

Rui Filipe da Conceição Teixeira

APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS E TOXICIDADE DOS NANOTUBOS DE CARBONO

Monografia orientada pelo Prof. Dr. Saul Pereira da Costa, no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, *Rui Filipe da Conceição Teixeira*, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010035, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular. Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, ----- de----- de 2015.

Assinatura do Aluno

(Rui Filipe da Conceição Teixeira)

Assinatura do Aluno
(Rui Filipe da Conceição Teixeira)

Assinatura do Tutor
(Prof. Dr. Saul Pereira da Costa)

Coimbra, _____ de Setembro de 2015

Índice

Abreviaturas	5
Resumo	6
Abstract	6
1. Introdução	7
2. Tipos de Nanotubos de Carbono	8
2.1 O que são Nanotubos de Carbono	8
2.2 MWCNTs	8
2.3 SWCNTs	9
3. Nanotubos de Carbono e Sistema Biológico	10
3.1 Funcionalização covalente	10
3.2 Funcionalização não covalente	11
3.3 Barreiras biológicas	12
3.4 Uptake celular	12
4. Aplicações terapêuticas dos nanotubos de carbono	14
4.1 Drug delivery	14
4.1.1 Pequenas moléculas	14
4.1.1.1 Cancro	14
4.1.2 Proteínas	16
4.1.3 BHE	17
4.2 Gene Delivery	17
5. Nanotoxicidade	20
5.1 Stress oxidativo como mecanismo explicativo	21
5.2 Outros mecanismos	21
6. Conclusão	22
7. Anexos	23
7.1 Anexo I	23
7.2 Anexo II	23
7.3 Anexo III	24
7.4 Anexo IV	24
7.5 Anexo V	24
7.6 Anexo VI	25

8. Bibliografia..... 26

Abreviaturas

BHE – Barreira hematoencefálica

CNTs – *Carbon nanotubes*

Complexo RISC – *RNA-induced silencing complex*

DDS – *drug delivery systems*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSTs – Doenças sexualmente transmissíveis

EGF – *Epidermal growth factor*

EGFR – *Epidermal growth factor receptor*

f-CNTs – *Functionalized carbon nanotubes*

miRNA – micro RNA

MWCNTs – *multi-walled carbon nanotubes*

NOSs – *Nitric oxide synthase*

pDNA – Plasmídeo DNA

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – *Reactive oxygen species*

siRNA – *Small interfering RNA*

SWCNTs – *single-walled carbon nanotubes*

Resumo

Os nanotubos de carbono (CNTs) são estruturas moleculares organizadas apenas por átomos de carbono ligados entre si através de interações sp^2 , formando grafite e constituindo tubos em nanoescala. A sua configuração de átomos de carbono possibilita-lhes características eletrônicas, físicas e mecânicas únicas. Os CNTs são divididos em dois grandes grupos, os de camada simples, constituídos apenas por uma camada de átomos de carbono ou os de camada múltipla que são compostos por mais do que duas camadas concêntricas.

Os CNTs têm várias aplicações em farmácia e medicina, no entanto para serem biocompatíveis com os sistemas biológicos necessitam de ser funcionalizados de forma covalente ou não covalente. *Drug delivery* é considerado o grande ramo da farmácia e medicina onde estas estruturas são estudadas, o que apesar de se demonstrarem com elevado potencial ainda não se conhecem todas as suas propriedades toxicológicas, ou mesmo os efeitos em *background* a longo prazo nos sistemas biológicos e portanto a necessidade da realização de mais estudos.

Abstract

Carbon nanotubes (CNTs) are organized molecular structures where the carbon atoms link between them by sp^2 interaction, forming graphite and having a cylindrical structure. Atom distribution give them electrical, physical and unique mechanical characteristics. CNTs are divided into two big groups, SWCNTs (single-walled carbon nanotubes) where the layer composition is just one atom thicker and MWCNTs (multi-walled carbon nanotubes) composed by more than two layers.

Their unique characteristics have a huge value in fields as pharmacy or medicine, however to be compatible with any biological system it need to be changed in the surface by covalent or non-covalent reaction. CNTs associated to Drug delivery is considered a cluster of research and they show a huge potential to be used as drug delivery system (DDS), however CNTs to be used in humans need to be more studied because of the unknown about all their toxicological effects and long exposure effects in *background*.

I. Introdução

A 7 de novembro de 1991, S.Iijimi anunciava na revista *Nature* ter descoberto novas estruturas de tamanho “nano”, a que hoje se chamariam “nanotubos de carbono”. [1] Estas estruturas são tubulares e são definidas por terem um diâmetro de tamanho “nano” e um comprimento até alguns micrómetros. Este tamanho na “nanoescala” faz com que seja um material muito interessante e com características inesperadas, abrindo novas portas investigativas, bem como o estudo de novos fenômenos.[2]

Os CNTs podem dividir-se em dois grandes grupos, MWCNT e SWCNT, que significam nanotubos em multicamadas e em camada simples, respetivamente. Assim sendo, os SWCNT têm a espessura de apenas um átomo de carbono, enquanto os MWCNT têm várias camadas de apenas um átomo de espessura, e serão posteriormente desenvolvidos nesta monografia.[3]

Hoje em dia, estas estruturas, devido às suas propriedades únicas, são extremamente estudadas em vários campos, como a eletrónica, informática e ótica onde conferem uma força mecânica enorme, excelente condução térmica e elétrica. [4]

Algumas das suas propriedades, como grande área de contato, excelente estabilidade química e uma camada poliaromática rica eletronicamente, tornam estas estruturas ideais para adsorver ou conjugar diversas moléculas terapêuticas como proteínas, anticorpos, enzimas, etc. A possibilidade de administrar estes conjugados em células levou a que os CNTs sejam muito estudados, não só a nível da terapêutica anticancerígena como principalmente a nível do *drug delivery*. [5,6]

O mundo da nanotecnologia está em rápida expansão e cada vez mais se produzem materiais complexos, cujas características se desconhecem inteiramente. De entre essas características, destaca-se o seu extenso perfil toxicológico, o que limita tanto a pesquisa como a aplicabilidade prática em estudos clínicos.

