

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

PAULA SABIN RADDATZ

**METOTREXATO EM NANOCARREADORES NO TRATAMENTO DO
CÂNCER: UMA REVISÃO.**

Porto Alegre
2015

PAULA SABIN RADDATZ

**METOTREXATO EM NANOCARREADORES NO TRATAMENTO DO
CÂNCER: UMA REVISÃO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Farmacêutica, sob orientação da Prof. Dra. Adriana Raffin Pohlmann e co-orientação da Dra. Ana Carolina Cavazzin Asbahr.

Porto Alegre

2015

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia irei construir um castelo...”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, especialmente aos meus pais, Paulo Roberto e Carmen Lúcia, por me apoiarem e confiarem em mim. Agradeço pelo amor incondicional, às palavras carinhosas, a presença constante, apesar da distância. À minha irmã Laura, que é um exemplo para mim, obrigada pelos conselhos e por ser minha eterna amiga e companheira. Ao Conrado, meu namorado, que me encorajou durante toda a jornada acadêmica, sendo atencioso, prestativo e, sobretudo, encheu minha vida de alegria.

À Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann, por sua orientação e paciência para a concretização deste trabalho, e, sobretudo, aos ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

À minha co-orientadora Ana Carolina Cavazzin Asbahr pelo apoio, atenciosidade e dedicação que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

Às minhas colegas e amigos da graduação da Faculdade de Farmácia UFRGS, pela amizade e convívio durante estes onze semestres de faculdade.

Aos colegas do K204 e 405 que de certa forma, auxiliaram, pelo conhecimento compartilhado e pela convivência no laboratório.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada!

RESUMO

As nanopartículas são definidas como partículas com diâmetro entre 1 e 1000 nm, ou seja, inferior a um micrômetro, constituídas por diferentes polímeros naturais ou sintéticos, lipídios ou fosfolipídios, até mesmo metais. É relevante destacar os benefícios da nanotecnologia aplicada à terapêutica, na qual grande parte dos estudos desenvolvidos tem foco em preparar formulações destinadas ao tratamento de doenças inflamatórias, neurológicas, cardiovasculares, câncer e também ao combate do vírus de imunodeficiência adquirida. Sistemas de entrega de fármacos vêm sendo utilizados permitindo um melhor controle da taxa de liberação do fármaco em determinado sítio de ação além do direcionamento específico ao tecido alvo e minimização dos efeitos colaterais indesejados. Dentre os principais nanocarreadores aplicados na terapêutica, destacam-se os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas, os dendrímeros e as nanopartículas poliméricas, que por sua vez incluem os sistemas vesiculares (nanocápsulas) e os matriciais (nanoesferas). O metotrexato possui atividade citotóxica e imunossupressora, entretanto possui limitação quanto ao seu uso devido a sua toxicidade dose-dependente, à meia-vida curta e à resistência em células alvo. Para tanto, com o objetivo de minimizar os efeitos adversos do metotrexato e melhorar sua resposta farmacológica, tem sido investigada nos últimos anos a utilização de nanocarreadores para a incorporação deste fármaco. Esta revisão discute os sistemas nanoestruturados de entrega do metotrexato visando o tratamento terapêutico em tumores.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanocarreadores. Metotrexato. Câncer.

ABSTRACT

Nanoparticles are defined as particles with a diameter between 1 and 1000 nm, or less than one micrometer, formed by different natural or synthetic polymers, lipids, phospholipids, or even metal. It is worth highlighting the benefits of nanotechnology applied to therapy, in which much of the developed studies have focused on preparing formulations for the treatment of inflammatory diseases, neurological, cardiovascular, cancer and also to combat the human immunodeficiency virus. Drug delivery systems are being used allowing a better control of the drug release rate in a given site of action in addition to the specific targeting to the target tissue while minimizing unwanted side effects. Among the main nanocarriers applied in therapy, we highlight the liposomes, solid lipid nanoparticles, dendrimers and polymeric nanoparticles, which in turn include vesicular systems (nanocapsules) and matrix (nanospheres). Methotrexate has cytotoxic and immunosuppressive activity, but has limitations on its use due to its dose-related toxicity, short half-life and resistance in target cells. Therefore, in order to minimize the adverse effects of methotrexate and improve their pharmacological response has been investigated in recent years the use of nanocarriers for the incorporation of the drug. This review discusses the nanostructured systems of delivery of methotrexate targeting the therapeutic treatment of tumors.

Keywords: Nanotechnology. Nanocarriers. Methotrexate. Cancer.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 JUSTIFICATIVA.....	11
4 METODOLOGIA.....	12
5 RESULTADOS.....	13
5.1 NANOTECNOLOGIA.....	13
5.2 METOTREXATO.....	17
5.3 CÂNCER.....	19
5.4 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS.....	21
5.4.1 Nanopartículas Poliméricas.....	23
5.4.2 Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	26
5.4.3 Lipossomas.....	29
5.4.4 Dendrímeros.....	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia vem despertando interesse de diversos grupos de pesquisa em todo mundo, sendo considerada como ciência do futuro pelo fato de possuir um elevado potencial de aplicação em inúmeros setores industriais (DURAN, 2006). Richard Feynman, físico americano, propôs a ideia da nanotecnologia no ano 1959, quando sugeriu a possibilidade de manipular átomos individualmente em escala nanométrica o que para a época foi uma ideia revolucionária (FEYNMAN, 1960). O prefixo “*nano*” tem origem grega e significa anão, sendo assim, um indicador de medida de escala nanométrica. Já a palavra tecnologia, também derivada do grego, possui duas raízes onde “*téchne*” significa a arte, prática, ofício e “*logos*” é sinônimo de ciência, estudo, conhecimento (DURAN, 2006).

O desenvolvimento da nanotecnologia tem evidenciado cada vez mais a multidisciplinaridade entre os campos científicos, abrange, portanto, aplicações em diversas áreas, desde a indústria farmacêutica até setores de eletrônica e energia (ROSSI-BERGMANN, 2008).

O uso de nanomateriais na indústria farmacêutica possibilitou o desenvolvimento de produtos de liberação controlada, habitualmente chamado de “*Drug Delivery Systems*”. Estes sistemas destacam-se pelas inúmeras vantagens oferecidas em comparação aos sistemas de dosagem convencional (PIMENTEL *et al.*, 2007), tais como: possibilidade de vetorização do princípio ativo para seu alvo específico; controle da liberação do princípio ativo, minimizando o aparecimento de doses tóxicas e sub-terapêuticas; diminuição da dose terapêutica e no número de administrações; utilização reduzida da quantidade de princípio ativo, em consequência se obtêm um menor custo. Ou seja, os produtos de liberação controlada visam melhorar a terapia medicamentosa em virtude das limitações potenciais de fármacos convencionais, conferindo melhor adesão do paciente ao tratamento. Entre as desvantagens dos “*Drug Delivery Systems*” podemos citar: dependendo dos materiais e dos processos utilizados o custo torna-se mais elevado, entretanto, há a compensação na redução no número de administração de doses necessárias e, outra desvantagem é que deve ser monitorada e controlada quanto à

possível toxicidade dos produtos da sua biodegradação (ROSSI-BERGMANN, 2008).

A capacidade de controlar a liberação do fármaco e a escolha do polímero tem feito as nanopartículas poliméricas candidatas ideais para a terapia do câncer, liberação de antibióticos, liberação de vacinas e contraceptivos (KAYSER *et al.*, 2005). Em relação às doenças mais citadas nos resumos de patentes relacionadas a sistemas de liberação controlada de fármacos, os dados revelam que, o câncer encontra-se na primeira posição como tópico, seguido da diabetes (ROSSI-BERGMANN, 2008).

ALVES *et al.* (2008) relatam que as nanopartículas possuem características necessárias para que os sistemas de liberação de fármaco sejam efetivos, de forma que permitem a entrega em local apropriado, mantendo os níveis de concentração adequadas por longos períodos de tempo. Acrescenta também os tipos de sistemas nanoestruturados empregados pela indústria farmacêutica para a encapsulação de ativos, a exemplo das nanopartículas poliméricas, lipídicas sólidas e lipossomas.

Nos últimos anos, vem sendo estudado e pesquisado, o uso do metotrexato em nanocarreadores, com o intuito de melhorar a resposta farmacológica e minimizar os efeitos indesejáveis do fármaco. Sabe-se que quando administrado por via oral, o metotrexato possui meia vida curta, havendo a necessidade de doses elevadas ou repetidas para manter a concentração no tecido alvo. O encapsulamento do fármaco com polímeros pode aumentar sua meia vida (SINGH E UDUPA, 1997). Além disto, é excretado pelos rins e possui como efeito secundário hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, supressão da medula óssea entre outros efeitos indesejáveis, e para superar, é possível desenvolver um sistema de liberação diferenciado, com vetorização ao sítio-alvo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um levantamento bibliográfico referente à aplicação de nanocarreadores contendo o fármaco metotrexato para o tratamento de câncer.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demonstrar o potencial da nanotecnologia farmacêutica como ferramenta destinada ao combate e controle de doenças e aspectos relevantes incluindo o histórico.
- Abordar um panorama geral do fármaco metotrexato.
- Abordar aspectos do câncer e tratamento.
- Descrever e discutir os sistemas nanoestruturados contendo o fármaco metotrexato.

3 JUSTIFICATIVA

A tecnologia e as novas estratégias para a veiculação de fármacos representam uma importante aplicação da ciência que contribui muito para o avanço da saúde humana. A utilização de sistemas de entrega de fármacos nas suas mais variadas formas, a exemplo das nanopartículas poliméricas, lipídicas sólidas, lipossomas, dendrímeros entre outros, tem se mostrado efetiva para a obtenção de novos produtos com características precisas e individualizadas.

