

Alina Licova

Nanotubos de Carbono na Entrega de Fármacos: Tratamento do Cancro

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Rui Manuel Silva Gomes Barbosa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Alina Licova

Nanotubos de Carbono na Entrega de Fármacos: Tratamento do Cancro

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Rui Manuel Silva Gomes Barbosa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

RESUMO

O cancro continua a ser uma das principais causas de morte no mundo ocidental, no entanto, os tratamentos atuais oferecem uma eficácia limitada com significativos efeitos adversos. Neste sentido, a nanotecnologia focou-se no desenvolvimento de novos materiais capazes de alcançarem o alvo com uma maior especificidade. Surgem, assim, os nanotubos de carbono, potenciais candidatos em sistemas de entrega de biomoléculas na terapia e diagnóstico do cancro. Os nanotubos de carbono apresentam uma estrutura atómica única bem como propriedades elétricas, térmicas e, mecânicas inigualáveis, que os tornam promissores para a entrega de fármacos no local alvo. A capacidade de absorver radiação na região do infravermelho próximo permite que sejam empregues na remoção fototérmica de tumores. Além disso, têm também sido feitos estudos para o seu uso em imunoterapia. Todavia as preocupações relativas à toxicidade nos humanos bem como no meio ambiente devem ser ultrapassadas a fim de poderem ser utilizados em ensaios clínicos e, futuramente, comercializados.

Palavras-chave: nanotecnologia, nanotubos de carbono, terapia do cancro.

ABSTRACT

Cancer remains a leading cause of death in the western world, however, actual treatments offer limited efficacy with extensive secondary effects. Therefore, nanotechnology focused on developing new materials capable of targeting with enhanced specificity. Thus appear carbon nanotubes as potential candidates in drug delivery systems for cancer therapy and diagnosis. Carbon nanotubes have unique atomic structure, as well as unequalled electric, thermal and mechanical properties, making them attractive for drug delivery to the target site. The ability to absorb radiation in near infrared region allows their use in photothermal ablation of tumors. Furthermore, studies have been done for the use of carbon nanotubes in immunotherapy. However concerns related to the toxicity in humans and environment should be overcome in order to use carbon nanotubes in clinical trials and be commercialized in a near future.

Keywords: nanotechnology, carbon nanotubes, cancer therapy.

ÍNDICE

1	CANCRO.....	5
2	NANOTECNOLOGIA.....	6
3	NANOMATERIAIS À BASE DE CARBONO.....	7
4	PROPRIEDADES, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO.....	8
5	APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DOS NANOTUBOS DE CARBONO.....	11
6	USOS NO TRATAMENTO DO CANCRO.....	14
	6.1 VEÍCULOS DE ENTREGA DE FÁRMACOS ANTICANCERÍGENOS.....	14
	6.2 TERAPIA COM NANOTUBOS FUNCIONALIZADOS COM ANTICORPOS E PREENCHIDOS COM METAIS RADIOATIVOS.....	17
	6.3 TERAPIA FOTOTÉRMICA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	20
	6.4 IMUNOTERAPIA.....	24
7	TOXICIDADE DOS NANOTUBOS DE CARBONO.....	25
	7.1 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> E OS FACTORES QUE INFLUENCIAM A TOXICIDADE DOS CNTs.....	25
	7.2 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	26
	7.3 ESTRATÉGIAS PARA DIMINUIR A TOXICIDADE.....	26
8	CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	28
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

CBNs – Nanomateriais à base de carbono

CLSM – Microscopia confocal de varrimento laser

CNTs – Nanotubos de carbono

CVD – Deposição química em fase de vapor

Cy5 – Cianina 5

DWCNTs – Nanotubos de carbono de parede dupla

EAD – Descarga de arco elétrico

FCM – Citometria de fluxo

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FR – Recetores de folato

LA – Ablação por laser

MDR – Células multirresistentes

MWCNTs – Nanotubos de carbono de parede múltipla

NIR – Região do infravermelho próximo

PEG – Polietilenoglicol

P-gp – Glicoproteína-P

SEM – Microscopia eletrónica de varrimento

SWCNTs – Nanotubos de carbono de parede simples

TEM – Microscopia eletrónica de transmissão

TGA – Análise termogravimétrica

I CANCRO

A palavra cancro deriva do grego *karkínos* que significa caranguejo, este termo foi usado pela primeira vez por Hipócrates (460–370 B.C) devido à semelhança entre a vascularização do tumor e as patas do crustáceo (Sudhakar, 2010; American Cancer Society, 2014). O cancro é uma doença na qual as células se dividem de forma descontrolada. Existem vários tipos de cancro, em todos eles as células continuam a crescer e a dividir-se dando origem a células anormais. Alguns tipos de cancro podem deslocar-se para outras partes do corpo através da circulação sanguínea ou dos vasos linfáticos (metástases). No entanto, nem todos os tumores correspondem a cancro podendo ser benignos ou malignos (Sudhakar, 2010). Os tumores benignos, raramente, colocam a vida em risco, e podem ser removidos ou regredirem. Além disso, as células dos tumores benignos não se disseminam para os outros tecidos. Ao invés, os tumores malignos são mais graves, podendo colocar a vida em risco, e apesar de poderem ser removidos, há a possibilidade de voltarem a crescer. As células dos tumores malignos podem invadir e danificar os tecidos e órgãos circundantes. Os fatores de risco mais comuns são o envelhecimento, tabaco, exposição à luz solar e radiação ionizante, determinados agentes químicos, dieta pobre, falta de atividade física ou excesso de peso (Liga Portuguesa Contra o Cancro).

O cancro continua a ser uma das principais causas de morte no mundo ocidental, estando associado a custos consideráveis para a sociedade (Fonseca *et al.*, 2014). Em Portugal, a incidência de novos casos de tumores malignos tem vindo a aumentar. Entre 2009 e 2010 observou-se a um aumento de 4% dos casos. O cancro da próstata apresenta maior taxa de incidência, seguido pelo cancro da mama, cólon, traqueia, brônquios, pulmão, estômago e reto (DGES, 2010). Todavia, os tratamentos atuais, designadamente, a quimioterapia, radioterapia e cirurgia oferecem uma eficácia limitada com extensos efeitos adversos, como resultado dos efeitos tóxicos nas células normais (Fonseca *et al.*, 2014). A ação não específica da quimioterapia tem despertado a necessidade de formulações capazes de alcançarem o alvo com uma maior especificidade, menos tóxicas, mais acessíveis e que promovam uma melhoria na qualidade de vida (Ranganathan *et al.*, 2012). No cancro da mama e da próstata pode usar-se hormonoterapia visto que estes tipos são sensíveis à ação de determinadas hormonas (Sudhakar, 2010).

O aparecimento da nanotecnologia trouxe a promessa de revolucionar vários campos, entre as quais a oncologia, propondo sistemas de entrega de fármacos avançados para a terapia do cancro (Fonseca *et al.*, 2014).

2 NANOTECNOLOGIA

O prefixo “*nano*” indica extrema pequenez. Tão pequeno que uma estrutura à escala nanométrica (Figura 1) tem de ser ampliada mais de 10 milhões de vezes para poder ser vista em pormenor a olho nu (Fortunato, 2005). A nanotecnologia é um ramo da ciência de natureza multidisciplinar, relacionada com a física, química, ciência dos materiais e biologia (Merkoã, 2007). Refere-se à compreensão e controlo da matéria ao nível dos átomos e moléculas, ou seja, com dimensões entre 1 e 100 nanómetros. Os materiais com dimensões à nanoescala apresentam propriedades físicas, químicas e biológicas únicas que diferem significativamente dos materiais à escala macroscópica (Ranganathan *et al.*, 2012).

A maior vantagem da nanotecnologia reside no seu potencial em criar novas estruturas com capacidade para atravessar membranas celulares e biomoléculas com solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade aumentadas, melhorando, assim, a eficácia da entrega. Desta forma, a nanotecnologia tem sido empregue em várias aplicações biomédicas, designadamente na bioimagem e na entrega de biomacromoléculas (Vardharajula *et al.*, 2012), mas também tem sido aplicada em áreas como a eletrónica, produção e armazenamento de energia, magnetismo, ótica, tecnologias da informação e no desenvolvimento de materiais (National Cancer Institute).

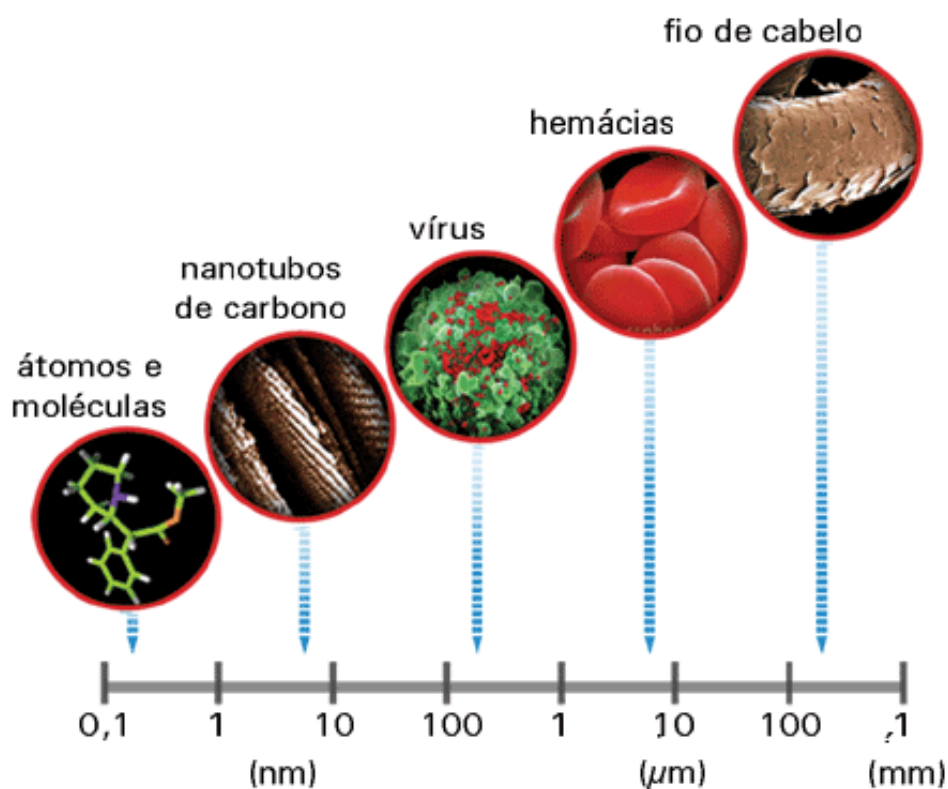


Figura 1 – Escala nanométrica (disponível na Internet: <http://betaeq.blogspot.pt/2014/11/ii-sbeq-nanotecnologia-aplicada.html>).