Os nanotubos de carbono são apenas um destes exemplos do novo ramo da toxicologia, designado por nanotoxicologia, em que ainda não existe consenso sobre a sua real toxicidade.[7]

2. Tipos de Nanotubos de Carbono

2.1 O que são Nanotubos de Carbono

Os nanotubos de carbono são considerados tanto alótropos do Carbono como fulerenos, porque são constituídos apenas por átomos de carbono que organizados através de ligações do tipo sp^2 , formam anéis de benzeno e que enrolados entre si originam as estruturas tubulares denominadas nanotubos de carbono. [3]

De acordo com o nível de camadas que estes nanotubos possam apresentar a partir da sua parte central, podem ser divididos em dois grandes grupos *multi-walled carbon nanotubes* (b) ou *single-walled carbon nanotubes* (a).

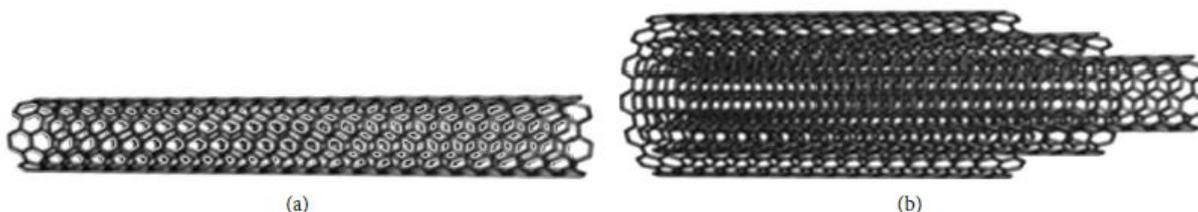


Ilustração 1 - Estrutura tridimensional dos SWCNTs(a) e MWCNTs(b)[8]

2.2 MWCNTs

Os MWCNTs representados pela figura 1 b) são constituídos por dois ou mais cilindros de camada simples de átomos de carbono alinhados concentricamente e separados por uma entre camada que normalmente tem uma espessura de aproximadamente 0.34nm.[9] O diâmetro exterior maior que 2nm e até aproximadamente 100nm e um diâmetro interior entre 1 a 3nm, no entanto, podem ter comprimento até alguns micrómetros.[8]

2.3 SWCNTs

Por seu lado os SWCNTs são mais simples que os MWCNTs e foram descobertos apenas dois anos após os MWCNTs, sendo no entanto basilares para a compreensão total de ambos os tipos. São constituídos apenas por uma camada circular de átomos de carbono e em forma de cadeias longas. O seu diâmetro varia entre 0.4nm e os 2nm. Como só tem uma camada de átomos de espessura, a forma como são sintetizados e a forma como o enrolamento dos átomos de carbono em relação ao eixo de enrolamento se dá, definem três tipos diferentes de nanotubos de carbono de camada simples, e por sua vez com propriedades diferentes.

Existem três tipos diferentes de “enrolamento” designadamente “arm-chair”, “zig-zag” e “quiral” para todas as outras formações que não as duas anteriores. [3, 4, 8]

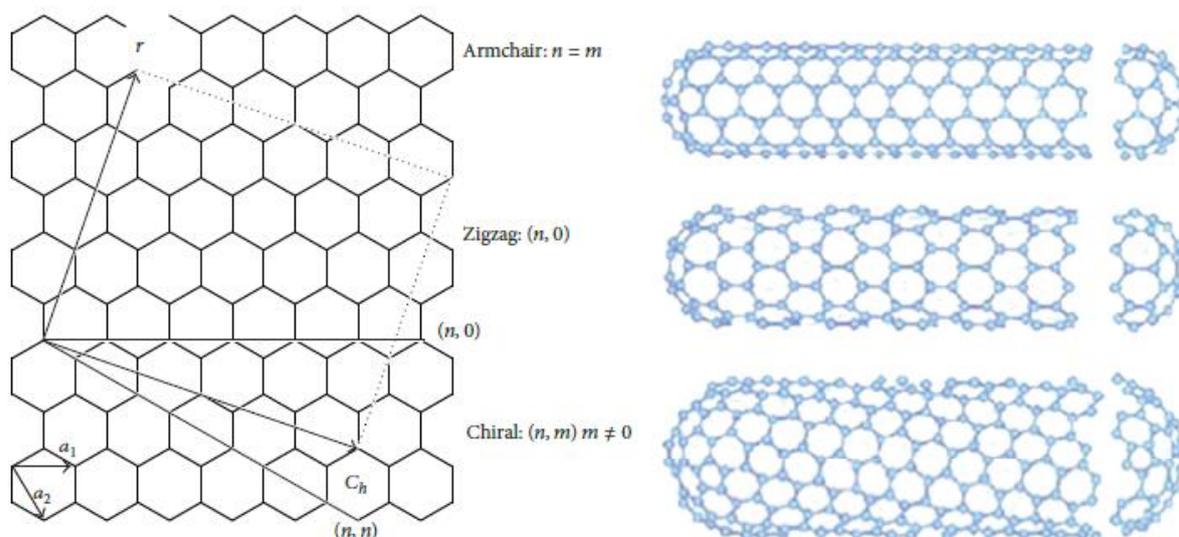


Ilustração 2- Tipos de configuração eletrónica possíveis nos nanotubos de carbono "arm-chair", "zig-zag" e "quiral"[8]

3. Nanotubos de Carbono e Sistema Biológico

A fraca interação entre os nanotubos de carbono e qualquer matriz que o rodeia deve-se ao estabelecimento de ligações van der Waals (ligações fracas) com os potenciais candidatos a integrar, o que faz com que os nanotubos de carbono apresentem limitações quando o objetivo é por exemplo o transporte sem perdas de um fármaco. Características como um diâmetro muito pequeno mas, no entanto, uma área de contato enorme faz com que este material tenha sérios problemas de dispersão.

