



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**APLICAÇÃO DE FITOQUÍMICOS POR NANOTECNOLOGIA NA  
TERAPIA ONCOLÓGICA**

Trabalho submetido por  
**Marta Raquel Porfírio da Silva Marques**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Novembro de 2016**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**APLICAÇÃO DE FITOQUÍMICOS POR NANOTECNOLOGIA NA  
TERAPIA ONCOLÓGICA**

Trabalho submetido por  
**Marta Raquel Porfírio da Silva Marques**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Mestre Ana Maria Pintão**

**Novembro de 2016**



## **Dedicatória**

*Dedico esta tese à minha mãe, pai e avós que sempre me abraçaram nos momentos mais difíceis, que multiplicam a felicidade nas minhas alegrias, que tornam mais leve toda a minha vida. A eles devo-lhes tudo, e tudo é pouco....*



## **Agradecimentos**

*Após tanta dedicação chegou o fim de uma das maiores etapas,*

*Primeiramente agradeço a ajuda da minha orientadora Prof. Ana Pintão pela paciência, interesse e dedicação que teve na conclusão da minha formação. Quero agradecer também aos demais Professores do Instituto, pelo conhecimento e sabedoria que me passaram neste percurso tão importante.*

*Agradeço a ajuda, o conforto, o companheirismo e a preocupação que as minhas amigas Ana Luegi, Joana Coelho e Leonor Guedes sempre tiveram comigo. Sem elas nada seria igual, muita coisa não faria sentido. São o meu mais que tudo, Obrigada Joana pela tua dedicação, obrigada Ana pelo teu incentivo e carinho, obrigada Leonor pelo teu optimismo.*

*Agradeço às minhas amigas Beatriz Carvalho, Sara Manso e Beatriz Alegria a amizade preocupação que sempre me deram durante todo o meu processo académico. Sem elas muita coisa não teria sido possível, nunca falharam. São mais que amizades. Obrigada Beatriz Carvalho pela tua mais que preocupação, obrigada Sara pela tua eficácia e prontidão em tudo, obrigada Beatriz Alegria por estares sempre pronta a ajudar.*

*Não esquecendo da minha madrinha Helena Catita que me faz sorrir em qualquer ocasião e que nunca descursa da sua preocupação, tendo sempre uma palavra amiga.*

*Um agradecimento especial à minha família que nunca me deixa ir abaixo, que me apoia em tudo. Obrigada mãe, obrigada pai, avós, tios, Teresinha e Dinis, obrigada por tudo aquilo que me proporcionaram e me proporcionam até hoje. Obrigada Júlio e Vasco pela preocupação, carinho e ajuda.*



## RESUMO

A nanotecnologia tem possibilitado o desenvolvimento de novas estratégias de direccionamento de fármacos às células tumorais, evitando que compostos citotóxicos atinjam as células saudáveis. As nanopartículas mais utilizadas na terapia oncológica são as nanopartículas biodegradáveis e biocompatíveis à base de lipídios e à base de polímeros, como os lipossomas, as micelas poliméricas, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), os transportadores nano-estruturados lipídicos (TNL) e as nanopartículas proteicas.

Mais de 50% dos fármacos em uso clínico a nível mundial, tiveram origem em compostos extraídos de plantas. Vários fitoquímicos apresentam actividade anti-tumoral, com valores de citotoxicidade de grandeza nanomolar ou micromolar, estando já inseridos em regimes quimioterapêuticos hospitalares como os taxanos, paclitaxel e docetaxel, os alcalóides da vinca, vincristina e vimblastina, as campotecinas como o irinotecano e os derivados semi-sintéticos da podofilotoxina como o etopósido.

Muitos outros fitoquímicos como a curcumina, o resveratrol, a epigallocatequina-3-galato e genisteína encontram-se em diferentes fases de ensaios *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos com vista à sua futura utilização como agentes quimioterapêuticos.

Os fitoquímicos anti-cancerígenos possuem diferentes modos de acção, funcionando como inibidores enzimáticos, bloqueadores mitóticos ou anti-angiogénicos, podendo induzir a apoptose celular das células tumorais. Alguns fitoquímicos podem apresentar vantagens em termos de toxicidade e inconvenientes em termos de solubilidade e reduzido tempo de semi-vida.

Esta revisão bibliográfica evidencia a utilização actual dos nano-sistemas na entrega de fitoquímicos na terapia oncológica, os tipos de tumor e regimes em que estão a ser aplicados clinicamente e, ainda, os benefícios resultantes do seu uso.

Palavras-chave: nanotecnologia, nanopartículas, fitoquímicos, cancro, anti-cancerígenos, ensaios clínicos, *in vitro*, *in vivo*, toxicidade



## ABSTRACT

Nanotechnology has enable the development of knew targeted drug strategies to the tumour cells and thus preventing the damaged of healthy tissues. The more exploited nanoparticles on cancer therapy are biodegradable and biocompatible lipid-based and polimeric-based nanoparticles like liposomes, polimeric micelles, solid lipid nanoparticles (SLNs), nanostructured lipid carriers (NLCs) and protein nanoparticles.

Worldwide more than 50% of the drugs in clinical use are derived from plant compound extracts. Several phytochemicals have anti-tumor activity displaying cytotoxicities between nano and micro molar ranges. Some of them make part of chemotherapeutic hospital regimens like taxanes (paclitaxel and docetaxel), vinca alkaloids (vincristine, vinblastine), camptothecins (irinotecan and topotecan) and the semi-syntetic podophylotoxin derivates (etoposide and teniposide).

Many other phytochemicals such as curcumin, resveratrol, epigallocatechin-3-gallate and genistein are in different stages of *in vitro* and *in vivo* assays and in clinical trials, creating a possibility to all of them to make part of a future as a chemotherapeutic agentes.

Anti-cancer phytochemicals have different modes of action, functioning as enzyme inhibitors blockers, as anti-mitotic agentes or anti-angiogenic inducing tumour cell apoptosis. Some phytochemicals may present advantages in terms of toxicity and inconvenience in terms of solubility and reduced half-life.

This review highlights the current use of nano-systems in the delivery of phytochemicals in câncer therapy, which tumours and regimens they are associated to and the benefits when they are incorporated on these delivery nano-systems.

Keywords: nanotechnology, nanoparticles, phytochemicals, cancer, anti-tumour, trials, *in vitro*, *in vivo*, toxicity



## Índice de Conteúdos

<b>1. Nanotecnologia na Terapia Oncológica.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Utilização da nanotecnologia na terapia oncológica.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Tipos de nanopartículas .....</b>	<b>15</b>
<u>1.2.1 Nanopartículas lipídicas .....</u>	<u>16</u>
1.2.1.2 Lipossomas .....	17
1.2.1.3 Nanopartículas lipídicas sólidas .....	19
<u>1.2.2 Nanopartículas poliméricas .....</u>	<u>22</u>
1.2.2.1 Nanopolímeros.....	22
1.2.2.2 Micelas poliméricas.....	24
1.2.2.3 Nanopartículas proteicas.....	25
<b>1.3 Vantagens e desvantagens das nanopartículas .....</b>	<b>26</b>
<b>1.4 Vias de administração .....</b>	<b>28</b>
<b>1.5 Absorção, distribuição, metabolismo e excreção .....</b>	<b>29</b>
<b>1.6 Mecanismos de direcionamento das nanopartículas .....</b>	<b>31</b>
1.6.1 Passivo .....	31
1.6.2 Activo .....	32
<b>2.Fitoquímicos na Terapia Oncológica .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Utilização de fitoquímicos na terapia oncológica.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2 Modo de acção.....</b>	<b>38</b>
<u>2.2.1 Inibição de enzimas .....</u>	<u>39</u>
<u>2.2.2 Ligação aos microtúbulos.....</u>	<u>40</u>
<u>2.2.3 Alterações epigenéticas e condensação da cromatina .....</u>	<u>41</u>
<u>2.2.4 Inibição da angiogénese.....</u>	<u>41</u>
<u>2.2.5 Toxicidade .....</u>	<u>41</u>
<b>2.3 Fitoquímicos com actividade anti-cancerígena.....</b>	<b>42</b>
<u>2.3.1 Paclitaxel e Docetaxel .....</u>	<u>42</u>
2.3.1.1 Indicação terapêutica e eficácia.....	42
2.3.1.2 Toxicidade .....	44
<u>2.3.2 Vincristina .....</u>	<u>45</u>
2.3.2.1 Indicação terapêutica e eficácia.....	46
<u>2.3.3 Etopósido .....</u>	<u>49</u>
2.3.3.1 Indicação terapêutica e eficácia.....	49

2.3.3.2 Toxicidade .....	51
<u>2.3.4 Irinotecano</u> .....	52
2.3.4.1 Indicação terapêutica e eficácia .....	52
2.3.4.2 Toxicidade .....	54
<b>3. Fitoquímicos aplicados por nanotecnologia na terapia oncológica.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1 Fitoquímicos em uso clínico através da nanotecnologia.....</b>	<b>55</b>
<u>3.1.1 Ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></u> .....	55
3.1.1.1 Paclitaxel .....	55
3.1.1.2 Vincristina .....	58
<u>3.1.2 Ensaios clínicos</u> .....	59
3.1.2.1 Paclitaxel .....	59
3.1.2.2 Vincristina .....	65
3.1.2.3 Irinotecano .....	66
<b>3.2. Aplicações da nanotecnologia a fitoquímicos em desenvolvimento .....</b>	<b>67</b>
<u>3.2.1 Ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></u> .....	68
3.2.1.1 Etopósido .....	68
3.2.1.1 Epigallocatequina-3-galato .....	69
3.2.1.3 Curcumina .....	71
3.2.1.4 Quercetina.....	73
3.2.1.5 Resveratrol.....	74
3.2.1.6 Genisteína .....	75
<u>3.2.2 Ensaios clínicos</u> .....	75
<b>3.3 Avaliação da utilização das nanopartículas .....</b>	<b>76</b>
<u>3.3.1 Comparação entre sistemas de veiculação</u> .....	76
<u>3.3.2 Eficácia e segurança</u> .....	78
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>81</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>83</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Correlação de dimensões com a nano-escala.....	13
<b>Figura 2</b> - Sistemas coloidais de entrega de fármacos.....	16
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática da organização de um lipossoma.....	17
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática da categorização dos lipossomas segundo o seu número de bicamadas.....	18
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática da organização de uma nanopartícula lipídica sólida.....	20
<b>Figura 6</b> - Factores que afectam a formação de nanopartículas com copolímeros.....	23
<b>Figura 7</b> - Representação esquemática da organização de uma micela polimérica.....	24
<b>Figura 8</b> - Polimersoma onde se podem observar as cadeias de copolímeros arranjadas formando um core interno aquoso e uma zona lipofílica entre camadas....	25
<b>Figura 9</b> - Produção de nanopartículas proteicas através do método de emulsificação/extracção de solvente.....	26
<b>Figura 10</b> - Ilustração da acumulação passiva de nanopartículas no tecido tumoral devido ao efeito de permeabilidade e retenção.....	31
<b>Figura 11</b> - Epigallocatequina-3-galato encapsulada em nanopartículas poliméricas constituídas pelo copolímero PLGA-PEG.....	71
<b>Figura 12</b> - Eficácia anti-tumoral <i>in vivo</i> da curcumina liposomal em modelos xenográficos de cancro pancreático.....	72



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Exemplos de nanoformulações comercializadas.....	14
<b>Tabela 2</b> - Técnicas de produção de lipossomas.....	19
<b>Tabela 3</b> - Técnicas de produção de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e de transportadores nano-estruturados lipídicos (TNL).....	21
<b>Tabela 4</b> - Características desejáveis das nanopartículas para uma melhor absorção, distribuição e baixa excreção.....	30
<b>Tabela 5</b> - Fitoquímicos em ensaios clínicos e em desenvolvimento na terapia oncológica.....	36
<b>Tabela 6</b> - Exemplos de fontes de alimentos que contêm compostos activos com potencial anti-cancerígeno.....	37
<b>Tabela 7</b> - Ensaios clínicos de eficácia com o paclitaxel no cancro pancreático.....	43
<b>Tabela 8</b> - Síntese de efeitos adversos associados aos regimes com taxanos e sem taxanos.....	45
<b>Tabela 9</b> - Ensaios clínicos de eficácia de regimes com a vincristina e vimblastina em gliomas de baixo grau.....	47
<b>Tabela 10</b> - Síntese de efeitos adversos associados aos regimes híper-CVAD, ao regime ABFM, aoregime PVC, à vincristina e vimblastina.....	48
<b>Tabela 11</b> - Ensaio <i>in vivo</i> de avaliação de eficácia anti-tumoral do etopósido.....	49
<b>Tabela 12</b> - Ensaios clínicos de comparação entre regimes de etopósido e cisplatina com regimes de gencitabina com carboplatina no cancro de pequenas células do pulmão (CPCP).....	50
<b>Tabela 13</b> - Síntese de efeitos adversos associados ao etopósido no cancro de pequenas células do pulmão e no cancro testicular não seminomatoso.....	51
<b>Tabela 14</b> - Avaliação da eficácia anti-tumoral do irinotecano no cancro colorectal...	52
<b>Tabela 15</b> - Comparação de eficácia anti-tumoral entre o regime de platina-etoposido e platina-irinotecano no cancro de pequenas células do pulmão.....	53
<b>Tabela 16</b> - Síntese de efeitos adversos associados ao irinotecano e ao irinotecano com cisplatina.....	54
<b>Tabela 17</b> - Ensaio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com nab-paclitaxel. Estudo da citotoxicidade <i>in vitro</i> e da toxicidade e farmacocinética <i>in vivo</i> .....	56
<b>Tabela 18</b> - Ensaio <i>in vivo</i> com nab-paclitaxel em associação com gencitabina no cancro do pâncreas.....	56

<b>Tabela 19</b> – Ensaio <i>in vivo</i> da actividade anti-tumoral do Abraxane® e do Taxol®.....	57
<b>Tabela 20</b> - Ensaio <i>in vivo</i> com vincristina lipossomal no cancro do pulmão. Estudo de farmacocinética.....	58
<b>Tabela 21</b> – Ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com vincristina em nanoformulações lipossomais.....	59
<b>Tabela 22</b> – Ensaio de fase III com o regime nab-paclitaxel/carboplatina no cancro de não-pequenas células do pulmão.....	60
<b>Tabela 23</b> – Ensaio clínico fase III com o regime nab-paclitaxel/gencitabina no cancro pancreático.....	61
<b>Tabela 24</b> – Ensaios clínicos de fase II/III com nab-paclitaxel no cancro da mama.....	62
<b>Tabela 25</b> – Ensaios clínico fase II com nab-paclitaxel no melanoma.....	63
<b>Tabela 26</b> – Ensaios clínicos em desenvolvimento com nab-paclitaxel.....	64
<b>Tabela 27</b> - Eficácia da nanoformulação lipossomal de vincristina no linfoma não-Hodgkin.....	65
<b>Tabela 28</b> – Ensaios clínicos de fase II/III com nal-IRI no cancro metastático do Pâncreas.....	67
<b>Tabela 29</b> – Nanoformulações em ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com o etoposido.....	69
<b>Tabela 30</b> – Nanoformulações <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com a epigallocatequina-3-galato (EGCG).....	70
<b>Tabela 31</b> – Ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de nanoformulações com a curcumina.....	73
<b>Tabela 32</b> – Ensaios <i>in vivo</i> de nanoformulações com quercetina.....	73
<b>Tabela 33</b> – Ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de nanoformulações com resveratrol.....	74
<b>Tabela 34</b> – Ensaio <i>in vitro</i> de nanoformulação com genisteina.....	75

**Lista de Abreviaturas**

5-FU – 5- Fluorouracilo

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AF – Ácido Folínico

BEP – Bleomicina / Etopósido / Cisplatina

BITC – Benzil- Isoteocianato

CCR – Cancro Colo Retal

CHOP – Ciclofosfamida / Doxrrubicina/ Vincristina/ Prednisona

CNP CP – Cancro de não-pequenas células do Pulmão

COX-2 – Ciclo-oxigenase

CPCP – Cancro de Pequenas Células do Pulmão

DMT - Dose Máxima Tolerada

EC- Etopósido / Carboplatina

EGCG- Epígalocatequina –3– galato

EMA – Agência Europeia do Medicamento

EP- Etopósido / Cisplatina

EPR - Efeito de permeabilidade e retenção

EPR – Efeito Permeabilidade e Retenção

FDA - Food and Drug Administration

FOLFIRI - 5-fluorouracilo / ácido folínico

FOLFOX - 5-fluorouracilo / ácido folínico / oxaliplatina

FOLFOXIRI – 5 – Fluorouracilo / ácido folínico / irinotecano / oxaliplatina

GP60 – Glicoproteína 60

GUV - Vesículas unilamelares gigantes

hiper-CVAD – Regime Hiper Fraccionado de Ciclofosfamida / Vincristina / Doxrrubicina / Dexametasona

HPH - Homogeneização a alta pressão / (“High Pressure Homogenization”)

iHDAC- inibidores das histona-deacetilases

IP - irinotecano/cisplatina

IRI – Irinotecano

ITC – Isotiocianatos

KFDA - Korean Food and Drug Administration

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

LUV - Vesículas unilamelares grandes

nab - nanopartícula de ligação à albumina / (nanoparticle albumine-bound)

nal-IRI - nanolipossoma com irinotecano

NLS - Nanopartículas lipídicas sólidas / (SLNs: Solid lipid nanoparticles)

NNI - National Nanotechnology Initiative

PCL - Policaprolactona

PEG - Polietilenoglicol

PGLA - Ácido polilático co-glicólico

PLA - Ácido polilático

PVC – Procarbazina/ Lomostina / Vincristina

RCM – Resumo das Características do Medicamento

RSV - resveratrol

RT – Radioterapia

SG – Sobrevida Global

SLP - Sobrevida Livre de Progressão

SUV - Vesículas unilamelares pequenas

TNL - Transportadores nano-estruturados lipídicos / (NLCs: Nanostructured lipid carriers)

TRO - Taxa de Resposta Objectiva

TOP1 – Topoisomerase I

TOP2 – Topoisomerase II

TRO- Taxa de Resposta Objectiva

VCR- Vincristina

VIP – Cisplatina / Etopósido / Ifosfamida

VLB – Vimblastina

# 1. Nanotecnologia na Terapia Oncológica

## 1.1 Utilização da nanotecnologia na terapia oncológica

A nanotecnologia é definida de acordo com *National Nanotechnology Initiative* (NNI) como “a pesquisa e o desenvolvimento da tecnologia à escala atômica, molecular ou macromolecular, levando ao uso e criação controlada de estruturas, aparelhos e sistemas com uma escala de dimensão de aproximadamente 100 nm” (Zamboni, 2014). De acordo com Wilczewska, Niemirowicz, Markiewicz e Car (2012), a dimensão das nanopartículas está entre os 80 a 300 nm nos lipossomas e entre os 10 e 100 nm nas nanopartículas poliméricas (figura 1).

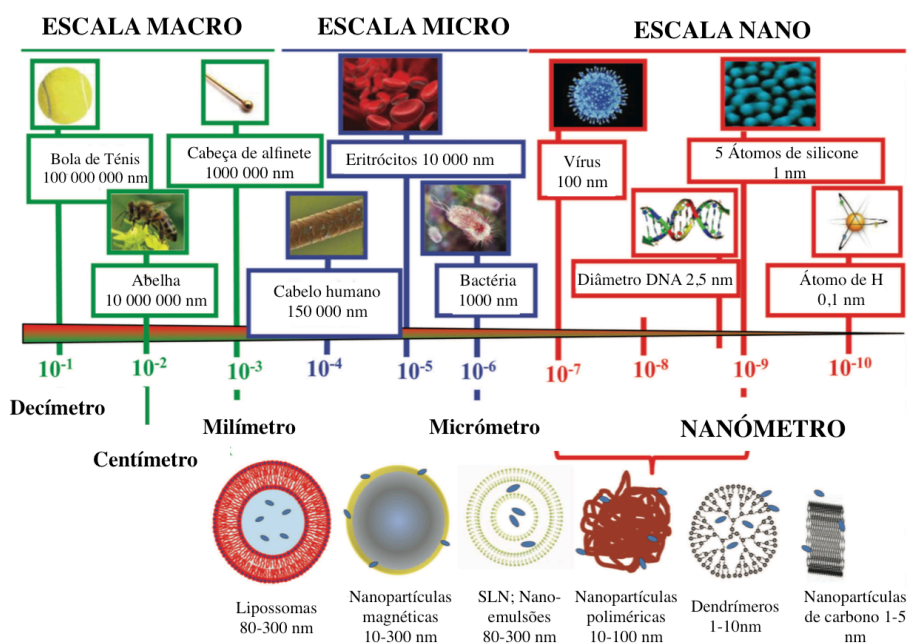


Figura 1 – Correlação de dimensões com a nano-escala. Adaptado de Wilczewska, Niemirowicz, Markiewicz & Car, (2012).

Os primeiros nano-sistemas a serem desenvolvidos foram as nano-emulsões que começaram a ganhar grande relevância nos anos 50 (Martins, Sarmiento & Souto, 2007) e rapidamente se percebeu que as suas aplicações são vastas, sendo usadas como um sistema de distribuição de fármacos (Martins et al., 2007).

Os lipossomas conhecidos desde 1965, que são estruturas clássicas de sistemas de entrega lipídicos (Naseri, Valizadeh & Zakeri-milani, 2015), são dos nano-sistemas

mais utilizados até à data em aplicações clínicas (Grijalvo, Mayr, Eritja & Diaz, 2016). Por outro lado, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) têm vindo a demonstrar serem uma boa alternativa aos lipossomas (Nunes, Madureira, Campos, Sarmiento & Gomes, 2015), e tal como os transportadores nano-estruturados lipídicos (TNLs), surgiram já na década de 90 com o intuito de substituir os lipossomas (Naseri et al., 2015). Os transportadores nano-estruturados são considerados a nova geração de nanopartículas, sendo um nano-sistema com elevada eficiência de encapsulação, com uma libertação controlada e elevado desempenho na produção de formas farmacêuticas finais como cremes, comprimidos, cápsulas e injectáveis (Jaiswal, Gidwani & Vyas, 2014).

Várias formulações na área de cosmética e na terapia, especialmente na área oncológica têm vindo a ser aprovadas e comercializadas (tabela 1).

Tabela 1 – Exemplos de nanoformulações comercializadas. Adaptado de Weissing, Pettinger e Murdock (2014); Li Wu, Martini e Wen (2011).

<b>Nome comercial</b>	<b>Nanopartícula</b>	<b>Composto</b>	<b>Indicação</b>	<b>Aprovação</b>
<b>Doxil®</b>	Lipossoma	Doxorrubicina	Tumores	FDA 1995
<b>RevitaLift®</b>	Nanossomas	Pró-retinol A e vitamina A	Anti-rugas	
<b>PegIntron®</b>	Proteína peguilada	Interferão alfa 2b	Hepatite C	FDA 2001
<b>Genexol®</b>	Micela polimérica	Paclitaxel	Tumores	KFDA 2001
<b>Megace ES®</b>	Nanocristal	Megestrol	Anorexia	FDA 2005

FDA (*Food and Drug administration*); KFDA (*Korean Food and Drug Administration*)

A nanotecnologia na terapia oncológica é aplicada de modo a resolver um dos seus maiores problemas, o qual reside na falta de selectividade da entrega do composto activo no tumor e a sua entrega na quantidade necessária (Wilczewska et al., 2012). Ultrapassando estes problemas é possível minimizar os efeitos indesejáveis nas células saudáveis e promover uma maior eficácia do tratamento (Wilczewska et al., 2012). O primeiro medicamento anti-tumoral em lipossomas aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1993 foi a doxorrubicina (Doxil®) (Weissing, Pettinger & Murdock, 2014).

Em 2012 já existiam 43 nanopartículas comercializadas com compostos activos, designados como “produtos nano-farmacêuticos”, “nanomedicinas” ou “nano-fármacos”. De entre as nanopartículas comercializadas aplicáveis às mais variadas patologias, encontram-se lipossomas como o DepoCyt® que contém citarabina para a meningite, o Marqibo® com vincristina encapsulada para a leucemia linfoblástica aguda ou o Ambiosome® para infecções fúngicas, entre outros (Weissing et al., 2014). Para além dos lipossomas encontram-se ainda comercializadas outros tipos de nanopartículas como as nanoformulações à base de polímeros onde se insere por exemplo o Genexol® que transporta o paclitaxel, os conjugados de proteína-fármaco como o Abraxane® de aplicação oncológica (Weissing et al., 2014) .

## **1.2 Tipos de nanopartículas**

As nano-partículas que são aplicadas a sistemas de entrega de fármacos podem ter origem em diversos materiais como lípidos no caso dos nanotransportadores lipídicos, polímeros designados de nanotransportadores poliméricos, compostos organometálicos como o caso dos nanotubos de carbono ou até mesmo por vírus, conhecidas como nano-partículas virais) (Cho, Wang, Nie, Chen & Shin, 2008).

As nanopartículas que têm sido aplicadas na área da oncologia são nanopartículas pertencentes aos Sistemas Coloidais de Entrega de Fármacos (“Coloidal Drug Delivery Systems”) os quais podem ser divididos em nano-transportadores que têm como formulação base os lípidos e em nano-transportadores à base de polímeros (Pradhan, Singh & Singh, 2013) (figura 2).