3 NANOMATERIAIS À BASE DE CARBONO

As várias formas de carbonos (alótropos) identificados até à data incluem minerais que ocorrem naturalmente (e.g. grafite, diamante, carvão) e fulerenos (e.g. *buckyballs*, grafeno, nanotubos de carbono) os quais podem ser artificialmente sintetizados, tendo sido recentemente encontrados também na natureza (Lamberti *et al.*, 2015). A **grafite** é um dos materiais naturais mais antigos e mais largamente usados, sendo tradicionalmente conhecida como o principal constituinte do lápis. Estudos sobre a grafite revelaram que a combinação única das suas propriedades físicas advém da sua estrutura molecular, a qual consiste em camadas empilhadas de átomos de carbono hibridizado em sp^2 (Pierson, [s.d.]). Com o desenvolvimento das técnicas de nanofabricação e o surgimento dos nanomateriais, a grafite começou a ser extensivamente usada como matéria-prima para construir vários tipos de **nanomateriais à base de carbono (CBNs, do inglês carbon-based nanomaterials)**, incluindo nanotubos de parede simples ou de parede múltipla, fulerenos, nanodiamantes e grafeno (Figura 2) (Engineering *et al.*, [s.d.]).

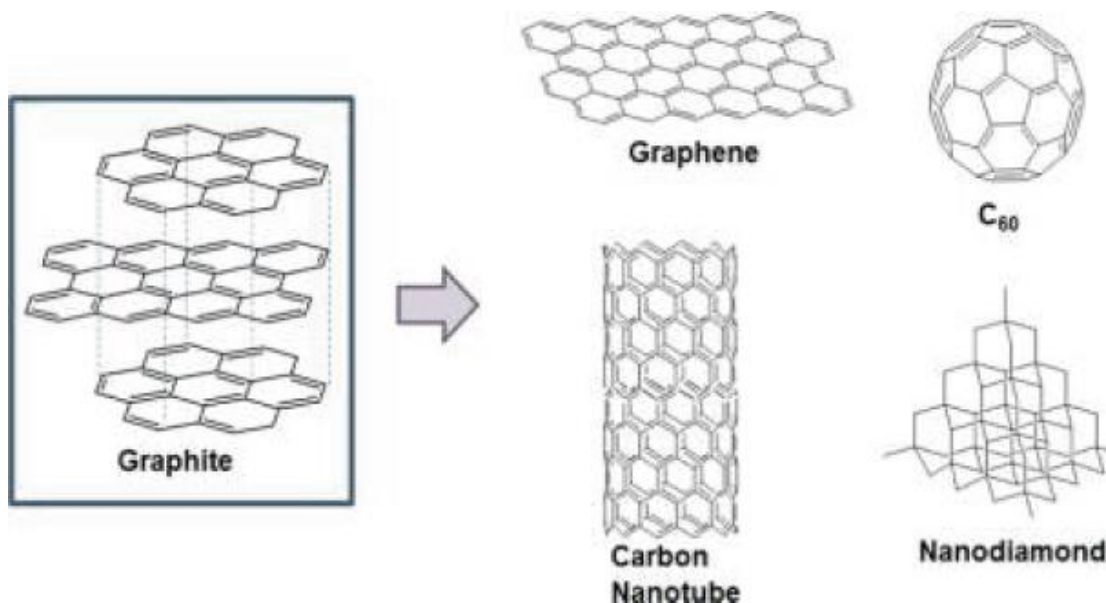


Figura 2 – Vários tipos de nanomateriais à base de carbono (Engineering *et al.*, [s.d.]).

Os CBNs possuem excelente resistência mecânica, condutividade térmica e elétrica, e propriedades espectroscópicas. A maior parte da investigação têm-se focado na utilização destas propriedades em diversas aplicações (Engineering *et al.*, [s.d.]; Pierson, [s.d.]). Os nanomateriais à base de carbono apresentam uma natureza multifuncional, sendo que a incorporação em biomateriais pode aumentar ainda mais as suas funções. Assim, os CBNs têm sido alvo de investigação biomédica, designadamente, em sistemas de entrega de fármacos, no reforço de tecidos, e na marcação celular e tecidual (Engineering *et al.*, [s.d.]).

4 PROPRIEDADES, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO

Desde a sua descoberta, em 1991, por Iijima (He *et al.*, 2013), os **nanotubos de carbono (CNTs)**, do inglês *carbon nanotubes* têm sido amplamente explorados para potenciais usos em medicina (Amenta e Aschberger, 2015). Do enrolamento de uma ou mais folhas de **grafeno** resultam estruturas cilíndricas ocas de parede simples (SWCNTs) ou de parede múltipla (MWCNTs), estas folhas de grafeno são constituídas por átomos de carbono arranjados hexagonalmente (Lamberti *et al.*, 2015). A forma cilíndrica e a elevada razão área de superfície/volume conferem-lhes excelentes propriedades de absorção quando comparados com outros nanomateriais, nomeadamente as nanopartículas esféricas (Amenta e Aschberger, 2015). Os SWCNTs são camadas de carbono monocilíndricas com diâmetro situado entre 0.4-2.0 nm. Dependendo da direção dos hexágonos, os nanotubos podem estar organizados em arranjos quirais, em ziguezague ou em *armchair*. Os CNTs de parede dupla (DWCNTs) consistem somente em dois tubos com tamanhos semelhantes aos SWCNTs. Por sua vez, os MWCNTs resultam de múltiplas camadas de grafeno enroladas (tubos concêntricos), os tubos cilíndricos centrais apresentam um diâmetro médio de 1-3 nm enquanto os tubos cilíndricos externos têm 2-100 nm (Figura 3) (Lamberti *et al.*, 2015). Os MWCNTs, ao contrário dos SWCNTs, podem ser produzidos sem ou com catalisadores e têm geralmente um grau de pureza mais elevado e menos defeitos, porém uma vez que os defeitos ocorrem durante a síntese, torna-se mais difícil de os aperfeiçoar. Todavia os SWCNTs necessitam de catalisadores para a sua síntese, e normalmente contêm mais impurezas metálicas, sendo mais propensos a defeitos durante a funcionalização (Amenta e Aschberger, 2015).

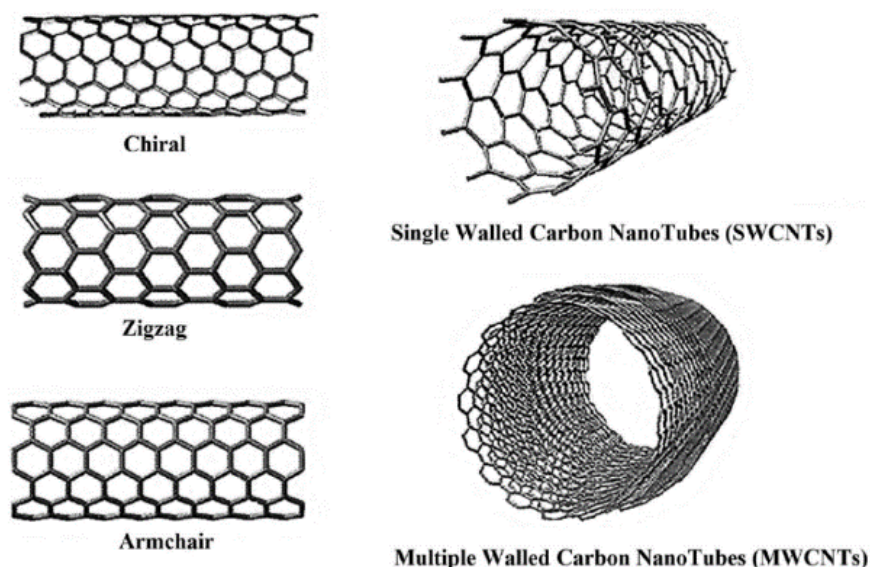


Figura 3 – Nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) e os seus diferentes arranjos, e nanotubos de parede múltipla (MWCNTs) (Lamberti *et al.*, 2015).

Tal como foi referido anteriormente os CNTs têm uma estrutura atómica única bem como propriedades mecânicas, térmicas, magnéticas, óticas e elétricas excepcionais (Vardharajula *et al.*, 2012). As propriedades elétricas e óticas decorrem não só do carbono sp^2 , mas também das propriedades físicas, nomeadamente, o diâmetro, o comprimento, parede simples *versus* parede múltipla, a funcionalização da superfície, e a quiralidade (Engineering *et al.*, [s.d.]). Os CNTs podem ser quimicamente modificados para apresentar porções específicas (grupos funcionais, moléculas e polímeros) a fim de conferir propriedades adequadas às aplicações biológicas, nomeadamente, elevada solubilidade e biocompatibilidade, capacidade de resposta celular, melhorada compatibilidade material (Bianco *et al.*, 2005). Os CNTs são relativamente flexíveis e interagem com as membranas celulares penetrando nas células e, dependendo do seu tamanho são capazes de entrar no núcleo permitindo, assim, a entrega de fármacos a nível celular e nuclear. Também apresentam elevada resistência devido ao carácter sp^2 das ligações C-C e densidade muito baixa ($1,3 \text{ g/cm}^3$) o que os torna materiais extremamente leves, estas características são uteis para a sua aplicação na reparação tecidual e outras aplicações médicas (Amenta e Aschberger, 2015).

A síntese dos CNTs pode ser feita através de diversas técnicas, entre as quais, descarga de arco elétrico (EAD), deposição de vapor químico de grafite (CVD) e ablação por laser (LA). Independentemente do método de síntese utilizado, os CNTs têm que ser purificados por oxidação (para remoção das impurezas carbonáceas) ou através de tratamento ácido (para remoção das impurezas metálicas), por vezes são usados tratamentos com ultrassons para encurtar os CNTs ou para melhorar a sua dissolução. As impurezas e imperfeições estruturais são responsáveis pela toxicidade dos CNTs. Assim, os CNTs usados em aplicações biomédicas devem estar isentos de impurezas e não apresentar danos estruturais (Amenta e Aschberger, 2015).

Diferentes materiais e moléculas podem ser incorporados no interior da estrutura dos CNTs através da difusão/inserção ou endocitose, ou anexados à sua superfície a fim de se alcançar uma determinada ação terapêutica. Podem ser usadas várias moléculas ao mesmo tempo obtendo-se, assim, sistemas multifuncionais (Figura 4), como por exemplo, sistemas de entrega capazes de libertar um determinado fármaco num alvo específico sendo simultaneamente possível rastreá-lo no interior do organismo. Isto é conseguido através da incorporação de um agente de contraste adicional (Amenta e Aschberger, 2015). O método de internalização é mais eficaz, pois o fármaco conjugado é degradado no interior das células, sendo aí libertado o agente farmacológico. Ao passo que quando está ligado à superfície do CNT o fármaco pode ser degradado nos fluidos fisiológicos antes de ser

internalizado (Hirlekar *et al.*, 2009). Além disso, a capacidade de absorver radiação na região do infravermelho próximo permite que os CNTs sejam usados na destruição fototérmica dos tumores (Huang *et al.*, 2008).

