

Filipa Cláudia Ambrósio Marta

# Nanopartículas lipídicas como sistema para administração de fármacos anticancerígenos

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
orientada pela Professora Doutora Carla Sofia Pinheiro Vitorino e apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Filipa Cláudia Ambrósio Marta, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009334, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

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

Coimbra, 11 de Julho de 2014.

As)

A Tutora

Carla Sofia Pinheiro Vitorino

**(Professora Doutora Carla Sofia Pinheiro Vitorino)**

A Aluna

Filipa Cláudia Ambrósio Marta

**(Filipa Cláudia Ambrósio Marta)**

*There are many hypotheses in science which are wrong. That's perfectly all right; they're the aperture to finding out what's right.*

Carl Sagan

## **Agradecimentos...**

À Doutora Carla Vitorino, tutora da monografia, pela ajuda, disponibilidade, preocupação e dedicação dispensada durante todo este período.

Aos meus pais, irmã e Guilherme, pelo apoio incondicional.

À Catarina Costa, por toda motivação e a companhia durante estes cinco meses.

E por fim à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

# Índice

---

1. Introdução .....	4
2. Nanopartículas lipídicas (NL) .....	6
2.1 Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) .....	6
2.2 Transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC) .....	8
2.3 Conjugados fármaco-lípido (LDC) .....	9
2.4 Nanopartículas híbridas lípido-polímero (PLN) .....	10
2.5 Métodos de produção.....	10
2.5.1 Homogeneização a elevada pressão (HPH): quente e frio.....	10
2.5.2 Homogeneização a elevada velocidade (HSH) e ultrassonicação (US) .....	11
2.5.3 Microemulsificação.....	11
2.5.4 Emulsificação - evaporação do solvente .....	12
2.5.5 Dupla emulsificação.....	12
2.6 Propriedades .....	13
3. Nanopartículas lipídicas e anticancerígenos .....	14
3.1 Obstáculos à quimioterapia e o uso das NL.....	14
3.2 Anticancerígenos.....	16
3.2.1 Lipossolúveis .....	16
3.2.1.1 Camptotecina (SN38).....	16
3.2.1.2 Irinotecano (CPT-11 ou camptosar) .....	17
3.2.1.3 Paclitaxel.....	17
3.2.1.4 Outros compostos.....	18
3.2.2 Hidrossolúveis .....	19
3.2.2.1 Iónicos .....	21
Doxorrubicina e idarrubicina.....	21
3.2.2.2 Não iónicos .....	22
5-Fluorouracilo (5-FU) .....	22
4. Perspetivas futuras .....	22
4.1 Combinação de quimiossensibilizadores com anticancerígenos em NL .....	22
4.2 <i>Targeting</i> de NL para alvos tumorais específicos .....	23
4.3 Terapia génica anticancerígena através de NL .....	24
5. Conclusão .....	25
6. Bibliografia .....	26
Anexos .....	30

## Abreviaturas

5-FU – 5-Fluorouracilo

AFM – Microscopia de força atômica

AINE – Anti-inflamatório não esteróide

CPT-11 - Irinotecano

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSC- Calorimetria de varrimento diferencial

ELS – Dispersão eletroforética da luz

FuDR - 3',5'-dioctanoílo-5-fluor-2'-desoxiuridina

GRAS - *Generally recognized as safe*

HPESO - Epóxido de óleo de soja hidrolisado e polimerizado

HPH - Homogeneização a elevada pressão

HSH - Homogeneização a elevada velocidade

LDC - Conjugados fármaco-lípido

MDR - Resistência a múltiplos fármacos

MWCO - *Molecular weight cut-off*

NL – Nanopartículas lipídicas

NLC - Transportadores lipídicos nanoestruturados

PCS - Espectroscopia de correlação fotônica

P-gp - Glicoproteína-P

PLN – Nanopartículas híbridas lípido-polímero

PS - Fosfo-sulindac

SEM - Microscopia eletrônica de varrimento

SLN – Nanopartículas lipídicas sólidas

SN-38 - Camptotecina

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão

US - Ultrassonicação

VP-16 – Etoposido

## Resumo

O cancro continua a ser uma das doenças com maior impacto na sociedade, não só pela gravidade como também pela frequência, sendo detetados anualmente números crescentes de novas pessoas afetadas. Apesar dos avanços no tratamento oncológico, a quimioterapia continua a fazer parte da terapêutica convencional.

No entanto, grande parte dos anticancerígenos usados acarreta problemas como: solubilidade, toxicidade e pouca especificidade, comprometendo a eficácia do tratamento e podendo induzir resistência. As nanopartículas lipídicas (NL) surgem assim como um sistema de transporte de anticancerígenos muito promissor. Esta dissertação aborda a aplicação das várias gerações de nanopartículas lipídicas no transporte de anticancerígenos, em particular na resolução dos problemas a estes associados.

As perspetivas futuras aliam as vantagens das NL à co-encapsulação de anticancerígenos com quimiossensibilizadores e ao *targeting* de forma a tornar a terapêutica mais eficaz, especialmente quando existem mecanismos de resistência.

**Palavras-chave:** Nanopartículas lipídicas sólidas, transportadores lipídicos nanoestruturados, conjugados fármaco-lípido, nanopartículas híbridas lípido-polímero, anticancerígenos, co-encapsulação, *targeting*.

## Abstract

Cancer is one of the most devastating diseases affecting the life of many people around the world, with an increased number of new diagnosed cases every year. Despite the advances in oncology treatment, chemotherapy still remains the standard of care.

However, a large part of the conventionally used anticancer drugs has problems related to solubility, low toxicity and specificity, thus compromising the effectiveness of the treatment, also being able to induce resistance. Lipid nanoparticles (LN) are a very promising anticancer drug transport system. This dissertation addresses the application of the several generations of lipid nanoparticles in the transport of anticancer drugs, giving particular insight to the problems they are able to solve.

A future perspective about the use of LN for the co-encapsulation of anticancer and chemosensitizer compounds, and their targeting ability, in order to provide a more effective treatment, especially in the case of resistance mechanisms, is finally presented.

**Keywords:** solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, lipid drug conjugates, polymer lipid hybrid nanoparticles, cancer chemotherapy, anticancer drug delivery, co-encapsulation, tumor-specific targeting.

# I. Introdução

---

Em 1991 R. H. Müller desenvolveu a primeira geração de nanopartículas lipídicas (NL), as nanopartículas lipídicas sólidas (do inglês, *solid lipid nanoparticles*, SLN) como um sistema alternativo de encapsulação de fármacos em relação aos sistemas coloidais tradicionais. [1, 2]

Desde muito cedo que as NL se mostraram um sistema de transporte de fármacos promissor e versátil, podendo ser administradas por diversas vias: oral, parenteral, dérmica, ocular, pulmonar e retal. [1, 3] Tal é devido a propriedades como o seu tamanho reduzido (50 a 1000 nm), excelente estabilidade físico-química, uma vez que possuem uma matriz sólida à temperatura ambiente e à temperatura corporal, que lhe proporciona uma maior proteção, no caso dos fármacos serem lábeis, e uma libertação controlada dos mesmos, apresentando também um excelente perfil de segurança, pois na sua composição são utilizados lípidos biocompatíveis e biodegradáveis, que são estabilizados por tensioativos não iónicos, aniónicos ou catiónicos. [1, 3-7] Para além disso, a sua produção é custo-efetiva, facilmente transposta para uma escala industrial, envolvendo excipientes de baixo custo e evitando o recurso a solventes orgânicos. [1, 8, 9]

Além das características mencionadas, a utilização de NL está associada a um melhor perfil farmacocinético comparativamente a outros sistemas de administração e a uma entrega eficiente do fármaco no local pretendido, devido à sua capacidade de direcionamento que, no caso dos citotóxicos, leva ao aumento da toxicidade em células tumorais resistentes e, deste modo, são minimizados os efeitos colaterais sistémicos destes fármacos. [10, 11]

Porém, é importante mencionar que as SLN apresentam também limitações, tais como: reduzida capacidade de carga, devido à baixa solubilidade dos fármacos no lípido sólido, particularmente para compostos hidrofílicos, e à estrutura cristalina da matriz e a ocorrência de transições polimórficas dos lípidos durante o armazenamento, conduzindo, muitas vezes, à expulsão do fármaco incorporado. [1] Para colmatar algumas destas limitações foi então desenvolvida uma 2ª geração de NL, os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC). [7] Mais recentemente, surgiram os conjugados fármaco-lípido (LDC) e as nanopartículas híbridas lípido-polímero (PLN) que apresentam uma elevada capacidade para incorporar fármacos hidrofílicos, como será discutido *a posteriori*. [10]

Com exceção de alguns tipos de cancro onde se usa a imunoterapia ou a terapia hormonal, os fármacos citotóxicos parecem permanecer como a principal forma de tratamento, por serem tóxicos para as células cancerígenas que apresentam uma divisão e

crescimento acelerados, causando a sua morte. [12] Porém, estes fármacos não são inócuos, pois apresentam uma elevada toxicidade e baixa especificidade, comprometendo assim o seu efeito terapêutico e conduzindo à ocorrência de mecanismos de resistência durante o tratamento. [10, 12]

As características físico-químicas favoráveis, a cinética de libertação controlada e a entrega específica do fármaco no local de ação fazem das NL uma valiosa opção como transportador de anticancerígenos, salvaguardando a exposição dos tecidos saudáveis a estes agentes, conduzindo a elevados níveis de toxicidade nos tecidos tumorais e aumentando a eficácia da quimioterapia. [10]

Esta monografia é uma revisão literária focada na otimização do desempenho das NL como sistemas de administração de anticancerígenos sendo, para isso, necessário conhecer as características e composição destas, métodos de preparação, bem como as propriedades dos fármacos a incorporar.

## 2. Nanopartículas lipídicas (NL)

---

### 2.1 Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)

As nanopartículas lipídicas sólidas são compostas por lípido(s) no estado sólido, tensoativos (associados a co-tensoativos, se necessário), água e pelo fármaco que se pretende incorporar. [10] O lípido sólido (tipicamente numa concentração 0,1 – 30% m/m) vai ser disperso numa solução aquosa de tensoativo (0,5 - 5% m/m). [13]

Os lípidos usados na preparação de SLN podem ser de diversas categorias, de acordo com a sua estrutura: ácidos gordos com diferentes comprimentos na cadeia hidrocarbonada, ésteres de ácidos gordos, álcoois gordos, ceras, glicéridos com diferentes estruturas ou misturas de mono- di- e triglicéridos. Podem também ser utilizados lípidos catiónicos, tais como a estearilamina (Tabela A.1). A escolha deste constituinte não é arbitrária, sendo um parâmetro crítico, uma vez que influencia a capacidade de incorporação do fármaco, o comportamento de libertação sustentada e a estabilidade das SLN. [10]

Fases lipídicas diferentes levam a diferentes coeficientes de partição e, conseqüentemente, a diferentes capacidades de carga. A capacidade de incorporação do fármaco é tanto maior quanto maior for a solubilidade deste no lípido fundido ou quando há um elevado coeficiente de partição entre o lípido e a fase aquosa, tendo como base o princípio igual-dissolve-igual. Deste modo, para se obter uma elevada capacidade de incorporação é necessário conhecer a solubilidade e polaridade do lípido em causa. [10]

A hidrofobicidade lipídica varia de acordo com o equilíbrio dos grupos funcionais hidrofóbicos e hidrofílicos, e vai determinar a hidrofobicidade global das SLN. [12]