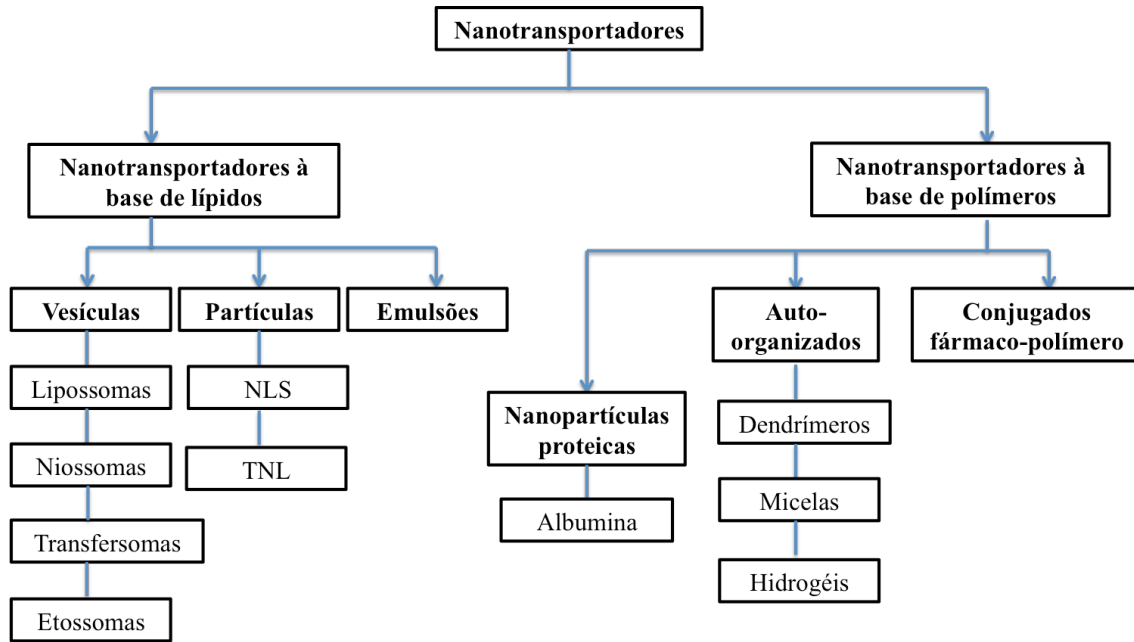


Figura 2 – Sistemas coloidais de entrega de fármacos. NLS (nanopartículas lipídicas sólidas); TNL (transportadores nano-estruturados lipídicos) Adaptado de Pradhan et al., (2013); Amaral & Estanqueiro, (2015); Loheharoenkal et al., (2014).

Os nano-transportadores à base de lípidos podem ser divididos em vesículas, partículas e emulsões (Pradhan et al., 2013) e os nano-transportadores à base de polímeros são segmentados em partículas, em sistemas que se auto-organizam e em conjugados fármaco-polímero (Pradhan et al., 2013; Amaral & Estanqueiro, 2015).

### 1.2.1 Nanopartículas lipídicas

Os nano-transportadores vesiculares constituídos por lípidos são esféricos e compostos por uma bicamada de fosfolípidos que protege o “core” interno aquoso. Nesta categoria inserem-se os lipossomas, niossomas, transfersomas e etossomas (Pradhan et al., 2013). A diferença que reside entre as vesículas lipídicas e as nanopartículas lipídicas é o estado-físico do seu “core” interno, que no primeiro caso é líquido e no segundo caso sólido e semi-sólido (Amaral & Estanqueiro, 2015). Nas nanopartículas lipídicas estão incluídas as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e os transportadores nano-estrueturados lipídicos (TNL) (Pradhan et al., 2013; Amaral & Estanqueiro, 2015).

### 1.2.1.2 Lipossomas

Os lipossomas são nanopartículas lipídicas que transportam no seu “core” interno compostos hidrossolúveis e na sua membrana compostos lipofílicos, protegendo ambos do ambiente externo que os rodeia até atingirem o local de ação pretendido (Wang et al., 2015).

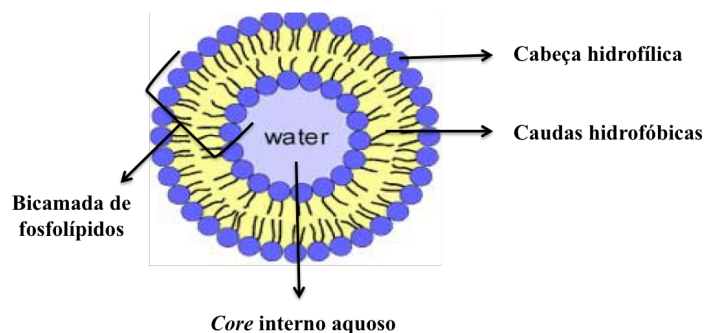


Figura 3 – Representação esquemática da organização de um lipossoma

Na sua composição são constituídos por uma bicamada fosfolipídica (figura 3), ou seja, são formados por várias moléculas de fosfolípidos, as quais têm uma cabeça de natureza hidrofílica que é solúvel em água e duas caudas hidrofóbicas de ácidos gordos que são repelidas pela mesma (Wang et al., 2015). Os lipossomas podem apresentar características diferentes consoante o seu número de bicamadas, o seu tamanho e a sua carga de superfície, dependendo esta última do tipo de fosfolípidos utilizados (Grijalvo et al., 2016).

No que concerne ao número de bicamadas os lipossomas são inseridos em duas categorias, as vesículas multilamelares, constituídas por mais que uma bicamada e vesículas unilamelares, constituídas apenas por uma bicamada. As vesículas unilamelares ainda se podem sub-dividir em vesículas unilamelares gigantes (GUV), vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV) (Nogueira, Gomes, Preto & Cavaco-Paulo, 2015) (figura 4).

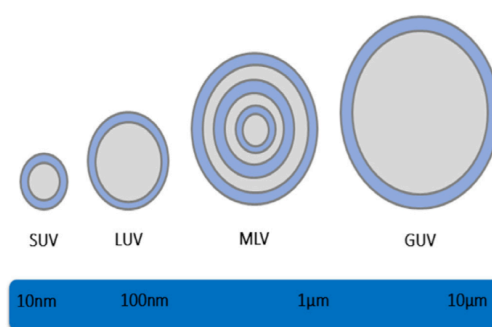


Figura 4 – Representação esquemática da categorização dos lipossomas segundo o seu número de bicamadas. Retirado de Nogueira et al., (2015).

Segundo Nogueira et al. (2015) o tamanho da vesícula irá influenciar o tempo de semi-vida na corrente sanguínea e o número de bicamadas aliado às dimensões da partícula vão determinar a quantidade de fármaco que pode ser introduzida no lipossoma. Os nano-lipossomas (LUV e SUV), iguais em composição e estrutura aos lipossomas, apenas diferem no seu tamanho, sendo que às dimensões da nano-escala, vieram promover uma maior área interfacial de superfície do fitoquímico com o tecido biológico em si, aumentando a biodisponibilidade do composto encapsulado (Wang et al., 2015).

As técnicas de produção de um lipossoma são diversas, sendo a técnica mais simples o método de hidratação em camada fina que consiste na separação do solvente seguido de uma re-hidratação. A diálise também é um dos métodos de produção de lipossomas, que consiste na formação de uma micela mista com emulgente com a subsequente diluição do mesmo, pode ser usada como um método alternativo quando se estão a manipular compostos sensíveis à desnaturação, como as proteínas (Nogueira et al., 2015).

Para reduzir o tamanho dos lipossomas utiliza-se a sonicação, a homogeneização a alta velocidade e a extrusão de membrana (Nogueira et al., 2015). No caso da injeção de solvente, não há necessidade de uma posterior redução de tamanho do lipossoma, pois dá logo origem a nano-lipossomas de aproximadamente 100 nm (Nogueira et al., 2015) (tabela 2).

Tabela 2 – Técnicas de produção de lipossomas. Adaptado de Nogueira et al., (2015)

Método	Técnica
<b>Hidratação em camada fina</b>	Evaporação de solvente seguido por um re-hidratação numa fase aquosa
<b>Evaporação de fase reversa</b>	Mistura de uma fase aquosa com um solvente imiscível para formar uma emulsão com posterior evaporação do solvente
<b>Injecção de solvente</b>	Injecção de um solvente que seja miscível numa fase aquosa (normalmente etanol)
<b>Díalise</b>	Formação de uma micela mista com emulgente com a subsequente diluição ou remoção do mesmo
<b>Fluido supercrítico</b>	Solvatação dos lípidos num fluido supercrítico com posterior injecção a alta pressão numa fase aquosa
<b>Sonicação</b>	Energia ultra-sónica para levar à ruptura das vesículas
<b>Homogeneização a alta velocidade</b>	Colisões a alta velocidade para levar à ruptura mecânica da vesícula
<b>Extrusão de membrana</b>	Forçar a passagem da vesícula através de poros com medidas definidas

A Vincristina lipossomal sob a marca comercial Marqibo®, é uma nanopartícula com vincristina que foi aprovada clinicamente pela FDA (Food and Drug Administration) na leucemia linfoblástica aguda em adultos refractários. Esta nanopartícula é uma formulação de sulfato de vincristina encapsulada num lipossoma composto por fosfolípidos de esfingomiéline e colesterol (Douer, 2016). Recentemente, a FDA também aprovou a nanoformulação lipossomal de irinotecano como tratamento de segunda-linha no cancro metastático do pâncreas (Ko, 2016).

### 1.2.1.3 Nanopartículas lipídicas sólidas

Ao contrário dos lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) têm um “core” interno de lípidos no estado sólido no qual também está inserido água e surfactante (Martins et al., 2007) e são constituídas por uma camada de fosfolípidos (Martins et al., 2007) (figura 5). Estas nanopartículas são usadas maioritariamente para encapsular compostos hidrofóbicos, aumentando a estabilidade do composto, diminuindo a sua degradação e promovendo uma libertação prolongada do mesmo (Wang et al., 2015).

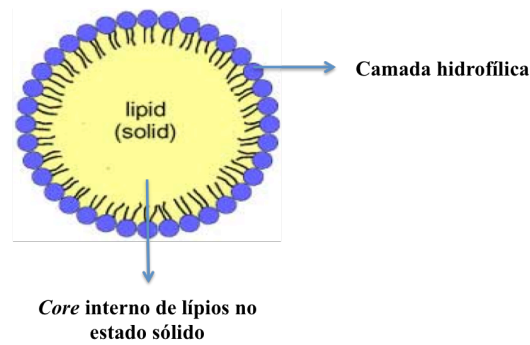


Figura 5 - Representação esquemática da organização de uma nanopartícula lipídica sólida

O composto activo pode ser encapsulado quer por dissolução no “core” interno da nanopartícula, ou por dispersão do composto à volta do core ou por enclausuramento do composto na matriz lipídica (Naseri et al., 2015). Ao dispersar o composto à volta do “core” tem-se uma libertação bifásica do activo e ao enclausurar obtém-se uma libertação mais prolongada no tempo (Wang et al., 2015).

Os transportadores nano-estruturados lipídicos (TNL) têm a mesma estrutura que as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), no entanto o estado físico do “core” interno em vez de sólido é semi-sólido, sendo constituído por uma mistura de lípidos no estado líquido e no estado sólido (Battaglia & Gallarate, 2012).

Os métodos mais comuns de produção das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e dos transportadores nano-estruturados lipídicos (TNL) são o método da homogeneização, evaporação de fase reversa ou evaporação/emulsificação de solvente (Wang et al., 2015). Na evaporação de fase reversa há mistura de uma fase aquosa com um solvente imiscível para formar uma emulsão com posterior evaporação do solvente (Nogueira et al., 2015). Na evaporação/emulsificação, os lípidos são dissolvidos num solvente orgânico com posterior evaporação do mesmo a pressão reduzida (Naseri et al., 2015). Na homogeneização a altas pressões os compostos são dissolvidos nos lípidos previamente fundidos antes da homogeneização (Battaglia & Gallarate, 2012) (tabela 3).

Tabela 3 – Técnicas de produção de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e de transportadores nano-estruturados lipídicos (TNL). Adaptado de Naseri et al. (2015); Iqbal et al. (2012); Wang et al. (2015).

<b>Método</b>	<b>Técnica</b>
<b>Homogeneização a altas pressões (HPH)</b>	O composto é dissolvido ou disperso nos lípidos fundidos antes da homogeneização
<b>Emulsificação/Evaporação de solvente</b>	Os lípidos são dissolvidos num solvente orgânico, com posterior evaporação do mesmo a pressão reduzida
<b>Fluido supercrítico</b>	Solvatação dos lípidos num fluido supercrítico (dióxido de carbono) com posterior injeção a alta pressão numa fase aquosa
<b>Injeção de solvente</b>	Injeção de um solvente que seja miscível numa fase aquosa (normalmente etanol)
<b>Técnica da micro-emulsão</b>	Os lípidos são aquecidos acima do seu ponto de fusão e adicionados a uma fase aquosa à mesma temperatura. Após formação da micro-emulsão, esta é diluída em água fria de forma a precipitar a nanopartícula com um tamanho mais reduzido

A técnica de homogeneização a alta pressão (HPH) tem desvantagem de envolver parâmetros críticos como altas temperaturas e pressões que causam instabilidade mecânica e termodinâmica no produto final (Battaglia & Gallarate, 2012). A técnica de HPH pode ser realizada através de uma homogeneização a quente ou a frio, sendo que esta última supera os inconvenientes da homogeneização a quente, prevenindo a degradação acelerada do fármaco devido às altas temperaturas e a perda de fármaco para a fase aquosa durante a homogeneização (Jaiswal et al., 2014). Na homogeneização a frio, há menos exposição da substância às altas temperaturas uma vez que é logo arrefecida através de gelo ou nitrogénio líquido para distribuição do fármaco na matriz lipídica (Jaiswal et al., 2014).

De acordo com outros autores (Naseri et al., 2015; Iqbal, Sahni, Baboota, Dang & Ali, 2012) ambas as nanopartículas também podem ser preparadas através de outros métodos, como a injeção de solvente, fluido supercrítico e técnica da micro-emulsão entre outros (tabela 3).

### 1.2.2 Nanopartículas poliméricas

Nos nano-transportadores poliméricos, as nanopartículas que se auto-organizam em arranjos espontâneos são constituídas por moléculas anfotéricas que se organizam à superfície na presença de determinados solventes de forma a isolar o “core” interno e a substância nele inserida. As micelas, os dendrímeros e os hidrogéis fazem parte deste sub-grupo (Pradhan et al., 2013).

#### 1.2.2.1 Nanopolímeros

Os polímeros podem ter origem em compostos natural como o colagénio, o quitosano, a elastina e a queratina ou sintética (Sionkowska, 2011). Os polímeros direccionados para entrega de fármacos são normalmente constituídos por polímeros hidrofóbicos biocompatíveis e biodegradáveis como os poliésteres que estão ligados a um polímero hidrofílico também biocompatível, como o polietilenoglicol (PEG) (Pradhan et al., 2013). Os polímeros sintéticos mas biodegradáveis maioritariamente usados são o ácido poliláctico (PLA), a policaprolactona (PCL) e o ácido poliláctico coglicólico (PGLA) (Tamman, Azzazy & Lamprecht, 2015). O PGLA é o polímero usado com mais sucesso na produção de nanopartículas poliméricas, pois é derivado dos monómeros de ácido láctico e glicólico, sendo ambos metabolizados e eliminados do organismo através do ciclo de ácido cítrico (Tamman et al., 2015). Este polímero é maioritariamente usado em nanopartículas transportadoras de compostos hidrofóbicos (Amaral & Estanqueiro, 2015).

As construções com copolímeros anfipáticos são constituídas por dois polímeros quimicamente diferentes e têm-se revelado um excelente meio de distribuição de compostos activos (Zhu et al., 2013). A junção de polímeros pode ser usada para a produção de diferentes nanopartículas poliméricas, como micelas poliméricas, dependendo das técnicas utilizadas na sua produção, da composição dos blocos de copolímeros e do seu tamanho (Letchford & Burt, 2007) (figura 6).

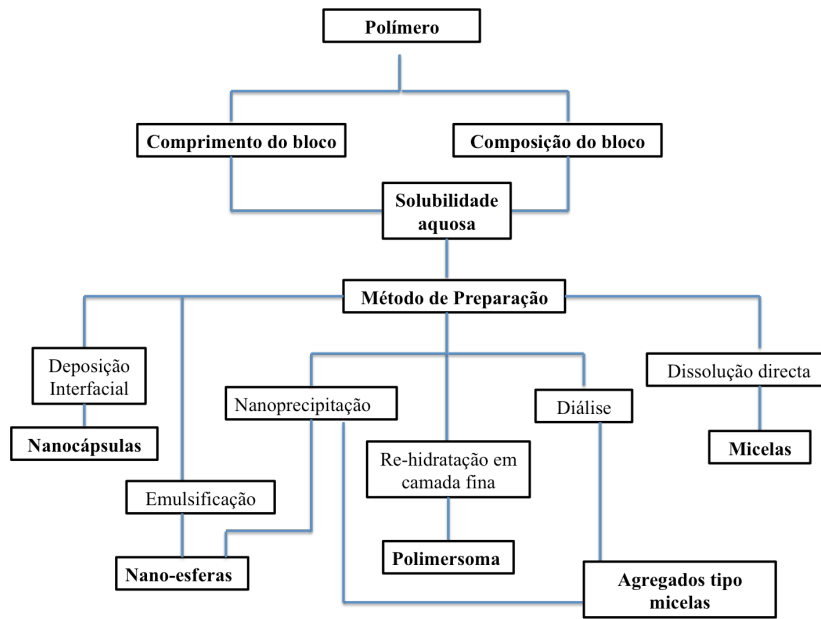


Figura 6 – Factores que afectam a formação de nanopartículas com copolímeros. Adaptado de Letchford & Burt, (2007).

Relativamente ao comprimento do bloco, se tivermos um peso molecular maior da parte hidrofílica, o copolímero é facilmente disperso em água e auto-organiza-se em pequenas micelas (Letchford & Burt, 2007). Por outro lado, se o bloco hidrofóbico exceder o hidrofílico, o copolímero torna-se mais insolúvel em água não se transformando numa nanopartícula apenas através de uma dissolução directa, sendo necessário processos como uma diálise, uma emulsificação ou nanoprecipitação (Letchford & Burt, 2007). Segundo Letchford e Burt (2007), a proporção do tamanho bloco hidrofílico/bloco hidrofóbico também tem acção na geometria das nanopartículas, numa situação em que haja um maior comprimento do bloco hidrofílico irá ser promovida a formação de nanopartículas esféricas.

Anwer (2016) comprovou o potencial de nanopartículas sintetizadas a partir de PLGA para melhorar a distribuição da quercetina, um flavonóide com grande potencial anti-oxidante e promissor na área do cancro, aterosclerose, inflamação crónica, entre outras. Com a incorporação da quercetina nestas nanopartículas poliméricas, a solubilidade do fármaco foi aumentada assim como o seu efeito anti-oxidante.

### 1.2.2.2 Micelas poliméricas

As micelas poliméricas (MP) são nano-estruturas esféricas constituídas por construções de copolímeros biodegradáveis e anfipáticos que se auto-organizam em meio aquoso (Grattoni et al., 2010). As moléculas anfotéricas formam uma monocamada com uma região hidrofóbica interna semi-sólida (Grattoni et al., 2010) constituída a maior parte das vezes por PLA, PCL ou PLGA (Moutinho, Matos, Teixeira & Balcão, 2012) e com uma zona hidrofílica tipicamente formada por PEG onde se podem conjugar ligandos como estratégia de direccionamento a células cancerígenas (Grattoni et al., 2010) (figura 7). As micelas poliméricas são maioritariamente utilizadas para transportar substâncias lipofílicas no seu interior (Grattoni et al., 2010).

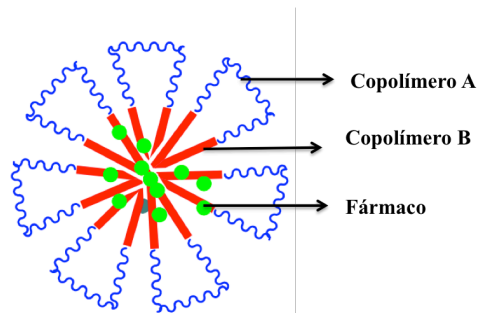


Figura 7 - Representação esquemática da organização de uma micela polimérica. Copolímero A: PEG; Copolímero B: PLGA. Adaptado de Danafar (2016).

Segundo Letchford e Burt (2007) o método de produção escolhido para a formação das micelas poliméricas depende da solubilidade do copolímero. Caso o copolímero seja moderadamente solúvel em água, as micelas podem ser preparadas por uma dissolução directa onde o copolímero é adicionado ao meio aquoso, ou através do método de “film casting” onde ocorre a dissolução do copolímero e do composto activo num solvente volátil que é posteriormente evaporado (Letchford & Burt, 2007). Se o copolímero for pouco solúvel em água, é comum recorrer à diálise (Letchford & Burt, 2007).

Segundo Sosnik e Raskin (2015), o arranjo dos blocos ao longo da estrutura do polímero irá também afectar a estrutura micelar e a sua auto-organização. Por exemplo, uma construção L-H-L onde L e H são copolímeros lipofílicos e hidrossolúveis respectivamente, vai proporcionar a formação de uma estrutura em forma de flor com uma maior capacidade de “core” interno que permite o transporte de moléculas mais

volumosas (Sosnik & Raskin, 2015). Esta estrutura quando se auto-organiza em meio aquoso pode originar micelas em forma de roda ou umas vesículas denominadas de polimersomas que conseguem transportar concomitantemente, substâncias solúveis e não solúveis em água devido a sua estrutura de “core” interno aquoso que fica rodeada por uma bicamada hidrofóbica (Sosnik & Raskin, 2015) (figura 8).

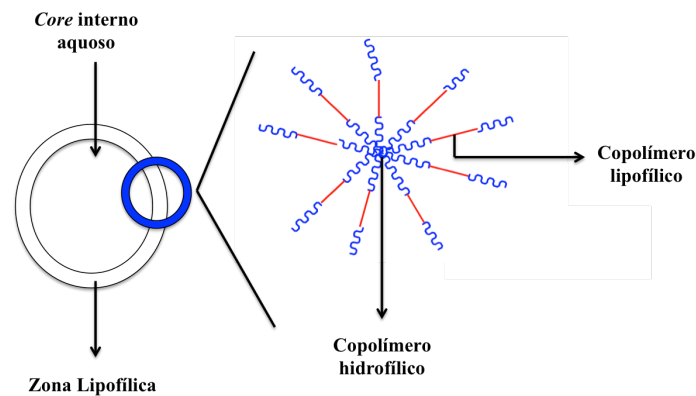


Figura 8 – Polimersoma onde se podem observar as cadeias de copolímeros arranjadas formando um core interno aquoso e uma zona lipofílica entre camadas. Adaptado de Letchford & Burt, (2007) ; Danafar, (2016).

O Genexol-PM® é um exemplo de uma nanopartícula micelar polimérica com paclitaxel que se encontra aprovada, estando indicada no cancro da mama e do pulmão (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015). Esta nanopartícula é constituída por diblocos de polietilenoglicol e ácido poli-DL-láctico (PEG-PDLLA) não-tóxicos (Kim et al., 2001).

### 1.2.2.3 Nanopartículas proteicas

As nanopartículas proteicas são transportadoras de moleculares biocompatíveis e biodegradáveis que surgiram como alternativa aos polímeros sintéticos (Lohcharoenkal et al., 2014).

As nanopartículas proteicas direccionam eficientemente os fármacos, protegendo-os da degradação *in vivo* após administração, como é o caso da albumina que é largamente usada na produção de micro e nanopartículas (Amaral & Estanqueiro, 2015). As nanopartículas proteicas podem ser sintetizadas através de várias proteínas, nomeadamente através de proteínas solúveis em água (albumina humana e albumina bovina) ou através de proteínas hidrofóbicas (gliadina) (Lohcharoenkal et al., 2014).

As nanopartículas proteicas podem ser preparadas através de dessolvatação e emulsificação/extracção, sendo este último método utilizado na tecnologia nab (nanopartícula de ligação à albumina) (Locharoenkal et al., 2014). A dessolvatação é baseada num diferencial de solubilidade de proteínas em solventes onde há uma diminuição da solubilidade da proteína levando a uma separação de fases. Após esta separação, há adição de um solvente dessolvente que leva à alteração conformacional da proteína de forma a que ela precipite. Após estarem formadas, são interligadas através agentes como o glutaraldeído formando nanopartículas proteicas com ligações cruzadas entre si (Locharoenkal et al., 2014).

A emulsificação/extracção de solvente realiza-se através da emulsificação de uma solução aquosa proteica, em que a fase oleosa é posteriormente removida através de um solvente orgânico. Após a remoção da fase oleosa formam-se nanopartículas proteicas que são interligadas através da adição de glutaraldeído (Locharoenkal et al., 2014) (figura 9).

A tecnologia nab utilizada no paclitaxel, que é um dos seu maiores exemplos, consiste numa formulação à base de uma nanopartícula polimérica de aproximadamente 130 nm onde o paclitaxel está ligado através de uma ligação hidrofóbica não-covalente e reversível a uma proteína o estabiliza, a albumina (nab-paclitaxel: “nanoparticle albumin-bound paclitaxel”) (Wang, Langer & Farokhzad, 2012).

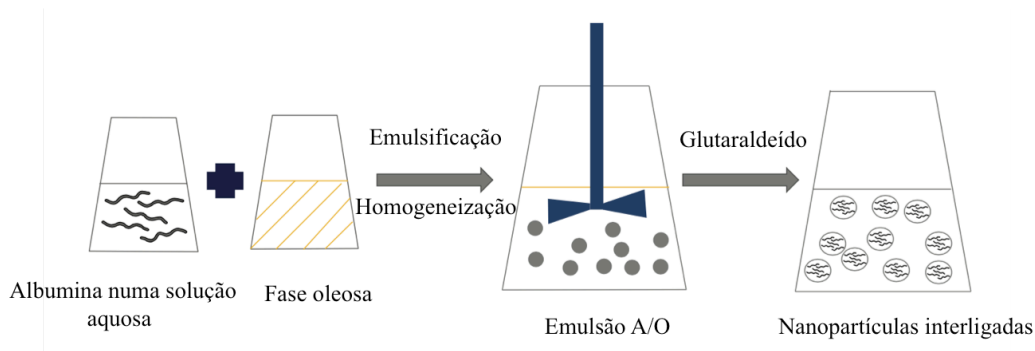


Figura 9 - Produção de nanopartículas proteicas através do método de emulsificação/extracção de solvente (A/O - emulsão água em óleo). Adaptado de Locharoenkal et al., (2014).