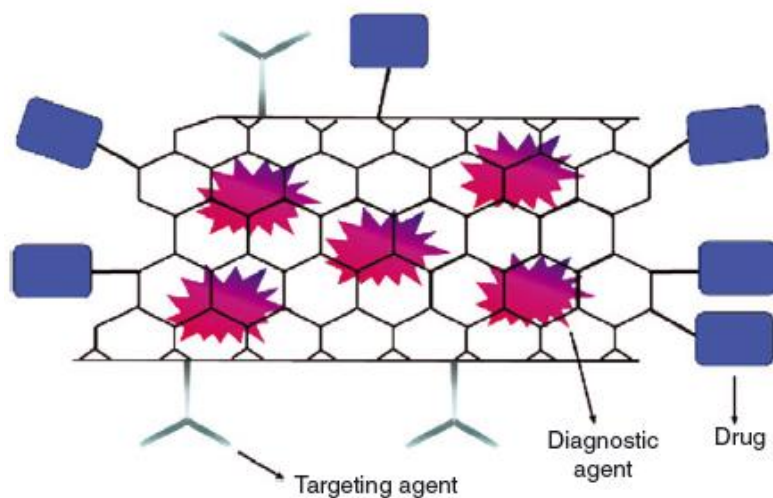


Figura 4 – Representação esquemática de um sistema multifuncional com função terapêutica e de diagnóstico. Na cavidade interna está o agente de diagnóstico e à superfície está ligado um agente que reconhece o alvo (recetor químico ou anticorpo) bem como o fármaco conjugado através de um ligante clivável (Amenta e Aschberger, 2015).

A caracterização dos CNTs pode ser feita através de espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de transmissão (TEM), microscopia eletrônica de varrimento (SEM) e ainda através de análise termogravimétrica (TGA). A espectroscopia Raman permite o *screening* rápido e fiável da presença de SWCNTs. Por sua vez, a TEM possibilita a avaliação detalhada das estruturas, enquanto a SEM permite uma visão geral. Por fim, a TGA fornece informações sobre a abundância relativa das partículas do catalisador, nanotubos de carbono e de outras estruturas carbonáceas (Hirlekar *et al.*, 2009).

5 APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DOS NANOTUBOS DE CARBONO

Desde o início do século XXI, os CNTs foram introduzidos na farmácia e na medicina em sistemas de entrega de agentes terapêuticos, uma vez que têm a capacidade de transportar biomoléculas, através das membranas celulares, mantendo-as intactas durante o transporte e internalização nas células (He *et al.*, 2013; Lamberti *et al.*, 2015). Por conseguinte, os CNTs são materiais promissores para várias aplicações biológicas, entre as quais **veículos para a entrega de fármacos**, particularmente, no tratamento do cancro (Mundra *et al.*, 2014), mas também no desenvolvimento de novos agentes de diagnóstico ou como fontes de raio-X para imagiologia (Amenta e Aschberger, 2015). É de salientar ainda o seu uso como **estruturas de apoio** (*scaffolds*) em culturas de células tronco e no desenvolvimento de **biossensores**. Para além disso, a associação de CNTs com proteínas levou ao desenvolvimento de **nanocompósitos** com propriedades antimicrobianas (Figura 5) (Mundra *et al.*, 2014).

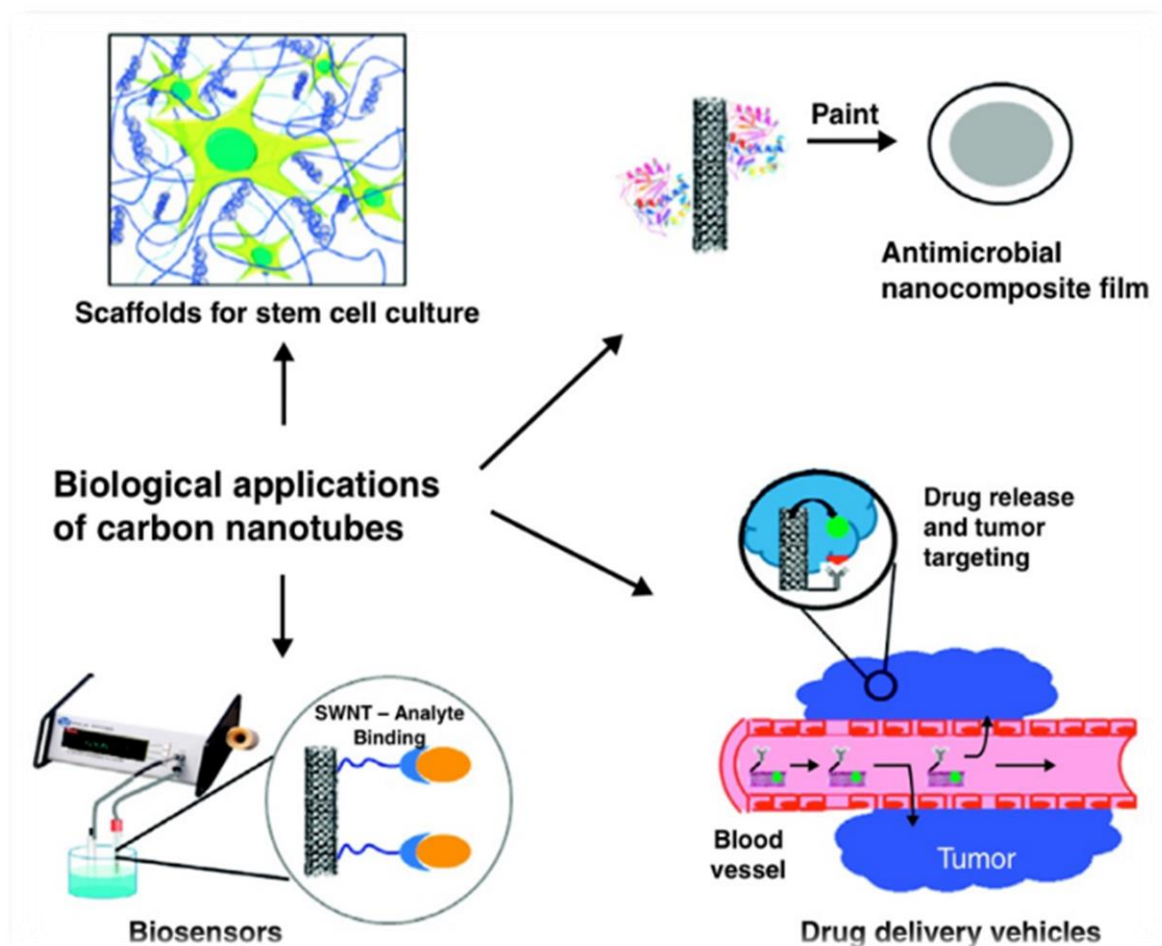


Figura 5 – Aplicações biológicas dos nanotubos de carbono (Mundra *et al.*, 2014).

Os CNTs não funcionalizados são de difícil dispersão (Vardharajula *et al.*, 2012) e insolúveis em solução aquosa por causa da sua superfície altamente hidrofóbica (Amenta e Aschberger, 2015; He *et al.*, 2013). A falta de solubilidade tem sido uma barreira para o seu uso em aplicações biológicas e biomédicas (Hirlekar *et al.*, 2009). Assim, de forma a ultrapassar esse problema as modificações na superfície ou a funcionalização assumem um papel crucial na melhoria das propriedades físico-químicas e de superfície (Vardharajula *et al.*, 2012). Com o desenvolvimento de técnicas de funcionalização expandiu-se ainda mais a gama de potenciais aplicações dos CNTs, devido à melhoria de algumas propriedades, designadamente, aumento da solubilidade e biocompatibilidade, diminuída tendência para formar aglomerados e aumento da dispersão, resultando num efeito citotóxico menor (Vardharajula *et al.*, 2012). A funcionalização é o processo que permite a conjugação de várias moléculas à superfície (funcionalização exohedral) ou no interior dos CNTs (funcionalização endohedral). Os CNTs podem ser funcionalizados com fármacos antineoplásicos, proteínas, ADN, oligonucleótidos, polímeros e surfatantes (Amenta e Aschberger, 2015; Vardharajula *et al.*, 2012). Assim, dependendo da natureza das biomoléculas, a funcionalização poderá ser feita com base em ligações covalentes ou não covalentes (He *et al.*, 2013). Os CNTs interagem de forma não covalente através de interações fracas, tais como, adsorção, interações π - π , ligações de hidrogénio, interações electrostáticas e forças de *Van der Waals*, o que aumenta a miscibilidade dos CNTs em água tornando-os menos tóxicos. A **funcionalização exohedral** pode ser conseguida tanto por adsorção não covalente como por ligação covalente. A funcionalização covalente é normalmente feita por reações de cicloadição ao carbono sp^2 ou por tratamento ácido (por exemplo, HNO_3) para dar origem a grupos carboxílicos, os quais poderão, posteriormente, ser funcionalizados. A **funcionalização endohedral** permite a incorporação de várias moléculas, entre as quais fármacos antineoplásicos, os fármacos alcançam o interior dos CNTs por capilaridade, sendo retidos por forças *Van der Waals* e interações π - π entre as moléculas e as paredes dos CNTs (Amenta e Aschberger, 2015).

Como foi mencionado anteriormente os MWCNTs apresentam um diâmetro maior comparativamente aos SWCNTs possibilitando, assim, a incorporação de um número mais elevado de moléculas. A libertação dos fármacos do interior dos CNTs parece ser estritamente dependente do diâmetro. Quanto maiores forem os CNTs, mais fortes serão as interações entre as moléculas e as paredes dos CNTs e, conseqüentemente menos eficiente será a libertação do fármaco. Portanto, para que os CNTs possam ser usados como veículos na entrega de fármacos devem ser concebidos sistemas nos quais o fármaco seja

bem armazenado na cavidade interna, mas libertado eficazmente no local alvo (Amenta e Aschberger, 2015). Contudo, os CNTs funcionalizados tornam-se hidrofílicos e disponíveis para serem combinados com fármacos ou biomoléculas (He *et al.*, 2013).

O uso dos CNTs para o desenvolvimento de aplicações na terapia requer a compreensão do seu percurso no organismo humano, ou seja, o seu **perfil ADME** (absorção, distribuição, metabolização e excreção). A via de administração permite determinar quais os tecidos onde os CNTs se acumulam e as potenciais reações tóxicas. Quando a administração é feita por via intravenosa, pode considerar-se 100% de **absorção**, visto que o fármaco fica completamente disponível na corrente sanguínea. Porém, quando a administração é por via oral o fármaco é absorvido pela barreira gastrointestinal antes de atingir a corrente sanguínea e o local alvo. Apesar de existirem vários estudos, a **distribuição** ainda não é bem conhecida, pois os estudos não são facilmente comparáveis e, por vezes, fornecem resultados contraditórios. Estudos toxicológicos após administração intravenosa de CNTs mostraram que estes se distribuem por vários órgãos, acumulando-se maioritariamente, no fígado, pulmões e baço (Amenta e Aschberger, 2015). No que diz respeito ao **metabolismo** não existe muita informação. O facto de causar granulomas após administração indica que têm tendência a acumular-se nos macrófagos. Contrariamente, num estudo foi demonstrado que os SWCNTs podem ser biodegradados pela enzima mieloperoxidase, presente nos neutrófilos dos ratinhos, a ação da mieloperoxidase (conversão dos CNTs em água e dióxido de carbono) pode ser bastante promissora em sistemas de entrega de fármacos (He *et al.*, 2013). Vários estudos referem que a **eliminação** dos CNTs ocorre predominantemente através do fígado e da biliar, enquanto outros referem que também pode ser através dos rins. O comprimento, a funcionalização e o estado de dispersão têm um papel importante na determinação do perfil de eliminação.

