LQES	MONOGRAFIA
	DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E MECANISMOS DE AÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PARA USO EM TERAPIAS QUÍMICAS (QUIMIOTERAPIA) ***Raphael Dias Holtz***

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um termo utilizado para designar um conjunto de mais de 100 doenças associadas ao crescimento desordenado das células que podem se espalhar por tecidos e órgãos do corpo, em um fenômeno denominado metástase. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 10 milhões de casos de câncer surgem a cada ano, causando mais de 6 milhões de óbitos[1], sendo no Brasil a terceira causa de morte. De acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a cada 36 min uma mulher morre no Brasil vítima de câncer de mama[2].

O sucesso na cura do câncer está associado a um diagnóstico precoce da doença, assim como uma terapia eficiente. Nos últimos anos, novas formas de diagnósticos e terapias de combate ao câncer têm sido desenvolvidas, aumentando as chances de diagnósticos em estágios iniciais da doença, potencializando as chances de cura. Nesse sentido, a nanotecnologia tem proporcionado uma verdadeira revolução na medicina, ao ponto de ser utilizado o termo "nanomedicina" para esta nova abordagem que utiliza sistemas ou partículas de tamanhos nanométricos.

Em termos gerais, uma partícula é considerada nanométrica quando apresenta um tamanho inferior a 100 nm (1 nm corresponde a bilionésima parte do metro), no entanto, para aplicações farmacêuticas ou biomédicas, a faixa de tamanho adotada é de 5 – 1000 nm[3,4].

A evolução nos métodos de síntese e no entendimento das propriedades das nanopartículas tem possibilitado o desenvolvimento de sistemas exatos de diagnósticos e de terapia do câncer, como a entrega da droga diretamente na célula cancerosa (*Drug Delivery Systems*), diminuindo os efeitos colaterais e potencializando a ação do princípio ativo. Estima-se que os sistemas entregadores de drogas utilizem uma quantidade 100 vezes menor do agente ativo e sejam 100 vezes mais eficientes[5]. Os sistemas nanométricos utilizados nos *Drug Delivery Systems* oferecem como grande vantagem a redução ou eliminação dos severos efeitos colaterais da quimioterapia, pois atuam diretamente nas células cancerosas e não ficam livres na via sistêmica. A possibilidade

de diagnósticos em estágios iniciais da doença e de drogas precisas (no sentido de atingir um alvo desejado, no caso a célula do câncer) tem contribuído para o desenvolvimento da medicina personalizada com o tratamento de cada paciente de forma individualizada.

Embora o termo *Drug Delivery Systems* esteja sendo extremamente utilizado nos últimos anos, o que de certa forma pode gerar uma impressão equivocada de esta idéia seja muito recente, a proposta de um sistema direcionado que pudesse entregar uma droga em um local específico é datada do início do século XX, precisamente em 1906, quando o bacteriologista judeu-alemão Paul Ehrlich propôs a idéia do "*Zauberkungel"*, termo que foi traduzido para o inglês como *"Magic Bullet"*, ou bala mágica. No modelo proposto por Paul Ehrlich, o fármaco é ligado a um agente transportador e terá sua ação terapêutica apenas no alvo, ou seja, nas células do câncer[6].

Classicamente, os tratamentos envolvendo os sistemas entregadores de drogas podem ser divididos em duas categorias: passivo e ativo. No tratamento passivo o agente terapêutico é incorporado dentro de uma macromolécula ou de nanopartícula (podendo receber também o nome de nanocápsulas), que circulam na corrente sanguínea e são acumuladas dentro do tumor através do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (do inglês *Enhanced Permeability and Retention*, ou EPR). Para que as nanopartículas possam circular o tempo suficiente dentro do organismo elas devem ser biocompatíveis, ou seja, elas não podem ser reconhecidas como um "corpo estranho". Uma das técnicas mais utilizadas para aumentar o tempo de circulação no corpo é a realização de um *coating* com polietilenogligol nas nanopartículas, em uma técnica chamada de PEGlação. Alternativamente, cateteres podem ser utilizados para injetar as nanopartículas contendo o agente terapêutico diretamente no tumor. No tratamento ativo, o agente terapêutico é conjugado com uma nanopartícula que possui um ligante (anticorpo) que reconhece especificamente os antígenos relacionados às células do câncer[7,8].

A liberação da droga no alvo específico ocorre em resposta a certos estímulos, que podem ser biológicos ou externos. Esses estímulos atuam como se fossem verdadeiros "gatilhos" que disparam a "bala", em uma analogia com o termo *"Magic Bullet"* desenvolvido por Paul Ehrlich. Exemplos de estímulos são as variações de pH e de temperatura. O pH extracelular e intracelular em sistemas biológicos são extremamente afetados por doenças. O pH extracelular em um tumor sólido tende a ser mais ácido (6,5) do que o pH do sangue (7,4) a 37°C. Em vista disso, sistemas entregadores de drogas que sejam sensíveis à variações de pH podem ser utilizados para transporte e liberação da droga no local específico. A temperatura é outro agente que pode ser utilizado para a liberação da droga em local específico, uma vez que podem ser desenvolvidas nanopartículas que liberem o agente terapêutico apenas em temperaturas superiores a 37 ^{o}C. A droga encapsulada estará circulando na via sistêmica, no entanto, a aplicação do estímulo hipertérmico irá ocorrer apenas na área do tumor, causando a liberação apenas nesta região. Outros possíveis estímulos externos são o campo magnético e o ultrassom. Esses estímulos

podem ser utilizados, respectivamente, em nanopartículas magnéticas transportadoras de drogas que podem ser direcionadas para locais específicos com o auxílio de um campo magnético, e em micelas encapsuladoras de drogas que, após injetadas em um tumor, podem ser submetidas à sonicação, permitindo a liberação do agente terapêutico[9].

A incorporação das drogas às nanopartículas pode ocorrer por diversos métodos, que em muitos casos utilizam mecanismos de auto-organização. As drogas podem, por exemplo, ser dispersas em uma matriz polimérica, encapsuladas no núcleo ou adsorvidas na superfície das nanopartículas[10].

Vários tipos de nanopartículas têm sido utilizados no diagnóstico e na terapia do câncer, como por exemplo, as nanopartículas inorgânicas (nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas), nanopartículas poliméricas (micelas, quitosana), nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanotubos de carbono, pontos quânticos, assim como os conjugados envolvendo essas nanopartículas. A Figura 1 apresenta algumas nanopartículas que podem utilizadas em terapias químicas.

(a) (b) (c) (d) (e) (f) (g)

Figura 1. Alguns tipos de nanopartículas utilizadas em terapias químicas: (a) nanopartículas inorgânicas; (b) nanopartículas poliméricas; (c) nanopartículas lipídicas sólidas; (d) lipossomas; (e) nanocristais ou pontos quânticos; (f) nanotubos de carbono e (g) dendrímeros [3].

As nanopartículas poliméricas apresentam um grande potencial como agente transportador de droga, pois a sua superfície pode ser modificada quimicamente, possibilitando a incorporação de agentes terapêuticos, de agentes de imageamento por ressonância magnética, de ligantes (anticorpos) que reconheçam de forma específica as células do câncer[3,11], e de sinalizadores de morte celular, possibilitado a construção de verdadeiros dispositivos multifuncionais. Outra característica muito interessante de nanopartículas poliméricas, em especial os dendrímeros, é a sua elevada razão de aspecto, ou seja, apresenta uma elevada área superficial por volume.

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), também chamadas de lipoesferas ou nanoesferas lipídicas sólidas, apresentam um tamanho entre 50 e 1000 nm, e são preparadas usando uma grande variedade de ácidos lipídicos, mono-, di- ou triglicerídeos, misturas de glicerídeos ou ceras, que são estabilizados por surfactantes biocompatíveis aniônicos ou catiônicos[12]. Essas

nanopartículas apresentam elevada estabilidade no meio biológico, uma vez que possuem um núcleo rígido que é sólido nas temperaturas ambiente e corporal, o qual é rodeado por uma camada de fosfolipídeos. As NLS podem ser utilizadas para encapsular e transportar drogas lipofílicas, como por exemplo a doxorubicina e o paclitaxel. A liberação da droga (ou *drug release*) pode ocorrer seletivamente através de hipertermia [3], que provoca o rompimento da camada de fosfolipídeos e a liberação do agente terapêutico. As nanopartículas lipídicas sólidas utilizam o sistema de entrega passivo, ou seja, utiliza o efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) para se acumularem no tumor.

Os lipossomas são vesículas concêntricas bilamelares que possuem uma membrana fosfolipídica na parte externa. Essas nanopartículas podem ser utilizadas para transportar drogas hidrofílicas no seu núcleo hidrofílico ou de drogas hidrofóbicas em sua camada fosfolipídica[3]. A natureza anfifílica, a facilidade de modificação superficial, como por exemplo o revestimento com polietilenoglicol, e a boa biocompatibilidade possibilitam a utilização dessas nanopartículas como carregadores de drogas em terapias químicas, tanto que a primeira droga baseada em nanopartículas aprovada pelo FDA trata-se de uma formação lipossomal contendo o agente terapêutico doxorrubicina (Doxil), utilizado no tratamento de AIDS e sarcoma de Kaposi[13].

Uma outra nanopartícula com elevado potencial em nanomedicina são os pontos quânticos (PQs). Estes são nanocristais de materiais semicondutores que fluorescem quando excitados por uma fonte de luz como um laser[14]. Há um considerável interesse no uso dos PQs como fluoróforos inorgânicos, devido ao fato deles apresentarem vantagens significativas em relação aos marcadores fluorescentes usados convencionalmente [5,15]. Os pontos quânticos apresentam um amplo espectro de excitação – do ultravioleta ao vermelho – que pode ser variado de acordo com o tamanho e a composição do material. Finalmente, eles são altamente resistentes à degradação, e sua fluorescência é altamente estável [5,16]. Os pontos quânticos têm sido utilizados como possíveis alternativas para tingimento de vírus e células cancerosas, porém como a sua superfície possui natureza hidrofóbica, torna-se necessário sua modificação com a incorporação de moléculas com afinidade por água, como proteínas e DNA[17]. PQs conjugados que apresentam bioluminescência em ausência de uma fonte de excitação externa têm sido preparados pelo acoplamento de PQs-carboxilato a uma mutação da proteína *Renilla reniformis luciferase*. O conjugado emite uma luz bioluminescente com amplo comprimento de onda (do vermelho ao infravermelho próximo) em células e animais, mesmo em tecidos profundos, tornando-os adequados para o imagiamento *in vivo*[5].

Os nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNT) estão sendo utilizados para monitorar certas proteínas associadas ao câncer, pois são extremamente sensíveis, e qualquer ligação que se forme em sua superfície é observada por uma mudança nas propriedades elétricas. Os nanotubos com anticorpos ligados à sua superfície são utilizados para detectar células cancerosas na corrente sangüínea. Nesse sistema, quando uma molécula relacionada à célula

cancerosa se liga ao nanotubo, é observada uma variação na corrente elétrica. Este método pode ser utilizado para detecção de células tumorais na corrente sanguínea ou micrometastases remanescentes de um tratamento no tumor original[5]. Os SWCNT funcionalizados com ligantes específicos também podem ser utilizados nas terapias do câncer. Sabe-se que os sistemas biológicos são transparentes à radiação eletromagnética na faixa de 700 a 1100 nm (NIR), enquanto os nanotubos de carbono de paredes simples apresentam uma elevada absorção. Uma radiação contínua na região do infravermelho próximo *ex-vivo* pode causar a morte das células do câncer pelo acúmulo de calor local dos SWCNT[18].

O enorme potencial em diagnósticos e terapias químicas apresentado pelas nanopartículas tem refletido no crescimento exponencial do número de publicações envolvendo nanopartículas e sistemas entregadores de drogas (Figura 2).

Dentro deste contexto, fica clara a importância que as nanopartículas desempenham no desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico e terapias do câncer, que potencializem os efeitos dos agentes terapêuticos e minimizem os efeitos colaterais. Nos tópicos seguintes serão abordados com maior profundidade o desenvolvimento, a caracterização e os mecanismos de ação de algumas nanopartículas utilizadas em terapias químicas.

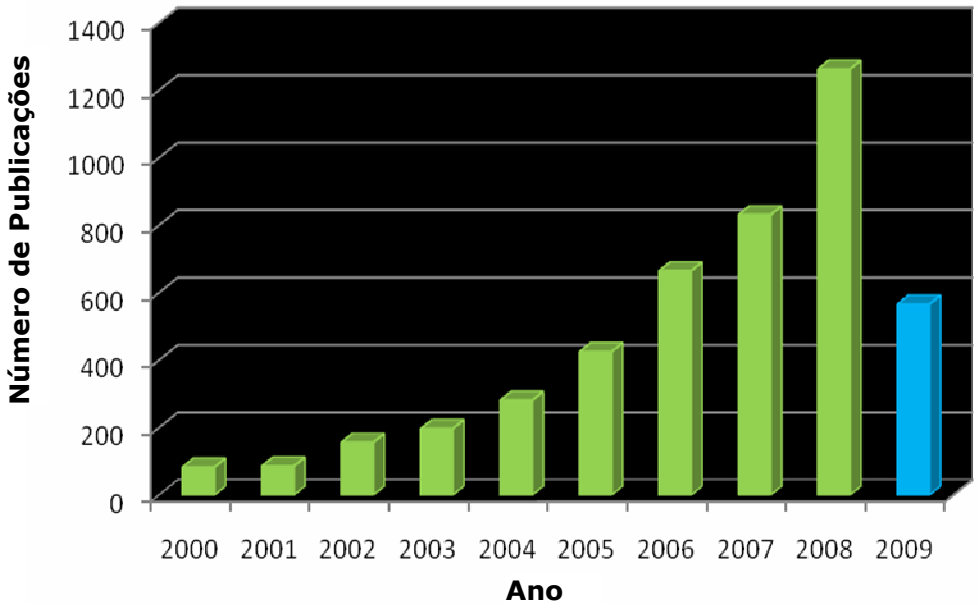

Figura 2. Evolução temporal do número de artigos científicos publicados envolvendo entrega de drogas com nanopartículas (Fonte: ISI Web of Knowledge – The Thomson Corporation. Pesquisa pelos termos: "nanoparticles" e "drug delivery". Data da pesquisa: maio de 2009).

