

Ana Teresa Pires Joaquim Marques de Oliveira

Nanocristais: Aplicações em Tecnologia Farmacêutica

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, Ana Teresa Pires Joaquim Marques de Oliveira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009751, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

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

Coimbra, 18 de julho de 2014

(Ana Teresa Marques de Oliveira)

A Tutora,

Carla Vitorino

(Professora Doutora Carla Sofia Pinheiro Vitorino)

A Aluna,

Ana Teresa Marques de Oliveira

(Ana Teresa Marques de Oliveira)

Lista de acrónimos

API	<i>Active pharmaceutical ingredient</i>
Apo E	Apolipoproteína E
AR	Autoridades regulamentares
BCS	<i>Biopharmaceutical classification system</i>
HEP	Homogeneização a elevada pressão
IV	Intravenoso
NC	Nanocristais
NCS	<i>Nanotoxicological classification system</i>
NEQ	Novas entidades químicas
NS	Nanossuspensão
O/A	Óleo em água
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
UE	União Europeia

Índice

Lista de acrónimos.....	1
Resumo	3
Abstract	3
Introdução	4
Solubilidade e tamanho de partícula: influência na biodisponibilidade.....	5
Problemas de formulação de fármacos pouco solúveis: estratégias para aumentar a solubilidade	6
Os nanocristais e o seu potencial na indústria farmacêutica	6
Produção de nanocristais.....	8
Tecnologias Bottom-up.....	8
Tecnologias Top-down	9
Tecnologias combinadas	10
Transformação em formas sólidas.....	11
Produtos no Mercado.....	12
Mercado Nutracêutico.....	14
Administração oral de nanocristais	14
Outras vias de administração promissoras	16
Via intravenosa.....	16
Direccionamento para órgãos específicos – cérebro	17
Via pulmonar	19
Administração ocular	19
Aplicação dérmica	20
Nanotoxicologia.....	21
Conclusão.....	24
Referências Bibliográficas.....	25

Resumo

O aumento do número de moléculas pouco solúveis em água tem dificultado o desenvolvimento farmacêutico de novos fármacos. Apesar de existirem métodos para o aumento da solubilidade de fármacos, tais como técnicas de micronização, mistura de solventes e incorporação em ciclodextrinas, estes continuam a apresentar algumas lacunas e não permitem atingir a solubilidade desejada, sendo necessárias outras estratégias para a resolução deste problema. Surge então a abordagem à “nanonização” e, mais especificamente, à tecnologia de produção de nanocristais.

Os nanocristais são nanopartículas constituídas maioritariamente por princípio ativo puro que, devido às suas propriedades, permitem aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade. As técnicas de produção destes assentam em processos *bottom-up* e *top-down* e tecnologias combinadas, as quais serão descritas nesta monografia.

As formulações baseadas em nanocristais constituem uma estratégia promissora e versátil, não só para administração oral, como também por outras vias, tais como a intravenosa, pulmonar, ocular e dérmica.

Palavras-chave: nanocristais, tecnologias *bottom-up*, tecnologias *top-down*, administração oral, aplicações na via intravenosa.

Abstract

The increasing number of poorly water-soluble drugs has been an obstacle to the development of new medicines. Although some strategies for the enhancement of drug solubility have been developed, such as micronization, solvent mixtures and cyclodextrins, other approaches are still required in order to attain the desired bioavailability. This prompted to the need for further particle size reduction up to nanoscale, using formulations based on nanocrystals.

Drug nanocrystals are nanoparticles being composed mostly by drug that, due to their properties, allow to enhancing the solubility of poorly soluble drugs, thus increasing their bioavailability. The production techniques can be classified as *bottom-up*, *top-down* and combinational technologies, which will be described in the present work.

The formulations based on nanocrystals are a promising and versatile strategy, not only for oral drug delivery, but also for intravenous, pulmonar, ocular and dermal application.

Keywords: drug nanocrystals, *bottom-up* process, *top-down* process, oral administration, intravenous applications.

Introdução

O aparecimento de novas patologias e a descoberta dos mecanismos fisiopatológicos de doenças já conhecidas, aliados ao desenvolvimento de novas tecnologias, permite que a investigação e desenvolvimento de novos fármacos seja um ponto fulcral no setor farmacêutico.

Porém, na fase de investigação e descoberta, sabemos que dos cerca de 5000-10000 compostos inicialmente em investigação, apenas uma percentagem inferior a 1% (cerca de 250 compostos) chega à etapa do desenvolvimento pré-clínico. Os motivos pelos quais os compostos não chegam à fase clínica estão relacionados com problemas de pré-formulação, formulação, produção e estabilidade. Dos poucos compostos que chegam à fase de desenvolvimento clínico, geralmente, apenas um alcança a penetração no mercado. [1, 2] Estima-se que mais de 40% destes compostos em desenvolvimento, designados por novas entidades químicas (NEQ) são classificadas como pouco solúveis. [3] Está ainda reportado que cerca de 60% das moléculas vindas diretamente da síntese são pouco solúveis. [1, 2, 4]

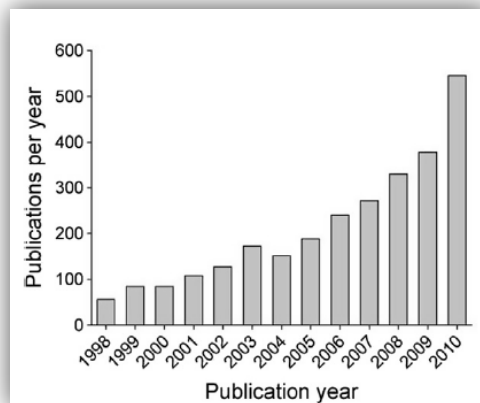


Figura 1: Aumento do número de publicações por ano relacionadas com moléculas pouco solúveis.[3]

O facto da grande maioria das NEQ apresentar problemas de solubilidade (Figura 1) levou a que a indústria farmacêutica tivesse necessidade de desenvolver técnicas que superassem este problema.