O polimorfismo lipídico é um fenómeno típico das SLN em relação a outras formulações lipídicas. [14] Os lípidos no estado sólido podem adquirir diferentes formas meta-estáveis que, posteriormente, se irão transformar numa forma polimórfica termodinamicamente mais estável. [15] Esta mudança de forma conduz a um desafio no desenvolvimento das SLN. [16] Assim, no caso dos triglicéridos estão descritas três formas polimórficas: a forma- $\alpha$ , instável; a forma- $\beta'$ , meta-estável e a forma  $\beta$ , estável. [14] As moléculas de fármaco são incorporadas em espaços existentes entre os lípidos no estado sólido. Se o lípido estiver na forma meta-estável aquando da preparação, com o tempo irá converter-se na forma estável (mais ordenada) e esses espaços tendem a desaparecer. [1] Tal comportamento pode conduzir à expulsão do fármaco a partir do núcleo lipídico para a superfície, levando à libertação brusca do mesmo durante o armazenamento (Figura A.1). [7]

Devido a este fenómeno, na escolha de lípidos deve optar-se por lípidos com tendência a formar cristais perfeitos de forma a evitar transições polimórficas. Sabe-se, por

exemplo, que os lípidos com cadeias longas de ácidos gordos apresentam transições polimórficas mais lentas do que aqueles com cadeias curtas. Outros fatores devem ser considerados, como as condições de armazenamento bem como os métodos de produção. Assim, por exemplo, se o arrefecimento for rápido a matriz lipídica tende a ficar na forma meta-estável. A escolha do tensoativo e de co-tensoativos é também crucial, podendo influenciar o comportamento polimórfico dos lípidos da matriz, quer favorecendo a recristalização na forma meta-estável, quer aumentando a velocidade de cristalização. [10, 17, 18] Os tensoativos têm uma cabeça hidrofílica e uma cauda lipofílica, reduzindo a tensão superficial entre as duas fases. Desta forma, vão ajudar a dispersar o lípido na fase aquosa e a estabilizar a nanopartícula após o arrefecimento. São vários os fatores que devem ser considerados na escolha dos tensoativos: equilíbrio hidrófilo-lipófilo (HLB), a via de administração, a toxicidade e os efeitos na modificação dos lípidos e no tamanho da partícula. [10, 19]

O tipo de SLN vai depender da natureza química do fármaco e do lípido, da solubilidade do fármaco nos lípidos fundidos, da natureza e concentração dos tensoativos, do método e temperatura de produção utilizados. [20] Assim foram descritos três modelos de incorporação (Figura A.2):

- 1- SLN tipo I ou modelo de matriz homogénea;
- 2- SLN tipo II ou modelo com fármaco “em concha”;
- 3- SLN tipo III ou modelo do núcleo enriquecido com o fármaco.

As SLN tipo I possuem uma matriz caracterizada pela distribuição homogénea de fármaco no lípido. Estas SLN são obtidas através da técnica de homogeneização a elevada pressão (HPH) a frio (ver secção 2.5.1), segundo a qual é preparada uma mistura de lípidos contendo o fármaco molecularmente disperso. Após a solidificação da mistura, esta é submetida a um processo de moagem, evitando assim o enriquecimento de fármaco em diferentes partes da SLN. [20]

As SLN do tipo II são obtidas quando é usada a técnica de HPH a quente e a concentração de fármaco no lípido é baixa. Durante o processo de arrefecimento o lípido irá precipitar primeiro, conduzindo a uma concentração cada vez maior de fármaco no lípido remanescente. Quando o fármaco atinge a sua saturação uma camada externa irá solidificar, contendo a substância ativa e lípidos. O enriquecimento da zona exterior das partículas favorece a libertação imediata do fármaco (*burst effect*). A percentagem de fármaco localizado no invólucro exterior pode ser ajustada de uma maneira controlada através da alteração de parâmetros de produção, tais como a temperatura. [20, 21]

As SLN do tipo III surgem quando a concentração de fármaco na massa lipídica é elevada ou relativamente próxima da sua concentração de saturação. O arrefecimento do lípido, na maioria dos casos reduz a solubilidade do fármaco. Quando a concentração de saturação é ultrapassada, o fármaco precipita, conduzindo à formação de um núcleo enriquecido com fármaco. [20] Nesta situação, a libertação do fármaco vai ser prolongada. [10]

O tamanho reduzido, a capacidade de incorporação e a extensa superfície tornam as SLN um sistema de administração de fármacos muito promissor, alternativo aos sistemas convencionais. Em relação às nanopartículas poliméricas, as SLN são compostas por lípidos biocompatíveis que são fisiologicamente bem tolerados quando administrados *in vivo* (excipiente GRAS), podendo ser preparadas sem o uso de solventes orgânicos que poderiam, por vezes, ser tóxicos. [14] Comparativamente às nanoemulsões, a matriz sólida das SLN torna possível a libertação prolongada do fármaco; os lípidos sólidos vão também proteger os fármacos instáveis e sensíveis da degradação e coalescência, reduzindo a partição dos fármacos para a fase externa. [10] Os tensoativos usados nas SLN são, normalmente, os utilizados em sistemas coloidais associados a menor toxicidade. A adaptação da produção das SLN a uma escala industrial com custos reduzidos torna-as ainda mais atraentes, sendo também possível submetê-las a um processo de esterilização. [10, 14]

Porém, as SLN apresentam limitações, como foi já referido, tais como a reduzida capacidade de carga determinada pela matriz sólida cristalina, particularmente para fármacos hidrofílicos, e a expulsão de fármaco durante o armazenamento devido às transições polimórficas. Tal levou ao desenvolvimento de outras nanopartículas lipídicas. [22]

## 2.2 Transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC)

Os NLC foram desenvolvidos para colmatar as desvantagens das SLN. Os NLC apresentam uma capacidade de carga de fármacos mais elevada, devido à matriz sólida menos organizada resultante da mistura de um lípido sólido com um lípido líquido (óleo) num rácio tipicamente de 70:30 a 99,9:0,1. [13] Esta matriz sólida apresenta um ponto de fusão inferior às SLN, mantendo-se, no entanto, sólida à temperatura ambiente e corporal. Consequentemente, a probabilidade de “expulsão” do fármaco devido a transições polimórficas vai ser menor (Figura 2). Os NLC têm também um menor teor de água que as SLN e permitem uma maior estabilidade química dos fármacos incorporados. [22, 23]

Estão descritos três modelos para a nanoestrutura dos NLC (Figura A.3) [20]:

- 1- NLC tipo I ou modelo do cristal imperfeito;
- 2- NLC tipo II ou modelo amorfo;

### 3- NLC tipo III ou modelo múltiplo.

Os NLC do tipo I são também definidos como modelo do cristal imperfeito, porque na sua matriz existem muitas imperfeições que são capazes de acumular fármacos. Este modelo é obtido através da mistura de lípidos sólidos com pequenas quantidades de lípidos líquidos (óleos). Devido aos diferentes comprimentos de cadeia dos ácidos gordos e da mistura de mono-, di- e triglicéridos, a matriz nas NLC não é capaz de formar uma estrutura ordenada. [20]

Os NLC do tipo II, também denominados de modelo amorfo, são criados através da mistura de lípidos que não recristalizam mais, formando uma estrutura amorfa depois de homogeneização e arrefecimento. [20]

Os NLC do tipo III são descritos como modelo múltiplo. Este modelo foi desenvolvido para melhorar a capacidade de carga de alguns fármacos, nomeadamente aqueles cuja solubilidade em lípidos líquidos é maior do que em lípidos sólidos. São derivados de emulsões do tipo A/O/A, consistindo na dispersão de nanocompartimentos de óleo em lípido sólido, em água. Neste modelo misturam-se lípidos sólidos com lípidos líquidos (óleos) numa razão tal que a solubilidade do óleo no lípido sólido é excedida. O lípido fundido e o óleo quente são então misturados devendo mostrar um intervalo de miscibilidade nas concentrações utilizadas (aproximadamente 40°C). Uma nanoemulsão é produzida a uma temperatura ainda mais elevada (aproximadamente 80°C), seguindo-se o arrefecimento das gotículas lipídicas. Ao atingir o intervalo de miscibilidade, o óleo precipita formando gotículas pequenas de óleo no lípido sólido fundido. A solidificação dos lípidos sólidos na matriz leva a fixação das gotículas oleosas. [20]

Tal como as SLN, os NLC podem ser produzidos em grande escala através do método de homogeneização a elevada pressão e o processo pode ser modificado para produzir dispersões de partículas lipídicas com um teor sólido de 30 a 80%. [22, 24]

## 2.3 Conjugados fármaco-lípido (LDC)

Os conjugados fármaco-lípido (LDC, do inglês, *lipid drug conjugates*) foram desenvolvidos para colmatar a reduzida capacidade de carga na matriz lipídica das SLN, em particular para fármacos hidrofílicos, devido à partição para a fase aquosa durante o processo de produção. Apenas fármacos potentes em baixa dose podem ser adequadamente incorporados na matriz lipídica sólida. De forma a ultrapassar esta limitação surgiram os LDC que apresentam uma capacidade de carga até 33%. A conjugação do fármaco com o lípido é conseguida por formação de um sal (por exemplo, com um ácido gordo) ou por ligação covalente (por exemplo, com ésteres). Por fim, este conjugado vai ser processado

com uma solução de tensoativo para a formulação de nanopartículas. Estas nanopartículas são esféricas e apresentam um núcleo com fármaco estabilizado por um tensoativo (Figura A.4). [25]

## **2.4 Nanopartículas híbridas lípido-polímero (PLN)**

A fim de melhorar a incorporação de fármacos hidrofílicos, surgiram também as PLN (do inglês, *Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles*) (Figura A.5). Neste tipo de NL, é formado um complexo por um fármaco iónico com um polímero iónico de carga oposta como, por exemplo, o sulfato de dextrano, que é depois incorporado na fase lipídica. A Figura A.6 ilustra esse processo. [10, 26]

Nestes sistemas, o polímero pode conduzir a uma libertação mais rápida do fármaco. Assim, as moléculas de fármaco perto da superfície são inicialmente libertadas, deixando as moléculas do polímero dissociadas relativamente hidrofílicas. Entretanto, algumas cargas residuais do polímero que não estão completamente neutralizadas podem acelerar o processo de erosão, havendo uma maior libertação de fármaco a partir do interior da nanopartículas (Figura A.7). [12]

## **2.5 Métodos de produção**

### **2.5.1 Homogeneização a elevada pressão (HPH): quente e frio**

A homogeneização a elevada pressão é um método adequado para a preparação de NL e pode ser realizada a temperatura elevada (HPH a quente) ou a temperatura baixa (HPH a frio). Esta técnica apresenta diversas vantagens: evita a utilização de solventes orgânicos, permite a obtenção de dispersões com elevado conteúdo de partículas e é de fácil transposição para a escala industrial. [25]

Na HPH a quente, o fármaco (preferencialmente lipofílico) é dissolvido ou suspenso no lípido fundido. A fase oleosa é dispersa numa solução aquosa de tensoativo(s) à mesma temperatura, obtendo-se uma pré-emulsão a quente. Esta é posteriormente processada num homogeneizador de elevada pressão com temperatura controlada de acordo com um número de ciclos pré-determinado, normalmente três. A nanoemulsão obtida vai recrystalizar durante o arrefecimento até à temperatura ambiente, formando as nanopartículas lipídicas (Esquema A.1). Em geral, as temperaturas mais elevadas resultam em partículas com tamanho inferior, devido à diminuição da viscosidade da fase interna. No entanto, as altas temperaturas podem aumentar a degradação do fármaco e transportador, sendo crítico para fármacos termolábeis. O aumento da pressão de homogeneização ou do

número de ciclos resulta, normalmente, num aumento do tamanho de partícula por coalescência, como resultado da elevada energia cinética das partículas. [5]