Assim sendo, a escolha do fármaco metotrexato descrito neste trabalho tem como principais razões:

- Custo do fármaco
- Toxicidade
- Desenvolvimento em nanotecnologia farmacêutica

O metotrexato é um fármaco de custo baixo e possui um volume de vendas bastante elevado, entretanto exige controle de seus efeitos adversos, pois possui potencial risco devido a sua toxicidade. Portanto, em virtude do fármaco possuir alto índice de resistência e toxicidade, sua veiculação em nanodispositivos vem sendo vastamente investigada. O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos tem otimizado e aprimorado os efeitos farmacológicos, superando os mecanismos de resistência das células cancerígenas, diminuindo os efeitos adversos e melhorando a adesão do paciente ao tratamento.

4 METODOLOGIA

Com o propósito de contribuir para a formação acadêmica e atualização dos profissionais de saúde a respeito dos avanços da nanomedicina, o objeto desta pesquisa utilizou de levantamento bibliográfico em base de dados Scopus, PubMed, ScienceDirect, Scientific Electronic Library Online (SciELO). Outras formas de referências também foram utilizadas para a elaboração desta revisão como artigos do grupo de pesquisa Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos (SNAF) e Laboratório de Micro e Nanopartículas Aplicadas na Terapêutica, teses e dissertações. Foram utilizados alguns termos de pesquisa (palavras-chave e delimitadores) em combinações: “*nano**”, “*drug*”, “*methotrexate**”, “*tumor*” e “*cancel*”.

Os critérios de inclusão para escolha das publicações foram os seguintes: artigos publicados entre janeiro de 2000 a setembro de 2015, incluindo artigos originais e de revisão escritos nos idiomas inglês, português e espanhol, de forma que, foram incluídos aqueles que apresentavam dados pertinentes à temática e que, de alguma forma, mostrassem resultados significativos a fim de garantir o embasamento teórico necessário para a discussão do tema.

A partir do levantamento de dados, o trabalho foi dividido em quatro partes. A primeira abordando a relevância do tema nanotecnologia, o cenário mundial, seu histórico e aplicações. Na segunda parte foi abordado um panorama geral sobre o fármaco metotrexato. A terceira parte foram discutidos aspectos relevantes quanto à doença do câncer e avanços da nanotecnologia oncológica para o tratamento do câncer. Por fim, na quarta parte foi apresentado os sistemas de nanocarreadores encapsulados com o fármaco metotrexato para o uso em tratamento do câncer, sendo incluídos os sistemas de nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas e dendrímeros.

5 RESULTADOS

5.1 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia, de acordo com o *National Nanotechnology Initiative* (NNI)ⁱ - iniciativa do governo dos Estados Unidos que envolve a pesquisa e desenvolvimento, é definida como: “A compreensão e controle da matéria em dimensões de cerca de 1 a 100 nanômetros, onde fenômenos únicos permitem novas aplicações”. Neste âmbito, dentre os setores em maior evidência está nanomedicina. Segundo a *European Science Foundation* (ESF) o termo é definido como: “É a ciência e tecnologia de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças e lesões traumáticas, de aliviar a dor, e de preservar e melhorar a saúde humana, o uso de ferramentas moleculares e conhecimento molecular do corpo humano” (WEBSTER, 2006). Ou seja, a fim de desenvolver ferramentas destinadas ao combate e controle de doenças, pesquisadores têm focado em fazer uso de inovações de base nanotecnológica aplicada a fármacos. Os estudos de nanoencapsulamento têm por objetivo, principalmente, direcionar e controlar a liberação de fármacos em seu sítio-alvo.

Para comprovar a atualidade do tema junto ao meio acadêmico foi realizado um estudo quantitativo junto às bases de dados PubMed e ScienceDirect, a fim de verificar, em termos numéricos, o quanto está sendo produzido e divulgados por jornais e revistas científicas ao longo dos últimos quinze anos sobre nanotecnologia, especificamente. A Figura 1 mostra o resultado do estudo demonstrando que, o número de artigos a respeito do tema tem aumentado ano a ano, sendo possível inferir que, hoje, há um elevado interesse envolvendo o assunto, ou seja, o crescente número de artigos publicados contendo a palavra “*nanotechnology*” sugere e indica elevados investimentos realizados em pesquisas nessa área.

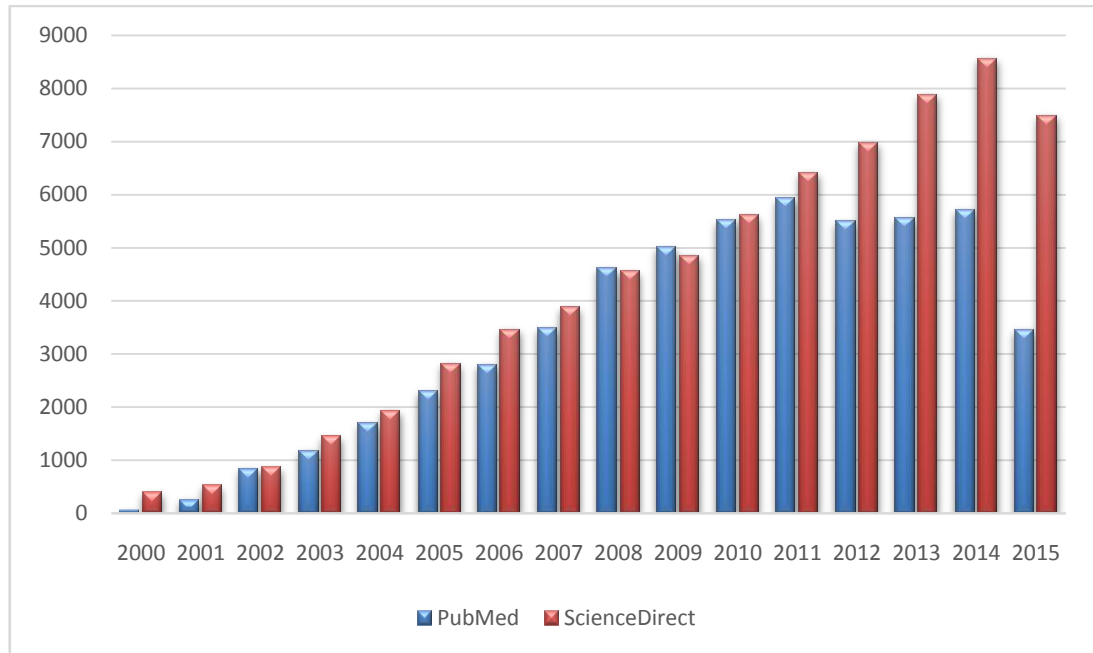


Figura 1. Publicações em nanotecnologia catalogadas no PubMed e ScienceDirect (2000-2015)

Também foi realizado um estudo comparativo quanto à produção científica em nanotecnologia nos últimos quinze anos, entre onze países, incluindo o Brasil. Para tanto, foram utilizadas informações disponíveis na base de dados Scopus. O resultado desta pesquisa, conforme a Figura 2 demonstra que a quantidade de depósitos publicados dos Estados Unidos é de 22.158, o que corresponde a 55,77% a mais em relação ao segundo país, a China, com 9.801 publicações seguidas pela Alemanha com 4.911.

Quanto ao cenário brasileiro, os investimentos relacionados à Nanosciences & Nanotechnologies (N&N) têm crescido significativamente. Dados revelam que o Brasil contribuiu cerca de 1,9% da produção mundial científica, tendo a melhor e maior infraestrutura da América Latina. Pesquisas mostraram que todas as regiões do Brasil possuem grupos de pesquisa relacionados à N&N. A região Sudeste lidera com 40% e Sul com 29%, seguido do Nordeste (19%), Centro-Oeste (9%) e Norte (3%) (DIMER, 2013).

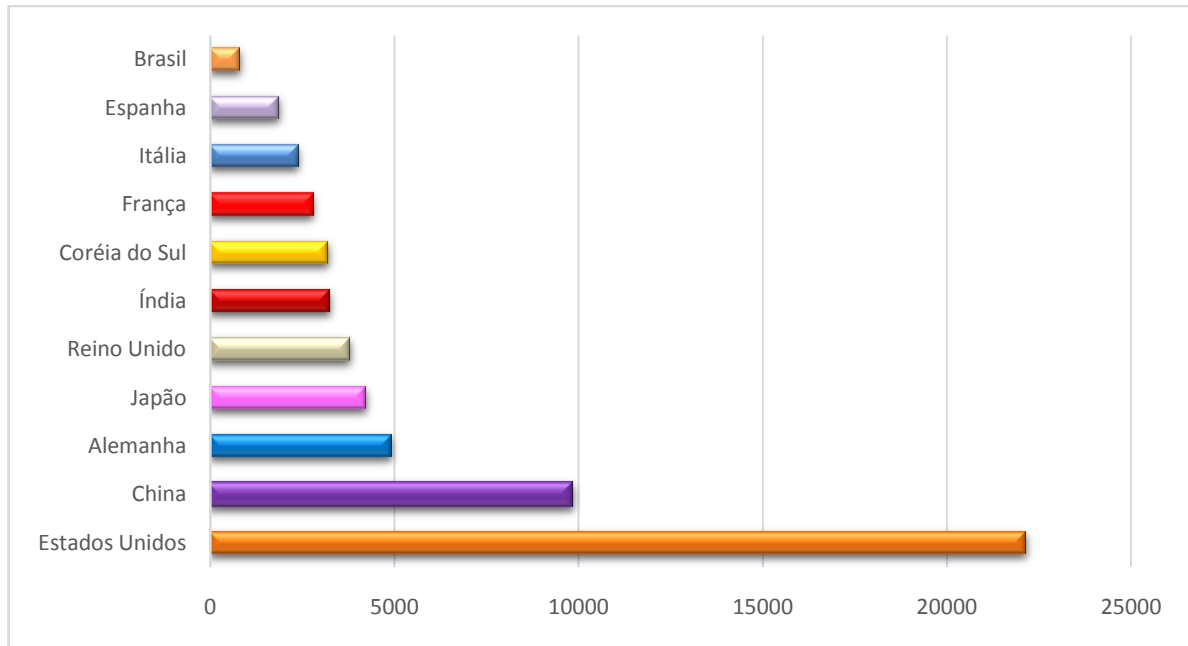


Figura 2. Comparativo entre depósitos publicados entre onze países na base de dados Scopus (2000-2015).

