



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

Janice Vasconcelos Oliveira

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS CONTENDO
COMPOSTO 2-FENIL-4-AMINO-6-*p*-FLUOR-FENIL-5-
CARBONITRILA-PIRIMIDINA E AVALIAÇÃO DE SEU
POTENCIAL ANTITUMORAL**

Vitória de Santo Antão

2013

Janice Vasconcelos Oliveira

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS CONTENDO
COMPOSTO 2-FENIL-4-AMINO-6-*p*-FLUOR-FENIL-5-
CARBONITRILA-PIRIMIDINA E AVALIAÇÃO DE SEU
POTENCIAL ANTITUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Emerson Peter da Silva Falcão

Coorientador (a): Prof^a. Dr^a. Noemia Pereira da Silva Santos

Vitória de Santo Antão

2013

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Lúcia Feliciano dos Santos, CRB4: 1650

O48d Oliveira, Janice Vasconcelos.

Desenvolvimento de lipossomas contendo composto 2-fenil-4-amino-6-p-fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina e avaliação de seu potencial antitumoral. / Janice Vasconcelos Oliveira. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2013.
xxiv, 59 folhas: il.; graf., tab.

Orientador: Emerson Peter da Silva Falcão.

Co-orientador: Noemia Pereira da Silva Santos.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. Neoplasias. 3. lipossomas. I. Falcão, Emerson Peter da Silva (Orientador). II. Santos, Noemia Pereira da Silva (Co-orientador). III. Título.

620.5 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-025/2013

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

JANICE VASCONCELOS OLIVEIRA

Banca examinadora:

Prof.^o. Dr.^o. Cristiano Aparecido Chagas

Prof.^a. Dr.^a. Mariane Cabujá de Britto Lira

Prof.^o Dr.^o. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior

Dedico aos meus pais, João e Maria das Graças Oliveira, fonte de incondicional apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido a vida e a acumulado de bênçãos e graças. Por ser meu refúgio, amparo e fortaleza em cada passo dado, em cada conquista alcançada. Por nunca me abandonar nos momentos mais difíceis, dando-me a força necessária para prosseguir.

Aos meus pais, João e Graça Oliveira, irmão Jonathas, familiares e amigos, pela compreensão nos momentos de ausência, pela paciência nos dias difíceis, pelo estímulo nos momentos de cansaço e pelo apoio incondicional nesta jornada com tantas barreiras.

Ao meu noivo, Mateus Silva, por me acompanhar, me apoiar, por oferecer ajuda e doar seu ombro nos momentos de angústia, e acima de tudo por toda a compreensão.

Ao Prof.^o Dr.^o. Emerson Peter da Silva Falcão, pela confiança, pela constante presença, orientação e paciência. Por todo ensino que não se limita apenas ao campo da ciência, que foi intenso, mas também em todos os aspectos que ajudam no amadurecimento pessoal e formação na vida profissional.

À Prof.^a. Dr.^a. Noemia Pereira da Silva Santos, minha co-orientadora, pelos ensinamentos e pela oportunidade de adquirir conhecimentos no mundo científico.

À Prof.^a. Dr.^a. Mariane Cabujá de Britto Lira e ao Prof.^o Dr.^o. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior por toda a colaboração e consequente transmissão de valiosos ensinamentos em suas respectivas áreas de conhecimento.

À Audenes de Oliveira Melo, Soraia Lins, Thyago David dos Santos Oliveira e Cybelle Alves Tavares, mestrandos, por toda contribuição e participação nos momentos de descobertas, conquistas e aprendizados, por toda dedicação, amizade, apoio e a enorme colaboração prestada a este trabalho.

À Adalva, secretária do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente (PPGSHMA), por toda ajuda e orientação.

A todos os amigos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente (PPGSHMA), professores e colegas de turma, pelos momentos de companheirismo, estudo e descontração dentro e fora da sala de aula.

Aos estudantes de iniciação científica, Maria Aparecida Lira, Marllyn Marques, Maria Clara Santana, Maria Carolina Lyra e Amanda Cabral, pela ajuda na realização dos experimentos e amizade.

A todos do Grupo de pesquisa em novos fármacos e produtos naturais bioativos, pelos momentos de partilha e por todo estímulo e força. Tudo foi essencial nesta caminhada.