A HPH a frio foi desenvolvida para ultrapassar vários problemas associados à homogeneização a quente, tais como: o facto da temperatura elevada poder induzir a degradação do fármaco, a possibilidade do fármaco sofrer partição para a fase aquosa durante a homogeneização e a complexidade do passo de cristalização. Deste modo, esta técnica permite a incorporação de fármacos hidrofílicos, evitando este problema e minimizando a exposição térmica apenas necessária numa fase inicial. O primeiro passo é semelhante ao que ocorre na HPH a quente e inclui a solubilização ou dispersão do fármaco no lípido fundido. Subsequentemente, a fase interna oleosa é colocada em azoto líquido de forma a promover um rápido arrefecimento e submetida a moagem para obtenção de micropartículas. Estas são, posteriormente, dispersas na solução de tensoativo a frio, formando-se uma pré-suspensão, que é homogeneizada num HPH segundo um número definido de ciclos, obtendo-se assim as nanopartículas lipídicas (Esquema A.1). Comparativamente à HPH a quente, na HPH a frio as partículas têm, normalmente, tamanhos superiores e uma distribuição mais alargada. [5, 14]

### **2.5.2 Homogeneização a elevada velocidade (HSH) e ultrassonicação (US)**

A homogeneização a elevada velocidade e a ultrassonicação são técnicas que também permitem produzir nanopartículas lipídicas. A maior vantagem é que os equipamentos usados são bastante comuns no laboratório. De acordo com estas técnicas, o fármaco é incorporado no lípido fundido e a fase interna oleosa dispersa numa solução aquosa de tensoativo, recorrendo a um homogeneizador de elevada velocidade ou ultrassonicador. Após arrefecimento da mistura formam-se as nanopartículas lipídicas (Esquema A.2). As desvantagens destes métodos são a distribuição do tamanho das partículas, que, por vezes é ampla, podendo variar na gama dos micrómetros, o que leva a instabilidade física com o crescimento de partículas durante o armazenamento e a contaminação com metais, no caso da US. [27]

### **2.5.3 Microemulsificação**

Esta técnica baseia-se na diluição de microemulsões. [27] A microemulsão é uma dispersão transparente, fluida, óticamente isotrópica e termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis, contendo quantidades apropriadas de tensoativos (e co-tensoativos se necessário). Nesta técnica, o fármaco é disperso no lípido fundido, e a essa mistura adiciona-

se uma solução de tensoativo quente. A agitação suave e a elevada concentração de tensoativos conduz à obtenção da microemulsão. Por fim, a microemulsão é dispersa em água fria (2°C-4°C) em excesso, normalmente na proporção de 1:20, sob agitação, formando-se as nanopartículas lipídicas (Esquema A.3). A distribuição do tamanho de partícula e a estabilidade estão relacionados com as propriedades de microemulsão, tais como os lípidos e os tensoativos utilizados, a concentração dos tensoativos e a proporção de fármaco/lípido. Este processo tem como vantagem a baixa energia mecânica utilizada. Porém, a baixa concentração de nanopartículas como resultado do passo de diluição do sistema, e a complexidade em termos de formulação constituem algumas das desvantagens. [25]

#### **2.5.4 Emulsificação - evaporação do solvente**

Na técnica de emulsificação – evaporação do solvente, a fase interna é constituída por lípido e fármaco dissolvidos num solvente orgânico imiscível com água (p.ex. clorofórmio) e, em seguida, é emulsionada numa fase aquosa contendo o tensoativo, recorrendo a um homogeneizador de alta velocidade ou ultrassonicador. Por fim, o solvente orgânico é evaporado, usando, por exemplo, um evaporador rotativo, e as NL são obtidas por precipitação (Esquema A.4). Aqui o tamanho da partícula depende, em parte, da concentração de lípido na fase orgânica (tamanhos menores podem ser obtidos com uma reduzida concentração de lípido em relação ao solvente orgânico. A grande vantagem deste método é a possibilidade de evitar o *stress* térmico. Porém, tem como desvantagem o uso de solventes orgânicos e o facto da solubilidade do lípido no solvente orgânico ser limitada, levando a dispersões diluídas, o que torna este método menos atrativo. [14]

#### **2.5.5 Dupla emulsificação**

Nesta técnica, o fármaco é dissolvido em água, e depois disperso numa fase orgânica contendo o lípido e emulsionante. Posteriormente, esta emulsão primária (A/O) vai ser dispersa numa solução aquosa que contém um emulsionante hidrofílico. Por fim o solvente é evaporado e obtêm-se as nanopartículas lipídicas (A/O/A) (Esquema A.5). [28]

A grande vantagem desta técnica é que permite incorporar fármacos hidrofílicos e evita o *stress* térmico permitindo incorporar fármacos termolábeis. Por outro lado, a utilização de solventes orgânicos e a elevada polidispersão constituem as principais limitações desta técnica. [28]

Em síntese, na Tabela A.2 é feita a comparação, com as vantagens e desvantagens, de cada um dos métodos mencionados.

## 2.6 Propriedades

Uma adequada caracterização físico-química das NL é crucial para assegurar a qualidade do produto, a estabilidade, e a própria cinética de libertação. Dentro dos parâmetros a analisar destacam-se: tamanho de partícula, morfologia, potencial zeta, grau de cristalinidade e polimorfismo, a eficiência de encapsulação e capacidade de carga. [14]

O tamanho de partícula é um ótimo indicador de estabilidade. As formulações adequadas devem ter uma baixa polidispersão e tamanho médio inferior a 1µm. Este parâmetro é afetado pela composição da formulação (mistura de tensioativos, propriedades dos lípidos e fármacos incorporados), pelos métodos de produção e a temperatura. Por exemplo, elevadas quantidades de tensioativo favorecem a formação de partículas menores; outro exemplo, são as baixas temperaturas que tendem a formar partículas maiores. [29] O tamanho de partícula pode ser determinado por espectroscopia de correlação fotónica (PCS), difração de laser ou recorrendo a técnicas microscópicas de alta resolução. [14]

A análise da morfologia é útil para obter informações relativas à forma e ao tamanho. Assim, pode ser estudada através da microscopia electrónica de varrimento (SEM), microscopia electrónica de transmissão (TEM) e microscopia de força atómica (AFM). [14] A AFM, para além da forma e superfície, permite obter informações acerca da topografia das nanopartículas (informação tridimensional). [30]

Tal como o tamanho de partícula, o potencial zeta é um parâmetro que dá uma indicação da estabilidade do sistema coloidal. Para além disso, este parâmetro também permite inferir acerca da possível localização do fármaco na nanopartícula. O potencial zeta é uma propriedade física relacionada com a carga superficial de uma partícula em suspensão, sendo influenciado pelas mudanças na interface com o meio onde é disperso, pela dissociação de grupos funcionais na superfície ou adsorção de compostos iónicos presentes no meio aquoso da dispersão. [31] Este parâmetro pode ser determinado através da dispersão eletroforética da luz (ELS). [14]

O grau de cristalinidade e polimorfismo são parâmetros importantes, uma vez que como foi referido anteriormente, condicionam a estabilidade das nanopartículas, quando há mudanças polimórficas das formas instáveis e meta-estáveis para a forma estável, podendo conduzir à libertação do fármaco incorporado. [7] Estes parâmetros podem ser estudados através da calorimetria de varrimento diferencial (DSC) e pela difração de raios-X. [14]

Devido ao tamanho reduzido das nanopartículas, a determinação da quantidade de fármaco é complexa. A técnica mais utilizada para esse efeito é a ultrafiltração-centrifugação. Esta técnica permite a separação das nanopartículas da fase externa aquosa, recorrendo a

uma unidade de filtração com determinado MWCO, sendo a concentração de fármaco livre, presente na suspensão, determinada por método indireto no filtrado, após centrifugação. Assim pode determinar-se a eficiência de encapsulação (razão da massa do fármaco encapsulado, determinada pela diferença da massa de fármaco total e a massa de fármaco livre, pela massa de fármaco total) e a capacidade de carga (razão da massa do fármaco encapsulado, determinada pela diferença da massa de fármaco total e a massa de fármaco livre, pela massa lipídica). [32]

### **3. Nanopartículas lipídicas e anticancerígenos**

---

#### **3.1 Obstáculos à quimioterapia e o uso das NL**

Na maioria dos tumores, a quimioterapia com fármacos citotóxicos permanece como a terapêutica mais vulgarmente utilizada. [10] Porém, apesar dos avanços que existem, os resultados de tratamentos com quimioterapia continuam a ser insatisfatórios. A taxa de resposta para o cancro do pâncreas, cancro do esófago e cancro do ovário estão abaixo dos 20%, por exemplo. [33] Mesmo em tumores malignos que são sensíveis a agentes citotóxicos, como por exemplo no cancro de mama, os resultados clínicos estão abaixo da expectativa. Em comparação com outras classes de medicamentos, os fármacos anticancerígenos apresentam problemas únicos, destacando-se a pouca especificidade, alta toxicidade e a suscetibilidade de induzir resistência. Os fármacos citotóxicos administrados convencionalmente ligam-se extensiva e indiscriminadamente aos tecidos do corpo e às proteínas do plasma de forma imprevisível. Apenas uma pequena fração dos medicamentos consegue alcançar o tumor. [12] Deste modo, a eficácia terapêutica fica reduzida e há um aumento da toxicidade do fármaco a nível sistémico. Idealmente, os fármacos citotóxicos só deveriam atuar sobre as células cancerígenas, mas na realidade eles também são tóxicos para as células de divisão rápida, por exemplo, as células da medula óssea e as células do trato gastrointestinal. A fraca especificidade de fármacos anticancerígenos quer em termos de biodistribuição, quer a nível farmacológico, constitui um desafio significativo para que os anticancerígenos sejam eficazes. Dependendo da escolha do fármaco, diferentes órgãos ou tecidos podem ser estimulados ou danificados pela ação não específica destes. [34] Quase todos os citotóxicos têm efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, fadiga e perda de cabelo. Porém, alguns desses efeitos são específicos e podem ser, por vezes, fatais, como por exemplo, as antraciclina podem causar cardiotoxicidade. [35] Os fármacos citotóxicos têm uma curva dose-resposta acentuada e elevada para que o êxito terapêutico seja obtido. [36] Isto leva a um dilema difícil para os médicos: escolher entre altas doses do fármaco com