2. Nanopartículas no combate ao câncer

São várias as nanopartículas que desempenham um enorme potencial de utilização em diagnósticos e terapias contra o câncer, no entanto, no texto a seguir serão abordadas apenas algumas destas nanopartículas. Dentre as nanopartículas selecionadas, será dado um maior enfoque às nanopartículas de ouro e às nanopartículas magnéticas com o objetivo de realizar uma abordagem mais aprofundada, tendo em vista que estas são as nanopartículas mais estudadas em terapias químicas nos últimos anos.

2.1. Nanopartículas de ouro

O ouro é um elemento emblemático, símbolo de riqueza e poder. Seu uso como agente terapêutico é extremamente antigo, sendo utilizado pelos chineses desde 2.500 A.C..O ouro já foi utilizado no passado para o tratamento de doenças como epilepsia e sífilis. Soluções vermelhas de ouro coloidal são utilizadas até hoje na Índia como rejuvenescedores e revitalizantes[19].

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, a utilização do ouro na medicina, principalmente em estudos envolvendo diagnósticos e terapias do câncer, tem crescido rapidamente nos últimos anos. O ouro apresenta como grandes vantagens a sua biocompatibilidade, uma síntese relativamente simples, o controle do tamanho das nanopartículas, a facilidade de modificação química de sua superfície, e a facilidade de caracterização devido à presença de uma banda de superfície *plasmon* ressonante[20]. As propriedades químicas e físicas das nanopartículas dependem de fatores como o tamanho, a composição, a forma, a razão de aspecto e a natureza da sua superfície[19,21].

Em vista dessas variáveis, o desenvolvimento de métodos de síntese e de modificação da superfície são etapas determinantes para o sucesso no desenvolvimento das nanopartículas de ouro que possam se utilizadas em terapias químicas.

2.1.1. Síntese, caracterização e mecanismos de ação das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (NPAu), com tamanhos e formas variadas, podem ser sintetizadas em solução aquosa ou em solventes orgânicos. Em uma síntese típica, um sal de ouro, como por exemplo, o $AuCl_3$, é reduzido pela adição de um agente redutor que conduz a nucleação dos íons Au^+ às nanopartículas. Um agente passivante (também chamado de surfactante), tipicamente carregado, deve ser adicionado para se ligar à superfície das nanopartículas e garantir a estabilidade da solução coloidal através da repulsão entre as nanopartículas[22].

Em uma rota comum de síntese em meio aquoso, o ácido cítrico pode ser utilizado como agente redutor do sal de ouro, acionando o processo de nucleação e se ligando à superfície das nanopartículas promovendo a estabilização do sistema coloidal através da repulsão das cargas negativas. Neste caso, o agente redutor também desempenha o papel de passivante. No caso da síntese em meio orgânico, esses papéis são desempenhados por substâncias diferentes. Geralmente o passivante utilizado é um alcanotiol que se liga à superfície das nanopartículas e estabiliza o sistema coloidal[22].

Utilizando a síntese em meio aquoso, Karatas e col.[23] obtiveram nanopartículas de ouro com tamanho médio de 13 nm. Neste procedimento os autores adicionaram uma solução de citrato à uma solução de ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$) sob ebulição, e mantiveram o aquecimento por 15 min. Trata-se de um procedimento extremamente simples e rápido, com elevado rendimento morfológico. As nanopartículas obtidas por Karatas e col. podem ser visualizadas na Figura 3a

Sau e col.[24] prepararam nanobastões de ouro com elevada razão de aspecto através do método de crescimento através de "sementes" em meio aquoso. No procedimento de obtenção das "sementes de Au", soluções de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), em diferentes concentrações, foram adicionadas a uma solução aquosa de ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4.3H_2O$) sob leve agitação. Posteriormente foi adicionada uma solução resfriada de borohidreto de sódio ($NaBH_4$), e o sistema foi agitado por alguns minutos. Para o crescimento de nanobastões de ouro, soluções de CTAB, $HAuCl_4.3H_2O$, nitrato de prata ($AgNO_3$) e ácido ascórbico (AA) foram colocadas em um tubo, seguido da adição das soluções contendo as "sementes de Au". A mistura resultante foi agitada por alguns segundos e então mantida em repouso por algumas horas. Foi observado que o comprimento e a largura dos nanobastões mudam com o tempo e a concentração do agente redutor e do surfactante, assim como a razão [semente]/Au^{3+}. A adição de $AgNO_3$ foi fundamental para a formação dos nanobastões, pois quando este não foi utilizado houve uma mistura de morfologias, com a formação de nanoesferas (Figura 3b e c). Os autores propuseram que o $AgNO_3$, em presença do CTAB, leva à formação do AgBr que se adsorve diferencialmente nas faces das partículas de Au, conduzindo o crescimento em uma direção, ou seja, levando à formação de partículas na forma de nanobastões. Os autores ainda sugerem que o CTAB forma uma lamela ao redor das nanopartículas de ouro que conduz a formação da morfologia de nanobastões. As variações nos parâmetros de síntese e os resultados morfológicos podem ser observados na Tabela 1.

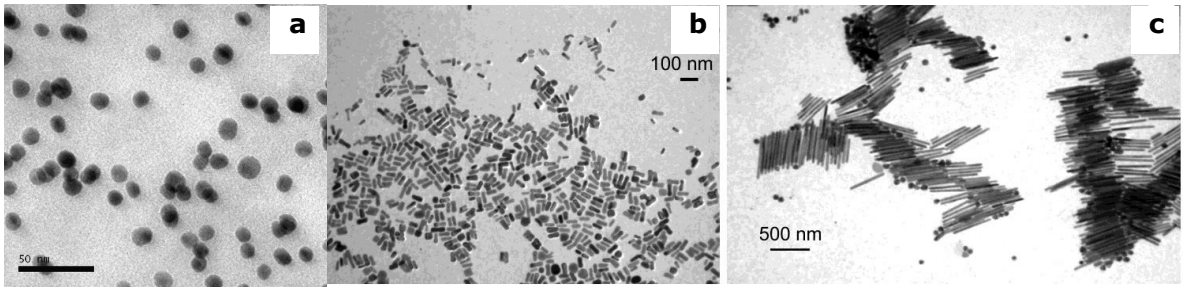

Figura 3. Micrografias eletrônicas de transmissão de NPAu. A micrografia a) apresenta nanoesferas com 13 nm de diâmetro[23]. A barra de escala equivale a 50 nm.As micrografias b) e c) se referem à nanobastões de ouro sintetizados nas mesmas condições, porém em c) não foi utilizado $AgNO_3$[(24)].

Tabela 1. Variação na morfologia em função dos parâmetros experimentais[(24)].

Variações nos parâmetros experimentais	Resultado morfológico nos nanobastões
Aumento na [semente de Au]	Diminuição no comprimento
Diminuição na [Au^{3+}]	Extremidades mais arredondadas
Aumento na [AA]	Diminuição no comprimento
Diminuição na [CTAB]	Diminuição no comprimento e ligeiro aumento na largura
Ausência de $AgNO_3$	Aumento no comprimento e perda de rendimento

[ ] significa a concentração da solução

Essas variações no tamanho e na morfologia provocadas pelas variáveis de síntese são muito importantes, pois variam a razão de aspecto e, por conseguinte, causam um deslocamento da banda *plasmon* para maiores ou menores comprimentos de onda. A posição da banda *plasmon* é verificada através de espectroscopia VIS-NIR. A Figura 4 trás um exemplo desta caracterização, em que a posição da banda *plasmon* é influenciada pela morfologia e razão de aspecto das nanoestruturas[(21)].

A posição da banda *plasmon* indica em qual comprimento de onda a nanopartícula de ouro irá absorver energia, ou seja, qual o comprimento de onda do laser deve ser incidido no tumor para que a nanopartícula absorva energia e aqueça, destruindo as células do câncer no tratamento hipertérmico.

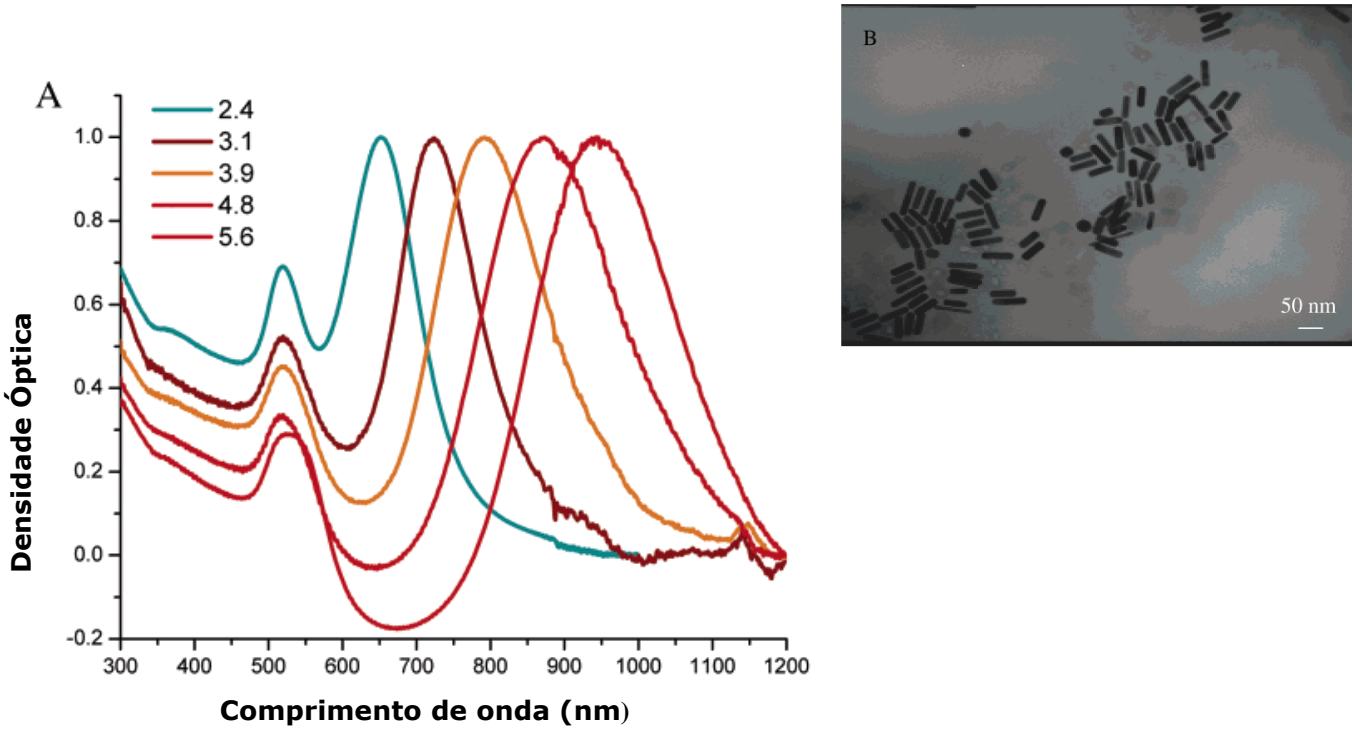

Figura 4. A) Espectro de absorção *plasmon* de nanobastões de ouro com diferentes razões de aspecto; B) Imagem de TEM de nanobastões com razão de aspecto de 3,9, correspondendo à curva laranja na imagem A[21].

Em recente tese de doutorado[25] defendida no Laboratório de Química do Estado Sólido da Universidade Estadual de Campinas, foram obtidas nanopartículas de ouro em formato esférico com diâmetros variados. As nanopartículas foram obtidas através do método das duas fases. Nesse procedimento uma solução de brometo de tetraoctilamônio em tolueno, responsável pela transferência do íons $[AuCl_4]^-$ para a fase orgânica, foi adicionada à uma solução de ácido tetracloroáurico, e mantida sob agitação até completa mudança da coloração da solução aquosa de amarelo para incolor. Posteriormente foram adicionadas quantidades variadas de diferentes tiós (4,4-tiobisbenzenotiol, benzenotiol, p-aminotiofenol e tiocolesterol), e foi utilizado $NaBH_4$ como agente redutor. Essa reação foi mantida sob forte agitação por algumas horas, sendo a fase orgânica posteriormente isolada, concentrada por evaporação em linha de vácuo, adicionada em etanol e resfriada em freezer (~ 18°C negativos) por várias horas. O produto foi então isolado por centrifugação e redisperso em tolueno. O procedimento de adição de etanol, resfriamento e isolamento por centrifugação foi repetido para a eliminação do excesso de reagentes. As NPAu obtidas apresentaram entre 1,5 e 4 nm de diâmetro, variando em função da razão Au/Tiol utilizada.

A Tabela 2 traz um resumo dos alguns métodos de obtenção de nanopartículas de ouro e seus respectivos diâmetros.

Tabela 2. Métodos de síntese de nanopartículas de ouro e diâmetros obtidos[26].