### 1.3 Vantagens e desvantagens das nanopartículas

Idealmente, um nano-transportador para ser eficaz deve ser biodegradável e biocompatível, ter uma elevada capacidade de encapsulação de fármaco, apresentar especificidade para determinado local de ação de forma a evitar os tecidos e células

saudáveis, não proporcionar libertação precoce do fármaco ( caso aconteça, a sua perda não deve ser significativa) e ainda possuir um mecanismo de libertação do composto activo controlado de forma a dispensar a dosagem correta no local de ação (Amaral & Estanqueiro, 2014).

As nanopartículas lipídicas são compostas por lípidos fisiológicos sendo por isso muito bem toleradas e não-tóxicas pois têm a vantagem de serem semelhantes às estruturas fisiológicas. Estas nanopartículas têm numerosas vantagens em termos de libertação controlada, de estabilidade, de produção, de direcionamento e de encapsulação (Pradhan et al., 2013). No entanto, os lipossomas possuem pouca estabilidade na corrente sanguínea (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015), a qual pode ser aumentada pela adição de surfactantes não iónicos ou de polímeros como é o caso da adição de polietiloglicol (PEG) à superfície dos lipossomas (Nogueira et al., 2015). Os lipossomas apresentam também uma baixa capacidade de retenção do composto activo caso a permeabilidade de membrana não seja a adequada, sendo possível torná-la mais rígida e impermeável com a adição de esteróis, como o colesterol (McClements, 2015). Apesar dos inconvenientes, os lipossomas são muito utilizados pela indústria farmacêutica e sendo constituídos por lípidos de origem natural são biodegradáveis, biologicamente inactivos e pouco imunogénicos, possuindo uma toxicidade interna baixa (Aqil, Munagala, Jeyabalan & Vadhanam, 2014).

Relativamente às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) seria expectável que uma matriz mais rígida favorecesse uma libertação mais prolongada do composto activo (Battaglia & Gallarate, 2012), contudo o seu *core* interno constituído apenas lípidos sólidos, exige uma homogeneização a alta temperatura originando imperfeições na matriz cristalina lipídica (Wang et al., 2015). Esta imperfeição da matriz é a principal desvantagem deste nano-sistema, provocando uma expulsão precoce do composto activo da matriz lipídica (Iqbal et al., 2012).

Os transportadores nano-estructurados lipídicos (TNL) surgiram para ultrapassar este problema de imperfeição da matriz cristalina das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).

Ao contrário das NLS, os TNL apresentam uma matriz mais desorganizada capaz de incorporar maior quantidade de fármaco, a qual é possível controlar através do estado semi-sólido conforme a quantidade de lípidos líquidos inseridos na sua constituição (Jaiswal et al., 2014) e pela adição de ácidos gordos de diferentes comprimentos de cadeias (Wang et al., 2015).

Os transportadores nano-estruturados lipídicos (TNL) também apresentam a vantagem de terem uma libertação de fármaco bifásica começando com uma expulsão de fármaco inicial, seguida de uma libertação controlada a uma taxa constante (Khan, Baboota & Narang, 2015). Segundo Khan et al (2015), os TNL conseguem também ser facilmente estabilizadas com o mínimo de surfactante e continuarem a apresentar os melhores resultados de estabilidade, encapsulação e libertação de fármaco.

Relativamente aos nano-transportadores à base de polímeros, apesar de os polímeros naturais estarem associados a menor toxicidade, são menos eficazes que os sintéticos (Sionkowska, 2011). Os nanopolímeros sintéticos como o PLGA, são biodegradáveis e biocompatíveis reduzindo o risco de toxicidade no organismo, demonstrando grande potencial na terapia oncológica (Tamman et al., 2015).

As nanopartículas proteicas têm a desvantagem de conterem uma significativa resposta anti-inflamatória e imunogénica e poderem ser contaminadas com agentes patogénicos, como vírus (Amaral & Estanqueiro, 2015). No entanto, a albumina é considerada não tóxica, não imunogénica, biocompatível, biodegradável e metabolizada *in vivo* em compostos inócuos à saúde (Amaral & Estanqueiro, 2015). O seu tempo de semi-vida (19 dias) também promove um melhor perfil farmacocinético do composto activo acoplado tal como uma eficiente libertação do mesmo nos tumores (Amaral & Estanqueiro, 2015). A albumina como tem uma elevada carga de superfície com aminoácidos, promove uma ligação a outros compostos e proteínas permitindo o direcionamento de compostos anti-cancerígenos (Amaral & Estanqueiro, 2015).

#### **1.4 Vias de administração**

A administração tópica tem-se vindo a revelar de grande potencial especialmente para as formulações cosméticas. No entanto, as nanopartículas lipídicas podem ser usadas em qualquer administração parentérica, desde intra-articular a intra-muscular, subcutânea e intravenosa. Pela via intravenosa, o tamanho das nanopartículas é das maiores vantagens, podendo direcioná-las a determinados órgãos. A administração oral é possível desde que o nano-sistema esteja em forma de dispersão aquosa ou que seja convertido a comprimidos, cápsulas ou granulados (Battaglia & Gallarate, 2012). Uma outra via também bastante promissora nos nanotransportadores à base de lípidos, é a via pulmonar apesar de ainda não estar muito bem estudada. As nanopartículas de lípidos

são bem toleradas pelas vias respiratórias inferiores, embora a tolerância após várias administrações ainda é um ponto em avaliação. Outras vias também estão em desenvolvimento para estas nanopartículas, como a via ocular e rectal (Battaglia & Gallarate, 2012). Nomeadamente, os transportadores nano-estruturados lipídicos (TNL) já estão indicados para uso ocular (Iqbal et al., 2012).

### **1.5 Absorção, distribuição, metabolismo e excreção**

O processo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção das nanopartículas vai ser influenciado pelas suas características físico-químicas como o seu tamanho, carga, hidrofobicidade e se são adicionadas à sua superfície moléculas para direccionar ou proteger a nanopartícula (Borel & Sabliov, 2014).

Todas estas características das nanopartículas vão determinar a sua interação com o sistema mononuclear fagocitário e poderão ocasionar ou não a sua interação com proteínas na corrente sanguínea (Borel & Sabliov, 2014).

Segundo Borel e Sabliov (2014) no que diz respeito à absorção as partículas com menos de 100 nm passam mais facilmente a mucosa intestinal, no entanto são preferíveis nanopartículas de 200 nm pois têm uma taxa de difusão três vezes superior sendo o limite para a nanopartícula ser excretada pelo cólon de 500 nm. Após a absorção, nanopartículas hidrofóbicas seguem para o sistema linfático, escapando ao efeito de primeira passagem no fígado, aumentando a concentração do composto activo na corrente sanguínea. No entanto, nanopartículas hidrofóbicas também são reconhecidas pelo sistema mononuclear fagocitário e caso não apresentem um tamanho entre 30-100 nm, são eliminados pela via biliar, pelo que se considera ideal que sejam neutras, sejam hidrofílicas e de dimensão inferior a 100 nm (Borel & Sabliov, 2014) (tabela 4).

Tabela 4 – Características desejáveis das nanopartículas para uma melhor absorção, distribuição e baixa excreção. Adaptado de Borel e Sabliov, (2014).

<b>Características ótimas</b>	
<b>ABSORÇÃO</b>	
Tamanho	< 100 nm
Carga	Neutra
Hidrofobicidade	Hidrofóbica
<b>DISTRIBUIÇÃO</b>	
Tamanho	< 100 nm
Carga	Neutra
Hidrofobicidade	Hidrofílica
<b>EXCREÇÃO</b>	
Tamanho	< 10 nm urina, 2-200 nm bÍlis, > 500 nm fezes
Hidrofobicidade	Ambos são excretados

A distribuição aos órgãos das nanopartículas é maior nos órgãos mais vascularizados como o coração, pulmão, rins, fígado, cérebro (Borel & Sabliov, 2014) e alguns tumores (Elkhodiry et al., 2016).

A metabolização das nanopartículas ainda não é um processo bem conhecido, no entanto as nanopartículas carregadas positivamente são mais propensas a interações que as negativas e neutras (Borel & Sabliov, 2014).

Os macrófagos estão presentes em grandes quantidades na maior parte dos tecidos do organismo, aumentando de número em processos de inflamação, feridas e malignidade (Hume, 2006). De acordo com Cho et al. (2008), as nanopartículas devem ser pequenas o suficiente para escaparem aos macrófagos e para que tal aconteça, também podem ser revestidas com polietiloglicol (PEG) promovendo maior estabilidade, prevenindo a adsorção de proteínas e impedindo a interação com outras partículas e células do sistema imunitário (Wang, Langer & Farokhzad 2011). No entanto, a interação com proteínas não acarreta só desvantagens, sendo possível obter um direcionamento da nanopartícula ao local desejado através de ligações fármaco-proteína, como exemplo tem-se o paclitaxel ligado à albumina (nab-paclitaxel – Abraxane®) na quimioterapia direcionada ao cancro da mama (Zhang, Mei & Feng, 2013).

A excreção das nanopartículas ocorre através do fígado, baço ou cólon, sendo que através dos rins as nanopartículas inferiores a 10 nm e hidrofílicas são mais facilmente excretadas (Borel & Sabliov, 2014). As características desejáveis que uma nanopartícula deve ter são diferentes consoante o sistema de excreção utilizado, uma vez que se forem muito pequenas são excretadas pela urina, se estiverem entre 2-200 nm são excretadas pela biliar e maiores que 500 nm nem sequer são absorvidas, sendo logo excretadas através do cólon (Borel & Sabliov, 2014) (tabela 4).

## 1.6 Mecanismos de direcionamento das nanopartículas

### 1.6.1 Passivo

Com a exceção de tumores hipovasculares (ex.: cancro da próstata e pancreático), o efeito de permeabilidade e retenção (EPR) é observado em praticamente todos os tipos de cancro (Elkhodiry et al., 2016) e é o principal responsável pela acumulação passiva das nanopartículas (Nogueira et al., 2015). O efeito EPR é resultado das características únicas exibidas pela vasculatura dos tumores, i.e., os poros existentes na vasculatura dos tumores apresentam diâmetros muito superiores ( $\geq 100$  nm) aos de uma vasculatura sem anormalidades (5-10 nm), permitindo que as nanopartículas atinjam os tumores de uma forma passiva (Wang et al., 2011). De acordo com Amaral e Estanqueiro (2015), as nanopartículas que circulam na corrente sanguínea são mais facilmente inseridas através dos poros dos vasos do tecido tumoral do que no saudável (figura 10).

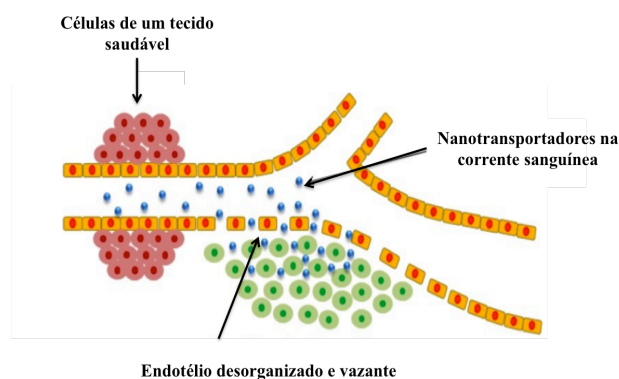


Figura 10 – Ilustração da acumulação passiva de nanopartículas no tecido tumoral devido ao efeito de permeabilidade e retenção (EPR). Adaptado de Amaral e Estanqueiro (2015).

A rápida taxa de crescimento de células cancerígenas exige um grande aporte de oxigénio e nutrientes que, ou é conseguido através da neovascularização ou através do redireccionamento de vasos já existentes, o que leva a que haja uma elevada desorganização e dilatação de vasos com inúmeros poros (Cho et al., 2008). O sistema de drenagem linfático também se encontra comprometido (Cho et al., 2008) devido à compressão que as células tumorais em proliferação exercem, levando muitas vezes ao seu colapso especialmente no centro do tumor (Wang et al., 2011), fazendo com que as nanopartículas e compostos activos que nele penetrem fiquem retidas durante mais tempo (Elkhodiry et al., 2016).

Para além do efeito de permeabilidade e retenção (EPR) o micro-ambiente que rodeia os tumores, como o pH, a temperatura e as enzimas presentes (Yu et al., 2016), têm também o seu papel no direccionamento passivo, pois influenciam a forma como libertam o fármaco nessa região. Uma das propriedades deste micro-ambiente é o pH ácido em que as células cancerígenas se encontram, sendo possível desenhar nanosistemas que sejam sensíveis ao mesmo e que apenas se desintegram em ambientes com um pH abaixo do pH fisiológico (Khodabandahloo, Zahednasab & Hafez, 2016).

O direccionamento passivo depende então, não só das características físico-químicas da partícula e das características do próprio tumor, como também da via de administração (Tammam et al., 2015) e da infiltração de macrófagos (Nogueira et al., 2015).

Na realidade, para além de o efeito passivo variar de tumor para tumor também está restrito a tumores sólidos (Nogueira et al., 2015) sendo imprevisível e pouco eficaz em tumores como a leucemia (Markman, Rekechenetskiy, Holler & Ljubimova, 2013). Sabe-se que mais de 95% das nanopartículas quando administradas por via intravenosa através da estratégia de direccionamento passiva, falham a chegada ao tumor (Yu et al., 2016).

### 1.6.2 Activo

No direccionamento activo, à superfície das nanopartículas são adicionados certos ligandos que as fazem interagir com determinado alvo ou receptor, acumulando o composto intracelularmente através de endocitose mediada por receptor (Nogueira et al., 2015). Os ligandos podem ser proteínas, como anticorpos ou fragmentos de

anticorpos, podem ser péptidos ou ácidos nucleicos, ou até mesmo vitaminas (Tammam et al., 2015).

A adição de ligandos é útil na medida em que reduz a probabilidade de destruição da nanopartícula por parte das enzimas (Yu et al., 2016) e por outro lado, uma das características que distingue as células normais das tumorais é que estas últimas frequentemente sobre-expressam certos receptores na sua membrana (Elkhodiry et al., 2016), no entanto as células saudáveis também expressam esses receptores e estão em maior quantidade no organismo (Yu et al., 2016). Para evitar que as células saudáveis sejam afectadas, pode-se recorrer à adição de múltiplos ligandos ou de diferentes tipos de ligandos (Yu et al., 2016). Não obstante, a quantidade de ligandos que são adicionados deve ser tida em conta, pois vários ligandos com cargas diferentes podem aumentar a afinidade para o receptor, mas também podem criar uma intoxicação de nanopartículas conforme a capacidade dos receptores (Yu et al., 2016).

A escolha do ligando a ser usado depende das características do receptor que está expresso na célula cancerígena, da afinidade do ligando e se o ligando também é introduzido juntamente com o composto activo na célula tumoral (Elkhodiry et al., 2016).

Os anticorpos são os ligandos mais estudados devido à sua alta especificidade, no entanto são difíceis de conjugar, caros e apresentam um curto tempo de circulação (Yu et al., 2016). Segundo Nogueira et al., (2015) pequenas moléculas também podem ser usadas como ligandos, nomeadamente o ácido fólico para os receptores de folato. Atualmente existem várias estratégias de direccionamento activo que estão a ser estudadas, pois existem diversos tipos de tumores e diferentes graus de malignidade, no entanto o objectivo é comum a todas: atingir um receptor que esteja sobre-expresso e seja distinto dos que se encontram em células normais, e que seja de fácil acesso (Elkhodiry et al., 2016). Segundo estes autores, as estratégias de direccionamento mais comuns são as que estão relacionadas com a divisão celular não controlada dos tumores, com a angiogénese e com os receptores específicos tumorais.

A tecnologia nab é um exemplo de direccionamento activo bastante eficaz no transporte de paclitaxel à células tumorais, uma vez que a albumina se liga a uma glicoproteína presente na superfície das células do endotélio dos vasos sanguíneos tumorais, a glicoproteína gp60 (Desai, 2008; Blair & Deeks, 2015). Esta ligação dá-se com uma alta afinidade à albumina por estar ao tamanho da nano-escala (Desai, 2008). Após esta ligação, a transcitose da ligação albumina-paclitaxel, dá-se através da

associação da gp60 com umas estruturas membranares denominadas de cavéolas que formam uma vesícula e transportam tanto a ligação gp60 como a ligação albumina-paclitaxel através da célula, libertando o conteúdo

## 2. Fitoquímicos na Terapia Oncológica

### 2.1 Utilização de fitoquímicos na terapia oncológica

A nível mundial, mais de 50% dos fármacos em uso clínico tiveram origem em compostos extraídos de plantas, no entanto poucos fitoquímicos chegaram à fase de comercialização inalterados (Chinembiri et al., 2014).

Com o avançar e refinamento de novas tecnologias biotecnológicas na produção de metabolitos secundários de plantas, a síntese combinatória e o screening biológico automatizado (“High Throughput Screening”), é expectável que novos compostos naturais de plantas medicinais, sejam identificados e desenvolvidos como fármacos seguros e eficazes na quimioprevenção e no tratamento oncológico (Bishayee & Gautam, 2016).

Na terapia oncológica os alcalóides vincristina e vimblastina e vinorelbina, extraídos da Perivincina de Madagáscar (*Catharantus roseus* (L. G. Don), sinonímia *Vinca rosea* L.) foram os primeiros fitoquímicos a ser usados clinicamente. Posteriormente começaram a ser usados para vários tipos de cancro os derivados da podofilotoxina (etopósido e tenipósido), os taxanos (paclitaxel e docetaxel) do ritidoma do tronco do teixo e as campotecinas (irinotecano e topotecano) isoladas do tronco da árvore *Camptotheca acuminata* Decne. (Chinembiri et al., 2014). De acordo com as guidelines da ESMO (European Society for Medical Oncology), os fitoquímicos que estão maioritariamente em uso clínico actualmente, como agentes quimioterapêuticos, são o paclitaxel, o docetaxel, a vincristina, o etopósido e o irinotecano (ESMO, 2016).

De acordo com Greenwell e Rahman (2015), a pomiferina uma isoflavona isolada da *Maclura pomifera*, o fosfato de combrestatatina derivado da *Combretum caffrum* e a epigalocatequina-3-galato (EGCG) isolada da *Camelia sinensis*, são alguns dos fitoquímicos que se encontram em desenvolvimento sendo conhecidos pelos seus efeitos apoptóticos, anti-angiogénicos e anti-oxidantes, respectivamente. O sulforafano, um isotiocianato derivado de crucíferas encontra-se em ensaios clínicos tal como o paclitaxel isolado da *Taxus brevifolia* e alcalóides da vinca como a vincristina, vimblastina, vinorelbina e vindesina (tabela 5).

Tabela 5 - Fitoquímicos em ensaios clínicos e em desenvolvimento na terapia oncológica. Adaptado de Greenwell & Rahman, (2015).

Composto activo	Isolado/Derivado de	Investigação e desenvolvimento clínico
<b>Sulforafano</b>	Isotiocianato em vegetais crucíferos <i>Brassica</i>	Em ensaios clínicos com administração oral de uma preparação de crucíferos vegetais com sulforafano
<b>Paclitaxel</b>	Taxano; <i>Taxus brevifolia</i> (L.)	Em uso clínico; Ensaios clínicos de fase II-III; tratamentos em fases precoces; cancro das células não pequenas do pulmão, cancro da mama, cancro do ovário, sarcoma de Kaposi. Investigação e desenvolvimento em administração alternativa através de nanopartículas, naococleados e nanoliposomas
<b>Vincristina</b>	Alcalóides da vinca; <i>Catharanthus roseus</i> (L.)	Anti-mitóticos; interfere nos microtúbulos; liga-se à $\beta$ -tubulina; propriedades pró-apoptóticas; atividade anti-tumoral
<b>Vimblastina</b>		
<b>Vinorelbina</b>		
<b>Vindesina</b>		
<b>Pomiferina</b>	Isoflavona; <i>Maclura pomifera</i> (Raf.)	Efeitos pró-apoptóticos; fragmentação do DNA; anti-oxidante; inibe a histona-deacetilase; citotóxico em células cancerígenas
<b>Fosfato de combretastatina A4</b>	Análogo solúvel em água da combretastatina; <i>Combretum cafferum</i> (Eckl. & Zeyh.)	Anti-angiogénica; necrose tumoral
<b>Epigallocatequina-3-galato (EGCG)</b>	Catequina; <i>Camelia sinensis</i> (L.)	Anti-oxidante; anti-proliferativo; inibe quinases específicas; inibe a carcinogénese quimicamente induzida ou por UV

Para além dos compostos que se encontram em uso clínico e em desenvolvimento referidos por Greenwell e Rahman (2015), existem outros fitoquímicos que estão em desenvolvimento para a terapia oncológica como a colchicina, isolada da *Colchicum autumnale* L., que apresenta atividade anti-mitótica. No entanto, ainda não foi aplicada clinicamente em oncologia devido à sua toxicidade (Brandão & David, 2010).

Outro metabolito alvo é a emodina, uma antraquinona isolada do ruibarbo (*Rheum palmatum* L.) que tem sido estudada devido às suas capacidades de inibição de proliferação celular e prevenção de metástases através da inibição de enzimas envolvidas no ciclo celular e diferenciação (Brandão & David, 2010).

Vários fitoquímicos com atividade anti-angiogénica (redução dos vasos tumorais) também têm sido estudados como é caso do artesunato (Brandão & David, 2010). O artesunato é um derivado semi-sintético da planta medicinal *Artemisia annua* L. (Asteraceae), a qual já é conhecida pelas suas propriedades anti-maláricas.

Por outro lado o papel dos fitoquímicos quimioprotectores da tumorigénese presentes na alimentação é um tema de grande interesse e actualidade na medida em que se tem entendido que pode haver benefício em ingerirmos determinados alimentos de origem vegetal, em determinadas quantidades, de forma a que haja uma possível prevenção do cancro e outras doenças crónicas, como o limoneno um terpenóide encontrado nos citrinos que poderá ter potencial anti-cancerígeno através da regulação da proliferação celular (Krzyzanowska, Czubacka & Oleszek, 2010) (tabela 6).

Tabela 6 - Exemplos de fontes de alimentos que contêm compostos activos com potencial anti-cancerígeno. Adaptado de Krzyzanowska, Czubacka & Oleszek, (2010)

Composto activo	Fonte alimentícia	Potencial benefício na saúde	Possível Mecanismo e Função
<b>Catequinas</b> (epigallocatequina e epigallocatequina-3-galato) (EGC e EGCG)	Chá verde, uvas/vinho	Redução do cancro e doenças coronárias	Inibe a iniciação, promoção e progressão do cancro, anti-oxidante
<b>Isoflavonas</b> (genisteína)	Rebentos de soja, alho, lentilhas, farelo de trigo	Prevenção de sintomas da menopausa, osteoporose e redução do cancro da mama e próstata	Inibição do crescimento de linhas celulares tumorais humanas de cancro da mama, redução do colesterol, estimulação da absorção de cálcio
<b>Flavonas e Flavonóis</b> (quercetina, canferol, rutina, antocianidinas)	Maçãs, cebola, chá, sumo de uva e de laranja, bróculos, couve	Redução do cancro e doenças coronárias	Remoção de espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio, anti-oxidantes
<b>Terpenóides</b> (limoneno)	Citrinos	Anti-cancerígeno	Regulação da proliferação de células malignas
<b>Stilbenos</b> (resveratrol)	Vinho tinto, mandioca	Redução do cancro e de doenças coronárias, estimulação da apoptose	Anti-oxidante e remoção de radicais livres

A epigallocatequina-3-galato (EGCG) é um importante fitoquímico associado ao consumo de chá verde, estando já demonstrada, *in vitro* e *in vivo*, a sua actividade contra várias linhagens celulares de cancro, nomeadamente no cancro da mama, cancro colorectal, cancro esofágico, cancro gástrico, cancro pulmonar e cancro da cabeça (Yang et al., 2013) (tabela 6). *In vivo* a EGCG consegue suprimir o crescimento de tumores humanos em modelos xenográficos, reduzir o volume e tamanho dos tumores, inibir a angiogénese tumoral e aumentar a apoptose de células cancerígenas. Os

resultados dos ensaios *in vivo* demonstraram que a EGCG pode ser utilizado como fármaco anti-cancerígeno (Yang et al., 2013), no entanto a sua estabilidade e biodisponibilidade no organismo é baixa, sendo necessário doses muito elevadas para exercer a sua acção (de Pace *et al.*, 2013).

## **2.2 Modo de acção**

Os agentes com atividade anti-cancerígena são agrupados conforme a fase em que atuam no desenvolvimento do cancro (Brandão & David, 2010) podendo ser designados como quimiopreventores ou quimioterapêuticos (Bathaie, Faridi, Nasimian, Heidarzadeh & Tamanoi, 2015).

O processo carcinogénico divide-se em três fases: iniciação, promoção e progressão (Bathaie et al., 2015). Na fase de iniciação há uma exposição do organismo a determinado carcinogénio onde ocorrem vários eventos intracelulares e extracelulares. Nesta fase pode ocorrer a activação metabólica e interacção de espécies reactivas de oxigénio (“reactive oxygen species”) com o ADN (Bathaie et al., 2015).

Na fase de promoção ocorre a proliferação de células pré-neoplásicas onde o processo ainda é reversível (Bathaie et al., 2015). Por outro lado, a fase de progressão é definida como a transformação de células pré-neoplásicas em neoplásicas onde ocorre o crescimento da massa tumoral com possibilidade de invasão e metástases em outros locais do organismo (Bathaie et al., 2015).

Na quimioprevenção existe uma interrupção ou atraso nas vias e processos que estão na origem do desenvolvimento do cancro (Landis-piwowar & Iyer, 2014) enquanto que na quimioterapia os fitoquímicos já actuam após instalação da doença (Brandão & David, 2010). De acordo com Brandão e David (2010), os fitoquímicos podem ser divididos em dois grupos, os fármacos bloqueadores que inibem a iniciação do processo carcinogénico e os fármacos supressores que inibem a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do cancro, sendo estes os mais estudados para o desenvolvimento de novos fármacos.