A todos do grupo de Sistema de Liberação Controlada (SLC), por todo auxílio.

Aos técnicos de Laboratório e funcionários do Centro Acadêmico da Vitória (CAV-UFPE), por toda ajuda, compreensão e disposição.

A CAPES, pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa.

A todos os outros colegas e amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2 Objetivos Específicos	3
1.3 Revisão da Literatura	4
1.3.1 Câncer	4
1.3.2 Nanotecnologia	7
1.3.3 Sistemas de Liberação Controlada - SLC	8
1.3.4 Lipossomas	10
1.3.4.1 Aspectos gerais	11
1.3.4.2 Composição	12
1.3.4.3 Classificação	12
1.3.4.4 Métodos de preparação	15
1.3.4.5 Caracterização	15
1.3.4.6 Mecanismos de interação dos lipossomas com as células	17
1.3.4.7 Aplicação dos lipossomas na terapia antitumoral	17
1.3.5 Compostos heterocíclicos	18
1.3.6 Pirimidinas	18
1.3.6.1 Síntese de compostos pirimidínicos	19
1.3.6.2 Atividade antitumoral dos compostos pirimidínicos	19
CAPÍTULO 2	22
Desenvolvimento de lipossomas contendo composto 2-fenil-4-amino-6-<i>p</i>-fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina e avaliação de seu potencial	

antitumoral.	
2.1 Resumo	23
2.2 Abstract	24
2.3 Introdução	25
2.4 Material e Métodos	26
2.4.1 Materiais	26
2.4.2 Síntese dos compostos pirimidínicos	26
2.4.3 Preparação de lipossomas contendo composto 2-fenil-4-amino-6- <i>p</i> -fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina	27
2.4.4 Caracterização dos lipossomas contendo composto 2-fenil-4-amino-6- <i>p</i> -fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina	27
2.4.5 Cultura de células	29
2.4.6 Determinação da viabilidade celular	29
2.4.7 Ensaio antitumoral <i>in vivo</i>	30
2.4.7.1 Animais experimentais	30
2.4.7.2 Atividade antitumoral do composto 2-fenil-4-amino-6- <i>p</i> -fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina em sua forma livre e encapsulada	31
2.4.8 Determinação do Índice Mitótico (IM)	32
2.4.9 Análise estatística	32
2.5 Resultados e Discussão	33
2.5.1 Preparação e caracterização dos lipossomas	33
2.5.2 Estudo da Viabilidade celular	34
2.5.3 Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	36
2.5.4 Determinação do Índice Mitótico (IM)	37
2.6 Conclusões	38
2.7 Agradecimentos	39
2.8 Referências Bibliográficas	40
2.9 Anexos	44
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
3 ANEXOS	xvii
3.1 Normas do Periódico ao qual o trabalho será submetido	xvii