elevado risco de toxicidade para os tecidos normais, ou usar fármacos em doses baixas sendo a probabilidade de resposta terapêutica menor. [37] Também as células cancerígenas exercem mecanismos a nível celular de forma a diminuir a toxicidade dos agentes citotóxicos a elas expostos, o que leva a resistência celular. A mais notável é a resistência a múltiplos fármacos (MDR) presente a nível do fenótipo, que envolve o efluxo ativo de uma ampla variedade de fármacos citotóxicos para fora do citoplasma, através da sobreexpressão de um transportador - glicoproteína-P (P-gp). [37, 38] A P-gp é uma glicoproteína associada à membrana celular e é capaz de transportar ativamente diversos substratos, incluindo vários agentes anticancerígenos, citotóxicos hidrofóbicos, tais como alcalóides da vinca (vincristina, vinblastina), taxanos (paclitaxel, docetaxel), as epipodofilotoxinas (etoposido, teniposido), as antraciclinas (doxorrubicina, daunorrubicina, epirrubicina), topotecano, dactinomicina e mitomicina-C para fora das células, tornando a quimioterapia ineficaz. [39] As nanopartículas lipídicas podem transportar os fármacos para dentro das células cancerígenas por endocitose, ultrapassando o mecanismo de efluxo de fármacos pela P-gp, contornando assim este problema. [40] Por vezes, há barreiras que dificultam a permeação dos fármacos citotóxicos, nomeadamente em tumores sólidos, o que torna difícil alcançar elevadas concentrações de fármacos nas células cancerígenas. [38, 41] A nível vascular, a angiogénese encontra-se desregulada, e o fluido intersticial é por vezes insuficientemente drenado devido ao sistema linfático deficitário. Deste modo, as nanopartículas podem extravasar para dentro do tumor sendo aí retidas. Este efeito de permeabilidade aumentada e retenção faz com que as nanopartículas lipídicas alcancem o tumor, resolvendo assim a baixa especificidade dos citotóxicos acima mencionados. A modificação físico-química da superfície das nanopartículas lipídicas tem sido também usada na sua biodistribuição de forma a melhorar o direcionamento para o tecido alvo. Assim, a quantidade de fármaco a atingir as células cancerígenas é maximizada e a sua toxicidade sistémica é diminuída. [1] As nanopartículas lipídicas rapidamente ganharam terreno como transportadores de fármacos anticancerígenos demonstrando as seguintes propriedades: 1) versatilidade do transportador ao permitir a encapsulação de fármacos citotóxicos com diferentes propriedades físico-químicas; 2) melhoria da estabilidade do fármaco; 3) capacidade de incorporar mais de um fármaco num mesmo transportador, o que permite a possibilidade de combinar fármacos e agentes com diferentes ações, o que vai melhorar a *compliance* do doente e aumentar a eficácia do tratamento, por exemplo, ao combinar um agente citotóxico com um quimiossensibilizador; 4) melhoria na citotoxicidade *in vitro* contra as células tumorais; 5) maior eficácia dos fármacos, demonstrada em modelos animais; 6) melhoria na farmacocinética e distribuição dos fármacos *in vivo*. [10]

## 3.2 Anticancerígenos

Os anticancerígenos podem ser divididos com base na solubilidade que apresentam. A maioria destes fármacos são lipofílicos e pouco solúveis em água. Porém, existem várias exceções: alguns fármacos são solúveis em água, porque as moléculas destes são pequenas e contêm grupos hidrófilos. Devido aos grupos ionizáveis que alguns fármacos lipofílicos possuem, podem ser convertidos em sais iônicos solúveis em água, permitindo a solubilização e administração através de solventes aquosos convencionais, como é o caso da dextrose a 5% ou soro fisiológico a 0.9%. [42]

### 3.2.1 Lipossolúveis

Dentro deste grupo de anticancerígenos encontramos inibidores da topoisomerase-I, como é o caso da camptotecina e irotecano e os seus pró-fármacos; taxanos, como é o caso do paclitaxel e outros compostos lipofílicos com propriedades anti-tumorais, como: o etoposido, o ácido *all-trans*-retinóico e o ácido butírico. Em geral, todos estes compostos são eficientemente encapsulados nas SLN, não sendo necessário modificações nas nanopartículas. [10]

#### 3.2.1.1 Camptotecina (SN-38)

A camptotecina é um composto alcalóide extraído da planta *Camptotheca acuminata*. [10] As moléculas de camptotecina e os derivados desta possuem estruturas aromáticas extensas, sendo bastante lipofílicos. [43] A atividade anti-tumoral da camptotecina está fortemente correlacionada com a funcionalidade do anel lactónico que possui. Em meio aquoso, em particular em pH básico, este anel é vulnerável à hidrólise, o que leva à formação de um grupo carboxilo que torna o composto farmacologicamente inativo (Figura A.8). Assim, a baixa solubilidade e estabilidade química deste composto comprometem a sua aplicação. [44] Estes dois problemas podem ser superados através do uso de nanopartículas lipídicas, tendo sido demonstrada uma eficiência de encapsulação de 99,6%, o que confirmou a sua capacidade para incorporar compostos lipofílicos. No mesmo estudo, foi confirmado o efeito protetor das SLN, tendo o fármaco permanecido no estado ativo (com o anel lactónico) até ser libertado no local alvo. [10]

Num estudo recente, foram formuladas SLN, e foi caracterizado o seu efeito citotóxico. A absorção celular e a retenção foram aumentadas duas vezes, quando as SLN foram utilizadas. Assim, os efeitos anticancerígenos são melhorados em relação ao fármaco livre, podendo ser uma estratégia promissora para melhorar os efeitos quimioterapêuticos. [44]

### **3.2.1.2 Irinotecano (CPT-11 ou camptosar)**

Este composto é o mais potente dos inibidores da topoisomerase-I. Em relação à camptotecina é mais estável e menos lipofílico. [45]

A nível terapêutico é geralmente usado em quimioterapia no cancro do colón. É um pró-fármaco da SN-38 cuja atividade anti-tumoral é cerca de mil vezes superior ao irinotecano (Figura A.9). A utilização clínica do SN-38 é impedida devido à extrema hidrofobicidade que este composto apresenta. Apesar de menos provável, a abertura do anel lactónico por hidrólise do irinotecano e SN-38 pode ocorrer. [45]

De forma a melhorar a solubilidade em água e a estabilidade química foram preparadas nanopartículas lipídicas (nomeadamente SLN). A formulação de SLN permitiu alcançar uma concentração elevada de SN-38: 1,0mg/ml. A estabilidade do anel lactónico (forma ativa) foi melhorada. Após 3h de incubação em albumina sérica humana, a concentração de SN-38 na forma ativa foi de 80%. [47] Esta concentração foi superior em relação às retenções de 40% obtidas quando formuladas SLN só com irinotecano. Em ambos os estudos foi demonstrada melhoria na solubilização dos fármacos, bem como na preservação da estabilidade destes. [10]

### **3.2.1.3 Paclitaxel**

O paclitaxel é um agente anti-microtubular e tem atividade anti-tumoral de largo espectro, sendo eficaz contra vários tipos de tumores, mesmo usado isoladamente. O paclitaxel disponível no mercado está formulado sob a forma de solução micelar não aquosa, contendo um óleo de rícino polioxetilado, o Cremophor EL (taxol) e etanol desidratado. O Cremophor EL é conhecido por causar reações de hipersensibilidade graves e nefrotoxicidade. [48] Para solubilizar o paclitaxel sem a necessidade de Cremophor EL, foram desenvolvidas formulações com nanopartículas lipídicas (SLN mais especificamente). [48] Todos esses excipientes são comuns em formulações parenterais, apresentando maior segurança que o Cremophor EL. O paclitaxel é normalmente diluído para uma concentração de 0,6-1,2 mg/ml com soro fisiológico ou dextrose para uso clínico. Como o paclitaxel é um fármaco com baixa estabilidade física, esta diluição pode destabilizar a formulação e levar à precipitação do fármaco, sendo necessário filtrar a solução antes da administração, o que conduz a um aumento no custo do trabalho, para além da concentração do fármaco ficar alterada. Quando o paclitaxel é formulado com as SLN este problema não é encontrado [41] A precipitação do paclitaxel também pode ocorrer quando o sistema de libertação não é controlado, pois ao libertar o fármaco rapidamente pode atingir-se a concentração de saturação do mesmo. Quando transportado através das SLN essa precipitação não foi

observada.[49] O paclitaxel-SLN quando liofilizado demonstrou estabilidade e as SLN dispersaram facilmente. [50] Deste modo, os problemas associados ao paclitaxel, incluindo o elevado risco de hipersensibilidade e a precipitação frequente, são resolvidos usando SLN. Atualmente, foram desenvolvidos novos anticancerígenos análogos ao paclitaxel e mais específicos, podendo as nanopartículas lipídicas ser também úteis para estes novos compostos. [10]

### **3.2.1.4 Outros compostos**

#### **Etoposido (VP-16)**

É um dos anticancerígenos mais antigos e ainda hoje se usa em quimioterapia. É um alcalóide que inibe a topoisomerase II e produz derivados reativos que podem levar a quebra do DNA. Este fármaco foi encapsulado em SLN com sucesso. Sendo estável e redispersível quatro meses após a preparação, o sistema de SLN demonstrou uma eficiência de encapsulação de 98,96%, com 4% de etoposido. [51]

#### **Sulindac**

Este composto é um anti-inflamatório não esteróide (AINE) que demonstrou capacidade para reduzir a incidência de alguns câncros, nomeadamente do pulmão. No entanto o uso deste a longo prazo está associado a toxicidade gastrointestinal. Para contornar este problema sintetizou-se o fosfo-sulindac (PS). Este composto tem eficácia no tratamento de cancro e menor toxicidade gastrointestinal. No entanto, o PS é muito hidrofóbico, resultando em baixa solubilidade em ambientes aquosos. Esta propriedade limita a sua biodisponibilidade e a sua entrega efetiva no tumor *in vivo*. Assim, as nanopartículas lipídicas surgem como uma forma de superar este problema, permitindo a dissolução do fármaco em meio aquoso, a estabilização do fármaco, distribuição específica junto ao órgão-alvo e ajudam a superar a resistência. [11]

Num estudo recente, procedeu-se à incorporação de PS em SLN e verificou-se um aumento da eficácia contra o cancro do pulmão. Com as SLN houve um reforço no direcionamento mitocondrial, um efeito crucial responsável pela indução de apoptose *in vivo* e *in vitro*. A formulação com SLN aumentou 35 vezes o conteúdo na mitocôndria em comparação com o PS livre. [11]

#### **Ácido *all-trans*-retinóico**

É um anticancerígeno conhecido pela sua instabilidade química: termossensibilidade, fotossensibilidade e oxida facilmente, podendo por isomerização ser convertido em isotretinoína ou ser oxidado formando compostos inativos. A estabilidade química do ácido *all-trans*-retinóico foi avaliada após incorporação em SLN, tendo permanecido mais de 90%

do fármaco intacto, após 3 meses de armazenamento a 4°C. O mesmo fármaco, nas mesmas condições de armazenamento, sem estar associado a SLN, em um mês sofreu uma degradação de cerca de 50%. [52] Um estudo recente envolveu a formulação de SLN com uma amina lipofílica (benetamina). Foi possível obter uma elevada eficiência de encapsulação (quase 100%) para o ácido retinóico. Além disso, a atividade anti-tumoral *in vitro* foi melhorada quando comparada com o ácido retinóico livre e noutras formulações de nanopartículas, tendo resultado numa otimização da formulação. [53]