Como exemplo de fitoquímicos bloqueadores, referem-se os flavanóis incluindo a epigallocatequina-3-galato (EGCG) e os produtos derivados dos glucosinolatos, dos quais fazem parte os isotiocianatos, que conseguem induzir a apoptose celular (Johnson & Johnson, 2012).

Nos fármacos supressores insere-se por exemplo o resveratrol, o limoneno, a genisteína, a curcumina e a quercetina. A curcumina é um pigmento amarelo, do rizoma do açafrão (*Curcuma longa* L. ), que apresenta actividade anti-inflamatória, anti-oxidante e quimiopreventora (Krzyzanowska et al., 2010), suprimindo a transcrição de genes envolvidos na regulação da inflamação, proliferação, diferenciação e apoptose (Johnson & Johnson, 2012).

A quercetina e a EGCG têm acção directa na inibição da mitose através da regulação de vias de sinalização (Johnson & Johnson, 2012). O resveratrol é valorizado pelas suas actividades anti-oxidantes e pela sua capacidade de bloquear a formação de espécies reactivas de oxigénio e é o fitoquímico que melhor representa os hidrocarbonetos aromáticos estilbenos, tendo sido descoberto em 1940, como um composto presente nas raízes de plantas *Veratrum grandiflorum* L. e identificado mais tarde em 1963 na *Polygonum cuspidatum* (Krzyzanowska et al., 2010).

A genisteína é um fito-estrogénio pertencente ao grupo das isoflavonas, ligando-se maioritariamente aos receptores de estrogénio  $\beta$  humanos estando por isso muito associada à protecção do cancro da próstata e da mama (Krzyzanowska et al., 2010). Os fitoquímicos quimioterapêuticos podem ser inseridos em diferentes grupos conforme o seu modo de acção, podendo actuar através de vários mecanismos, nomeadamente através da inibição de enzimas, através da ligação a microtúbulos, por alterações epigenéticas e modificação da cromatina e, através da inibição da angiogénese (Bathaie et al., 2015).

### 2.2.1 Inibição de enzimas

Os fitoquímicos inibidores de enzimas podem agir sobre as topoisomerases I (TOP1) e II (TOP2) (Brandão & David, 2010) ou sobre as telomerasas (Bathaie et al., 2015), danificando o ADN. A acção sobre a TOP1 promove a quebra de umas das cadeias de ADN e a torção da cadeia intacta sobre a quebrada, reduzindo a tensão torcional da molécula (Brandão & David, 2010) ao contrário da TOP2 que promove a quebra das duas cadeias de ADN. Os fitoquímicos ao inibirem estas enzimas, fazem com que não haja uma religação do ADN durante um certo período de tempo, levando a célula à apoptose (Brandão & David, 2010).

Entre os fitoquímicos inibidores de enzimas encontram-se os derivados da camptotecina, um alcalóide extraído da *Camptotheca acuminata* Decne., irinotecano e

topotecano, inibidores da TOP1. Encontram-se também inseridos neste grupo o tenipósido e o etopósido, derivados semi-sintéticos da podofilotoxina, como inibidores da topoisomerase II (TOP2), desenvolvidos, em 1970, pela Sandoz com o intuito de diminuir o efeito tóxico gastro-intestinal da podofilotoxina (Brandão & David, 2010). O etopósido e tenopósido são fitoquímicos que inibem a TOP2, causando a morte celular por paragem do ciclo celular nas fases tardias S-G2 da mitose (Kamal et al., 2015).

A telomerase actua como uma transcriptase reversa, adicionando sequências específicas e repetitivas de DNA na extremidade 3' dos cromossomas, denominadas de telómeros (Bathaie et al., 2015). Os inibidores destas enzimas como a EGCG e as campotecinas, fazem com que haja uma anormalidade no tamanho destas extremidades cromossomais induzindo a célula à apoptose (Bathaie et al., 2015).

Compostos derivados da dieta diária como a curcumina, a genisteína, o resveratrol e as catequinas do chá-verde são capazes de inibir as enzimas ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e as enzimas lipo-oxigenases, envolvidas na activação de processos pró-inflamatórios, nomeadamente a COX-2 está expressa em praticamente todas as células pré-malignas e malignas, como o cólon, fígado, pâncreas, mama, pulmão, bexiga, pele, estômago, cabeça e pescoço (Kwon et al., 2007).

### 2.2.2 Ligação aos microtúbulos

A ligação aos microtúbulos é muito importante na terapia oncológica, sendo estes o elemento principal do cito-esqueleto e essenciais nas células eucarióticas pois estão envolvidos no transporte de componentes, na forma e desenvolvimento da célula, na sinalização celular e no processo de mitose (Brandão & David, 2010). Os fitoquímicos que interferem nos microtúbulos são numerosos incluindo-se o tenipósido e o etopósido, e os alcalóides da vinca, vincristina e vimblastina. O Paclitaxel é um outro exemplo de fitoquímico com atividade anti-mitótica (Brandão & David, 2010). Apesar de todos os agentes anti-mitóticos interromperem o processo de mitose, eles podem ser divididos em dois grupos: os que estabilizam os microtúbulos inibindo a despolimerização e os que destabilizam os microtúbulos, inibindo a polimerização (Brandão & David). O Paclitaxel é um exemplo de estabilizador e as colchicinas um exemplo de destabilizadores (Bathaie et al., 2015).

Os isotiocianatos (ITC) são capazes de interferir no ciclo celular através da ligação aos microtúbulos (Overby, Baevre, Thangstad & Bones, 2015). A actividade

anti-tumoral dos ITC, nomeadamente do benzil-isotiocianato (BITC), foi verificada em 1995, através de ensaios *in vitro*, que demonstram a sua citotoxicidade, em concentrações micromolares, para várias linhagens tumorais humanas (ovário, pulmão, leucemia) e uma baixa toxicidade em ratos (Pintão, Pais, Coley, Kelland & Judson, 1995).

### 2.2.3 Alterações epigenéticas e condensação da cromatina

A metilação do DNA é a alteração epigenética mais descrita, compreendendo mais de 600 genes relacionados com o cancro. Como exemplos de inibidores da metilação de DNA tem-se a curcumina, a EGCG, o sulforafano e resveratrol (Landis-piwowar & Iyer, 2014).

Relativamente aos inibidores das histona-deacetilases (iHDAC), estes levam à condensação da cromatina de ADN, não havendo possibilidade de transcrição de genes, neste modo de acção estão inseridos isotiocianatos, como o sulforafano, e a pomiferina, uma isoflavona (Amin et al., 2009).

### 2.2.4 Inibição da angiogénese

Entre os compostos de origem vegetal que têm demonstrado capacidade de inibir a angiogénese, a EGCG está em fase de avaliação clínica (Amin et al., 2009) e a curcumina demonstrou *in vivo* reduzir a incidência de vasos à volta do tumor (Rajan, Mukerjee, Helson, Gupta & Vishwanatha, 2013). A angiogénese é um processo decorrente na progressão dos tumores quando estes têm falta de aporte de oxigénio e nutrientes, dando origem à expressão de factores de crescimento endoteliais vasculares por parte das células cancerígenas, os quais são inibidos pelos fitoquímicos com actividade anti-angiogénica (Bathaie et al., 2015).

### 2.2.5 Toxicidade

Os fitoquímicos anti-mitóticos são compostos muito usados e eficazes em quimioterapia, no entanto, estes fitoquímicos para além de poderem apresentar toxicidade para as células saudáveis, também têm vindo a desenvolver problemas de resistência múltipla no cancro, principalmente os taxanos e os alcalóides da vinca o que

acarreta entraves ao desenvolvimento destes compostos na terapia oncológica (Van Vuurem, Visagie, Theron & Joubert, 2015).

A neuropatia periférica induzida pela quimioterapia é o efeito adverso mais indesejável dos fitoquímicos com acção nos microtúbulos, tendo sido maioritariamente reportada nos tratamentos com compostos à base de platina, nos taxanos e nos alcalóides da vinca (De Iuliis, Taglieri, Salerno, Lanza & Scarpa 2015).

## **2.3 Fitoquímicos com actividade anti-cancerígena**

### 2.3.1 Paclitaxel e Docetaxel

O Paclitaxel um diterpeno da família *Taxaceae* isolado do ritidoma do caule da *Taxus brevifolia* L. e é um dos agentes mais eficazes e muito usado no cancro do pulmão, ovário e mama (Ma & J. Mumper, 2013). No entanto, quando descoberto apresentou uma grande limitação de *scale-up* que levou à produção de um composto semi-sintético derivado da *Taxus baccata* mais potente que o paclitaxel, o docetaxel (Brandão & David, 2010). Para ultrapassar as limitações de fornecimento em sido produzido biotecnologicamente em culturas de células em suspensão de *Taxus baccata* L..

#### 2.3.1.1 Indicação terapêutica e eficácia

O paclitaxel comercializado sob a designação de Taxol®, de acordo com o Resumo das Características do Medicamento (RCM), está aprovado como agente anti-cancerígeno no tratamento de pacientes com cancro do ovário, cancro da mama, cancro de não-pequenas células do pulmão (CNPCP) e no sarcoma de kaposi (INFARMED, 2016). O docetaxel, de acordo com a Agência Europeia do Medicamento (EMA) está indicado no cancro da mama, no cancro de pequenas células do pulmão, no cancro da próstata, no cancro gástrico e nos cancros da cabeça e pescoço (EMA, 2016).

A citotoxicidade do paclitaxel foi estudada *in vitro* em várias linhagens cancerígenas humanas (mama, pulmão, cervical, cólon, ovário, pâncreas e astrocitomas), apresentando um IC<sub>50</sub> médio entre 2,5 e 7,5 nM em 24h de exposição (Liebman et al., 1993). Neste estudo verificou-se também que a citotoxicidade aumentava com o tempo de exposição, elevando-se 5-200 vezes quando aplicados

tempos de exposição até 72h, o que indica que é mais eficaz com maiores tempos de exposição ao tumor (Liebman et al., 1993).

Recentemente foi feita uma análise de revisão sistemática realizada pela base Cochrane Library, no carcinoma metastático da mama, com o intuito de avaliar o benefício da inclusão de taxanos (paclitaxel e docetaxel) na terapia deste cancro. Esta meta-análise revelou que os regimes que continham taxanos apresentaram uma resposta de sobrevida global e tempo de progressão mais favorável que os regimes que não continham estes fitoquímicos (regimes com ciclofosfamida, 5-fluoracilo (5-FU), ciclofosfamida, capecitabina, entre outros) (Gherzi et al., 2015).

O paclitaxel apesar de apenas estar indicado em algumas patologias de acordo com o RCM, também tem sido estudado em outros cancros de forma a avaliar a sua eficácia nomeadamente, no carcinoma do pâncreas (Lemstrova, Melichar & Mohelnikova-Duchonova, 2016) (tabela 7) e no carcinoma metastático urotelial (Necchi et al., 2016).

O paclitaxel em monoterapia no cancro do pâncreas evidenciou pouca actividade anti-tumoral, tanto em primeira-linha como em doentes que não responderam à gencitabina. No entanto, quando associado ao 5-fluorouracilo (5-FU) foi considerado um regime de segunda-linha eficaz para este tipo de cancro com um baixo perfil de toxicidade (Lemstrova et al., 2016). O docetaxel em associação com a gencitabina também foi estudado no cancro do pâncreas e obteve resultados positivos, com uma sobrevida global (SG) de 14.5 meses e uma taxa de resposta objectiva (TRO) de 38% (Lemstrova et al., 2016) (tabela 7).

Tabela 7 - Ensaios clínicos de eficácia com o paclitaxel no cancro pancreático. Adaptado de Lemstrova et al., (2016)

Terapêutica	Modelo	Número da amostra	Tumor	Objectivo	Resultados	
					SG	TRO
<b>Paclitaxel + 5-FU</b>	Ensaio clínico fase II	28 pacientes	Cancro do pâncreas	Eficácia em 2ª linha	7.6 meses	10%
<b>Paclitaxel</b>	Ensaio Clínico fase II	39 pacientes	Cancro do pâncreas	Eficácia em 1ª linha	5.0 meses	8%
<b>Docetaxel + gencitabina +capecitabina</b>	Ensaio clínico fase II	44 pacientes	Cancro do pâncreas	Eficácia em 1a linha	14.5 meses	38%

SG (Sobrevida Global); TRO (Taxa de Resposta Objectiva)

O paclitaxel demonstrou também ser uma boa opção no cancro metastático urotelial, em associação à gencitabina, quando os doentes não podem fazer regimes à base de platina (Necchi et al., 2016), apresentando uma sobrevida global de 13,2 meses, em associação com a gencitabina, comparativamente a uma sobrevida global de 10 meses na terapia de primeira-linha usual neste cancro (carboplatina e gencitabina) (Necchi et al., 2016).

### 2.3.1.2 Toxicidade

Os taxanos estão associados a alguns efeitos adversos como a mielosupressão e neuropatia periférica (Van Vuurem et al., 2015) afectando esta última mais de 80% dos pacientes com cancro da mama (De Iuliis et al., 2015), é portanto necessária a investigação de novas estratégias neste âmbito. De acordo com Amaral e Estanqueiro (2015) os principais efeitos adversos referentes ao paclitaxel são reacções de hipersensibilidade aguda e neurotoxicidade. De acordo com Blair & Deeks (2015) a formulação comercializada de paclitaxel (Taxol®) contém um solvente tóxico conhecido como cremophor-EL que causa essas reacções de hipersensibilidade aguda, sendo esta uma grande desvantagem na sua administração.

Numa meta-análise feita a vários ensaios clínicos no cancro da mama, os regimes terapêuticos que continham taxanos revelaram um risco mais elevado associado a neurotoxicidade e alopecia (grau 3 e 4), mas menos risco associado a náuseas e vómitos (grau 3 e 4) que os regimes que não continham taxanos (Ghersi et al., 2015) (tabela 8).

Tabela 8 - Síntese de efeitos adversos associados aos regimes com taxanos e sem taxanos

Tumor	Efeitos adversos associados		Estudo
	Regime com taxanos	Regime sem taxanos	
Cancro da mama	Neurotoxicidade 7,35%	Neurotoxicidade 4,84%	Gherzi et al., (2015)
	Alopécia 3,87%	Alopécia 2,37%	
Cancro metastático urotelial	Anemia 8,7%	Anemia 25,5%	Necchi et al., (2016)
	Neutropénia 40,0%	Neutropénia 47,2%	
	Trombocitopénia 5,3%	Trombocitopénia 28,0%	
	Neurotoxicidade 8,3%	Neurotoxicidade 0%	
	Febre neutropénica 9,4%	Febre neutropénica 4,3%	
Cancro metastático pancreático	<b>Paclitaxel</b>		Lemstrova et al., (2016)
	Anemia 97%, 95% leucopénia, 85% mal-estar/fadiga, 74% alopecia, 74% náuseas/vômitos, 56% neurotoxicidade		

No cancro metastático urotelial os regimes de paclitaxel e docetaxel, em associação com a gencitabina, revelaram um maior grau e percentagem de neurotoxicidade (8,3%). No entanto, a frequência de efeitos adversos hematológicos (anemia 25,5%, trombocitopénia 47,2%) foi maior no grupo gencitabina/carboplatina (Necchi et al., 2016) (tabela 8).

No ensaio clínico referente ao carcinoma metastático do pâncreas, o paclitaxel em monoterapia revelou uma maior toxicidade comparativamente ao seu uso em associação com gencitabina (Lemstrova et al., 2016) (tabela 9). O aumento da dose de paclitaxel neste ensaio não revelou benefício clínico e aumentou a toxicidade (175 mg/m<sup>2</sup> semanal para 250 mg/m<sup>2</sup> semanal) (Lemstrova et al., 2016).

### 2.3.2 Vincristina

A vincristina (VCR) e a vimblastina (VLB), alcalóides da Vinca (*Catharanthus roseus* L.) foram os primeiros agentes a serem usados clinicamente (Cragg & Newman, 2005).

### 2.3.2.1 Indicação terapêutica e eficácia

A vincristina (VCR) está em uso clínico, como agente anti-cancerígeno, há aproximadamente 50 anos, sendo um componente “standard” em todos os regimes quimioterapêuticos no tratamento da leucemia linfoblástica aguda e em outros linfomas malignos (Douer, 2016). Para além das leucemias e linfomas está também indicada, em associação com outros agentes anti-neoplásicos, no tumor de Wilms, em sarcomas, no cancro da mama, cérebro e pulmão (INFARMED, 2016). A vimblastina é usada nos linfomas Hodgkin e não-Hodgkin e também no carcinoma metastático testicular em associação com outros agentes quimioterapêuticos (INFARMED, 2016).

Um estudo *in vitro* referente à vincristina e vimblastina revelou que a vincristina é mais citotóxica para exposições curtas (1h - 4h), no entanto em exposição contínua de 24h os dois fitoquímicos são igualmente citotóxicos. O IC<sub>50</sub> obtido com uma exposição de 24h de linhagens celulares cancerígenas de ratos de linfoma, de neuroblastoma e de leucemia, a vincristina apresentou citotoxicidade, na gama dos 1,4-33 nM, revelando maior acção nas células de leucemia e menor para as de neuroblastoma. A vimblastina apresentou citotoxicidade entre 2,6 e 15 nM com maior acção nas células de linfoma. Na exposição de 24h houve apenas uma diferença significativa nas células de neuroblastoma onde a vimblastina é duas vezes mais citotóxica que a vincristina (15 nM e 33 nM, respectivamente) (Ferguson, Phillips, Seiner & Cass, 1984).

De acordo com as guidelines da ESMO, a vincristina faz parte dos dois tratamentos base da leucemia linfoblástica aguda (LLA), sendo eles o regime aumentado BFM (Berlim-Frankfurt-Munique) utilizados essencialmente na pediatria e o regime hiper-CVAD (regime hiperfraccionado de ciclofosfamida/vincristina/doxorubicina/dexametasona) usado maioritariamente nos adultos com LLA (ESMO, 2016).

Rytting et al. (2016) num ensaio de fase III (tabela 9) demonstrou que ambos os regimes (hiper-CVAD e regime aumentado BFM) são eficazes na terapêutica da LLA em jovens adolescentes e adultos, revelando uma taxa de sobrevivência global ao fim de cinco anos de 60%.

Tabela 9 - Ensaios clínicos de eficácia de regimes com a vincristina e vimblastina em gliomas de baixo

Terapêutica	Modelo	Número da amostra	Tumor	Resultados		Referência
				hiper-CVAD	ABMF	
<b>Vincristina em regime hyper-CVAD e ABFM</b>	Ensaio clínico fase III	208 pacientes	Leucemia Linfoblástica aguda	<b>SG 60%</b>	<b>SG 60%</b>	Rytting et al., 2016
				<b>PVC+RT</b>	<b>RT</b>	
<b>RT com ou sem Vincristina em regime PVC</b>	Ensaio clínico fase III	368 pacientes	Glioma grau III	<b>SG 42,3 meses</b>	<b>SG 30,6 meses</b>	Van den Bent et al., 2013
<b>Vincristina em regime PVC</b>	Ensaio clínico fase II	28 pacientes	Glioma de baixo grau	<b>TRO 29%</b>		Buckner et al., 2003
<b>Vimblastina</b>	Ensaio clínico fase II	51 pacientes	Glioma de baixo grau	<b>TRO 93,2 %</b>		Bouffet et al., 2012

SG (sobrevida global); TRO (Taxa de Resposta Objectiva); RT (radioterapia); PVC (procarbazona/lomustina/vincristina); ABMF (regime aumentado de Berlim-Frankfurt-Muniquê)

A vincristina também está inserida nas guidelines da ESMO associada ao regime PCV (procarbazona/lomustina/vincristina) na quimioterapia de oligodendrogliomas (tumor cerebral grau III) e gliomas de baixo grau (tumores cerebrais grau I/II) (ESMO, 2016), o qual demonstrou através de ensaios clínicos de fase II e III (Van den Bent et al., 2013; Cairncross et al., 2013; Buckner et al., 2003) aumentar a taxa de sobrevivência global dos pacientes (Van Den Bent et al., 2016) (tabela 9). Buckner et al. (2003) demonstrou pela primeira vez que a quimioterapia com PVC tem eficácia anti-tumoral em gliomas de baixo grau. Bouffet et al. (2012) demonstrou também a eficácia da vimblastina em gliomas de baixo grau, apresentando uma taxa de resposta objectiva de 93,2%.

### 2.3.2.2 Toxicidade

O problema referente ao uso da vincristina advém dos seus efeitos neurotóxicos periféricos impedindo o seu uso em doses elevadas. Esta neurotoxicidade surge da

elevada afinidade que a vincristina (VCR) tem tanto para os microtúbulos mitóticos como para os neuronais (Douer, 2016).

A dose habitual de VCR é normalmente de 1,4 mg/m<sup>2</sup>, sendo limitada às 2 mg. Contudo, limitá-la a este valor implica que todos os pacientes com uma área de superfície corporal maior que 1,42 m<sup>2</sup> (praticamente todos os adultos e algumas crianças) recebam uma dose sub-ótima deste fitoquímico (Douer, 2016).

Krick et al. (2013) verificaram, *in vivo* em gatos, que a vincristina e vimblastina em regime CHOP (ciclofosfamida/doxorubicina/vincristina/prednisona) são igualmente eficazes na inibição tumoral de linfomas, no entanto a vimblastina revelou menor toxicidade gastro-intestinal (Krick et al., 2013) (tabela 10).

Tabela 10 - Síntese de efeitos adversos associados aos regimes híper-CVAD, regime ABFM, regime PVC, à vincristina e à vimblastina

Tumor	Efeitos adversos associados		Estudo
	híper-CVAD	ABFM	
<b>Leucemia linfoblástica aguda (LLA)</b>	Mielosupressão 6%	Hepatotoxicidade 41% Pancreatite 11% Osteonecrose 9%	Rytting et al., (2016)
	<b>Regime PVC</b>		
<b>Glioma grau III</b>	Leucopénia (grau 3 e 4) 75%, mielosupressão e Trombocitopénia 64%		Buckner et al., (2003)
	<b>Vimblastina</b>		
<b>Glioma baixo grau</b>	Neutropénia (grau 4) 47%		Bouffét et al., 2012
	<b>Vincristina</b>	<b>Vimblastina</b>	
<b>Linfoma em gatos</b>	Toxicidade gastro-intestinal 44.4%	Toxicidade gastro-intestinal 10.5%	Krick et al., (2013)

híper-CVAD (regime híperfraccionado de ciclofosfamida/vincristina/doxorubicina/dexametasona); PVC (procarbazina/lomustina/vincristina)

No estudo de Rytting et al. (2016) relativo à leucemia linfoblástica aguda, o regime aumentado de Berlim-Frankfurt-Munique revelou efeitos adversos associados a hepatotoxicidade, pancreatite e osteonecrose enquanto que o regime hyper – CVAD mostrou uma maior relação com a mielosupressão (tabela 10). Adicionalmente, o estudo de Buckner et al. (2003) demonstrou uma leucopenia elevada relacionada com o regime PVC (procarbazina – vincristina - lomustina) no tratamento de gliomas de baixo grau, que se acredita estar relacionado com a acumulação de uma mielosupressão relacionada com este mesmo regime (Buckner et al., 2003) (tabela 10).

A toxicidade descrita para a vimblastina, em monoterapia em gliomas de baixo grau, foi maioritariamente hematológica, apresentando como principal efeito adverso a neutropenia (Bouffet et al., 2012) (tabela 10).

### 2.3.3 Etopósido

A planta *Podophyllum peltatum* L. e a *Podophyllum emodii* Wallich conhecidas vulgarmente como podófilo, têm um longo historial medicinal nomeadamente no tratamento do cancro da pele e nas verrugas. Devido à toxicidade da podofilotoxina (PPT), foram desenvolvidas novas formas semi-sintéticas da mesma, como o etopósido (Kamal et al., 2015).

#### 2.3.3.1 Indicação terapêutica e eficácia

O etopósido está atualmente em uso clínico e de acordo com o seu RCM, é indicado no cancro testicular não seminomatoso e no cancro de pequenas células do pulmão (CPCP) em associação com outros agentes quimioterapêuticos, e também na leucemia monocítica aguda e na leucemia mielomonocítica (INFARMED, 2016).

Panigraphy et al. (2010) comprovou a eficácia do etopósido na indução da apoptose em diferentes cancros por interferência nos microtúbulos, inibindo o crescimento e a angiogénese tumoral (tabela 11).

Tabela 11 - Ensaio *in vivo* de avaliação de eficácia anti-tumoral do etoposido

Composto	Modelo	Tumor	Regime	Inibição tumoral	Referência
Etoposido	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos em modelo xenográfico	Células de LLC	40 mg/Kg/dia p.o.	29%	Panigraphy et al., (2010)
			80 mg/Kg/dia p.o.	56%	
		Células T241 de fibrossarcoma	40 mg/Kg/dia p.o.	55%	
			80 mg/Kg/dia p.o.	79%	
		Células U87 de glioblastoma	80 mg/Kg/dia p.o.	95%	

LLC (cancro do pulmão de Lewis)

O etopósido inibiu a angiogénese e crescimento tumoral em células de linhagem humana de cancro de Lewis, de glioblastoma (U87) e fibrossarcoma (T241) (tabela 11). Foi administrada uma dose oral entre 40 a 80 mg/Kg/dia em ratos onde se verificou que

havia um decréscimo da densidade microvascular sem toxicidade ou perda de peso do animal.

Todas as propostas de terapêutica de protocolos do cancro testicular, não seminomatoso, apresentam uma taxa de sobrevivência global e uma taxa de sobrevida livre de progressão acima de 95% (Hotte, Mayhew, Jewett, Chin, & Winkvist, 2010). Numa dessas propostas é recomendada uma quimioterapia adjuvante onde está inserido o etopósido (regime BEP - bleomicina/etopósido/cisplatina) (Hotte et al., 2010). Uma meta-análise realizada aos regimes quimioterapêuticos usados no cancro testicular avançado, nomeadamente o regime BEP, o regime EP (etopósido-cisplatina), o regime EC (etopósido-carboplatina), o regime VIP (cisplatina-etopósido-ifosfamida), entre outros, revelaram uma taxa de resposta objectiva (TRO) superior a 95% (Feldman, 2008). No entanto, o problema que reside nesta quimioterapia é a sua toxicidade, sendo importante continuar a investigação em tratamentos que não revelem tanta toxicidade (Feldman, 2008).