Diâmetro (nm)	Método de síntese	Agente passivante
1 – 2	Redução do $AuCl(PPh_3)$ com diborano ou borohidreto de sódio	Fosfina
1,5 – 5	Redução bifásica do $HAuCl_4$ por borohidreto de sódio em presença de tiol	Alcanotiol
10 – 150 nm	Redução do $HAuCl_4$ com citrato de sódio em água	Citrato

Outra maneira de se obter nanopartículas de ouro é através do uso de biomoléculas como agentes redutores. Nanopartículas de ouro com diâmetros entre 20 e 150 nm com morfologias esférica e triangular foram sintetizadas por redução de uma solução de $HAuCl_4.3H_2O$ em diferentes quantidades de extrato de cogumelo comestível (*Volvariella volvacea*) em presença de $AgNO_3$. Quando um excesso de extrato foi utilizado como agente redutor, as biomoléculas atuaram como agentes limitadores de crescimento, contribuindo fortemente para a formação de nanoesferas ao invés dos nanotriângulos de ouro[27].

Quando se desenvolve uma nanopartícula de ouro com o objetivo de aplicação em terapias químicas, seja como agente de contraste ou como agente terapêutico, as duas principais técnicas de caracterização utilizadas são a microscopia eletrônica de transmissão e a espectroscopia VIS-NIR, para ver a forma e o tamanho das nanopartículas e saber em qual comprimento de onda a partícula apresenta absorção de energia (banda do *plasmon*).

O fenômeno de ressonância *plasmon* de superfície pode ser explicado pela oscilação dos elétrons livres em uma superfície metálica. Quando uma nanopartícula é muito menor do que o comprimento de onda da luz, um campo eletromagnético em certa freqüência induz uma ressonância, coerente com a oscilação dos elétrons (Figura 5). Essa ressonância ocorre na região do visível para os metais nobres. A oscilação *plasmon* de superfície causa uma aumento na absorção da radiação[20]. Quando a radiação eletromagnética é incidida na freqüência do *plasmon* ressonante de forma continuada, as nanopartículas absorvem energia e a acumulam calor, sendo este um dos mecanismos de terapia hipertérmica utilizados no combate ao câncer.

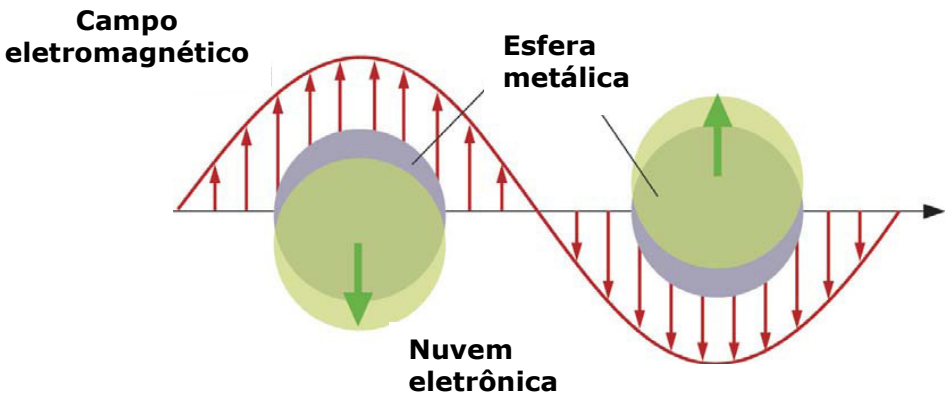

Figura 5. Esquema da interação de uma nanoesfera metálica com a luz. O campo eletromagnético da luz induz uma oscilação dipolar da condução eletrônica através da partícula[20].

Para as nanopartículas de ouro atuarem de forma ativa em terapias químicas, elas devem ser funcionalizadas, ou seja, em suas superfícies devem existir ligantes (anticorpos, DNA, folato) que reconheçam de forma específica as células do câncer. As NPAu são particularmente interessantes pois i) apresentam uma baixa toxicidade intrínseca, ii) suas propriedades de absorção de energia e conversão em calor podem ser otimizadas em função da forma e tamanho, iii) o tamanho reduzido (< 100 nm) propicia a adsorção por células cancerosos (efeito EPR) e iv) sua propriedade de *plasmon* intensificado as transformam em agentes de contraste para imageamento biológico[28].

As nanopartículas de ouro podem ser funcionalizadas com mais de um tipo de moléculas em sua superfície. A Figura 6 mostra um exemplo de NPAu funcionalizadas com tetraetilenoglicol e com um ligante fluorogênico (TTMA), assim como a emissão do sinal de fluorescência após a liberação da droga. A natureza catiônica do TTMA facilita a passagem pela barreira da membrana celular e o agente fluorogênico simula o mecanismo de entrega da droga (*drug release*) [26].

A outra possibilidade de terapia do câncer utilizando nanopartículas de ouro, já comentada, é a hipertermia. Quando uma NPAu funcionalizada com um ligante específico (um anticorpo por exemplo), se liga às células do câncer, uma radiação eletromagnética com comprimento de onda na região da banda *plasmon* da nanopartícula pode ser incidida localmente sobre a região do tumor, fazendo com que a nanopartícula absorva energia e cause a destruição das células doentes. Um aumento local de 5 ^{o}C pode induzir a desnaturação das proteínas ou uma perturbação das organelas do citoesqueleto. Aumentos moderados na temperatura também podem facilitar a entrada de agentes citotóxicos nas células pelo aumento da permeabilidade da membrana e redução da pressão hidrostática, além de poder gerar uma disfunção no metabolismo celular que leve à apoptose [28].

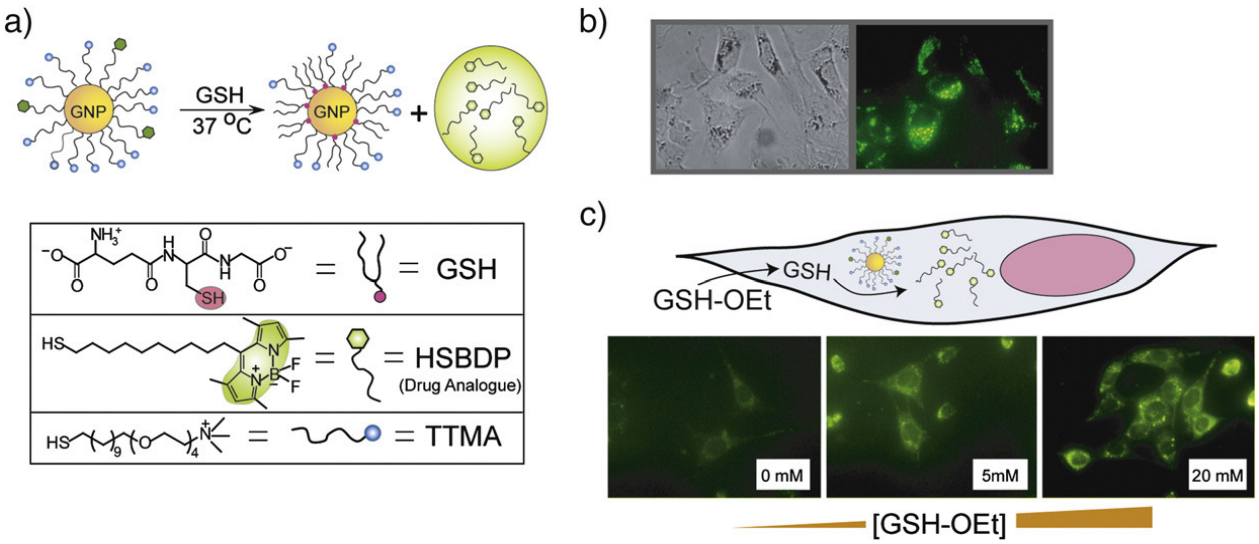

Figura 6.a) Esquema de liberação da droga via reação de troca com a glutationa, um tiol presente na maioria das células, em maior concentração intracelular do que extracelular; b) um sinal de fluorescência é emitido após as NPAu se ligarem às glutationas presentes em células do fígado (teste em cubeta); c) a emissão do sinal foi verificada em fibroblastos de células embrionárias de ratos em níveis 50% menores de GSH presentes em níveis intracelulares [26].

As nanopartículas de ouro com diferentes tamanhos e formas já são comercializadas. A empresa americana Nanopartz comercializa nanoesferas e nanobastões de ouro (*Gold Nanobeads™, Nanopartz™*) como agentes de contraste em diagnósticos e para tratamentos utilizando terapia hipertérmica[29].

2.2. Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas (NPM) são constituídas de um núcleo de um metal ou de um óxido metálico altamente magnético (superparamagnético), encapsulados por um revestimento polimérico ou inorgânico que torna a nanopartícula biocompatível, estável e que pode funcionar como suporte de biomoléculas[30].

Nanopartículas paramagnéticas de óxido de ferro tem sido utilizadas experimentalmente em um número considerável de aplicações como agentes de contraste por imageamento por ressonância magnética (IRM), hipertermia e entrega de drogas (*Drug Delivery Systems*). Para estas aplicações estas nanopartículas devem apresentar elevadores valores de magnetização, ser menores que 100 nm com distribuição estreita de tamanho, para que apresentem propriedades químicas e físicas uniformes. Essas nanopartículas podem receber um revestimento superficial com outras partículas magnéticas, com polímeros que aumentem o tempo de circulação no corpo e com ligantes que reconheçam de forma específica as células do câncer. As NPM podem ser ligadas à anticorpos, proteínas, enzimas, drogas, ou nucleotídeos, e podem ser direcionadas a um

órgão, tecido ou tumor utilizando um campo magnético externo (agindo como vetores magnéticos) e podem ser utilizadas em tratamentos hipertérmicos [5].

Os métodos tradicionais de terapia de câncer por hipertermia consistem da exposição do paciente em um ambiente aquecido, em que todo o corpo é submetido a um aquecimento por volta de 43 – 45 ^{o}C [31]. Na terapia utilizando NPM, a exposição à um campo magnético externo gera calor devido à oscilação no momento magnético da nanopartícula. Essa dissipação de calor pode ser devida a rotação da partícula magnética inteira ao redor da vizinhança líquida (relaxação Browniana) e/ou a rotação do momento magnético no núcleo magnético (relaxação de Neel) [32], provocando um aumento de temperatura local (atingindo 42 ^{o}C), provocando danos ou a destruição das células do câncer [31].

Os parâmetros chave do comportamento de uma nanopartícula magnética estão relacionados à superfície química, tamanho (núcleo magnético, volume hidrodinâmico, e distribuição de tamanho), e propriedades magnéticas (momento magnético, remanescência e coercividade). A superfície química é particularmente importante para evitar a ação do sistema imunológico, e aumentar o tempo de circulação na corrente sanguínea. O revestimento das NPM com um composto hidrofílico (polietilenoglicol (PEG), polissacarídeos e outros) aumenta o tempo de circulação em poucos minutos até dias. Outra possibilidade é a redução do tamanho das nanopartículas, no entanto existe a questão da migração desconhecida, em que não existem barreiras biológicas para as nanopartículas com um tamanho muito reduzido, e isto pode gerar sérios problemas toxicológicos [30].

Para as aplicações médicas das nanopartículas magnéticas algumas características são requeridas, como o comportamento superparamagnético e um suficiente tempo de circulação na corrente sanguínea. O superparamagnetismo ocorre em materiais compostos de cristalitos muito pequenos, e varia de material para material, sendo que no caso das nanopartículas baseadas em ferro o superparamagnetismo ocorre em partículas inferiores a 25 nm. Um revestimento de sílica também pode ser utilizado para aumentar o tempo de circulação no corpo das NPM. A sílica (SiO_2) possui o ponto isoelétrico em pH 2-3, que faz com que no pH do sangue (7,4) as nanopartículas revestidas de SiO_2 apresentem carga negativa, causando uma repulsão eletrostática e evitando a formação de aglomerados. Outra vantagem do revestimento com sílica é que esta possui grupos hidroxílicos superficiais em significante concentração (caráter hidrofílico intrínseco) e possibilita o ancoramento superficial de biomoléculas específicas. Somado a isso, sua porosidade interna pode ser usada para transporte de drogas específicas ao passo que evita a entrada de grandes moléculas [30]. A Figura 7 mostra imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) de nanopartículas magnéticas por SiO_2 e outros materiais.

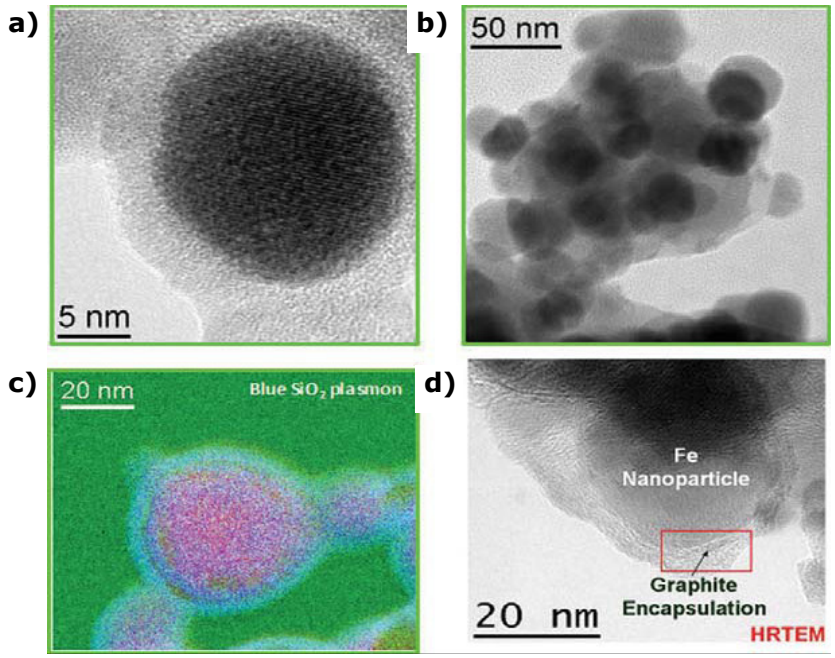

Figura 7. Imagens de HRTEM de a) NPM encapsuladas em sílica; b) NPM encapsuladas em zeólita; c) NP de ferro encapsuladas em SiO_2 (imagem com filtro de energia e mapa de cor) e d) NP de magnetita revestidas de grafite [30].