Segundo os autores ZANETTI-RAMOS E CRECZYNKSY-PASA (2008), os Estados Unidos (EUA), a União Européia (UE) e o Japão apresentam os maiores níveis de desenvolvimento em nanotecnologia. Com o programa de pesquisa e desenvolvimento em nanotecnologias, os EUA aumentaram as despesas federais de 220 milhões de dólares no ano 2000 para 982 milhões de dólares em 2005. Quanto ao cenário brasileiro, a nanotecnologia brasileira tem produzido resultados nas áreas farmacêuticas e biotecnológicas, com ênfase aos nanocarreadores utilizados em associação a medicamentos, principalmente quimioterápicos assim como em cosméticos também.

Para descrever o histórico da nanotecnologia é necessário voltar alguns anos, quando em 1959, o físico americano Richard Feynman enunciou uma conferência na Reunião da Sociedade Americana de Física, na ocasião discutiu-se a respeito da manipulação de átomos na escala nanométrica com características individualizadas. Os principais acontecimentos no que diz respeito à nanotecnologia, estão brevemente descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Cronologia da nanotecnologia

Ano	
1959	Conferência de Richard Feynman, na Reunião da Sociedade Americana de Física.
1966	Viagem Fantástica (<i>Fantastic Voyage</i>), filme baseado no livro de Isaac Asimov.
1974	Norio Taniguchi cunha o termo nanotecnologia.
1981	Trabalho de Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, criadores do microscópio eletrônico de tunelamento (<i>scanning tunneling microscope</i>).
1985	Descoberta dos fulerenos, por Robert Curl, Harold Kroto e Richard Smalley.
1986	Publicação do livro de Eric Drexler, " <i>Engines of Creation</i> ".
1989	Donald Eigler escreve o nome IBM com átomos de xenônio individuais.
1989	Descoberta dos nanotubos de carbono, por Sumio Iijima, no Japão.
2000	Administração Clinton lança no California Institute of Technology, a <i>National Nanotechnology Initiative</i> .
2001	Cees Dekker, biofísico holandês, demonstrou que os nanotubos poderiam ser usados como transistores ou outros dispositivos eletrônicos.
2001	Equipe da IBM (EUA) constrói rede de transistores usando nanotubos, mostrando mais tarde o primeiro circuito lógico à base de nanotubos.
2002	Chad Mirkin, químico da Northwestern University (EUA), desenvolve plataforma, baseada em nanopartículas, para detecção de doenças contagiosas.

(Fonte: ALVES, 2004).

Os estudos e descobertas desenvolvidos pelos pesquisadores atentam que tenha ocorrido uma nova revolução científica, quando em 2000 o governo de Clinton lançou no California Institute of Technology, a *National Nanotechnology Initiative*, fato que propiciou maior visibilidade e investimentos a essa área de pesquisa.

5.2 METOTREXATO

O metotrexato (ácido 2,4-diamino-N10-metilpteroil glutâmico - MTX) (Figura 3a) foi desenvolvido na década de 1940 por um grupo de pesquisadores dos Laboratórios Lederle (SKUBISZE TONG, 2012). Em 1953 foi aprovado pelo FDA para uso em quimioterapias (KRISHAN, 2007). Já no ano de 1956, a sua aplicação em um tratamento de uma mulher com coriocarcinoma terminal produziu a primeira cura de um tumor sólido pela quimioterapia (SKUBISZE TONG, 2012). Na década de 1980, mais especificamente em 1988, o uso de MTX foi aprovado pelo FDA para o tratamento da artrite reumatóide sendo considerada a terapia padrão ouro (ABOLMAALI *et al.*, 2013).

O MTX possui massa molar de $454,5 \text{ g.mol}^{-1}$ e fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_5$ e apresentando-se um pó alaranjado cristalino. É um análogo do ácido fólico (Figura 3b), possuindo na sua estrutura um anel pteridina, ácido *p*-aminobenzóico e ácido glutâmico. A solubilidade em água é de $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$, ou seja, praticamente insolúvel em meios aquosos, sendo sua solubilidade pH dependente. A molécula é sensível ao calor e à degradação pela luz (ABOLMAALI *et al.*, 2013; RUBINO, 2001). Apresenta baixa lipossolubilidade, sendo necessário ser transportado através do carregador de folato reduzido para alcançar o citoplasma das células (SCHRODER E STEIN, 2003).

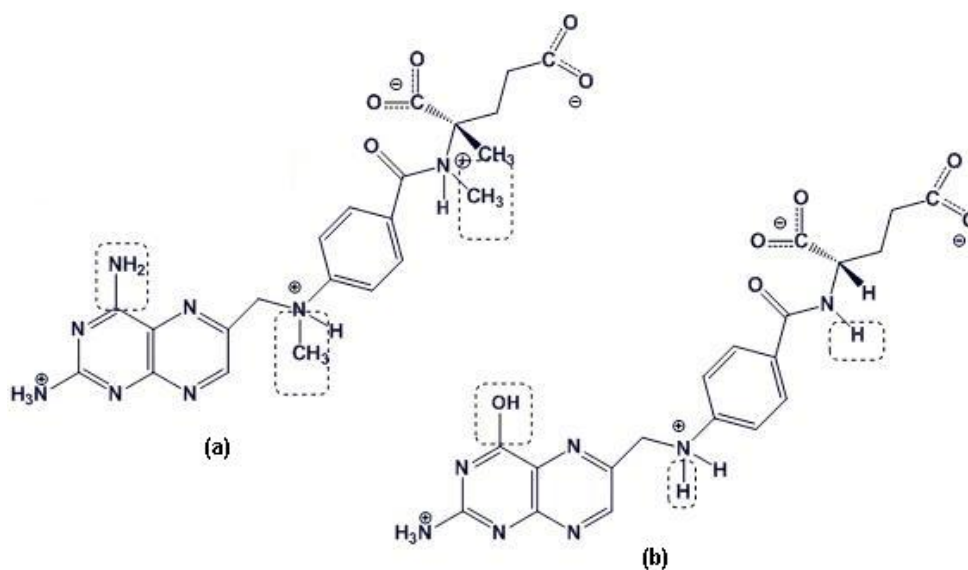


Figura 3. Estrutura química do metotrexato (a) e do ácido fólico (b).

O fármaco é classificado com um antimetabólico, sendo um antagonista específico do ácido fólico. Age inibindo a proliferação de células malignas e a síntese de purinas e pirimidinas (CHAN E CRONSTEIN, 2002). Atua através da inibição da dihidrofolatoredutase (DHFR), enzima necessária para a conversão do diidrofolato em tetraidrofolato (forma ativa), resultando assim na depleção de tetraidrofolatos que são necessários para a síntese de purinas e timidilato. Deste modo, a síntese de DNA e RNA são interrompidas assim como as reações metabólicas (ABOLMAALI *et al.*, 2013).

Devido a sua atividade citotóxica e imunossupressora, o fármaco é utilizado no tratamento de diversos tipos de tumores sólidos, doenças malignas hematológicas e doenças auto-imunes, tais como artrite reumatóide (AR). Tem desempenhado papel importante e crucial no tratamento de câncer de pulmão, mama, bexiga, osteossarcoma, leucemia linfóide aguda, leucemia mielóide crônica, meduloblastoma cerebral e linfoma primário do sistema nervoso central (SNC) (ABOLMAALI *et al.*, 2013). Deve-se atentar as contra-indicações do fármaco, pois é classificado na categoria D teratogenicidade, ou seja, é abortivo e teratogênico, seu uso é contra-indicado durante a gravidez assim como não deve ser prescrito às mulheres que amamentam (CARRETERO *et al.*, 2010).

A administração do MTX pode ser por diferentes vias dentre elas a oral, intramuscular, subcutânea, intravenosa (PUIG, 2014). Doses orais baixas são rapidamente absorvidas no trato gastrointestinal (TGI) por transporte ativo, entretanto para doses elevadas a absorção é irregular, devido à saturação do transporte. Os níveis séricos máximos são alcançados entre 1 a 4 horas após a administração. Aproximadamente 50% do MTX absorvido está ligado às proteínas séricas, porém, se distribui facilmente para as células dos tecidos, sendo as maiores concentrações encontradas nos rins, baço, fígado e pele. A eliminação ocorre majoritariamente pela via renal, cerca de 90% (OLIVEIRA, 2010). Seus principais metabólitos são 7-hidroxi-metotrexato (7OH-MTX), 4-amino-4-deoxi-N¹⁰-ácidometilpterico (DAMPA) e derivados poliglutamatos (RUBINO, 2001), sendo os responsáveis pelo aumento da toxicidade, especialmente nos tecidos que estão em alta divisão celular, tal como a pele, medula óssea e TGI (LELES, 2008).

5.3 CÂNCER

A palavra câncer foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina que viveu entre 460 e 377 a.C. e possui origem grega, na tradução quer dizer “carangueijo” (INCA, 2011). O câncer é considerado um conjunto de doenças que possui em comum o crescimento desordenado da célula tumoral. É também classificado como uma doença complexa, ocasionada pela instabilidade genética e/ou acúmulo de alterações moleculares atípicas, de forma que há um crescimento acelerado e desordenado de células capazes de invadir órgãos e tecidos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (FREITAS, 2011; NIE *et al.*, 2007).

