GE03.

Grupo A- A01: grupo de animais inoculados que não recebeu tratamento.

Grupo B- GB01: grupo tratado por inalação de nsLp sem fármaco ($6,48 \times 10^{12}$ nanopartículas/2ml de volume inalado). Início de tratamento duas semanas após inoculação das células.

Grupo C- GC01: administração intravenosa de doses unitárias de 120 μ g de Taxol®/0,1ml de PBS. Início de tratamento imediatamente após inoculação das células, com um total de quatro tratamentos.

Grupo D- GD01: grupo tratado com nsLp-Ptx por inalação (aproximadamente 100 μ g de paclitaxel/2ml volume inalado). Início do tratamento, imediatamente após inoculação das células, total de quatro tratamentos.

Grupo E- GE01: administração intravenosa de doses unitárias de 120 μ g de Taxol® /0,1ml de PBS. Início de tratamento duas semanas após inoculação das células, com um total de seis tratamentos.

Grupo F- GF01: grupo tratado com nsLp-Ptx por inalação (aproximadamente 100 μ g de paclitaxel/2ml volume inalado). Início de tratamento duas semanas após inoculação das células, com um total de seis tratamentos.

c. Protocolo 02

Pretendeu-se avaliar a eficácia de um tratamento prolongado por inalação de nsLp-ptx em aerossol. Neste ensaio manteve-se a dose de 55 µg/ml (cerca de 2 ml) assim como o tempo de administração (10 minutos). O número de tratamentos variou passando para o dobro dos tratamentos efectuados no protocolo 01. Administraram-se doses de partículas vazias equivalentes às amostras de nsLp-Ptx como no estudo anterior.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente, por grupos de 6 animais, de acordo com o tratamento, como esquematizado na Figura 5-3.

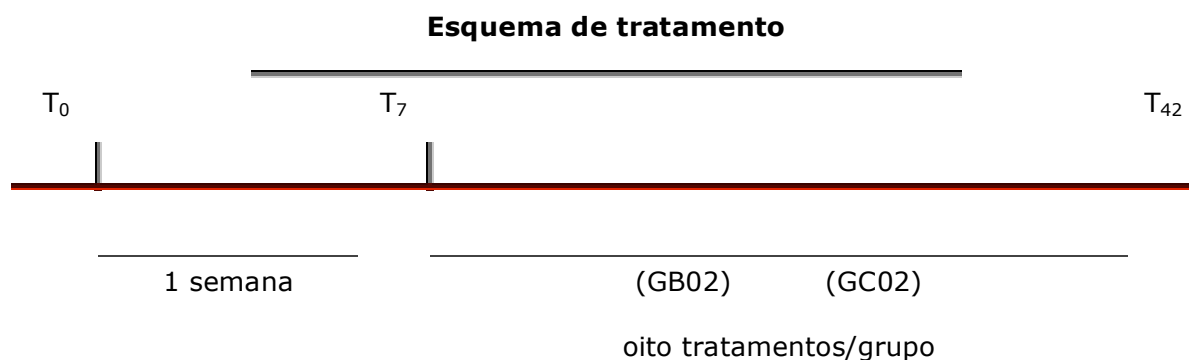


Figura 5-3: O grupo controlo, GA02, não fez qualquer tipo de tratamento.

Grupo A- GA02: grupo de animais inoculados que não recebeu tratamento.

Grupo B- GB02: grupo tratado por inalação de nsLp sem fármaco ($6,48 \times 10^{12}$ nanopartículas/2 ml de volume inalado). Início de tratamento uma semana após inoculação das células, total de oito tratamentos com uma frequência de dois tratamentos por semana.

Grupo C- GC02: grupo tratado com nsLp-ptx por inalação (aproximadamente 100µg de paclitaxel/2ml volume inalado). Início do tratamento uma semana após inoculação das células, total de oito tratamentos com uma frequência de 2 tratamentos por semana.

d. Procedimentos de Inalação

Para a administração do aerossol de nsLp-Ptx utilizou-se uma câmara de inalação ligada ao nebulizador (Figura 5-4).

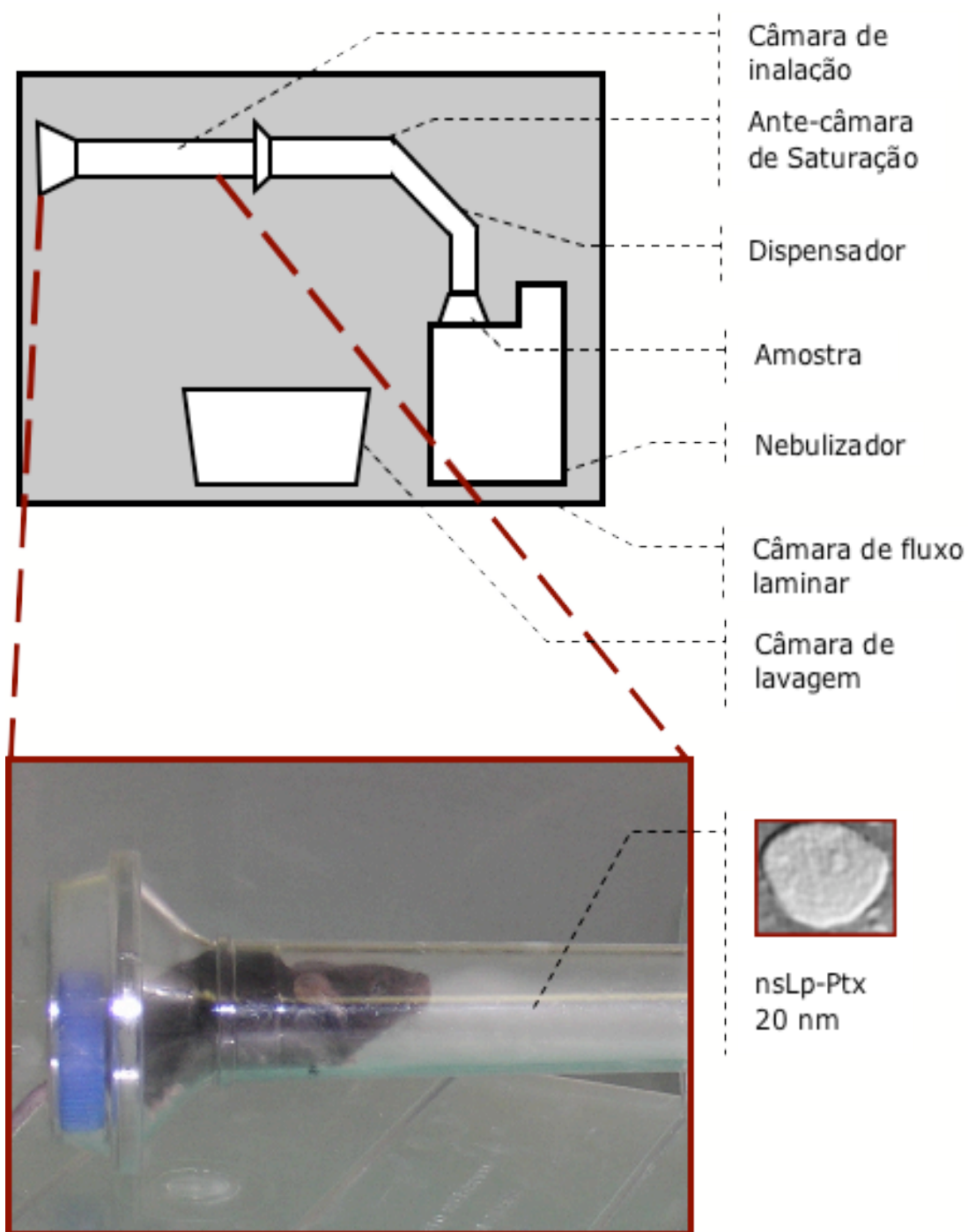


Figura 5-4: Esquema do protocolo utilizado para a administração do aerosol de nsLp e nsLp-Ptx. São identificados na imagem, a câmara de inalação, o nebulizador e a antecâmara destinada a diminuir o fluxo do aerosol formado. O esquema proposto teve como objectivo a saturação da câmara de inalação de modo a que a velocidade de inalação fosse limitada apenas pelo fluxo respiratório do animal (90 movimentos por minuto para um volume médio inalado de 200 μ l [Alexander Nepomuk,1998]).

O equipamento foi montado no interior de uma câmara de fluxo laminar (class II biological safety: Nuair Biological Safety Cabinets, Class II Type CZ, Plymouth, MN, USA) de modo a impedir a contaminação do operador por inalação de Ptx.

Cada animal é colocado na câmara em posição horizontal, onde permanece durante todo o ensaio a respirar normalmente. A nebulização decorre durante 10 minutos (Figura 5-4), correspondendo este tempo a um volume de inalação de cerca de 2ml de amostra. O volume inalado é estimado de acordo com a diferença entre o volume inicial e o volume residual após nebulização da amostra. A concentração de Ptx nas amostras foi determinada antes e depois da nebulização, de modo a calcular um valor de dose média administrada.

Após administração, o animal é retirado, lavado com uma solução diluída de etanol e isolado numa gaiola intermédia por cerca de 10 minutos. Depois deste tempo, registou-se o peso do animal, que é em seguida reposto na respectiva gaiola.

5.4. Resultados

5.4.1. Determinação in vitro da toxicidade de nsLp

A toxicidade *das nsLp* foi avaliada por incubação de concentrações crescentes de nanopartículas em culturas de macrófagos peritoneais de rato e de macrófagos bronco-alveolares humanos. Os dados registados na Tabela 5-2 indicam que existe uma dependência entre o número de nanopartículas presentes na amostra e a viabilidade celular das células expostas.