Tendo visto que as propriedades das nanopartículas são dependentes de uma série de fatores, os processos de síntese e funcionalização se tornam decisivos no sucesso do desenvolvimento de uma nanopartícula magnética para utilização em terapias químicas.

2.1.1. Síntese, caracterização e mecanismos de ação das nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas podem ser sintetizadas por várias rotas, seja por reações de precipitação [33], reações envolvendo redução [34] ou reações de síntese em elevadas temperatura e pressão [35].

Jain e col.[36] sintetizaram nanoparticulas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ácido oléico e com agentes quimioterápicos incorporados (doxorubicina e paclitaxel). As nanopartículas foram sintetizadas pela co-precipitação do Fe (III) e Fe (II) com hidróxido de amônio. Neste procedimento, soluções de cloreto de ferro (III) hexahidratado e cloreto de ferro (II) tetrahidratado foram misturadas e então uma solução de hidróxido de amônio foi adicionada gota a gota. Essa mistura foi então agitada por alguns minutos em atmosfera de nitrogênio, e então foi adicionado o ácido oléico. Após 30 min sob agitação em aquecimento a 80 ^{o}C, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente e as nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ácido oléico (NPMAO) foram separadas por atração magnética, lavadas com água destilada e colocadas

em uma solução aquosa de Plurônic® F-127 (agente estabilizante). Essa mistura foi então agitada por toda a noite, e posteriormente a suspensão foi centrifugada para remover grandes agregados. Soluções etanólicas de doxorubicina e paclitaxel foram adicionadas (separadamente e em conjuntamente) à dispersão das NPMAO e o sistema foi agitado por várias horas, sendo posteriormente feita a separadas da nanopartículas por atração magnética. As nanopartículas magnéticas obtidas apresentaram a forma de esferas com diâmetros entre 10 – 25 nm (Figura 8a) enquanto o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas magnéticas em água, medido por espalhamento de luz dinâmico, apresentou uma faixa de 210 – 250 nm (Figura 8b).

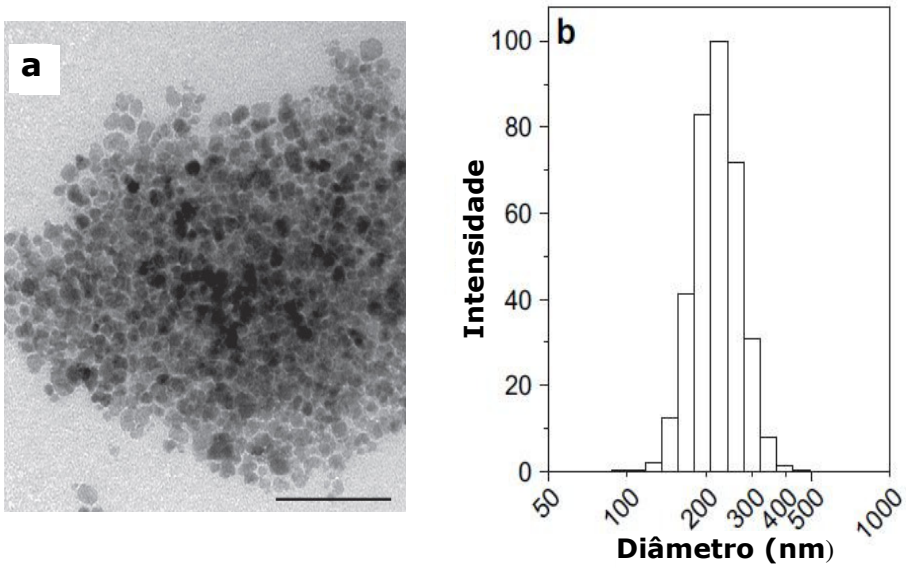

Figura 8. Caracterização das nanopartículas magnéticas: a) TEM (a barra de escala corresponde a 100 nm) e b) distribuição do tamanho hidrodinâmico das partículas medido por espalhamento de luz dinâmico [36].

Através de medidas do Potencial Zeta, foi verificado que a incorporação do paxlitaxel não provocou alteração na carga superficial das nanopartículas, ao passo que a doxorubicina provocou uma redução no potencial zeta das NPM. A incorporação do agente quimioterápico apresentou uma eficiência de 82 a 95% A propriedade anticâncer das nanopartículas foi avaliada *in vitro* em células de câncer de mama (MCF-7) exibindo uma diminuição do crescimento celular de até 90%, indicando que as NPMAO com agentes quimioterápicos insolúveis utilizados apresentam-se como potenciais agentes quimioterápicos para tratamentos de câncer de mama.

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro também foram sintetizadas por reação de redução do $FeCl_2$ em uma solução aquosa de borohidreto de sódio ($NaBH_4$) em presença de polietilenoglicóis (PEGs) com diferentes massas moleculares e com terminações em metoxila e carboxila [34]. Neste procedimento, uma solução de $NaBH_4$ foi adicionada lentamente às soluções

de $FeCl_2$ contendo os diferentes PEGs sob agitação. O material formado foi separado magneticamente e lavado com água deionizada e caracterizado. A Figura 9 mostra as imagens de TEM das nanopartículas obtidas em diferentes condições.

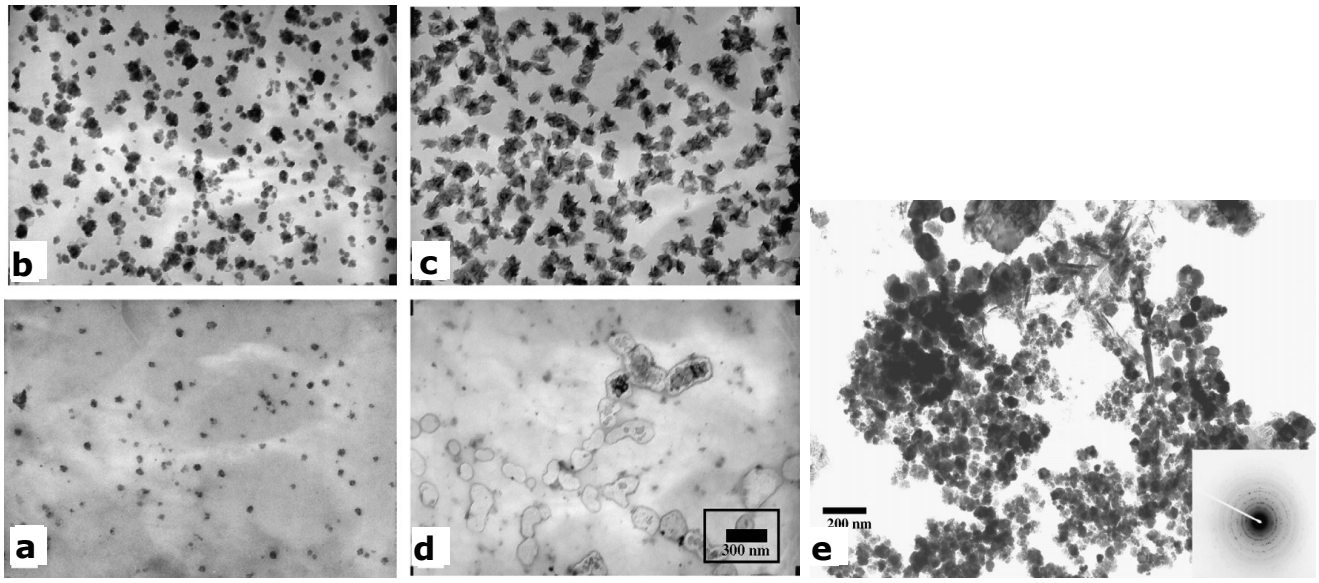

Figura 9. Micrografia eletrônica de transmissão em campo claro das nanopartículas de sintetizadas em diferentes concentrações de PEG linear: a) 1,0 mg/mL; b) 2,5 mg/mL; c) 5,0 mg/mL; d) 2,5 mg/mL (B com o dobro do volume) e e) nanopartícula formadas pela redução com $NaBH_4$ em ausência de PEG [34].

A Figura 9e mostra uma aglomerado de partículas com tamanhos variando entre 70 e 150 nm. A análise por difração de elétrons de uma área selecionada mostra que o material é uma combinação complexa de Fe_2O_3, Fe_2B, Fe_3B. Esta composição também foi obtida por espectroscopia Mössbauer. Essa amostra foi utilizada como referencial para as demais comparações. Através da análise das imagens da Figura 9, pode-se observar que o aumento na concentração do PEG provocou um aumento na aglomeração e no revestimento. Para a concentração de 1,0 mg/mL de PEG, as nanopartículas obtidas apresentaram 70 nm de diâmetro sem a formação de aglomerados. Isto indica que o volume hidrodinâmico do PEG em solução inibe o crescimento depois da nucleação inicial e estabiliza estericamente as nanopartículas contra aglomeração. O aumento da concentração provocou a formação de aglomerados que cresciam em função da concentração do PEG. Quando o volume da solução contendo o PEG com 2,5 mg/mL foi dobrado (Figura 9d), os aglomerados foram completamente encapsulados e o tamanho final excedeu os 300 nm. Um pico central observado no espectro Mössbauer das nanopartículas confirma a presença Fe_2O_3 paramagnético (Figura 10a). A linha verde no espectro corresponde ao espectro teórico e os círculos aos valores experimentais. Na Figura 10a2 os círculos representam

os valores das medidas realizadas em 80 K e a linha sólida aos espectros em 200 K. Em ambos os espectros aparece o pico paramagnético que é devido ao Fe_2O_3 com o aparecimento de um pico próximo da intensidade zero resultante de uma pequena quantidade de αFe. Dado que o PEG linear é hidrofílico e não tem grupos funcionais que poderiam se ligar covalentemente às nanopartículas, era de se esperar que ele não poderia proteger as nanopartículas de Fe da oxidação. O revestimento com PEG contendo o grupo metoxila terminal não provocou alterações significativas em relação às nanopartículas revestidas com PEG linear, sendo formado aglomerados da ordem de 100 nm (Figura 10c2). O revestimento com PEG com grupo carboxila terminal não alterou a forma das nanopartículas sem revestimento (Figura 10c1), indicando que neste caso o revestimento preveniu a aglomeração e manteve o tamanho das nanopartículas. Isso indica que existe uma massa crítica que pode ser necessária para a formação das emulsões para uma concentração particular do polímero. O espectro Mössbauer das nanopartículas revestidas com PEG-metoxila é semelhante ao obtido para o caso do PEG-linear (Figura 10a). No caso das nanopartículas revestidas com PEG-carboxila, existe uma significativa diferença (Figura 10b). Na temperatura ambiente o espectro desta amostra é similar ao obtido pelas outras amostras, no entanto a 80 K observa-se a presença de sextetos distintos que são característicos da αFe. Isto significa que o PEG-carboxila está protegendo com maior eficiência as nanopartículas de Fe, estabilizando uma maior quantidade de Fe na amostra.

Através de investigações adicionais, os autores verificaram que o aumento na concentração do PEG-carbolixa resultou no aumento da porcentagem de αFe nas nanopartículas. Os resultados obtidos para os níveis de magnetização mostraram que as nanopartículas revestidas com PEG-carboxila apresentaram valores de magnetização duas vezes maiores que o Fe_2O_3 "*bulk*" e 10 vezes maiores do que as suspensões de nanopartículas baseadas em óxidos mostrando o seu potencial uso em aplicações biomédicas.

Utilizando também uma rota de síntese por redução, Kim e col.[31] obtiveram nanopartículas de ferrita de cobalto ($CoFe_2O_4$) com formato esférico e com aproximadamente 6 nm de diâmetro (Figura 11a). Este processo envolve a reação, em altas temperaturas (acima de 285 ^oC), do acetilacetonato de ferro com o acetilacetonato de cobalto, em presença de 1,2-hexadecanodiol, de ácido oléico e de oleilamina. As nanopartículas apresentam o caráter hidrofóbico, mas podem se tornar hidrofílicas através de uma funcionalização com o ácido 11-mercaptodecanóico (11-AMD). O sucesso da ligação do 11-AMD com a $CoFe_2O_4$ pode ser explicada pela ligação do carboxilato terminal com os átomos de ferro e do mercapto com os átomos de cobalto. A Figura 11b mostra o comportamento hidrofílico da ferrita de cobalto funcionalizada com o 11-AMD.