Os agentes de platina-etopósido são a terapêutica base do cancro das pequenas células do pulmão metastático (CPCP) (Alvarado-luna & Morales-Espinosa, 2016). Os regimes com etoposido quer em monoterapia quer em associação com cisplatina, têm benefício na sobrevida global dos pacientes através de uma meta-análise realizada a 36 ensaios clínicos neste cancro (Mascaux et al., 2000). Nesta meta-análise várias combinações foram comparadas, nomeadamente regimes com gencitabina, ciclofosfamida, metotrexato, epidoxorrubicina, adriamicinina, procarbazina, lomustina, ifosfamida, teniposido, entre outros (Mascaux et al., 2000; Lee et al., 2009) (tabela 12).

Tabela 12 - Ensaios clínicos de comparação entre regimes de etoposido e cisplatina com regimes de gencitabina com carboplatina no cancro de pequenas células do pulmão (CPCP)

Terapêutica	Modelo	Número da amostra	Tumor	Resultados		Referência
				EP	GC	
<b>Etoposido-cisplatina (EP) e Gencitabina-carboplatina (GC)</b>	Ensaio clínico fase III	241 pacientes	CPCP	<b>SG</b> 8,1 meses	<b>SG</b> 8,0 meses	Lee et al., 2009
				<b>SLP</b> 6,3 meses	<b>SLP</b> 5,9 meses	

SG (Sobrevida Global); SLP (Sobrevida Livre de Progressão); ET (etopósido/cisplatina); GC (gencitabina/carboplatina)

2.3.3.2 Toxicidade

De acordo com o RCM do etoposido, o seu principal efeito indesejável é a mielosupressão (INFARMED, 2016). De acordo com alguns autores, o etoposido, tal como outros fármacos inibidores da topoisomerase II, está envolvido no aparecimento de determinadas leucemias secundárias (Kamal et al., 2015; Baldwin & Osherooff, 2005; Felix, 2001), no entanto, Yang et al. (2009) refere que os rearranjos translocacionais dos cromossomas após re-ligação do ADN não estão relacionados com aparecimento de leucemia secundária. De notar que na meta-análise realizada no cancro testicular não seminomatoso (Feldman et al., 2008), foram reportadas leucemias secundárias associadas ao etoposido com um risco superior nos primeiros 10 anos (3% - 7%) (tabela 13).

Tabela 13 - Síntese de efeitos adversos associados ao etoposido no cancro de pequenas células do pulmão e no cancro testicular não seminomatoso

Tumor	Efeitos adversos associados		Estudo
	EP	GC	
CPCP	Alopécia 68% Náuseas 43%	Anemia 14% Leucopénia 32% Trombocitopénia 22%	Lee et al., (2009)
Cancro testicular não seminomatoso	<b>Bleomicina</b> Toxicidade pulmonar		Feldman et al., (2008)
	<b>Etoposido</b> Leucemia secundária		
	<b>Cisplatina</b> Nefrotoxicidade Hipomagnesémia Neuropatia Infertilidade		

CPCP (Cancro de pequenas células do pulmão); EP (etopósido-cisplatin); GC (gencitabina)

A mielosupressão causada nos pacientes que estavam sobre o regime de gencitabina no CPCP foi evidente, enquanto que no regime de etopósido verificou-se uma maior percentagem de alopecia e náuseas (Lee et al., 2009) (tabela 13). Os doentes neste ensaio reportaram estarem mais desanimados com a alopecia e perda de função cognitiva resultante do regime de etopósido, revelando uma qualidade de vida menos satisfatória (Lee et al., 2009). No cancro testicular não seminomatoso, o risco de febre

neutropénica é aproximadamente 5%-25% com 3 a 4 ciclos de BEP (bleomicina-etopósido-cisplatina) ou de EP (etopósido-cisplatina).

### 2.3.4 Irinotecano

O irinotecano e topotecano são derivados semi-sintéticos da campotecina, um alcalóide extraído e isolado de uma árvore ornamental, a *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae). Estes compostos foram produzidos na tentativa de ultrapassar a elevada toxicidade da campotecina (Brandão & David, 2010).

#### 2.3.4.1 Indicação terapêutica e eficácia

O irinotecano está indicado no tratamento de doentes com cancro colorectal avançado em monoterapia ou combinado com 5-Fluoracilo (5-FU) e ácido folínico (AF) (regime FOLFIRI). Como tratamento de primeira linha no carcinoma metastático do cólon ou do recto está indicado o uso do regime FOLFIRI com bevacizumab. A dose recomendada em monoterapia é de 350 mg/m<sup>2</sup> de 3 em 3 semanas, em terapêutica de combinação com 5-FU e AF a dose deve ser de 180 mg/m<sup>2</sup> de 2 em 2 semanas, no entanto, as doses podem ter que ser ajustadas (INFARMED, 2016).

A citotoxicidade do irinotecano foi provada *in vitro* em duas linhas celulares humanas de cancro colorectal (LoVo e HT-29), apresentando valores de IC<sub>50</sub> de 15,8µM e 5,17µM (Pavillard et al., 2002).

O irinotecano (IRI) provou também a sua eficácia anti-tumoral em ensaios clínicos de fase II no cancro colorectal (CCR) comparativamente ao 5-FU (Roujier et al., 1998) (tabela 14).

Tabela 14 - Avaliação da eficácia anti-tumoral do irinotecano no cancro colorectal

Terapêutica	Modelo	Número da amostra	Tumor	Resultados		Referência
				IRI	5-FU	
Irinotecano (IRI)	Ensaio clínico fase II	267 pacientes	Cancro colorectal (CCR)	SG 10,8 meses	SG 8,5 meses	Roujier et al., (1998)
				SLP 4,2 meses	SLP 2,9 meses	

IRI (irinotecano); 5-FU (5-fluorouracilo); SG (Sobrevida Global); SLP (Sobrevida Livre de Progressão)

Os regimes quimioterapêuticos no CCR começaram apenas com o 5-FU e capecitabina, no entanto, rapidamente os regimes com oxaliplatina (FOLFOX) e irinotecano (FOLFIRI) se revelaram mais eficazes, o que levou ao estudo da junção dos dois regimes, originando o regime FOLFOXIRI (5-FU/AF/irinotecano/oxaliplatina) (Fujita et al., 2015), o qual é tratamento de primeira-linha no CCR (ESMO, 2016).

No seguimento da eficácia de regimes compostos por irinotecano, Kamisawa, Wood, Itoi & Takaori (2016) comprovaram a eficácia do regime FOLFOXIRI face à gencitabina, o qual demonstrou uma melhor sobrevida livre de progressão e uma melhor sobrevida global (11,1 meses FOLFIRINOX e 6,8 meses gencitabina) comparativamente à gencitabina, quando usada em monoterapia, no entanto continuaram a encontrar problemas de toxicidade relacionados com o irinotecano (Kamisawa et al., 2016).

Tabela 15 - Comparação de eficácia anti-tumoral entre o regime de platina-etoposido e platina-irinotecano no cancro de pequenas células do pulmão

Terapêutica	Modelo	Número da amostra	Tumor	Resultados		Referência
				EP	IP	
<b>Etoposido-cisplatina (EP) e Irinotecano-cisplatina (IP)</b>	Ensaio clínico fase III	610 pacientes	CPCP	<b>SG 9,7</b> meses	<b>SG 10,2</b> meses	Zatloukal et al., 2010
				<b>SLP 6,2</b> meses	<b>SLP 5,4</b> meses	

SG (Sobrevida Global); SLP (Sobrevida Livre de Progressão); EP (etopósido-cisplatina); IP (irinotecano-cisplatina)

Ensaio clínico de fase III (Zatloukal et al., 2010) revelaram que o irinotecano apreseta sinergismo quando conjugado com compostos de platina no CPCP. A eficácia do tratamento quando aplicado um regime de irinotecano com cisplatina (IP) e quando usado um regime de etoposido com cisplatina (EP), em contexto de primeira linha, é igualmente eficaz, podendo o irinotecano fazer parte de um regime alternativo à terapêutica standard deste cancro (Zatloukal et al., 2010) (tabela 15).

### 2.3.4.2 Toxicidade

O irinotecano é conhecido por causar um grande desconforto e toxicidade a nível gastro-intestinal devido ao seu metabolito activo SN-28, sendo a principal causa da toxicidade limitante da dose (Anthony, 2007). No cancro colorectal (CCR) a decisão entre um paciente usar uma quimioterapia com 5-FU em detrimento de irinotecano, pode surgir efectivamente da toxicidade gastrointestinal característica do fitoquímico e da neuropatia periférica que o mesmo pode causar (Anthony, 2007).

No estudo do irinotecano em monoterapia no CCR, também se observou maior percentagem de efeitos adversos associados a toxicidade gastrointestinal, como diarreia e vómitos, comparativamente ao 5-FU (Roujier et al., 1998). No entanto, a toxicidade gastrointestinal do irinotecano foi amplificada quando associada a regimes de fluoropirimidinas (Anthony, 2007) (tabela 16).

Tabela 16 - Síntese de efeitos adversos associados ao irinotecano e ao irinotecano com cisplatina

Tumor	Efeitos adversos associados		Estudo
	IRI	5-FU	
Cancro colorectal (CCR)	Diarreia 22% Dor 17% Neutopénia 14% Astenia 13%	Dor 13% Diarreia 11% Astenia 12%	Roujier et al., (1998)
	<b>IP</b>	<b>EP</b>	
CPCP	Diarreia 15.8% Vómitos 8.9%	Neutropénia 59.6%	Zatloukal et al., (2016)

IRI (irinotecano); 5-FU (5-fluorouracilo); IP (irinotecano-cisplatina); EP (etopósido-cisplatina); CPCP (cancro de pequenas células do pulmão)

No ensaio de fase III do cancro de pequenas células do pulmão (CPCP), as toxicidades de grau 3 e 4 foram semelhantes no regime de irinotecano e de etoposido, no entanto no regime de etoposido verificou-se uma maior percentagem de neutropenia e no de irinotecano uma maior frequência de eventos adversos associados a diarreia e vómitos (Zatloukal et al., 2016).

### **3. Fitoquímicos aplicados por nanotecnologia na terapia oncológica**

#### **3.1 Fitoquímicos em uso clínico através da nanotecnologia**

Entre os fitoquímicos que estão a ser estudados na aplicação da nanotecnologia à terapia oncológica encontram-se os taxanos, particularmente o paclitaxel e docetaxel, as campotecinas, nomeadamente o irinotecano, e os alcalóides da vinca, como a vincristina (Wang et al., 2012).

Algumas nanopartículas estão clinicamente aprovadas para serem utilizadas na terapia oncológica, nomeadamente a formulação de nab-paclitaxel (Abraxane®), a formulação da nanopartícula micelar polimérica de paclitaxel (Genexol-PM®) (Wang et al., 2012), a formulação lipossomal de paclitaxel (Lipusu®) (Koudelka & Turánek, 2012), a formulação lipossomal de vincristina (Marqibo®) (Lee et al., 2015) e mais recentemente, a formulação nano-lipossomal de irinotecano (nal-IRI) comercializado sob a marca ONIVYDE® (Ko, 2016).

Além do Lipusu®, o paclitaxel está em desenvolvimento com outras nanopartículas, nomeadamente em lipossomas apesar de ainda não estarem aprovadas clinicamente (Koudelka & Turávek, 2012).

##### 3.1.1 Ensaios *in vitro* e *in vivo*

###### 3.1.1.1 Paclitaxel

Foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* com o intuito de avaliar a eficácia anti-tumoral do uso da nanopartícula nab-paclitaxel (paclitaxel de ligação à albumina) no cancro do pâncreas (Loulkema, Jodrell & Tuveson, 2016) e a sua vantagem relativamente à formulação de paclitaxel com o seu solvente cremophor-EL (Dosio, Brusa, Crosasso, Arpicco & Cattel 1997).

No ensaio de Dosio et al. (1997) a citotoxicidade da nanopartícula nab-paclitaxel *in vitro*, revelou ser inferior à do paclitaxel dissolvido em cremophor-EL, demonstrando ser menos eficaz. Contudo *in vivo* a avaliação da toxicidade do nab-paclitaxel foi mais favorável face ao paclitaxel livre (valores acima de 70 mg/Kg não apresentaram

toxicidade e valores abaixo 30 mg/Kg resultaram em toxicidade, respectivamente), verificou-se também um aumento do tempo de semi-vida de eliminação e maior direccionamento do nab-paclitaxel às células tumorais (Dosio et al., 1997) (tabela 17).

Tabela 17 - Ensaio *in vitro* e *in vivo* com nab-paclitaxel. Estudo da citotoxicidade *in vitro* e da toxicidade e farmacocinética *in vivo*.

Nanopartícula	Modelo	Tumor	Resultados	Referência
nab-paclitaxel	<i>In Vitro</i> : células HT-29 e MeWo tratadas com paclitaxel e nab-paclitaxel	Cancro do cólon e Melanoma	<b>Diminuição</b> da toxicidade e citotoxicidade e diminuição do tempo de libertação do fitoquímico	Dosio <i>et al.</i> , (1997)
	<i>In Vivo</i> : administração I.V. em ratos de paclitaxel e nab-paclitaxel		<b>Aumento</b> da distribuição ao tumor, do tempo semi-vida e aumento da concentração do fitoquímico no tumor	

No cancro do pâncreas a nanopartícula nab-paclitaxel associada à gencitabina aumentou a sua biodisponibilidade *in vivo*, dentro das células tumorais, através da degradação da sua enzima metabolizadora. Este regime quimioterapêutico promove a regressão do tumor, não só pelo aumento da biodisponibilidade da gencitabina, mas também devido a uma sensibilização anterior destas células pelo nab-paclitaxel que demonstrou ter selectividade para o tumor, reduzindo a incidência de metástases (Loulkema et al., 2016) (tabela 18).

Tabela 18 - Ensaio *in vivo* com nab-paclitaxel em associação com gencitabina no cancro do pâncreas

Terapêutica	Modelo	Tumor	Resultados	Referência
nab-paclitaxel + gencitabina	<i>In Vivo</i> : ratos previamente mutados desenvolveram cancro metastático pancreático resistente à gencitabina. Administração nab-paclitaxel com gencitabina.	Cancro do pâncreas	<b>Diminuição</b> da incidência de metástases  <b>Aumento</b> da regressão do tumor e da sensibilização das células à gencitabina	Lolkema et al., (2016)

Um ensaio xenográfico, realizado *in vivo* em ratos sem timo com diferentes linhagens cancerígenas humanas, demonstrou que o nab-paclitaxel apresenta uma maior actividade anti-tumoral comparativamente à sua formulação com cremophor EL (Taxol®) (Desai et al., 2006). Neste ensaio, o nab-paclitaxel proporcionou um maior atraso na progressão do tumor (tabela 19). As linhagens celulares do cancro do pulmão e mama foram as mais sensíveis ao tratamento, atrasando a progressão do tumor em

mais de 63 dias e em mais de 95 dias, respectivamente. A dose máxima tolerada relativamente à toxicidade (MTD – “maximum tolerated dose”) foi superior para o nab-paclitaxel (30 mg/Kg/dia contra 13,4 mg/Kg/dia) revelando-se menos tóxico que a formulação de solubilização do paclitaxel em cremophor EL (Desai et al., 2006).

Tabela 19– Estudo *in vivo* da actividade anti-tumoral do Abraxane® e do Taxol®. Adaptado de Desai et al., (2006).

Tumor	DMT	Modelo	Resultados
			<b>Sem progressão (dias)</b>
Células HT22 (pulmão)	<i>nab</i> -PTX 30 mg/kg/dia	<i>In vivo</i> . Estudo xenográfico com ratos sem timo	>63
	CBP 13,4 mg/kg/dia		>63
Células MX-1 (mama)	<i>nab</i> -PTX 30 mg/kg/dia		>95
	CBP 13,4 mg/kg/dia		31,2
Células SK-OV-3 (ovário)	<i>nab</i> -PTX 30 mg/kg/dia		>51
	CBP 13,4 mg/kg/dia		44,2
Células PC-3 (próstata)	<i>nab</i> -PTX 30 mg/kg/dia		52,9
	CBP 13,4 mg/kg/dia		40,2
Células HT29 (côlon)	<i>nab</i> -PTX 30 mg/kg/dia		44,9
	CBP 13,4 mg/kg/dia		29,4

CBP (paclitaxel em cremophor-EL: “cremophor EL-based paclitaxel”); DMT (Dose Máxima Tolerada); nab-PTX (nab-paclitaxel)

O Genexol-PM® e Lipusu®, que são nanoformulações também comercializadas alternativas ao Taxol® (paclitaxel com cremophor EL), demonstraram efeitos anti-tumorais semelhantes, com citotoxicidade relativamente mais alta e toxicidade reduzida (Wang et al., 2013; Kim et al., 2001). O Genexol-PM® demonstrou *in vitro* menor citotoxicidade em linhas celulares de cancro da mama e ovário comparativamente ao Taxol® revelando um IC<sub>70</sub> de 0,003 µg/ml comparativamente aos 0,002 µg/ml do Taxol® (Kim et al., 2001). *In vitro*, o Lipusu revelou ter uma citotoxicidade semelhante ao taxol para células de linhagem humana de cancro oral (IC<sub>50</sub> de aproximadamente 0,59 µg/ml) (Wang et al., 2013).

### 3.1.1.2 Vincristina

A vincristina encapsulada em lipossomas (Marqibo®) demonstrou *in vitro* e *in vivo* a sua eficácia e vantagem anti-tumoral em diversos tumores nomeadamente em melanoma, em linfomas, na leucemia, no cancro renal, no cancro do pulmão, no cancro da próstata, da mama e do cólon face ao seu uso na forma não lipossomal (Silverman & Deitcher, 2013; Krishna, Webb, Onge & Mayer, 2001).

Krishna et al. (2001) comprovou que, *in vivo*, a vincristina lipossomal apresenta uma farmacocinética mais favorável que a vincristina na sua forma livre em modelos de ratos xenográficos de cancro do pulmão (tabela 20).

Tabela 20 - Ensaio *in vivo* com vincristina lipossomal no cancro do pulmão. Estudo de farmacocinética.

Nanopartícula	Tamanho	Modelo	Tumor	Resultados	Referência
Vincristina lipossomal	100-120 nm	<i>In Vivo</i> : inoculação em ratos de células humanas de cancro de pulmão Administração I.V. de vincristina livre e vincristina lipossomal	Cancro do pulmão	<b>Aumento</b> da concentração plasmática do fitoquímico, do seu tempo de circulação e aumento da sua concentração tumoral	Krishna et al., (2011)

A vincristina lipossomal manteve-se em concentrações altas na circulação sanguínea por mais de 48 horas ao contrário da vincristina livre que apenas permaneceu até 4 horas. Passados 30 minutos após administração intravenosa, a concentração máxima plasmática da vincristina lipossomal foi de 25.9 µg/ml e o da vincristina livre de 0,04 µg/ml. O tempo de semi-vida do fitoquímico encapsulado também aumentou de 1,36h para 6,6h. A vincristina lipossomal apresentou um maior direcionamento ao tumor, proporcionando uma maior concentração tumoral do fitoquímico (3.9 µg/g contra 0.47 µg/g) ( Krishna et al., 2011) (tabela 20).

A eficácia anti-tumoral da vincristina lipossomal (Marqibo®) foi avaliada *in vivo* em tumores sólidos resistentes à quimioterapia com vincristina não lipossomal (Leonetti et al., 2004). Neste ensaio, a vincristina encapsulada em lipossomas conseguiu diminuir a viabilidade das células resistentes numa forma dose-dependente ao contrário da vincristina livre que não teve qualquer efeito sobre as mesmas (Leonetti et al., 2004) (tabela 21).

Tabela 21 – Ensaios *in vitro* e *in vivo* com vincristina em nanoformulações lipossomais

Nanopartícula	Tamanho	Modelo	Tumor	Resultados	Referência	
Vincristina lipossomal	115 ± 25 nm	<i>In Vitro</i> : Células M14 e M14/R, MCF-7 e MCF-7/R, LoVo e LoVo/R humanas tratadas com vincristina livre e vincristina lipossomal	Melanoma	<b>Diminuição</b> do volume tumoral tanto na linhagem de células sensíveis como na linhagem resistente	Leonetti et al., (2004)	
			Cancro da mama			<b>Aumento</b> da sensibilização das células resistentes e da apoptose das células cancerígenas
			Cancro do cólon			
		<i>In Vivo</i> : inoculação em ratos das células M14 e M14/R, MCF-7 e MCF-7/R, LoVo e LoVo/R humanas. Administração I.V. da vincristina livre e vincristina lipossomal				

/R (células resistentes)

O tempo de exposição de células resistentes à vincristina não lipossomal não originou qualquer efeito na diminuição da viabilidade das mesmas, observando-se uma redução em 50% das células após 72 horas de exposição à vincristina lipossomal. Com uma dose de 2 mg/Kg a vincristina encapsulada provou a redução do peso do tumor em aproximadamente 55% e 56%, em células sensíveis e resistentes, respectivamente tendo a vincristina convencional efeito apenas nas células sensíveis que reduziu em 40%) (Leonetti et al., 2004).

A nanoformulação lipossomal de vincristina (Marqibo®) é eficaz contra várias linhagens de tumores e contra linhagens cancerígenas resistentes face à vincristina não lipossomal (Silverman & Deitcher, 2013; Krishna et al., 2001; Leonetti et al., 2004).

### 3.1.2 Ensaio clínico

#### 3.1.2.1 Paclitaxel

O nab-paclitaxel, paclitaxel com ligação à albumina, está indicado em monoterapia no carcinoma da mama metastático nos doentes que não responderam à primeira-linha de tratamento, no adenocarcinoma pancreático metastático, como primeira-linha em associação com a gencitabina, e no cancro de não-pequenas células do pulmão (CNPCP) como primeira-linha em associação com a carboplatina (EMA, 2008).

Num ensaio clínico de fase III foi avaliada a eficácia do nab-paclitaxel, em associação com a carboplatina, como terapêutica de primeira-linha em doentes com cancro de não-pequenas células do pulmão (CNPCP), onde a combinação se revelou benéfica, aumentando a sobrevida livre de progressão em cerca de 10% e a sobrevida global em 1 mês comparativamente ao uso de Taxol<sup>®</sup> (paclitaxel solubilizado em cremophor EL) com carboplatina (Blair & Deeks, 2015) (tabela 22).

Tabela 22 – Ensaio de fase III com o regime nab-paclitaxel/carboplatina no cancro de não-pequenas células do pulmão

Terapêutica	Nanopartícula	Direccionamento	Tumor	Resultados		Efeitos adversos	Referência
				SG	SLP		
nab-PTX + CAR	Nanopartícula de albumina-paclitaxel	Activo	CNPCP	12,1 meses	6,3 meses	Neutropénia 47%	Blair & Deeks, (2015)
				11,2 meses	5,8 meses	Neuropatia Periférica 3%	
sb-PTX + CAR	Sem nanopartícula	-				Neutropénia 58%	
						Neuropatia Periférica 12%	

sb-PTX (paclitaxel na formulação de cremophor EL – Taxol<sup>®</sup>); CAR (carboplatina); SG (sobrevida global); SLP (sobrevida livre de progressão)

O regime nab-paclitaxel/carboplatina apresenta um perfil de segurança superior ao paclitaxel/carboplatina, apresentando uma menor percentagem de toxicidades de grau  $\geq 3$  (tabela 22). Nomeadamente, a neuropatia periférica que é característica dos taxanos, apresentou uma menor percentagem no grupo dos pacientes tratados com nab-paclitaxel comparativamente aos do paclitaxel solubilizado em cremophor EL (Blair & Deeks, 2015).

Tal como descrito na Tabela 19, o nab-paclitaxel em ensaios *in vivo* aumentou a biodisponibilidade da gencitabina dentro dos tumores (Lolkema et al., 2016). Estes resultados satisfatórios *in vivo* da associação de nab-paclitaxel com a gencitabina levaram ao desenvolvimento de um ensaio clínico de fase III em que se realizou a comparação entre regimes de gencitabina/nab-paclitaxel com a gencitabina em monoterapia, o qual melhorou a sobrevida dos pacientes, apresentando uma sobrevida global (99% e 31%, respectivamente) e sobrevida livre de progressão (5.5 meses e 3.7 meses, respectivamente) superiores (Van Hoff et al., 2013) (tabela 23).

Tabela 23 – Ensaio clínico fase III com o regime nab-paclitaxel/gencitabina no cancro pancreático

Terapêutica	Nanopartícula	Direcionamento	Tumor	Resultados		Efeitos adversos	Referência
				TRO	*SG		
<b>nab-paclitaxel + gencitabina</b>	Nanopartícula de albumina-paclitaxel	Activo	Cancro do pâncreas	99%	35%	**Neutropénia 38% Fadiga 17% Neuropatia 17%	Von Hoff et al., (2013)
<b>Gencitabina</b>	Sem nanopartícula associada	-		31%	22%	**Neutropénia 27% Fadiga 7% Neuropatia 1%	Von Hoff et al., 2013;

TRO (Taxa de resposta objectiva)

\* sobrevida global analisada ao fim de 1 ano, \*\* neutropénia grau 3

Os efeitos adversos neutropénia, fadiga e neuropatia foram observados maioritariamente na quimioterapia com nab-paclitaxel, no entanto foram todos de grau 3 ou inferior. O efeito adverso que mais se pronunciou comparando os dois grupos foi a neuropatia periférica que foi rapidamente reversível na maioria dos pacientes com uma descontinuação temporária do nab-paclitaxel e consequente redução de dose sendo a mielosupressão também reversível (Von Hoff et al., 2013) (tabela 23).

De acordo com Lolkema et al. (2016), estes resultados são comparáveis com o regime actual de primeira linha do cancro do pâncreas (regime FOLFIRINOX - 5-fluororacilo, ácido folínico, irinotecano, oxaliplatina) em termos de sobrevida global (12.2 meses gencitabina/nab-paclitaxel contra 11.1 meses FOLFIRINOX).