O processo de formação do câncer, também chamado de oncogênese ou carcinogênese, é composto por três estágios: 1º) Iniciação, quando os genes sofrem a ação dos agentes carcinógenos; 2º) Promoção, quando os agentes oncopromotores atuam na célula já alterada; 3º) Progressão, no qual ocorre a multiplicação irreversível e descontrolada da célula (INCA, 2011).

A política da legislação sanitária brasileira, na década de 1920, nomeou a proposta anti-câncer, em virtude do crescente número de casos de câncer na Europa e Estados Unidos. Desde então, no Brasil, o número de casos de pessoas com câncer tem aumentado significativamente, o que é preocupante e assustador (FREITAS, 2011), o que confere na atualidade, um dos mais importantes problemas de saúde pública.

A classificação dos vários tipos de câncer é feita de acordo com a localização primário do tumor, podendo atingir qualquer parte do corpo, sendo alguns órgãos mais afetados que outros. Na população brasileira, os tipos de câncer mais incidentes são: câncer da cavidade oral (boca); cólon e reto (intestino); esôfago; estômago; mama; pele do tipo melanoma e não melanoma; próstata; pulmão; colo do útero e leucemias (INCA, 2011).

De acordo com dados estatísticos do INCA (2011), as principais causas de câncer são o tabagismo (30%), a alimentação (30%) e a hereditariedade (15%) (Figura 4).

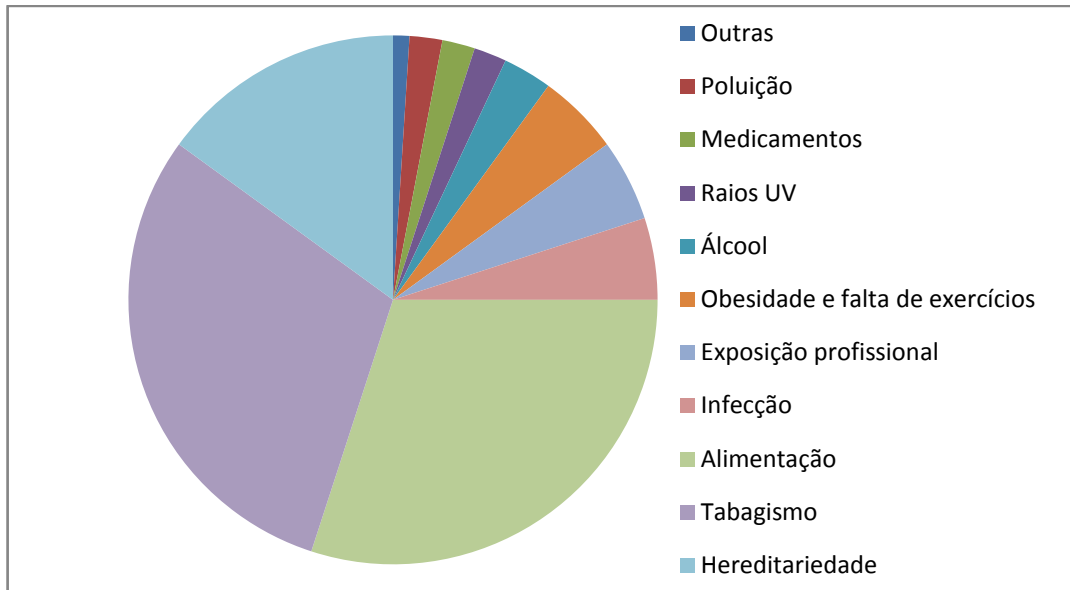


Figura 4. Principais causas de câncer (Fonte: INCA, 2011)

Atualmente, a maior dificuldade está em combater e desenvolver novas terapias satisfatórias para tratamento do câncer. Em virtude disso, pesquisadores tem se dedicado no intuito de trazer algo eficaz e inovador, neste contexto, a nanotecnologia tem sido uma estratégia muito investigada por apresentar características diferenciadas (FREITAS, 2011).

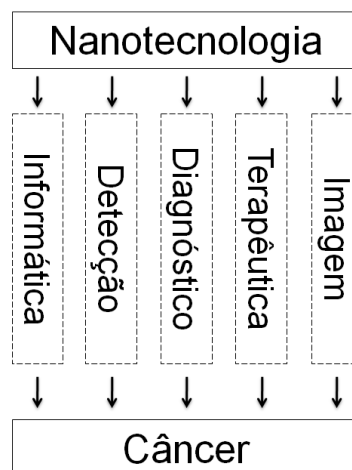


Figura 5. Diagrama esquemático que mostra aplicações da nanotecnologia no câncer através de imagem molecular, detecção precoce, diagnóstico molecular, terapia-alvo, e bioinformática câncer.(Fonte: Adaptado de NIE *et al.*, 2007)

Avanços da nanomedicina têm permitido o desenvolvimento de sistemas eficientes de diagnóstico e tratamento, visa assim, alavancar melhorias perante a medicina tradicional, no qual o diagnóstico e a entrega do ativo devem corresponder a um tratamento pontual. Em tumores sólidos, podem ser acumulados materiais

nanoestruturados, através de um mecanismo passivo que faz uso do aumento da retenção e permeabilidade em tumores, chamado de EPR (“*enhanced permeability and retention effect*”) (CANCINO *et al.*, 2014). É relevante destacar que este efeito EPR é decorrente da ineficiência do sistema linfático em conjunto com o aumento da permeabilidade da vasculatura (BROCHADO, 2013).

O FDA (*Food and Drug Administration*), órgão responsável pelo controle de novos produtos no mercado americano, aprovou, em meados da década de 1990, a Doxil®, uma formulação lipossomal de doxorubicina, no qual o fármaco foi nanoencapsulado e os estudos demonstraram que houve a diminuição da cardiotoxicidade para o tratamento de câncer nos ovários, quando comparado a doxorubicina livre. O Abraxane® é outro exemplo de produto aprovado pelo FDA, em 2005, este consiste em uma nanopartícula contendo albumina e paclitaxel, sendo indicado para o tratamento de diversos cânceres (CANCINO *et al.*, 2014).

Tabela 2. Exemplo de nanotecnologias aplicadas a terapia oncológica.

Produto	Ativo	Formulação	Via administração	Aplicação terapêutica
Abraxane	Paclitaxel	NP-Albumina	IV	Câncer de mama
Caelyx	Doxorrubicina	Lipossoma	IM	Câncer de mama, ovário e sarcoma de Kaposi
Myocet	Doxorrubicina	Lipossoma	IV	Câncer de mama
Doxil	Doxorrubicina	Lipossoma	IV	Sarcoma de Kaposi

(Fonte: Adaptado de BROCHADO, 2013).

Em suma, a nanotecnologia oncológica destaca-se pela utilização de estratégias de veiculação e vetorização de fármacos, permitindo a localização dos agentes terapêuticos somente nas células-alvo, deste modo, eliminando a toxicidade não-específica (BROCHADO, 2013).

5.4 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

A Comissão Europeia, em 2011 publicou no Jornal Oficial da União Europeiaⁱⁱ recomendações sobre a definição de nanomateriais:

“Um nanomaterial é definido como aquele de origem natural, incidental ou manufaturado contendo partículas em estado não-ligado, aglomerado ou agregado para os quais 50% ou mais das partículas da distribuição por número, ou uma ou mais das dimensões externas, situa-se na faixa entre 1 e 100 nm. Em casos específicos e sempre que se justificar por preocupação ao meio ambiente, à segurança, à saúde ou à competitividade, o limite de 50% da distribuição de tamanho por número pode ser substituído por um limiar entre 1 e 50%.”

Um dos comitês da *International Organization for Standardization* (ISO) focado em Nanotecnologia é a ISO TC 229ⁱⁱⁱ. Conforme consta no documento, a normalização no campo nanotecnológico deve incluir no mínimo um dos seguintes aspectos:

- “- Entendimento e controle da matéria e processos em nanoescala, tipicamente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros em uma ou mais dimensões, onde o aparecimento de fenômenos dependentes de tamanho permite novas aplicações;
- Utilização das propriedades das matérias em nanoescala que são diferentes das propriedades dos átomos individuais, moléculas, ou dos materiais macroscópicos, criando materiais, dispositivos e sistemas melhores que explorem essas novas propriedades.”

Além disto, o Comitê também aborda sobre o desenvolvimento de normas em três diferentes eixos: Metrologia e instrumentação; Terminologia e nomenclatura e práticas de saúde, segurança e meio ambiente. Um novo eixo foi incluso mais recentemente abrangendo a especificações de materiais.

Para esta parte do trabalho foi necessário restringir ainda mais a pesquisa nas bases de dados, visando colocar os estudos mais atuais, relevantes e com maiores números de citações da área de farmacologia e toxicologia. Além disso, foram incluídos teses e dissertações pertinentes a temática. Desta forma, foram selecionados⁵ estudos para os diferentes nanocarreadores descritos a seguir: 1) Nanopartículas Poliméricas; 2) Nanopartículas Lipídicas Sólidas; 3) Lipossomas e 4) Dendrímeros.

5.4.1 Nanopartículas Poliméricas

De acordo com SCHAFFAZICK *et al.* (2003), o conceito de nanopartículas poliméricas é definido como:

“São sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a $1\mu\text{m}$. O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferenciam entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido.”