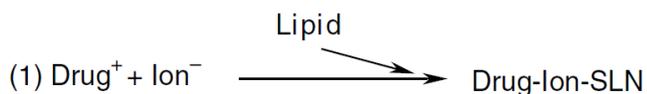
### **Ácido Butírico**

O ácido butírico, trata-se de um ácido gordo, sendo um composto anticancerígeno muito usado no cancro do cólon. Este composto estimula a absorção de eletrólitos, inibe a inflamação do cólon e o *stress* oxidativo, melhora as barreiras de defesa do cólon e inibe a carcinogénese. A ausência de butirato é associada a atrofia da mucosa e a morte das células do cólon. *In vitro*, este composto mostra um efeito inibitório no crescimento de células cancerígenas: induz a apoptose, inibe a proliferação e promove a diferenciação [54], não só em células de cancro colorretal, mas também em células de cancro da mama, gástrico, do pulmão, cérebro e pâncreas. No entanto, *in vivo*, esse efeito é muito baixo devido à sua semivida curta, por causa do seu metabolismo acelerado. [55] Isto requer a sua administração parentérica contínua para manter concentrações terapêuticas. Além disso, os acontecimentos adversos (anemia, dor de cabeça, náuseas, diarreia, cólicas abdominais e odor forte) reduzem ainda mais a adesão à terapêutica do doente. Um estudo recente mostrou que as SLN com o ácido butírico promoveram a diminuição da adesão de células tumorais a células endoteliais, o que é crucial para impedir a sua metastização. [54] Um outro estudo mostrou que a incorporação do ácido butírico nas SLN fez com que a inibição da adesão fosse de longa duração, sendo detetável 8 horas após o tratamento com o fármaco, e teve a duração de 48h. A principal conclusão foi que a formulação com as SLN inibiu a adesão em concentrações mil vezes menores comparativamente ao ácido butírico livre o que sugeriu que as SLN eram um sistema eficiente para entrega do fármaco. [56]

### **3.2.2 Hidrossolúveis**

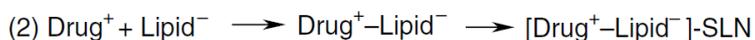
Existem agentes citotóxicos solúveis em água como é o caso do 5-fluorouracilo (5-FU) e a mitomicina-C, sendo, porém, relativamente poucos. Além disso, alguns fármacos lipofílicos são utilizados na forma de sais, de modo a serem convenientemente diluídos e administrados através de veículos à base de água. [12] Por exemplo, as antraciclinas, como a doxorrubina e alcalóides da vinca, como a vincristina, são muitas vezes administrados através do soro. Quando o fármaco hidrofílico é altamente potente, apenas é preciso uma pequena

quantidade para este ser eficaz. Porém, na maioria das vezes, para que o efeito anticancerígeno seja o desejado são precisos vários miligramas de fármaco. [57] Assim, é necessário recorrer a estratégias para a incorporação destes fármacos em nanopartículas lipídicas, de forma a tirar partido das mais-valias, já referidas, que este tipo de transportadores apresenta. Uma dessas estratégias usadas envolve a adição de contra-íons orgânicos para formar pares iónicos com as moléculas de fármacos carregadas. Esta técnica foi utilizada na incorporação dos sais de doxorrubina e idarrubicina, para os quais se obteve melhorias na encapsulação destes fármacos em SLN. (Figura 1) [12]



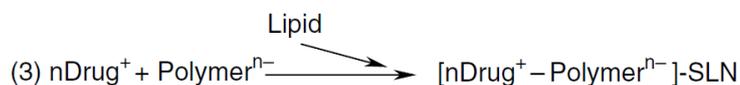
**Figura 1** Estratégia de incorporação do contra-íon [10]

Uma outra estratégia possível para a incorporação é a utilização de conjugados de fármaco-lípido (LDC). [12] Aqui procede-se à formação de um conjugado do fármaco com um lípido -ácido gordo – formando-se um sal, ou através de uma ligação covalente (por exemplo: ligação éster), tal como referido na secção 2.3. Esta mistura é posteriormente processada com uma solução de tensoativos para a formulação de nanopartículas pelos métodos tradicionais (Figura 2). [12]



**Figura 2** Formação de conjugados fármaco-lípido (LDC) [10]

Por fim, outra estratégia que pode ser utilizada, envolve a complexação de polímeros iónicos com os fármacos, de forma a produzir nanopartículas híbridas lípido-polímero (PLN) tal como já referido na secção 2.4. Aqui as cargas os fármacos são neutralizadas por contra-íons de polímeros, formando um complexo fármaco-polímero, que é posteriormente incorporado em lípidos para a preparação de nanopartículas (Figura 3). [12]



**Figura 3** Formação de PLN [10]

No geral é preferível usar o sal solúvel de um fármaco anticancerígeno para formular nanopartículas lipídicas quando ele se encontra disponível. [12]

### 3.2.2.1 Iônicos

#### Doxorrubicina e idarrubicina

Estes fármacos anticancerígenos pertencem ao grupo das antraciclinas. Acredita-se que o efeito anti-tumoral das antraciclinas se deva à sua capacidade para se difundir através da membrana celular, intercalando-se entre os pares de bases de DNA, tendo a topoisomerase II como alvo. [58] A doxorrubicina e a idarrubicina estão disponíveis sob a forma de sais e apresentam uma estrutura semelhante. Porém, a doxorrubicina é mais hidrofílica, devido à presença de grupos polares adicionais. Como ilustrado na Figura A.10, ambas as moléculas possuem um grupo amina e podem ser convertidas em sais de cloridrato. A doxorrubicina é um dos fármacos mais antigos e tem indicação para o tratamento de leucemias, linfomas, cancro da bexiga e da mama. Uma característica relevante da doxorrubicina é a sua instabilidade à luz e a algumas soluções ou fluidos biológicos. Os principais fatores relacionados com a sua degradação são a exposição à luz ultravioleta e a elevados pH, principalmente acima de 6,5. Já a idarrubicina é um análogo sintético da daunorrubicina, tem lipofilicidade melhorada, o que resulta numa absorção celular mais eficaz, tem uma melhor capacidade de quebra do DNA e maior citotoxicidade em relação à doxorrubicina. [58]

De forma a facilitar a incorporação destes sais nas SLN, utilizam-se as estratégias anteriormente referidas. Já foram utilizadas e testadas as estratégias do par-iônico e de PLN. [10]

Na estratégia do par iônico, os contra-íões usados foram o decil-fosfato ou hexadecil-fosfato, para a formação de pares com o cloridrato de doxorrubicina e cloridrato de idarrubicina em SLN contendo ácido esteárico e lecitina de ovo. Estes pares iônicos permitiram aumento da lipofilicidade em cerca de 1000 vezes para a doxorubicina e mais de 300 vezes para a idarrubicina. A capacidade de carga de doxorrubicina e idarubicina nas SLN atingiu 7% e 8,4%, respetivamente. Os fármacos, no entanto, foram libertados muito lentamente, provavelmente devido à sua lipofilicidade, tendo, a libertação após 2h sido inferior a 0,1%. Esta velocidade de libertação não permitiu atingir elevadas concentrações do fármaco nas células cancerígenas, sendo de referir que, a exposição crónica a concentrações sub-letais de fármacos anticancerígenos pode induzir resistência. [10, 58]

Outra abordagem estudada consistiu no uso de PLN. Foram preparadas com sucesso PLN de cloridrato de doxorrubicina através da inclusão de sulfato de dextrano como contra-íão. A eficiência de encapsulação foi superior a 70% na presença de sulfato de dextrano e de 40% na ausência deste.[26] Uma outra formulação de PLN com doxorrubicina

foi formulada com um polímero mais lipofílico: HPESO (epóxido de óleo de soja hidrolisado e polimerizado), tendo a capacidade de carga do anticancerígeno atingido os 6%. A libertação dos fármacos em ambas as formulações de PLN foi rápida, em comparação à conseguida com a formulação do par-iónico das SLN. [58-60]

Isto pode explicar-se devido à complexação fármaco-polímero não neutralizar completamente toda a carga, o que ajuda a libertar mais facilmente o fármaco, levando a uma terapia mais eficaz, em relação ao par iónico-SLN. As células cancerígenas que apresentam MDR, evidenciaram níveis de doxorrubicina-PNL mais elevados do que quando a doxorrubicina livre foi administrada. Deste modo, as nanopartículas lipídicas permitiram uma melhoria da eficácia terapêutica em caso de mecanismos de resistência. [40, 61]

### **3.2.2.2 Não iónicos**

#### **5-Fluorouracilo (5-FU)**

O 5-FU é um composto anticancerígeno muito usado no cancro da mama, trato gastrointestinal, cabeça e pescoço. [9] Este fármaco é o principal agente em quimioterapia com atividade clínica contra o cancro colorretal. [9] A solubilidade em água do 5-FU é elevada, o que torna difícil a incorporação nas SLN. Para contornar este obstáculo foi reduzida a solubilidade em água através da conjugação de dois grupos de octanoílo à molécula de 5-FU [62], formando o 3',5'-dioctanoílo-5-fluor-2'-desoxiuridina (FUdR). Este derivado pode ser incorporado nas SLN com uma eficiência de encapsulação superior a 90%. Esta estratégia envolveu procedimentos, por vezes, morosos. Os fármacos hidrofílicos como o 5-FU têm a vantagem de poder ser facilmente diluídos e administrados sem preocupação com a precipitação do fármaco. Nesta situação, a mais-valia das nanopartículas passa por permitir uma libertação controlada e melhorar o perfil do fármaco, no que diz respeito aos efeitos secundários e ao padrão de biodistribuição. [9]

## **4. Perspetivas futuras**

---

### **4.1 Combinação de quimiossensibilizadores com anticancerígenos em NL**

As nanopartículas lipídicas podem ser úteis para contornar o problema do efluxo de fármacos na membrana, causado pela P-gp (fenótipo MDR), mas é improvável que resolvam todos os problemas de resistência ao fármaco. Vários compostos apresentam atividade inibitória da P-gp, sendo designados por “quimiossensibilizadores”. Além da inibição do efluxo celular dos fármacos citotóxicos mediada pela P-gp, restauram a sensibilidade das

células resistentes a fármacos para o tratamento de quimioterapia. [63] O verapamil e a ciclosporina-A são quimiossensibilizadores que levaram a toxicidades significativas e a interações farmacocinéticas, devido às baixas potências e reduzida especificidade. O valspodar e o elacridar são mais potentes e específicos, que podem afetar a farmacocinética dos anticancerígenos administrados concomitantemente com eles, nem sempre sendo eficazes em tumores sólidos. Parte destas limitações podem ser resolvidas usando as NL. Dois estudos permitiram a encapsulação da ciclosporina-A [64] e verapamil [26] em SLN com sucesso. O último grupo de investigadores, desenvolveu ainda um sistema de co-encapsulação da doxorubicina e verapamil em PLN, que proporcionou a terapêutica citotóxica (doxorubicina) e a quimiossensibilização (verapamil), tendo verificado que os perfis de libertação não interferiam entre si. [26] Como o verapamil tem efeitos colaterais e não é específico para o P-gp (responsável pela resistência), formulou-se um sistema capaz de entregar a doxorubicina e um quimiossensibilizador mais potente – elacridar (GG-918). [65] Foi demonstrado que a co-encapsulação aumentou a concentração do anticancerígeno na célula e levou a uma maior eficácia (maior citotoxicidade) do que quando usados os compostos isoladamente. Este resultado sugere que os dois fármacos precisam de estar espacialmente próximos no local de ação para que haja um melhor efeito anticancerígeno. [65]

## **4.2 Targeting de NL para alvos tumorais específicos**

De forma a que a citotoxicidade seja seletiva é importante explorar as diferenças entre as células cancerígenas e saudáveis, nomeadamente a nível dos antigénios de superfície. Deste modo, o antigénio como só seria expresso nas células cancerígenas permitiria uma orientação molecular. [66] Com base neste pressuposto, foram desenvolvidos sistemas de SLN direcionadas para o recetor de folato (que é expresso em vários tipos de cancro) para a administração de um pró-fármaco de paclitaxel. [67] Esta formulação direcionada permitiu uma melhoria da absorção de fármacos e citotoxicidade em linhagens com recetores folato. Em ensaios *in vivo*, foi inibido o crescimento do tumor e a sobrevivência de animais também aumentou em relação às SLN formuladas sem direcionamento e em SLN com Cremophor EL. Os resultados deste estudo foram promissores, podendo levar ao desenvolvimento de mais NL direcionadas. [67]