Todavia, o uso de CNTs em aplicações biomédicas, diferentemente das outras nanopartículas (lipossomas, fármacos poliméricos e micelas) ainda não atingiu a fase de ensaios clínicos. Isto deve-se principalmente a preocupações relativas à baixa solubilidade em meio aquoso, baixa biodegradabilidade e potencial toxicidade. Portanto, para se proceder ao desenvolvimento e a comercialização de nanotubos requer-se uma análise completa do risco/benefício (Amenta e Aschberger, 2015).

6 USOS NO TRATAMENTO DO CANCRO

As propriedades elétricas, térmicas e espectroscópicas dos CNTs oferecem vantagens a nível da deteção, monitorização e tratamento de doenças (Spinato *et al.*, 2015). Os nanotubos de carbono no tratamento do cancro podem ser usados como **veículos de entrega de fármacos anticancerígenos** ou **de metais radioativos**, como **fontes de calor** e na **imunoterapia** (He *et al.*, 2013; Mundra *et al.*, 2014; Spinato *et al.*, 2015).

6.1 VEÍCULOS DE ENTREGA DE FÁRMACOS ANTICANCERÍGENOS

Os sistemas de entrega de fármacos (Figura 6) contribuem para a melhoria da biodistribuição, redução dos efeitos tóxicos e ainda permitem concentrar o fármaco no tecido alvo. Os CNTs são considerados excelentes veículos para a entrega de fármacos devido às suas propriedades físicas (Amenta e Aschberger, 2015). A elevada área de superfície, a estabilidade química e a estrutura poliaromática são propriedades que os torna capazes de serem conjugados com uma vasta variedade de moléculas terapêuticas de forma a serem transportadas até um alvo específico (He *et al.*, 2013). Essas moléculas podem ser incorporadas na cavidade interna bem como funcionalizadas à superfície. As suas pequenas dimensões permitem-lhes escapar à opsonização bem como à fagocitose e, no caso de entrega de fármacos a células cancerosas os CNTs entram passivamente nos tumores sem a ajuda de anticorpos nem de outras moléculas. Este efeito de permeabilidade e retenção aumentado promove a acumulação do fármaco no tumor (Amenta e Aschberger, 2015; Mundra *et al.*, 2014).

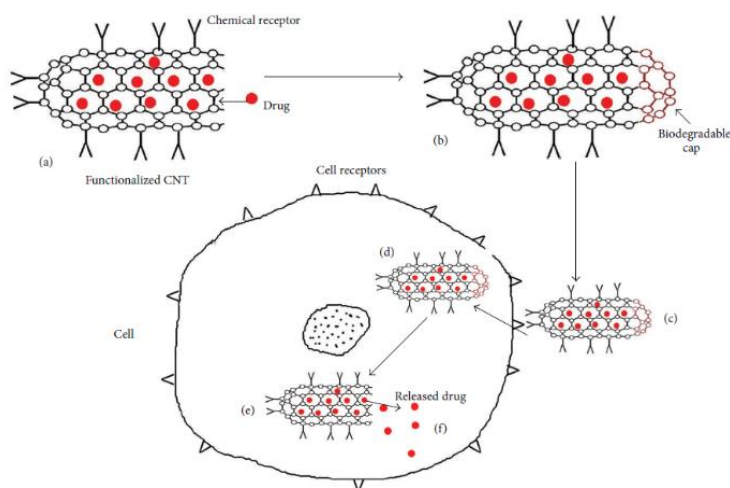


Figura 6 – Representação esquemática do processo de entrega de fármacos. (a) À superfície do CNT encontra-se ligado o recetor químico (Y) e na cavidade interna está o fármaco (.) (b) A extremidade do CNT é tapada (c) O conjugado obtido entra no organismo, alcançando o alvo (d) A célula internaliza o CNT através de endocitose mediada por recetores (e) No interior da célula extremidade é removida ou biodegradada, sendo libertado o fármaco (He *et al.*, 2013).

A resistência à quimioterapia têm sido apontada como obstáculo para a eficácia da terapêutica do cancro. Nas células multirresistentes (MDR) a **glicoproteína-P** (P-gp) está sobreexpressa, sendo esta responsável pelo aumento do efluxo de fármacos anticancerígenos. Assim, para superar o desafio colocado pelas células de leucemia MDR K562 foi feito um estudo no qual os SWCNTs foram carregados com **doxorubicina** (DOX), e funcionalizados com um anticorpo para a glicoproteína-P (Mundra *et al.*, 2014). A DOX pertence ao grupo das antraciclinas e está indicada no tratamento de **diversos tumores, incluindo o linfoma não-Hodgkin agressivo**, no entanto, é altamente tóxica e pode conduzir a supressão da hematopoiese, toxicidade gastrointestinal e cardíaca (Liu, Z. *et al.*, 2010). Os nanotubos obtidos reconheceram especificamente as células de leucemia MDR K562, tendo demonstrado um carregamento eficaz e uma libertação controlada de DOX. Estes resultados foram confirmados por citometria de fluxo (FCM) e microscopia confocal de varrimento laser (CLSM). Quando comparado com a DOX livre verificou-se uma maior citotoxicidade sobre as células MDR K562 e uma supressão significativa da proliferação celular (Mundra *et al.*, 2014).

A incorporação de DOX em SWCNTs funcionalizados com PEG através de ligações não covalentes entre os anéis aromáticos (π - π *stacking*) é bastante vantajosa na medida em que melhora o tempo de semi-vida e possibilita um maior *uptake* pelo tumor. O conjugado SWCNT-DOX demonstrou claramente aumento do tempo de semivida (2.22h) comparativamente à DOX livre (0.21h). As ramificações PEG são responsáveis por uma menor *clearance* pelos macrófagos e a passagem repetida dos conjugados do fármaco nos vasos tumorais causam um aumento do *uptake* pelo tumor. O empilhamento de fármacos em nanotubos de carbono para além do supramencionado tem também a vantagem de não comprometer a química do fármaco. A informação obtida pela espectroscopia Raman relativamente à biodistribuição dos SWCNTs combinada com a obtida através de fluorescência para a deteção da DOX indica que embora a maioria dos SWCNT-DOX permaneçam associados nas primeiras horas após a administração, a DOX carregada vai-se dissociando lentamente dos SWCNTs, sendo excretada pelos rins. A maioria dos nanotubos são muito grandes para serem excretados pelos rins e, por isso, são excretados lentamente pelas fezes (Liu, Z. *et al.*, 2010).

A libertação controlada de DOX pode ser obtida através da combinação de SWCNTs com quitosano e ácido fólico. O conjugado SWCNT-DOX para além de induzir a morte das linhas celulares do carcinoma hepatocelular SMMC-7721 e diminuir o crescimento do cancro do fígado também demonstrou menor toxicidade *in vivo* que a doxorubicina livre (Lamberti *et al.*, 2015).

Os SWCNTs também podem ser conjugados com o **paclitaxel (PTX)**. Este fármaco é usado no tratamento do **cancro da mama, ovário e células não pequenas do pulmão** (INFARMED). A administração *in vivo* dos SWCNTs-PTX em ratinhos com cancro da mama 4TI demonstrou ser altamente eficaz na supressão do crescimento do tumor apresentando menor efeito tóxico nos órgãos saudáveis quando comparado com o taxol livre mesmo numa dose mais baixa de fármaco (5mg/kg) (Liu, Z. *et al.*, 2008). A maior eficácia terapêutica e os efeitos adversos reduzidos poderão ser atribuídos ao tempo de semi-vida mais longo e à permeabilidade e retenção aumentada (He *et al.*, 2013).

Alguns tipos de cancro apresentam sobreexpressão do recetor de biotina na membrana citoplasmática, neste sentido, foi feito um estudo no qual os CNTs foram funcionalizados com biotina e conjugados com um fármaco inibidor da mitose através de um ligante clivável. Os CNTs reconheceram especificamente as células tendo sido internalizados através de endocitose mediada por recetores, o ligante foi clivado e o fármaco libertado no interior das células. A internalização do conjugado SWCNT-biotina em linhas celulares de leucemia LI210FR e a subsequente libertação do fármaco foi comprovado através da espectroscopia de fluorescência (Amenta e Aschberger, 2015). No entanto, nas células cancerosas dos nódulos linfáticos verifica-se sobreexpressão dos recetores de ácido fólico, assim, os MWCNTs funcionalizados com ácido fólico e revestidos com uma camada de nanopartículas de magnetite na superfície interna foram carregados com **cisplatina** através de nanoprecipitação. Com a ajuda de um ímã externo o sistema de entrega de cisplatina foi conduzido para os nódulos linfáticos, ao passo que a funcionalização com folato foi responsável pelo reconhecimento e internalização nas células tumorais, demonstrando-se assim, a libertação controlada de cisplatina nas células cancerosas HeLa (Yang, F. *et al.*, 2008).

Além disso, os CNTs também podem ser usados no tratamento de **tumores cerebrais**, uma vez que o seu pequeno tamanho e a possibilidade de modificações externas os tornam capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (Caraglia *et al.*, 2012).

6.2 TERAPIA COM NANOTUBOS FUNCIONALIZADOS COM ANTICORPOS E PREENCHIDOS COM METAIS RADIOATIVOS

Os CNTs para além de permitirem a entrega de fármacos e genes às células-alvo também podem ser usados na entrega de radionuclídeos/metais radioativos. Os SWCNTs funcionalizados com anticorpos e preenchidos com radionuclídeos (^{86}Y , ^{125}I , ^{14}C , ^{64}Cu ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$) podem ser aplicados na imagiologia ou no tratamento do cancro.

Através da funcionalização endohedral e exohedral foi idealizado um novo nanotubo de carbono para a entrega de metais radioativos (Spinato *et al.*, 2015). Os SWCNTs foram primeiramente purificados através de tratamento com vapor, o qual abre as extremidades dos CNTs, reduz o número de defeitos estruturais e ainda remove as impurezas carbonáceas (Ballesteros *et al.*, 2008). A remoção do carbono amorfo permite uma funcionalização mais eficaz das paredes dos CNTs (Shao *et al.*, 2007). Os SWCNTs purificados e com as extremidades abertas são então preenchidos com análogos radioativos (halogenetos metálicos), nomeadamente, SmCl_3 ou LuCl_3 , e selados através de um tratamento de elevada temperatura, o qual permite que os compostos fiquem confinados na cavidade interna. A encapsulação dos halogenetos metálicos nos SWCNTs foi confirmada através de microscopia eletrónica e espectroscopia. Posteriormente, procedeu-se à funcionalização externa dos SWCNTs obtidos através da cicloadição do nitreno. Neste sentido, os $\text{SmCl}_3@$ SWCNT foram dispersos em NMP seco através de ultrassons, em atmosfera inerte, a fim de evitar que espécies altamente reativas interajam com o oxigénio, visto que a reação com nitreno pode também levar a adição de radicais. Após este passo, adicionou-se um excesso de azida S3 e sujeitou-se a mistura a 200°C durante 12h (Figura 7).