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Ação de agentes cancerígenos sobre células normais.	5
Figura 1.2	Mecanismos de ação da quimioterapia.	6
Figura 1.3	Representação esquemática da escala nanométrica.	8
Figura 1.4	Farmacocinética comparativa de formas farmacêuticas convencionais e de liberação controlada.	9
Figura 1.5	Ilustração de alguns tipos de nanocarreadores.	10
Figura 1.6	Representação esquemática dos lipossomas.	11
Figura 1.7	Classificação dos lipossomas quanto ao número de lamelas	13
Figura 1.8	Classificação dos lipossomas quanto à constituição. A- Lipossomas convencionais. B- Lipossomas sítio-específicos. C- Lipossomas furtivos. D- Lipossomas direcionados de longa circulação. E- Lipossomas polimórficos: 1- lipossoma sensível ao pH; 2- lipossoma catiônico.	13
Figura 1.9	Etapas comuns a todos os métodos de preparação de lipossomas.	15
Figura 1.10	Anel pirimidínico.	19
Figura 1.11	Estrutura química do 5-Fluorouracil e anel pirimidínico.	20
Figura 2.1	Esquema reacional. 1- Aldeído aromático. 2- Malonitrila. 3- Bisnitrilas substituídas. 4- Amidina.	44
Figura 2.2	Viabilidade celular de <i>HeLa</i> frente ao composto livre e encapsulado e 5-Fluorouracil nas concentrações de 2,5; 5; 10 e 20 µg/ ml.	47
Figura 2.3	Peso dos tumores dos grupos tratados com solução salina, 20 mg/ Kg de peso corpóreo de 5-Fluorouracil e 15 mg/ Kg de peso corporal do composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído livre e encapsulado.	48
Figura 2.4	Avaliação da inibição tumoral dos grupos tratados com 5-Fluorouracil (20 mg/ Kg), 4-amino-pirimidínico-bissubstituído livre (15 mg/ Kg de peso corporal) e lipossomas contendo 4-amino-pirimidínico-bissubstituído (15 mg/ Kg de peso corporal).	49
Figura 2.5	Efeito da administração do 5-Fluorouracil (20 mg/ Kg), 4-amino-pirimidínico-bissubstituído livre (15 mg/ Kg de peso corporal) e lipossomas contendo 4-amino-pirimidínico-bissubstituído (15 mg/ Kg de peso corporal) sobre o número de mitoses. Os valores foram normalizados para o controle (100%). * aponta diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Estudo de estabilidade acelerada dos lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído. Ø: Tamanho de partícula; IPD: Índice de polidispersão; pH: potencial Hidrogênionico; Análise micro e macroscópica: homogeneidade, cor, viscosidade, deposição de materiais, formação de grumos, cremagem, floculação, coalescência e separação de fases.	45
Tabela 2.2	Estudo da estabilidade em tempos pré-determinados de lipossomas contendo 4-amino-pirimidínico-bissubstituído durante 30 dias. Ø: Tamanho de partícula; IPD: Índice de polidispersão; pH: Potencial hidrogênionico.	46

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
±	Mais/ menos
+	Mais
-	Menos
x	Vezes
°C	Graus Celsius
Ø	Diâmetro
<	Menor que
>	Maior que
μ	Letra grega mi
α	Letra grega alfa
®	Marca registrada

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
4-amino- pirimidínico- bissubstituído	composto 2-fenil-4-amino-6- <i>p</i> -fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina
5-Fu	5-Fluorouracil
AKT	Inibidores da Proteína Quinase B
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDK	Inibidores de Quinase Dependentes de Ciclina
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CHO	Colesterol
CI ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular
CO ₂	Dióxido de Carbono
<i>Cra</i>	<i>Cratylia mollis</i>
D.P.	Desvio padrão
DL ₅₀	Dose letal que pode causar a morte de 50% de uma dada população de organismos
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPC	Dioleoilfosfatidilcolina
DOPE	Dioleoilfosfatidiletanolamina
DSPE-PEG ₂₀₀₀	Diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao Polietilenoglicol 2000
EE	Eficiência de Encapsulação
g	Gramma
h	Hora
HE	Hematoxilina-Eosina
IM	Índice Mitótico
I.P.	Intraperitoneal

IPD	Índice de Polidispersão
Kg	Quilograma
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
Lipo p-F	Lipossomas contendo composto 2-fenil-4-amino-6- <i>p</i> -fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina
LUV	Lipossomas Unilamelares Grandes
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
MLV	Vesículas Multilamelares
mM	Milimolar
MTT	3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
mV	Milivolts
NaCl	Cloreto de Sódio
NCI	National Cancer Institute
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
p/ v	Percentual peso volume
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Fosfatidilcolina de soja
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenoglicol
<i>p</i> -F livre	composto 2-fenil-4-amino-6- <i>p</i> -fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina na forma livre
ph	Potencial Hidrogeniônico
PI – 3	Inibidores da Fosfatidilinositol-3-quinase
r.p.m.	Rotações por minuto
REUNI	Plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais
RMN - H	Ressonância Magnética de Protóns
RNA	Ácido ribonucleico
S.C.	Subcutânea
SA	Estearilamina
SLC	Sistema de Liberação Controlada
SPSS	Statistical Package of the Social Sciences
SUV	Vesículas Unilamelares Pequenas

T _c	Temperatura de transição de fase
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UI	Unidades Internacionais
v/ v	Percentual volume volume
α – TNF	Fator de Necrose Tumoral