Assim sendo, a adição de moléculas que modificam as propriedades de contato destes nanotubos pode ser uma alternativa com vista a uma maior aplicabilidade em nanomedicina, devido ao facto de se tornarem mais hidrofílicas e aptas a serem ligadas a agentes com interesse nesta área. Quando este fenómeno ocorre, estamos perante os chamados *functionalized carbon nanotubes (f-CNTs)*. [10]

Em termos de reatividade, a estrutura dos nanotubos de carbono pode ser definida por duas partes diferentes, a saber: as paredes de carbono laterais e as pontas do nanotubo. A ponta do nanotubo é considerada mais reativa, podendo a mesma ser aberta ou fechada (dependendo do método utilizado para sintetizar). Por sua vez, as partes laterais dos CNTs são menos reativas, e desta forma grande parte da funcionalização espera-se que ocorra nas pontas, e só depois nas paredes laterais, especialmente onde defeitos tenham ocorrido.[11]

3.1 Funcionalização covalente

A ligação entre os carbonos da camada dos nanotubos de carbono, como referido anteriormente é uma ligação sp^2 , o que os torna extremamente estáveis. A funcionalização neste caso consiste na passagem deste tipo de hibridização para sp^3 , conseguindo dessa forma perda de estabilidade e então possibilidade de, posteriormente, adicionar outros grupos químicos.

Para se quebrar uma ligação estável como a sp^2 é preciso fornecer mais energia do que esta contém, normalmente só se consegue através de reações mais violentas como por

exemplo oxidação com ácidos fortes, oxidantes fortes, cicloadição ou mesmo com o uso de sais de diazônio.

No entanto, este tipo de funcionalização como é mais agressiva, por vezes pode mesmo partir as cadeias de nanotubos fazendo com que estas percam as suas propriedades elétricas e térmicas que devem ser conservadas.[10]

3.2 Funcionalização não covalente

A funcionalização não covalente é uma forma muito menos invasiva, de modificar as propriedades dos nanotubos de carbono, em comparação com a funcionalização covalente em que se utilizam agentes com elevado poder oxidante.

Deste modo o uso de surfactantes e/ou polímeros constitui a principal via de funcionalização deste método. A cadeia aromática com ligações π faz desta a superfície ideal para se proceder à adição de agentes não covalentes, mantendo as propriedades originais, aumentando a solubilidade e diminuindo a toxicidade dos nanotubos de carbono. [12]

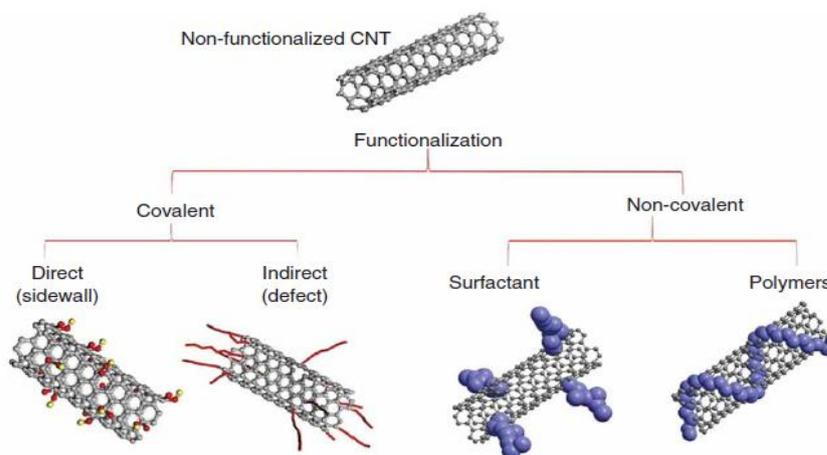


Ilustração 3- Funcionalização covalente e não covalente dos CNTs[13]

3.3 Barreiras biológicas

Para certa molécula chegar ao seu local de ação pelas diversas vias e produzir o efeito desejado é necessário atravessar um conjunto de estruturas biológicas até realmente chegar ao local de ação. Foi demonstrado que, devido a simples interações hidrofóbicas, interação π - π *stacking*, adsorção eletrostática e ligações covalentes na sua estrutura e adsorção dentro do cilindro oco do nanotubo, que estes possuem a capacidade de atravessar membranas celulares, o que lhes permite por exemplo ser utilizados em *drug delivery*. Características como manter as propriedades de um fármaco enquanto é transportado, e aumentar o seu *uptake* intracelular, tornam estas estruturas muito interessantes para baixar dosagens e diminuir a toxicidade na terapêutica. [14, 15]

3.4 Uptake celular

O *uptake* celular dos nanotubos de carbono ainda não se encontra totalmente estudado. No entanto, foi observado por vários autores a sua translocação passiva para o interior das células. A superfície dos nanotubos não tem importância relevante para a sua internalização pelas células devido às suas reduzidas dimensões. Atuam como “nano-agulhas”. Diferentes autores observaram que nanotubos mais curtos em comparação com cadeias mais longas penetram melhor as células e desta forma têm um *uptake* intracelular maior.

No caso dos nanotubos de carbono maiores e com multicamadas observou-se que a endocitose era a forma de transporte celular, muito provavelmente devido ao seu maior tamanho. A visualização de ambos os mecanismos está representada na *ilustração 3*.