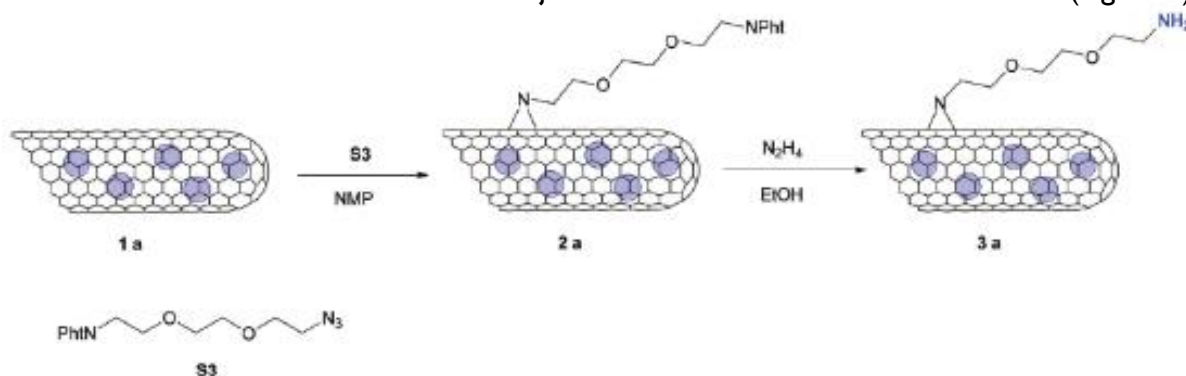


Figura 7 – Reação de cicloadição do nitreno ao $\text{SmCl}_3@$ SWCNT (1a) e clivagem do grupo ftalimida de forma a permitir a funcionalização do grupo amino $\text{SmCl}_3@$ SWCNT- NH_2 (3a) (Spinato *et al.*, 2015).

ao

O composto obtido, $\text{SmCl}_3@$ SWCNT-Pht (2a), na presença de etanol (EtOH) e hidrazina (N_2H_4) perde o grupo protetor ftalimida dando origem a $\text{SmCl}_3@$ SWCNT- NH_2 (3a). Para confirmar se a funcionalização ocorreu, os CNTs funcionalizados com o grupo

amino (3a) e o precursor protegido com Pht (2a) foram caracterizados por TGA em atmosfera inerte. Os $\text{SmCl}_3@\text{SWCNT-NH}_2$ (3a) foram incubados durante 24h com um anticorpo monoclonal (Cetuximab) na presença de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC.HCl) e N-hidroxi sulfo succinimida (NHSS) em condições tampão (Figura 8).

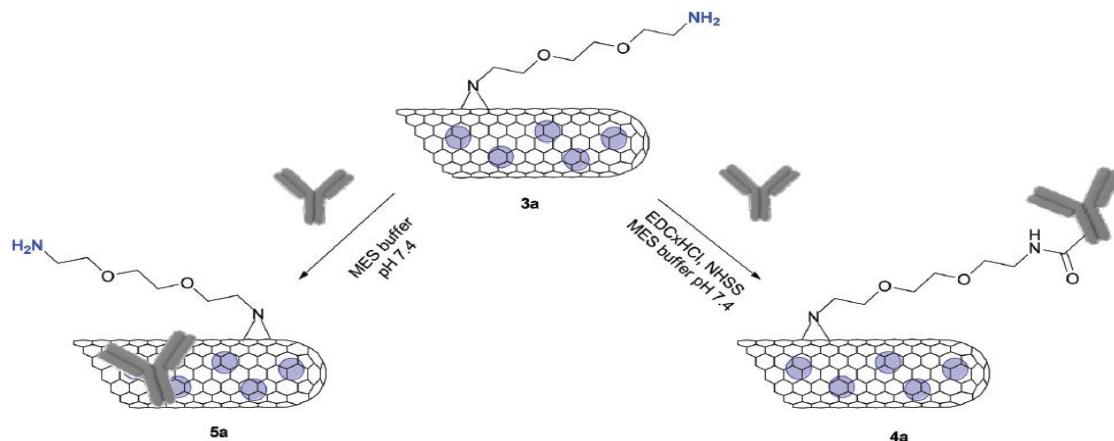


Figura 8 – Obtenção do SWCNT funcionalizado com Cetuximab, $\text{SmCl}_3@\text{SWCNT-mAb}$ (4a), e do complexo não covalente $\text{SmCl}_3@\text{SWCNT/mAb}$ (5a) na ausência de reagentes e acoplamento (Spinato *et al.*, 2015).

O Cetuximab liga-se especificamente ao recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), inibindo o crescimento celular. Este recetor membranar regula múltiplos processos celulares estando sobreexpresso em várias células cancerosas. O Cetuximab está indicado para o tratamento do **carcinoma colorretal**, **carcinoma do pulmão** de não pequenas células, **carcinoma da cabeça** e do **pescoço**. As proteínas podem ter uma forte afinidade para os CNTs, por isso, foi realizada uma reação de controlo para verificar se também ocorria imobilização não covalente do anticorpo. Neste âmbito incubou-se o $\text{SmCl}_3@\text{SWCNT-NH}_2$ (3a) com o Cetuximab na ausência de reagentes de acoplamento nas mesmas condições que a reação covalente.

Com base na análise termogravimétrica verificaram que o $\text{SmCl}_3@\text{SWCNT-mAb}$ e o conjugado não covalente $\text{SmCl}_3@\text{SWCNT/mAb}$ apresentam um carregamento do Cetuximab similar, 250 mg g^{-1} e 200 mg g^{-1} , respetivamente. Isto indica que uma quantidade não negligenciável de anticorpo é adsorvida nos nanotubos a qual não pode ser removida apesar dos passos de lavagem e diálise.

No entanto, através da eletroforese em gel (Figura 9) observaram diferenças entre ambos os compostos. No caso do conjugado não covalente $\text{SmCl}_3@\text{SWCNT/mAb}$ (5a) o anticorpo não ligado é livre de migrar através do gel e, por isso, observa-se uma banda na posição ca.150 kDa que corresponde ao Cetuximab. Por sua vez, o conjugado covalente $\text{SmCl}_3@\text{SWCNT-mAb}$ (4a) não dá origem a nenhuma banda que corresponda à posição do

mAb, isto sugere que a maior parte do Cetuximab está covalentemente ligado ao CNT, não podendo migrar através do gel. A presença de pequenas quantidades de mAb não conjugado não pode ser excluída sendo provavelmente responsável pelas bandas claras obtidas.

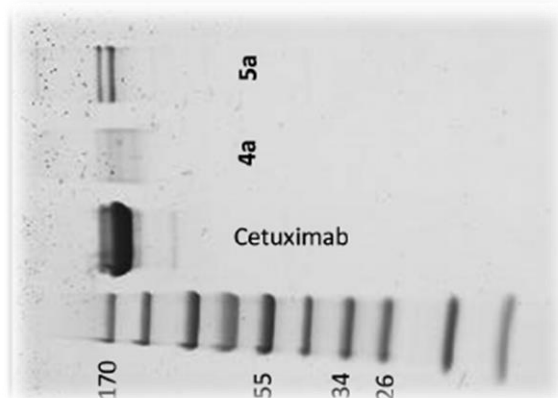


Figura 9 – Electroforese em gel do Cetuximab, $\text{SmCl}_3\text{@SWCNT-mAb}$ (4a) e $\text{SmCl}_3\text{@SWCNT/mAb}$ (5a) (Spinato et al., 2015).

Com o intuito de se avaliar a capacidade dos conjugados obtidos em alcançar o alvo foi feita uma imunocoloração com um anticorpo secundário e incubação dos CNTs com células EGFR+ seguido por citometria de fluxo, microscopia confocal ou análises elementares. Tanto o $\text{SmCl}_3\text{@SWCNT-mAb}$ (4a) como o complexo controle $\text{SmCl}_3\text{@SWCNT/mAb}$ (5a), foram marcados com anti-IgG humano ligado a nanopartículas de ouro (AuNP), capazes de reconhecerem Cetuximab. Como controlo as mesmas amostras foram separadamente marcadas com anti-IgG coelho ligados a AuNPs, o qual não é específico para as IgGs humanas. Os resultados permitiram concluir que apenas o conjugado obtido por reação covalente, $\text{SmCl}_3\text{@SWCNT-mAb}$, é capaz de reconhecer seletivamente o alvo. Assim, foi feita a caracterização do $\text{SmCl}_3\text{@SWCNT-mAb}$ marcado com anti-IgG humano através da análise EDX e mapeamento elementar EDX confirmando a presença de Sm e Au e a sua localização na área analisada. Provando-se desta forma que o Cetuximab foi eficientemente imobilizado nos SWCNTs preenchidos com Sm e que a sua afinidade para um anticorpo secundário foi conservada após a conjugação.

Os complexos SWCNTs-anticorpo foram incubados com células do glioblastoma U87 modificadas para sobreexpressar EGFR (U87-EGFR+). Como controlo negativo recorreram a células ováricas de hamster chinês (CHO), visto que estas não expressam EGFR. Ambas as células foram tratadas por um período de 1h e 3h com 10 $\mu\text{g/ml}$ de CNTs. Como controlo positivo usou-se o Cetuximab numa concentração de 2.5 $\mu\text{g/ml}$. Após o tempo de incubação as células foram lavadas, fixas e tratadas com um anticorpo secundário fluorescente que se liga ao Cetuximab a fim de permitir a análise da ligação celular e o uptake

por citometria de fluxo. Assim, mais de 80% das U87-EGFR+ foram capazes de se ligar e internalizar o Cetuximab ligado covalentemente ou não aos SWCNTs. Mesmo que ambos os conjugados sejam internalizados pelas U87-EGFR+, pode colocar-se a hipótese de que parte do mAb do conjugado não covalente se dissocie do CNT e se ligue ao EGFR. No caso das células CHO menos do que 5% foram capazes de se ligar e internalizar o Cetuximab. A seguir foi ainda determinado o teor de samário (Sm) nas células tratadas com Sm@SWCNT-mAb, o que representa uma medida indireta do *uptake*. Assim, as células U87-EGFR+ e CHO foram tratadas com 25 µg / ml de SmCl₃@SWCNT-mAb, após 24h as células foram lavadas, e foi medido o teor intracelular de Sm através de espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado (ICP-AES). Nas células U87-EGFR+ obteve-se uma maior quantidade de Sm, 5.60±0.08 pg/célula, o que indica que houve uma entrega mais eficiente do Sm contido nos nanotubos comparativamente às células CHO, 1.59±0.04 pg/célula.