Solubilidade e tamanho de partícula: influência na biodisponibilidade

Todos os fármacos, independentemente da via de administração, deverão possuir uma solubilidade aquosa mínima para que haja eficácia terapêutica. [2] Os fármacos pouco solúveis apresentam baixa biodisponibilidade e, conseqüentemente, ineficácia terapêutica. [4] Tal justifica-se pelo seu perfil de dissolução nos fluidos biológicos, uma vez que para que haja atividade farmacológica, as moléculas em geral têm que apresentar uma determinada solubilidade nos fluidos intestinais para que possam atingir o local de ação. [5]

A permeabilidade também afeta a biodisponibilidade [5]. Assim, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutico (BCS), as substâncias são classificadas consoante a sua solubilidade aquosa e permeabilidade da membrana, [5] dividindo-se em 4 classes (Tabela I). [6]

Tabela I: Sistema de Classificação Biofarmacêutico

Classe	Permeabilidade	Solubilidade
Classe I	+	+
Classe II	+	-
Classe III	-	+
Classe IV	-	-

Para as substâncias de classe II o passo limitante é a libertação do fármaco da forma farmacêutica e dissolução nos fluidos gastrointestinais. Assim, um aumento da solubilidade conduzirá a uma melhoria da biodisponibilidade para fármacos desta classe. [7]

Para fármacos de classe IV, a biodisponibilidade é adicionalmente limitada pela absorção/permeabilidade, a qual é mediada por um mecanismo de transporte (glicoproteína-p, por exemplo). Neste caso, a absorção poderá ser melhorada, potenciando o sistema de transporte com o aumento de fármaco dissolvido. [8]

Em relação ao tamanho de partícula, reduzindo este, a área de superfície da partícula aumenta, aumentando a velocidade de dissolução e, conseqüentemente, a biodisponibilidade. [9]

Problemas de formulação de fármacos pouco solúveis: estratégias para aumentar a solubilidade

Algumas das estratégias para aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis consistem no recurso a mistura de solventes, ciclodextrinas ou emulsões óleo em água (O/A) para uso intravenoso (IV). Contudo, estas abordagens apresentam algumas desvantagens como, por exemplo, no caso da mistura de solventes, o fármaco tem que apresentar solubilidade em meio aquoso, enquanto que no caso das ciclodextrinas o fármaco terá que possuir um peso molecular adequado para ser incorporado no anel da ciclodextrina. [10] Além disso, podem também estar associadas a efeitos adversos como, por exemplo, o desenvolvimento de reacções anafiláticas devido à administração de formulações contendo Cremophor[®]EL (co-solvente) ou nefrotoxicidade quando se usa ciclodextrinas IV. [8]

A micronização poderá ser também uma estratégia para aumentar a solubilidade. Contudo, para fármacos pouco solúveis, o aumento de área de superfície promovido poderá ser ainda insuficiente para melhorar a velocidade de dissolução [8] e, conseqüentemente, a biodisponibilidade. Assim, houve necessidade de reduzir ainda mais o tamanho de partícula, de forma a alcançar uma maior solubilidade. Surge, então, a abordagem à “nanonização”.

Os nanocristais e o seu potencial na indústria farmacêutica

Os nanocristais (NC) diferem de sistemas como as nanopartículas poliméricas, por serem constituídos maioritariamente por API (*active pharmaceutical ingredient*) puro [11], sendo o seu tamanho inferior a 1 μm . [10] O facto de, contrariamente a outros sistemas de nanopartículas, os NC serem constituídos apenas por API, faz com que estes sejam bastante eficientes no transporte do fármaco às células ou para dentro destas, atingindo uma concentração suficientemente elevada para que seja possível um efeito farmacológico. [12]

Os NC caracterizam-se por apresentarem as seguintes propriedades (Figura 2):

- **Aumento da concentração de saturação:** esta é uma constante que depende do composto, meio de dissolução e temperatura, sendo também função do tamanho de partícula para tamanhos inferiores a 1-2 μm . Esta aumenta com a diminuição do tamanho de partícula abaixo dos 1000 nm, tendo os NC uma maior concentração de saturação.

De acordo com a equação de Noyes-Whitney, $(\frac{dc}{dt} = \frac{DA}{h}(C_s - C_b))$, em que dc/dt corresponde à velocidade de dissolução, D ao coeficiente de difusão, A à área de superfície do sólido, h à espessura da camada de difusão e, por último, C_s e C_b correspondem, respectivamente, à concentração de saturação e à concentração do princípio ativo no meio de dissolução, a velocidade de dissolução é reforçada porque dc/dm é proporcional ao gradiente de concentração $(c_s - c_b)/h$. Assim, devido ao aumento da concentração de saturação, o gradiente de concentração entre o lumén intestinal e o sangue é aumentado, levando, conseqüentemente, a um aumento da absorção; [4]

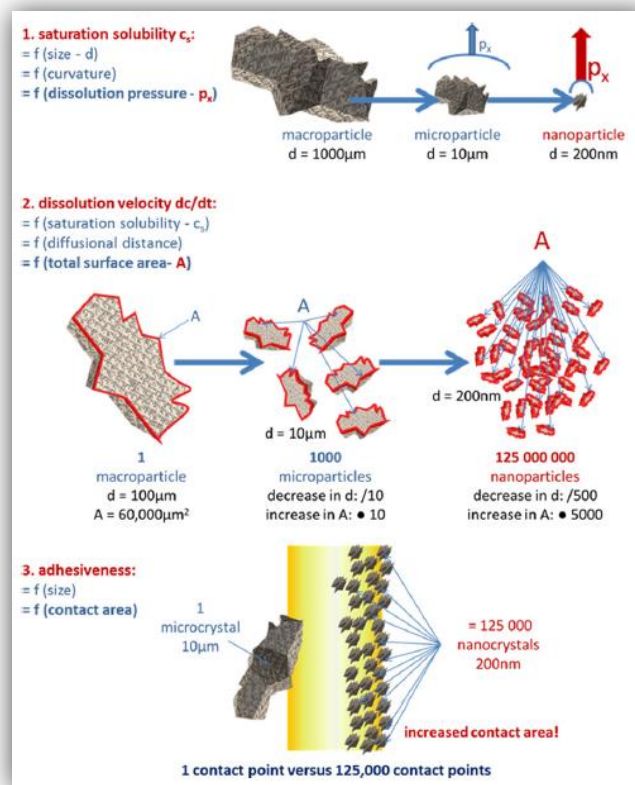


Figura 2: Propriedades dos NC. [12]

- **Aumento da velocidade de dissolução por aumento da área de superfície:** A diminuição do tamanho de partícula leva a um aumento da área de superfície e, de acordo com a equação de Noyes-Whitney, quanto maior a área de superfície, A , maior a velocidade de dissolução, $\frac{dc}{dt}$; [4]
- **Aderência:** devido à sua grande área de superfície, os NC tendem a aderir a superfícies. Esta aderência a nível do lumén intestinal, após administração oral, favorecerá o aumento da biodisponibilidade. [10]

Os NC são a tecnologia para administração de fármacos mais discutida nos últimos 20 anos. [11] Em 2000, foi introduzido no mercado pela Wyeth o primeiro medicamento, denominado Rapamune® (sirolimus), sob a forma farmacêutica de comprimidos. [8] A grande maioria das empresas aposta em formulações orais devido a esta ser a via mais conveniente, dada a sua facilidade de administração, adesão à terapêutica por parte do doente, apresentar uma relação custo-eficácia óptima e flexibilidade no *design* das formulações. [7]

Produção de nanocristais

O principal objectivo do ponto de vista tecnológico é tornar uma formulação tão simples quanto possível e com uma relação custo-benefício ótima. [13]

As estratégias de produção de NC podem ser divididas em tecnologias *bottom-up*, *top-down* e tecnologias combinadas, as quais serão seguidamente descritas.