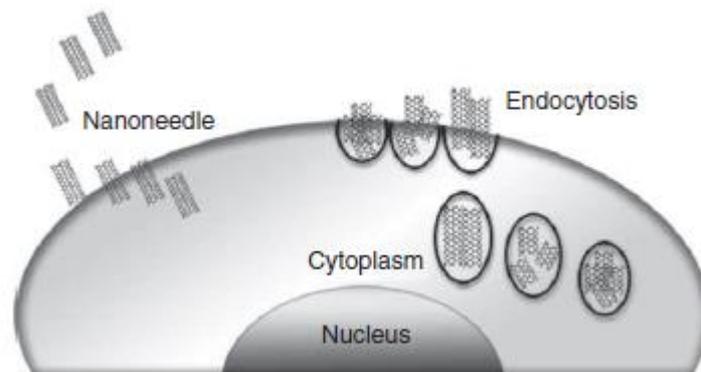


Ilustração 4- Formas de transporte membranar para o interior da célula por parte dos CNTs[16]

Não há, atualmente, consenso a nível da comunidade científica sobre os reais mecanismos de transporte para o interior das células, ou o que os diferencia. No entanto, todos os estudos confirmam um enorme *uptake* por parte das células deste nanomaterial, o que faz com que seja biocompatível com as biomembranas, não as alterando de forma significativa, e portanto, é viável a aplicação dos mesmos.[17]

4. Aplicações terapêuticas dos nanotubos de carbono

A funcionalização dos nanotubos de carbono foi um passo necessário no crescente interesse por estes materiais em medicina. Já se conheciam, anteriormente, os ganhos a nível terapêutico e finalmente demonstrava-se a sua aplicabilidade prática. Hoje, os nanotubos de carbono são muito estudados com o intuito de resolver alguns dos problemas que existem com várias terapêuticas, como por exemplo a baixa solubilidade de algumas moléculas, a baixa biodisponibilidade, entrega de genes, regeneração de tecidos, o *targetting*, etc.

Neste subtópico irei desenvolver as aplicações terapêuticas mais importantes e com mais relevância no uso de nanotubos de carbono.

4.1 *Drug delivery*

Um sistema de *drug delivery* é desenvolvido para aumentar a ação farmacológica e aumentar o perfil terapêutico da molécula farmacológica. Os f-CNTs como têm a capacidade de permear células e têm uma enorme área de contato para apetrechar com novas moléculas, podem oferecer uma boa ferramenta para melhorar algumas das já existentes terapêuticas.

4.1.1 *Pequenas moléculas*

4.1.1.1 *Cancro*

O cancro é uma das doenças mais complexas e onde as terapêuticas são menos efetivas devido às suas características peculiares como crescimento não-controlado, replicação descontrolada e resistência aos fármacos. O cancro, a seguir às doenças cardiovasculares, é a segunda doença que mais mata, só em 2009 morreram aproximadamente 8 milhões de pessoas em todo o mundo.

A cirurgia e a radioterapia são os tratamentos mais efetivos para cancros não metastáticos e locais. No entanto, são ineficientes quando o cancro está espalhado pelo corpo. Neste sentido são adotadas várias terapêuticas como a quimioterapia ou a hormonoterapia de referência, e de acordo com cada caso específico. Muitos dos mecanismos de ação das moléculas anticancerígenas, muitos deles descobertos na década de 40 ou 50, são baseadas na toxicidade da molécula e na posterior destruição da célula cancerígena. Contudo, a falta de *targetting* fazem destas terapêuticas ricas em efeitos adversos por destruírem outros campos celulares ao invés de serem apenas direcionadas para as células cancerígenas.

A terapia direcionada é baseada em alguns fatores que estão também em células ditas normais, mas estão sobreexpressos nas células cancerígenas como por exemplo alguns recetores, fatores de crescimento, cascata de cinases ou moléculas relacionadas com angiogénese e apoptose.

Deste modo, bloqueando ou conseguindo transportar fármacos através destas vias é possível um maior direcionamento do tratamento para aquele tipo de célula, salvaguardando as saudáveis e portanto diminuindo os efeitos tóxicos destes tratamentos.[18]

São exemplos de moléculas pequenas para o tratamento do cancro a Cisplatina, a Doxorubicina, o Taxano, o Metotrexato, a Gemcitabina e outras moléculas como a epirrubicina. (ANEXOS I, II, III, IV e V)

Apesar de ainda não existirem casos clínicos em humanos com o uso de *f*-CNTs, por razões que serão explicadas mais à frente, existem diversos casos de sucesso referentes à aplicação de *f*-CNTs para *drug delivery* em cancro *in vivo* de animais, é o caso dos estudos conduzidos por Bhirde, et al. [19] onde se utiliza Cisplatina, um agente citotóxico de primeira linha que é conjugado com SWNCTs na parede lateral dos CNTs e utilizam o factor EGF (*epidermal growth factor*) como agente direcionador para as células tumorais. Bhirde, et al. conclui que as células tumorais que sobreexpressavam o factor EGFR (*epidermal growth factor receptor*) tinham um uptake de cisplatina maior, reduzindo em maior volume o tamanho do tumor de pescoço e cabeça em ratos. Este exemplo é baseado na ligação anticorpo-antígeno e a afinidade que eles têm um para o outro fazendo com que a ligação seja muito específica e que o alvo sejam apenas as células com esse tipo de recetor.[20]

Um dos mecanismos explicativos da resistência à quimioterapia por parte das células tumorais é sem dúvida a presença em excesso da glicoproteína-p, uma proteína transmembranar dependente de ATP, que permite o transporte de moléculas do interior para o exterior das células. Uma das características das células tumorais é a sobreexpressão da glicoproteína-p que permite à célula o efluxo de moléculas de fármaco para o exterior da célula. Assim, o efeito terapêutico pretendido fica comprometido porque grande parte das moléculas terapêuticas são transportadas para o exterior das células.

Pela primeira vez Li e a sua equipa sintetizaram um SWCNT que foi funcionalizado com um anticorpo anti glicoproteína-P e que apresentava como fármaco ativo a doxorrubicina.