Verificou-se que culturas celulares, expostas a amostras com cerca de $9,72 \times 10^9$ de nanopartículas, não apresentam alteração da viabilidade celular. Pelo contrário, concentrações de nanopartículas dez ou cem vezes superiores, provocam uma diminuição, embora pouco acentuada, no número de células viáveis. A partir desse ponto, a viabilidade decresce abruptamente apenas com um aumento de 0,3 da unidade logarítmica (Figura 5-5). Este fenómeno é acompanhado de uma turvação persistente na cultura celular,

contrariamente ao verificado com as amostras anteriores, onde passado uma hora o meio se apresentava translúcido.

Tabela 5-2: Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais utilizando o teste de MTT de rato. Diluições em meio de cultura a partir de uma amostra com $9,72 \times 10^{12}$ partículas/ml.

(volume de amostra)	(Nº partículas $\times 10^{12}$)	(% cél. viáveis)
Controlo	-	100
200 μ l	1,94	31
100 μ l	0,97	85
10 μ l	0,097	95
1 μ l	0,0097	102

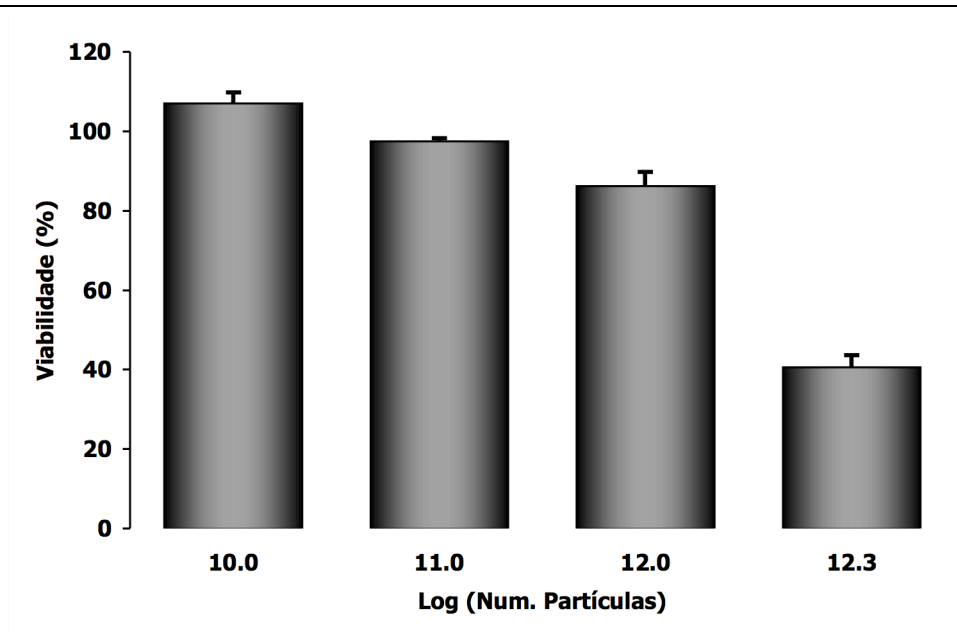


Figura 5-5: Efeito da concentração de nanopartículas sem fármaco na viabilidade celular de macrófagos peritoneais de rato.

Nas imagens da Figura 5-6 identificam-se, nas duas linhas celulares, vesículas citoplasmáticas onde aparentemente estão localizadas as nanopartículas que atingiram o espaço extra-celular. O padrão de dispersão destas estruturas no citoplasma, após internalização celular, pode ser

atribuído a vesículas endossômicas o que envolve a ativação das vias lisossomais. Este mecanismo foi confirmado mais tarde, quando aos 90 minutos de exposição, as células ao microscópio apresentaram cor verde difusa por todo o citoplasma, não sendo visíveis nesse momento estruturas do tipo vesicular (imagens não incluídas). Aparentemente a velocidade de internalização foi rápida, dado que a totalidade das partículas tinha desaparecido do meio de cultura 30 minutos após a adição à cultura de células.

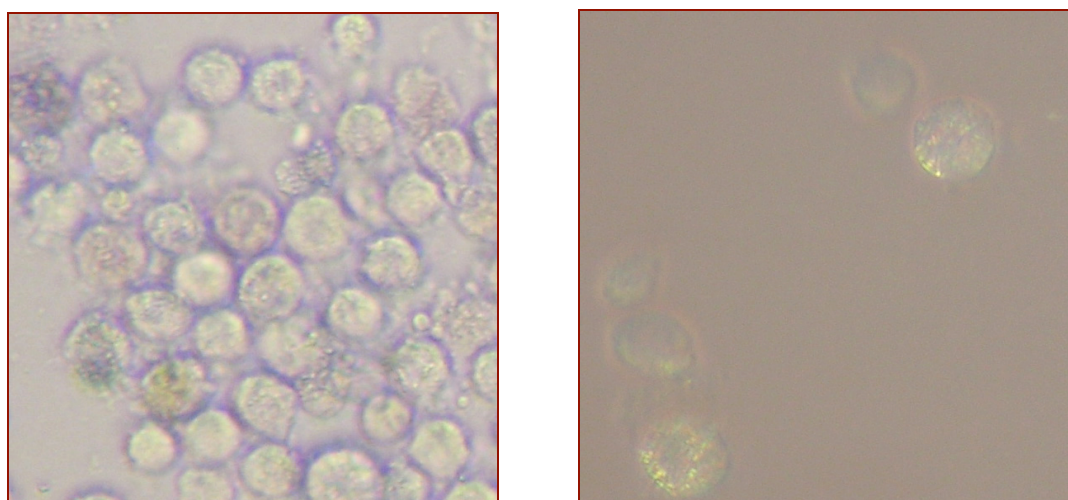


Figura 5-6: Células expostas a uma suspensão com $9,7 \times 10^{10}$ nanopartículas (nslp: 3% Precirol ATO5) marcadas com a sonda de fluorescência DPH. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência. A imagem da esquerda corresponde a uma cultura de macrófagos peritoneais de rato. Na imagens à direita observam-se macrófagos bronco-alveolares humanos em cultura.

a. Determinação *in vitro* de eficácia citotóxica de nsLp-ptx.

Os resultados obtidos neste estudo permitem comparar a actividade *in vitro* do paclitaxel livre e incorporado, frente à variante MXT-B2 de adenocarcinoma mamário de ratinho. As células foram expostas a amostras

de nsLp-Ptx por ordem crescente do logaritmo da concentração de paclitaxel (Figura 5-7).

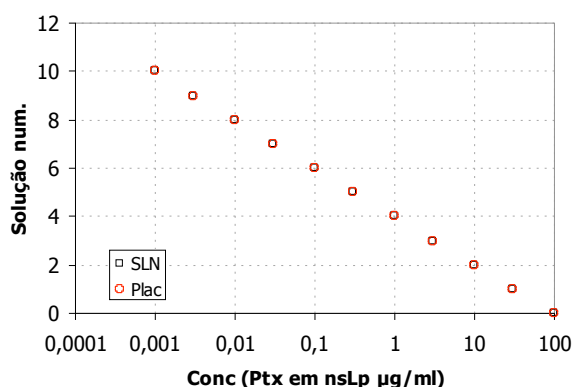


Figura 5-7: Prepararam-se as amostras a partir da representação linear da concentração de PtX incorporado em nsLp, de forma a obter uma distribuição logarítmica das concentrações.

A representação dos resultados do gráfico da Figura 5-8 descreve o perfil de morte celular induzida em função da concentração de paclitaxel ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$), para as formulações em estudo. O paclitaxel em suporte lipídico provou ser mais potente do que o fármaco livre, sendo a concentração de nsLp-Ptx necessária à indução de 50% de morte celular (DL50) cerca de vinte vezes inferior $0,156\mu\text{g}$ ($1,69\mu\text{M}$) quando comparada com o valor de DL50 registado para o fármaco livre $3,39\mu\text{g}$ ($39,70\mu\text{M}$) de Taxol[®] ($p < 0,001$).

A diferença de resposta por parte das células neoplásicas pode ser observada quando se comparam concentrações equivalentes de paclitaxel livre e incorporado. Para valores correspondentes a $0,5\mu\text{g}$ de fármaco, observou-se que a citotoxicidade das nsLp-Ptx provocou uma diminuição significativa da viabilidade celular (39,43%). Pelo contrário, as amostras correspondentes à solução de Taxol[®] apresentam para esta concentração uma actividade citotóxica reduzida que se reflecte numa elevada taxa de sobrevivência (87,85%).

Contrariamente ao observado com o fármaco nanoincorporado, a forma livre não apresenta actividade para concentrações inferiores a $0,05\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ no tempo em que decorreu o ensaio. A exposição das células MXT-B2 a nsLp sem fármaco, no intervalo de $4,86 \times 10^{11}$ a $9,72 \times 10^7$ (partículas /ml), não teve qualquer efeito na viabilidade celular.