Tecnologias Bottom-up

São comumente conhecidas como técnicas de precipitação, cujo princípio se baseia na precipitação de um fármaco contido numa solução supersaturada do mesmo. Esta precipitação pode ser induzida por processos que aumentem a supersaturação do sistema, como evaporação do solvente, redução de temperatura ou pela mistura de um não-solvente. [14]

A tecnologia NanoMorph®, pertencente à empresa Soliqs/Abbott, baseia-se em técnicas de precipitação [10], sendo útil para preparar nanossuspensões (NS) sob a forma amorfa, estáveis durante o prazo de validade do medicamento. O processo baseia-se na preparação de uma suspensão de fármaco num solvente orgânico, o qual é aquecido para formar uma solução, que é rapidamente misturada com uma solução aquosa arrefecida que contém um estabilizador para induzir uma rápida nucleação, de modo a que se formem partículas esféricas amorfas à escala nanométrica. [14] A forma amorfa, aliada ao tamanho destas partículas é descrita como sendo a forma ideal para promover um aumento na concentração de saturação. Contudo, existe o risco da conversão da forma amorfa em cristalina, levando a uma diminuição da biodisponibilidade. [8]

As técnicas *bottom-up* apresentam algumas vantagens, tais como a produção de NC através de processos de baixa energia, serem técnicas simples e com custos relativamente baixos e poderem ser realizadas a baixas temperaturas, o que é uma mais-valia para fármacos

termolábeis. [14] Além disso, a transposição de escala é relativamente fácil, recorrendo a misturadores fixos ou micromisturadores. [10] Desvantagens como o facto do fármaco ter que ser solúvel em pelo menos um solvente, a presença de solventes residuais e o crescimento de cristais após precipitação (no caso da mistura de solventes) [8, 10] fazem com que esta estratégia de produção de NC não seja a mais utilizada na indústria farmacêutica, apesar do seu potencial no que diz respeito à obtenção de partículas de tamanhos inferiores (<100 nm) e partículas no estado amorfo. [15]

Atualmente, existe a tentativa de aliar estas tecnologias a tecnologias *top-down*, como será descrito posteriormente nesta monografia.

Tecnologias Top-down

A maioria dos métodos de produção com abordagem *top-down* assenta em processos que requerem elevada energia, para que as partículas de fármaco sejam reduzidas a partículas mais pequenas [14]. São utilizados métodos como a homogenização a elevada pressão (HEP) e a moagem [9], sendo a tecnologia mais comum para a produção de NC. [10]

- **Moagem:** nesta técnica são utilizados moínhos de bolas, tirando partido do atrito mecânico produzido por esferas de vidro, óxido de zircónio ou polímeros especiais, tais como derivados do poliestireno. [15] A macrossuspensão é colocada no moínho e, com o movimento de um agitador, o fármaco, ao passar entre as esferas, sofre redução do seu tamanho. [10] Uma vez que é realizado em meio líquido, deste método resulta uma NS. [15]

Um problema comum nesta técnica é a potencial erosão das esferas, o que poderá conduzir à contaminação do produto. [10] Um exemplo de uma tecnologia baseada neste método é a tecnologia NanoCrystal™. [4]

- **Homogenização a elevada pressão:** para a produção dos NC, por métodos de HEP, existem três tecnologias relevantes:

- ✓ **Microfluidização (tecnologia IDD-P™)**, que se baseia no princípio de uma corrente de jacto, segundo o qual pela colisão de duas correntes de fluido da suspensão numa câmara sob elevada pressão são obtidas partículas de reduzido tamanho. Nesta tecnologia, são necessários inúmeros ciclos para que se consiga o tamanho de partícula desejado [8];

- ✓ **DissoCubes®** e **Nanopure®**, ambas baseadas numa tecnologia de homogeneização por pistão-orifício (*piston-gap*), em que a suspensão é forçada, por

intermédio de um pistão, a passar por um orifício bastante estreito (aproximadamente 25 μm) de um homogeneizador a elevada pressão (Figura 3). [16]

Enquanto na tecnologia DissoCubes[®], a produção de NC é feita à temperatura ambiente e em meio aquoso, a tecnologia Nanopure[®] opera a temperaturas mais baixas e em meio não aquoso ou mistura com água. [4, 8] A utilização de água poderá dar origem a fenómenos de hidrólise e problemas durante os passos de secagem, sendo uma desvantagem da tecnologia DissoCubes[®]. Já a tecnologia Nanopure[®], permite que todo o processo de produção seja realizado em meios não aquosos, protegendo assim os fármacos da hidrólise. As baixas temperaturas durante a homogeneização permitem que possam ser usados fármacos termolábeis. [4]

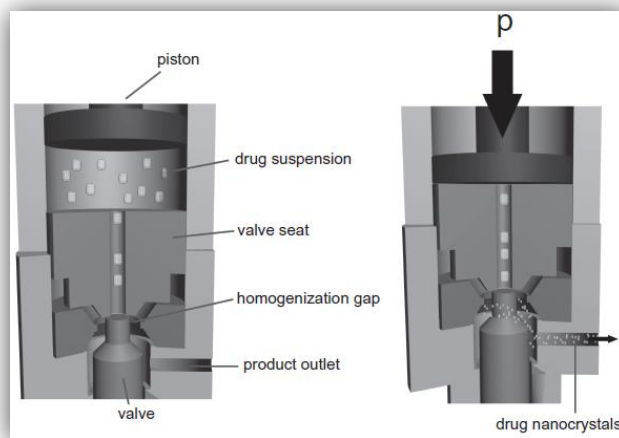


Figura 3: Homogeneização a elevada pressão usando um homogeneizador pistão-orifício. [4]

Contrariamente às técnicas *bottom-up*, a maioria dos fármacos pouco solúveis em água pode ser processada, mesmo sendo simultaneamente pouco solúvel em meio não aquoso. [17]

Apesar desta tecnologia ser a mais utilizada industrialmente, também apresenta as suas limitações, em termos de eficiência na redução do tamanho de partícula, requerendo um elevado número de ciclos de homogeneização (são necessários longos tempos de processamento para a obtenção de NC com tamanho inferior a 100 μm). [14]

Tecnologias combinadas

Estes métodos combinam uma etapa de pré-tratamento, com um passo subsequente de elevada energia como, por exemplo, a HEP. As partículas obtidas por precipitação apresentam, muito frequentemente, tendência para o crescimento de cristais à escala

micrométrica. Este fenómeno pode gerar problemas na estabilidade do produto a longo prazo, bem como comprometer a sua biodisponibilidade. Assim, a subsequente homogeneização da suspensão permite a preservação do tamanho de partícula obtido após a precipitação. [7] [8]