RESUMO

O aumento na incidência de neoplasias malignas no mundo tem estimulado pesquisas que visam desenvolver novos fármacos e alternativas terapêuticas que possibilitem debelar o problema. Neste sentido a tecnologia de liberação controlada de fármacos apresenta-se como ferramenta de grande relevância destacando-se os lipossomas. Compostos contendo o núcleo pirimidínico demonstram notável propriedade antineoplásica, descrita na literatura. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído, avaliar sua citotoxicidade e investigar a ação antitumoral *in vivo*, frente o Sarcoma 180, do fármaco isolado e encapsulado. Os lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e submetidos a ensaios de estabilidade acelerada e em tempos pré-determinados. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando o método colorimétrico MTT. Os experimentos *in vivo* foram submetidos, aprovados e devidamente protocolados junto à Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UFPE. Os testes de atividade antitumoral seguiram a metodologia de Santos e colaboradores (2005). Os cortes histológicos do tumor foram corados pela Técnica Hematoxilina-Eosina (HE). Após o processo de preparação, as formulações de lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído demonstraram-se homogêneas. O diâmetro médio e o índice de polidispersão das vesículas foram $298,75 \pm 30,37$ nm e $0,37 \pm 0,01$, respectivamente. A eficiência de encapsulação foi de $82,93 \pm 0,04\%$. Observou-se redução da viabilidade celular diante dos compostos testados. O teste *in vivo* utilizando lipossomas contendo *p*-F-pirimidina e sua forma livre demonstrou uma inibição tumoral de $66,47 \pm 26,8\%$ e $50,46 \pm 16,24\%$, respectivamente. A determinação do índice mitótico revelou redução do número de mitoses dos grupos tratados. Os resultados demonstram que a incorporação de *p*-F-pirimidina em lipossomas, potencializou seu efeito citotóxico e antitumoral, viabilizando, portanto, seu uso terapêutico.

Palavras-chave: neoplasias; 4-amino-pirimidina; nanotecnologia; lipossomas; viabilidade celular.

ABSTRACT

The increasing incidence of neoplastic diseases in the world has stimulated research aimed at developing new drugs and therapeutic alternatives that allow overcome the problem, taking as an alternative technology for controlled release of drugs, especially liposomes. Compounds containing a pyrimidine core demonstrate remarkable property antineoplastic described. The aim of this study was to develop and characterize liposomes containing compound 4-amino-pyrimidine-bissubstituido, assess their cytotoxicity and to investigate the antitumor action *in vivo*, forward Sarcoma 180, the drug alone and encapsulated. Liposomes containing compound 4-amino-pyrimidine-bissubstituido were prepared by hydration of the lipid film and tested for accelerated stability and predetermined times. Cytotoxicity assays were performed using the MTT method. The *in vivo* antitumor activity was performed according to the protocol of the Ethics Committee on Animal Experimentation (EAEC) UFPE. The histological sections of the tumor were stained with hematoxylin-eosin (HE) technique. After the preparation, formulations of liposomes containing compound 4-amino-pyrimidine-bissubstituido proved to be homogeneous. The average diameter and the polydispersity of the vesicles were 298.75 ± 30.37 and 0.37 ± 0.01 nm, respectively. The encapsulation efficiency was $82.93 \pm 0.04\%$. Observed reduction in cell viability before the compounds tested. The *in vivo* test using liposomes containing *p*-F-pyrimidine and free form showed an inhibition of tumor $66.47 \pm 26.8\%$ and $50.46 \pm 16.24\%$, respectively. The determination of the mitotic index was a reduction in the number of mitoses treated groups. The results demonstrate that the incorporation *p*-F-pyrimidine into liposomes potentiated their cytotoxic and antitumour, allowing therefore its therapeutic use.

Keywords: cancer; 4-amino-pyrimidine; nanotechnology; liposomes; cell viability.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

O câncer é um grupo de doenças caracterizado por um crescimento celular descontrolado, invasão tecidual e metástases (DASHORA et al, 2011). É uma das principais causas de morte no mundo e foi responsável por cerca de 7,9 milhões de mortes em 2007, correspondendo a 38% e 62% em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, respectivamente (GLOBOCAN, 2008). Estima-se que em 2030, serão 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 são válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer (INCA, 2011). Tal doença tem aumentado de maneira considerável em todo mundo, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade (GARRIDO et al, 2003), configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005).