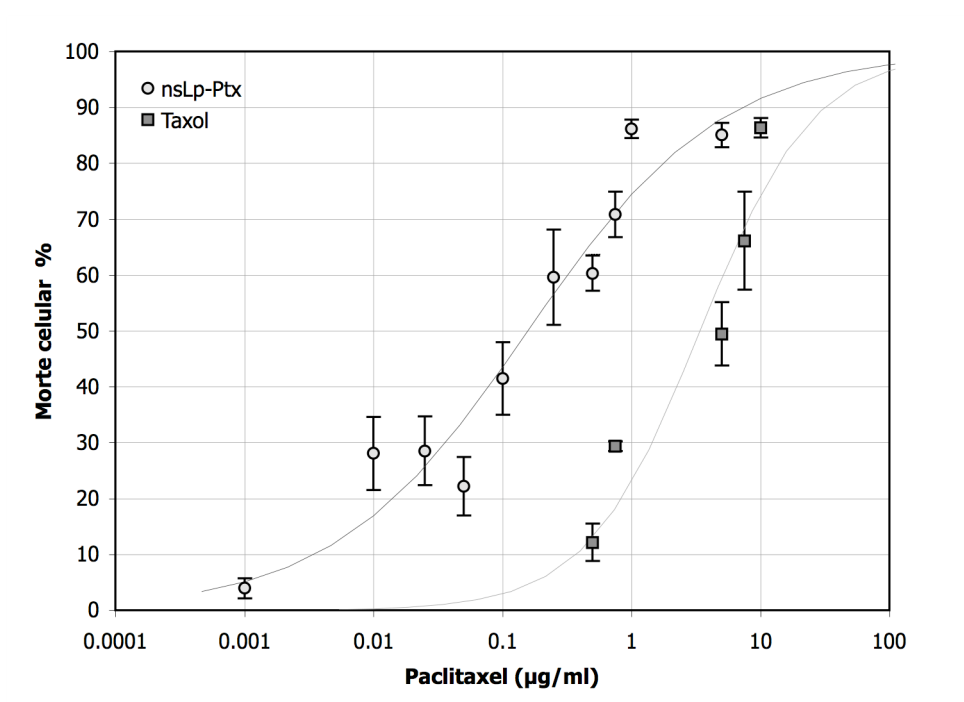


Figura 5-8: Morte celular das células MXT-B2 em cultura celular para concentrações de fármaco equivalentes a μg paclitaxel/poço. Os parâmetros calculados pela ANOVA para a equação 5-1 são: para as nsLp-Ptx, (a) -0,806 e (b) 0,752 e para o Taxol® (a) 0,530 e (b) 0,438.

Na Figura 5-9 podemos observar imagens obtidas após incubação de nsLp-Ptx em cultura de células MXT-B2.

As células expostas à amostra de nsLp-Ptx evidenciam perda de viabilidade celular, tal como havia sido determinado pelo teste de MTT nos ensaios *in vitro*.

Uma vez mais são visíveis vesículas intra-citoplasmáticas (Figura 5-9-A e B), o que sugere que também nestas células as nanopartículas podem ter sido internalizadas por endocitose, com possível formação de vesículas lisossomais e subsequente degradação da matriz lipídica, mecanismo que antecede a liberação do fármaco no citoplasma.

Adicionalmente, as células adquirem uma forma ovalada, sub-divididas em estruturas que aparentam estar rodeadas de membrana (Figura 5-9-C), compatíveis com o poderia ser o início do processo apoptótico.

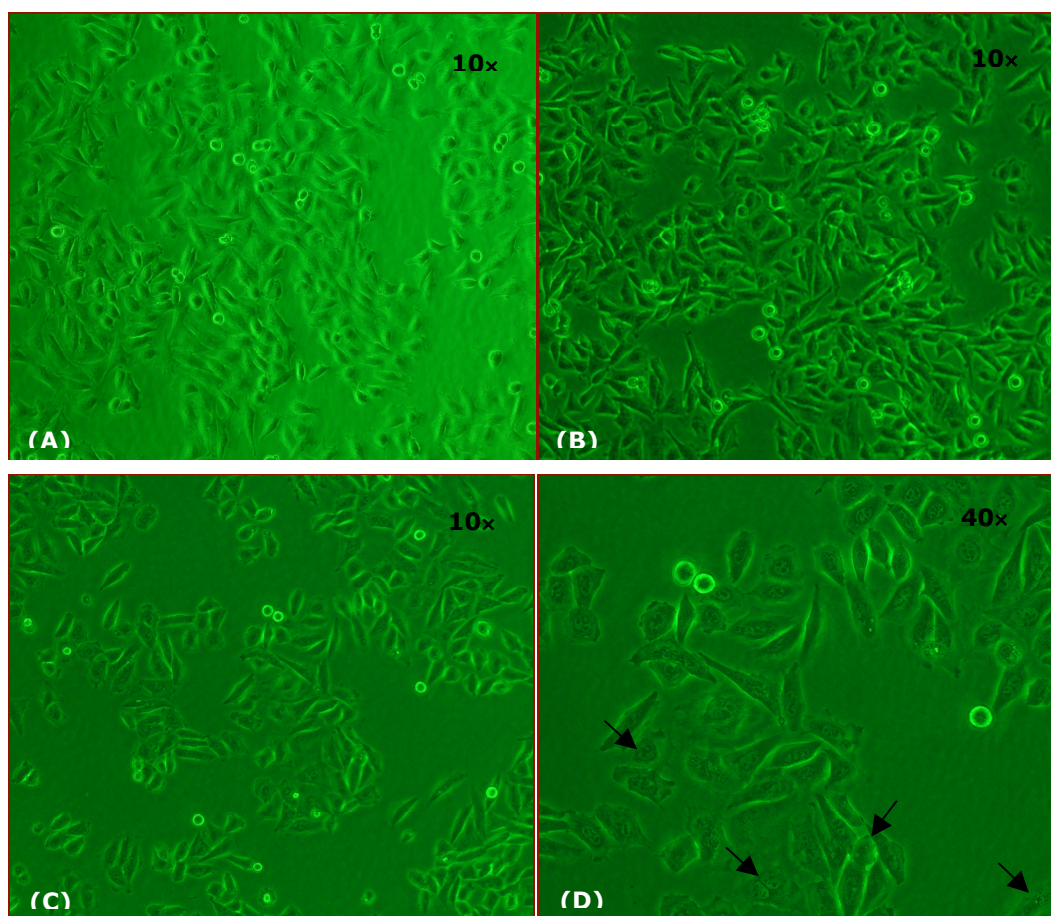


Figura 5-9: Microfotografia de células MXT-B2. As imagens correspondem: cultura de células controlo (A), células incubadas com nsLp sem fármaco (B), células incubadas com nsLp-Ptx (1 μ M) (C) e a mesma amostra, mas com as células observadas com uma magnificência de 40 \times (D). As setas apontam estruturas que se identificam com corpos apoptóticos.

5.4.2. Eficácia do sistema nsLp-Ptx

a. Protocolo 01

O primeiro protocolo, mais abrangente, foi desenhado tendo como objectivo comparar a actividade das diferentes formulações e determinar a influência da via de administração pulmonar. Duas hipóteses foram avaliadas: a primeira pretende demonstrar uma maior eficácia das nsLp-Ptx inaladas quando comparadas com a administração intravenosa de Taxol[®]. A segunda

hipótese, sugere que ao serem direcionadas para a circulação linfática pulmonar as nsLp-Ptx poderiam prevenir a entrada de micrometástases na região pulmonar.

O número e tamanho das metástases pulmonares, nos pulmões retirados após sacrifício, relativo aos grupos de animais tratados com Taxol® (GC01 e GE01), indica a ausência de mecanismos de bloqueio à disseminação e fixação de metástases (Tabela 5-3).

Tabela 5-3: (I) Percentagem de animais por grupo que apresentou lesão pulmonar. (II) Número de metástases por grupo.

	GA01	GB01	GC01	GD01	GE01	GF01
(I)	100	100	100	50	100	75
(II)	120	77	61	6	49	11

Todos os animais apresentaram lesão pulmonar, embora se tenha observado uma diminuição no número de metástases, relativamente aos animais não tratados ou tratados com partículas sem fármaco (Figura 5-10).

O fármaco livre, administrado por via intravenosa duas vezes por semana, 6mg/kg de peso corporal, provocou ainda efeitos adversos, dos quais se destacam letargia e perda de peso acentuada. De facto, o estado dos animais dos grupos (GC01 e GE01) determinou a conclusão precoce do estudo, aos trinta dias, uma vez que a perda de mais de 10% da massa corporal correspondia a um dos parâmetros previamente estipulado como limite da continuidade do estudo.

O tratamento dos ratinhos por inalação de nsLp-Ptx, no grupo de prevenção (GD01) e no terapêutico (GF01), apresentou uma eficácia superior à observada com o fármaco livre (Tabela 5-3). Destacando-se sobretudo a ausência de lesão pulmonar em 3 de 4 animais, bem como uma acentuada diminuição do número de metástases por animal, relativamente aos restantes grupos de animais (Figura 5-10). Não se registaram, durante o estudo com as nsLp-Ptx, fenómenos de toxicidade, como ficou demonstrado pela determinação do peso e a observação do estado geral dos animais destes grupos.