O nab-paclitaxel evidenciou eficácia em ensaios clínicos de fase II/II (Gradishar et al., 2005; Gradishar et al., 2012) no cancro da mama face à formulação Taxol® (paclitaxel em cremophor EL) e face ao seu análogo docetaxel, respectivamente (tabela 24).

Tabela 24– Ensaios clínicos de fase II/III com nab-paclitaxel no cancro da mama

Terapêutica	Nanopartícula	Direcionamento	Tumor	Resultados		Efeitos adversos	Referência
				TRO	TPP		
<b>nab-paclitaxel</b>	Nanopartícula de albumina-paclitaxel	Activo	Cancro da mama	33%	23.0 semanas	*Neutropénia 9% **Neuropatia 10%	Gradishar et al., 2005
<b>Paclitaxel</b>	Sem nanopartícula associada	-		19%	16.9 semanas	*Neutropénia 22% **Neuropatia 2%	
				TRO	SG		
<b>nab-paclitaxel</b>	Nanopartícula de albumina-paclitaxel	Activo	Cancro da mama	74%	33.8 meses	*Neutropénia 9% **Neuropatia 22%	Gradishar et al., 2012
<b>Docetaxel</b>	Sem nanopartícula associada	-		39%	26.6 meses	*Neutropénia 75% **Neuropatia 12%	

TRO (Taxa de Resposta Objectiva); TPP (Tempo Para Progressão)

\* Neutropénia de grau 4 , \*\* Neuropatia grau 3

No ensaio clínico de fase II (Gradishar et al., 2005) o nab-paclitaxel originou taxas de resposta superiores, comparativamente ao paclitaxel convencional (paclitaxel em cremophor EL), e provocou um maior atraso no crescimento tumoral (23.0 semanas e 16.9 semanas, respectivamente) (tabela 25). A incidência de neutropénia de grau 4 foi menor no nab-paclitaxel, mesmo tendo sido administrada uma dose 49% mais elevada que a do paclitaxel convencional, e a neuropatia periférica de grau 3, apesar de ter sido maior no nab-paclitaxel, foi reversível (Gradishar et al., 2005).

No ensaio clínico de fase III (Gradishar et al., 2012), o regime nab-paclitaxel 150 mg/m<sup>2</sup> (miligramas por metro quadrado de superfície corporal) semanal foi o que trouxe maior benefício clínico face ao docetaxel 100 mg/m<sup>2</sup> 3 vezes por semana, apresentando uma maior sobrevida global (33.8 meses e 26.6 meses, respectivamente), a qual foi a melhor obtida até hoje nos regimes de monoterapia com taxanos no cancro metastático da mama (tabela 24). Os efeitos adversos de grau 3 e 4 de neutropénia e fadiga foram também menores para o nab-paclitaxel neste regime. Apenas se verificou neuropatia periférica de grau 3, a qual foi maior no nab-paclitaxel que no docetaxel (22% e 12%), no entanto o tempo que esta levou a regredir foi menor comparativamente à do docetaxel e a outras regimes de nab-paclitaxel que foram estudados (300 mg/m<sup>2</sup> e 100 mg/m<sup>2</sup>), o que significa que os pacientes poderão atingir um benefício clínico antes de atingirem a dose limitante de toxicidade para os efeitos adversos (175 mg/m<sup>2</sup>) (Gradishar et al., 2012).

Nos Estados Unidos o nab-paclitaxel está a ser usado também no tratamento do melanoma com base nas recomendações da National Comprehensive Cancer Network (Kundranda & Niu, 2015). O nab-paclitaxel provou não só ser eficaz em doentes com melanoma não tratados previamente, mas também em doentes que tivessem recebido terapêutica prévia com dacarbazina que é um dos agentes base desta terapia (Hersh et al., 2010) (tabela 25).

Tabela 25 – Ensaios clínico fase II com *nab*-paclitaxel no melanoma

Terapêutica	Tumor	Resultados	Efeitos adversos	Referência
		<b>SG</b>		
<b>nab-paclitaxel 1ª linha</b>	Melanoma	9.6 meses	Neutropénia 35%	Hersh et al., (2010);
<b>nab-paclitaxel após dacarbazina</b>		12.1 meses	Neuropatia periférica 16%	
			Neutropénia 11%	
<b>Dacarbazina 1ª linha</b>		< 8 meses	Neuropatia periférica 5%	
			-	

SG (Sobrevida Global)

O nab-paclitaxel revelou resultados superiores àqueles conseguidos com a dacarbazina, a qual evidencia apenas uma sobrevida global inferior a 8 meses. Comparando com o nab-paclitaxel que obteve uma sobrevida global de 9.6 meses em primeira-linha e 12.1 meses após tratamento com dacarbazina, estudos futuros devem incidir sobre esta terapêutica. A neutropenia e neuropatia foram os efeitos adversos mais datados, tendo a neuropatia incidido preferencialmente nos pacientes sem terapêutica prévia. Tal facto pode dever-se à dose superior que foi administrada. Contudo, ambas as toxicidades foram reversíveis (Hersh et al., 2010).

Encontram-se em desenvolvimento outros estudos relativos ao nab-paclitaxel, que, embora ainda sem resultados, revelam a importância desta tecnologia baseada na ligação nab ( “nanoparticle albumin bound”) que se poderá tornar também promissora para outros fitoquímicos (tabela 26). Nomeadamente, o docetaxel que foi colocado em ensaios pré-clínicos com a mesma nano-tecnologia baseada na ligação à albumina (nab-docetaxel) tendo demonstrado maior eficácia anti-tumoral *in vitro* em células cancerígenas humanas do cólon e da próstata, prosseguindo para ensaios clínicos de fase I (Desai et al., 2008).

Tabela 26 – Ensaios clínicos em desenvolvimento com *nab*-paclitaxel. Adaptado de Kundranda e Niu, (2015); ClinicalTrials.gov, (2016).

<b>Id. ClinicalTrials.gov</b>	<b>Situação actual</b>	<b>Fase</b>	<b>Regime</b>	<b>Resultados primários</b>	<b>Previsão resultados</b>
<b>Carcinoma pancreático</b>					
NCT01836432	Activo, não está a recrutar	III	FOLFIRINOX ou nab-paclitaxel + gencitabina com ou sem imunoterapia	SG	Dezembro 2016
<b>Carcinoma da cabeça e pescoço</b>					
NCT01412229	Activo, não está a recrutar	II	Carboplatina + nab-PTX + cetuximab	TRO	Fevereiro 2017
<b>Carcinoma colorectal e do intestino delgado</b>					
NCT01730586	Completo	II	nab-paclitaxel	TRO	Agosto 2016
<b>Carcinoma gástrico</b>					
NCT01980810	Terminado	II	nab-paclitaxel	TRO	Fevereiro 2015
<b>Carcinoma da mama</b>					
NCT02019277	Activo, não está a recrutar	III	nab-paclitaxel + pertuzumab + trastuzumab	Efeitos Adversos	Novembro 2016

SG (Sobrevida Global); TRO (Taxa de Resposta Objectiva)

As formulações lipossomais alternativas ao Taxol® encontram-se em várias fases de ensaios clínicos, nomeadamente LEP-ETU da NeoPharm e o EndoTAG-1 da Medigene que já alcançaram ensaios clínicos de fase II e o Lipusu® da Luye Pharma Group que foi a primeira formulação lipossomal a ser comercializada, tendo sido aprovada na China (Koudelka & Turánek, 2012).

O Genexol-PM® (paclitaxel encapsulado em micelas poliméricas) foi aprovado pela KFDA (Korean Food and Drug Administration) no tratamento do cancro da mama e do pulmão (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015). Esta nanoformulação micelar com o paclitaxel encontra-se em 19 ensaios clínicos de fase II nos Estados Unidos para o tratamento de cancro da mama, urotelial, pâncreas, ovário, pulmão, cabeça e pescoço (Clinical Trials, 2016).

### 3.1.2.2 Vincristina

A vincristina lipossomal (Marqibo®), demonstrou em ensaios clínicos de fase II ser menos neurotóxica e mais activa que a vincristina não lipossomal em linfomas não-Hodgkin (Sarris et al., 2000). Colocou-se a questão de substituir a vincristina não lipossomal pela vincristina lipossomal no regime CHOP-R (regime de ciclofosfamida/doxorubicina/vincristina/prednisona com rituximab) em doentes não tratados previamente com linfoma não-Hodgkin, evidenciando num ensaio clínico de fase II o seu potencial nesta terapia oncológica (Hagemeister et al., 2013) (tabela 27).

Tabela 27 - Eficácia da nanoformulação lipossomal de vincristina no linfoma não-Hodgkin

Terapêutica	Nanopartícula	Direccionamento	Tumor	Resultados	Efeitos adversos	Referência
				<b>TRO</b>		
<b>CHMP+R (regime com vincristina lipossomal)</b>	Lipossoma com vincristina	Activo para células B do sistema imunitário	Linfoma não-Hodgkin	≤60 anos	36% Neurotoxicidade de	Hagemeister et al., (2013)
				100%		
				>60 anos		
				93%		
<b>CHOP+R (regime com vincristina não lipossomal)</b>	-	-		>60 anos	92% Neurotoxicidade de	Hagemeister et al., (2013)
				75%		

CHMP+R (ciclofosfamida/doxorubicina/Marqibo®-prednisona + rituximab); CHOP+R (ciclofosfamida/doxorubicina/vincristina/prednisona + rituximab); TRO (Taxa de Resposta Objectiva)

No ensaio clínico de fase II de Hagemeister et al. (2013), foi avaliada a eficácia anti-tumoral da vincristina lipossomal em doentes não tratados previamente com linfoma não-Hodgkin. Inserindo a vincristina lipossomal no regime quimioterapêutico CHOP-R em vez da vincristina convencional (não lipossomal), obteve-se uma resposta global (idades abaixo e acima de 60 anos) de 96% uma sobrevida livre de progressão e sobrevida global ao fim de 10 anos de 87% e 77%, respectivamente. De notar, que em doentes com menos de 60 anos a taxa de resposta foi de 100% e com mais de 60 anos a taxa de resposta obtida com o regime CHMP-R (regime com a vincristina lipossomal) foi de 93%. A toxicidade da vincristina lipossomal quando associada a este regime revelou níveis muito mais baixos de neurotoxicidade periférica comparativamente à vincristina convencional (36% e 92%, respectivamente) (Hagemeister et al., 2013) (tabela 27).

Tendo em conta a superioridade da vincristina lipossomal comparativamente à vincristina convencional tanto em ensaios *in vitro*, *in vivo* e em ensaios clínicos na leucemia linfoblástica aguda em adultos (Silverman & Deitcher, 2012), um ensaio clínico de fase II realizou-se também na leucemia linfoblástica aguda mas com uma dose mais elevada de vincristina lipossomal para além daquela que limita o nível para a qual é considerada tóxica ( $2 \text{ mg/m}^2$ ) (O'Brien et al., 2013). Neste ensaio foi administrada uma dose de vincristina lipossomal de  $2,25 \text{ mg/m}^2$  uma vez por semana durante 4 semanas, ou seja, os pacientes receberam doses individuais duas vezes superiores àquelas que são usadas na vincristina convencional. Neste ensaio de fase II foi usado um protocolo específico com um algoritmo de modificação da dose de vincristina lipossomal de forma a que fosse possível manusear as toxicidades sem ter que se interromper o tratamento (O'Brien et al., 2013).

Os resultados obtidos foram positivos, atingindo-se uma sobrevida global de 7.7 meses e uma taxa de resposta objectiva de 35%, onde se verificou uma taxa de neuropatia de 63%. Estes resultados comparados com o uso da vincristina convencional inserida em outros regimes, como por exemplo no regime CHOP (ciclofosfamida/hidroxicortona/vincristina/prednisona), revela um perfil de toxicidade bastante favorável comparativamente à dose estipulada de vincristina convencional. Em suma, doses elevadas de vincristina lipossomal na leucemia linfoblástica em adultos revelou benefícios clínicos e toxicidades paralelas à dose e formulação vincristina não lipossomal (O'Brien et al., 2013).

### 3.1.2.3 Irinotecano

O nanolipossoma de irinotecano (nal-IRI), um composto derivado semi-sintético da campotequina, demonstrou benefício em ensaios clínicos de fase II e III no cancro metastático do pâncreas quando inserido no regime 5-fluoracilo e ácido fólico (5-FU/AF) (Ko, 2016) (tabela 28).

Tabela 28 – Ensaios clínicos de fase II/III com nal-IRI no cancro metastático do pâncreas. Adaptado de Ko, (2016)

Terapêutica	Nanopartícula	Direcionamento	Tumor	Regime	Resultados		Efeitos adversos
					TRO	SG	
nal-IRI + 5-FU/ AC	Lipossoma com irinotecano	Passivo	Cancro do pâncreas	nal-IRI, I.V. 80 mg/m <sup>2</sup> 2x/semana + 5-FU 2400 mg/ m <sup>2</sup> + AC 400 mg/ m <sup>2</sup> I.V.	16%	6.1 meses	Diarreia 59%  Vómitos 52%
nal-IRI	lipossoma	-		nal-IRI 120 mg/m <sup>2</sup> semanal, I.V.	6%	4.9 meses	Diarreia 70%  Vómitos 54%
5 FU/AC		Passivo		5-FU 2400 mg/m <sup>2</sup> + AC 400 mg/m <sup>2</sup> I.V.	1%	4.2 meses	Diarreia 26%  Vómitos 26%

Através destes ensaios de fase II e III com nal-IRI, confirmou-se que a nanoformulação lipossomal com irinotecano melhora os resultados terapêuticos do regime 5-FU/AC sozinho, aumentando a taxa de resposta objectiva (16% comparativamente contra 1%) e o tempo de sobrevida global (6.1 meses contra 4.2 meses) no cancro metastático pancreático (Ko, 2016). A diarreia e vómitos foram os efeitos adversos mais relatados na nanoformulação lipossomal de irinotecano (nal-IRI) em monoterapia, verificando-se que ao dividir 120 mg/m<sup>2</sup> em duas administrações semanais se mantinha a eficácia e melhorava o perfil de toxicidade, o que explica toxicidades mais baixas na associação de nal-IRI com o regime 5-FU/AC (Ko, 2016).

No entanto algumas complicações devido a neutropénia (neutropénia febril, sépsis neutropénica) ocorreram em menos 5% nos pacientes com nal-IRI comparativamente ao que apenas foram tratados com 5-fluoracilo e ácido fólico (5-FU/AC) (Ko, 2016).

Esta aprovação suscitou novas questões, nomeadamente a substituição do irinotecano na sua forma livre pelo nal-IRI no tratamento de primeira-linha do cancro metastático do pâncreas (regime FOLFOXIRI), estando um ensaio clínico de fase II a decorrer nesse âmbito (NCT02551991) (Ko, 2016).

### 3.2. Aplicações da nanotecnologia a fitoquímicos em desenvolvimento

O etoposido tem sido alvo de estudo de aplicação em nanopartículas à base de lípidos, nomeadamente em lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e

transportadores nano-estruturados lipídicos (TNL) (Zhang et al., 2016). Outros fitoquímicos considerados como quimiopreventores e que estão presentes na nossa dieta diária embora ainda não usados clinicamente, têm sido estudados em nanopartículas de modo a ultrapassar problemas como a sua baixa solubilidade em água e a sua baixa biodisponibilidade, como por exemplo a epigallocatequina-3-galato (EGCG), a curcumina, a quercetina, o resveratrol e a genisteína.

São em seguida descritas algumas das tentativas de aplicação da nanotecnologia e estes compostos.

### 3.2.1 Ensaio *in vitro* e *in vivo*

#### 3.2.1.1 Etopósido

No desenvolvimento de uma terapia direccionada activa a células cancerígenas, avaliou-se a actividade anti-tumoral/citotoxicidade do etoposido (ETP) quando encapsulado em transportadores nano-estruturados lipídicos (TNL) com a adição de um ligando específico para os receptores de folato (ácido fólico - AF) (Zhang et al., 2016). Os resultados foram positivos para ambas as nanopartículas (com e sem folato) em detrimento de uma solução apenas com etoposido livre, sendo que a inibição tumoral *in vivo* foi maior no TNL com folato (88%) e a distribuição do etoposido encapsulado foi superior nos tecidos tumorais em detrimento dos saudáveis (Zhang et al., 2016) (tabela 29). O tamanho das nanopartículas teve uma grande influência na citotoxicidade *in vitro* e na distribuição *in vivo*, observando-se uma menor captação pelo fígado, um aumento do tempo de circulação do fitoquímico e uma menor citotoxicidade por parte do FA-ETP-TNL (Zhang et al., 2016) (tabela 30).

No cancro gástrico, também se tentou caracterizar o etoposido (ETP) encapsulado em NLS (ETP-NLS) e avaliar a sua actividade anti-tumoral *in vitro*, os resultados obtidos foram positivos em comparação ao uso do etoposido livre (Wang et al., 2014) (tabela 29).

Tabela 29 – Nanoformulações em ensaios *in vitro* e *in vivo* com o etoposido

Nanopartícula	Tamanho	Direcionamento	Modelo	Tumor	Resultados	Referência
ETP-TNL-AF e ETP-TNL	120 nm	Activo para os receptores de folato	<b>In Vitro:</b> células CT26, SGC7901 e NCI-H209 para estudo de citotoxicidade. Tratamento com ETP livre e ETP encapsulado  <b>In Vivo:</b> modelo xenográfico de células CT26 injectadas em ratos para estudo de actividade anti-tumoral. Administração de ETP livre e ETP encapsulado	Cancro colorectal, gástrico e CACP  Cancro gástrico	<b>Diminuição de:</b> crescimento tumoral  <b>Aumento de:</b> citotoxicidade, selectividade tumoral e tempo de circulação	Zhang et al., (2016)
ETP-NLS	30-50 nm	Passivo	<b>In Vitro:</b> células SGC7901 foram tratadas com ETP livre e ETP encapsulado	Cancro gástrico	<b>Aumento de:</b> Taxa de apoptose, paragem ciclo celular G2/M, captação celular tumoral e tempo de circulação	Wang et al., (2014)

ETP-TNL-AF (etoposido-transportador nano-estruturado lipídico-ácido fólico); ETP-NLS (etoposido-nanopartícula lipídica sólida)

O tamanho das nanopartículas teve uma grande influência na citotoxicidade *in vitro* e na distribuição *in vivo*, observando-se uma menor captação pelo fígado, um aumento do tempo de circulação do fitoquímico e uma menor citotoxicidade por parte do transportador nano-estruturado lipídico com ácido fólico (AF-TNL-ETP) (Zhang et al., 2016) (tabela 29).

No cancro gástrico, também se avaliou a actividade anti-tumoral *in vitro* do etoposido (ETP) encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (ETP-NLS) os resultados obtidos foram positivos em comparação ao uso do etoposido livre, havendo um aumento da taxa de apoptose de células cancerígenas e uma maior concentração de fitoquímico no tumor (Wang et al., 2014) (tabela 29). O perfil de libertação *in vitro* demonstra que a nanopartícula lipídica sólida (NLS) promove uma libertação prolongada (acima de 60 horas) que é conseguida pela difusão lenta através da matriz lipídica da nanopartícula lipídica sólida. A encapsulação do etoposido em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e em transportadores nano-estruturados lipídicos (TNL) revela ser uma quimioterapêutica promissora no cancro gástrico, cancro colorectal e cancro das pequenas células do pulmão (CACP) (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2016).

### 3.2.1.1 Epigallocatequina-3-galato

A epigallocatequina-3-galato (EGCG), já provou *in vivo* e *in vitro* o seu potencial anti-cancerígeno, no entanto a sua estabilidade e biodisponibilidade no organismo é baixa, sendo necessário doses muito elevadas para exercer a sua acção (de Pace et al.,

2013). Este fitoquímico foi estudado *in vitro* associada a nanopartículas, nomeadamente no cancro da mama (de Pace et al., 2013) e da próstata (Arca et al., 2011) (tabela 30). No cancro da mama foi verificado que a EGCG encapsulada em nanolipossomas revestidos por quitosano apresentava maior estabilidade, um maior controlo de libertação do fitoquímico e aumento da concentração intracelular tumoral da EGCG, demonstrando efeitos anti-proliferativos na concentração de 10  $\mu$ M, valor este para o qual a EGCG livre não apresenta qualquer efeito clínico benéfico. A adição de quitosano a esta nanoformulação permitiu aumentar a concentração do fitoquímico das células tumorais, diminuindo a viabilidade das mesmas (de Pace et al., 2013) (tabela 30).

Tabela 30 – Nanoformulações *in vitro* e *in vivo* com a epigalocatequina-3-galato (EGCG)

Nanopartícula	Tamanho	Direcionamento	Modelo	Tumor	Resultados	Referência
Lipossomas com EGCG revestidos por quitosano	100 nm	Passivo	<i>In Vitro</i> : células tratadas com EGCG livre ou EGCG encapsulada	MCF-7 Cancro da mama	<b>Diminuição</b> da viabilidade das células cancerígenas  <b>Aumento</b> da taxa de apoptose das células cancerígenas	de Pace et al., (2013)
Nanopartículas poliméricas de PLGA-PEG	80 nm	Activo para o PSMA	<i>In Vitro</i> : células tratadas com EGCG encapsulada sem ligando ou EGCG encapsulada com ligando para o PSMA	LNCap Cancro da próstata	<b>Diminuição</b> da viabilidade das células cancerígenas	Arca et al., (2011)

No cancro da próstata, a EGCG quando encapsulada e direcionada através de um ligando específico ao receptor de membrana do cancro da próstata (PSMA - “prostate-specific membrane antigen”), aumenta a sua actividade anti-proliferativa *in vitro*, tem uma maior selectividade dirigindo-se para as células cancerígenas em detrimento das saudáveis tornando-se menos citotóxica nestas últimas (Arca et al., 2011) (tabela 30). Este ligando foi adicionado à zona hidrofílica do copolímero PLGA-PEG (figura 11).

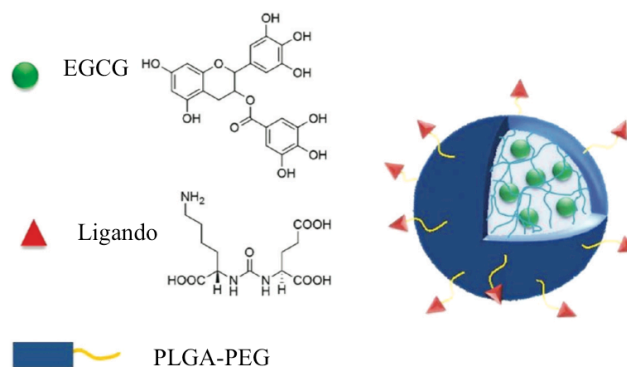


Figura 11 - Epigallocatequina-3-galato encapsulada em nanopartículas poliméricas constituídas pelo copolímero PLGA-PEG. O ligando é adicionado à zona hidrofílica (PEG) e o fitoquímico é encapsulado na zona hidrofóbica (PLGA). Adaptado de Arca et al. (2011).

### 3.2.1.3 Curcumina

A curcumina tem um potencial anti-cancerígeno, que se reflecte na sua capacidade anti-proliferativa e também na capacidade de regulação de alguns factores de transcrição, no entanto para que haja benefício da sua ingestão oral deve de haver um consumo elevado deste fitoquímico (Krzyzanowska et al., 2010). Foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* (Wang et al., 2013; Rajan et al., 2013) com a inclusão da curcumina em nanopartículas, nomeadamente no cancro do pulmão e no cancro pancreático com o objectivo de avaliar a sua actividade anti-tumoral e o seu benefício quando utilizada à nano-escala comparativamente à curcumina livre na corrente sanguínea (tabela 31).

A curcumina encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas, tornou-se um composto mais estável, ficando protegida da hidrólise e biotransformação. A curcumina livre é um fitoquímico hidrofóbico e instável em solução aquosa, o que foi constatado pela sua rápida eliminação no organismo através do metabolismo e baixa biodisponibilidade (Wang et al., 2013). A curcumina livre, apenas foi encontrada em pequena quantidade no tecido tumoral do pulmão ao contrário da curcumina encapsulada que aumentou a sua concentração tumoral 2,6 vezes comparativamente ao fitoquímico livre (Wang et al., 2013). A curcumina encapsulada revelou uma maior citotoxicidade para as células cancerígenas do que a curcumina livre, apresentando um IC<sub>50</sub> entre 18-32  $\mu\text{mol}$  e entre 78-185  $\mu\text{mol}$ , respectivamente (Wang et al., 2013) (tabela 31).

Tabela 31 – Ensaios in vitro e in vivo de nanoformulações com a curcumina

Nanopartícula	Tamanho	Direcionamento	Modelo	Tumor	Resultados	Referência
NLS	20-80 nm	Passivo	<i>In Vitro</i> : células A549 tratadas com curcumina livre ou encapsulada  <i>In Vivo</i> : inoculação em ratos de células A549 humanas. Administração da curcumina livre e encapsulada (200 mg/Kg)	Cancro do pulmão	<b>Diminuição</b> do volume tumoral  <b>Aumento</b> da estabilidade do fitoquímico, da apoptose de células cancerígenas e da concentração plasmática do fitoquímico	Wang et al., (2013)
Lipossoma	100 nm	Passivo	<i>In Vitro</i> : células MiaPaCa tratadas com curcumina livre ou encapsulada  <i>In Vivo</i> : inoculação em ratos de células MiaPaCa humanas. Administração de curcumina livre e encapsulada (20 mg/Kg)	Cancro do pâncreas	<b>Diminuição</b> da proliferação das células cancerígenas, do crescimento tumoral e angiogénese à volta do tumor	Ranjan et al., (2013)

NLS (nanopartícula lipídica sólida);

O IC<sub>50</sub> na formulação lipossomal de curcumina para o cancro pancreático apresentou um valor de 17,5 µmol, indicativo de actividade anti-tumoral (Ranjan et al., 2013) (tabela 31). Neste ensaio in vivo, realizado em modelos xenográficos, verificou-se que a inibição do crescimento tumoral pela curcumina lipossomal (inibição em 42%) estava relacionada com a sua capacidade de inibição da neovascularização à volta do tumor (Ranjan et al., 2013) (figura 12).