Este quadro, e o fato da atual terapia com fármacos convencionais ser limitada devido à impossibilidade do aumento da sua concentração no sangue, a baixa solubilidade, aos efeitos colaterais inerentes às terapias com doses elevadas (BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007), tem estimulado pesquisas que visam desenvolver novos fármacos e alternativas terapêuticas que possibilitem enfrentar o problema. Dessa forma, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos tem sido alvo de novas pesquisas.

Estudados por mais de quatro décadas, entre as várias formas de sistema de liberação controlada de fármacos, os lipossomas são vesículas nanométricas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolipídios, que apresentam capacidade de incorporar uma diversidade de compostos, sejam eles hidrofílicos ou hidrofóbicos (ALLEN; HANSEN; LOPES DE MENEZES, 1995; VOINEA; SIMIONESCU, 2002).

Os lipossomas podem ser utilizados como carreadores de fármacos antineoplásicos, para alcançar a acumulação seletiva do fármaco no tecido, onde se encontra o tumor ou nas células tumorais. Os lipossomas têm sido carreadores aceitos clinicamente no tratamento do

câncer, visto que eles alteram a farmacocinética e biodistribuição dos fármacos antineoplásicos (MAMOT et al, 2003).

Compostos heterocíclicos vêm apresentando grande importância devido à sua aplicabilidade nos mais diversos campos da química moderna e devido à enorme variedade e complexidade estrutural (PIZZUTI, 2005), sendo fonte de diversos e extensos estudos. Dentre os sistemas heterocíclicos destacam-se as pirimidinas e seus derivados devido a suas propriedades farmacológicas e biológicas. Os compostos contendo pirimidina apresentam atividade antifúngica (ANDERSON et al, 1945; MANGALAGIU et al, 2001), antiviral (NASR; GINEINAH, 2002), antimicrobiana (CHOWDHURY, MATIN, ANWAR, 1997; KANTH et al, 2006; BHUIYAN et al, 2006), antitumoral (BARALDI et al, 2002; FALCAO et al, 2006) e anti-inflamatória (SONDHI et al, 2001; FALCAO et al, 2006), estando presente na estrutura química de vários produtos farmacêuticos, como medicamentos para hipertensão e ansiolíticos, bem como em outros agentes antimicrobianos e antitumorais (LUNA et al, 2011).

Considerando a aplicabilidade dos derivados da pirimidina e suas diversas propriedades farmacológicas, com enfoque em sua ação antitumoral, as vantagens obtidas com a utilização dos sistemas de liberação controlada na terapia antineoplásica, a saber os lipossomas, julgou-se importante realizar esta abordagem, pois a associação destes compostos permanece ainda em campo aberto a estudos associado a escassez de trabalhos. Portanto, a utilização de sistemas de liberação controlada surge, como alternativa para o desenvolvimento de lipossomas contendo 2-fenil-4-amino-6-*p*-fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina na quimioterapia do câncer.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

- Desenvolver lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído para avaliar sua ação antitumoral frente ao Sarcoma-180.

1.2.2. Objetivos específicos

- Obter e caracterizar lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído;
- Realizar estudos de estabilidade acelerada e em tempos pré-determinados das formulações obtidas;
- Avaliar a citotoxicidade frente à linhagem celular tumoral;
- Investigar a ação antineoplásica *in vivo*, frente a tumor sólido experimental, do fármaco isoladamente e encapsulado;
- Efetuar avaliação morfológica e determinação do índice mitótico dos tumores.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Câncer

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que se caracterizam pela multiplicação e disseminação descontrolada de formas anômalas de células do próprio corpo, diferenciadas pela etiologia, história natural e forma de tratamento, que invadem tecidos e órgãos. Tumor ou neoplasia, que significa “novo crescimento”, pode ser designado como benigno ou maligno. Câncer, tumor maligno e neoplasia maligna são sinônimos e caracterizam-se pela rápida divisão, onde as células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. As células que crescem de forma localizada, sem invasão a tecidos adjacentes são classificadas como tumores benignos (INCA, 2010; WEINBERG, 2008).