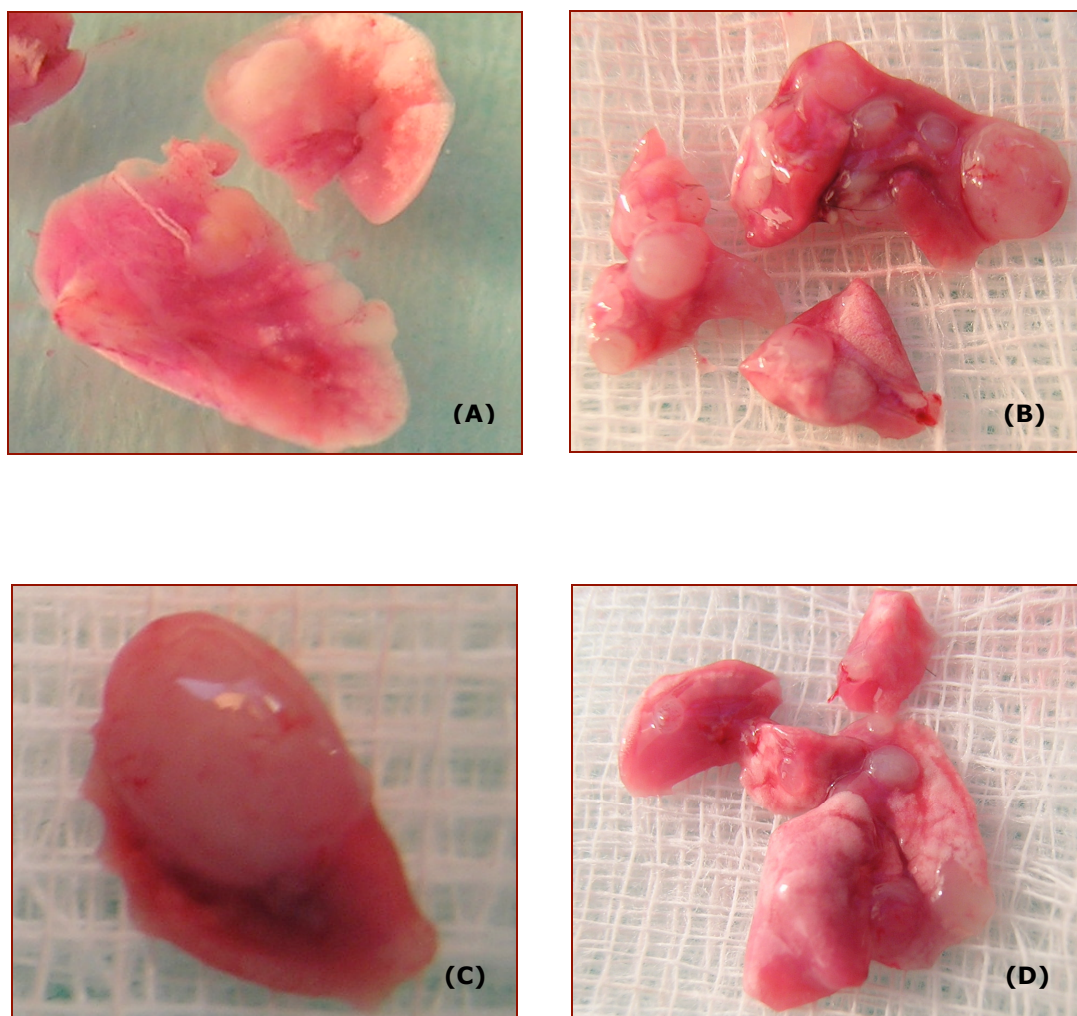


Figura 5-10: Aspecto dos pulmões de ratinho 30 dias após inoculação da suspensão de células MXT-B2. O aparecimento de metastases pulmonares múltiplas de carcinoma da mama, confirma que o modelo é adequado ao estudo da avaliação da eficiência terapêutica de um aerosol de nsLp-Ptx.

Na figura (A) podemos observar micrometástases experimentais com um padrão de disseminação maioritariamente concentrado na região periférica (ratinho tratado com aerosol de nsLp sem fármaco). Na imagem (B) encontram-se fragmentos de um pulmão retirado de um animal do grupo controlo, onde se identificam metástases de várias dimensões. Aspecto de uma lesão com 4mm, correspondente a um animal tratado com Taxol® (C). Na figura (D) encontra-se um pulmão retirado de um animal correspondente ao mesmo grupo (Taxol®) verificando-se um padrão semelhante ao dos pulmões de animais não tratados.

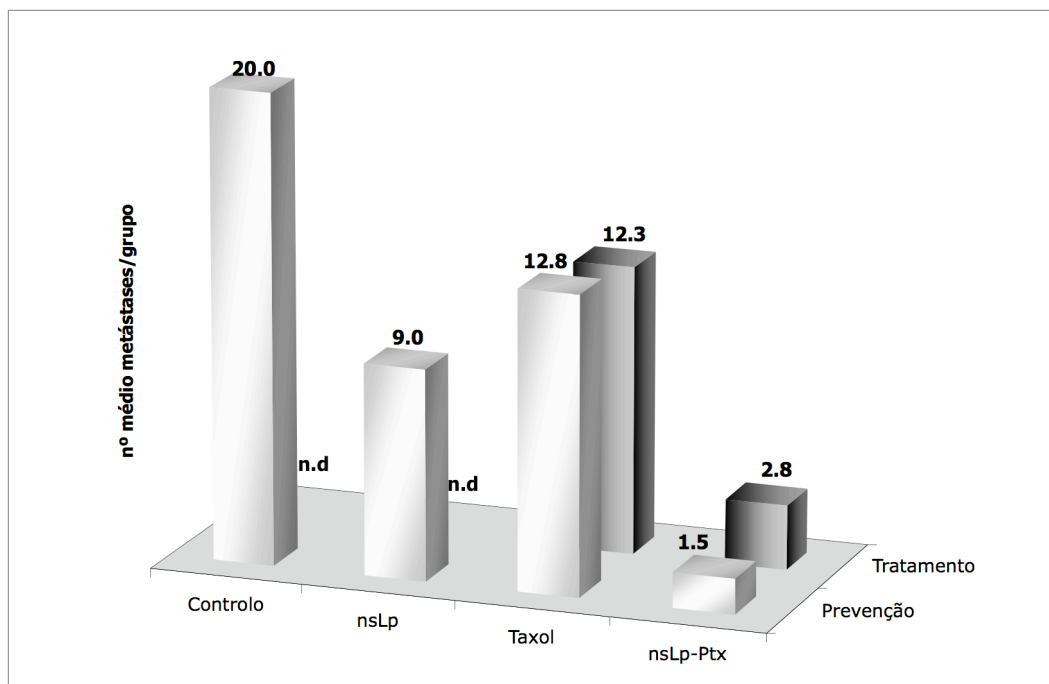


Figura 5-11: Número médio de metástases por rato em cada grupo.

A comparação dos dados obtidos com o tratamento durante a fase de disseminação de metástases, ou seja, de prevenção e, aqueles obtidos com o tratamento durante a fase de invasão e crescimento pulmonar, não permite inferir de forma estatisticamente significativa qual deles tem maior influência no resultado final (Figura 5-11).

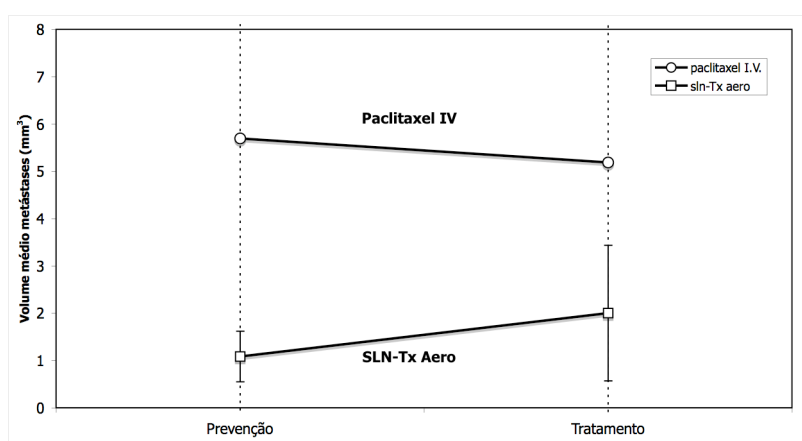


Figura 5-12: Magnitude do efeito de obtido para cada formulação, nas fases de prevenção e de tratamento estipuladas no protocolo 01-03.

Embora não se identifiquem diferenças significativas para qualquer das formulações de Ptx (Figura 5-12), no que respeita às duas fases experimentais previamente estipuladas, o tratamento por administração pulmonar de nsLp-Ptx produz uma redução expressiva quer na supressão de metástases quer no volume médio das mesmas (Tabela 5-4 e Figura 5-13).

Tabela 5-4: Valores determinados para o Volume médio de lesão neoplásica nos dois lobos pulmonares após sacrifício dos animais.

nsLp	Taxol®	nsLp-Ptx	controlo
7,10±1,24	5,70±2,03	1,08±0,79	6,78±1,06

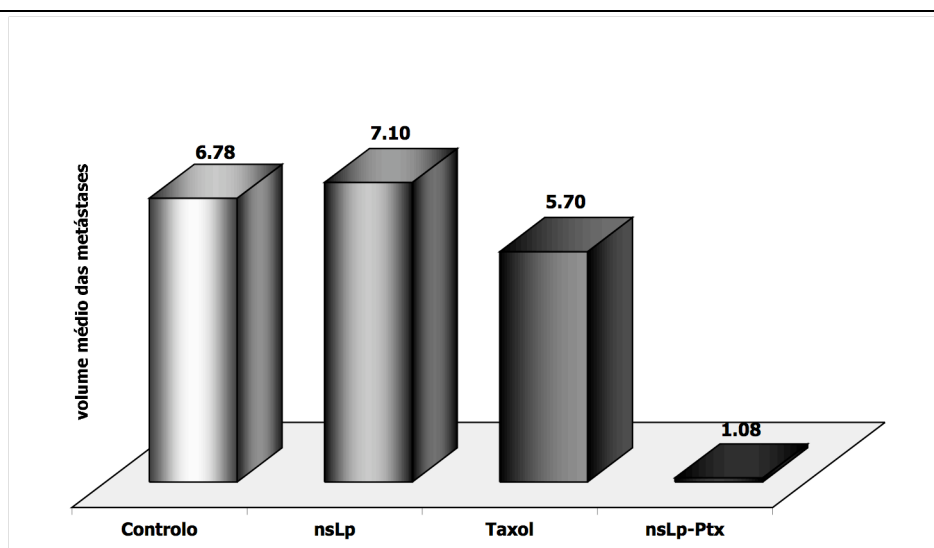


Figura 5-13: Volume médio das metástase (mm³) por grupo de animais.

b. Protocolo 02

O segundo protocolo apresentou um carácter mais orientado para a eficácia e segurança da utilização de nsLp-Ptx. Neste estudo pretendeu-se avaliar a hipótese de um tratamento prolongado por administração pulmonar de nsLp-Ptx poder evitar a disseminação e desenvolvimento de metástases pulmonares, tendo em conta o padrão de deposição do aerossol formado e envolvimento do sistema linfático pulmonar após inalação.