Um exemplo deste método é a tecnologia NANOEDGE™, pertencente à empresa Baxter, segundo a qual, após um passo de precipitação, é efectuado um tratamento específico que previne o crescimento de NC precipitados, permitindo a conversão da matéria que é termodinamicamente instável numa forma mais estável, por aplicação de elevada energia, como por exemplo, a HEP. O uso de solventes orgânicos no passo de precipitação constitui uma desvantagem. [8]

A tecnologia SmartCrystal® é considerada uma 2ª geração de NC. Assenta na combinação de vários processos adicionais (por exemplo, atomização ou liofilização), tendo em conta as propriedades físicas do fármaco em questão (por exemplo, dureza), permitindo a produção de NC com um tamanho inferior a 100 nm, para aplicações específicas. [8, 12]

Transformação em formas sólidas

Os métodos de produção atrás referidos, têm como resultado final uma suspensão de NC num meio líquido estabilizado por um surfactante ou um polímero. Esta NS necessita de ser transformada numa forma sólida, caso se pretenda como produto final, comprimidos ou *pellets* para administração oral. Caso o objetivo seja a preparação de uma formulação para administração IV, esta manter-se-á sob a forma de uma NS ou de um pó liofilizado, para reconstituição antes da administração, não esquecendo a esterilização da formulação. [10]

Após obtenção da NS, é necessário prevenir a aglomeração dos NC, de modo a manter a sua estabilidade, a qual é conseguida pela adição de agentes estabilizantes. Contudo, sabe-se que algumas NS poderão continuar a ter uma estabilidade bastante reduzida, sendo a sua transformação em formas sólidas uma vantagem. Para obtenção de um produto sólido, recorre-se a métodos como liofilização, atomização, peletização (extrusão-esferonização) ou granulação, que transformarão as NS em pós que, posteriormente, poderão ter fins variados, tais como enchimento de cápsulas, transformação em comprimidos por compressão ou pós para reconstituição. [15]

A adição de um agente estabilizante, é, geralmente, essencial para obter uma formulação de NC estável. Este agente poderá ser um polímero iónico ou não iónico que

impede a aglomeração dos cristais por repulsão eletrostática e/ou estabilização estérica. [18] Quando a formulação sob a forma de NS é mantida, este mecanismo funciona contra a agregação das partículas. Porém, no processo de transformação em formas sólidas quando é retirada a água deste sistema, os grupos ionizados são destruídos, ocorrendo a aglomeração das partículas. Assim, há a necessidade de adicionar à formulação um dispersante, para que, durante os passos de secagem, este funcione como uma matriz que preenche o espaço da água, evitando a fusão dos cristais.

Os métodos para solidificação das NS mais utilizados são a liofilização e a atomização e, em ambos, é necessário a adição de uma grande quantidade de dispersantes, tais como polímeros e açúcares. [16]

Produtos no Mercado

Como referido anteriormente, o número crescente de moléculas pouco solúveis em água na investigação e desenvolvimento de fármacos, conduziu ao desenvolvimento de novas estratégias para tornar tais fármacos aptos para penetração no mercado.

A investigação na área dos NC no mercado farmacêutico não é um assunto recente, mas algo que já vem a ser estudado desde 1990. Hoje em dia, existem cerca de vinte medicamentos sob ensaios clínicos, o que demonstra a vasta investigação nesta tão promissora tecnologia à escala nanométrica. Em termos de medicamentos que estão efectivamente no mercado, contabilizam-se seis, os quais serão detalhados de seguida. [11, 13] É importante referir que esta tecnologia não só permite o desenvolvimento de formulações a partir de novas moléculas, como também a reformulação de fármacos que estão no mercado, cuja patente está próxima de expirar. Esta reformulação tem como objectivo demonstrar vantagens farmacêuticas em relação às formulações anteriores. [13]

Em 2000, chegou ao mercado o medicamento Rapamune[®] (sirolimus), um imunossupressor disponível sob a forma de solução e comprimidos. A formulação em comprimidos é, sem dúvida, uma vantagem para o doente. Contudo, outras vantagens contribuem para o sucesso desta formulação. Se for comparada a biodisponibilidade oral entre a solução oral e os comprimidos de NC, verifica-se que esta é superior em 21% nos comprimidos. A explicação assenta no facto dos NC de fármaco serem libertados dos comprimidos sob a forma de uma NS ultrafina, o que leva a uma maior solubilidade e área de superfície, aumentando a velocidade de dissolução e, consequentemente, a biodisponibilidade. [4]

Contudo, a formulação em comprimidos poderá acarretar algumas desvantagens, como a agregação de cristais durante o processo de compressão. Se acontecer a agregação dos NC, a biodisponibilidade oral de fármacos de BCS II irá diminuir, pois existirá um decréscimo na velocidade de dissolução. Assim, existe um limite de carga de NC na formulação, para que fenómenos de agregação e crescimento de cristais não aconteçam. [4] No caso de fármacos com uma dose oral baixa, como é o caso do Rapamune® (1 mg e 2 mg para uma massa final de 365 mg e 370 mg, respetivamente), este fenómeno não é problemático. [10]

Em 2001, surgiu o medicamento Emend®, como resposta ao facto do seu princípio ativo, aprepitant, ter que ser apenas absorvido no trato gastrointestinal superior. Este fármaco antiemético é formulado sob a forma *pellets* dentro de cápsulas de gelatina duras, podendo estes ser administrados através de uma sonda diretamente no estômago. As vantagens do uso de *pellets* como formulação assentam no processo de produção por extrusão, um método menos energético do que a compressão de comprimidos, minimizando assim os riscos de agregação de cristais. A produção de NC faz com que se ultrapasse o problema da janela de absorção estreita deste medicamento. [4] [8]

Os medicamentos Tricor® e Triglide® (fenofibrato) surgiram em 2004 e 2005, respetivamente. Estes são usados para o tratamento de doentes com hipercolesterolemia primária e dislipidemia. O Tricor® foi o primeiro produto *blockbuster* (vendas superiores a 1 bilião de dólares) na área dos NC, tendo possibilitado a toma de fenofibrato independente das refeições, devido às suas propriedades adesivas. [8, 13]

Em 2009, foi lançado no mercado o primeiro medicamento para administração parentérica, sob o nome comercial Invega®, cuja substância ativa é o palmitato de paliperidona, usado em doentes com esquizofrenia. Trata-se de uma NS produzida pela tecnologia NanoCrystal®, sendo vantajosa na medida em que apresenta baixa viscosidade e um elevado conteúdo de fármaco, requerendo um volume de injeção inferior e proporcionando baixos níveis de dor. [11]

Mercado Nutracêutico

A nanotecnologia não se aplica apenas ao mercado farmacêutico, estando presente no nosso dia a dia em várias vertentes como, por exemplo, na engenharia e alimentação. Uma vez que a população em geral tem vindo a preocupar-se cada vez mais com a sua saúde, a nutrição ocupa um lugar fundamental para o bem estar do ser humano.