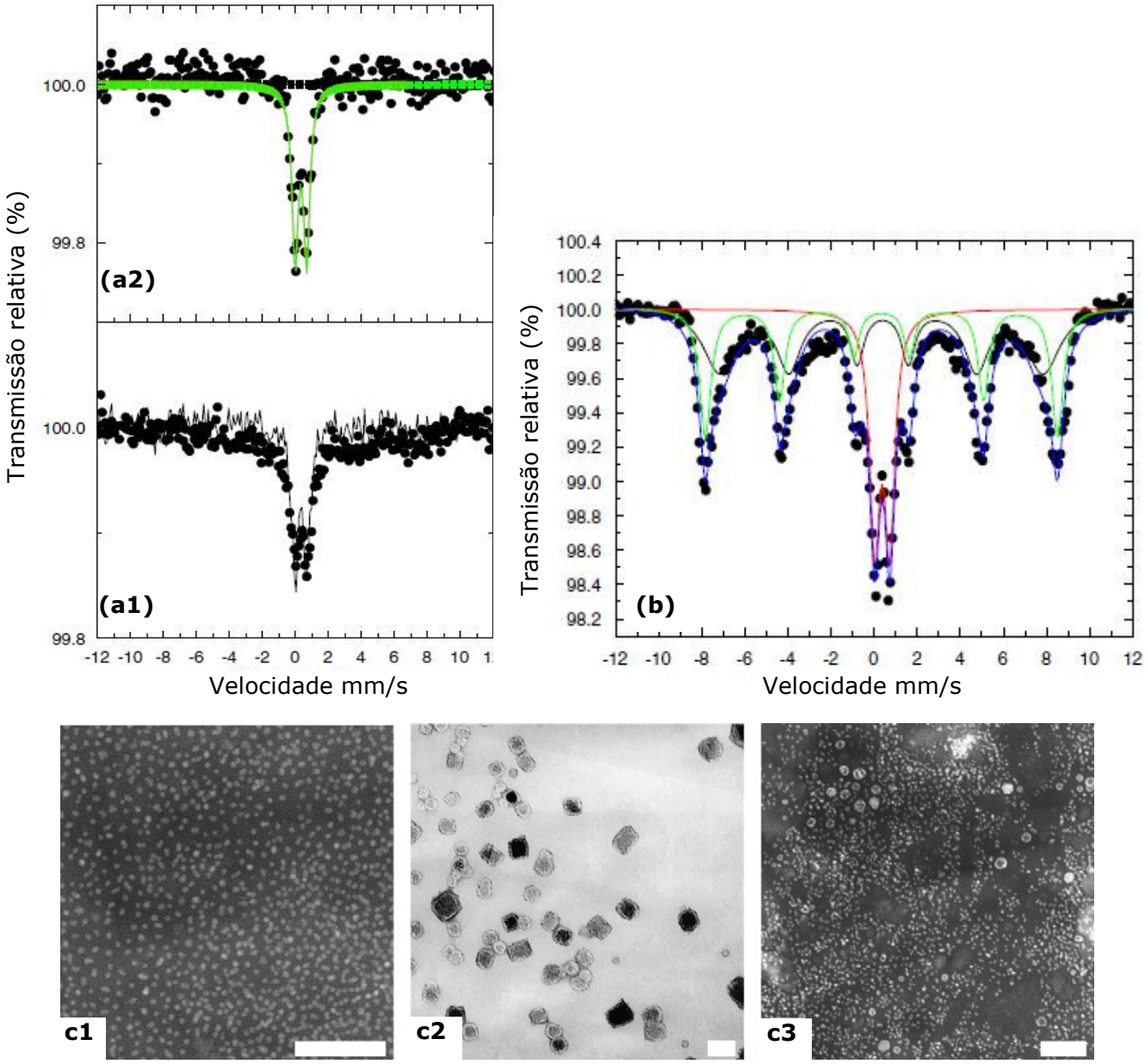

Figura 10. a1) Espectro Mössbauer das nanopartículas sintetizadas em presença de PEG linear em temperatura ambiente e a2) em temperatura criogênica (4 K); b) Espectro Mössbauer das nanopartículas revestidas com PEG com grupo carboxil terminal a 80 K B1); c1 Imagem de TEM das nanopartículas sintetizadas em ausência de PEG (síntese repetida, equivalente à Fig. 9e); c2) Imagem de TEM das nanopartículas sintetizadas em presença de PEG com grupo metóxil terminal e c3) com grupo carboxil terminal. As barras brancas representam 100 nm. [34]

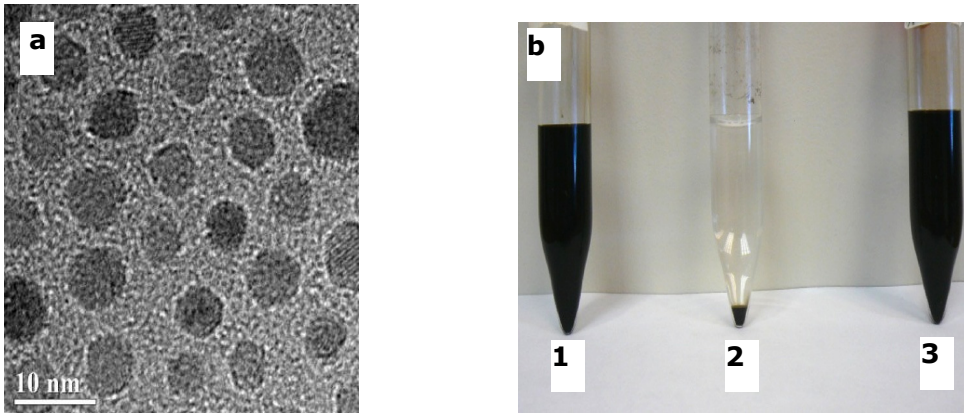

Figura 11. a) Imagem de TEM das nanopartículas de $CoFe_2O_4$; b) imagens de 1) nanopartículas de $CoFe_2O_4$ com ligantes ácido oléico e oleilamina em hexano, 2) $CoFe_2O_4$ em água após lavagem com etanol e 3) $CoFe_2O_4$ funcionalizada com 11-AMD dispersa em água[31].

Quando as nanopartículas de $CoFe_2O_4$ são submetidas à um campo magnético estas absorvem energia e transformam em calor, como pode ser observado pelo gráfico da Figura 12.

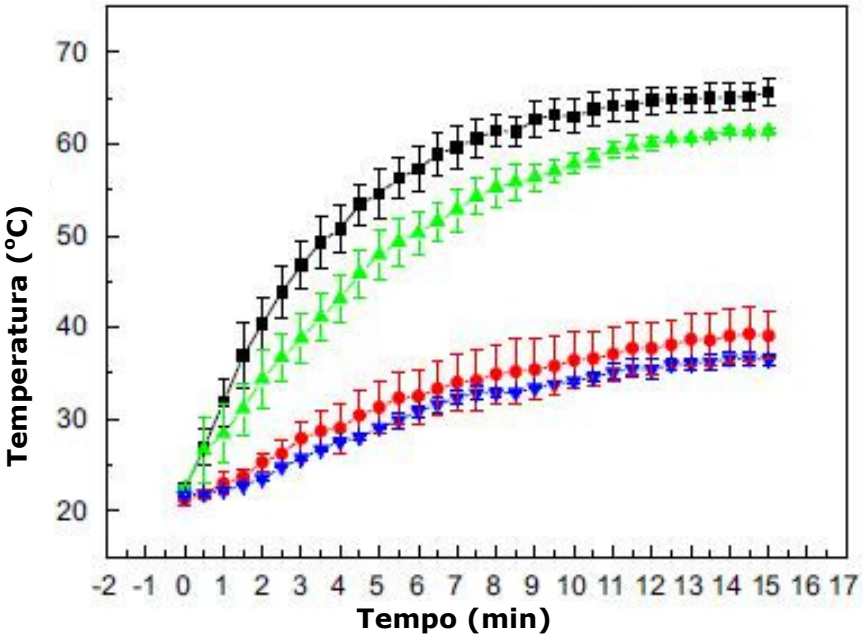

Figura 12. Perfis de temperatura criados pela geração de calor induzido por um campo magnético em uma dispersão aquosa de $CoFe_2O_4$ e em uma não-dispersão de $CoFe_2O_4$ em água, com 634 e 380 Oe a 266 KHz. As barras representam os desvios padrão de três medidas. As curvas preta e vermelha correspondem ao $CoFe_2O_4$ dispersado em água a 634 e 380 Oe, respectivamente, enquanto que as curvas verde e azul correspondem ao $CoFe_2O_4$ não dispersado em água a 634 e 380 Oe, respectivamente.[31]

Esses resultados mostram que as nanopartículas de ferrita de cobalto podem efetivamente absorver calor quando dispersadas em soluções aquosas e submetidas a um campo magnético, o que as torna um potencial agente para tratamentos por hipertermia, e como adjuvantes em nanopartículas multifuncionais que precisem de um aumento de temperatura para a liberação do agente terapêutico.

Algumas nanopartículas magnéticas já estão sendo testadas em terapias químicas em humanos. A Figura 13 mostra imagens de cortes transversais dos cérebros de pacientes que foram tratados com o fluido magnético MFL AS (MagForce Nanotechnologies AG, Berlim, Alemanha), medicamente liberado para estudos e sujeito a órgãos médicos reguladores da Europa. O fluido consiste de uma suspensão de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro revestidas com aminosilanos, com 15 nm de diâmetro. As nanopartículas geram calor quando submetidas a um campo magnético pelo processo de relaxação de Brownian e Néel, induzindo a formação de necrose com subseqüente infiltração e ativação dos fagócitos [37].

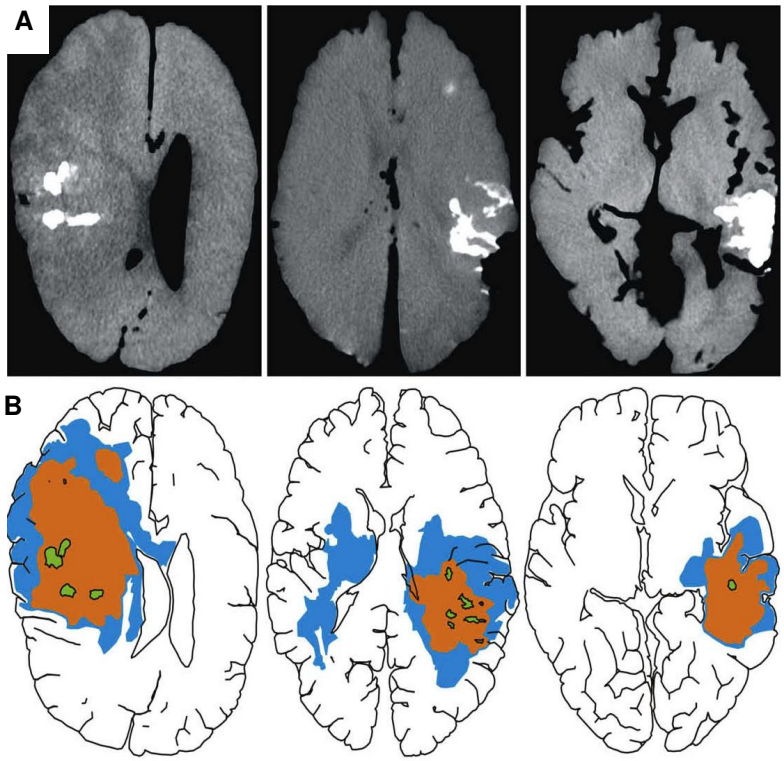

Figura 13. A) Imagem do corte horizontal do cérebro de três pacientes com gliobastoma multiforme (GBM). B) Ilustração: a demarcação azul indica GBMs; laranja indica área geográfica necrosada no tumor; verde indica áreas com agregados de nanopartículas magnéticas[37].

As nanopartículas superparamagnéticas já são comercializadas livremente como agentes de contraste e agentes de entrega de drogas. A empresa Goldpharma comercializa o Endorem®,

uma suspensão de nanapartículas de óxido de ferro contendo 88,6 mg em 8mL por R$ 941,12 (incluindo R$ 36 de impostos), podendo ser comprado inclusive pela internet[38]. O produto FluidMAG®, constituído de uma suspensão aquosa de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético (25 mg/mL) com 50, 100 e 200 nm é comercializado pela empresa Chemicell, custando 40 euros cada mililitro[39]. Outros exemplos de marcas de nanopartículas comercializadas não são difíceis de encontrar, mostrando que a faixa que separa o que é publicado no "estado da arte" e o que já movimenta indústrias é muito estreita.

2.3. Nanopartículas poliméricas

A utilização de nanopartículas poliméricas em estudos envolvendo a entrega de drogas tem crescido muito nos últimos anos. Esses materiais são altamente versáteis pois suas propriedades físico-químicas podem ser controladas de acordo com sua a composição e com os seus grupos funcionais terminais. Nanopartículas com um núcleo hidrofóbico podem ser utilizadas para o encapsulamento de drogas anticâncer hidrofóbicas, enquanto a camada hidrofílica permite a solubilidade e estabilidade no sangue, permitindo a entrega da droga no local do tumor explorando o efeito de permeabilidade e retenção aumentadas[40].

2.3.1. Dendrímeros

Os dendrímeros (do Grego "parte de árvore" ou "ramificação de árvore") são uma importante classe de macromoléculas de 2 a 15 nm altamente ramificadas, que podem ser utilizadas em diagnósticos moleculares, no imageamento e na entrega de drogas. Os dendrímeros são formados de um núcleo rodeado por dédrons, em que cada ramificação possui uma disjunção binária[41]. Essas macromoléculas ramificadas foram primeiramente sintetizadas por Vögtle e colaboradores em 1978, sendo denominadas de "moléculas cascata", no entanto o desenvolvimento desta classe de materiais ocorreu a partir de 1985 com a síntese de dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) pelo grupo de D. Tomália na Dow Chemicals[42].

Os dendrímeros cliváveis são frequentemente derivados de poliamidas, PAMAM, poliésteres e polietilenoglicóis (PEGs). Os principais grupos cliváveis são amidas, ésteres e carbamatos, sendo que os dois últimos são mais utilizados porque são mais facilmente hidrolisados. A maioria das construções dendríticas possui o formato esférico e com superfície homogênea, no entanto a sua superfície pode ser modificada pela introdução de grupos funcionais nos dédrons terminais[44], que pode provocar alterações nas propriedades físico-químicas, como rigidez e solubilidade[41], além de possibilitar a construção de estruturas dendriméricas não regulares[43].

A clivagem, ou despolimerização, de um dendrímero clivável pode ocorrer de três modos (Figura 14): a) uma clivagem supramolecular e liberação do substrato ou de moléculas pequenas;

b) clivagem pela remoção parcial de poucos grupos funcionais, por uma liberação seqüencial específica, remoção dos dédrons (ou de parte deles) e do núcleo; c) e um modo combinado em que a ruptura de uma camada dendrítica inicia uma liberação supramolecular[44].