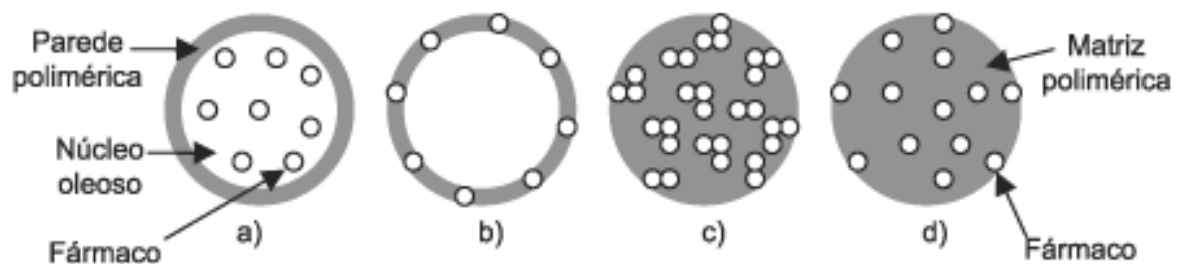


Figura 6. Imagem ilustrativa de a) nanocápsulas contendo fármaco dissolvido no núcleo oleoso; b) nanocápsulas contendo fármaco adsorvido na parede polimérica; c) nanoesferas com fármaco retido na matriz polimérica e d) nanoesferas com fármaco adsorvido/ disperso na matriz polimérica. (Fonte: SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)

A preparação das nanopartículas pode ser classificada basicamente em duas diferentes metodologias, a primeira delas é baseada na precipitação dos polímeros pré-formados e a outra na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Os polímeros como poli(ácido lático) (PLA), o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL) são os mais utilizados clinicamente, bem como os biopolímeros quitosana e albumina que possuem a vantagem de menor custo em relação aos sintéticos (ROSSI-BERGMANN, 2008). Após a preparação da formulação é possível compreender o comportamento físico químico destes sistemas através da realização de análises morfológicas, determinação da distribuição de tamanho de partícula, determinação

da distribuição da massa molar do polímero, medição do potencial zeta e pH das suspensões (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Visando avaliar a eficácia de nanocápsulas de núcleo lipídico incorporadas com metotrexato (LNC MTX) para o tratamento do glioblastoma multiforme (GBM), PEREIRA (2015) avaliou, experimentalmente, o efeito citotóxico em linhagens de células tumorais de glioma murino (GL261) e de micróglia (BV2). O GBM é uma doença grave, classificada como neoplasia maligna de origem astrocitária e não possui um tratamento eficaz visto que a quimioterapia possui uma limitação na sobrevivência do paciente, uma vez que a barreira hemato-encefálica (BHE) confere algumas restrições na terapia de doenças que atingem o sistema nervoso central. Os resultados mostram que as LNC MTX possuem efeito citotóxico nas duas linhagens celulares tumorais, atuando na fase G1 do ciclo celular, entretanto, as células BV2 são mais resistentes ao MTX causando a fragmentação do DNA, já as células GL261 são mais sensíveis a este efeito. Além disso, foi possível detectar uma redução do volume tumoral do GBM, tal redução não foi detectada em animais tratados com solução de MTX, sendo assim a estratégia da nanoencapsulação do MTX sugere ter sido importante para o tratamento do glioblastoma.

JAIN *et al.* (2015) desenvolveram uma formulação de nanopartículas poliméricas utilizando PLGA, revestidas e carregadas com Tween 80 e metotrexato-transferrina, respectivamente, (NP-MTX-TF-Tw) com o objetivo de aumentar a permeação de moléculas bioativas através da barreira hematoencefálica (BHE) para tratamento de câncer no cérebro. Foram realizados estudos de citotoxicidade em células de glioma C6 e avaliaram, experimentalmente, em modelos de ratos a eficácia anti-tumoral da formulação desenvolvida comparando ao controle. Foi possível detectar uma maior citotoxicidade da formulação desenvolvida para as células de glioma C6 e além disso, o pequeno tamanho das nanopartículas podem levar ao efeito EPR assim como o revestimento de polissorbato 80 pode permitir uma melhor permeabilidade celular devido as alterações na fluidez da membrana celular. Também detectaram uma maior compatibilidade, menor toxicidade e maior atividade antitumoral da formulação NP-MTX-TF-Tw, visto que os animais tratados mostraram uma significativa redução do volume do tumor enquanto o grupo controle negativo não apresentou nenhuma inibição do tamanho do tumor. Conclui-se neste

estudo que as NP-MTX-TF-Tw são uma ótima ferramenta para a terapia de câncer no cérebro, devido principalmente ao seu potencial de entrega sustentada.

Visando desenvolver um sistema de entrega de drogas polimérico AFSHARI *et al.* (2014) propuseram utilizar os polímeros PLGA e PEG nas nanopartículas de metotrexato. A capacidade de induzir apoptose através da atividade da caspase-3 e a citotoxicidade em três diferentes linhagens de células tumorais foram avaliadas em comparação ao fármaco livre. Os resultados mostraram que as nanopartículas de MTX (PLGA-PEG) foram mais eficazes, tanto na citotoxicidade quanto na capacidade de induzir apoptose visto que a atividade da caspase-3 aumentou nas linhagens de células MCF-7 (adenocarcinoma de mama), AGS (carcinoma gástrico humano) e A549 (carcinoma de pulmão).

CHEN e colaboradores (2013) relataram uma nova estratégia de preparação de nanopartículas de MTX. Utilizaram o polímero quitosana (CS) e metoxi(polietilenoglicol) (mPEG) para melhorar a segmentação e prolongar o tempo na circulação sanguínea. Prepararam e avaliaram as nanopartículas (NPs MTX-mPEG-CS) e o MTX livre quanto à eficácia e toxicidade alvo *in vitro* e *in vivo*. Os resultados demonstraram que se obteve maior eficiência de inibição quando os animais foram tratados com NPs MTX-mPEG-CS, ou seja, a inibição do crescimento e proliferação das células tumorais foi muito maior quando comparado ao fármaco livre. Desta forma, a estratégia proposta e estudada visa ser um alvo promissor principalmente para o tratamento de carcinoma do colo do útero, visto que os testes de citotoxicidade foram realizados em células epiteliais de carcinoma do colo de útero humano (HeLa).

Um estudo realizado por PRETTI *et al.* (2012), relata um sistema de entrega de droga no qual o fármaco, MTX, foi encapsulado em um copolímero anfifílico biocompatível e biodegradável (mPEG-PCL) formando o completo NP-MTX-mPEG-PCL. Realizou-se teste de liberação controlada e avaliou-se o potencial de citotoxicidade em células de osteossarcoma humano (MG63) – tumor ósseo maligno. Como conclusão, os autores do estudo confirmaram a diminuição na viabilidade celular das células de osteossarcoma indicando que o nanodispositivo do fármaco foi eficiente.

5.4.2 Nanopartículas Lipídicas Sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram introduzidas na década de 90 por Müller e Lucks ao patentarem a primeira formulação de NLS por homogeneização à alta pressão (MÜLLER *et al.*, 2000).

SOUTO *et al.* (2011) definem as NLS como:

“Sistema alternativo de encapsulação de princípios ativos em relação aos sistemas coloidais tradicionais, tais como emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas. O grande diferencial das NLS é a sua excelente estabilidade físico-química, que proporciona maior proteção contra a degradação de fármacos lábeis. Na área farmacêutica, as NLS podem ser usadas por todas as vias de administração, como a oral, parenteral e cutânea, devido seu tamanho reduzido, variando de 50 a 1000 nm e biocompatibilidade.”



Figura 7. Esquema representativo de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (Fonte: Adaptado de MÜLLER *et al.*, 2000)

As NLS são formadas por uma matriz lipídica sólida, ou seja, lipídios sólidos a temperatura ambiente no qual a substância ativa é incorporada, tensoativos para estabilização e água. Mistura de glicerídeos, ceras e triglicerídeos são exemplos de lipídios utilizados na preparação das NLS. Possuem elevada versatilidade para carrear diferentes ativos, podendo ser administradas pelas vias oral, oftálmica, parenteral e dérmica, sendo a via oral mais atrativa em virtude do seu potente comercial (MARCATO *et al.*, 2009).

Dentre as vantagens destes sistemas tem-se a facilidade de produção em larga escala, o que atrai o interesse das empresas para produção deste nanocarreador. Além disso, há a possibilidade de utilizar diferentes métodos na produção das NLS, sendo possível utilizar reagentes aprovados pela FDA e não usar solventes orgânicos. Como desvantagens, tem-se que a eficiência de encapsulamento é baixa (MARCATO *et al.*, 2009).

Visto que o metotrexato sofre de baixa biodisponibilidade, KAKKAR *et al.* (2015) estudaram um sistema nanoparticulado que consiste em um núcleo lipídico peguado de ácido esteárico, a fim de avaliar o potencial de encapsulamento e a entrega do fármaco quimioterápico. Quanto à avaliação físico-química das partículas, observou-se que a formulação de NLS peguadas é estável, com tamanho médio em torno de 130 nm e baixo índice de polidispersão e morfologia quase esférica. Estudos de citotoxicidade *in vitro* foram realizados em células V79 de fibroblastos, para tanto utilizou-se o ensaio de MTT. A viabilidade versus concentração revelou uma diminuição da atividade mitocondrial em virtude do aumento do tempo de exposição à formulação desenvolvida, desta forma foi possível concluir que as NLS de ácido esteárico carregadas com MTX são não tóxicas para as células normais, permitindo seu uso como veículos para fármacos quimioterápicos.

ZHUANG *et al.* (2012) desenvolveram três formulações de nanopartículas lipídicas sólidas contendo mitoxantrona (MTO), paclitaxel (PCT) e metotrexato (MTX) para aplicação futura na clínica, visando investigar os efeitos citotóxicos sobre a linhagem celular de câncer da mama (MCF-7). A partir das curvas de crescimento obtidas pelo ensaio de MTT, foram obtidos os valores da concentração inibitória 50% (IC50). A citotoxicidade *in vitro* da NLS-PCT e do PCT livre foram semelhantes, enquanto que para as formulações de NLS-MTO e NLS-MTX foi mais elevada do que os respectivos fármacos livres. Os pesquisadores ainda realizaram um estudo farmacológico em ratos afetados, trataram com as NLS durante um mês e o tumor foi inibido significativamente ($p < 0,05$) quando comparado ao tratamento com o fármaco livre. A conclusão sugere que, as formulações desenvolvidas contendo os fármacos anticâncer, incluindo a MTO, MTX e PCT podem ser mais eficazes para a terapia do câncer de mama.