Contudo, a encapsulação de radioisótopos nos CNTs e a subsequente funcionalização com ligandos que reconhecem alvos específicos pode ser uma forma eficiente de entrega de isótopos tanto para fins terapêuticos como de diagnóstico. Os radioisótopos, contrariamente aos fármacos antineoplásicos, quando alcançam o local alvo não devem ser libertados das nanocápsulas para exercer o efeito terapêutico, devem ficar confinados na cavidade interna até decaírem (Spinato *et al.*, 2015).

6.3 TERAPIA FOTOTÉRMICA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

A aplicação da terapia fototérmica no tratamento do cancro tem sido amplamente investigada visto ser pouco invasiva e altamente eficiente quando comparada com outros métodos existentes (Moon, Lee e Choi, 2009; Zhou *et al.*, 2014).

Quando as células são sujeitas a temperaturas superiores a 42° C ocorre desnaturação das proteínas e rutura das membranas e, consequentemente, morte celular (Hildebrandt, 2002). Enquanto que os tecidos biológicos (pele, por exemplo) são transparentes à **radiação no infravermelho próximo** (NIR, 700-1100 nm), os CNTs por sua vez apresentam elevada absorção ótica na região do infravermelho próximo e quando expostos à luz NIR geram quantidades significativas de calor, num curto espaço de tempo (<120s). Este efeito fototérmico pode ser usado para induzir a morte celular de células cancerosas *in vivo* de forma não invasiva (Amenta e Aschberger, 2015; Moon *et al.*, 2009). Foram realizados vários estudos *in vitro* para a aplicação de CNTs na terapia fototérmica. No que diz respeito a estudos *in vivo* existe um número limitado, e a realização de ensaios clínicos ainda não foi reportada (Amenta e Aschberger, 2015).

Num estudo piloto *in vivo* selecionaram os SWCNTs revestidos com polímeros anfífilicos (10%-5kPEG-PMHC₁₈) que apresentavam um maior *uptake* tumoral e acumulação relativamente baixa na pele. Estes SWCNTs foram injetados por via intravenosa em sete ratinhos Balb/c portadores de tumores 4T1 em ambos os ombros. Como controlo usaram sete ratinhos também portadores de tumores 4T1, mas não injetados com SWCNTs. Um dia após a irradiação com NIR (808 nm) dos sete tumores injetados com SWCNTs cinco desapareceram, deixando cicatrizes negras no local do tumor original. De entre estes cinco tumores, três não voltaram a crescer num espaço de duas semanas, ao passo que os outros dois reapareceram uma semana após o tratamento. Os restantes dois tumores do grupo de ratinhos injetados com SWCNTs foram parcialmente removidos e observou-se um crescimento lento após a irradiação. Ao invés, os tumores no grupo controlo, ratinhos injetados com SWCNTs mas não irradiados e ratinhos irradiados com luz IR mas não injetados com SWCNTs, mostraram um crescimento rápido do tumor. O que indica que apenas a injeção dos SWCNTs combinada com a irradiação tem efeito terapêutico no crescimento dos tumores (Figura 10). A densidade de potência do laser NIR usada neste estudo ($1 \text{ W} / \text{cm}^2$) (Liu, X. *et al.*, 2011) é menor do que a usada quando se administraram *nanorods* de ouro, isto é, nanoestruturas em formato de bastões, ($2 \text{ W} / \text{cm}^2 \sim 4 \text{ W} / \text{cm}^2$) (Huang *et al.*, 2008), possivelmente devido ao efeito de permeabilidade e retenção aumentados e elevado poder de absorção dos nanotubos de carbono (Liu, X. *et al.*, 2011).

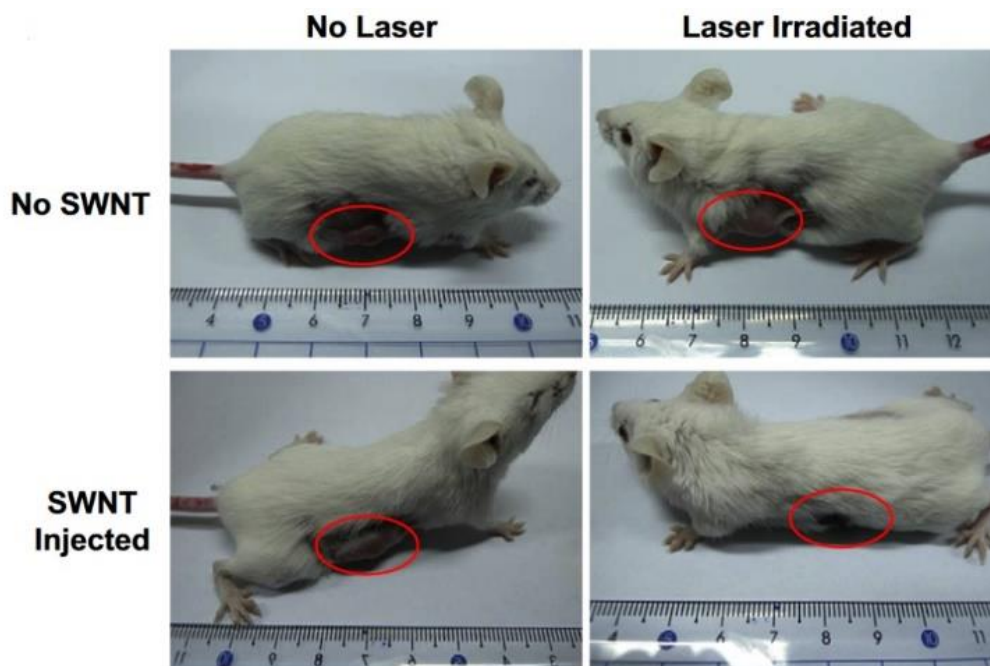


Figura 10 – Fotografias dos ratinhos após os vários tratamentos. O tumor do ratinho injetado com SWCNT e irradiado foi completamente destruído (Liu, X. *et al.*, 2011).

Após a destruição do tumor pela irradiação com NIR os SWCNTs injetados no tumor podem deslocar-se para o sistema reticuloendotelial e ser lentamente eliminados (Moon *et al.*, 2009).

De forma similar ratinhos tratados com SWCNTs funcionalizados com PEG (SWCNT-PEG) mostraram destruição completa dos tumores sem efeitos nocivos ou recorrência do tumor durante 6 meses, ao passo que os tumores no grupo controle continuaram a crescer até a morte do ratinho. Uma das maiores preocupações após a terapia fototérmica é se os SWCNTs se acumulam ou não nos tecidos/órgãos ou se são eliminados. Neste estudo foi também possível verificar que maioria dos SWCNTs foram completamente excretados através da via biliar e urinária em cerca de 2 meses (Moon *et al.*, 2009).

Um outro estudo utilizou SWCNTs CoMoCAT®, nanotubos com tamanho uniforme (0.81 nm) e pico de absorção aos 980 nm, conjugados com folato (SWCNT-FA), o qual se liga especificamente à superfície do recetor de folato marcador de tumor. Tanto nos ensaios *in vitro* como *in vivo* os SWCNT-FA melhoraram efetivamente a destruição fototérmica das células tumorais não afetando as células normais. Vários tumores sólidos, incluindo, células do **carcinoma da mama, pulmão, endométrio, cérvix, ovário e rim** sobreexpressam receptores de folato (FRs) na membrana citoplasmática. Neste sentido foram usadas células EMT6 FR-positivas (FR+) com FRs sobreexpressas nas superfícies e células FR-negativas (FR-) sem FRs. Ambas as células FR+ e FR- foram incubadas com SWCNT-FA durante 2h, lavadas, e, posteriormente, irradiadas com laser (0.5 W / cm²) durante 2 min. Após a irradiação, observou-se que nas células FR+ tinha ocorrido morte celular, o que foi evidenciado pelas alterações morfológicas drásticas, ao passo que as células FR- permaneceram intactas. Assim, pode concluir-se que as células FR+ conseguem internalizar seletivamente os SWCNT-FA sendo destruídas quando sujeitas a radiação NIR. *In vitro* foi avaliada a viabilidade das células tumorais sujeitas a concentrações de SWCNT-FA e intensidades diferentes. Durante a irradiação de intensidade 60 J/ cm², as células tumorais tratadas apenas com laser sem a presença de SWCNT-FA permaneceram intactas enquanto as sujeitas a laser e SWCNT-FA apresentaram citotoxicidade fototérmica. Por sua vez, durante a irradiação de intensidade 120 J/ cm² as células tumorais sujeitas apenas ao laser apresentaram citotoxicidade acentuada (37%). No entanto, a fotocitotoxicidade foi mais significativa quando se usou os SWCNT-FA. Os SWCNT-FA com concentração de 1.75 µg/ml e 3.5 µg/ml levaram a taxas de citotoxicidade de 60% e 85%, respetivamente (Figura 11). Portanto tanto a concentração como a intensidade do laser são fatores responsáveis pela citotoxicidade.

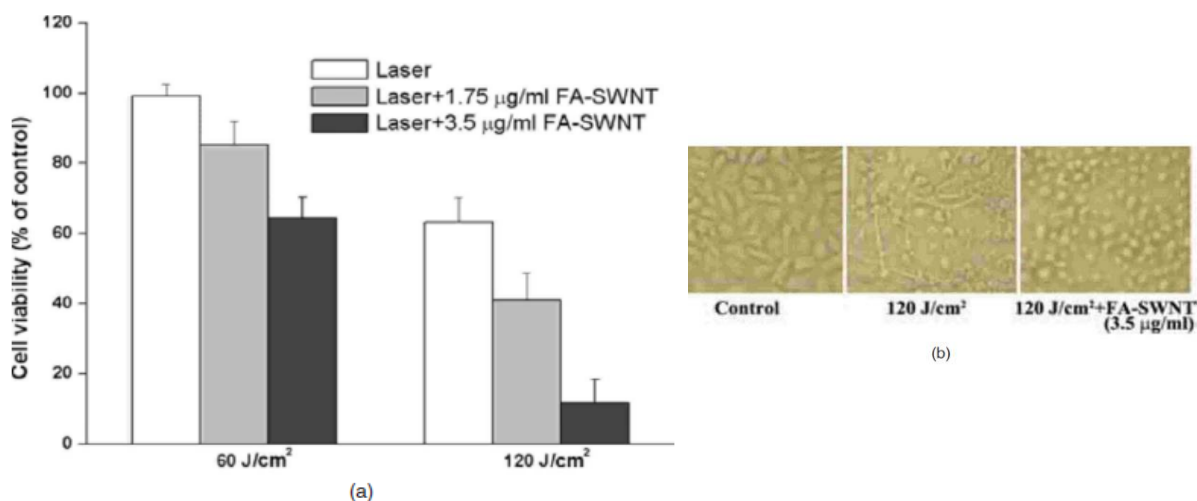


Figura 11 – Viabilidade das células tumorais sujeitas a tratamentos diferentes. (a) Células tumorais tratadas apenas com laser ou com laser e FA-SWCNT. As células sem tratamento serviram de controlo. (b) Imagens óticas das células tumorais sujeitas a condições diferentes tal como indicado (Zhou *et al.*, 2014).