Após os estudos efetuados, a equipa observou um maior *uptake* por parte das células K562R (células leucémicas multirresistentes) e um conseqüente aumento da eficácia em relação ao simples uso da doxorrubicina. [21]

4.1.2 Proteínas

Estas macromoléculas essenciais para o ser humano são constituídas por longas cadeias de aminoácidos. Funções como replicação de DNA, sinalização celular, enzimas que realizam reações vitais para o ser humano, regulação do ciclo celular, entre outras, fazem destas estruturas entidades indispensáveis para o organismo vivo.[22]

O uso de proteínas em terapêutica, como a eritropoietina, em casos de anemia por falha renal, cancro, DSTs, faz com que a eritropoietina seja de extrema importância. A administração destas moléculas por via oral tem vários problemas. A ação por parte de enzimas sob estes sistemas é uma realidade, associada a uma baixa absorção intestinal devido à sua baixa permeabilidade membranar. O uso de f-CNTs pode assim ser uma das vias para proteger estes peptídeos de serem degradados e devidamente absorvidos a nível intestinal e, posteriormente, serem entregues no alvo terapêutico.

A funcionalização de CNTs por oxidação com biotina e sua posterior complexação com a estreptavidina, devido a uma ligação muito específica, demonstrou ter bastante

estabilidade e poder ser transportado para o interior das células. Contudo, moléculas com peso superior a 80KD demonstraram não sofrer transporte, devido ao seu tamanho. [16, 17]

4.1.3 BHE

A barreira hematoencefálica (BHE) é constituída por epitélio vascular especializado que interage com astrócitos, neurónios e pericitos. Esta barreira formada por estas estruturas garante que ocorra uma filtração das restantes moléculas do sangue do conteúdo do cérebro. O mesmo se passa com moléculas terapêuticas, que para ultrapassarem a BHE e posteriormente terem ação no cérebro têm que sofrer alterações, como por exemplo aumentar a lipofilia da molécula por modificação química. Outro método, é fazer do fármaco um “cavalo de tróia”, que entra mascarado por imunoglobulinas, lipossomas ou mesmo nanopartículas.[23]

Recentemente um grupo de duas investigadoras da King's College London utilizou *f*-CNTs associados à Caspase-3-siRNA e que através de injeção local e sistémica possibilitou o *targetting* através das células da BHE. Há, também, várias referências de outros casos de sucesso para este tipo de terapêutica, no entanto, futuros estudos ao nível da aglomeração, estabilidade e toxicidade serão necessários.[24]

4.2 Gene Delivery

Para integrar o genoma da célula, o gene tem que integrar o núcleo da célula e esse processo além de ser complexo é muito difícil de assegurar as condições necessárias para atingir esse feito. Os sistemas que existem hoje em dia para *gene delivery* são divididos em virais e não virais. Primeiramente foram desenvolvidos os virais, como *retrovírus*, *lentivírus*, *herpes vírus simplex*, *adenovírus* e *vírus de RNA*, cada qual com as suas próprias características e mais ou menos adequados a cada situação. No entanto, o uso destes materiais além de ser extremamente caro, não é 100% seguro, podendo mesmo causar doenças. Para tentar

colmatar estes argumentos, os cientistas de todo o mundo batalham na descoberta de novos vetores não virais, neste caso os CNTs. [25]

Um plasmídeo (pDNA) foi o primeiro ácido nucleico a sofrer transfecção *in vitro* através de nanotubos de carbono. A funcionalização da superfície com grupos amino, glicopolímeros e etilenodiamina são apenas alguns exemplos que permitem a ligação destas estruturas. Apesar de ter sido comprovado *in vitro*, há uma evidência muito limitada de casos de sucesso *in vivo*.

No entanto, outras formas de genes são possíveis de transportar, como por exemplo, siRNA, miRNA, oligonucleotídeos e aptâmeros de DNA ou RNA.

A transfecção destes genes para a célula foi demonstrada em vários estudos, quase todos *in vitro*, demonstram boa atividade celular, no entanto, a eficácia *in vivo*, devido a outro nível de complexidade, tem sido posta em causa em vários estudos. Entre estes possíveis tratamentos o que mais se tem destacado é a transfecção de siRNA através de CNTs. A demonstração dos resultados ao nível do tratamento do cancro tanto *in vitro* quanto *in vivo* fazem da transfecção de siRNA através de CNTs o mais promissor e mais apostado neste campo de pesquisa.[26]

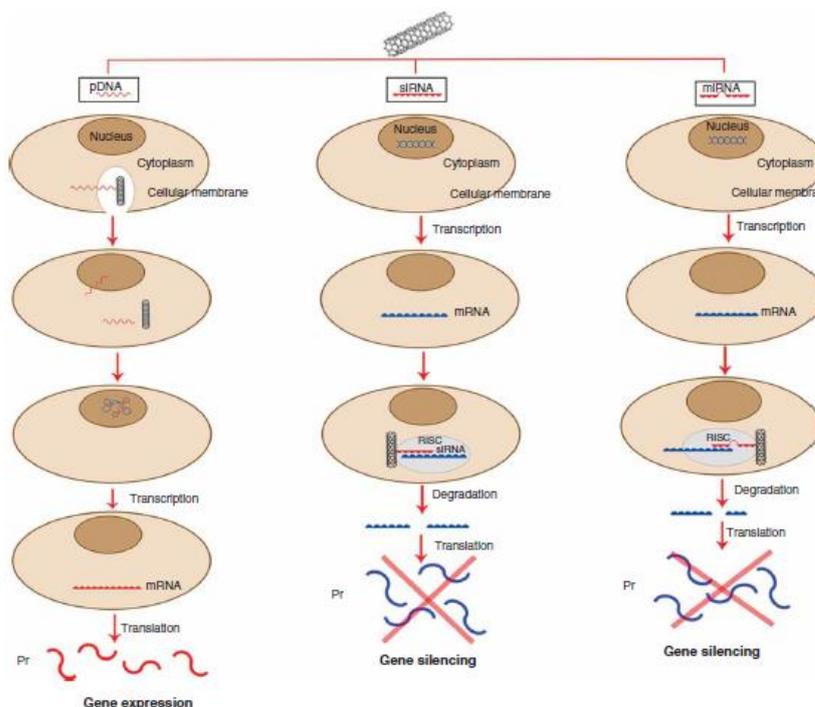


Ilustração 5- Expressão de genes por pDNA e silenciamento de genes por siRNA e miRNA acoplados a CNTs [16]