Visando propor um novo método para preparar nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) BATTAGLIA *et al.* (2011) estudaram o encapsulamento do MTX dentro das NLS pela técnica de coacervação, além de avaliar a eficácia *in vitro* e *in vivo* para linhagens celulares Mat B-III e MCF-7 e em modelos de tumores de mama. Em comparação com o fármaco livre as NLS carregadas com o metotrexato apresentaram um aumento significativo na inibição do crescimento das células tumorais de forma que houve um maior acúmulo no tecido neoplásico, sendo assim as NLS-MTX são promissores veículos para a entrega do fármaco e eficazes para o tratamento do câncer de mama.

Com o intuito de investigar o potencial de superfície projetada de nanopartículas lipídicas sólidas como vetores para contornar a barreira hematoencefálica e também propiciar melhor eficácia terapêutica de fármacos anti-câncer, AGARWAL *et al.* (2011) investigaram as NLS-MTX conjugadas com albumina de soro bovino catiônico (CSBA). Estas foram preparadas pela técnica de fusão-dispersão por ultra-som seguido pelo método modificado descrito por Nimje *et al.* (2009) e após foram caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. Obteve-se tamanho de partícula $94,5 \pm 1,5$ nm, índice de polidispersão de $0,086 \pm 0,009$ e potencial zeta positivo ($+10,3 \pm 0,6$ mV) devido a substituição dos grupos carboxílicos com funcionalidades amina na ligação do CSBA na NLS. Estudos de captação celular foram avaliados utilizando células cerebrais (BCs) e HNGC1 (linhagens de células neuroglial humano). NLS-MTX-CSBA exibiram efeito citotóxico mais potente quando comparado ao MTX livre. Assim, pode-se considerar esta formulação como potencial veículo para uma variedade de fármacos quimioterápicos visando à entrega específica ao tumor.

RUCKMANI *et al.* (2006) desenvolveram e caracterizaram NLS contendo metotrexato para administração intravenosa. As partículas de NLS-MTX (com ácido estearia e lecitina de soja) foram preparadas pelo método de microemulsificação dos lipídios fundidos e subsequente dispersão da microemulsão. Obtiveram tamanho de partícula em torno de 270 nm e 51,3% aprisionamento fármaco. O estudo farmacológico foi realizado em camundongos portadores de EAC (Ascite Ehrlich Carcinoma), neste estudo foi possível detectar a melhor atividade antitumoral da formulação desenvolvida (NLS-MTX), ou seja, aumentou o tempo de sobrevivência dos camundongos quando comparado ao controle.

5.4.3 Lipossomas

Os lipossomas são sistemas compostos por vesículas fechadas, esféricas e formadas por uma ou mais bicamadas de fosfolipídeos, sendo assim, um sistema promissor de liberação de medicamentos. O processo de formação destes sistemas requer a hidratação sob agitação de fosfolipídeos, para que ocorra a formação de uma dupla camada de moléculas anfipáticas. Estruturalmente, assemelham-se às membranas celulares, sendo biodegradáveis, atóxicos e não-imunogênicos. Tais características o tornam muito versátil, com inúmeras aplicações na clínica (GARCIA, 2014).

As formulações de lipossomas já são utilizadas na terapêutica, um bom exemplo é o primeiro agente quimioterápico lipossomal desenvolvido, a Doxil® (Doxorubicina lipossomal), aprovado pelo FDA para o tratamento de diversos tipos de tumores como câncer de cólon, mama e melanoma (ALVARENGA *et al.*, 2014).

Entre as principais vantagens dos lipossomas, destacam-se a biocompatibilidade, pois podem ser aplicados tanto para fármacos hidrofílicos quanto para hidrofóbicos, conforme ilustrado na Figura 8. A baixa eficiência de encapsulação de fármacos, principalmente para os hidrofóbicos é a principal desvantagem destes sistemas, além da instabilidade. Entretanto, alterando a composição da bicamada lipídica é possível melhorar a estabilidade, tal como a adição de polímeros adesivos, a exemplo da quitosana e PEG (FENG, 2011)

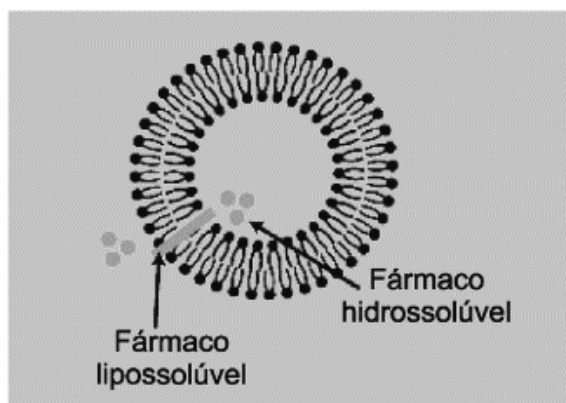


Figura 8. Imagem ilustrativa de um corte transversal de um lipossoma, podendo conter fármaco hidrofóbico retido na bicamada lipídica ou fármaco hidrofílico na cavidade interna aquosa.

(Fonte: PIMENTEL *et al.*, 2007)

PRIVALOVA *et al.* (2015), investigaram duas formulações nanométricas sendo uma nanoemulsão contendo docetaxel e outra formulação lipossomal contendo metotrexato. Realizaram estudos de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células de adenocarcinoma da mama humano MCF-7 através de dois modelos: cultura em monocamada 2D e modelo 3D baseado em esferóides multicelulares tumorais (MTS). Resultados demonstraram que a viabilidade celular das células em MTS foi cerca de 1,4 vezes mais elevada comparando com a cultura em monocamada, indicando que há maior resistência das células. Os autores sugerem que MTS seja uma ferramenta promissora para experimentos *in vitro*, destaca-se por conseguir restabelecer características muito semelhantes a tumores avasculares *in vivo*.

KUZNETSOVA *et al.* (2009) desenvolveram formulações lipossomais contendo metotrexato na forma de um pró-fármaco lipofílico conjugado diglicérido (1,2-dioleilglicerol de MTX ou MTX-DG). Caracterizaram a composição, tamanho e estabilidade e realizaram experimentos em culturas de células leucêmicas humanas (CEM-CCRF). Os resultados demonstraram que o conjugado MTX-DG na formulação lipossomal foi capaz de superar a resistência das células tumorais. Os autores sugerem que isto está relacionado às proteínas da família ABC, que são proteínas transmembrana e podem participar no desenvolvimento da resistência à antifolatos lipofílicos. Como conclusão, a formulação desenvolvida representa um veículo eficaz de entrega de fármacos, entretanto requer mais investigações quanto aos parâmetros farmacocinéticos

DODDOLI *et al.* (2005) desenvolveram lipossomas polimerizados contendo metotrexato (LSP-MTX). No estudo, foram avaliados os parâmetros farmacocinéticos, estudos de citotoxicidade em linhagem celular THP-1 e captação celular em macrófagos. Os resultados mostram claramente as diferenças farmacocinéticas entre a forma lipossomal e o fármaco livre, demonstrando que os lipossomas permitem manter o MTX no interior do pulmão. Relatam que a formulação lipossomal do MTX aumentou significativamente a acumulação celular.

PIGNATELLO *et al.* (2003) desenvolveram formulações de lipossomas multilamelares (MLV), conjugados com MTX-LAA, obtidos a partir de fosfolipídios com diferentes cargas e composição. No estudo, avaliaram a atividade inibitória

contra células eritroleucêmica humana (K562) comparando com atividade do fármaco parenteral e dos conjugados livres e discutiram sobre a carga da superfície e o tipo de conjugado, na forma éster ou forma carboxílico, correlacionando com o efeito biológico. Os autores observaram que a encapsulação em lipossomas aumentou o potencial de atividade contra as células tumorais testadas. Os dados também mostraram que houve influência da carga sobre a atividade antitumoral, no caso de conjugados na forma carboxílico as vesículas positivas apresentaram efeito inibitório maior enquanto a neutra e a negativa reduziram a atividade do fármaco. Já no conjugado na forma éster a atividade mostrou equivalente e/ ou maior nas três cargas.

Com o objetivo de caracterizar lipossomas termossensíveis contendo metotrexato e investigar o seu potencial em melanoma (B16F1) com e sem hipertermia localizada, SANDIP *et al.* (2000) desenvolveram uma formulação lipossomal feita de lipídios sintéticos (distearoilfosfatidilcolina-DSPC e dipalmitoilfosfatidilcolina-DPPC) contendo MTX. Os resultados mostram que lipossomas-MTX à temperatura sensível e com hipertermia localizada de uma hora contribuíram para um sistema de entrega do fármaco devido à redução do volume e ao atraso de crescimento significativo, quando comparado ao MTX livre. Mesmo o sistema lipossomal-MTX sem hipertermia foi vantajoso em relação ao fármaco livre. Os autores sugerem que o efeito da hipertermia para as células tumorais ocorre em decorrência das mudanças no fluxo sanguíneo, seguido de alterações do pH e tensão do oxigênio.

5.4.4 Dendrímeros

Os dendrímeros são moléculas com estrutura bem definidas, apresentam um elevado grau de monodispersibilidade e são extremamente ramificadas, conforme ilustrado na Figura 9 (GARCIA, 2014). O termo deriva do grego “dendron” significa árvore e “meros” parte ou fração. Foi produzido pela primeira vez por Donald Tomalia, na década de 1980 (ROSSI-BERGMANN, 2008).

São estáveis e podem ser funcionalizados em sua superfície através de moléculas e ligantes específicos, a exemplo do folato. A encapsulação do fármaco pode ocorrer no núcleo multifuncional, onde há a proteção devido à elevada ramificação existente (GARCIA, 2014). A solubilidade, flexibilidade, densidade, polaridade, a forma, o peso molecular e o tamanho dos dendrímeros são muito bem controlados, dependem da escolha dos componentes estruturais, núcleo central, grupos funcionais utilizados e das unidades ramificadas (AVTI, 2013).