Para investigar os efeitos dos SWCNT-FA *in vivo* injetaram células EMT6 em fêmeas Balb/c. Os tumores dos ratinhos com ou sem SWCNT-FA foram irradiados por laser (980 nm). Durante a irradiação foi medida a temperatura à superfície dos tumores com uma câmara térmica infravermelha. Num dos ratinhos com SWCNT-FA a irradiação causou uma elevação de temperatura de 63°C, no entanto, o tumor sem SWCNT-FA irradiado da mesma forma levou a uma elevação de 54°C. Ensaio com outros animais conduziram a resultados similares. Assim, pode concluir-se que os SWCNT-FA podem melhorar a terapia fototérmica.

Com o intuito de se investigar a distribuição dos SWCNTs injetaram diretamente nos tumores soluções de FITC-SWCNT ou FITC-SWCNT-FA. Os tumores foram analisados ao microscópio de fluorescência 6h após a injeção. A fluorescência dos SWCNT-FA foi detetada somente no interior dos tumores, porém, os SWCNT foram detetados no interior e também no tecido circundante. Isto indica que SWCNT-FA tem uma maior afinidade para as células tumorais devido aos anticorpos específicos para o tumor, enquanto os SWCNT que não se encontram conjugados com folato, para além, de entrarem nas células tumorais também penetraram nos tecidos circundantes através de difusão intracelular.

Os principais desafios associados a terapia fototérmica estão relacionados com a seletividade do tratamento bem como a capacidade de atingir o nível apropriado de calor por irradiação. A seletividade pode ser conseguida através da funcionalização, ao passo que o aquecimento dos nanotubos após irradiação pode ser modulado através da projeção de

CNTs com boro ou azoto. Estas modificações criam defeitos nas superfícies o que poderá levar à dispersão na trajetória da luz e aumentar as propriedades de aquecimento dos CNTs. O aquecimento excessivo poderá levar a efeitos indesejáveis nos tecidos saudáveis circundantes e o aquecimento insuficiente conduzirá a falha na destruição das células tumorais. Os nanotubos de carbono mais longos apresentam um melhor acoplamento ótico e, por conseguinte, melhores propriedades térmicas comparativamente aos CNTs mais curtos. Assim, escolher os CNTs com o comprimento adequado também é importante para otimizar o aquecimento (Amenta e Aschberger, 2015).

A terapia fototérmica apesar de ser bastante promissora está limitada ao tratamento de tumores superficiais por causa da baixa penetração tecidual da radiação NIR (Gannon *et al.*, 2007) Uma outra limitação está relacionada com a recorrência do tumor, o qual pode ser ultrapassado ao aumentar a imunogenicidade do tumor (Amenta e Aschberger, 2015). Contudo, o uso de CNTs funcionalizados na terapia fototérmica se combinados com a quimioterapia também entregue pelos nanotubos de carbono poderá trazer grandes oportunidades para o tratamento do cancro (Liu, X. *et al.*, 2011).

Os SWCNTs também podem libertar calor quando expostos a ondas de **radiofrequência** (RF) induzindo citotoxicidade nas células cancerosas. Num estudo os SWCNTs funcionalizados através de ligações não covalentes com Kentera, polímero não-iónico e biocompatível, foram injetados em coelhos com tumores hepáticos VX2 sendo expostos a RF (13.56 MHz). Após 48h, todos os grupos tratados com SWCNT demonstraram necrose completa, enquanto os tumores nos grupos controlo, tratados com RF mas sem serem injetados com SWCNT e os injetados com SWCNT mas não tratados com RF permaneceram viáveis (Gannon *et al.*, 2007).

6.4 IMUNOTERAPIA

A imunoterapia consiste em estimular o sistema imune do doente de forma a combater as células tumorais malignas (He *et al.*, 2013). A estimulação pode ser alcançada através da administração de vacinas obtidas a partir de células cancerígenas inativadas ou citocinas que modulam a resposta imune. Tanto as vacinas como as citocinas podem ser entregues pelos CNTs, melhorando desta forma a imunoterapia antitumoral (Amenta e Aschberger, 2015). A conjugação de MWCNTs com uma proteína de lisado tumoral (vacina de célula tumoral) em ratinhos portadores de tumor do fígado H22 demonstrou um aumento da eficácia da imunoterapia (He *et al.*, 2013). Além disto os CNTs oxidados também apresentam a capacidade de retardar o crescimento do tumor através da ação imunoestimuladora (Amenta e Aschberger, 2015).

7 TOXICIDADE DOS NANOTUBOS DE CARBONO

Embora existam muitos dados acerca das vantagens em termos de maior eficácia e menos efeitos adversos, vários estudos recentes relataram toxicidades inesperadas induzidas pelos CNTs (Lamberti *et al.*, 2015).

Os CNTs podem induzir toxicidade através da formação de radicais livres designadamente da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), resposta inflamatória aumentada e formação de granulomas (Jain, Singh e Pillai, 2012). A formação de radicais livres deve-se às impurezas metálicas presentes nas paredes de CNTs, mas também à falha da fagocitose pelos macrófagos subsequente à exposição de CNTs longos (*fiber-like*). Ao passo que a inflamação granulomatosa é devida à formação de agregados (Nel *et al.*, 2009).

7.1 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS *IN VITRO* E OS FACTORES QUE INFLUENCIAM A TOXICIDADE DOS CNTs

Alguns estudos realizados *in vitro* relataram um aumento da citotoxicidade dos CNTs relacionado com o *uptake* celular, aglomeração e stresse oxidativo induzido (Yang, S. T. *et al.*, 2012). Os resultados conflituosos a respeito da biocompatibilidade dos CNTs resultam da **variabilidade**, isto é, comprimento, forma, espessura, carga, grau de aglomeração, método de produção, pureza, funcionalização e número de paredes (Amenta e Aschberger, 2015; Engineering *et al.*, [s.d.]; Madani, Mandel e Seifalian, 2013) bem como dos **protocolos de teste** (estudos *in vitro* vs *in vivo*, tipos de células, tecidos e animais testados) (Engineering *et al.*, [s.d.]). Assim, apesar dos vários estudos disponíveis os protocolos usados nem sempre são standardizados (Amenta e Aschberger, 2015). MWCNTs curtos e finos são considerados menos tóxicos que os nanotubos de carbono longos tipo fibra (*fiber-like*), uma vez que são mais facilmente interiorizados pelas células fagocíticas e, conseqüentemente, eliminados para fora do organismo (Murphy *et al.*, 2012). Contrariamente, os CNTs longos e com maior diâmetro conduzem a uma maior citotoxicidade, pois o processo de fagocitose falha levando à produção de ROS e mediadores de inflamação. A citotoxicidade também pode ser atribuída à remoção incompleta no passo de purificação dos catalisadores metálicos (Fe, Co, Ni e Mo) usados durante a preparação dos CNTs, os quais podem gerar radicais livres causando danos nas células e membranas (Jain *et al.*, 2012). Para ultrapassar este problema pode recorrer-se a ultrassons. Um estudo demonstrou que sujeitar os CNTs ao ultrassons durante 5 min reduz significativamente a sua toxicidade, este efeito poderá ser devido à libertação das impurezas metálicas para a solução (Madani *et al.*, 2013).

7.2 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS *IN VIVO*

Os estudos toxicológicos *in vivo* permitem obter informações mais precisas e relevantes sobre vários parâmetros, tais como, distribuição, metabolismo e eliminação, uma vez que avaliam a citotoxicidade no organismo todo ao invés dos estudos *in vitro* (Madani *et al.*, 2013).

Os CNTs podem ser administrados através da via oral, intravenosa, inalatória ou transdérmica (Madani *et al.*, 2013). A toxicidade sistêmica dos CNTs depende da via de exposição e de vários outros fatores relacionados com as suas propriedades físico-químicas. Nalguns estudos os CNTs demonstraram um comportamento tóxico após administração oral e intravenosa, ao passo que outros não revelaram toxicidade (Amenta e Aschberger, 2015). Apesar de não haver indicação clara do método de entrada mais tóxico, alguns estudos indicam que a administração endovenosa, oral e dérmica dos CNTs resultaria numa ligeira inflamação, porém a inalação dos CNTs seria mais preocupante, na medida em que poderá resultar numa inflamação grave (Foldvari e Bagonluri, 2008). Assim, a toxicidade dos CNTs parece estar relacionada com o método de administração. Vários estudos indicam que a exposição do sistema respiratório às nanopartículas pode resultar em asma, bronquite, enfisema e cancro do pulmão. Todavia a entrada dos CNTs através do trato gastrointestinal poderá levar a doença de Crohn e cancro do cólon. Para além disso, a exposição do sistema circulatório pode conduzir à coagulação sanguínea e doença cardíaca. Contudo, nem todas as nanopartículas são tóxicas e ao se alterar a forma, tamanho e composição pode modificar-se a nanotoxicidade dos CNTs (Madani *et al.*, 2013).

Assim, é necessária uma investigação mais profunda sobre a toxicidade e farmacocinética das diferentes formas de CNTs, particularmente *in vivo*, antes de serem eficazmente usados em estudos clínicos e, posteriormente, comercializados (Lamberti *et al.*, 2015).

7.3 ESTRATÉGIAS PARA DIMINUIR A TOXICIDADE

A funcionalização pode melhorar significativamente a dispersibilidade e biocompatibilidade, bem como diminuir a toxicidade dos CNTs (Madani *et al.*, 2013). Foi demonstrado que a dispersibilidade pode reduzir a imunotoxicidade dos CNTs. Os SWCNTs funcionalizados apresentam melhor biocompatibilidade e são menos citotóxicos quando comparados com os nanotubos não funcionalizados (Amenta e Aschberger, 2015; Lee, Khang e Kim, 2015). Os CNTs ao serem revestidos com um polímero biocompatível (policarbonato, poliuretano ou policarbonato-uretano) mostraram diminuição significativa da toxicidade e da inflamação (Kumar *et al.*, 2014). Uma das abordagens mais comuns é

funcionalizar os CNTs com o polímero PEG, o qual reduz a citotoxicidade dos CNTs *in vivo*, melhora o comportamento farmacocinético, prolonga o tempo de semi-vida e ainda diminui a captura pelo sistema reticuloendotelial. (Madani *et al.*, 2013). Um estudo demonstrou que o uso de ramificações PEG pode melhorar o tempo de semi-vida para 15h bem como melhorar a sua excreção. Os resultados mostraram que os CNTs funcionalizados são excretados através da urina e das fezes, ao passo que os não funcionalizados apresentaram uma excreção reduzida. A toxicidade dos CNTs-PEG só foi reportada para doses elevadas de CNTs. Os CNTs também podem ser funcionalizados com Tau, os resultados apresentaram inflamação celular e destruição mitocondrial muito baixa quando administrados numa dose elevada (Yang, S. T. *et al.*, 2012). Assim, as modificações químicas tais como, funcionalização, produção de CNTs com dimensões controladas e purificação conduzem a uma menor toxicidade (Kumar *et al.*, 2014). Para além disso, a introdução de defeitos estruturais permite a biodegradação dos CNTs através de catálise enzimática (Mundra *et al.*, 2014)

A aplicação dos CNTs ao campo biomédico não está a ser tão rápido como em outras áreas. Enquanto alguns produtos baseados em CNTs já estão a ser usados em têxteis, matrizes poliméricas, artigos de desporto, microelectrónica e armazenamento de energia, por sua vez os medicamentos e dispositivos médicos para aplicações *in vivo* ainda não foram comercializados (Amenta e Aschberger, 2015).