No âmbito do mercado nutracêutico, também existem certos compostos pouco solúveis em água, como por exemplo os antioxidantes, fazendo com que a biodisponibilidade destes compostos seja comprometida. NC de compostos como rutina, hesperidina, apigenina e coenzima Q10 mostraram uma *performance superior in vitro* quando comparados às formulações dos mesmos existentes no mercado, sendo um segmento onde os NC também poderão vingar. [8]

Administração oral de nanocristais

Sabe-se que, a via de administração de medicamentos de eleição, tanto para os doentes como para a indústria farmacêutica, é a via oral. Ao doente, facilita a toma da sua medicação, promovendo a adesão à terapêutica, enquanto que, para a indústria as vantagens assentam no facto de serem formulações menos complexas e com menores custos de produção.

Após administração oral de um fármaco, este é absorvido pelo intestino e entra na corrente sanguínea, para que depois possa ser distribuído pelos vários tecidos do corpo. Primeiramente, tem que existir uma fase de dissolução do fármaco, de modo a que este seja transportado através do epitélio gastrointestinal, sendo a dissolução considerada como o passo limitante na absorção de fármacos administrados por via oral. [16]

O número crescente de fármacos pouco solúveis em água condiciona a *performance* dos mesmos quando administrados oralmente, em vários aspetos como descritos na Tabela 2. Por exemplo, sabe-se que, quando um fármaco pouco solúvel em água é administrado com alimentos, a absorção do mesmo é maior ou dá-se mais rapidamente. Este facto pode ser explicado por vários fatores, sendo alguns exemplos, o aumento do tempo de esvaziamento gástrico, o aumento da secreção biliar e do volume gástrico. Assim, tais fármacos serão absorvidos de forma diferente consoante o conteúdo estomacal, como é o caso do fenofibrato, em que a sua absorção é 35% mais elevada quando este é administrado com alimentos *versus* em jejum. De salientar que para fármacos com margens terapêuticas

estreitas, esta variação na absorção consoante a administração é feita com alimentos ou em jejum, pode trazer alguns riscos. [4, 16]

Tabela 2: Diferenças na *performance* de fármacos pouco solúveis em água. [16]

Formulation-Related Performance Issues in Oral Application of Poorly Soluble Drugs
• A low/variable bioavailability
• A high fed/ fasted variation
• A retarded onset of action
• Lack of dose proportionality
• A higher interpatient variation
• Local irritation for irritative drugs (e.g. NSAIDs)

Outro aspeto condicionante da actividade terapêutica é a biodisponibilidade. Os fármacos pouco solúveis são eliminados do trato gastrointestinal antes de se dissolverem totalmente, levando a uma baixa absorção e, conseqüentemente, menor biodisponibilidade.

Todas estas problemáticas poderão ser ultrapassadas com formulações baseadas em NC. Em primeiro lugar, devido ao seu reduzido tamanho, os NC dissolvem-se rapidamente nos fluidos gastrointestinais. Após dissolução dos NC, gera-se um gradiente de concentração de fármaco elevadíssimo entre o trato gastrointestinal e os vasos sanguíneos, aumentando a absorção do fármaco, e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade (Figura 4). Também torna a administração segura de fármacos pouco solúveis em água, pois a distribuição destes nos fluidos gastrointestinais é uniforme, evitando um aumento de concentração brusco no local de ação que pode estar associado a efeitos secundários. [19]

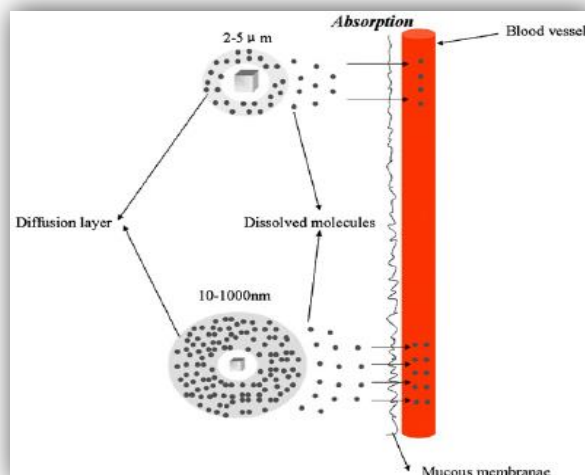


Figura 4: Diferença de gradientes de concentração de partículas micrométricas e NC entre o trato gastrointestinal e os vasos sanguíneos. [19]

Em relação à variabilidade de absorção consoante o conteúdo estomacal, está provado que formulações baseadas em NC diminuem esta variabilidade, como é o caso do fenofibrato formulado em NC, comercializado sob o nome de Tricor[®], em que os níveis plasmáticos de fármaco entre um estado de jejum e pós-prandial são bioequivalentes, não havendo necessidade da administração ser realizada após as refeições. [4] Outro problema está relacionado com a variação da biodisponibilidade oral de indivíduo para indivíduo, a qual também poderá ser evitada administrando formulações de NC, uma vez que estes, devido às suas propriedades adesivas, aderem às paredes do intestino muito eficazmente, reduzindo a variabilidade de resposta inter-individual. [12]

O aumento da concentração plasmática máxima, C_{max} , a diminuição do tempo para atingir a concentração plasmática máxima, T_{max} , assim como o aumento da área sob a curva, AUC , são as alterações farmacocinéticas observadas quando se administram NC via oral. [19]

Concluindo, as formulações de NC para administração oral não só proporcionam benefícios a nível da biodisponibilidade de fármacos, como também na redução da variabilidade inter-individual, redução da variabilidade na absorção de fármacos entre um estado de jejum/ingestão de alimentos e, por último, proporcionalidade da dose melhorada. [8]

Outras vias de administração promissoras

Via intravenosa

A formulação de fármacos para administração IV acarreta alguns desafios para a indústria farmacêutica. Os fármacos têm que ser solúveis no volume de solvente destinado à administração, o que leva a que a indústria opte por técnicas de solubilização, como foi referido anteriormente. Estas técnicas, para além de não serem suficientemente eficazes para solubilizar o fármaco em determinados casos, também acarretam, geralmente, efeitos secundários indesejáveis, como por exemplo, reações anafiláticas. [8]