Os dados recolhidos revelam que o grupo de animais não tratado e o grupo que inalou partículas sem fármaco apresentaram um comportamento semelhante relativamente à invasão metastática da superfície pulmonar, confirmando os resultados obtidos no protocolo anterior.

Nestes grupos, 75% (n=5) dos animais apresentavam invasão nos dois lobos pulmonares e apenas 25% (n=5) apresentavam micro metástases (Figura 5-12).

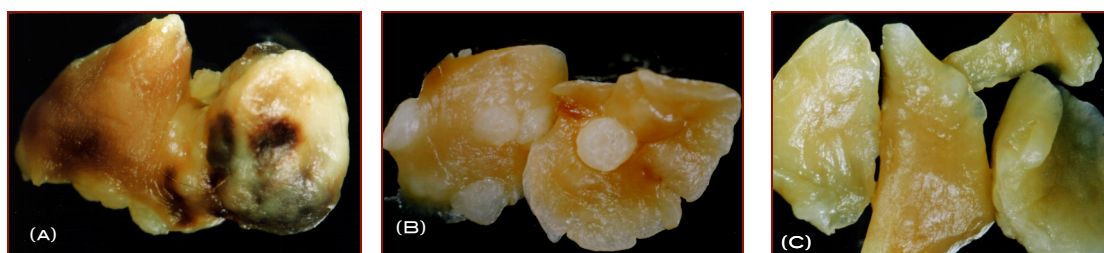
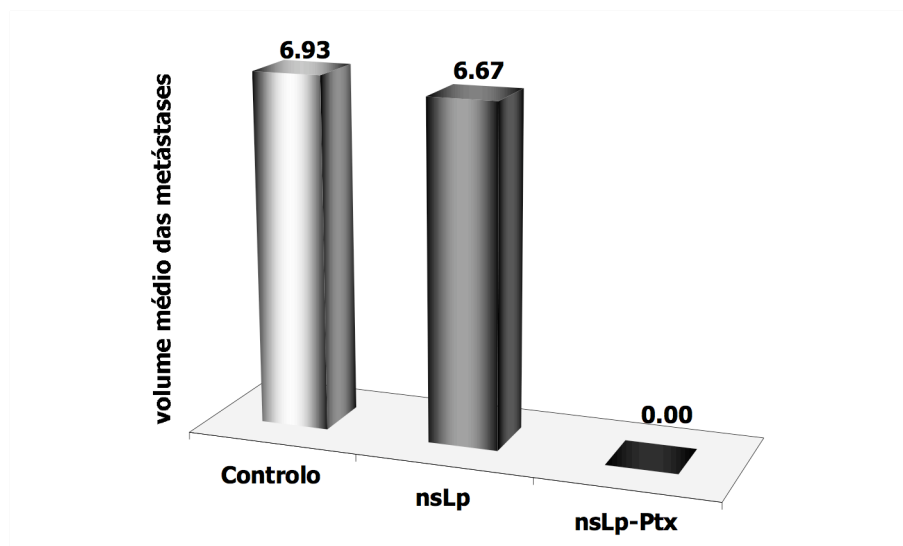


Figura 5-14: Volume médio, em mm³, das metástases por grupo de animais. O volume correspondente a tecido neoplásico nos pulmões dos animais tratados com nsLp-Ptx é desprezável. Imagens dos pulmões de animais não tratados (A), tratados com partículas vazias (B) e com nsLp-Ptx (C), em fotografias obtidas através de uma câmara fotográfica acoplada a uma lupa de magnificiência (40x).

Os pulmões dos animais tratados por inalação de aproximadamente 2ml de um aerossol de nsLp-Ptx (55µg/ml), durante um período de quatro semanas num total de oito tratamentos, não apresentaram nenhum tipo de lesão. Neste grupo, os animais apresentaram igualmente um bom estado de saúde, sem perda de peso ou aumento de agressividade, até aos 45 dias após inoculação da suspensão celular de MXT-B2.

5.5. Discussão

5.5.1. Citotoxicidade de nsLp *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade de nsLp *in vitro*, utilizando culturas de macrófagos peritoneais de ratinho, revelou que as nanopartículas não provocam diminuição da viabilidade celular, até concentrações de partículas oito vezes superiores ao número de células semeadas.

De facto o padrão de morte celular parece estar relacionado, não tanto com a toxicidade do lípido ou do tensoactivo que compõe as partículas, mas acima de tudo com a turvação do meio e respectiva concentração de lípidos. Uma concentração intracelular elevada, relacionada não apenas com o elevado número de partículas, mas também com a permeabilidade celular às nsLp, pode provocar acumulação de nanopartículas no citosol, com consequente aumento da actividade lisossomal e possível perda de viabilidade celular por saturação das vias endocíticas (Harush-Frenkel *et al.* 2007; Khalil *et al.* 2006).

O estudo que envolveu a incubação de nanopartículas lipídicas em cultura de macrófagos bronco-alveolares humanos revelou ausência de toxicidade na concentração estudada, não se tendo detectado diminuição da viabilidade celular após incubação com 100 μ l de amostra de nsLp ($4,86 \times 10^{10}$ partículas/ml). No entanto, mesmo a cultura de células correspondente ao controlo apresentou reduzida viabilidade celular, tendo-se revelado bastante delicada a manutenção e crescimento destas estruturas pelos métodos utilizados.

Após incubação das partículas nsLp-DPH na variante MXT-B2 em cultura, observou-se a rápida internalização destas, bem como a presença de numerosas vesículas no citoplasma e junto da membrana citoplasmática. A maturação dessas vesículas endossómicas para lisossomas explicaria o aparecimento de cor dispersa por todo o citoplasma, indicativa não apenas de internalização celular, mas também da digestão das nanopartículas e libertação do marcador. Não se detectou efeito sobre a viabilidade celular, para a concentração de partículas utilizada, nas células em contacto com a suspensão de nsLp sem fármaco ($4,86 \times 10^{10}$ partículas/ml). Estes resultados,

que confirmam os obtidos em culturas de macrófagos, podem ser atribuídos não apenas à capacidade de estimulação dos mecanismos lisossomais após endocitose, mas também ao tropismo subjacente ao carácter lipófilo das nsLp.

5.5.2. Avaliação da actividade do sistema nsLp-Ptx

a. Avaliação *in vitro* da actividade citotóxica das nsLp-Ptx

A determinação *in vitro* da eficácia farmacológica do paclitaxel, aprisionado na matriz lipídica, evidenciou uma actividade citotóxica expressiva frente às células MXT-B2. As imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência confirmam uma diminuição acentuada da viabilidade celular para concentrações de nsLp-Ptx correspondentes a 1,45 μM . A rápida internalização e a magnitude do efeito anti-tumoral sugerem uma vez mais, um perfil de interacção nanopartículas-células compatível com activação das vias endocíticas, ficando por esclarecer qual o mecanismo subjacente. Estes resultados evidenciam antes de mais uma elevada biodisponibilidade intracelular, que pode por si só justificar a maior eficácia terapêutica.

O estudo de citotoxicidade com o fármaco livre, para o tempo de incubação avaliado, revelou uma potência quatro vezes inferior à observada com o fármaco em suporte lipídico. Esta diferença, observada para concentrações extra-celulares equivalentes de Ptx (5,85 μM), valor abrangido pelo intervalo de concentrações necessário à actividade farmacológica (0,1 a 10 $\mu\text{mol/L}$), pode estar relacionada com uma menor permeabilidade ao fármaco livre e consequentemente uma concentração intracelular inferior (Beck *et al.* 2000). Resultados semelhantes foram descritos por Miglietta e colaboradores (2000), tendo os autores verificado que o efeito citotóxico do Ptx em linhas celulares de tumores sólidos, aumentava quando estes se encontravam incorporados em SLN's (Miglietta *et al.* 2002; Miglietta *et al.* 2000). É possível que o aumento da resposta celular ao Ptx em nanopartículas lipídicas se encontre igualmente condicionado à velocidade de internalização do sistema de veiculação e, este fenómeno, está claramente relacionado com o tipo de lípido base.

Note-se que estes resultados estão de acordo com as premissas teóricas assumidas anteriormente, nas quais a natureza dos lípidos constituintes das partículas, nsLp e SLN, poderá estar na base da elevada eficácia *in vitro* destes sistemas (Khalil *et al.* 2006; Vasir & Labhasetwar 2007; Vonarbourg *et al.* 2006). Este facto reforça o interesse que existe em desenvolver estas matrizes para veiculação intracelular de moléculas com potencial terapêutico. Contudo a resposta ao Ptx, associado a partículas lipídicas, depende também do fenótipo das células frente às quais se avalia a eficácia do sistema (Capítulo 1). De facto observaram-se, para o mesmo sistema de partículas Ptx-SLN, diferenças de resposta notáveis entre linhas de cancro colon-rectal (HT-29) e adenocarcinoma mamário (MCT-7), respectivamente 16,1 ng/ml contra 1,16 ng/ml de DL50 para o Ptx incorporado (Miglietta *et al.* 2002; Serpe *et al.* 2004).

b. Efeito citotóxico in vivo de nsLp-Ptx

A eficácia do modelo tumoral ficou demonstrada nos dois protocolos, através do número de metástases pulmonares experimentais, registadas em 100% dos ratinhos do grupo controlo (GA01). Como seria de esperar, o grupo que recebeu partículas sem fármaco (GB01) exibiu um resultado similar ao grupo controlo relativamente ao número de metástases (Figura 5-13).