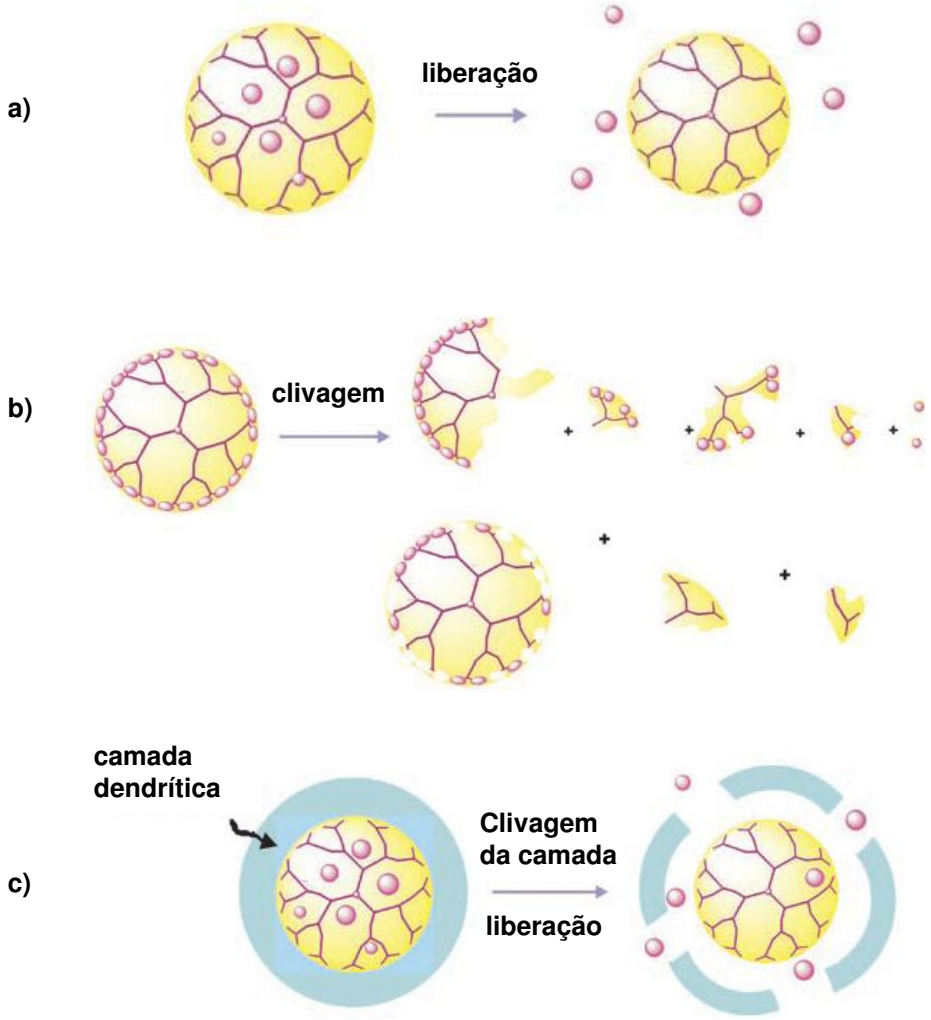

Figura 14. Principais modos de clivagem de dendrímeros: a) clivagem supramolecular; b) clivagem covalente; c) combinação da clivagem covalente e supramolecular[44].

Os dendrímeros com um núcleo hidrofóbico e uma superfície polar são algumas vezes chamados de "micelas unimoleculares". As propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas de um dendrímero, juntamente com o comprimento e os ângulos de rotação das unidades repetitivas, determinam a interação hospedeiro-convidado. O PEG é frequentemente conjugado na superfície dos dendrímeros para criar uma camada hidrofílica ao redor do dendrímero hidrofóbico formando uma micela unimolecular capaz de transportar drogas hidrofóbicas no interior ou drogas hidrofílicas na camada de PEG[45].

Os dendrímeros são obtidos por reações de síntese orgânica em múltiplos passos, em que unidades de polímeros funcionam como blocos de construção. Eles podem ser desenvolvidos por síntese divergente, que envolve a incorporação de ligantes em um núcleo, e pela síntese convergente, na qual as ramificações são sintetizadas primeiro e posteriormente atacadas pelo núcleo. A síntese divergente, além de gerar produtos mais puros, apresenta maior rendimento[41]. Pela escolha de diferentes polímeros (com diferentes grupos funcionais terminais), utilizados como blocos de construção, é possível controlar precisamente o tamanho do dendrímero, a massa molecular, a forma, a densidade, a polaridade, a flexibilidade e a solubilidade. Em geral, os dendrímeros possuem cavidades internas onde drogas hidrofóbicas podem ser encapsuladas. A grande variedade de grupos funcionais nas terminações dos dendrímeros possibilita a conjugação com um grande número de moléculas, como ácido fólico, peptídeos e anticorpos, possibilitando a construção de dispositivos multifuncionais para terapias químicas[46].

Yang e col.[46] desenvolveram um dendrímero à base de PAMAM conjugado com biotina, uma molécula da família das vitaminas (vitamina H) responsável pelo crescimento de tecidos, e com fluoresceínaisotiocianato (FITC) como agente de contrate. Em células cancerosas existe uma maior demanda de biotina devido o crescimento acelerado das células, assim a ligação específica da biotina com os receptores foi explorada para a localização exata das células cancerosas. Os resultados de microscopia confocal (Figura 15) mostraram a elevada eficiência de contraste do conjugado biotina-dendrímero-FITC em células cancerosas, indicando que esta plataforma pode ser utilizada em diagnósticos e terapias do câncer. Também utilizando um dendrímero baseado em PAMAM, Shukla e col[47]. também desenvolveram um conjugado marcador-dendrímero-agente de contraste com potencial aplicação no diagnóstico e terapias de tumores angiogênicos

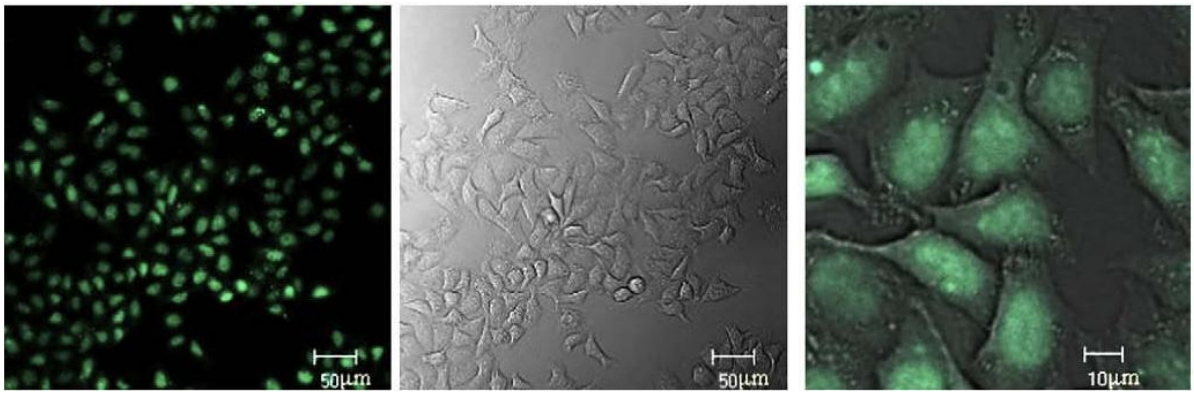

Figura 15. Imagem de microscopia confocal da avaliação *in vitro* do conjugado dendrimérico avaliado em células cancerosas. A imagem central refere-se à incubação das células cancerosas em tampão por 24 h a 37°C. A imagem da direita é uma amplificação da primeira imagem. É possível observar que o conjugado se encontra tanto na periferia da membrana celular quanto no citoplasma da célula[47].

2.3.2. Micelas

Micelas são supramoléculas que podem ser baseadas em copolímeros anfifílicos e podem apresentar uma estrutura de casca e caroço (Figura 16), com tamanho variando entre 10 e 100 nm. O núcleo é um espaço vazio, no qual podem ser colocadas drogas hidrofóbicas, e a casca é composta de uma superfície de organelas hidrofílicas formando uma micela solúvel em água, possibilitando o transporte de drogas pouco solúveis em meios aquosos [5].

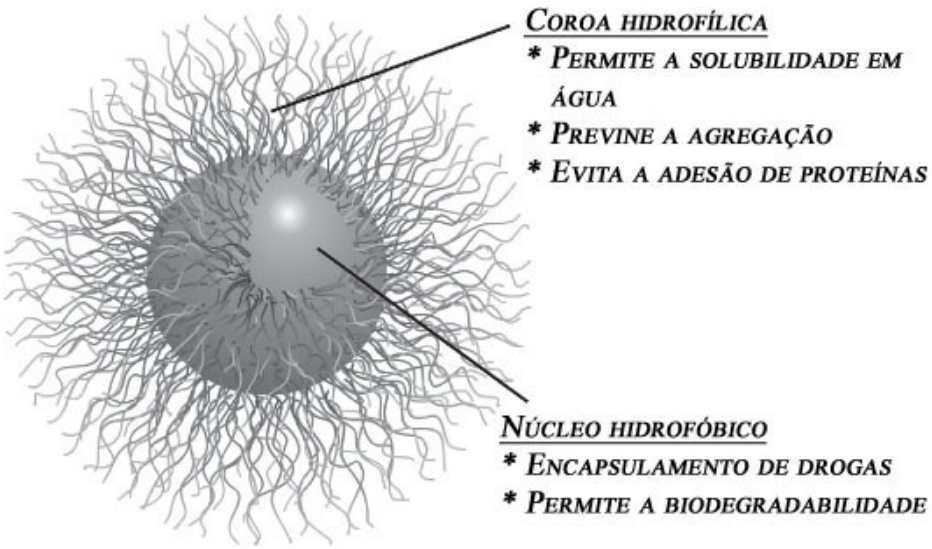

Figura 16. Representação da estrutura de uma micela utilizada em sistemas entregadores de drogas [5].

Micelas contendo paclitaxel (PTX) encapsulado foram sintetizadas pelos métodos de nanoprecipitação e emulsão, e seu comportamento frente às células cancerosas foi avaliado pelo controle no crescimento de tumores em ratos[48]. No método de "nanoprecipitação", uma solução orgânica acetonada contendo poli(lactato-co-glicolato) (PLGA), PLGA-PEG, poli(crapolactona-co-etilenoglicol) (PCL-PEG) e o PTX, foi adicionada em água sob agitação magnética por uma noite permitindo a completa evaporação da acetona. Na técnica de emulsão, o PLGA e o PTX foram adicionados à uma solução de PLGA-PEG em dicloroetano sob agitação, sendo posteriormente adicionado uma solução de colato de sódio, e a realizado um procedimento de sonicação. A emulsão formada foi colocada lentamente em uma solução de colato de sódio sob agitação magnética à 37°C para a evaporação do diclorometano. Para remover a droga (PTX) não encapsulada, as suspensões foram filtradas e ultracentrifugadas em baixas temeraturas, sendo os *pellets* suspensos em água ultra-purificada. A técnica de nanoprecipitação apresentou maior eficiência de encapsulamento, com cerca de 70% do PTX encapsulado, resultando em micelas com diâmetros de 112nm (medida realizada por espectroscopia de correlação de fótons, também

chamada de espalhamento de luz dinâmico). Os valores de potencial zeta encontrados foram próximos da neutralidade, condizente com a presença do PEG que "blinda" as cargas negativas presentes na superfície da nanopartícula. Resultados *in vitro* e *in vivo* mostraram um aumento na atividade antitumoral do PTX encapsulado em micelas em relação à droga livre e aumentando o tempo de vida dos animais submetidos aos testes, indicando que este sistema pode ser considerado um sistema entregador de droga em quimioterapias. Em outro trabalho, o paclitaxel também foi encapsulado em uma micela conjugada com Herceptina, um anticorpo monoclonal, e sua citotoxicidade foi avaliada em algumas linhagens de células cancerosas[40]. Foi observado que o complexo formado pelo agente ativo (PTX)-micela-anticorpo monoclonal (Herciptina) apresentou um maior grau de internalização nas células, quando comparado à Herciptina sozinha e à Herciptina encapsulada em um lipossoma comercial (BioPorter) (Figura17). As células tratadas com o conjugado BioPorter/Herceptina (produto comercial) não apresentaram nenhum aumento na citoxicidade quando comparada às tratadas apenas com a Herceptina, por causa da baixa taxa de penetração celular. Em contraste, quando a Herceptina foi "carregada" pelas micelas, ocorreu um aumento considerável na citotoxicidade. Os resultados de citotoxicidade mostraram que a eficiência no combate às células aumenta quando a entrega da droga, no caso o PTX, ocorre de maneira conjunta com um anticorpo monoclonal.

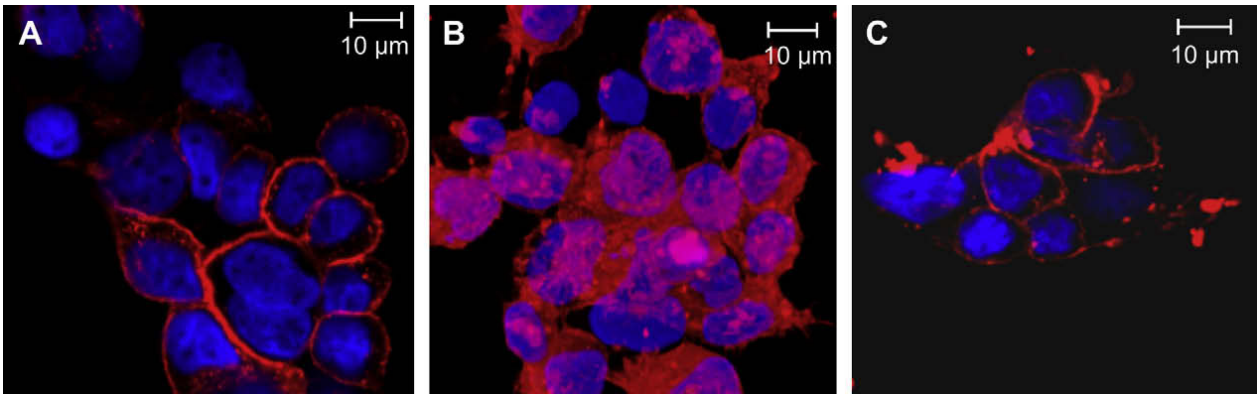

Figura 17. Distribuição celular (A) da fluorescência associada à Herceptina, (B) do conjugado PTX-micela-Herceptina e (C) do complexo BioPorter/Herceptina. Os núcleos foram corados de azul. A fluorescência vermelha mostra a presença de Herceptina no citosol e púrpura no núcleo[(40)].