Os NC surgem assim como uma abordagem promissora para estas formulações complexas, substituindo os medicamentos com problemas a nível toxicológico por NS bem toleradas. As NS aquosas podem trazer vantagens como o aumento da solubilidade do fármaco, a diminuição dos efeitos secundários e também o direccionamento do fármaco para o local pretendido. Outro aspeto importante é o tamanho das partículas contidas na

formulação para administração IV, pois o seu tamanho reduzido evita o congestionamento e embolismo dos capilares sanguíneos que têm um tamanho de cerca de 5 μm . [12, 19]

Após a administração intravenosa de uma NS, o sistema mononuclear fagocitário (SMF) assume que os NC são corpos estranhos e tenta removê-los da corrente sanguínea recorrendo à fagocitose dos mesmos. Este processo é bastante rápido e eficiente e, uma vez que os NC precisam de cerca de 5 a 10 minutos para que ocorra a dissolução dos mesmos, aqueles que não se dissolveram são captados pelo fígado e em parte pelo baço. Como consequência, esta acumulação pode levar a efeitos citotóxicos (especialmente quando se trata de fármacos destinados a tratamentos em quimioterapia). Apesar de apresentar esta desvantagem, em alguns tipos de tratamentos, a acumulação no fígado poderá funcionar como algo benéfico. Caso o objetivo seja um efeito terapêutico ao longo do tempo, esta acumulação será proveitosa, visto que o fármaco é libertado como um *depot*. [12]

Para que a captação dos NC pelos macrófagos seja efetuada, existem proteínas no plasma que funcionam como promotores da ligação, as opsoninas. A tecnologia farmacêutica evoluiu no sentido de “ocultar” a presença de NC a estas proteínas, recorrendo a modificações na superfície dos NC, o que faz com que estes sejam “invisíveis” para o sistema SMF, permitindo que o fármaco possa ser direccionado para outras zonas específicas do organismo. [12]

Direccionamento para órgãos específicos – cérebro

Como referido anteriormente, para direccionar os NC para outras células do organismo que não as células do SMF, é necessário tornar estes NC “invisíveis” aos macrófagos. Esta “invisibilidade” é possível modificando as propriedades da superfície dos NC, através de diferentes surfactantes e misturas destes até se atingir as propriedades de superfície desejadas para evitar a adsorção pelas opsoninas. Após estas modificações, os NC conseguem “escapar” ao SMF, seguindo-se o objetivo de direccioná-los para células específicas. Este direccionamento é conseguido a partir de modificações ao nível das proteínas plasmáticas adsorvidas à superfície dos NC, que funcionarão como elos de ligação à célula alvo, seguindo-se a sua internalização.

Tendo por base as características da superfície das partículas como a hidrofobicidade, carga e grupos funcionais, é possível prever quais as proteínas do sangue que sofrem adsorção às partículas após administração IV, designando-se este conceito por adsorção

proteica diferencial (Figura 5), a qual possibilita a modificação da superfície dos NC de modo a que estes sejam conduzidos até ao local desejado.

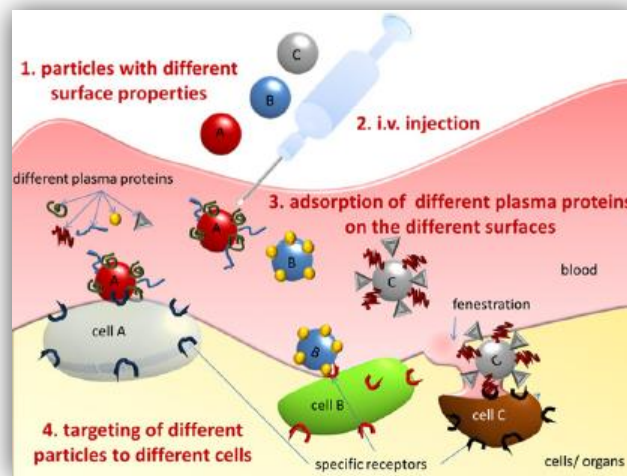


Figura 5: Adsorção proteica diferencial. [12]

Um bom exemplo de como esta modificação pode ser conseguida está relacionado com o transporte de fármacos até ao cérebro. Kreuter *et al* observaram que nanopartículas que tinham sido estabilizadas com Tween 80 à sua superfície, conseguiram transportar o fármaco dalargin até ao cérebro, o que não se observou para aquelas que não haviam sido estabilizadas pelo Tween 80.

Neste estudo foi ainda possível identificar a presença da apolipoproteína E (Apo E) adsorvida à superfície das nanopartículas, mostrando que a Apo E teria um papel fundamental no direccionamento destas até às células endoteliais da barreira hematoencefálica. [12] A Figura 6 exemplifica o direccionamento de fármacos até ao cérebro, compreendendo uma formulação com as propriedades de superfície ideais para que a Apo E seja adsorvida à superfície *versus* uma formulação não contendo as características de superfície ideais para que a adsorção ocorra. [12, 20]

É importante referir que o trajeto dos NC desde a sua administração até à chegada ao alvo deverá ser bastante rápido, uma vez que os NC estão continuamente a dissolver-se. Apesar de ser uma abordagem ao direccionamento de fármacos bastante promissora, por vezes, quando se dá a ligação da superfície dos NC à superfície da célula alvo, o SMF é novamente ativado, necessitando esta temática de mais estudos. [12]

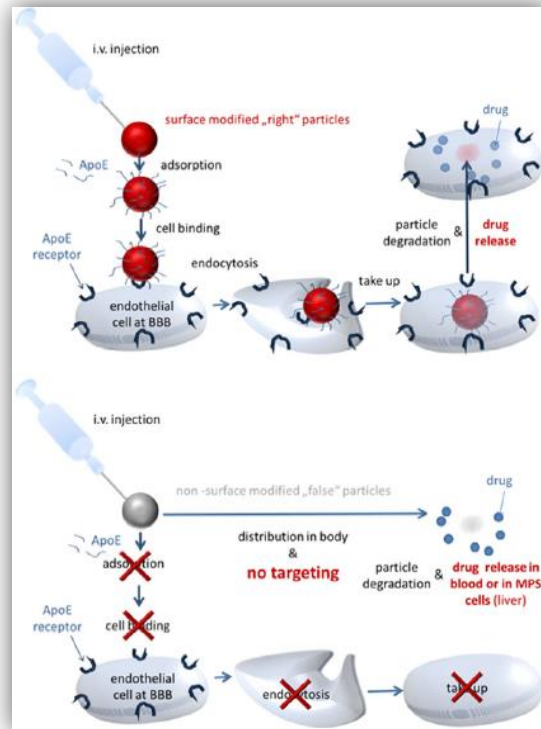


Figura 6: Papel da Apo E no direcionamento de fármacos ao cérebro. [12]