Num estudo recente foram desenvolvidas SLN com paclitaxel com conjugados de um peptídeo de polietilenoglicol clivável enzimaticamente. Estes conjugados interagem especificamente com as melanoproteinasas, que são, por sua vez, sobre-expressas em células tumorais, permitindo assim especificidade na integração. Os resultados obtidos revelaram

que o fármaco foi acumulado no local do tumor numa maior extensão, persistiu mais tempo na circulação e mostrou uma menor toxicidade em relação às SLN com paclitaxel sem o peptídeo. [68]

O etoposido é usado no tratamento de cancro do ovário com alguns tipos de resistência. O hialuronato de sódio é um composto que se liga a recetores sobre-expressos das células cancerígenas do ovário. Neste estudo, foram desenvolvidas SLN com hialuronato contendo o etoposido e verificou-se que a citotoxicidade do etoposido aumentou em relação às SLN sem o hialuronato. Assim, pode ser uma mais-valia a nível terapêutico, podendo ser reduzida a dose prescrita e, conseqüentemente os efeitos secundários deste fármaco. [69]

### **4.3 Terapia génica anticancerígena através de NL**

Nos últimos anos, a terapia génica está a tornar-se uma estratégia muito promissora, podendo ser usada por si só ou combinada com um fármaco citotóxico. Na terapia génica é importante identificar um transportador não tóxico que seja capaz de atingir os tecidos cancerígenos com boa especificidade e que permita a transferência do material genético com alta eficiência. Tradicionalmente, têm sido usados agentes virais. Porém, estes podem provocar respostas imunitárias indesejadas. Já foram desenvolvidos e testados peptídeos, polímeros policatiónicos e, mais recentemente, SLN e lipossomas catiónicos. Estes sistemas apresentaram elevada eficiência de transfecção *in vitro*, mas *in vivo* a sua eficácia está longe de ser a ideal. [70]

Atualmente, nenhum sistema de SLN foi ainda utilizado para entrega de material genético, mas com as SLN catiónicas isso pode tornar-se possível. [70] Num estudo usaram-se Cos-1 de células semelhantes a fibroblastos de rim de macaco, e formularam-se lipossomas e SLN a partir dos mesmos lípidos catiónicos. Estas duas formulações mostraram-se equipotentes em eficiência de transfecção *in vitro*. Assim, as SLN mostram ser pelo menos tão eficazes como os lipossomas na terapia génica. [70]

Recentemente, formularam-se SLN de superfície modificada com uma proteína fluorescente verde, contendo doxorribucina e um plasmídeo (pEGFP), com o objetivo de combinar a terapêutica anticancerígena com a terapia génica. A citotoxicidade *in vitro* desta formulação foi baixa e o efeito terapêutico foi notável, tanto a nível farmacológico como na terapia génica. Deste modo, este tipo de sistemas oferece a combinação da genética com a quimioterapia sendo multifuncional e, representando uma melhoria na terapêutica do cancro. [71]

## 5. Conclusão

---

As nanopartículas lipídicas são um sistema de administração de fármacos anticancerígenos muito promissor. Estas apresentam a vantagem de serem compostas por excipientes biocompatíveis e biodegradáveis (GRAS). Além disso, os métodos de produção normalmente utilizados (HPH) permitem uma fácil transposição para uma escala industrial. Por sua vez, os anticancerígenos apresentam problemas que podem ser contornados pela utilização de nanopartículas lipídicas, como por exemplo: solubilidade, segurança, estabilidade e resistência.

Assim, a melhoria de propriedades como: a capacidade de carga, o direcionamento, a biodisponibilidade, a estabilidade e a modulação da libertação dos fármacos são características que as tornam uma excelente escolha para o transporte de anticancerígenos.

Estudos recentes têm demonstrado a mais-valia das NL na co-encapsulação de citotóxicos com agentes quimiossensibilizadores. Estes últimos compostos (por exemplo: verapamil ou Elacridar) têm como finalidade melhorar a eficácia terapêutica, permitindo, por exemplo, a diminuição do efluxo celular dos fármacos pela P-gp. Também o *targeting* (direcionamento) tem sido uma propriedade estudada com as NL, tendo estas revelado resultados muito satisfatórios.

A associação das NL à terapia génica tem sido também recentemente investigada. Porém, ainda não existem muitos resultados a este nível, sendo necessários mais estudos.

Deste modo, atendendo ao aumento do número de doentes afetados por cancros e as limitações das terapêuticas convencionais, não será surpreendente que num futuro próximo as nanopartículas lipídicas sejam uma opção valiosa como sistemas de administração, oferecendo tratamentos eficazes, seguros, e específicos, melhorando assim o perfil farmacológico dos anticancerígenos atuais.

## 6. Bibliografia

---

1. Wissing, S.A., O. Kayser, and R.H. Muller, *Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery*. 2004, *Adv. Drug Deliv. Rev.* p. 1257-1272.
2. Wissing, S.A. and R.H. Muller, *Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: In vitro release and in vivo skin penetration*. 2002, *J. Control. Release.* p. 345-355.
3. Joshi, M.D. and R.H. Muller, *Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives*. 2009, *Eur J Pharm Biopharm.* p. 161–172.
4. Westesen, K., B. Siekmann, and M.H.J. Koch, *Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction*. 1993, *Int. J. Pharm.* p. 189–199.
5. Mukherjee, S., S. Ray, and R. Thakur, *Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system*. *Indian J Pharm Sci*, 2009. 71: p. 349-358.
6. Schwarz, C.e.a., *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization*. *J. Control. Release*, 1994. 30: p. 83 - 96.
7. Müller, R.H., M. Redtke, and S.A. Wissing, *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002. 54: p. S131–S155.
8. Muller, R.H., K. Mader, and S. Gohla, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art*. 2000, *Eur J Pharm Biopharm.* p. 161–177.
9. Yassin, A.E.B., et al., *Optimization of 5-fluorouracil solid-lipid nanoparticles: a preliminary study to treat colon cancer*. *International Journal of Medical Sciences*, 2010. 7(6): p. 398-408.
10. Wong, H.L., et al., *Solid Lipid Nanoparticles for Anti-Tumor Drug Delivery. Nanotechnology for Cancer Therapy*, 2006. Cap 36: p. 741 - 776.
11. Zhu, R., et al., *Phospho-Sulindac (OXT-328) Inhibits the Growth of Human Lung Cancer Xenografts in Mice: Enhanced Efficacy and Mitochondria Targeting by its Formulation in Solid Lipid Nanoparticles*. *Pharmaceutical Research*, 2012. 29(11): p. 3090-3101.
12. Wong, H.L., et al., *Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007. 59: p. 491 - 504.
13. Pardeike, J., A. Hommoss, and R.H. Müller, *Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products*. *Int J Pharm*, 2009. 366(1-2): p. 170-84.
14. Attama, A.A., M.A. Momoh, and P.F. Builders, *Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development*. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, 2012. 5: p. 107 - 140.
15. Müller, R.H., et al., *Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008. 68(3): p. 535-44.
16. Souto, E.B. and R.H. Müller, *Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC)*. *Int J Cosmet Sci*, 2008. 30(3): p. 157-65.
17. Aquilano, D., R. Cavalli, and M.R. Gasco, *Solid lipospheres obtained from hot microemulsions in the presence of different concentration of cosurfactant: The crystallization of stearic acid polymorphs*. *Thermochim. Acta*, 1993. 230: p. 29–37.
18. Olbrich, C., O. Kayser, and R.H. Müller, *Lipase degradation of Dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN)-effect of surfactants, storage time and crystallinity*. *Int. J. Pharm*, 2002. 237: p. 119–128.
19. Olbrich, C. and R.H. Müller, *Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures*. *Int. J. Pharm*, 1999. 180: p. 31–39.
20. Souto, E.B. and R.H. Muller, *Lipid Nanoparticles( Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers) for Cosmetic, Dermal, and Transdermal Applications*. *Deepak Thassu*, 2007. 14: p. 213 - 219.

21. Müller, R.H., K. Mäder, and S. Gohla, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art*. Eur J Pharm Biopharm, 2000. 50(1): p. 161-77.
22. Selvamuthukumar, S. and R. Velmurugan, *Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug carrier for cancer chemotherapy*. Lipids in Health and Disease, 2012. 11: p. 159 - 167.
23. Fang, C.L., S.A. Al-Suwayeh, and J.Y. Fang, *Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting*. Recent Pat Nanotechnol, 2013. 7(1): p. 41-55.
24. Radtke, M., E.B. Souto, and R.H. Müller, *Nanostructured Lipid Carriers: A Novel Generation of Solid Lipid Drug Carriers*. Pharmaceutical Technology Europe, 2005. 17: p. 45-50.
25. Das, R.J., K. Baishya, and K. Pathak, *Recent advancement of lipid drug conjugate as nanoparticulate drug delivery system*. International Research Journal of Pharmacy, 2013. 4: p. 73-78.
26. Wong, H.L., et al., *Development of solid lipid nanoparticles containing ionically complexed chemotherapeutic drugs and chemosensitizers*. J Pharm Sci, 2004. 93(8): p. 1993-2008.
27. Sarathchandiran, I., *A review on nanotechnology in solid lipid nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutical Development & Technology, 2012. 2: p. 45-61.
28. Souto, E.B., et al., *Nanopartículas de lípidios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial*. Quim. Nova, 2011. 10: p. 1762-1769.
29. Uner, M., *Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems*. Pharmazie, 2006. 5: p. 375-386.
30. Hall, S.S., S. Mitragotri, and P.S. Daugherty, *Identification of peptide ligands facilitating nanoparticle attachment to erythrocytes*. Biotechnol. Prog., 2007. 23: p. 749-754.
31. Freitas, C. and R.H. Müller, *Spray-drying of solid lipid nanoparticles*. Eur, J, Pharm. Biopharm, 1998. 46: p. 145-151.
32. Santos-Magalhães, N.S., et al., *Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules*. Int. J. Pharm., 2000. 208: p. 71-80.
33. Ewesuedo, R.B. and M.J. Ratain, *Principles of cancer chemotherapy*. Oncologic Therapeutics, 2003: p. 19-66.
34. Tipton, J.M., *Side effects of cancer chemotherapy*. Handbook of Cancer Chemotherapy, Lippincott Williams & Wilkins, 2003: p. 561-580.
35. Lu, P., *Monitoring cardiac function in patients receiving doxorubicin*. Semin. Nucl. Med., 2005. 35: p. 197-201.
36. Kalyanaraman, B., et al., *Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity*. Mol. Cell. Biochem., 2002. 234: p. 119-124.
37. Baird, R.D. and S.B. Kaye, *Drug resistance reversal—are we getting closer?* Eur. J. Cancer, 2003. 39: p. 2450-2461.
38. Chimmiri, P., et al., *Solid lipid nanoparticles: a novel carrier for cancer therapy*. International Journal of Biological & Pharmaceutical Research, 2012. 3: p. 405-413.
39. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(1): p. 48-58.
40. Wong, H.L., et al., *A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. 317(3): p. 1372-81.
41. Serpe, L., et al., *Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line*. Eur J Pharm Biopharm, 2004. 58(3): p. 673-80.
42. Guo, S. and L. Huang, *Nanoparticles containing insoluble drug for cancer therapy*. Biotechnology Advances, 2014. 32(4): p. 778-788.
43. Sepehri, N., et al., *SN38 polymeric nanoparticles: In vitro cytotoxicity and in vivo antitumor efficacy in xenograft balb/c model with breast cancer versus irinotecan*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. 471(1-2): p. 485-497.