Figura 9. Esquema ilustrativo de um dendrímero (Fonte: FARAJI, 2009)

Dendrímeros de poliamidoamina(PAMAM) tem sido amplamente investigados para a entrega de fármacos na terapia do câncer. São altamente ramificados e com estrutura química bem definida, sendo facilmente conjugados com diversas funcionalidades, como por exemplo, o direcionamento de moléculas e fármacos e como agentes de imagiologia. ZHANG *et al.* (2011) sintetizaram um dendrímero (G5) PAMAM conjugado com ácido fólico e metotrexato, utilizararam para a síntese uma nova via chamada “onepot” considerada fácil, viável para síntese de larga escala e reprodutível. Realizaram estudos de citotoxicidade através do ensaio colorimétrico “XTT” comparando com outro lote de G5-FA-MTX sintetizado por Cambrex Inc. que utilizaram para a preparação a via de síntese clássica, ou seja, a conjugação de FA e MTX acontece através de ligações amida e éster, respectivamente. Os resultados mostram que tanto o conjugado sintetizado pelos autores quanto o lote Cambrex foram citotóxicos *in vitro* e tumorícidias *in vivo*.

KONG *et al.* (2009) estudaram dendrímeros G4-PAMAM peguilado com polietilenoglicol (PEG) através de ligações amida. O fármaco utilizado como modelo foi o metotrexato. Conjugados PAMAM-MTX e PAMAM-PEG-MTX foram preparados. Avaliaram a atividade antitumoral dos complexos PAMAM-PEG-MTX

comparando com o fármaco livre e PAMAM-MTX através de administração intravenosa em ratos portadores de tumor S180. Durante o experimento os autores calcularam a taxa de inibição do tumor e medição do peso médio do tumor. Os resultados revelaram que a taxa inibitória do tumor pelo PAMAM-PEG-MTX foi 1,8 e 2,1 vezes maior sobre o complexo PAMAM-MTX e o fármaco livre, respectivamente. Foi possível concluir que o conjugado proposto pelos pesquisadores exerceu uma atividade antitumoral maior, sendo assim, o sistema peguilado sugere ser útil no complexo de entrega do fármaco.

Na tentativa de aumentar a permeabilidade dos sistemas de entrega através da barreira hematoencefálica, diminuir a resistência à droga e a fraca penetração no tecido do tumor, DHANIKULA *et al.* (2008) avaliaram veículos de fármacos para o tratamento de gliomas. Desenvolveram dendrímeros conjugados com D-glucosamina carregados com metotrexato, no intuito de aumentar a permeabilidade e a vetorização ao tumor alvo. Os valores de IC50 foram calculados e dendrímeros carregados com MTX apresentaram menor IC50 que o MTX livre, sugerindo assim que o MTX carregado em dendrímeros aumentou a sua potência. Foi avaliada a eficácia da formulação desenvolvida em células U87MG e U343MGA, na qual os dendrímeros-MTX foram capazes de matar até mesmo as células resistentes ao MTX. A glicosilação elevou a permeação cumulativa e desta forma também aumentou a quantidade de MTX disponível. O estudo sugere que a glucosamina utilizada é importante não apenas para o direcionamento para tumores gliais, mas também para obter maior permeabilidade na barreira hematoencefálica. Conclui-se assim que os dendrímeros conjugados a D-glucosamina carregados com MTX tem sido um potencial candidato para o tratamento de gliomas.

GURDAG *et al.* (2006) investigaram a funcionalidade de dendrímeros PAMAM conjugados com metotrexato em células linfoblastóides de leucemia aguda humana (CCRF) e de ovário de hamster chinês (CHO). Dendrímeros PAMAM-MTX conjugados por ligação amida foram sintetizados, sendo que um dendrímero foi terminado em ácido carboxílico e amina do MTX (A – dendrímero aniônico) e outro terminado com amina e grupo carboxílico do MTX (B – dendrímero catiônico). Os resultados mostram que o conjugado (A) possui atividade superior em ambas as linhagens de células quando comparado ao MTX livre. O conjugado (B) não apresentou atividade relevante em nenhuma das duas linhagens pesquisadas. Desta

forma, os pesquisadores constataram que a diferença da toxicidade dos conjugados (A) e (B) ligados por amida podem ser indicativas das diferenças na liberação do MTX intracelular, devido às divergências da funcionalidade da superfície

KUKOWSKA-LATALLO *et al.* (2005) avaliaram a eficácia de dendrímeros poliméricos (PAMAM) conjugados com ácido fólico, como agente de direcionamento e acoplados com marcadores fluorescentes ou metotrexato. Este conjugado foi injetado em camundongos portadores de tumor humano (KB) que super-expressam o receptor de folato, via intravenosa, comparando-se os resultados com o fármaco livre e com o polímero sem ácido fólico. Os resultados da microscopia confocal confirmaram a internalização dos dendrímeros conjugados com MTX para as células tumorais. Conclui-se assim, que estes sistemas conjugados com MTX aumentaram a atividade antitumoral e diminuíram significativamente a toxicidade quando comparado ao fármaco livre.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível destacar que os estudos científicos embasam o desenvolvimento de base nanotecnológica, “Drug Delivery Systems”, de forma a possibilitar a transferência de tecnologia para as indústrias farmacêuticas. Estes possibilitaram grandes avanços, inovação e tecnologia, quando se refere a terapias e tratamentos ainda não disponíveis no mercado.

O metotrexato é considerado um promissor agente terapêutico com uso em um amplo espectro de doenças tais como o câncer, doenças auto-imunes, psoríase entre outras. Entretanto, as propriedades farmacocinéticas do fármaco e sua elevada toxicidade prejudicam os resultados terapêuticos dos sistemas convencionais de entrega do fármaco. A estratégia da nanoencapsulação do MTX, nos diversos estudos apresentados, mostrou-se eficaz, entre os benefícios apresentados estão:

- Aumento da atividade antitumoral;
- Redução do volume tumoral;
- Maior inibição do crescimento e proliferação de células tumorais;
- Capacidade de superar a resistência das células tumorais;
- Efeito citotóxico mais potente em linhagens de células tumorais;
- Aumento da acumulação celular significativa;
- Capacidade de induzir apoptose;

Tais sistemas nanoestruturados descritos neste trabalho refletem uma variedade de ferramentas para contornar e superar as limitações e a toxicidade apresentada pelo fármaco. Revelam-se, os novos *Drug Delivery Systems*, muito atrativos na terapia oncológica, demonstrando a potencialidade da nanotecnologia quando comparado aos sistemas convencionais, possibilitando melhoria da segurança e eficácia do fármaco, melhor biodisponibilidade e estabilidade do agente terapêutico e diminuição dos efeitos adversos.

REFERÊNCIAS

ABOLMAALI, S.S.; TAMADDON, A.M.; DINARVAND, R. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.71 p.1115–1130, 2013.

AFSHARI, M.; DERAKHSHANDEH, K.; HOSSEINZADEH, L. Characterisation, cytotoxicity and apoptosis studies of methotrexate-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles. **Journal of Microencapsulation: Micro and Nano Carriers**, v.31, p.239-245, 2014.

AGARWAL, A.; MAJUMDER, S.; AGRAWAL, H.; MAJUMDAR, S.; AGRAWAL, G.P. Cationized Albumin Conjugated Solid Lipid Nanoparticles as Vectors for Brain Delivery of an Anti-Cancer Drug. **Current Nanoscience**, v.7, p.71-80, 2011.

ALVARENGA, E.C.; CAIRES, A.; LADEIRA, L.O.; GAMERO, E.J.P.; ANDRADE, L.M.; PAZ, M.T.L.; LEITE, M.F. Potenciais alvo terapêuticos contra o câncer. **Ciência e Cultura**, v.66, n.1, p. 43-48, 2014.

ALVES, O. L. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. **Parcerias Estratégicas**, n.18, p.23-40, 2004.

ALVES, G.P.; MARTINS, F.; SANTANA, M.H. A. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. **Fármacos & Medicamentos**, São Paulo, ano 9, p.44-50, 2008.

AVTI, P. K. E KAKKAR, A. Dendrimers as anti-inflammatory agents. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.49, p. 57-65, 2013.

BATTAGLIA, L.; SERPE, L.; MUNTONI, E.; ZARA, G.; TROTTA, M.; GALLARATE, M. Methotrexate-loaded SLNs prepared by coacervation technique: *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* pharmacokinetics and biodistribution. **Future medicine**, v.6, p.1561-1573, 2011.

BROCHADO, P.M.D.S.C. Nanotecnologia e a sua aplicação à terapêutica oncológica. **Dissertação de mestrado**: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

CANCINO, J.; MARANGONI, V.S.; ZUCOLOTTO, V. NANOTECNOLOGIA EM MEDICINA: ASPECTOS FUNDAMENTAIS E PRINCIPAIS PREOCUPAÇÕES. **Química Nova**, v.37; p.521-526, 2014.

CARRETERO, G.; PUIG, L.; DEHESA, L.; CARRASCOSA, J.M.; RIBERA, M.; SÁNCHEZ-REGAÑA, M.; DAUDÉN, E.; ALSINA, M.; MUÑOZ-SANTOS, C.; LÓPEZ-ESTEBARANZ, J.L.; NOTARIO, J.; FERRANDIZ, C.; VANACLOCHA, F.; GARCÍA-BUSTINDUY, M.; TABERNER, R.; BELINCHÓN, I.; SÁNCHEZ-CARAZO, J.; MORENO, J.C. Guidelines on the use of methotrexate in Psoriasis. **Actas Dermato-Sifiliográficas**, v.101, n.7, p.600-613, 2010.

CHAN, E.S.L. E CRONSTEIN, B.N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. **Arthritis Research & Therapy**, v.4, n.4, p.266-273, 2002.