Alguns estudos para o desenvolvimento de sistemas carregadores de drogas combinam o uso de micelas conjugadas com a utilização do ultrassom como fonte de energia externa. As ondas de pressão provocadas pelo ultrassom causam uma compressão e uma expansão do meio em que estão passando. Esse movimento gera um *stress* que pode provocar a ruptura da micela e a liberação da droga, além de contribuir para a entrada da micela para dentro da célula pelo

aumento da permeabilidade, sendo que alguns estudos relatam valores 20 vezes maiores em relação àqueles utilizados sem ultrassom[49].

2.3.3. Nanopartículas baseadas em Quitosana

A quitosana, α(1-4)-2-amino-2-deoxi β-D-glucana, é uma forma desacetilada da quitina, um polissacarídeo abundante presente nas conchas dos crustáceos. Esse polímero natural possui interessantes propriedades médico-farmacêuticas, como a biocompatibilidade e baixa toxicidade[4]. Explorando tais propriedades, sistemas carregadores de drogas, em que drogas hidrofóbicas são encapsuladas dentro de nanopartículas à base de quitosana têm sido amplamente estudados nos últimos anos, apresentando resultados promissores[50,51,52].

Lee e col.[51] desenvolveram um interessante estudo em que um agente fotossensível foi encapsulado em nanopartículas à base de quitosana glicol e o tratamento foi conjugado com uma fonte excitação externa, com o objetivo de produzir dentro do tumor espécies de oxigênio-singlete altamente reativos, causando sua destruição do tecido canceroso. A entrega passiva do agente fotossensível encapsulado dentro de nanopartículas poliméricas aumenta a eficiência terapêutica e diminui drasticamente os efeitos colaterais. Nesse estudo, os autores desenvolveram um sistema de *drug delivery* em que a protoporfirina IX (FpIX), um agente fotossensível insolúvel em água foi encapsulado através de diálise dentro do núcleo hidrofóbico de nanopartículas à base de quitosana glicol. As nanopartículas à base de quitosana (NPQ) foram preparadas por auto-organização e modificadas hidrofobicamente pela conjugação com o ácido 5-β-colânico (AC) em presença de N-hidróxisuccinamida e hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dietilaminopropil)-carbodiimida. Após a formação do conjugado NPQ-AC (Figura 18a), o agente fotossensível (FpIX) (Figura18b) foi encapsulado por diálise dentro do conjugado, formando uma nanocápsula (260 – 350 nm) de quitosana com FpIX (Fig.18c). Utilizando do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR), característico de tumores sólidos, as nanocápsulas se acumularam na região cancerosa e após a irradiação com um laser de He-Ne (633 nm, 3 mW/cm^2) por 12 min foi possível observar uma dramática redução no número de células cancerosas vivas. Os testes realizados em ratos, mostraram que esse sistema de protoporfirina encapsulada em nanopartículas de quitosana irradiado com laser de Ne-He externo induz a necrose da região cancerosa, além de aumentar o tempo de vida dos animais utilizados nos experimentos, mostrando seu potencial de utilização em terapias químicas, uma vez que possui o efeito teraupêutico potencializado e baixa toxicidade, o que diminui os efeitos colaterais.

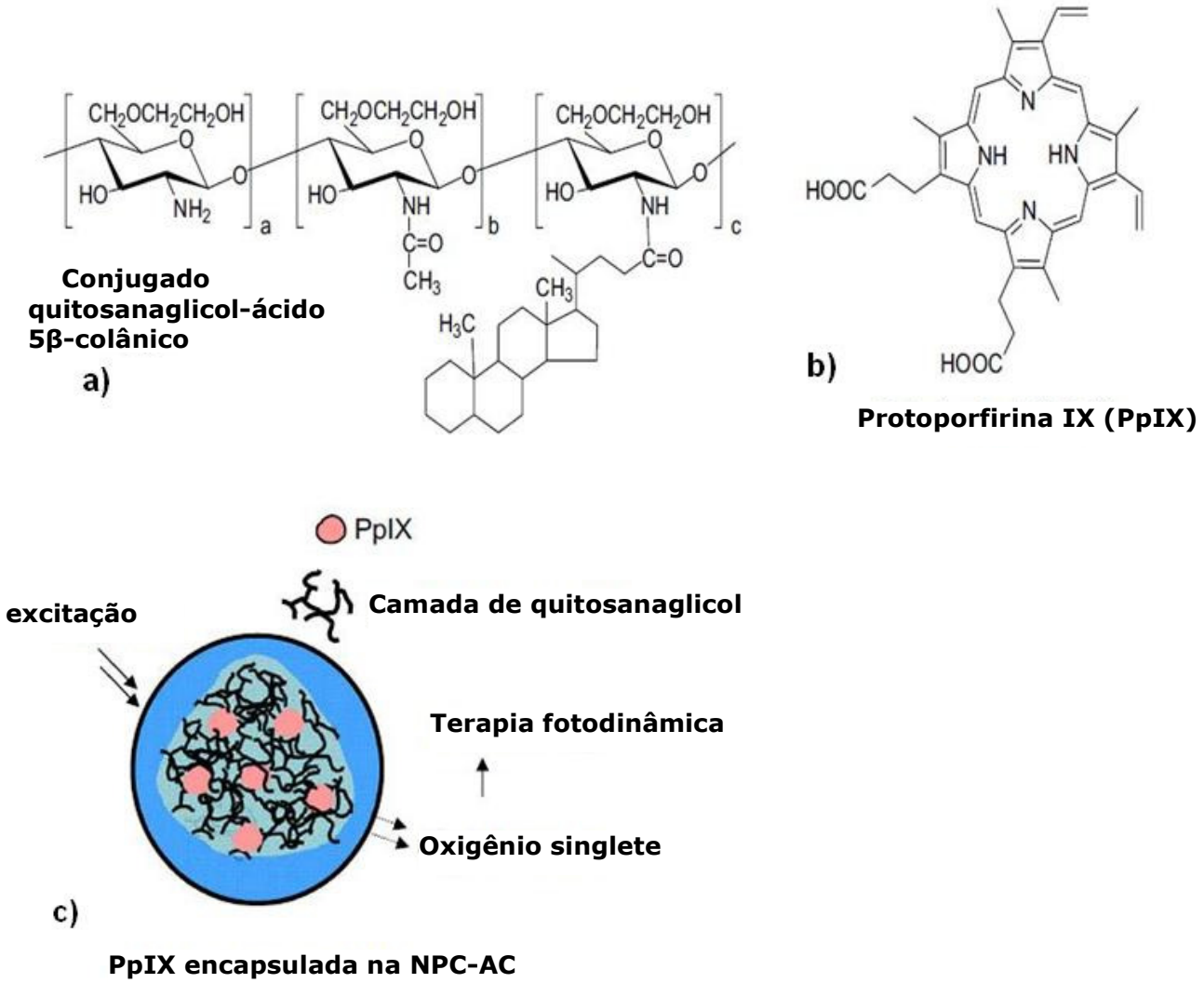

Figura 18. a) Estrutura química do conjugado quitosona glicol- ácido 5-β-colânico (NPQ-AC); b) estrutura do agente fotosensível, protoporfirina IX (FpIX) e c) representação esquemática do PpIX encapsulado na NPQ-AC[51].

3. Considerações Finais

A utilização de nanopartículas no diagnóstico e terapias do câncer tem possibilitado o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes e com enorme redução dos efeitos colaterais, que são os principais responsáveis pelo sofrimento causado pelas quimioterapias. Esses efeitos são causados devido à baixa seletividade das drogas convencionais, tornando necessária a utilização de uma grande quantidade de medicamento para se atingir o resultado esperado. A baixa seletividade ainda faz com que os agentes quimioterápicos ataquem não somente as células ou tecidos cancerosos como também as células sadias, principalmente aquelas com crescimento

acelerado, como é o caso das células do cabelo, resultando na queda capilar. Estima-se que os sistemas entregadores de drogas (*Drug Delivery Systems*) possam utilizar uma quantidade 100 vezes menor de princípio ativo e apresentar uma eficiência aumentada em 100 vezes [(5)]. Multiplicando os valores, trata-se de um aumento no rendimento de cerca de 4 ordens de grandeza.

As nanopartículas, conjugadas com fontes de excitação externa como o campo magnético, a radiação ultravioleta, laser e ultrassom, têm sido utilizadas em diagnósticos e terapias químicas como agentes de contraste ou como carregadores de drogas com resultados promissores. Algumas dessas nanopartículas já são comercializadas, podendo inclusive ser compradas pela internet[(38)] mostrando a rápida transposição da barreira "pesquisa (*paper*) - mercado (produto)".

Nos últimos anos tem havido uma tendência no desenvolvimento de sistemas que entreguem as drogas nas células cancerosas de forma ativa ao invés da passiva (acúmulo no tumor pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentadas). Isso tem sido realizado pelo desenvolvimento de sistemas multifuncionais, em que as partículas funcionam como plataformas de construção de dispositivos contendo o agente terapêutico, um agente de contraste e um ligante (anticorpo) que reconhece de forma específica as células do câncer, aumentando a especificidade do tratamento e, por conseguinte a redução dos efeitos colaterais.

O "universo" das nanopartículas utilizadas em terapias químicas tem crescido rapidamente. Nos últimos anos interessantes trabalhos têm sido publicados utilizando nanopartículas inorgânicas como carregadores de drogas ou como agentes fototerápicos. Dentre essas nanopartículas utilizadas em fototerapias podem ser citadas as nanopartículas de fosfato de cálcio[(53)] e de óxido de zinco[(54)]. As primeiras foram revestidas por uma camada polimérica e utilizadas como transportadores de agentes fotossensíveis e as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) revestidas com aminopolisiloxano e conjugadas com daunorrubicina (um agente quimioterápico) foram utilizadas em terapias fotodinâmicas. Nessa terapia, quando o ZnO em solução aquosa é irradiado com luz UV, espécies reativas de oxigênio, como radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e superóxido, podem ser geradas, tornando possível a decomposição de compostos orgânicos citotóxicos em algumas células cancerosas. As nanopartículas de sílica[(55)] e os hidróxidos duplos lamelares (hidrotalcita)[(56)] também podem ser utilizados como transportadores, em que a droga, peptídeos ou proteínas podem ser transportados dentro dos poros ou nas regiões interlamelares, respectivamente.

Neste contexto, fica claro que as possibilidades de terapias químicas envolvendo as nanopartículas são inúmeras e os benefícios incluem o aumento da eficiência no tratamento e a redução dos efeitos colaterais. As vantagens dos tratamentos envolvendo os sistemas nanométricos se refletem no aumento exponencial do número de artigos publicados nos últimos anos, sendo ressaltadas ainda mais pelos produtos "nanotecnológicos" já disponíveis no mercado. Entretanto, os estudos nanotoxicológicos desses sistemas não acompanham a velocidade com que

os artigos que exploram os benefícios das nanopartículas são publicados. O que se percebe é uma significativa discrepância entre o número de publicações envolvendo as vantagens das nanopartículas e seus riscos à saúde. Os estudos toxicológicos das nanopartículas que são apresentados, na maioria das vezes, são pouco específicos, e geralmente são limitados à tradicional mortalidade dose-dependente. Além disso, a maioria dos estudos nanotoxicológicos é realizada *in vitro*, não fazendo nenhuma referência à complexidade das interações *in vivo.* Isso pode ser interpretado como uma infância relativa deste campo de pesquisa[57,58]. Somado à essas questões, alguns testes toxicológicos de nanopartículas apresentam resultados controversos. Talvez o caso mais discutido, até o momento, seja o dos nanotubos de carbono[59]. Esses materiais apresentam resultados nanotoxicológicos totalmente contrários em estudos realizados por diferentes grupos de pesquisa. Esses resultados controversos podem ser decorrentes de uma falta de padronização do material, que no caso dos nanotubos de carbono é extremamente complicada, pois diferentes amostras de nanotubos de carbono de um mesmo lote da mesma empresa apresentam morfologias diferentes, além de impurezas e resíduos de catalisadores. Uma comparação entre a toxicidade dos nanotubos de carbono realizada por diferentes grupos de pesquisa necessita de caracterizações físico-químicas detalhadas do material, o que geralmente não é observado nos trabalhos com aplicações médicas ou biológicas.

Outra preocupação com o crescente aumento na utilização das nanopartículas em medicina é a falta do estudo de seu "ciclo de vida". Nos poucos trabalhos em que a toxicidade é avaliada *in vivo*, os animais são sacrificados após um período determinado (geralmente poucos dias) para investigar o acúmulo das nanopartículas em determinados órgãos. Não foram observados trabalhos em que os animais foram mantidos vivos por um longo período de tempo, com o intuito de avaliar se o organismo é capaz de eliminar as nanopartículas ou se este animal irá desenvolver com o tempo alguma anomalia crônica. Esta observação surgiu das seguintes indagações: Após a terapia química ser concluída em um paciente, para onde vão as nanopartículas? O organismo é capaz de eliminá-las em sua totalidade? Devido ao tamanho reduzido, elas não podem percorrer o corpo, inclusive ultrapassar a barreira de sangue do cérebro causando anomalias no sistema nervoso central? Essas questões poderiam ser utilizadas para balancear a "chuva de artigos" sobre as vantagens das nanopartículas e a falta de estudos sobre os seus riscos. Fica, desta maneira, evidente a necessidade rápida do desenvolvimento de pesquisa sistemática de riscos, uma vez que muitas dessas nanopartículas já estão disponíveis no mercado.