Tanto a curcumina encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas como a lipossomal poderão ser usadas na terapia oncológica nestes cancros (Wang et al., 2013; Ranjan et al., 2013).

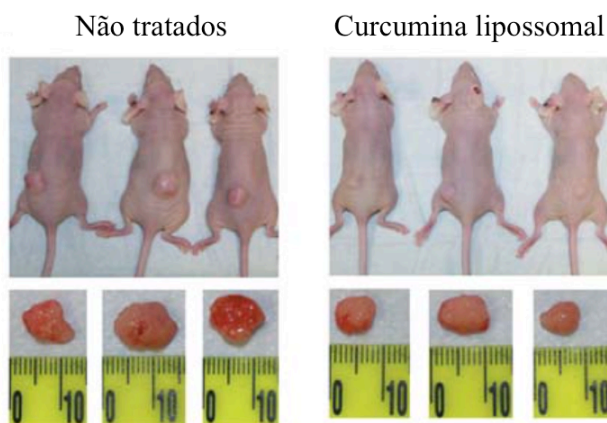


Figura 12 - Eficácia anti-tumoral *in vivo* da curcumina lipossomal em modelos xenográficos de cancro pancreático (20 mg/Kg, 3 vezes por semana). Adaptado de Ranjan et al. (2013).

## 3.2.1.4 Quercetina

A quercetina é o flavonol mais comum encontrado na alimentação humana encontrando-se em elevada concentração na cebola (Krzyzanowska *et al.*, 2010) e tal como a EGCG e a curcumina, a quercetina tem sido associada a nanopartículas de forma a estudar o seu benefício na terapia oncológica uma vez que mesmo com uma ingestão diária de 1g/dia as concentrações plasmáticas atingidas são mínimas (aproximadamente 1,5  $\mu\text{M}$ ) para exercer um efeito anti-cancerígeno (Chang, Tan, Lim & Chiu, 2012). Estudos *in vitro* e *in vivo* (Sun et al., 2014; Tan et al., 2012) no cancro da mama e do pulmão demonstraram vantagem na associação de fitoquímico a nanopartículas face à quercetina livre na corrente sanguínea (tabela 32).

Tabela 32 – Ensaio *in vivo* de nanoformulações com quercetina

Nanopartícula	Tamanho	Direcionamento	Modelo	Tumor	Resultados	Referência
TNL	30 nm	Passivo	<i>In Vitro</i> : células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com quercetina livre ou encapsulada	Cancro da mama	<b>Diminuição</b> da viabilidade das células cancerígenas  <b>Aumento</b> da apoptose das células cancerígenas e da solubilidade da quercetina	Sun et al., (2014)
Micela polimérica	16 nm	Passivo	<i>In Vivo</i> : inoculação em ratos de células A549 humanas. Administração oral da quercetina livre ou encapsulada (30 mg/Kg)	Cancro do pulmão	<b>Diminuição</b> do volume tumoral e da viabilidade das células cancerígenas  <b>Aumento</b> da estabilidade da quercetina	Chang et al., (2012)

TNL (transportador nano-estruturado lipídico)

Tal como muitos outros flavonóis, a entrada da quercetina dentro das células fica limitada devido à sua hidrofobicidade (Sun et al., 2014). No entanto, no estudo com a quercetina encapsulada em transportadores nano-estruturados lipídicos (TNL) foi demonstrado que a concentração de quercetina dentro do tumor era superior quando o fitoquímico se encontrava encapsulado, o que levou à obtenção de uma citotoxicidade maior para as células do cancro da mama na quercetina-TNL comparativamente à quercetina livre ( $\text{IC}_{50}$  entre 14,1-15,8  $\mu\text{mol}$  e  $>50 \mu\text{mol}$ , respectivamente) (Sun et al., 2014). A formulação micelar de quercetina aumentou a concentração do fitoquímico nas células do cancro do pulmão e aumentou a sua solubilidade aquosa (3mg/L comparativamente a 80  $\mu\text{M}$  da quercetina livre), o que se reflectiu numa inibição do crescimento tumoral em 83% comparativamente aos 48% da quercetina livre (Chang et al., 2012) (tabela 32). Foi verificado que uma concentração de quercetina a 3 g/Kg não

demonstrou efeitos tóxicos para ratos, o que leva a discutir o facto da dose eficaz de 30 mg/Kg em nano-micelas aplicadas a ratos poder vir a ser benéfica para a terapia oncológica em humanos, sendo necessário por isso realizar estudos futuros tanto em animais como em humanos (Chang et al., 2012).

### 3.2.1.5 Resveratrol

O resveratrol, tal como os outros fitoquímicos, apresenta pouca solubilidade aquosa e baixa estabilidade (Jun et al., 2015). De forma a melhorar a sua farmacocinética e actividade na carcinogénese, tem sido associado a como as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e nanopartículas poliméricas de PEG-PLA (Jung et al., 2015; Jose et al., 2014) (tabela 33).

O resveratrol (RSV) no cancro do cólon quando encapsulado na nanopartícula polimérica não demonstrou uma diferença significativa na citotoxicidade comparativamente ao RSV livre em circulação (IC<sub>50</sub> 16 µM e 17 µM, respectivamente), o que significa que preservou a actividade anti-tumoral do fitoquímico livre. A potência e a capacidade de reduzir o número de células de cancro do colon CT26 foi superior para o resveratrol encapsulado na nanopartícula polimérica de PEG-PLA (Jung et al., 2015) (tabela 33).

Tabela 33 – Ensaio in vitro e in vivo de nanoformulações com resveratrol

Nanopartícula	Tamanho	Direcionamento	Modelo	Tumor	Resultados	Referência
Nanopartícula polimérica PEG-PLA	12 - 260 nm	Passivo	<i>In Vitro</i> : células CT26 de ratos tratadas com resveratrol livre ou encapsulado  <i>In Vivo</i> : inoculação em ratos de células CT26. Administração I.V. de resveratrol livre ou encapsulado (100 mg/Kg)	Cancro do cólon	<b>Diminuição</b> do volume tumoral  <b>Aumento</b> da apoptose das células cancerígenas	Jung et al., (2015)
NLS	250 nm	Passivo	<i>In Vivo</i> : inoculação em ratos de células de tumor cerebral. Administração i.p. do resveratrol livre ou encapsulado (5 mg/Kg)	Cancro cerebral	<b>Aumento</b> da concentração do fitoquímico no tumor	Jose et al., (2014)

NLS (nanopartícula lipídica sólida); i.p. (intra-peritoneal)

No ensaio do cancro do cólon não foi possível fazer uma comparação *in vivo* da actividade anti-tumoral com o RSV livre porque era necessário solubilizá-lo com uma solução a 30% de DMSO (dimetilsulfóxido), a qual está relacionada com uma

toxicidade *in vivo* significativa (Jung et al., 2015). Relativamente ao resveratrol encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas, verificou-se que havia uma maior acumulação nas células cancerígenas cerebrais comparativamente ao resveratrol livre (17, 28 µg/g e 3,45 µg/g, respectivamente) (Jose et al., 2014) (tabela 33).

Estudos anteriores com o resveratrol ligado à albumina (tecnologia “nab”) no cancro do ovário, verificaram que a redução do volume tumoral foi superior quando comparada com o resveratrol livre (66,9% e 61,7%, respectivamente).

### 3.2.1.6 Genisteína

Devido à grande hidrofobicidade da genisteína e à sua tendência natural de se incorporar nas membranas lipídicas, foi realizado um estudo *in vitro* e multifactorial (Phan et al., 2013) com o intuito de otimizar e demonstrar a eficácia da genisteína em lipossomas nos cancros da próstata, da mama e do ovário (tabela 34).

As células cancerígenas da mama revelaram-se mais sensíveis à genisteína lipossomal seguida das células do cancro do ovário e da próstata, no entanto, em todas elas a citotoxicidade da genisteína encapsulada foi mais alta que a da genisteína livre (IC<sub>50</sub> entre 22.7-34.1 µM e 144.3-169.5 µM, respectivamente) (Phan et al., 2013) (tabela 34).

Tabela 34 – Ensaio *in vitro* de nanoformulação com genisteína

Nanopartícula	Tamanho	Direccionamento	Modelo	Tumor	Resultados	Referência
Lipossoma	161 nm	Passivo	<i>In Vitro</i> : células PC-3 e OVCAR-3 humanas e células 4T1 de ratos tratadas com genisteína livre ou encapsulada	Cancro da próstata Cancro do ovário Cancro da mama	Aumento da citotoxicidade e da apoptose de células cancerígenas	Phan et al., (2013)

A genisteína em lipossomas causou um maior dano a nível mitocondrial, explicando o aumento da apoptose das células cancerígenas relativamente à genisteína livre. O protótipo lipossomal, utilizado neste estudo, aumentou bastante o efeito anti-cancerígeno da genisteína comparativamente à genisteína livre (Phan et al., 2013).

### 3.2.2 Ensaio clínicos

De acordo com as bases de dados Cochrane Library, ClinicalTrials.gov e PubMed.gov, apenas a curcumina se encontra em ensaios clínicos através da

nanotecnologia. A curcumina está a ser avaliada em ensaios clínicos encapsulada em nanopartículas lipídicas para o cancro da mama (Cochrane Library, 2016).

### **3.3 Avaliação da utilização das nanopartículas**

Os nano-transportadores revelaram diferentes eficácias de encapsulação (capacidade de incorporação do fitoquímico) e direcionamento do fitoquímico sendo abaixo analisadas algumas características das nanopartículas usadas nos ensaios acima descritos.

#### 3.3.1 Comparação entre sistemas de veiculação

O transportador nano-estruturado lipídico (TNL) onde foi encapsulado o etopósido através da técnica de injeção de solvente, revelou uma boa eficácia de encapsulação (capacidade de incorporar a quantidade de fármaco introduzida na nanopartícula) (82.92% - 83.86%) e uma libertação controlada do fitoquímico (mais de 24 h), que por estar rodeada de folato para um direccionamento activo reteve mais tempo o fitoquímico que o transportador nano-estruturado lipídico sem o folato (o receptor de folato está sub-expresso em células de linhagem cancerígena do pulmão, de cancro colorectal e glioblastoma) (Zhang et al., 2016).

Na preparação da nanopartícula lipídica sólida (NLS) para encapsulação do etopósido, verificou-se que maiores concentrações do fitoquímico levaram a menores percentagens de eficiência de encapsulação (Wang et al., 2014a). Nesta nanopartícula lipídica sólida do etopósido (NLS), a eficiência de encapsulação do etopósido foi um pouco mais elevada que no transportador nano-estruturado lipídico (TNL) (82.92% e 75.42%, respectivamente) (Wang et al., 2014). Esta diferença poderá estar associada ao tipo de transportador nano-estruturado utilizado (imperfeito, amorfo ou múltiplo), pois segundo Jaiswal et al. (2014) consoante a estruturação da matriz lipídica e a sua natureza poderá haver capacidades de encapsulação mais eficazes que outras. A libertação do fármaco pela nanopartícula lipídica sólida (NLS) também foi mais controlada (mais de 60 horas) devido à libertação bifásica do fitoquímico e ao seu estado amorfo dentro da NLS, proporcionando uma melhor penetração do mesmo no tumor (Wang et al., 2014) e benefício para os compostos que possam causar irritação a elevadas concentrações (Wang et al., 2014). A NLS do etopósido foi caracterizada como

tendo uma óptima estabilidade a longo-prazo que é conseguida pela estrutura cristalina desorganizada ou estrutura amorfa que o etopósido apresenta dentro da NLS (Wang et al., 2014).

A adição de quitosano na nanoformulação lipossomal da EGCG permitiu aumentar a estabilidade da nanopartícula e o seu tamanho (100 nm) aumentando o seu tempo de circulação (de Pace et al., 2013). De acordo com Borel e Sabliov (2014), partículas com menos de 10 nm são facilmente excretadas na urina e menores que 100 nm são facilmente distribuídas.

Na EGCG o lipossoma revestido por quitosano usado para a sua encapsulação, foi formado através de colesterol e fosfatidilcolina onde a EGCG foi encapsulada no “core” interno hidrofílico do lipossoma (de Pace *et al.*, 2013).

De acordo com Nogueira *et al.* (2015), o colesterol pode ser adicionado à preparação dos lipossomas de forma a modular a sua rigidez e estabilidade de membrana para que não haja tanta perda de composto activo encapsulado, o que se verificou nesta forma de veiculação aplicada à EGCG, apresentando uma eficácia de encapsulação de 90% e uma libertação controlada do fitoquímico caracterizada por uma libertação bifásica (de Pace et al., 2013).

Nos estudos *in vivo* da quercetina a micela polimérica utilizada resultou de uma solubilização indirecta com recurso a co-solventes com posterior evaporação da fase orgânica, que segundo Sosnik e Raskin (2015) é um dos métodos utilizados na preparação de micelas. Os copolímeros usados foram o polietilenoglicol (PEG) que por norma faz parte da zona hidrofílica (Grattoni et al., 2010) e fosfatidilcolina, um fosfolípido (Tan et al., 2012). Estas nanomicelas de PEG-lípidos já anteriormente estudadas para administração intravenosa, foram aqui aplicadas com o intuito de estudar este sistema de veiculação como parte integrante de uma formulação oral, o qual revelou uma eficácia de encapsulação do fitoquímico acima de 88.9% (Chang et al., 2012). Neste ensaio pode-se concluir que a eficácia de encapsulação da micela polimérica depende da quantidade de quercetina encapsulada, sendo que à medida que a quantidade aumenta a eficiência diminui (Chang et al., 2012). Tratando-se de uma administração oral, fizeram-se testes de estabilidade mimetizando o ambiente gástrico e intestinal onde se verificou ausência de precipitação da quercetina, manutenção do tamanho da micela e uma retenção de fármaco em 70-75% (Chang et al., 2012).

Comparativamente à micela polimérica da quercetina, o transportador nano-estructurado lipídico (TNL) revelou-se mais eficaz na encapsulação da quercetina,

apresentado uma eficácia de encapsulação de 95% (Sun et al., 2014). Esta nano-estrutura foi obtida através da técnica da micro-emulsão por um processo de homogeneização a frio, o que segundo Jaiswal et al. (2014) poderá trazer vantagens uma vez que o composto não fica por longos períodos de tempo exposto a altas temperaturas. Para além do método de preparação, a elevada eficiência de encapsulação, remete-se ao facto de se ter utilizado uma mistura de vitamina E e triglicéridos com cadeias de diferentes tamanhos de ácidos gordos, que segundo Letchford e Burt (2007) poderá alterar as características de uma nanopartícula. Neste caso, a associação com cadeias de diferentes tamanhos levou a que se formasse uma matriz com estrutura cristalina menos perfeita acomodando em maior quantidade e mais eficazmente o fitoquímico (Sun et al., 2014).

Comparando com a nanopartícula lipídica sólida (NLS) do resveratrol, onde foi usada uma menor percentagem de surfactante face à percentagem de lípidos obteve-se uma nanopartícula de maiores dimensões e de menor eficiência de encapsulação (33.93%) (Jose et al., 2014). Adicionalmente, ao contrário da TNL da quercetina, A NLS do resveratrol foi produzida através de uma homogeneização a alta pressão (Jose *et al.*, 2014) que origina imperfeições na matriz cristalina lipídica, podendo originar uma expulsão precoce do fitoquímico (Igbal et al., 2012) tal como uma baixa capacidade de incorporação do composto (Naseri et al., 2015).

### 3.3.2 Eficácia e segurança

A eficácia e segurança das nanoformulações comercializadas, como o Abraxane®, Marqibo® e Genexol-PM® são superiores às suas formas formulações comerciais que não estão associadas a nanopartículas como o Taxol® e Oncovin® (sulfato de vincristina).

A formulação lipossomal da vincristina (Marqibo) apresenta na sua composição esfingomiéline e colesterol o que torna o lipossoma mais rígido que os lipossomas convencionais, fazendo com que haja uma libertação da vincristina mais lenta e prolongada, promovendo um aumento do tempo de circulação do fitoquímico (Douer, 2016). O volume de distribuição da vincristina lipossomal também é muito menor que o da vincristina convencional, sendo de apenas de 2,0 ml face aos 145 ml da vincristina. O elevado volume de distribuição da vincristina convencional pode limitar a sua concentração máxima e a sua exposição nos tecidos e tumores, o que explica o facto da

vincristina lipossomal aumentar também a concentração do fitoquímico no tumor (Krishna et al., 2001). A vincristina lipossomal diminui a toxicidade e está associada a uma menor percentagem de efeitos adversos que a vincristina convencional, nomeadamente na neutropenia, obstipação, náuseas e pirexia apesar das doses mais elevadas (Douer, 2016), o que pode ser explicado pela elevada eficácia de encapsulação do fitoquímico (superior a 98%) (Krishna et al., 2001).

A formulação do nab-paclitaxel (Abraxane®) diminuiu as reacções de hipersensibilidade e neurotoxicidade aguda do paclitaxel dissolvido em cremophor-EL (Taxol), revelando ser mais seguro (Blair & Deeks, 2015). As propriedades naturais da albumina sem a adição de nenhum solvente ou surfactante para dissolução do paclitaxel, proporcionou uma acumulação mais selectiva e activa do fitoquímico nos tumores, tornando por isso a nanoformulação menos tóxica que o Taxol® para as células saudáveis (Denise, 2008).

Comparativamente à formulação de solubilização cremophor-EL e paclitaxel (Taxol®), estudos *in vitro* demonstraram que o nab-paclitaxel aumenta 9,9 e 4,2 vezes a ligação do paclitaxel às células endoteliais e a sua transcitose, uma vez que o cremofor EL promove uma inibição dose-dependente da glicoproteína 60 (gp60) à albumina, sendo assim o Abraxane® mais eficaz que o Taxol® (Desai et al., 2006). A presença da gp60 e o conhecimento de que em tumores em progressão a albumina é acumulada e usada como a maior fonte de energia e azoto na síntese de novas proteínas (Desai, 2008), veio facilitar a acumulação da nanopartícula nab-paclitaxel dentro do tumor, sendo este um exemplo de como se pode formular uma nanopartícula eficaz num direccionamento activo de um fitoquímico a um tumor (Denise, 2008).

O Lipusu® (lipossoma com paclitaxel) demonstrou *in vivo* um melhor perfil de segurança podendo trazer benefício aos doentes uma vez que não revela tanta toxicidade conseguindo manter na mesma uma actividade anti-proliferativa semelhante à do paclitaxel solubilizado em cremophor-EL (Wang et al., 2013). Para uma mesma dosagem de Taxol® (30 mg/Kg) apresentou reacções de hipersensibilidade muito ténues, assim como apresentou uma dose letal superior à do Taxol® (69.82 mg/Kg e 33 mg/Kg, respectivamente).

O Genexol-PM® (micela polimérica com paclitaxel) apresenta vantagens face ao Taxol® como uma maior dose tolerada (50 mg/Kg e 26 mg/Kg, respectivamente), um

maior limite de toxicidade (205,4 mg/Kg e 8,3 mg/Kg, respectivamente) e uma eficácia anti-tumoral bastante semelhante à do Taxol® o que faz com que a nanoformulação micelar de paclitaxel seja também uma boa alternativa de terapêutica (Kim et al., 2001).

## 4. Conclusão

A utilização de fitoquímicos, aplicados através da nanotecnologia, na terapia oncológica tem vindo a demonstrar um crescente interesse no benefício clínico dos doentes, principalmente quando aliados a regimes quimioterapêuticos já existentes que são aplicados em protocolos hospitalares, aumentando a potência do fitoquímico, a eficácia dos regimes e a sobrevivência dos pacientes. Outros fitoquímicos com aplicação em nanotecnologia, maioritariamente em fase de avaliação pré-clínica, apresentaram todos resultados positivos encontrando-se em progresso o estudo das suas futuras aplicações clínicas.

Vários fitoquímicos, quando associados a nanopartículas, evidenciam propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas mais vantajosas face ao seu uso na forma convencional, o que se reflecte no benefício clínico observado em ensaios clínicos.

Os principais problemas associados aos fitoquímicos actualmente em uso são a sua toxicidade, a sua baixa solubilidade aquosa e rápida eliminação pelo organismo. A utilização de nanopartículas poderá ultrapassar a limitação de utilização destes fármacos em doses sub-óptimas, que não exibem qualquer benefício na vida dos pacientes, ou em doses excessivas que acarretam efeitos adversos graves, como a mielosupressão e neurotoxicidade (Silverman & Deitcher, 2013). As nanoformulações biodegradáveis e biocompatíveis, à base de lípidos, têm sido as mais usadas (Riehemann et al., 2012), aumentando o tempo de permanência do fitoquímico no organismo e a sua concentração no tumor. Por outro lado o estudo de novos fitoquímicos anti-tumorais menos tóxicos e com encapsulação pode ultrapassar questões de eficácia e segurança.

O direccionamento passivo da formulação de vincristina lipossomal comprovou ter eficácia em células de linhagem cancerígena resistentes à quimioterapia, um dos maiores problemas dos agentes quimioterapêuticos sintéticos (Leonetti et al., 2004). No entanto, o direccionamento activo aos tumores dos fitoquímicos anticancerígenos, origina melhores resultados do que o direccionamento passivo, porque é possível tornar a quimioterapia mais selectiva tendo em conta a afinidade de certas moléculas, como o folato ou albumina, para determinado receptor expresso nas células cancerígenas. O nab-paclitaxel é um exemplo de sucesso do uso da nanotecnologia nos fitoquímicos através de um direccionamento activo.

O estudo do aumento da eficácia dos fitoquímicos, pode contribuir para novas linhas de orientação de protocolos quimioterapêuticos mais eficazes de forma a aumentar não só a qualidade de vida dos doentes, mas também a sua sobrevida como está a ser evidenciado pela nanoformulação lipossomal de irinotecano no cancro do pâncreas (Ko, 2016).

## Bibliografia

Alvarado-Luna, G., & Morales-Espinosa, D. (2016). Treatment for small cell lung cancer, where are we now? A review. *Translational Lung Cancer Research*, 5(1), 26–38. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.13>

Amaral, M. H., Estanqueiro M. (2015). Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: state of art, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.12.041>

Amin, A., Gali-Muhtasib, H., Ocker, M., Schneider-Stock R. (2009). Overview of Major Classes of Plant-Derived Anticancer Drugs. *International Journal of Biomedical Sciences*, 5(1), 1–11. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3297>

Anthony, L. (2007). Irinotecan toxicity. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 1(1), 35–9. <http://doi.org/10.1097/SPC.0b013e328133f2ad>

Anwer, K., Al-mansoor, M. A., Jamil, S., Al-shdefat, R. I., Ansari, M. N., & Shakeel, F. (2016). Development and evaluation of PLGA polymer based nanoparticles of quercetin. *International Journal of Biological Macromolecules*. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.002>

Aqil, F., Munagala, R., Jeyabalan, J., & Vadhanam M. V. (2014). Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. *Cancer Letters*, 334(1), 133–141. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.032.Bioavailability>

Arca, A., Marceddu, S., Bandiera, P., Uzzau, S., & Sechi, M. (2011). Targeted Biocompatible Nanoparticles for tie Delivery of ( - ) -Epigallocatechin 3-Gallate to Prostate Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(Outubro 2015), 1321–1332. <http://doi.org/10.1021/jm1013715>

Baldwin, E. L., & Osheroff, N. (2005). Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents*, 5(615), 363–372. <http://doi.org/10.2174/1568011054222364>

Bathaie, S. Z., Faridi, N., Nasimian, A., Heidarzadeh, H., & Tamanoi, F. (2015). *How Phytochemicals Prevent Chemical Carcinogens and / or Suppress Tumor Growth ? Mechanism of the Anticancer Effect of Phytochemicals* (1<sup>a</sup> ed., Vol. 37). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/bs.enz.2015.06.003>

Battaglia, L., & Gallarate, M. (2012). Lipid nanoparticles : state of the art , new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert Opin. Drug Delivery*, 9(5), 497–508. <http://doi.org/10.1517/17425247.2012.673278>

Bishayee, A., & Sethi, G. (2016). Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. *Seminars in Cancer Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.semancer.2016.08.006>

Blair, H. A., & Deeks, E. D. (2015). Albumin-Bound Paclitaxel: A Review in Non-Small Cell Lung Cancer. *Drugs*, 75(17), 2017–2024. <http://doi.org/10.1007/s40265-015-0484-9>

Borel, T., & Sabliov, C. M. (2014). Nanodelivery of Bioactive Components for Food Applications : Types of Delivery Systems , Properties , and Their Effect on ADME Profiles and Toxicity of Nanoparticles. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 197–216. <http://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092354>

Bouffet, E., Jakacki, R., Goldman, S., Hargrave, D., Hawkins, C., Shroff, M., ... Baruchel, S. (2012). Phase II study of weekly vinblastine in recurrent or refractory pediatric low-grade glioma. *Journal of Clinical Oncology*, 30(12), 1358–1363. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.5843>

Brandão, H. N., & David, J. M. (2010). Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. *Química Nova*, 33(6), 1359–1369. Retirado de [http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol33No6\\_1359\\_25-RV09637.pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol33No6_1359_25-RV09637.pdf)

Buckner, J. C., Gesme, D., O'Fallon, J. R., Hammack, J. E., Stafford, S., Brown, P. D., ... Jenkins, R. (2003). Phase II trial of procarbazine, lomustine, and vincristine as initial therapy for patients with low-grade oligodendroglioma or oligoastrocytoma: Efficacy and associations with chromosomal abnormalities. *Journal of Clinical Oncology*, *21*(2), 251–255. <http://doi.org/10.1200/JCO.2003.06.023>

Cairncross, G., Wang, M., Shaw, E., Jenkins, R., Brachman, D., Buckner, J., ... Mehta, M. (2013). Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: Long-term results of RTOG 9402. *Journal of Clinical Oncology*, *31*(3), 337–343. <http://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.2674>

Chang, K. L., Tan, B., Chang, K.-L., Lim, B. K., & Chiu, G. N. (2012). Perorally active nanomicellar formulation of quercetin in the treatment of lung cancer. *International Journal of Nanomedicine*, *7*, 651–661. <http://doi.org/10.2147/IJN.S26538>

Chinembiri, T. N., Du Plessis, L. H., Gerber, M., Hamman, J. H., & Du Plessis, J. (2014). Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. *Molecules* (Vol. 19). <http://doi.org/10.3390/molecules190811679>

Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. G., & Shin, D. M. (2008). Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin Cancer Res*, *14*(5), 1310–1317. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1441>

ClinicalTrials.gov. (2016). Acedido a 20 de Setembro de 2016, disponível em <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=genexol&Search=Search>.