O estudo comparativo levado a cabo no protocolo 01, demonstrou que a inalação de nsLp-Ptx foi significativamente mais eficaz do que a administração intravenosa de Taxol[®], no tratamento de um modelo de metástases pulmonares experimentais.

A diminuição do número e tamanho de metástases pulmonares, após inalação de nsLp-Ptx durante os primeiros quinze dias, traduzida pela supressão completa em 3/4 animais e registo de apenas um animal com lesões (1/4), sugere que a disseminação e, em consequência a fixação de metástases, pode ter sido bloqueada ao nível pulmonar. Este facto poderá ser atribuído ao padrão de eliminação pulmonar das nanopartículas, com consequente acumulação no interstício e mais tarde no sistema linfático pulmonar, tornando possível a interacção com as células neoplásicas fora do espaço alveolar ou mesmo em circulação no sistema linfático.

Verificou-se que o sistema de administração pulmonar por inalação de nsLp-Ptx exibe uma elevada eficácia terapêutica. Esta eficácia, em função do tratamento administrado, resultou num decréscimo significativo (Protocolo 01) e supressão total de metástases experimentais (Protocolo 02) na superfície pulmonar quando o número de administrações é alargado.

Os resultados obtidos sugerem que, na região pulmonar, a concentração de fármaco activo após inalação deverá ser equivalente ao valor determinado como DL50 nos estudos *in vitro* (1,45 μM). Acontece que a concentração de Ptx no aerossol administrado é de 64 μM , o que significa que a quantidade efectiva deste é inferior à DL50 (0,128 $\mu\text{moles}/2\text{ml}$). Esta circunstância sugere que a natureza do efeito citotóxico observado pode não estar totalmente esclarecida. A actividade do paclitaxel é geralmente relacionada com a dinâmica dos microtúbulos (10 μM paclitaxel) embora este não seja o único mecanismo envolvido. São atribuídas a este fármaco interações com outros mecanismos celulares (Blagosklonny *et al.* 1996; Burkhardt *et al.* 1994; Haldar *et al.* 1996; Liu *et al.* 1994; Wang *et al.* 2000) especialmente, quando estão envolvidas concentrações intracelulares inferiores às necessárias para bloquear a dinâmica dos microtúbulos (Zaffaroni *et al.* 1998). Em 2001 Giannakakou e colaboradores (2001) observaram a morte celular por apoptose induzida por concentrações na ordem dos 3 a 6 nM de paclitaxel em células portadoras do gene *p53*. Os autores demonstraram que houve indução do gene *p53* activador da transcrição da *bax*, uma proteína pró-apoptótica (Giannakakou *et al.* 2001).

Níveis superiores de *p53* aumentam a sensibilidade celular ao paclitaxel, com o efeito citotóxico a ser exercido pela via apoptótica. Esta via, poderia explicar parte dos resultados obtidos neste trabalho, tendo em conta a concentração de fármaco relativa às nsLp-Ptx inaladas. De facto, nas imagens por microscopia de fluorescência das células tratadas com nsLp-Ptx, registaram-se estruturas membranares compatíveis com a formação de corpos apoptóticos (Figura 5-6-D).

c. Veiculação selectiva de paclitaxel

Paralelamente, a capacidade dos sistemas de veiculação de fármacos diminuiriam a toxicidade associada ao fármaco, principalmente quando há

necessidade de aumentar o número de administrações, constitui um objectivo fundamental da veiculação selectiva (Couvreur & Vauthier 2006; Torchilin 2006a). A ausência de toxicidade, durante o tratamento por inalação de nsLp-Ptx, nomeadamente do Protocolo 02 onde o número de administrações foi superior, indica que este objectivo foi atingido com sucesso, contrariamente ao que se verificou nos grupos aos quais se administrou o fármaco livre por via intravenosa.

Idealmente, a actividade do agente incorporado deve ser limitada às células neoplásicas. Poder-se-á atribuir uma elevada selectividade ao sistema desenvolvido ou seja nsLp administradas por inalação, tendo em conta dois aspectos:

- o primeiro aspecto é puramente mecânico. A administração pulmonar produz um efeito de “aspersão” do fármaco incorporado sobre a superfície pulmonar. Previsivelmente esta via de administração pode ser comparada com uma aplicação tópica, o que aumenta a selectividade para a região lesada ao concentrar o fármaco no local de administração ao mesmo tempo que a sua circulação a nível sistémico é limitada;
- o segundo aspecto está relacionado com a fisiologia da região lesada. O desenvolvimento de um tumor é acompanhado por alterações ao nível do microambiente que envolve a região afectada. Nos tumores sólidos, os vasos resultantes do processo de angiogénese apresentam uma estrutura desordenada ao nível da membrana de células endoteliais, o que significa que a este nível a permeabilidade a partículas coloidais está aumentada (Gerlowski & Jain 1986; Wu *et al.* 1993). Geralmente, nas zonas onde há actividade hiperproliferativa, existe ainda um desequilíbrio entre a drenagem linfática e a acumulação de líquido intersticial o que provoca a acumulação de partículas coloidais nestas regiões (Fang *et al.* 2003; Maeda *et al.* 2000). O efeito de permeabilidade e retenção (EPR) resulta destes dois fenómenos, constituindo, a par com as propriedades de superfície do transportador coloidal, um dos factores determinantes na eficácia da veiculação de fármacos como estratégia terapêutica (Duncan 2006; Kelly & Kim 2007).

No modelo utilizado neste trabalho, tendo em conta que este apresenta múltiplas regiões de hiperplasia, o efeito EPR está subjacente à selectividade da veiculação coloidal. No entanto, o forte envolvimento do espaço intersticial na administração pulmonar de nsLp será porventura o efeito que mais contribui para a supressão das metástases pulmonares de carcinoma da mama, quer se trate de um modelo experimental ou de disseminação do tumor primário. A acumulação de partículas no espaço intersticial reveste-se de particular importância, se considerarmos a administração linfática em função da estrutura do espaço intersticial. No pulmão, este apresenta condições únicas, relativamente à administração intraperitoneal ou subcutânea (Harivardhan *et al.* 2005), sendo igualmente a maior superfície atingida por uma única administração.

A elevada eficácia terapêutica de fármacos acoplados a sistemas coloidais em modelos de carcinomas pulmonares primários ou metástases experimentais pulmonares, tem sido extensamente demonstrado, em parte devido às características anatomo-fisiológicas particulares dos tecidos onde existe neoplasia (Lopez-Barcons *et al.* 2005; Nie *et al.* 2007; Wang *et al.* 2005; Xu *et al.* 2005). No entanto, a eficácia no tratamento de metástases pulmonares de adenocarcinoma renal (Renca – Murine Renal carcinoma cell line), por nebulização de Ptx livre, com ou sem administração concomitante de ciclosporina A, veio confirmar que a administração pulmonar constitui, por si só, um factor adicional para o aumento da eficiência terapêutica (Gautam & Koshkina 2003; Koshkina *et al.* 2004).

Deste modo, é natural que deposição do aerosol inalado sobre a superfície pulmonar constitua um importante contributo para a veiculação selectiva do sistema, permitindo a interacção das nsLp-Ptx com o epitélio bronco-alveolar, com a população celular alveolar, com o espaço intersticial e, consequentemente, com o sistema linfático associado ao pulmão (Sharma *et al.* 2001; Vyas *et al.* 2004). Admitindo-se que a veiculação selectiva, associada sobretudo à administração por inalação, em conjunto com a elevada internalização celular do sistema, justifique o potencial antineoplásico das nsLp-Ptx.

d. Influência da natureza da matriz na eficácia do sistema nsLp

Koshkina e colaboradores (2001) foram pioneiros na investigação da eficácia do paclitaxel inalado na erradicação de metástases pulmonares (Koshkina *et al.* 2001). Utilizando modelos distintos de cancro de pulmão, os autores obtiveram resultados promissores, por tratamento com Ptx encapsulado em lipossomas. Curiosamente, ao contrário dos resultados obtidos no presente trabalho, a supressão total das metástases, por tratamento com aerossóis de Ptx encapsulado em lipossomas, não foi alcançada, tendo-se registado adicionalmente, alguma toxicidade sistémica.

As razões possíveis para as discrepâncias de resultados entre a formulação de lipossomas e as nanopartículas lipídicas com Ptx, prendem-se com o modelo tumoral e com as características do suporte.

Relativamente ao modelo, apesar das diferenças genótípicas entre o carcinoma renal e o da mama, ambos apresentam disseminação metastática a nível pulmonar utilizando predominantemente o sistema linfático. Deste modo, poder-se-á considerar que estão em causa células com fenótipo comparável, o que representa alguma similaridade nos mecanismos de fixação e desenvolvimento, podendo por isto não serem atribuíveis ao modelo as diferenças nos resultados.

Excluindo o modelo tumoral, poder-se-á concluir que a natureza da matriz tem um papel fundamental. Esta hipótese foi também evidenciada pelos resultados obtidos com o aumento da frequência de tratamentos, que no caso dos lipossomas de Ptx não resultou em maior eficácia terapêutica, tendo-se registado nesta experiência a ocorrência de neurotoxicidade, o que sugere a presença de fármaco livre. Pelo contrário, o aumento do número de tratamentos com nsLp-Ptx inalado determinou a supressão total das metástases pulmonares sem que as condições gerais dos animais tenham sido comprometidas, indicando que a actividade citotóxica do fármaco está nitidamente relacionada com a associação ao suporte de veiculação.