A gênese do tecido neoplásico permite classificar as neoplasias de acordo com o nome do tecido que a originou. Geralmente, a denominação é feita indicando o nome do tecido seguido do sufixo *oma*. Essa classificação primária é utilizada para tumores benignos e malignos. Quando tumores malignos surgem do tecido conjuntivo (ossos, músculo e cartilagem) eles são denominados sarcomas. Os tumores derivados do tecido epitelial chamam-se carcinomas e constituem o tipo mais comum de câncer, incluindo pele, boca, estômago, intestino, bexiga, útero, próstata, pâncreas entre outros. Carcinomas com padrão glandular recebem, ainda, a terminologia adenocarcinoma (ROBBINS; COTRAN, 2005; ALMEIDA et al, 2005).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2013).

De todos os casos, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais, como o cigarro, a exposição excessiva ao sol e alguns vírus. Outros fatores, como alguns componentes dos alimentos que são ingeridos, ainda estão em estudo. Os fatores de risco ambientais de câncer são denominados cancerígenos ou carcinógenos. Esses fatores atuam alterando a estrutura genética (DNA) das células.

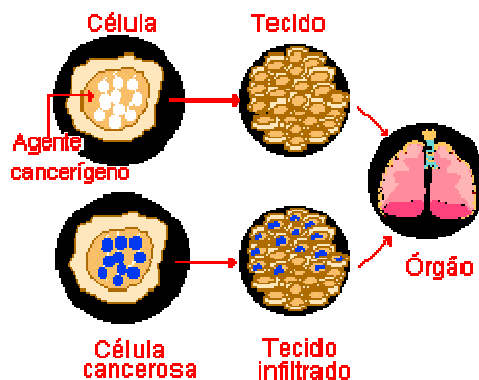


Figura 1.1 – Ação de agentes cancerígenos sobre células normais (Fonte: INCA, 2013).

Antigamente, a incidência do câncer era relativamente rara devido, provavelmente, a menor expectativa de vida (PONCE et al, 1996) aliada à ausência de diagnóstico, porém, atualmente a redução das taxas de mortalidade e de natalidade com consequente prolongamento da expectativa de vida e envelhecimento populacional, levou ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares e do câncer. Além disto, os atuais padrões de vida adotados em relação ao trabalho, nutrição e consumo em geral expõe os indivíduos a fatores ambientais mais agressivos, relacionados a agentes químicos, físicos e biológicos resultantes de um processo de industrialização cada vez mais intenso (INCA, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que em 2005 ocorreram 35 milhões de mortes por doenças crônicas no mundo, sendo que aproximadamente 7,6 milhões, ou 21,7%, corresponderam às neoplasias (WHO, 2005). Tal doença está entre as principais causas de morte no mundo e foi responsável por cerca de 7,9 milhões de mortes em 2007, correspondendo a 38% e 62% em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, respectivamente (GLOBOCAN, 2008). Estima-se que em 2030, serão 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer (INCA, 2011). Com estas taxas crescentes configura-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005).

O aumento na incidência e mortalidade por neoplasias malignas no mundo no início do século XXI, somadas à expectativa de acréscimo nos seus valores nas próximas décadas, têm apontado para a necessidade urgente de se intensificar pesquisas que visam desenvolver novos fármacos e alternativas terapêuticas que possibilitem enfrentar e debelar o problema (WHO, 2002).

O tratamento do câncer é feito através de formas bem estabelecidas: a excisão cirúrgica, radioterapia, quimioterapia e transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade (INCA, 2013).

A escolha da cirurgia para o tratamento do câncer depende da natureza e do estágio da doença. A intervenção cirúrgica pode ser necessária para garantir o acesso de quimioterápicos aos vasos sanguíneos (BOYLE; LEVIN, 2008), ou para reduzir nódulos visíveis de tumor, aumentando a eficiência da quimioterapia ou da radioterapia (AL-SHAMMAA; YONEMURA, 2008; ALMEIDA et al, 2005). A radioterapia, por sua vez, é o tratamento no qual se utilizam radiações para destruir um tumor ou impedir que suas células aumentem. O transplante de medula óssea é o tratamento utilizado para algumas doenças malignas que afetam as células do sangue, consistindo na substituição de uma medula óssea doente, ou deficitária, por células normais de medula óssea, com o objetivo de reconstituir a nova medula (INCA, 2013).