A *ilustração 5* representa a expressão de genes quando um plasmídeo é integrado no genoma de uma célula, assim como a inibição da tradução, devido ao complexo RISC que se forma tanto com siRNA ou miRNA.[27]

5. Nanotoxicidade

O desenvolvimento da engenharia e da ciência levou à descoberta e à síntese de novos materiais até então desconhecidos. Os materiais em escala “nano”, devido ao seu reduzido tamanho, comportam-se diferentemente, quer física, quer quimicamente, das escalas maiores, e portanto, têm diferentes interações com os sistemas biológicos. A necessidade de compreender esta nova classe ao nível de segurança e saúde na utilização dos mesmos, levou a que em 2004 se criasse um novo subgrupo dentro da Toxicologia, a Nanotoxicologia.[7]

Estes materiais têm sido maioritariamente utilizados pela indústria em aplicação eletrónica, os principais esforços em termos de toxicidade têm sido direcionados para perceber a toxicidade pela via respiratória e por via dérmica, porque são as duas vias que na produção de CNTs estão mais expostas e, por conseguinte, a probabilidade de entrar em contato com os humanos é maior. A similaridade estrutural fibrosa entre os CNTs e os asbestos foi desde o início o elo de ligação à sua possível toxicidade, tendo em consideração que a exposição aos asbestos está diretamente relacionada com carcinoma broncogénico, fibrose pleural e mesotelioma.[28]

Sabe-se que os nanotubos de carbono apresentam toxicidade diferente diferindo no tamanho, largura, superfície química (tipo de funcionalização) e também devido à bioacumulação no organismo vivo. Todas estas características fazem com que SWCNTs e MWCNTs tenham distintos perfis toxicológicos. Fatores como o nível de purificação, vestígios de catalisadores e carga exterior dos nanotubos de carbono também fazem com que estes tenham perfis toxicológicos diferentes, sob células diferentes, o que faz com que os CNTs, funcionalizados ou não, tenham muitos detalhes que devem ser avaliados para entender melhor os seus perfis. Estas razões fazem com que a atividade científica neste campo nem sempre seja consensual, e que os resultados variem muito de método para método, dificultando a aplicação e a criação de critérios genéricos a esta população de materiais.[29]

Atualmente, os mecanismos de toxicidade aceites para os CNTs quando dentro do organismo vivo podem ser divididos em stress oxidativo, resposta inflamatória, transformação maligna, mutações/destruição no DNA (genotoxicidade), formação de granuloma ou fibrose intersticial.[30]

5.1 Stress oxidativo como mecanismo explicativo

O “stress oxidativo” que é caracterizado por uma falha no balanço entre ROS e espécies anti-oxidantes, que por sua vez danifica a célula. Este desbalanço pode causar danos a nível do DNA, proteínas, lípidos e até mesmo causar a morte celular se o dano for demasiado grande e não for possível aos mecanismos celulares repararem a célula.

Os mecanismos pelos quais os CNTs podem produzir ROS ainda estão em estudo, no entanto, foi demonstrado que devido ao seu tamanho ($>15 \mu\text{m}$) os macrófagos têm uma fagocitose fracassada, não conseguindo “internalizar” os CNTs e acabam por libertar o conteúdo dos seus fagossomas, rico em propriedades oxidativas que provocam inflamação local e necrose.

Tanto os SWCNTs como os MWCNTs demonstraram induzir danos nas mitocôndrias celulares do pulmão, e dessa forma levar à produção de ROS, e ao serem fagocitados por neutrófilos a libertação de espécies NOSs (enzimas membranares) podem gerar aniões superóxido e radicais hidroxilo que irão danificar tanto membranas como as restantes estruturas celulares.[31]

5.2 Outros mecanismos

Outros mecanismos como a inflamação, proliferação, genotoxicidade e resposta fibroblástica são também utilizados como possíveis explicadores da nanotoxicidade dos nanotubos de carbono, porém, muitas vezes associados ao “stress oxidativo”, daí esta ser a teoria mais aceite. [31]

6. Conclusão

Os avanços constantes da tecnologia permitem ao Ser Humano adquirir cada vez mais conhecimento teórico e prático, só assim se consegue uma evolução dos mais variados temas. No entanto, mais conhecimento gera sempre novas questões que necessitam de explicação. Este exemplo de evolução/necessidade de novas respostas é a analogia perfeita no caso dos nanotubos de carbono.

Os CNTs são estruturas relativamente recentes que demonstram poder ser utilizadas em diversos campos, nomeadamente o da farmácia e medicina. Vários autores defendem que os nanotubos de carbono, devido às suas características tão peculiares têm enormes aplicações como em *drug delivery systems* para doenças como o cancro, a terapia génica ou a administração por via oral de moléculas até então não viáveis desta forma, e assim melhorar perfis farmacológicos de várias moléculas. O nível de complexidade destes sistemas faz deles difíceis de serem estudados tanto *in vitro* como *in vivo*, onde os níveis de complexidade são maiores. Assim, é necessária mais pesquisa científica para estabelecer toda a farmacocinética e farmacodinâmica dos CNTs e f-CNTs.

Ao mesmo tempo, os CNTs apresentam o lado menos positivo, a nanotoxicidade destes sistemas é uma realidade que prejudica a sua aplicabilidade prática em humanos. Já foi diminuída através da funcionalização dos mesmos, sendo no entanto necessário encontrar novas formas para responder a algumas das questões que a comunidade científica ainda batalha por desmistificar.

Desta forma, o futuro destas estruturas a nível de DDS e a sua aplicabilidade em humanos dependem de conhecimento que ainda não possuímos, mas que sem dúvida a comunidade científica está interessada em saber e desenvolver.