Via pulmonar

A produção de NS para a administração de fármacos por via pulmonar é, industrialmente, viável. As NS podem ser administradas sob a forma de um aerossol recorrendo a nebulizadores ou inaladores, tendo como vantagem, comparativamente às micropartículas, uma distribuição mais homogênea de fármaco, sendo a dosagem mais precisa. Além disso, o facto das partículas possuírem um tamanho inferior, faz com que se dissolvam rapidamente, levando a uma elevada concentração a nível pulmonar. [13, 19]

Sabe-se que a administração de corticóides por inalação leva a certos efeitos secundários tais como infeções fúngicas e disfonia, devido ao seu efeito imunossupressor quando as partículas se depositam na boca e garganta. Esta deposição inadequada pode ser ultrapassada pelo uso de formulações de NC, pois estes acarretam menos perdas de fármaco no trato respiratório superior. [19]

Administração ocular

Quando se trata de uma patologia a nível ocular, a administração local do fármaco constitui uma vantagem. Contudo, nos colírios convencionais, a biodisponibilidade ocular do

fármaco é baixa, devido à constante drenagem do olho, sendo necessárias instilações frequentes do fármaco de modo a manter o efeito terapêutico, o que pode levar não só à não adesão à terapêutica por parte do doente, como também a efeitos secundários indesejáveis, como a absorção sistémica. [19]

O uso de NS com nanocristais minimiza o risco de irritação ocular por estes serem constituídos por API puro, levando a que o olho lacrimeje menos vezes e evitando que a formulação seja drenada. Devido ao seu reduzido tamanho, a velocidade de dissolução é maior, e o fármaco é deslocado rapidamente da lágrima para o tecido ocular. As suas propriedades bioadesivas são fundamentais neste tipo de formulações, pois prolongam o tempo de contacto com a superfície do olho. [19]

Além desta ação maximizada no olho, o facto das Autoridades Regulamentares (AR) não aceitarem alguns polímeros contidos nas formulações para aplicação ocular, poderá colocar de parte as outras nanopartículas, mas não os NC, uma vez que os NC não são constituídos por nenhuma matriz polimérica. [8]

NS de vários glucocorticóides pouco solúveis em água, como a hidrocortisona, prednisolona e dexametasona têm sido produzidas para aumentar a biodisponibilidade destes fármacos a nível ocular. [21]

Aplicação dérmica

Desde há vários anos que a indústria cosmética tira partido desta tecnologia para formular produtos cosméticos com ativos pouco solúveis em água, como os antioxidantes rutina, apigenina e hesperidina. Estes ativos são formulados como NC e adicionados à fase aquosa de cremes ou emulsões O/A. Apesar de serem formulados com NC, de acordo com o novo regulamento para cosméticos da União Europeia (UE), não são considerados nano produtos, como será descrito posteriormente. [8]

Os NC aumentam a dissolução dos compostos ativos pouco solúveis em água na fase aquosa, aumentando assim o gradiente de concentração entre a formulação e a pele, consequentemente facilitando a sua penetração cutânea (Figura 7). Na fase aquosa, ao mesmo tempo que o ativo penetra na pele, rapidamente é dissolvida mais quantidade deste, funcionando os NC como um *depot* nesta fase. [8, 21]

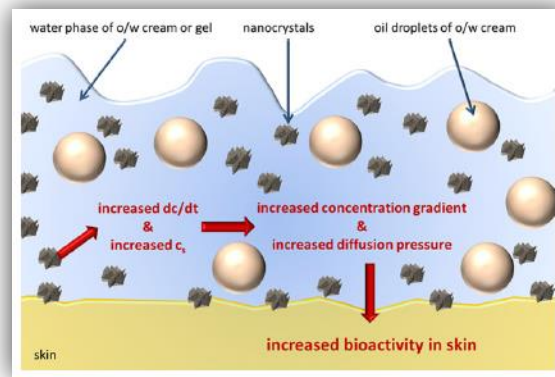


Figura 7: Modo de ação de NC na pele quando formulados na fase aquosa de um creme ou emulsão. [12]

Nanotoxicologia

Infelizmente, e principalmente na indústria farmacêutica, a inovação de um produto acarreta sempre algumas dúvidas ou desvantagens. É o caso dos NC, em que o tema da nanotoxicologia tem ganho cada vez maior importância e preocupação por parte dos investigadores e das AR. Estas preocupações estão relacionadas com o tamanho das partículas e com o seu tempo de persistência no organismo. [12]

Pensando na administração intravenosa de fármacos, é quase intuitivo, se pensarmos no tamanho dos NC, que existe captação dos mesmos pelas células. A captação por parte das células é função do tamanho das partículas, como se pode observar na Figura 8. As micropartículas (50-100 μm) como têm tamanho superior às células do corpo humano (6-10 μm), não são internalizadas por estas; já as nanopartículas com tamanho entre 1000 nm e alguns micrómetros, só podem ser internalizadas pelas células que possuem actividade fagocítica, como é o caso dos macrófagos do SMF.

As partículas que podem ser internalizadas por todas as células via endocitose são aquelas com tamanho inferior a 100 nm, e são estas que acarretam maior risco para o organismo. [12] Contudo, não existe um consenso das AR sobre a definição de nanopartículas. Mueller, Gohla *et al* definem as partículas com tamanho entre 100 nm e 1000 nm e que não são captadas pelas células por endocitose, como partículas submicrométricas (Figura 8). [12]

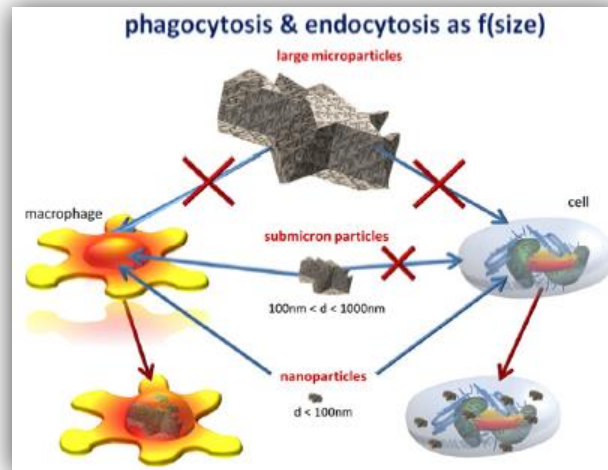


Figura 8: Internalização pelas células vs. tamanho de partícula. [12]

Outro fator importante na área da nanotoxicologia diz respeito à persistência dos NC no organismo. É crucial que os NC sejam biodegradáveis, ou seja, que sejam facilmente eliminados pelo organismo. Assim, quando se analisam os possíveis efeitos tóxicos de um produto baseado na nanotecnologia, há que ter em consideração não só o seu tamanho, como também a sua persistência no organismo. Este é um aspecto já focado pela regulamentação da UE no que diz respeito aos produtos cosméticos à escala nanométrica, sendo que estes deverão ser devidamente rotulados como produtos baseados na nanotecnologia, quando são biopersistentes e apresentam tamanho inferior a 100 nm (classe IV, NCS). [12]

Conforme esquematizado na Figura 9, Mueller, Gohla *et al*, propuseram um sistema de classificação do risco das nanopartículas, *nanotoxicological classification system*, NCS, que relaciona o risco nanotoxicológico com o tamanho e persistência das nanopartículas.