Os resultados correspondentes ao protocolo 02 desta experiência, sugerem que o efeito terapêutico observado nos animais pode estar relacionado não apenas com um padrão uniforme de dose administrada, mas também com a possível acumulação de partículas na região pulmonar. Como foi previamente demonstrado (Capítulo 3), após inalação as partículas nanométricas têm

acesso a toda a área de superfície pulmonar. A elevada deposição pulmonar de partículas, mesmo tendo em conta os fenómenos de eliminação, pode determinar a disponibilidade de doses de fármaco, superiores ou iguais ao valor de IC50 para as células neoplásicas, após múltiplas administrações. Este aspecto pode concorrer para justificar, a supressão total de metástases pulmonares observada no Protocolo 02, sem que tivessem sido registados fenómenos de toxicidade sistémica.

Por outro lado, com base no perfil de internalização celular, é possível analisar a aparente diferença de eficácia entre as duas formulações, nsLp-Ptx e Ptx em lipossomas (Koshkina *et al.* 2001). Considerando que ambas as formulações têm acesso à região onde existe patologia, as variações em termos de citotoxicidade só poderão ser atribuídas a diferenças na velocidade de internalização e nos processos de digestão intracelular das nanopartículas. Os resultados vêm desta maneira confirmar que a biodisponibilidade intracelular das nsLp-Ptx é elevada e, aparentemente, após digestão do lípido houve uma elevada cedência local de fármaco.

Em conjunto, estes resultados sugerem que foi possível obter a acumulação das nanopartículas ao nível do microambiente do tumor e, a partir desse ponto, limitar o acesso de nsLp-Ptx às células do tumor com consequente veiculação intracelular e cedência do fármaco ao nível do citoplasma.

5.6. Bibliografia

- Ally J, Martin B, Khamesee MB, Roa W, Amirfazli A. 2005. Magnetic Targeting Of Aerosol Particles For Cancer Therapy. *J Magn Magn Mater* 293:442-9
- Beck PWT, Cass PCE, Houghton PPJ. 2000. Microtubule-targeting anticancer drugs derived from plants and microbes: vinca alkaloids, taxanes, and epothilones. In *Cancer Medicine*, pp. 687-91
- Blagosklonny MV, Schulte T, Nguyen P, Trepel J, Neckers LM. 1996. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res* 56:1851-4
- Brannon-Peppas L, Blanchette JO. 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 56:1649-59
- Burkhart CA, Berman JW, Swindell CS, Horwitz SB. 1994. Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor-alpha gene expression and cytotoxicity. *Cancer Res* 54:5779-82
- Chavanpatil MD, Patil Y, Panyam J. 2006. Susceptibility of nanoparticle-encapsulated paclitaxel to P-glycoprotein-mediated drug efflux. *Int J Pharm* 320:150-6
- Couvreur P, Vauthier C. 2006. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharmaceutical Research* 23:1417-50
- Crown J, O'Leary M, Ooi WS. 2004. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *Oncologist* 9 Suppl 2:24-32
- Cuenca AG, Jiang H, Hochwald SN, Delano M, Cance WG, Grobmyer SR. 2006. Emerging Implications of Nanotechnology on Câncer Diagnostics and Tehrapeutics. *Cancer* 107:459-66
- Duncan R. 2006. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nat Rev Cancer* 6:688-701
- Ettinger DS. 1999. Concurrent paclitaxel-containing regimens and thoracic radiation therapy for limited-disease small cell lung cancer. *Semin Radiat Oncol* 9:148-50
- Fang J, Sawa T, Maeda H. 2003. Factors and mechanism of "EPR" effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS. *Adv Exp Med Biol* 519:29-49
- Ferrari M. 2005. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 5:161-71
- Gabizon AA. 2001. Stealth liposomes and tumor targeting: one step further in the quest for the magic bullet. *Clin Cancer Res* 7:223-5
- Gautam A, Koshkina N. 2003. Paclitaxel (taxol) and taxoid derivates for lung cancer treatment: potential for aerosol delivery. *Curr Cancer Drug Targets* 3:287-96
- Gerlowski LE, Jain RK. 1986. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc Res* 31:288-305
- Giannakakou P, Robey R, Fojo T, Blagosklonny MV. 2001. Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene* 20:3806-13
- Haldar S, Chintapalli J, Croce CM. 1996. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res* 56:1253-5
- Harivardhan RL, Sharma RK, Chuttani K, Mishra AK, Murthy RSR. 2005. Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice. *Journal of Controlled Release* 105:185-98

- Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. 2007. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 353:26-32
- Hodoshima N, Udagawa C, Ando T, Fukuyasu H, Watanabe H, Nakabayashi S. 1997. Lipid nanoparticles for delivering antitumor drugs. *Int. J. Pharm* 146:81-92
- Huisman C, Ferreira CG, Broker LE, Rodriguez JA, Smit EF, et al.. 2002. Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Clin Cancer Res* 8:596-606
- Illum L, Church AE, Butterworth MD, Arien A, Whetstone J, Davis SS. 2001. Development of systems for targeting the regional lymph nodes for diagnostic imaging: in vivo behaviour of colloidal PEG-coated magnetite nanospheres in the rat following interstitial administration. *Pharm Res* 18:640-5
- Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. 2006. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today* 11:812-8
- Jones AT, Gumbleton M, Duncan R. 2003. Understanding endocytic pathways and intracellular trafficking: a prerequisite for effective design of advanced drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1353-7
- Kelly Y, Kim MA. 2007. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and Medicine* 3:103-10
- Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H. 2006. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev* 58:32-45
- Kondratov RV, Komarov PG, Becker Y, Ewenson A, Gudkov AV. 2001. Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14078-83
- Koshkina N, Golunski E, Roberts L, Gilbert B, Knight V. 2004. Cyclosporin A aerosol improves the anticancer effect of paclitaxel aerosol in mice. *J Aerosol Med* 17:7-14
- Koshkina NV, Kleinerman ES. 2005. Aerosol Therapy For Malignancy Involving The Lungs. *Int J Cancer* 116:458-63
- Koshkina NV, Waldrep JC, Knight V. 2003. Camptothecins and Lung Cancer: Improved Delivery Systems by Aerosol. *Curr Cancer Drug Targets* 3:251-364
- Koshkina NV, Waldrep JC, Roberts LE, Golunski E, Melton S, Knight V. 2001. Paclitaxel liposome aerosol treatment induces inhibition of pulmonary metastases in murine renal carcinoma model. *Clin Cancer Res* 7:3258-62
- Leroux J, Vargas A, Doelker E, Gurny R, Delie F. 2006. The Use of Drug-Loaded Nanoparticles in Cancer Chemotherapy. In *Microencapsulation Methods and industrial Applications*, ed. S Benita, pp. 625-71
- Li R, Moudgil T, Ross HJ, Hu HM. 2005. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death Differ* 12:292-303
- Liu Y, Bhalla K, Hill C, Priest DG. 1994. Evidence for involvement of tyrosine phosphorylation in taxol-induced apoptosis in a human ovarian tumor cell line. *Biochem Pharmacol* 48:1265-72
- Llorens A, Vinyals A, Alia P, López-Barcons L, Gonzalez-Garrigues M, Fabra A. 1997. Metastatic ability of MXT mouse mammary subpopulations correlates with clonal expression and/or membrane-association of gelatinase A. *Molecular Carcinogenesis* 19:54-66
- Lopez-Barcons LA, Polo D, Llorens A, Reig F, Fabra A. 2005. Targeted adriamycin delivery to MXT-B2 metastatic mammary carcinoma cells by transferrin liposomes: effect of adriamycin ADR-to-lipid ratio. *Oncology Reports* 14:1337-43
- Mader K. 2006. Solid Lipid nanoparticles as drug carriers. In *Nanoparticulates as drug carriers* ed. V.Torchilin, pp. 187-212: Imperial College Press

- Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65:271-84
- Manjunath K, Venkateswarlu V. 2005. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. *J Control Release* 107:215-28
- Miglietta A, Bocca C, Gabriel L. 2002. Comparative studies on biological activity of certain microtubule-interacting taxanes. *Chem.Biol.Interact.* 139:283-99
- Miglietta A, Cavalli R, Bocca C, Gabriel L, Gasco MR. 2000. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *Int.J.Pharm.* 210:61-7
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63
- Murphy M, Hinman A, Levine AJ. 1996. Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein. *Genes Dev* 10:2971-80
- Murphy WK, Fossella FV, Winn RJ, Shin DM, Hynes HE, et al.. 1993. Phase II study of taxol in patients with untreated advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:384-8
- Nie S, Xing Y, Kim GJ, Simons JW. 2007. Nanotechnology Applications in Cancer *Annual Review of Biomedical Engineering* 9:257-88
- Rao RD, Markovic SN, Anderson PM. 2003. Aerosol therapy for malignancy involving the lungs. *Curr Cancer Drug Targets* 3:239-50
- Serpe L, Catalano MG, Cavalli R, Ugazio E, Bosco O, et al.. 2004. Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *Eur J Pharm Biopharm* 58:673-80
- Sharma S, White D, Imondi AR, Placke ME, Vail DM, Kris MG. 2001. Development of inhalational agents for oncologic use. *J Clin Oncol* 19:1839-47
- Torchilin VP. 2006a. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58:1532-55
- Torchilin VP. 2006b. Recent Approaches to Intracellular Delivery of Drugs and DNA and Organelle Targeting. *Annual Review of Biomedical Engineering* 8:343-75
- Vasir JK, Labhasetwar V. 2007. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 59:718-28
- Veronese FM, Pasut G. 2005. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 10:1451-8
- Videira M, Almeida AJ, Müller RH. 2000. Formulation and physical stability assessment of SLN containing paclitaxel. Incorporation of paclitaxel in SLN: assessment of drug-lipid interaction. *Proceed. 3rd World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (Berlin)*:453-4
- Videira MA, Botelho MF, Santos AC, Gouveia LF, de Lima JJ, Almeida AJ. 2002. Lymphatic uptake of pulmonary delivered radiolabelled solid lipid nanoparticles. *J Drug Target* 10:607-13
- Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. 2006. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 27:4356-73
- Vyas SP, Kannan ME, Sannyog Jain, Mishra V, Singh P. 2004. Design of liposomal aerosol for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages. *International Journal Of Pharmaceutics* 269:37-49
- Wang F, Cao Y, Zhao W, Liu H, Fu Z, Han R. 2003. Taxol inhibits melanoma metastases through apoptosis induction, angiogenesis inhibition, and restoration of E-cadherin and nm23 expression. *J Pharmacol Sci* 93:197-203
- Wang J, Mongayt D, Torchilin VP. 2005. Polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs: preparation and anticancer activity in vitro of paclitaxel incorporated into mixed