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, *100*(1-2), 72–79. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.011>

Danafar, H., Pharmaceutical, Z., & Res, D. (2016). Applications of Copolymeric Nanoparticles in Drug Delivery Systems. *Drug Res*. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-109865>

Desai, N., Trieu, V., Yao, Z., Louie, L., Ci, S., Yang, A., ... Soon-Shiong, P. (2006). Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clinical Cancer Research*, 12(4), 1317–1324. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1634>

Desai, N. (2008). Nab Technology: A Drug Delivery Platform Utilising Endothelial gp60 Receptor-based Transport and Tumour-derived SPARC for Targeting. Retirado de <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/EnforcementActivitiesbyFDA/WarningLettersandNoticeofViolationLetterstoPharmaceuticalCompanies/UCM289191.pdf>

De Iuliis, F., Taglieri, L., Salerno, G., Lanza, R., & Scarpa, S. (2015). Taxane induced neuropathy in patients affected by breast cancer: Literature review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 96(1), 34–45. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.04.011>

de Pace, R. C. C., Liu, X., Sun, M., Nie, S., Zhang, J., Cai, Q., ... Wang, S. (2013). Anticancer activities of (-)-epigallocatechin-3-gallate encapsulated nanoliposomes in MCF7 breast cancer cells. *Journal of Liposome Research*, 23(3), 187–96. <http://doi.org/10.3109/08982104.2013.788023>

Dosio, F., Brusa, P., Crosasso, P., Arpicco, S., & Cattel, L. (1997). Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel – albumin conjugate. *J Control Release*, 47(3), 293–304. [http://doi.org/0168-3659/97/\\$17.00](http://doi.org/0168-3659/97/$17.00)

Douer, D. (2016). Efficacy and Safety of Vincristine Sulfate Liposome Injection in the Treatment of Adult Acute Lymphocytic Leukemia. *The Oncologist*, 21, 840–847. [http://doi.org/1083-7159/2016/\\$20.00/0](http://doi.org/1083-7159/2016/$20.00/0)

Eckardt, J. R., Von Pawel, J., Papai, Z., Tomova, A., Tzekova, V., Crofts, T. E., ... Ross, G. (2006). Open-label, multicenter, randomized, phase III study comparing oral topotecan/cisplatin versus etoposide/cisplatin as treatment for chemotherapy-naïve patients with extensive-disease small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(13), 2044–2051. <http://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.3332>

Elkhodiry, M. A., Momah, C. C., Suwaidi, S. R., Gadalla, D., Martins, A. M., Vitor, R. F., & Hussein, G. A. (2016). Ultrasound-Triggered Drug Delivery in Cancer Treatment. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(1), 1–18. <http://doi.org/10.1166/jnn.2016.11124>

EMA. (2016). Resumo das Características do Medicamento - docetaxel. Acedido a 3 de Agosto de 2016, disponível em [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002539/WC500128368.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002539/WC500128368.pdf)

ESMO. (2016). Esmo Clinical Practice Guidelines. Acedido a 30 Outubro de 2016, disponível em <http://www.esmo.org/Guidelines>

Feldman, D. R. (2008). Medical Treatment of Advanced Testicular Cancer. *Jama*, 299(6), 672. <http://doi.org/10.1001/jama.299.6.672>

Felix, C. A. (2001). Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors. *Medical and Pediatric Oncology*, 36(5), 525–535. <http://doi.org/10.1002/mpo.1125>

Ferguson, P. J., Phillips, J. R., Seiner, M., & Cass, C. E. (1984). Differential Activity of Vincristine and Vinblastine against Cultured Cells. *Cancer Research*, 44(8), 3307–3312.

Feugier, P. (2005). Long-Term Results of the R-CHOP Study in the Treatment of Elderly Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Journal of Clinical Oncology*, 23(18), 4117–4126. <http://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.131>

Fujita, K. I., Kubota, Y., Ishida, H., & Sasaki, Y. (2015). Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 21(43), 12234–12248. <http://doi.org/10.3748/wjg.v21.i43.12234>

Gherzi, D., Willson, M. L., Chan, M. M. ing K., Simes, J., Donoghue, E., & Wilcken, N. (2015). Taxane-containing regimens for metastatic breast cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6(6), CD003366. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD003366.pub3>

Gradishar, W. J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., ... O'Shaughnessy, J. (2005). Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31), 7794–7803. <http://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.937>

Gradishar, W. J., Krasnojon, D., Cheporov, S., Makhson, A. N., Manikhas, G. M., Clawson, A., ... Iglesias, J. (2012). Phase II trial of nab-paclitaxel compared with docetaxel as first-line chemotherapy in patients with metastatic breast cancer: Final analysis of overall survival. *Clinical Breast Cancer*, 12(5), 313–321. <http://doi.org/10.1016/j.clbc.2012.05.001>

Grattoni, A., Ziemys, A., Bouamrani, A., Hu, T., Shivakumar, I., Rosa, E. De, ... Landry, M. (2010). Enabling individualized therapy through nanotechnology. *Pharmacol Res*, 62(2), 57–89. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.12.011.Enabling>

Greenwell, M., & Rahman, P.K.S.M. (2015). Europe PMC Funders Group Medicinal Plants : Their Use in Anticancer Treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(10), 4103–4112. [http://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(10\).4103-12.Medicinal](http://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4103-12.Medicinal)

Grijalvo, S., Mayr, J., Eritja, R., & Díaz, D. D. (2016). Biodegradable liposome-encapsulated hydrogels for biomedical applications: a marriage of convenience. *Biomaterials Science*. <http://doi.org/10.1039/C5BM00481K>

Hagemeister, F., Rodriguez, M. A., Deitcher, S. R., Younes, A., Fayad, L., Goy, A., ... Cabanillas, F. (2013). Long term results of a phase 2 study of vincristine sulfate liposome injection (Marqibo®) substituted for non-liposomal vincristine in cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone with or without rituximab for

patients with untreated aggressive non-Hodgkin lymphomas. *British Journal of Haematology*, 162(5), 631–638. <http://doi.org/10.1111/bjh.12446>

Hersh, E. M., O'Day, S. J., Ribas, A., Samlowski, W. E., Gordon, M. S., Shechter, D. E., ... Gonzalez, R. (2010). A phase 2 clinical trial of nab-Paclitaxel in previously treated and chemotherapy-naive patients with metastatic melanoma. *Cancer*, 116(1), 155–163. <http://doi.org/10.1002/cncr.24720>

Hotte, S. J., Mayhew, L. A., Jewett, M., Chin, J., & Winkquist, E. (2010). Management of Stage I Non-seminomatous Testicular Cancer: a Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Oncology*, 22(1), 17–26. <http://doi.org/10.1016/j.clon.2009.09.005>

Hume, D. A. (2006). The mononuclear phagocyte system. *Current Opinion in Immunology*, 18, 49–53. <http://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.008>

INFARMED. (2016). Resumo das Características do Medicamento. Acedido a 3 de Agosto de 2016, disponível em [http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=47209&tipo\\_doc=rcm](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=47209&tipo_doc=rcm)

Iqbal, A., Sahni, J. K., Baboota, S., Dang, S., & Ali, J. (2012). Nanostructured lipid carriers system : Recent advances in drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 20(10), 813–830. <http://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716845>

Iriti, M., & Varoni, E. M. (2013). Chemopreventive potential of flavonoids in oral squamous cell carcinoma in human studies. *Nutrients*, 5(7), 2564–2576. <http://doi.org/10.3390/nu5072564>

Jaiswal, P., Gidwani, B., & Vyas, A. (2014). Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology (Print)*,(Janeiro), 1–14. <http://doi.org/10.3109/21691401.2014.909822>

Johnson, I. T., & Johnson, I. T. (2012). Phytochemicals and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66, 207–215. <http://doi.org/10.1017/S0029665107005459>

Jose, S., Anju, S. S., Cinu, T. A., Aleykutty, N. A., Thomas, S., & Souto, E. B. (2014). In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 474(1–2), 6–13. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.003>

Jung, K.-H., Lee, J. H., Park, J. W., Quach, C. H. T., Moon, S.-H., Cho, Y. S., & Lee, K.-H. (2015). Resveratrol-loaded polymeric nanoparticles suppress glucose metabolism and tumor growth in vitro and in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*, 478(1), 251–257. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.049>

Khan S., Baboota S., & Narang RS, N. J. (2015). Nanostructured lipid carriers: An emerging platform for improving oral bioavailability of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 5(4), 182. <http://doi.org/10.4103/2230-973X.167661>

Kamal, A., Ali Hussaini, S. M., Rahim, A., & Riyaz, S. (2015). Podophyllotoxin derivatives: a patent review (2012 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25(9), 1025–1034. <http://doi.org/10.1517/13543776.2015.1051727>

Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T., & Takaori, K. (2016). Pancreatic cancer. *Lancet*, 388(10039), 73–85. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00141-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00141-0)

Kim, S. C., Kim, D. W., Shim, Y. H., Bang, J. S., Oh, H. S., Kim, S. W., & Seo, M. H. (2001). In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: Toxicity and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 72(1-3), 191–202. [http://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00275-9](http://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00275-9)

Khodabandehloo, H., Zahednasab, H., & Hafez, A. A. (2016). Nanocarriers Usage for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Iranian J Cancer Prevention*, 9(2). <http://doi.org/10.17795/ijcp-3966.Review>

- Khosropanah, M.H. , Dinarvand, A. , Nezhadhosseini, A., Haghghi. A., Hashemi, S., Nirouзад, F., Khatamsaz, S. , Entezari, M., Hashemi, M., & Dehghani, H. (2016). Analysis of the antiproliferative effects of curcumin and nanocurcumin in MDA-MB231 as a breast cancer cell line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15(1), 231. Disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/cochranelibrary/search/>
- Ko, A. H. (2016). Nanomedicine developments in the treatment of metastatic pancreatic cancer: Focus on nanoliposomal irinotecan. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 1225–1235. <http://doi.org/10.2147/IJN.S88084>
- Koudelka, Š., & Turánek, J. (2012). Liposomal paclitaxel formulations. *Journal of Controlled Release*, 163(3), 322–334. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.09.006>
- Krick, E. L., Cohen, R. B., Gregor, T. P., Salah Griessmayr, P. C., & Sorenmo, K. U. (2013). Prospective Clinical Trial to Compare Vincristine and Vinblastine in a COP-Based Protocol for Lymphoma in Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(1), 134–140. <http://doi.org/10.1111/jvim.12006>
- Krishna, R., Webb, M. S., St. Onge, G., & Mayer, L. D. (2001). Liposomal and Nonliposomal Drug Pharmacokinetics after Administration of Liposome-Encapsulated Vincristine and Their Contribution to Drug Tissue Distribution Properties. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), 1206–1212. Retirado de <http://jpet.aspetjournals.org/content/298/3/1206.abstract>  
<http://jpet.aspetjournals.org/content/298/3/1206.full.pdf>
- Krzyzanowska, J., Czubačka, A., & Oleszek, W. (2010). Dietary phytochemicals and human health. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 698, 74–98. [http://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4\\_7](http://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4_7)
- Kwon, K. H., Barve, A., Yu, S., Huang, M. T., & Kong, A. N. T. (2007). Cancer chemoprevention by phytochemicals: Potential molecular targets, biomarkers and animal models. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(9), 1409–1421. <http://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00694.x>

Landis-piwowar, K. R., & Iyer, N. R. (2014). Cancer Chemoprevention: Current State of the Art Kristin. *Cancer Growth and Metastasis*, 7, 19–25. <http://doi.org/10.4137/CGM.S11288.RECEIVED>

Lee, C., Lee, C., Huang, Y., Yang, C., & Huang, K. (2015). Drug Delivery Systems and Combination Therapy by Using Vinca Alkaloids Drug Delivery Systems and Combination Therapy by Using Vinca Alkaloids. *Cancer Topics in Medicinal Chemistry*, 15, 1491–1500. <http://doi.org/10.2174/1568026615666150414120547>

Lee, S. M., James, L. E., Qian, W., Spiro, S., Eisen, T., Gower, N. H., ... Rudd, R. M. (2009). Comparison of gemcitabine and carboplatin versus cisplatin and etoposide for patients with poor-prognosis small cell lung cancer. *Thorax*, 64(1), 75–80. <http://doi.org/10.1136/thx.2007.093872>

Lemstrova, R., Melichar, B., & Mohelnikova-Duchonova, B. (2016). Therapeutic potential of taxanes in the treatment of metastatic pancreatic cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1–11. <http://doi.org/10.1007/s00280-016-3058-y>

Leonetti, C., Scarsella, M., Semple, S. C., Molinari, A., D'Angelo, C., Stoppacciaro, A., ... Zupi, G. (2004). In vivo administration of liposomal vincristine sensitizes drug-resistant human solid tumors. *International Journal of Cancer*, 110(5), 767–774. <http://doi.org/10.1002/ijc.20174>

Letchford, K., & Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures : micelles , nanospheres , nanocapsules and polymersomes, 65, 259–269. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.11.009>

Li, D., Wu, Z., Martini, N., & Wen, J. (2011). Advanced carrier systems in cosmetics and cosmeceuticals: a review. *Journal of Cosmetic Science*, 62(6), 549–63. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682399>

Liebmann, J. E., Cook, J. a, Lipschultz, C., Teague, D., Fisher, J., & Mitchell, J. B. (1993). Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. *British Journal of Cancer*, 68(6), 1104–1109. <http://doi.org/10.1038/bjc.1993.488>

Lohcharoenkal, W., Wang, L., Chen, Y. C., Rojanasakul, Y., Lohcharoenkal, W., Wang, L., ... Rojanasakul, Y. (2014). Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. *BioMed Research International*, 2014, 1–12. <http://doi.org/10.1155/2014/180549>

Lolkema, P., Jodrell, D. I., & Tuveson, D. A. (2016). nab-paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Discov*, 2(3), 260–269. <http://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0242.nab>

Markman, J. L., Rekechenetskiy, A., Holler, E., & Ljubimova, J. Y. (2013). Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13-14), 1866–1879. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.019>

Martins, S., Sarmiento, B., & Souto, E. B. (2007). Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery – liposomes versus lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 2(4), 595–607. Retirado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18203427>

Ma, P., J. Mumper, R. (2013). Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review. *J Nanomed Nanotechnol*, 4(2), 1–35. <http://doi.org/10.4172/2157-7439.1000164.Paclitaxel>

Mascaux, C., Paesmans, M., Berghmans, T., Branle, F., Lafitte, J. J., Lemaitre, F., ... Sculier, J. P. (2000). A systematic review of the role of etoposide and cisplatin in the chemotherapy of small cell lung cancer with methodology assessment and meta-analysis. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 30(1), 23–36. [http://doi.org/10.1016/S0169-5002\(00\)00127-6](http://doi.org/10.1016/S0169-5002(00)00127-6)

McClements, D. J. (2015). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 219, 27–53. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.002>

Naseri, N., Valizadeh, H., & Zakeri-milani, P. (2015). Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers : Structure , Preparation and Application. *Adv Pharm Bull* , 5(3), 305–313. <http://doi.org/10.15171/apb.2015.043>

Necchi, A., Pond, G. R., Raggi, D., Giannatempo, P., Vogelzang, N. J., Grivas, P., ... Sonpavde, G. (2016). Efficacy and Safety of Gemcitabine Plus Either Taxane or Carboplatin in the First-Line Setting of Metastatic Urothelial Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Genitourinary Cancer*. <http://doi.org/10.1016/j.clgc.2016.05.003>

Nogueira, E., Gomes, A. C., Preto, A., & Cavaco-paulo, A. (2015). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Design of liposomal formulations for cell targeting. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 514–526. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.034>

Nunes, S., Madureira, R., Campos, D., Sarmento, B., & Gomes, A. M. (2015). Solid Lipid Nanoparticles as Oral Delivery Systems of Phenolic Compounds : Overcoming Pharmacokinetic Limitations for Nutraceutical Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <http://doi.org/10.1080/10408398.2015.1031337>

O'Brien, S., Schiller, G., Lister, J., Damon, L., Goldberg, S., Aulitzky, W., ... Kantarjian, H. (2013). High-dose vincristine sulfate liposome injection for advanced, relapsed, and refractory adult philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 31(6), 676–683. <http://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.2309>

Overby, A., Baevre, M. S., Thangstad, O. P., & Bones, A. M. (2015). Disintegration of microtubules in *Arabidopsis thaliana* and bladder cancer cells by isothiocyanates. *Front Plant Sci*, 6(Janeiro), 6. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00006>

Pavillard, V., Agostini, C., Richard, S., Charasson, V., Montaudon, D., & Robert, J. (2002). Determinants of the cytotoxicity of irinotecan in two human colorectal tumor cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 49(4), 329–335. <http://doi.org/10.1007/s00280-001-0416-0>

Panigrahy, D., Kaipainen, A., Butterfield, C. E., Chaponis, D. M., Laforme, A. M., Folkman, J., & Kieran, M. W. (2010). Inhibition of tumor angiogenesis by oral etoposide. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1(5), 739–746. <http://doi.org/10.3892/etm.2010.127>

Phan, V., Walters, J., Brownlow, B., & Elbayoumi, T. (2013). Enhanced cytotoxicity of optimized liposomal genistein via specific induction of apoptosis in breast, ovarian and prostate carcinomas. *Journal of Drug Targeting*, 21(10), 1001–1011. <http://doi.org/10.3109/1061186X.2013.847099>

Pintão, A. M., Pais, M. S., Coley, H., Kelland, L., & Judson, I. (1995). In Vitro and In Vivo Antitumor Activity of Benzyl Isothiocyanate: A Natural Product from *Tropaeolum majus*. *Planta Med*, 61, 233–236. Retirado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7617765>

Pérez-Herrero, E., & Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93(Março), 52–79. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018>

Pradhan, M., Singh, D., & Singh, M. R. (2013). Novel colloidal carriers for psoriasis : Current issues , mechanistic insight and novel delivery approaches. *Journal of Controlled Release*, 170(3), 380–395. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.020>

Ranjan, A. P., Mukerjee, A., Helson, L., Gupta, R., & Vishwanatha, J. K. (2013). Efficacy of Liposomal Curcumin in a Human Pancreatic Tumor Xenograft Model: Inhibition of Tumor Growth and Angiogenesis. *Anticancer Research*, 33(9), 3603–3609.

Riehemann, K., Schneider, S., Luger, T. A., Godin, B., Ferrari, M., & Fuchs, H. (2012). Nanomedicine – challenge and perspectives. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(5), 872–897. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations>

Rougier, P., Van Cutsem, E., Bajetta, E., Niederle, N., Possinger, K., Labianca, R., ... Jacques, C. (1998). Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet*, 352(9138), 1407–1412. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)03085-2](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)03085-2)

Rytting, M. E., Jabbour, E. J., Jorgensen, J. L., Ravandi, F., Franklin, A. R., Kadia, T. M., ... Kantarjian, H. M. (2016). Final results of a single institution experience with a pediatric-based regimen, the augmented Berlin-Frankfurt-Munster, in adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia, and comparison to the hyper-CVAD regimen. *American Journal of Hematology*, 91(8), 819–823. <http://doi.org/10.1002/ajh.24419>

Sarris, A. H., Hagemester, F., Romaguera, J., Rodriguez, M. A., Mclaughlin, P., Tsimberidou, A. M., ... Cabanillas, F. (2000). Original article Liposomal vincristine in relapsed non-Hodgkin ' s lymphomas : Early results of an ongoing phase II trial. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 11, 69–72.

Sionkowska, A. (2011). Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science*, 36(9), 1254–1276. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003>

Silverman, J. A., & Deitcher, S. R. (2013). Marqiboâ (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(3), 555–564. <http://doi.org/10.1007/s00280-012-2042-4>

Sun, M., Nie, S., Pan, X., Zhang, R., Fan, Z., & Wang, S. (2014). Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities in vitro.

*Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 15–24.  
<http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.032>

Sosnik, A., & Raskin, M. M. (2015). Polymeric micelles in mucosal drug delivery : Challenges towards clinical translation. *Biotechnology Advances*.  
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.003>

Tammam, S. N., Azzazy, H. M. E., & Lamprecht, A. (2015). Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(4), 555–577. <http://doi.org/10.1166/jbn.2015.2017>

Trivedi, R., & Kompella, U. (2012). Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: strategies and underlying principles. *Nanomedicine*, 100(2), 130–134.  
<http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations>

Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., ... Renschler, M. F. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England Journal of Medicine*, 369(18), 1691–703.  
<http://doi.org/10.1056/NEJMoa1304369>

Van Den Bent, M. J., Brandes, A. A., Taphoorn, M. J. B., Kros, J. M., Kouwenhoven, M. C. M., Delattre, J. Y., ... Hoang-Xuan, K. (2013). Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: Long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *Journal of Clinical Oncology*, 31(3), 344–350. <http://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.2229>

Van Den Bent, M. J., Bromberg, J. E. C., & Buckner, J. (2016). Low-grade and anaplastic oligodendroglioma. *Handbook of Clinical Neurology* (1<sup>a</sup> ed., Vol. 134). Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00022-0>

Van Vuuren, R. J., Visagie, M. H., Theron, A. E., & Joubert, A. M. (2015). Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76(6), 1101–1112. <http://doi.org/10.1007/s00280-015-2903-8>

Wang, A. Z., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2012). Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. *Annual Review of Medicine*, 63, 185–98. <http://doi.org/10.1146/annurev-med-040210-162544>

Wang, P., Zhang, L., Peng, H., Li, Y., Xiong, J., & Xu, Z. (2013). The formulation and delivery of curcumin with solid lipid nanoparticles for the treatment of on non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 33(8), 4802–8. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.047>

Wang, J., Zhu, R., Sun, X., Zhu, Y., Liu, H., & Wang, S. (2014). Intracellular uptake of etoposide-loaded solid lipid nanoparticles induces an enhancing inhibitory effect on gastric cancer through mitochondria-mediated apoptosis pathway. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3987–3998. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S64103>

Wang, S., Su, R., Nie, S., Sun, M., Zhang, J., Wu, D., & Moustaid-Moussa, N. (2015). Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *J Nutr Biochem*, 25(4), 363–376. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.002.Application>

Wang, H., Cheng, G., Du, Y., Ye, L., Chen, W., Zhang, L., ... Fu, F. (2013). Hypersensitivity reaction studies of a polyethoxylated castor oil-free, liposome-based alternative paclitaxel formulation. *Molecular Medicine Reports*, 7(3), 947–952. <http://doi.org/10.3892/mmr.2013.1264>

Weissig, V., Pettinger, T. K., & Murdock, N. (2014). Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4357–4373. <http://doi.org/10.2147/IJN.S46900>

Whitehead, R. P., Jacobson, J., Brown, T. D., Taylor, S. A., Weiss, G. R., & Macdonald, J. S. (1997). Phase II trial of paclitaxel and granulocyte colony-stimulating factor in patients with pancreatic carcinoma: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 15(6), 2414–2419. [http://doi.org/0732-183X/97/1506-0025\\$3.00/0](http://doi.org/0732-183X/97/1506-0025$3.00/0)

Wilczewska, A., Niemirowicz, K., Markiewicz, K., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64(5), pp. 1864–1882. [http://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](http://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5)

Yang, J., Bogni, A., Cheng, C., Bleibel, W. K., Cai, X., Yang, W., ... Relling, M. V. (2009). Etoposide Sensitivity Does Not Predict MLL Rearrangements or Risk of Therapy-related Acute Myeloid Leukemia. *Clin Pharmacol Ther*, 84(6), 691–697. <http://doi.org/10.1038/clpt.2008.86.Etoposide>

Yang, S., Hai, F. I., Nghiem, L. D., Price, W. E., Roddick, F., Moreira, M. T., & Magram, S. F. (2013). Absorption, Metabolism, Anti-Cancer Effect and Molecular Targets of Epigallocatechin Gallate (EGCG): An Updated Review, 1–69. <http://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.04.012>

Yu, X., Trase, I., Ren, M., Duval, K., Guo, X., & Chen, Z. (2016). Design of Nanoparticle-Based Carriers for Targeted Drug Delivery. *J Nanomater*. <http://doi.org/10.1155/2016/1087250.Design>

Zamboni, W. C., Torchilin, V., Patri, A., Hrkach, J., Stern, S., Nel, A., ... Grodzinski, P. (2014). Best Practices in Cancer Nanotechnology – Perspective from NCI Nanotechnology Alliance. *Clin Cancer Res*, 18(12), 3229–3241. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2938.Best>

Zatloukal, P., Cardenal, F., Szczesna, A., Gorbunova, V., Moiseyenko, V., Zhang, X., ... Thomas, M. (2010). A multicenter international randomized phase III study comparing cisplatin in combination with irinotecan or etoposide in previously untreated small-cell lung cancer patients with extensive disease. *Annals of Oncology*, 21(9), 1810–1816. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdq036>

Zhang, Z., Mei, L., & Feng, S.S. (2013). Paclitaxel drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(3), 325–40. <http://doi.org/10.1517/17425247.2013.752354>

Zhang, S., Lu, C., Zhang, X., Li, J., Jiang, H., Zhang, S., ... Jiang, H. (2016). Targeted delivery of etoposide to cancer cells by folate-modified nanostructured lipid drug delivery system Targeted delivery of etoposide to cancer cells by folate-modified nanostructured lipid drug delivery system, *Durg Delivery*, <http://doi.org/10.3109/10717544.2016.1141258>

Zhu, J., Zhang, S., Zhang, K., Wang, X., Mays, J. W., Wooley, K. L., & Pochan, D. J. (2013). A block copolymer blend solution construction. *Nature Communications*, 4, 1–7. <http://doi.org/10.1038/ncomms3297>