44. Acevedo-Morantes, C.Y., et al., *Evaluation of the cytotoxic effect of camptothecin solid lipid nanoparticles on MCF7 cells*. *Drug Deliv*, 2013. 20(8): p. 338-48.
45. Liu, H., et al., *Lipid nanoparticles loaded with 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin-phospholipid complex: in vitro and in vivo studies*. *Drug Deliv*, 2014.
46. Takimoto, C. and S. Arbuck *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*. Camptothecins, Chabner BA & Longo DL (Editors), 1996.
47. Williams, J., et al., *Nanoparticle drug delivery system for intravenous delivery of topoisomerase inhibitors*. *J Control Release*, 2003. 91(1-2): p. 167-72.
48. Ma, P. and R.J. Mumper, *Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review*. *J Nanomed Nanotechnol*, 2013. 4(2): p. 1000164.
49. Cavalli, R., O. Caputo, and M.R. Gasco, *Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel*. *Eur J Pharm Sci*, 2000. 10(4): p. 305-9.
50. Lee, M.K., S.J. Lim, and C.K. Kim, *Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles*. *Biomaterials*, 2007. 28(12): p. 2137-46.
51. Harivardhan Reddy, L., et al., *Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice*. *J Control Release*, 2005. 105(3): p. 185-98.
52. Lim, S.J. and C.K. Kim, *Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid*. *Int J Pharm*, 2002. 243(1-2): p. 135-46.
53. Carneiro, G., et al., *Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and anticancer activity of all-trans retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles*. *International Journal of Nanomedicine*, 2012. 7: p. 6011-6020.
54. Foglietta, F., et al., *Modulation of butyrate anticancer activity by solid lipid nanoparticle delivery: an in vitro investigation on human breast cancer and leukemia cell lines*. *J Pharm Pharm Sci*, 2014. 17(2): p. 231-47.
55. Brioschi, A., et al., *Cholesterylbutyrate solid lipid nanoparticles as a butyric acid prodrug*. *Molecules*, 2008. 13(2): p. 230-54.
56. Minelli, R., et al., *Cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles inhibit the adhesion and migration of colon cancer cells*. *British Journal of Pharmacology*, 2012. 166(2): p. 587-601.
57. Olbrich, C., et al., *Lipid-drug-conjugate (LDC) nanoparticles as novel carrier system for the hydrophilic antitrypanosomal drug diminazenediaceturate*. *J Drug Target*, 2002. 10(5): p. 387-96.
58. Ma, P., et al., *Development of Idarubicin and Doxorubicin Solid Lipid Nanoparticles to Overcome Pgp-Mediated Multiple Drug Resistance in Leukemia*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2009. 5(2): p. 151-161.
59. Wong, H.L., et al., *A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells*. *Pharm Res*, 2006. 23(7): p. 1574-85.
60. Hadinoto, K., A. Sundaresan, and W.S. Cheow, *Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013. 85(3 Pt A): p. 427-43.
61. Senkiv, Y., et al., *Enhanced anticancer activity and circumvention of resistance mechanisms by novel polymeric/ phospholipidic nanocarriers of doxorubicin*. *J Biomed Nanotechnol*, 2014. 10(7): p. 1369-81.
62. Wang, J.X., X. Sun, and Z.R. Zhang, *Enhanced brain targeting by synthesis of 3',5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2002. 54(3): p. 285-90.
63. Chidambaram, M., R. Manavalan, and K. Kathiresan, *Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations*. *J Pharm Pharm Sci*, 2011. 14(1): p. 67-77.

64. Ugazio, E., R. Cavalli, and M.R. Gasco, *Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN)*. *Int J Pharm*, 2002. 241(2): p. 341-4.
65. Wong, H.L., et al., *Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (Elacridar) by new polymer-lipid hybrid nanoparticles (PLN) for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer*. *J Control Release*, 2006. 116(3): p. 275-84.
66. Finley, R.S., *Overview of targeted therapies for cancer*. *Am J Health Syst Pharm*, 2003. 60(24 Suppl 9): p. S4-10.
67. Stevens, P.J., M. Sekido, and R.J. Lee, *A folate receptor-targeted lipid nanoparticle formulation for a lipophilic paclitaxel prodrug*. *Pharm Res*, 2004. 21(12): p. 2153-7.
68. Zheng, J., et al., *Targeted Paclitaxel Delivery to Tumors Using Cleavable PEG-Conjugated Solid Lipid Nanoparticles*. *Pharm Res*, 2014.
69. Mohammadi Ghalei, P., J. Varshosaz, and H. Sadeghi Aliabadi, *Evaluating Cytotoxicity of Hyaluronate Targeted Solid Lipid Nanoparticles of Etoposide on SK-OV-3 Cells*. *J Drug Deliv*, 2014. 2014: p. 746325.
70. Tabatt, K., et al., *Transfection with different colloidal systems: comparison of solid lipid nanoparticles and liposomes*. *J Control Release*, 2004. 97(2): p. 321-32.
71. Han, Y., et al., *Co-delivery of plasmid DNA and doxorubicin by solid lipid nanoparticles for lung cancer therapy*. *Int J Mol Med*, 2014. 34(1): p. 191-6.

\*Ilustração da capa adaptada de:

-<http://aims.amrita.edu/school-of-pharmacy/research.php> (consultado a 10-7-2014)

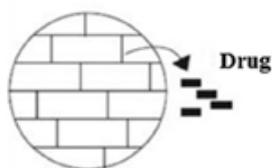
-<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11095-014-1320-8#page-1> (consultado a 10-7-2014)

-[http://alzher.blogspot.pt/2012\\_05\\_01\\_archive.html](http://alzher.blogspot.pt/2012_05_01_archive.html) (consultado a 10-7-2014)

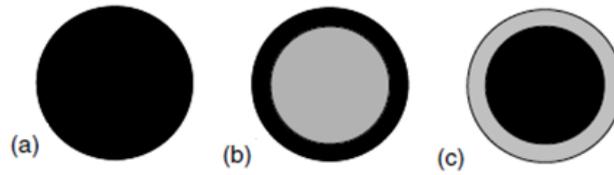
# **Anexos**

**Tabela A.1:** Exemplos de lípidos e tensoativos usados na preparação das NL; adaptado de [10]

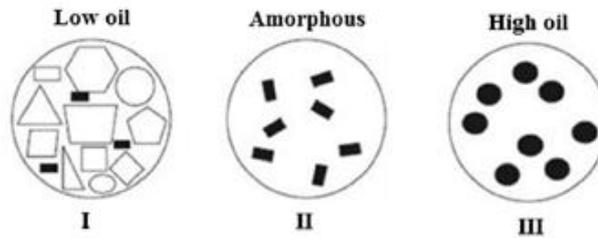
<b>Lípidos</b>	<b>Tensoativos</b>
<p><b>Triglicéridos</b></p> <p>Tricaprina Trilaurina Trimiristina Tripalmitina Triestearina</p> <p><b>Outros glicéridos</b></p> <p>Monoestearato de glicerol Behenato de glicerol Palmitostearato de glicerol</p> <p><b>Ácidos Gordos</b></p> <p>Ácido esteárico Ácido palmítico Ácido decanoico Ácido beénico</p> <p><b>Ceras</b></p> <p>Cetilpalmitato</p> <p><b>Catiônicos</b></p> <p>Estearilamina</p>	<p><b>Anfotéricos</b></p> <p>Lecitina de ovo Fosfatidilcolina de ovo Fosfatidilcolina de soja</p> <p><b>Iônicos</b></p> <p>Colato de sódio Dodecilsulfato de sódio Glicocolato de sódio</p> <p><b>Sais orgânicos</b></p> <p>Monodecilsulfato Monohexadecilsulfato</p> <p><b>Não iônicos</b></p> <p>Poloxâmero 188 Poloxâmero 407 Tween 20 Tween 80</p> <p><b>Co-tensoativos</b></p> <p>Butanol Ácido butírico</p> <p><b>Polímeros iônicos</b></p> <p>Epóxido de óleo de soja hidrolisado e polimerizado (HPESO)</p>



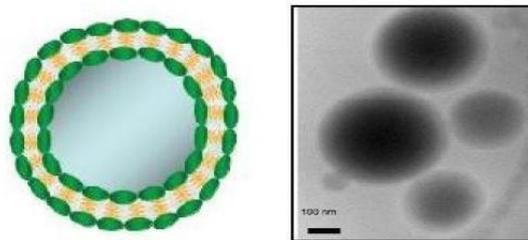
**Figura A.2:** Transição polimórfica que ocorre nas SLN [7]



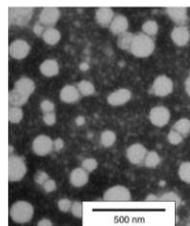
**Figura A.3:** Tipos de SLN, a) SLN tipo I (matriz homogénea), b) SLN tipo II (fármaco “em concha”, “Shell”), c) SLN tipo III (fármaco no núcleo da SLN) [10]



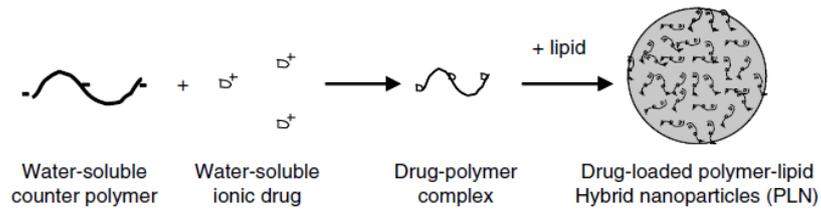
**Figura A.4** Tipos de NLC: I) modelo do cristal imperfeito; II) modelo amorfo; III) modelo múltiplo [22]



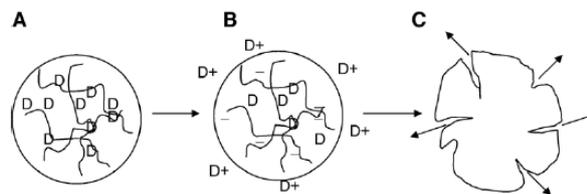
**Figura A.5** Estrutura e imagem de um conjugado fármaco-lípido [5]