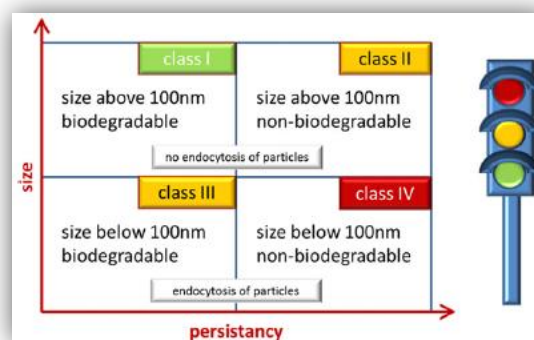


Figura 9: Proposta de um sistema de classificação de risco nanotoxicológico, NCS. [12]

No caso dos NC, a maioria dos produtos apresenta tamanhos acima de 100 nm e, na presença de água estes dissolvem-se, sendo eliminados pelo organismo. Assim, a maioria dos medicamentos à base de NC situa-se na classe I do NCS, sendo bastante toleráveis, não representando risco para o organismo. [8]

Conclusão

Analisando a evolução dos medicamentos à base de NC no mercado farmacêutico, é de esperar que nos próximos anos existam cada vez mais medicamentos em *pipelines* baseados nesta estratégia. O sucesso desta tecnologia é facilmente comprovado ao analisar o medicamento Tricor[®], cujas vendas o tornaram um *blockbuster*, trazendo um ganho colossal não só à indústria farmacêutica como também aos doentes que necessitam da sua toma diária, fazendo com que esta fosse independente da alimentação. Este é um caso claro do potencial que esta abordagem tem e terá na tecnologia farmacêutica.

Apesar de não existir uma formulação universal que sirva para todas as moléculas, os NC poderão aproximar-se desse ideal, sendo uma ótima solução para as moléculas pouco solúveis em água. Além da sua capacidade para melhorar a solubilidade devido ao seu tamanho reduzido, os NC revelam-se promissores no que diz respeito ao direccionamento de fármacos para locais específicos do organismo, aspecto bastante importante para terapêuticas que requerem concentrações elevadas de fármaco no local de ação.

As formas orais ocupam um lugar de destaque nesta tecnologia, e, dadas as suas vantagens e facilidade de produção foram as primeiras a entrar no mercado, ocupando quase a totalidade dos produtos à base de NC aprovados. Contudo, formulações de NC destinadas à administração IV, merecem especial atenção, não só pela diminuição dos efeitos secundários relacionadas com as formulações convencionais, como também pelo facto do princípio ativo poder ser libertado ao longo do tempo.

Apesar de muitas questões serem colocadas do ponto de vista toxicológico, sabemos que para cada terapêutica existe uma relação benefício/risco, a qual necessita de ser devidamente analisada. Em termos toxicológicos, as questões estão relacionadas com o facto de serem nanopartículas e poderem ser internalizadas pelas células, assim como e pela sua potencial permanência no organismo. Contudo, o seu tamanho não chega a ser suficientemente pequeno para que sejam internalizados pelas células e, uma vez que a sua capacidade de dissolução em água não permite que permaneçam indefinidamente no organismo, são considerados uma formulação segura.

Referências Bibliográficas

1. Gibson, M., *Pharmaceutical Preformulation and Formulation A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form*. Second Edition ed. Vol. 199. 2009: Informa Healthcare.
2. Aulton, M.E., *Aulton's Pharmaceutics The Design and Manufacture of Medicines*. Third Edition ed. 2007: Elsevier.
3. Buckley, S.T., et al., *In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012. **45**(3): p. 235-250.
4. Junghanns, J.-U.A.H. and R.H. Mueller, *Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications*. *International Journal of Nanomedicine*, 2008. **3**(3): p. 295-309.
5. Stegemann, S., et al., *When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007. **31**(5): p. 249-261.
6. FDA. *The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance*. 2009 [2 de maio de 2014].
7. Savjani, K.T., A.K. Gajjar, and J.K. Savjani, *Drug solubility: importance and enhancement techniques*. *ISRN pharmaceutics*, 2012. **2012**: p. 195727-195727.
8. Shegokar, R. and R.H. Mueller, *Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010. **399**(1-2): p. 129-139.
9. Salazar, J., et al., *Nanocrystals: Comparison of the size reduction effectiveness of a novel combinative method with conventional top-down approaches*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012. **81**(1): p. 82-90.
10. Keck, C.M. and R.H. Muller, *Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006. **62**(1): p. 3-16.
11. Moeschwitzer, J.P., *Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013. **453**(1): p. 142-156.
12. Mueller, R.H., S. Gohla, and C.M. Keck, *State of the art of nanocrystals - Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011. **78**(1): p. 1-9.
13. Mueller, R.H. and C.M. Keck, *Twenty years of drug nanocrystals: Where are we, and where do we go?* *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012. **80**(1): p. 1-3.
14. Sinha, B., R.H. Mueller, and J.P. Moeschwitzer, *Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: Formulations and factors affecting particle size*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013. **453**(1): p. 126-141.
15. Van Eerdenbrugh, B., G. Van den Mooter, and P. Augustijns, *Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008. **364**(1): p. 64-75.
16. Gao, L., et al., *Application of Drug Nanocrystal Technologies on Oral Drug Delivery of Poorly Soluble Drugs*. *Pharmaceutical Research*, 2013. **30**(2): p. 307-324.

17. Li, Y., et al., *A novel high-pressure precipitation tandem homogenization technology for drug nanocrystals production - a case study with ursodeoxycholic acid*. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2014. **19**(6): p. 662-670.
18. Song, J., et al., *Development and Characterisation of Ursolic Acid Nanocrystals Without Stabiliser Having Improved Dissolution Rate and In Vitro Anticancer Activity*. *Aaps Pharmscitech*, 2014. **15**(1): p. 11-19.
19. Gao, L., et al., *Drug nanocrystals: In vivo performances*. *Journal of Controlled Release*, 2012. **160**(3): p. 418-430.
20. Alyautdin, R., et al., *Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(buyl cyanoacrylate) nanoparticles*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1995. **41**(1): p. 44-48.
21. Sun, B. and Y. Yeo, *Nanocrystals for the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs*. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 2012. **16**(6): p. 295-301.