- micelles based on poly(ethylene glycol)-lipid conjugate and positively charged lipids. *J Drug Target* 13:73-80
- Wang TH, Wang HS, Soong YK. 2000. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 88:2619-28
- Westesen K, Bunjes H, Koch MHJ. 1997. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their loading capacity and sustained release potential. *Journal of Controlled Release* 48:223-36
- Witte M, Jones K, Wilting J, Dictor M, Selg M, et al.. 2006a. Structure function relationships in the lymphatic system and implications for cancer biology. *CANCER AND METASTASIS REVIEWS* 25 (2): 159-184 JUN 2006 25:159-84
- Witte MH, Jones K, Wilting J, Dictor M, Selg M, et al.. 2006b. Structure function relationships in the lymphatic system and implications for cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 25:159-84
- Wu NZ, Da D, Rudoll TL, Needham D, Whorton AR, Dewhirst MW. 1993. Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of Stealth liposomes in tumor tissue. *Cancer Res* 53:3765-70
- Xu Z, Gu W, Huang J, Sui H, Zhou Z, et al.. 2005. In vitro and in vivo evaluation of actively targetable nanoparticles for paclitaxel delivery. *Int J Pharm* 288:361-8
- Zaffaroni N, Silvestrini R, Orlandi L, Bearzatto A, Gornati D, Villa R. 1998. Induction of apoptosis by taxol and cisplatin and effect on cell cycle-related proteins in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cells. *Br J Cancer* 77:1378-85
- Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. 2007. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 83:761-9

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO GERAL

Apesar da variedade de esquemas terapêuticos e da crescente investigação na área oncológica, os agentes antineoplásicos convencionalmente utilizados apresentam enormes limitações que vão desde o elevado volume de distribuição à toxicidade sistémica. A acção destes fármacos em tecidos saudáveis, independentemente do seu tipo histológico, da sua função e da sua integridade celular, continua a ser um factor determinante para a necessidade de encontrar soluções inovadoras.

As nanopartículas desenvolvidas neste trabalho, por um processo de emulsificação/solidificação, representam um sistema de partículas promissor e abrem novas perspectivas para a terapêutica selectiva. Está em causa um conjunto de valências que, no futuro, pode constituir uma mais valia na área da nanomedicina. A optimização dos parâmetros de processo e a escolha adequada da composição lípido/tensioactivo permitiram preparar nsLp estáveis. Muito embora os lípidos considerados como base de nsLp tivessem dado origem a um sistema disperso de partículas sólidas, a melhor correlação entre diâmetro médio, cristalinidade e estabilidade a longo prazo foi observada com as nsLp preparadas com base no Precirol ATO5®. Este resultado indica que este lípido é o que melhor se adapta ao método desenvolvido.

Os resultados demonstram que as nanopartículas lipídicas, desenvolvidas neste estudo, acumulam às vantagens descritas para as emulsões

farmacêuticas, as características que lhes são subjacentes, o diâmetro nanométrico e a cristalinidade parcial da matriz. De igual modo, a elevada área de superfície característica dos sistemas nanoestruturados, distingue-os das moléculas que transportam bem como dos compostos que lhes dão origem.

A associação de fármacos a nanopartículas lipídicas pode constituir uma estratégia para alterar a sua farmacocinética, modificando a distribuição deste quando incorporado e promovendo a sua acumulação nos tecidos lesados.

Deste modo, a incorporação de Ptx em partículas estáveis, assim como a administração pulmonar, poderão contribuir marcadamente para modificar as características farmacocinéticas obtidas com o fármaco livre por perfusão. A administração de doses terapêuticas, adequadas e direccionadas ao órgão alvo, permitirá atingir um objectivo perseguido nas últimas décadas, a veiculação selectiva de fármacos. Por outro lado, a redução da toxicidade e a utilização de vias de administração alternativas permitirá o desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos.

A estabilidade das dispersões preparadas, confirmada durante a nebulização e a sua capacidade para atingirem os pulmões e o sistema linfático pulmonar, demonstram que o sistema desenvolvido é eficaz e que os aerossóis formados são constituídos por partículas respiráveis. As partículas inaladas depositam-se de forma extensa em toda a superfície pulmonar. O facto de as partículas dispersas migrarem para os gânglios linfáticos regionais, poucos minutos após a deposição do aerossol no pulmão, sugere que a drenagem linfática, por acumulação no espaço intersticial ou por acção dos Ma's, representa um dos mecanismos mais importantes de remoção de nsLp da região alveolar. A inalação apresenta-se aqui como uma via efectiva para administração pulmonar de nsLp, constituindo uma alternativa à via intraperitoneal, quando o alvo é o sistema linfático.

Outro aspecto importante está relacionado com a visualização dos gânglios peri-aórticos ou mediastínicos (Capítulo 3). Como se sabe, a disseminação extensiva de células cancerígenas ocorre em numerosos carcinomas

torácicos, entre os quais se incluem as neoplásias do pulmão. O envolvimento dos gânglios linfáticos peri-aórticos é responsável na maioria dos casos por um prognóstico desfavorável da doença. Os resultados demonstram que as nanopartículas lipídicas acedem a este compartimento após inalação, o que significa que este sistema pode ser utilizado para veicular fármacos para gânglios do espaço abdominal.

Adicionalmente, a percentagem de partículas retida no espaço pulmonar, nomeadamente na região brônquica, proporciona uma estratégia de libertação controlada, o que torna estas partículas igualmente adequadas, para terapêutica de doenças crónicas ao nível pulmonar.

A veiculação para o espaço pulmonar é de extrema importância, quer ao nível oncológico, quando existem neoplasias circunscritas ou em estadio avançado, quer em termos de diagnóstico, uma vez que abre caminho à possibilidade de utilizar as nsLp como radiofármacos em linfocintigrafia. Mais ainda, os progressos da medicina, nomeadamente novas técnicas de radiologia e imageologia, bem como o conhecimento de mecanismos subjacentes à especialização morfológica e funcional da célula neoplásica, ampliam a diversidade de alvos terapêuticos, o que associado à administração regional de fármacos, pode tornar-se uma estratégia de elevado potencial.

As nanopartículas preparadas nsLp-Ptx constituem um sistema dispersível em veículos aquosos, estável ao longo do tempo e que poderá servir para colmatar as limitações até agora existentes com o fármaco livre. Os valores obtidos, em termos de dm e carga superficial nas nsLp-Ptx, revelam uma vez mais, que o sistema de partículas desenvolvido é susceptível de ser utilizado em qualquer via de administração. O processo utilizado para incorporar o fármaco não altera a estrutura inicial das partículas nem a estrutura da molécula de Ptx, o que se deve essencialmente ao facto de as interacções envolvidas corresponderem a ligações fracas, características das interacções hidrofóbicas.

A eficácia das nsLp-Ptx, avaliada *in vitro* e *in vivo*, demonstrou que a administração pulmonar proporciona um aumento do tempo de exposição das células neoplásicas a concentrações farmacológicas de fármaco, maximizando

o efeito antineoplásico. Os resultados demonstram que é possível aumentar a dose a administrar e, simultaneamente, contribuir para a diminuição ou inexistência Ptx livre, o que permite prever a redução da toxicidade sistémica.

O efeito atingido é possivelmente o resultado de factores sinérgicos como a veiculação selectiva, a facilidade de entrada na célula, a possível digestão rápida com libertação do fármaco no citosol e, porventura, a estimulação de vias apoptóticas. Como era de esperar, a célula neoplásica está envolvida em todo o processo, já que através dela foi possível controlar mecanismos essenciais à sobrevivência e crescimento do tumor, como a regulação do ciclo celular e a apoptose, mas também, a angiogenese e a inibição da capacidade de metastização, fenómenos nos quais o Ptx já demonstrou estar envolvido.

Em suma, os dados indicam que foi alcançada a conjugação entre uma maior eficácia terapêutica e uma diminuição acentuada dos efeitos tóxicos, confirmando, deste modo, que o índice terapêutico do sistema de inalação de nsLp-Ptx é superior àquele que se verifica com o fármaco livre.

Apesar de quase três décadas de investigação, a procura de sistemas de nanopartículas lipídicas pela indústria farmacêutica continua a ser um não objectivo. Para tal, contribui o facto de as autoridades reguladoras se verem confrontadas com ausência de conhecimento ou legislação de suporte à nanomedicina, mas também a existência de lacunas relativamente às propriedades dos sistemas desenvolvidos. Para isto, é necessário encontrar uma concepção sólida que permita desenvolver uma matriz com características pluralistas relativamente às potenciais vias de administração e aos fármacos a incorporar. Na verdade, enquanto o desenvolvimento não for acompanhado pela total caracterização da estrutura da partícula, de modo a traduzir integralmente as propriedades do sistema desenvolvido, dificilmente se dará o passo final para passar do laboratório à prática clínica.