8 CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Nos últimos anos os nanotubos de carbono têm sido alvo de investigação uma vez que são materiais com propriedades extremamente interessantes podendo ser usados em várias aplicações, entre as quais, a terapia do cancro. Tendo como base os vários estudos supramencionados pode concluir-se que os nanotubos de carbono em sistemas de entrega de fármacos anticancerígenos são bastante eficientes, pois demonstraram supressão significativa da proliferação celular *in vitro* bem como diminuição do crescimento do tumor *in vivo*, levam a um aumento do tempo de semivida e a uma diminuição da toxicidade quando comparados com o fármaco livre. Desta forma, pode dizer-se que os nanotubos de carbono na entrega de fármacos contribuem para a melhoria do perfil farmacológico e terapêutico dos fármacos. A entrega de isótopos radioativos através dos CNTs também demonstrou ser eficaz, não sendo necessária a sua libertação no local alvo ao contrário dos fármacos antineoplásicos. Com base nos estudos referenciados relativamente à terapia fototérmica conclui-se que apenas a injeção dos SWCNTs combinada com a irradiação NIR permite a remoção dos tumores. Para além disso, a funcionalização dos SWCNTs com um marcador tumoral demonstrou uma melhoria significativa na afinidade para as células alvo e, conseqüentemente, na destruição das células tumorais não afetando as células normais. Os CNTs também podem ser usados na entrega de vacinas ou citocinas melhorando a imunoterapia anticancerígena.

Todavia, várias questões se colocam em relação ao seu perfil toxicológico, uma vez que os nanotubos de carbono apresentam características diversificadas entre si, nomeadamente, no que diz respeito à forma, tamanho, comprimento e funcionalização. Apesar disto, foi demonstrado que modificações químicas aumentam a biocompatibilidade e dispersibilidade diminuindo significativamente a toxicidade. Contudo, deve ser feita uma avaliação *in vivo* mais profunda com protocolos estandardizados e doses adequadas a fim de poderem ser usados em ensaios clínicos e, posteriormente, comercializados.

Nos próximos anos alguns CNTs poderão entrar em ensaios clínicos, designadamente, nanotubos de carbono conjugados com siRNA para a terapia do cancro, o uso dos nanotubos de carbono na melhoria da imagiologia do cancro coloretal e ainda a sua utilização como fonte de raio-X para detetar pequenos tumores.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMENTA, V.; ASCHBERGER, K. - Carbon nanotubes: Potential medical applications and safety concerns. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. ISSN 19390041 , 7(3), 371–386. doi: 10.1002/wnan.1317.
- BALLESTEROS, B. *et al.* - Steam purification for the removal of graphitic shells coating catalytic particles and the shortening of single-walled carbon nanotubes. *Small*. ISSN 16136810 , 4(9), 1501–1506. doi: 10.1002/smll.200701283.
- BIANCO, A. *et al.* - Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chemical communications (Cambridge, England)*. ISSN 1359-7345 , (5), 571–577. doi: 10.1039/b410943k.
- CARAGLIA, M. *et al.* - Nanotech revolution for the Anti-Cancer drug delivery through Blood-Brain-Barrier. *Curr Cancer Drug Targets*. ISSN 15680096 , 12(3), 186–196.
- ENGINEERING, B. *et al.* - Carbon-Based Nanomaterials : Multifunctional Materials for.
- FOLDVARI, M.; BAGONLURI, M. - Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. ISSN 15499634 , 4(3), 183–200. doi: 10.1016/j.nano.2008.04.003.
- FONSECA, N. A. *et al.* - Bridging cancer biology and the patients' needs with nanotechnology-based approaches. *Cancer Treatment Reviews*. ISSN 15321967 , 40(5), 626–635. doi: 10.1016/j.ctrv.2014.02.002.
- GANNON, C. J. *et al.* - Carbon nanotube-enhanced thermal destruction of cancer cells in a noninvasive radiofrequency field. *Cancer*. ISSN 0008543X , 110(12), 2654–2665. doi: 10.1002/cncr.23155.
- HE, H. *et al.* - Carbon nanotubes: Applications in pharmacy and medicine. *BioMed Research International*. ISSN 23146133 , 2013. doi: 10.1155/2013/578290.
- HILDEBRANDT, B. - The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. ISSN 10408428 , 43(1), 33–56. doi: 10.1016/S1040-8428(01)00179-2.
- HIRLEKAR, R. *et al.* - Review Article CARBON NANOTUBES AND ITS APPLICATIONS: A REVIEW. *Asian Journal of Pharmaceutics and Clinical research*. ISSN 0974-2441 , 2(4), 17–27.
- HUANG, X. *et al.* - Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science*. ISSN 02688921 , 23(3), 217–228. doi: 10.1007/s10103-007-0470-x.
- JAIN, S.; SINGH, S. R.; PILLAI, S. - Toxicity Issues Related to Biomedical Applications of Carbon Nanotubes. *Journal of nanomedical nanotechnology*. ISSN 21577439 , 3(5), 1–15.

doi: 10.4172/2157-7439.1000140.

KUMAR, R. *et al.* - Carbon nanotubes: a potential concept for drug delivery applications. Recent patents on drug delivery & formulation. ISSN 2212-4039 , 8(1), 12–26. doi: 10.2174/1872211308666140124095745.

LAMBERTI, M. *et al.* - Carbon nanotubes: Properties, biomedical applications, advantages and risks in patients and occupationally-exposed workers. International Journal of Immunopathology and Pharmacology. ISSN 03946320 , 28(1), 4–13. doi: 10.1177/0394632015572559.

LEE, S.; KHANG, D.; KIM, S. H. - High dispersity of carbon nanotubes diminishes immunotoxicity in spleen. International Journal of Nanomedicine. ISSN 11782013 , 10, 2697–2710. doi: 10.2147/IJN.S80836.

LI, R. *et al.* - Folate and iron difunctionalized multiwall carbon nanotubes as dual-targeted drug nanocarrier to cancer cells. Carbon. ISSN 00086223 , 49(5), 1797–1805. doi: 10.1016/j.carbon.2011.01.003.

LIU, X. *et al.* - Optimization of surface chemistry on single-walled carbon nanotubes for in vivo photothermal ablation of tumors. Biomaterials. ISSN 01429612 , 32(1), 144–151. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.096.

LIU, Z. *et al.* - Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. Cancer Research. ISSN 00085472 , 68(16), 6652–6660. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1468.

LIU, Z. *et al.* - NIH Public Access. , 48(41), 7668–7672. doi: 10.1002/anie.200902612.Supramolecular.

MADANI, S. Y.; MANDEL, A.; SEIFALIAN, A. M. - A concise review of carbon nanotube's toxicology. Nano reviews. ISSN 2000-5121 , 4, 1–14. doi: 10.3402/nano.v4i0.21521.

MERKOÅI, A. - Nanobiomaterials in Electroanalysis. ISSN 10400397 , (7), 739–741. doi: 10.1002/elan.200790008.

MOON, H. K.; LEE, S. H.; CHOI, H. C. - In vivo near-infrared mediated tumor destruction by photothermal effect of carbon nanotubes. ACS Nano. ISSN 19360851 , 3(11), 3707–3713. doi: 10.1021/nn900904h.

MUNDRA, R. V. *et al.* - Nanotubes in biological applications. Current Opinion in Biotechnology. ISSN 09581669 , 28(Figure 1), 25–32. doi: 10.1016/j.copbio.2013.10.012.

MURPHY, F. A. *et al.* - The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells. Particle and fibre toxicology. ISSN 1743-8977 , 9, 8. doi: 10.1186/1743-8977-9-8.

NEL, A. E. *et al.* - Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface.

Nature materials. ISSN 1476-1122 , 8(7), 543–557. doi: 10.1038/nmat2442.

PIERSON, H. O. - HANDBOOK OF CARBON , GRAPHITE , DIAMOND AND FULLERENES

RANGANATHAN, R. *et al.* - Nanomedicine: Towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. International Journal of Nanomedicine. ISSN 11769114 , 7, 1043–1060. doi: 10.2147/IJN.S25182.

SHAO, L. *et al.* - Removal of amorphous carbon for the efficient sidewall functionalisation of single-walled carbon nanotubes. Chemical Communications. ISSN 1359-7345 , 1(47), 5090. doi: 10.1039/b712614j.

SPINATO, C. *et al.* - Design of antibody-functionalized carbon nanotubes filled with radioactivable metals towards a targeted anticancer therapy. Nanoscale. ISSN 2040-3364 doi: 10.1039/C5NR07923C.

SUDHAKAR, A - History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods Akulapalli. J Cancer Sci Ther. ISSN 1948-5956 , 1(2), 1–4. doi: 10.4172/1948-5956.100000e2.History.

VARDHARAJULA, S. *et al.* - Functionalized carbon nanotubes: Biomedical applications. International Journal of Nanomedicine. ISSN 11769114 , 7, 5361–5374. doi: 10.2147/IJN.S35832.

YANG, F. *et al.* - Magnetic lymphatic targeting drug delivery system using carbon nanotubes. Medical Hypotheses. ISSN 03069877 , 70(4), 765–767. doi: 10.1016/j.mehy.2007.07.045.

YANG, S. T. *et al.* - Pharmacokinetics, metabolism and toxicity of carbon nanotubes for biomedical purposes. Theranostics. ISSN 18387640 , 2(3), 271–282. doi: 10.7150/thno.3618.

ZHOU, F. *et al.* - Cancer photothermal therapy in the near-infrared region by using single-walled carbon nanotubes. Journal of biomedical optics. ISSN 1083-3668 , 14(2), 21009.

American Cancer Society – **Early history of cancer**. 2014. [Acedido a 29 de agosto de 2016]. Disponível na Internet: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/the-history-of-cancer-what-is-cancer>

Liga Portuguesa Contra o Cancro – **O que é o cancro?** Lisboa. [Acedido a 29 de agosto de 2016]. Disponível na Internet: <https://www.ligacontracancro.pt/o-que-e-o-cancro/>

DGES – **Portugal Doenças Oncológicas em números 2015**. Lisboa, 2016. [Acedido a 29 de agosto de 2016]. Disponível na Internet:

http://www.apah.pt/media/publicacoes_tecnicas_sector_saude_2/Doencas_Oncologicas.pdf

Nacional Cancer Institute – **Understanding Nanotechnology** [Acedido a 29 de agosto de 2016]. Disponível na Internet: <http://nano.cancer.gov/learn/understanding/>

INFARMED – **Folheto informativo** [Acedido a 30 de agosto de 2016]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=43993&tipo_doc=fi