CHEN, J.; HUANG, L.; LAI, H.; LU, C.; FANG, M.; ZHANG, Q.; LUO, X. Methotrexate-Loaded PEGylated Chitosan Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and *in Vitro* and *in Vivo* Antitumoral Activity. **Molecular pharmaceuticals**, v.11, p.2213-2223, 2013.

DHANIKULA, R.S.; ARGAW, A.; BOUCHARD, J.F.; HILDGEN, P. Methotrexate loaded polyether-copolyester dendrimers for the treatment of gliomas: Enhanced efficacy and intratumoral transport capability. **Mol. Pharm.**, v.5; pp.105–116, 2008.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. e POHLMANN, A. R. Impact of nanotechnology on public health: production of medicines. **Química Nova**, v.36, p.1520-1526, 2013.

DODDOLI C.; GHEZ, O.; BARLÉSI, F.; D'JOURNO B.; ROBITAIL, S.; THOMAS, P.; CLERC, T. *In vitro* and *in vivo* methotrexate disposition in alveolar macrophages: comparison of pharmacokinetic parameters of two formulations. **Int J Pharm.**, 297(1-2):180-9., 2005.

DURAN, N.; MATTOSO. L.H.C.; DE MORAIS, P.C. Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: **Artliber**, 2006.

FARAJI, A. H. E WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorgan.Med. Chem.**, v. 17, p.2950-2962, 2009.

FENG, S. Chemotherapeutic Engineering: Concept, Feasibility, Safety and Prospect – A tribute to ShuChien's 80th Birthday. **Biomedical Engineering Society**, v. 4, n^o4, p.708-216, 2011.

FEYNMAN, R. There's plenty of room at the bottom. In: Annual Meeting of the American Physical Society, 20 dez 1959. California Institute of Technology (Caltech). **EngSci**. California: Caltech, 1960.

FREITAS, F.J.; LIMA, A.A.; ARÇARI, D.P. Nanotecnologia empregada no tratamento do câncer. **Gestão em foco – Grupo UNISEPE**, v.4; p.6, 2011.

GARCIA, F.M. Avanços da nanomedicina: A nova fronteira da medicina – artigo de atualização. **Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança**, v.12, p.110-7, 2014.

GURDAG, S., KHANDARE, J., STAPELS, S., MATHERLY, L.H., KANNAN, R.M. Activity of dendrimer-methotrexate conjugates on methotrexate-sensitive and -resistant cell lines. **Bioconjug Chem**, 17(2):275–283, 2006.

INCA, 2011. ABS do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. **BVS/Ministério da Saúde**, Rio de Janeiro, 2011.

JAIN, A.; JAIN, A.; GARG, N.K.; TYAGI, R.K.; SINGH, B.; KARATE, O.P.; WEBSTER, T.J.; SONI, V. Surface engineered polymeric nanocarriers mediate the delivery of transferring-methotrexate conjugates for an improved understanding of brain cancer. **Acta Biomaterialia**, v.24, p.140-151, 2015.

KAKKAR, D.; DUMONGA, S.; KUMAR, R.; CHUTTANI, K.; MISHRA, A.K. PEGylated solid lipid nanoparticles: design, methotrexate loading and biological evaluation in animal models. **Med. Chem. Commun.**, v.6, p.1452-1463, 2015.

KAYSER, O.; LEMKE, A.; TREJO, N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. **Current Pharmaceutic Biotechnology**, v.6, p.3-5, 2005.

KONG, S.Y.; TANG, G.T.; PEI, Y.Y.; JIANG, Y.Y. PEGylated polyamidoamine dendrimer/ methotrexate complex: pharmacokinetics and anti-tumor activity in normal and tumor-bearing rodents. **Yao Xue Xue Bao**, v.44, p.85-90, 2009.

KRISHAN, A. What Links Cod Liver Oil, Spinach, and Flow Cytometry? Flow Cytometric Detection and Quantitation of Folic Acid Receptors In Tumor Cells. **Cytometry Part A**, v.71, p.897-898, 2007.

KUKOWSKA-LATALLO, J.F.; CANDIDO, K.A.; CAO, Z.; NIGAVEKAR, S.S.; MAJOROS, I.J.; THOMAS, T.P.; BALOGH, L.P.; KHAN, M.K.; BAKER JR., J.R. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. **Cancer Research**, v.65, p.5317–5324, 2005.

KUZNETSOVA, N.; KANDYBA, A.; VOSTROV, I.; KADYKOV, V.; GAENKO, G.; VODOVOZOVA, E. Liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan as convenient drug delivery vehicles. **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** v.19(n.1), p.51–59, 2009.

LELES, R. N. Monitorização terapêutica do metotrexato sob altas doses em pacientes portadores de leucemia linfoblástica aguda. **Dissertação de mestrado**, Goiás, UFG, 2008.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.6, n.2, p.1-37, 2009.

MÜLLER, R.H.; MAËDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics**, v.50, n.1, p.161-177, 2000.

NIE, S.; XING, Y.; KIM, G.J.; SIMONS, J.W. Nanotechnology applications in Cancer. **Rev. Biomed. Eng**, v.9, p.257-88. 2007.

OLIVEIRA, C. P. Proposição de algoritmo para determinação da partição de fármacos em formulações da nanocápsulas de núcleo lipídico. **Dissertação de mestrado**, Porto Alegre, UFRGS, 2010.

PEREIRA, N.R.C. Eficácia terapêutica de nanocápsulas de metotrexato em glioblastoma murino: estudos *in vivo* e *in vitro*. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, USP, 2015.

PIGNATELLO, R.; PULEO, A.; PUGLISI, G.; VICARI, L.; MESSINA, A. Effect of liposomal delivery on in vitro antitumor activity of lipophilic conjugates of methotrexate with lipoamino acids. **Drug Deliv.**, v.10(n.2), p.95-100, 2003.

PIMENTEL, L.F.; JÁCOME, A.T.; MOSQUEIRA, V.C.F.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.43, n.4, 2007.

PRETTI, T.S.; SOUZA, M.A.; SANTOS, H.T.; NASCIMENTO, A.C.G.G.; SANTOS, F.J.; FRAGA, A.F.; JAFELICCI, M.J.; MARQUES, R.F.C. DRUG DELIVERY NANOTECHNOLOGY APPLIED TO METHOTREXATE CONTROLLED RELEASE IN HUMAN OSTEOSARCOMA: *IN VITRO* TEST. **Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**, Natal, 2012.

PRIVALOVA, A.M.; UGLANOVA, S.V.; KUZNETSOVA, N.R.; KLYACHKO, N.L.; GOLOVIN, Y.I.; KORENKOV, V.V.; VODOVOZOVA, E.L.; MARKVICHEVA, E.A. Microencapsulated Multicellular Tumor Spheroids as a Tool to Test Novel Anticancer Nanosized Drug Delivery Systems In Vitro. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v7, p.4806-14, 2015.

PUIG, L. Metotrexato: novidades terapéuticas. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, p.583-589, 2014.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciências e Cultura**, São Paulo, v.60, n.2, 2008.

RUBINO, F.M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography B**, v.764, n.1-2, p.217-254, 2001.

RUCKMANI, K.; SIVAKUMAR, M.; GANESHKUMAR, P.A. Methotrexate loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for effective treatment of carcinoma. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.6, p.2991–2995, 2006.

SANDIP, B.T.; UDUPA, N.; RAO, B.S.S.; DEVI, P.U. THERMOSENSITIVE LIPOSOMES AND LOCALISED HYPERTHERMIA – ANEFFECTIVE BIMODALITY APPROACH FOR TUMOUR MANAGEMENT. **Indian Journal of Pharmacology**, v.32, p.214-220, 2000.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SCHRODER, O. E STEIN, J. Low dose methotrexate in inflammatory bowel disease: current status and future direstions. **American Journal of Gastroenterology**, v.98. p.530-537, 2003.

SINGH, U. V. E UDUPA, N. In vitro characterization of methotrexate loaded poly (lactic – co- glycolic) acid microspheres and antitumor efficacy in Sarcoma -180 mice bearing tumor. **Pharmaceutics Acta Helvetiae**, v.,72, p.165–173. 1997.

SKUBISZ, M.M. E TONG, S. The evolution of methotrexate as a treatment for ectopic pregnancy and gestational trophoblastic neoplasia: a review. **ISRN Obstet Gynecol**, 2012.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A e PINHO, S. C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v.34, n.10, p.1762-1769, 2011.

ZANETTI-RAMOS, B.G. E CRECZYNKSY-PASA, T.B. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. **Rev. Bras. Farm.**,v.89(2), p.95-101, 2008.

ZHANG, Y.; THOMAS, T.P.; DESAI, A.; ZONG, H.; LEROUEIL, P.R.; MAJOROS, I.J.; BAKER, J.R.Targeted Dendrimeric Anticancer Prodrug: A Methotrexate-Folic Acid-Poly(amidoamine) Conjugate and a Novel, Rapid, “One pot” Synthetic Approach. **Bioconjug. Chem.**, v.17, p.489-495, 2011.

ZHUANG, T.; XU, B.; HUANG, F.; WU, J.; CHEN, S. Solid lipid nanoparticles of anticancer drugs against MCF-7 cell line and a murine breast cancer model. **Pharmazie**, p.925-929, 2012.

WEBSTER, T. Nanomedicine: what’s in a definition? **International Journal of Nanomedicine**, v.1, n.2, p.115-116, 2006.

ⁱ <http://www.nano.gov/>. Acessado dia 17/11/2015.

ⁱⁱ https://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/policy/commissionrecommendation-on-the-definition-of-nanomater-18102011_en.pdf. Acessado dia 17/11/2015.

ⁱⁱⁱ http://www.iso.org/iso/home/standards_development/list_of_isotechnical_committees_iso_technical. Acessado dia 17/11/2015.