7. Anexos

7.1 Anexo I

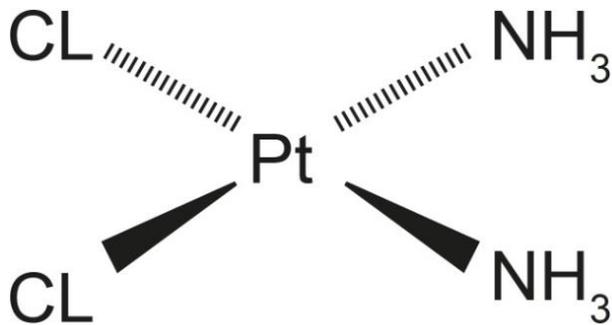


Ilustração 6- Estrutura química da Cisplatina [32]

7.2 Anexo II

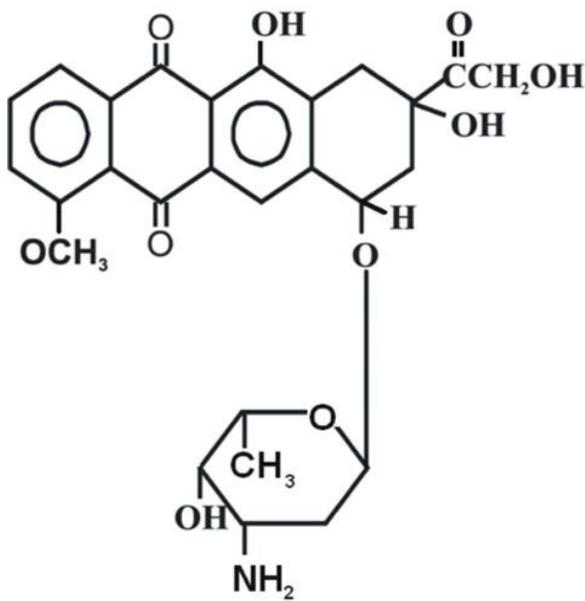


Ilustração 7- Estrutura química da Doxorubicina [33]

7.3 Anexo III

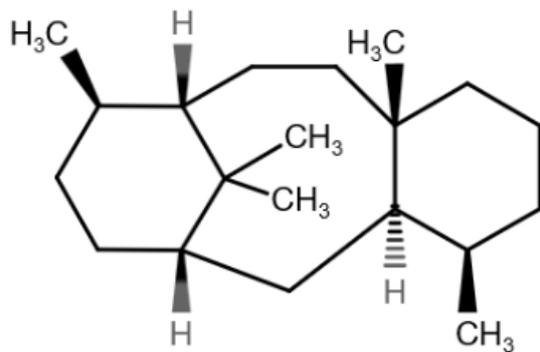


Ilustração 8- Estrutura química do Taxano [34]

7.4 Anexo IV

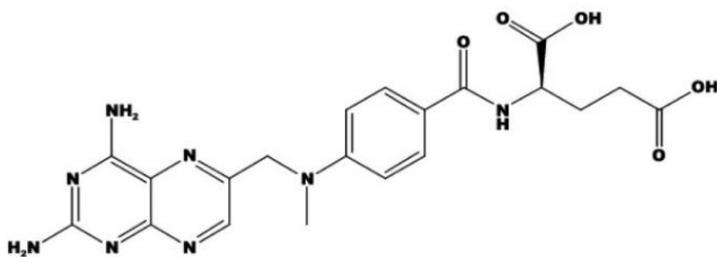


Ilustração 9- Estrutura química do Metotrexato [35]

7.5 Anexo V

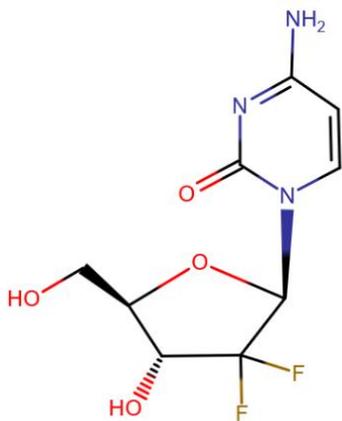


Ilustração 10- Estrutura química da Gemcitabina [36]

7.6 Anexo VI

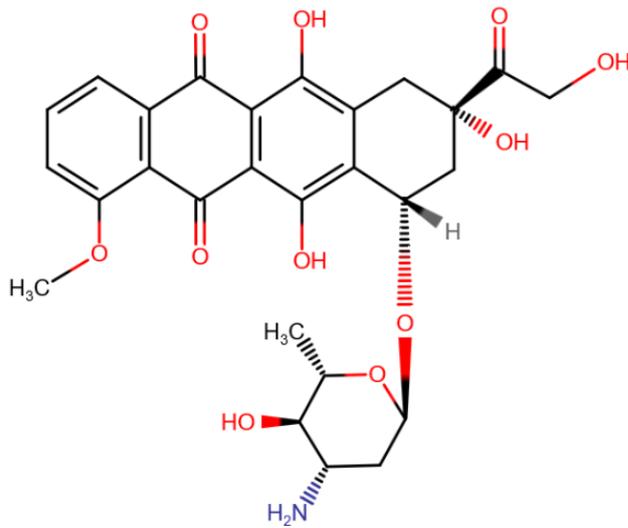


Ilustração 11- Estrutura química da Epirubicina [37]