**Figura A.6** Morfologia das PLN, obtida por microscopia eletrónica de transmissão. [10]

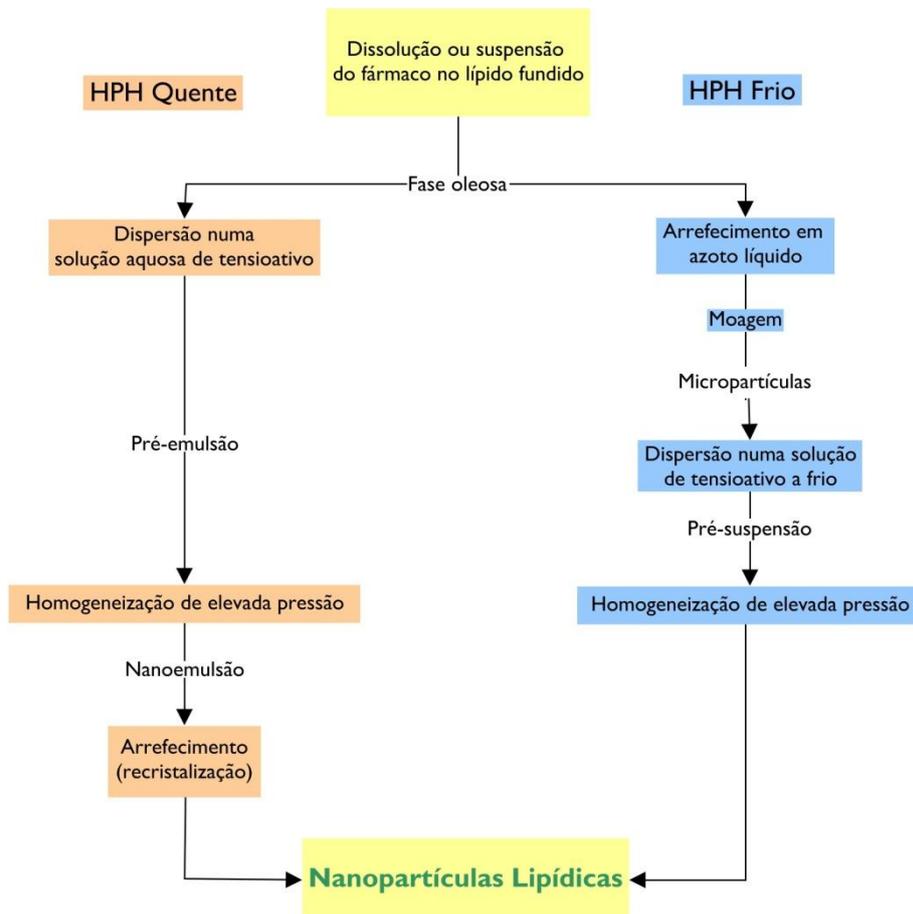


**Figura A.7** Mecanismo de formação e estrutura das PLN. D<sup>+</sup> representa uma molécula de fármaco catiónico e a linha curva representa uma molécula de polímero aniónico. O complexo formado resulta duma neutralização das cargas, sendo posteriormente envolvido numa matriz lipídica. [10]

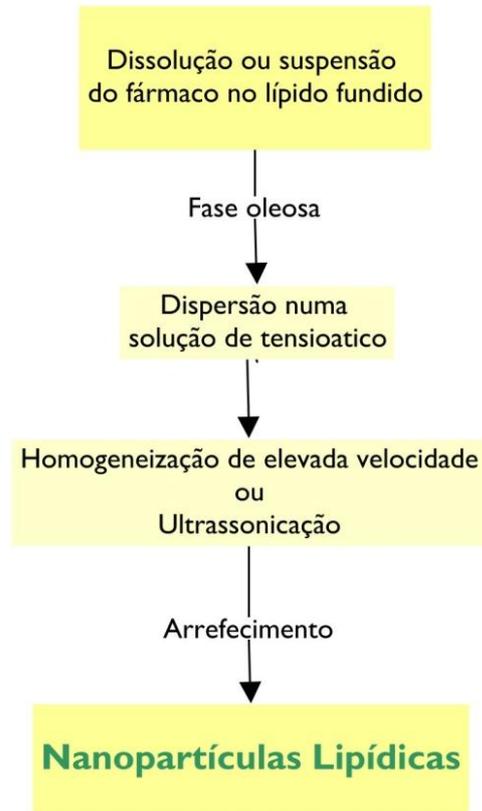


**Figura A.8** Processo de libertação do fármaco a partir de uma PLN. D<sup>+</sup> representa uma molécula de fármaco catiónico e a linha curva representa uma molécula de polímero aniónico. [12]

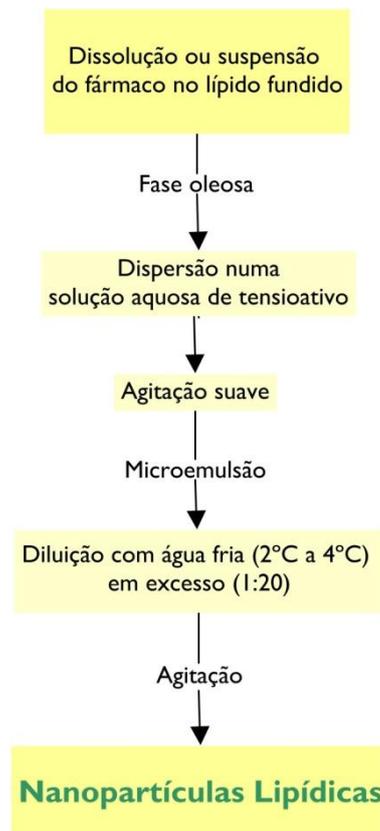
**Esquema A.1:** Homogeneização a elevada pressão (HPH)



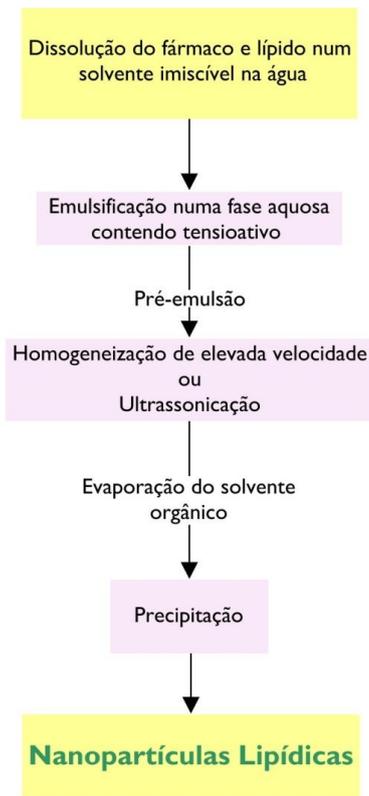
**Esquema A.2:** Homogeneização a elevada velocidade (HSH) e Ultrassonicação (US)



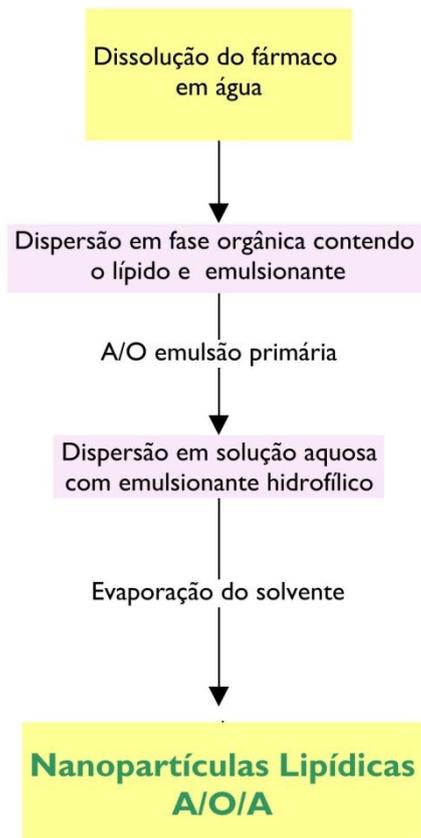
**Esquema A.3:** Microemulsificação



**Esquema A.4: Emulsificação – evaporação do solvente**

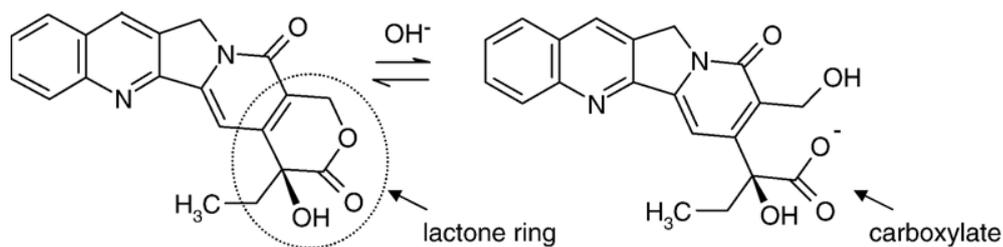


**Esquema A.5: Dupla emulsificação**

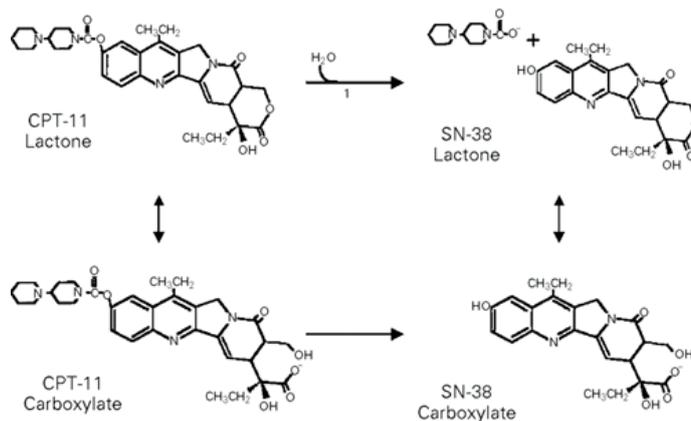


**Tabela A.2:** Tabela comparativa dos diferentes métodos de produção

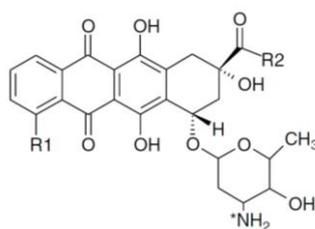
<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Homogeneização a elevada pressão (HPH)</b>	<p>-não utilização de solventes orgânicos</p> <p>-dispersões com elevado conteúdo de NL</p> <p>-transponível para escala industrial</p> <p><u>HPH quente:</u></p> <p>-partículas mais pequenas</p> <p><u>HPH frio:</u></p> <p>-menor exposição térmica (evita desvantagens da HPH quente)</p>	<p>-requer elevada energia</p> <p><u>HPH quente:</u></p> <p>-aumenta a degradação do fármaco e transportador</p> <p>-partição do fármaco para a fase aquosa</p> <p>-complexidade do passo de recristalização</p> <p><u>HPH frio:</u> partículas maiores</p>
<b>Homogeneização a elevada velocidade (HSH) e Ultrassonicação (US)</b>	<p>-equipamentos são comuns no laboratório</p>	<p>-heterogeneidade do tamanho de partículas</p> <p>-requer elevada energia</p> <p><u>US</u> – potencial contaminação metálica</p>
<b>Microemulsificação</b>	<p>-baixa energia mecânica utilizada</p>	<p>-baixa concentração de NL (diluição)</p> <p>-complexidade da formulação</p>
<b>Emulsificação – evaporação do solvente</b>	<p>-evita <i>stress</i> térmico</p>	<p>-uso de solventes orgânicos</p> <p>-solubilidade limitada do lípido no solvente orgânico</p>
<b>Dupla emulsificação</b>	<p>-incorporação de fármacos hidrofílicos</p> <p>-evita <i>stress</i> térmico</p>	<p>-uso de solventes orgânicos</p> <p>-elevada polidispersão</p>



**Figura A.9** Hidrólise da camptotecina. O anel lactônico (à esquerda) pode ser hidroliticamente aberto para formar o carboxilato (direita). Este processo é acelerado na presença de hidróxidos) [10]



**Figura A.10** Conversão metabólica do irinotecano em SN-38 [46]



**Figura A.11** Doxorrubicina ( $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$ ) ou idarrubicina ( $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$ ) \* o grupo amina é protonado quando se forma o cloridrato de sal solúvel em água de doxorrubicina ou idarrubicina.

[10]