Em um ponto de vista muito pessoal, essas questões não devem ser encaradas como barreiras para o desenvolvimento de novas terapias químicas, mas sim como uma grande oportunidade de pesquisa para uma área que começa a dar os primeiros passos (não desmerecendo os trabalhos já publicados até então) e que com certeza terá um grande caminho pela frente.

4. Referências Bibliográficas

(1) JABR-MILANE, L. S., VAN VLERKEN, L. E., YADAV, SUNITA, AMIJI, M. M. Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. **Cancer Treat. Ver.** v.34 p. 592-602, 2008.

(2) Disponível em: < http://www.inca.gov.br> Acesso em 25 em maio de 2009.

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

(4) HAMIDI, M., AZADI, A., RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Adv. Drug Deliver. Rev.** v. 60, p.1638-1649, 2008.

(5) JAIN, K. K. Handbook of Nanomedicine. In __:**Nanomolar Diagnostic and Nano-Oncology**. Ed. Humana Press. Estados Unidos,2008.

(6) SANTOS, N. C., CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: A bala mágica acertou? **Quim. Nova** v. 25 6B, p. 1181-1185, 2002.

(7) SINGH, R., LILLARD JR, J. W. Nanoparticle-based targetet drug delivery. **Exp. Mol. Pathol**. v. 86, p. 215-223, 2009.

(8) SHEKHAR, C. Lean and mean: Nanoparticle-based delivery improves performance of cancer drugs. **Chem. Biol**. v.16, p. 349-350, 2009.

(9) GANTA, S., DEVALAPALLY, H. SHAHIWALA, A., AMIJI, M. A review of stimuli-response nanocarriers for drug and gene delivery. **J. Control. Release.** v. 126. p. 187-204, 2008.

(10) HANS, M. L., LOWMAN, A.M. Nanomaterials Handbook. In ___: **Nanoparticles for Drug Delivery**. Ed. Taylor & Francis.Estados Unidos, 2006.

(11) FRÉCHET, J. M. J. Dendrimers and supramolecular chemistry. **P. Natl. Acad. Sci. USA** v.8, p. 4782-4787, 2002.

(12) WONG, H. L., BENDAYAN, R., RAUCHT, A. M., LI, Y., WU, X. Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsuled in solid nanoparticles. **Adv. Drug Deliver. Rev**. v.59, p. 491-504, 2007.

(13) CHAN, J. M., ZHANG, L., YUET, K. P., LIAO, G., RHEE, J., LANGER, R., FAROKHZAD, O. C. PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. **Biomaterials** v.30, p.1627-1634, 2009.

(14) AZZAZY, H. M.E., MANSOUR, M. M. H., KAZMIERCZAK, S. C. Nanodiagnostics: A New Frontier for Clinical Laboratory Medicine. **Clin. Chem.** v. 52(7), p. 1238-1246,2006.

(15) PORTNEY, N. G., OZKAN, M. Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 384, p. 620-630, 2006.

(16) YEH, H.C., HO, Y.P., WANG, T.H. Quantum dot–mediated biosensing assays for specificnucleic acid detection. **Nanomed-Nanotechnol.** v.1, p. 115-121, 2005.

(17) GUO, P., WEI, C. Quantum dots for robust and simple assays usingsingle particles in nanodevices. **Nanomed-Nanotechnol.** v. 1, p.122-124,2005.

(18) KAM, N. W. S., O`CONNELL, M., WISDOM, J. A., DAÍ, H. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. **P. Natl. Acad. Sci. USA** v.102(33), p. 11600-1605, 2005.

(19) BHATTACHARYA, R., MUKHERJEE, P. Biological propreties of "naked"metal nanoparticles. **Adv. Drug Deliver. Rev.**v.60, p. 1289-1306, 2008.

(20) JAIN, P. K., EL-SAYED, I., H., EL-SAYED, M. A. Au nanoparticles target cancer. **Nano Today** v.2(1), p.18-29, 2007.

(21) HUANG, X., EL-SAYED I.H., QIAN, W., EL-SAYED, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. **J. Am. Chem. Soc**. v.128, p.2115-2120, 2006.

(22) SPERLING,R. A., GIL, P. R., ZHANG, F., ZANELLA, M., PARAK, W.J. Biological applications of gold nanoparticles. **Chem Soc Rev**. v.37, p. 1896–1908, 2008.

(23) KARATAS, Ö., F., SEZGIN, E., AYDIN, Ö., ÇULHA, M. Interaction of gold nanoparticles with mitochondria. **Colloid. Surface B** v.71, p. 315-318, 2009.

(24) SAL, T. K., MURPHY, C. J. Seeded High Yield Synthesis of Short Au Nanorods in Aqueous Solution. **Langmuir** v.20, p. 6414-6420, 2004.

(25)OTUBO, L. Química de Nanoestruturas: Funcionalização de Nanopartículas Metálicas e Nanotubos de Carbono. Campinas, 2009. Tese - (Doutorado em Química). Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas.

(26) GHOSH, P., HAN, G., DE, M., KIM, C. K., ROTELLO V. M. Gold nanoparticles in delivery applications. **Adv. Drug Deliver. Rev.** v.60, p. 1307–1315, 2008.

(27) PHILIP, D. Biosynthesis of Au, Ag and Au–Ag nanoparticles using edible mushroom extract. **Spectrochim. Acta A** v.73, p. 374–381, 2009.

(28) HUFF, T. B., TONG, L., ZHAO, Y., HANSEN, M. N., CHENG, J. X., WEI, A. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. **Nanomedicine-UK** v.2(1), p. 125-132, 2007.

(29) Disponível em: < http://www.nanopartz.com> Acesso em 2 de junho de 2009.

(30) ARRUEBO, M., FERNANDEZ-PACHECO, R., IBARRA, M. R., SANTAMARÍA, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Nano Today** v.2(3), p.22-32, 2007.

(31) KIM, D. H., NIKLES, D. E., JONHSON, D. T., BRAZEL, C. S. Heat generation of aqueously dispersed $COFe_2O_4$ nanoparticles as heating agents for magnetically activated drug delivery and hyperthermia. **J. Magn. Magn. Mater.** v.320, p.2390-2396, 2008.

(32) CIOFANI, G., RIGGIO, C., RAFFA, V., MENCIASSI, A., CUSCHIERI, A. A bi-modal approach against cancer: Magnetic alginate nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia. **Med. Hypotheses** v.73, p. 80-82, 2009.

(33) YUANBI, Z., ZUMIN, Q., JIAYING, H. Preparing and analysis of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles used as targered-drug carriers. **Chinese j. Chem. Eng**. v.16(3), p. 451-455, 2008.

(34) BONDER, M. J., ZHANG, Y., KIICK, K. L., PAPAEFTHYMIOU, V., HADJIPANAYIS, G. C. Controlling synthesis of Fe nanoparticles with polyethylene glycol. **J. Magn. Magn. Mater** v.311, p.658-664, 2007.

(35) LIM, Y. T., CHO, M. Y., LEE, J. M., CHUNG, S. J., CHUNG., B. H. Simultaneous intracellular delivery of targeting antibodies and functional nanoparticles with engineered protein G system. **Biomaterials** v.30, p. 1197-1204, 2009.

(36) JAIN, T. K., RICHEY, J., STRAND, M., LESLIE-PELECKY, D. L., FLASK, C. A. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: Drug delivery and magnetic resonance imaging. **Biomaterials** v.29, p. 4012-4021, 2008.

(37) VAN LANDEGHEM, F. K. H., MAIER-HAUFF, K., JORDAN, A., HOFFMANN. K. T., GNEVECKOW, U., SCHOLZ, R., THIESEN, B., BRÜCK, W., VON DEIMLING, A. Post-mortem studies in gliobastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles. **Biomaterials** v.30, p. 52-57, 2009.

(38) Disponível em:<http://www.goldpharma.com/?show=search&search_srt=ENDOREM&lang=ENGLISH> Acesso em 2 junho de 2009.

(39) Disponível em:<http://www.chemicell.com/products/ferrofluid/ferrofluids.html>. Acesso em 2 junho de 2009.

(40) LEE, A. L.Z., WANG, Y., CHENG, H. Y., PERVAIZ,S., YANG, Y. Y. The co-delivery of paclitaxel and Herceptin using cationic micellar nanoparticles. **Biomaterials** v.30, p.919–927, 2009.

(41) LANGEREIS, S., DIRKSEN, A., HACKENG,T. M.,VAN GENDEREN, M. H. P., MEIJER, E. W. Dendrimers and magnetic resonance imaging. **New j. Chem.** v.31, p. 1152–1160 2007.

(42) BOAS, U., CHRISTERSEN, J. B., HEEGAARD, P. M. H. Dendrimers in Medicine and Biotechnology: New Molecular Tools. In____: **Dendrimers: Design, Synthesis and Chemical Properties**.. RSC Publishing, 2006.

(43) NEWKOME, G. R., KOTTA, K. K., MOORFIELD, C., N. Design, Synthesis, and Characterization of Conifer-Shaped Dendritic Architectures. **Chem-Eur. J.** v.12, p. 3726-3734, 2006.

(44) GINGRAS, M., RAIMUNDO, J. M., CHABRE, Y. M. Cleavable Dendrimers. **Angew. Chem. Int. Edit.** v.46, p. 1010-1017, 2007.

(45) CRAMPTON, H. L., SIMANEK E. E. Dendrimers as drug delivery vehicles: non-covalent interactions of bioactive compounds with dendrimers. **Polym. Int.** v.56, p. 489–496, 2007.

(46)YANG, W., CHENG, Y., XU T., WANG, X., WEN, L. Targeting cancer cells with biotinedendrimer conjugates. **EUR. J. MED. CHEM.** v.44, p. 862 -868, 2009.

(47) SHUKLA, R., THOMAS, T. P., PETERS, J., KOTLYAR, A., MYC, A., BAKER JR, J. R. Tumor angiogenic vasculature targeting with PAMAM dendrimer–RGD conjugates. **Chem. Commun.** p.5739–5741. 2005.

(48) DANHIER, F., LECOUTURIER, N., VROMAN, B., JÉRÔME, C., MARCHAND-BRYNAERT, J., FERON, O., PRÉAT, V. Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. **J. Control. Release** v.133, p. 11-17, 2009.

(49) HUSSEINI, G. A., PITT, W. G. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. **Adv. Drug Deliver. Rev.** v.60, p. 1137-1152, 2008.

(50) TAN, Y., LIU, C. Self-aggregated nanoparticles from linoleic acid modified carboxymethyl chitosan: Synthesis, characterization and application in vitro. **Colloid. Surface B** v.69, p. 178-182, 2009.

(51) LEE, S. J., PARK, K., OH, Y., KWON, S., HER, S., KIM, I., CHOI, K., LEE, S. J., KIM, H., LEE, S. G., KIM, K., KWON, I. C. Tumor specificity and therapeutic efficacy of photosensitizer-encapsulated glycol chitosan-based nanoparticles in tumor-bearing mice. **Biomaterials** v.30, p. 2929-2939. 2009.

(52) KIM, J., KIM, Y., PARK, K., LEE, S., NAM, H. Y., MIN, K. H., JO, H. G., PARK, J. H., CHOI, K., JEONG, S. Y., PARK, R., KIM, I., KIM, K., KWON, I. C. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. **J. Control. Release** v.127, p.41-49, 2008.

(53) SCWIERTZ, J., WIEHE, A., GRAFE, S., GITTER, B., EPPLE, M. Calcium phosphate nanoparticles as carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria. **Biomaterials** v.30, p. 3324-3331, 2009.

(54) GUO, D., WU, C., JIANG, H., LI, Q., WANG, X., CHEN, B. Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorrubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation. **J. Photoch. Photobio. B** v.93, p.119-126, 2008.

(55) SLOWING, I. I., TREWYN, B. G., LIN, V. S-Y. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery for membrane-impermeable proteins. **J. Am. Chem. Soc**. v.129, p. 8845-8849, 2007.

(56) CHOI, S-J., OH, J-M., CHOY J-H. Anticancer drug-layered hydroxide nanohybrids as potent cancer chemotherapy agents. **J. Phys. Chem. Solids.** v.69, p. 1528-1532, 2008.

(57) OSTROWSKI, A. D., MARTIN, T., CONTI, J., HURT, I., HARTHORN, B. H. Nanotoxicology: characterizing the scientific literature, 2000-2007. **J. Nanoparticle. Res.** v.11, p. 251-257, 2009.

(58) LINKOV, I., SATTERSTROM, F. K., COREY, L. M. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions **Nanomed-Nanotechnol.** v.4, p.167-171, 2008.

(59) SHVEDOVA, A.A., KISIN, E.R., PORTER, D., SCHULTE, P., KAGAN, V. E., FADEEL, B., CASTRANOVA, V. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? **Pharmacol. Therapeut.** v.121, p.192-204, 2009.

Esta monografia corresponde ao Exame Geral de Qualificação de Doutorado de Raphael Dias Holtz, apresentada ao Instituto de Química da UNICAMP, em 10 de junho de 2009, tendo a banca sido constituída pelos Profs. Drs.: Edvaldo Sabadini (IQ-UNICAMP), Nelson Eduardo Durán Caballero (IQ-UNICAMP) e Ivo Milton Raimundo Júnior (IQ-UNICAMP).