8. Bibliografia

1. Iijima, S., *Helical microtubules of graphitic carbon*. Nature, 1991. **254**: p. 56 - 58.
2. Nemes, L., *A Review of: "Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes, Dresselhaus M.S. Dresselhaus, G. Eklund, P.C. Laszlo Nemes, Academic Press, Inc., New York, 1996"*. Fullerene Science and Technology, 1997. **5**(3): p. 627-628.
3. Dresselhaus, M.S., G. Dresselhaus, and P. Avouris, *Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties and Applications*, ed. Springer. Vol. 80. 2001. 447.
4. Dresselhaus, M.S., et al., *Electronic, thermal and mechanical properties of carbon nanotubes*. Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2004. **362**(1823): p. 2065-98.
5. Ilbasmis-Tamer, S., et al., *Carbon nanotubes to deliver drug molecules*. J Biomed Nanotechnol, 2010. **6**(1): p. 20-7.
6. Prakash, S. and A.G. Kulamarva, *Recent advances in drug delivery: potential and limitations of carbon nanotubes*. Recent Pat Drug Deliv Formul, 2007. **1**(3): p. 214-21.
7. Maynard, A.D., D.B. Warheit, and M.A. Philbert, *The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond*. Toxicol Sci, 2011. **120 Suppl 1**: p. S109-29.
8. Saifuddin, N., A.Z. Raziah, and A.R. Junizah, *Carbon Nanotubes: A Review on Structure and Their Interaction with Proteins*. Journal of Chemistry, 2013. **2013**: p. 1-18.
9. Jorio, A., G. Dresselhaus, and M.S.D. (Eds.), *Carbon Nanotubes Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications*, ed. Springer. Vol. 110. 2008: Springer.
10. Jeon, I.-Y., et al., *Functionalization of Carbon Nanotubes*. Carbon Nanotubes - Polymer Nanocomposites. 2011.
11. Prato, M., K. Kostarelos, and A. Bianco, *Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery*. Acc Chem Res, 2008. **41**(1): p. 60-8.
12. Sahoo, N.G., et al., *Specific Functionalization of Carbon Nanotubes for Advanced Polymer Nanocomposites*, ed. W.B.J.W. Sons). Vol. 19. 2009.
13. Karimi, M., et al., *Carbon nanotubes part I: preparation of a novel and versatile drug-delivery vehicle*. Expert Opin Drug Deliv, 2015. **12**(7): p. 1071-87.
14. Jiang, L., et al., *Adsorption behavior of pazufloxacin mesilate on amino-functionalized carbon nanotubes*. J Nanosci Nanotechnol, 2012. **12**(9): p. 7271-9.
15. Chen, Z., et al., *Adsorption behavior of epirubicin hydrochloride on carboxylated carbon nanotubes*. Int J Pharm, 2011. **405**(1-2): p. 153-61.

16. Karimi, M., et al., *Carbon nanotubes part II: a remarkable carrier for drug and gene delivery*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2015. **12**(7): p. 1089-105.
17. Kumar, R., et al., *Carbon nanotubes: a potential concept for drug delivery applications*. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2014. **8**(1): p. 12-26.
18. Perez-Herrero, E. and A. Fernandez-Medarde, *Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015. **93**: p. 52-79.
19. Bhirde, A.A., et al., *Distribution and clearance of PEG-single-walled carbon nanotube cancer drug delivery vehicles in mice*. *Nanomedicine (Lond)*, 2010. **5**(10): p. 1535-46.
20. Bhirde, A.A., et al., *Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube-based drug delivery*. *ACS Nano*, 2009. **3**(2): p. 307-16.
21. Li, R., et al., *P-glycoprotein antibody functionalized carbon nanotube overcomes the multidrug resistance of human leukemia cells*. *ACS Nano*, 2010. **4**(3): p. 1399-408.
22. Han, W., X. Li, and X. Fu, *The macro domain protein family: structure, functions, and their potential therapeutic implications*. *Mutat Res*, 2011. **727**(3): p. 86-103.
23. Tajes, M., et al., *The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it*. *Mol Membr Biol*, 2014. **31**(5): p. 152-67.
24. Wang, J.T. and K.T. Al-Jamal, *Functionalized carbon nanotubes: revolution in brain delivery*. *Nanomedicine (Lond)*, 2015.
25. Atkinson, H. and R. Chalmers, *Delivering the goods: viral and non-viral gene therapy systems and the inherent limits on cargo DNA and internal sequences*. *Genetica*, 2010. **138**(5): p. 485-98.
26. Bates, K. and K. Kostarelos, *Carbon nanotubes as vectors for gene therapy: past achievements, present challenges and future goals*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013. **65**(15): p. 2023-33.
27. Kobayashi, H. and Y. Tomari, *RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2015.
28. Donaldson, K., et al., *Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos - similarities and differences*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013. **65**(15): p. 2078-86.
29. Firme, C.P., 3rd and P.R. Bandaru, *Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems*. *Nanomedicine*, 2010. **6**(2): p. 245-56.
30. Liu, Y., et al., *Understanding the toxicity of carbon nanotubes*. *Acc Chem Res*, 2013. **46**(3): p. 702-13.
31. Dong, J. and Q. Ma, *Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity*. *Nanotoxicology*, 2015. **9**: p. 658-76.

32. Sathish Kumar, K. and V. Jaikumar, *Gold and Iron Oxide Nanoparticle-Based Ethylcellulose Nanocapsules for Cisplatin Drug Delivery*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR, 2011. **10**(3): p. 415-424.
33. Chouhan, R. and A.K. Bajpai, *Real time in vitro studies of doxorubicin release from PHEMA nanoparticles*. Journal of Nanobiotechnology, 2009. **7**: p. 5-5.
34. U.S. National Library of Medicine-TOXNET. "Taxane". [Acedido a 10 de Setembro de 2015].Disponível na Internet:: WWW
<<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/structure/viewer/1605-68-1>>
35. Jouyban, A., et al., *Determination of Methotrexate in Biological Fluids and a Parenteral Injection Using Terbium-Sensitized Method*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR, 2011. **10**(4): p. 695-704.
36. U.S. National Library of Medicine-TOXNET. "Gemcitabine". [Acedido a 10 de Setembro de 2015].Disponível na Internet:: WWW
<<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/structure/viewer/95058-81-4>>
37. U.S. National Library of Medicine-TOXNET. "Epirubicin". [Acedido a 10 de Setembro de 2015].Disponível na Internet: WWW
<<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/structure/viewer/56420-45-2>>