O tratamento quimioterápico é entendido como a utilização de agentes químicos direcionados para matar ou controlar células tumorais. Ele carrega um alto risco devido à toxicidade das drogas e aos efeitos colaterais que essas causam, diminuindo ainda mais a qualidade de vida do paciente. A eficácia da quimioterapia depende ainda de vários fatores como as drogas e as doses utilizadas, a via de administração e a condição do paciente (JAIN, 2001). Além disso, durante o percurso até o tumor, a droga pode interagir com outros tecidos e ser metabolizada pelo organismo, comprometendo a sua biodisponibilidade na colônia neoplásica e, por conseguinte, sua eficácia (OOYAMA et al, 2008).

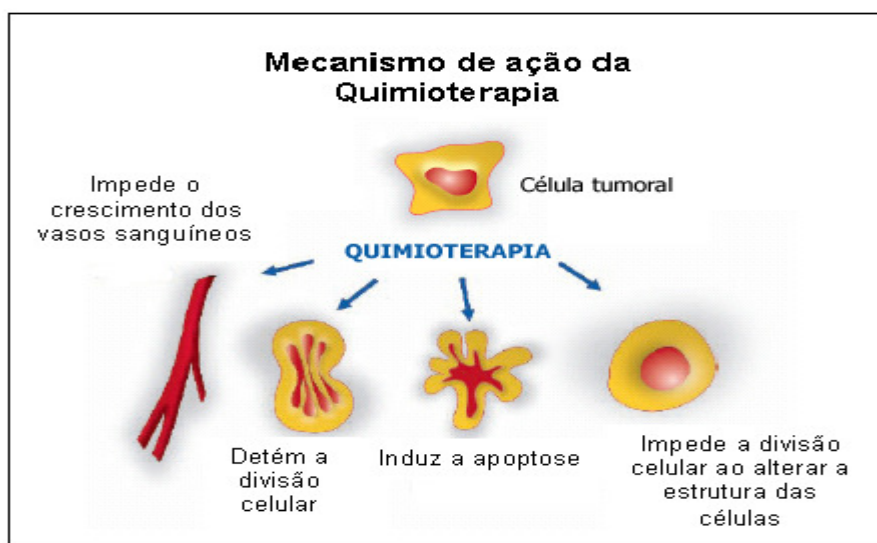


Figura 1.2 – Mecanismos de ação da quimioterapia (Fonte: adaptado de drcarlosrey.blogspot.com).

Uma diversidade de fármacos compõem o arsenal terapêutico disponível ao tratamento quimioterápico, apresentando compostos de origem natural e sintética. Entretanto, a eficácia destes compostos atualmente disponíveis frente a tumores sólidos é limitada (COCCO et al, 2006), pois, além de fatores inerentes ao fármaco, os tumores apresentam uma rápida divisão celular, respondendo pouco aos agentes quimioterápicos existentes e o tratamento curativo, utilizando qualquer uma das modalidades terapêuticas ou mesmo a combinação das diversas modalidades, é extremamente difícil (KENNEDY et al, 1980).

Então, apesar da diversidade de drogas já utilizadas no tratamento do câncer, as dificuldades encontradas na quimioterapia convencional (efeitos tóxicos sistêmicos, baixa biodisponibilidade do fármaco e pouca aceitação da terapia pelo paciente, por exemplo) incentivaram pesquisadores a desenvolver novas formas de entregar os fármacos. Avanços na terapia do câncer estão progredindo devido ao emprego de sistemas de liberação controlada de fármacos, os quais têm o intuito de melhorar o transporte e as propriedades dos fármacos quimioterápicos (LAPENDA et al, 2012).

1.3.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar, que se encontra em rápida expansão, e abrange biologia, química, engenharia, física etc. Nos últimos anos os nanotecnólogos têm estudado as propriedades dos nanomateriais para diversas aplicações biológicas, destacando-se a terapêutica (MENDONÇA, 2011).

Esta tecnologia possibilita avanços na pesquisa de câncer por meio da utilização de lipossomas (NIE et al, 2007), que são estruturas construídas na escala nanométrica, unidade de medida que correlaciona-se com a bilionésima parte do metro (10^{-9}) (Figura 1.3) (FARAJI; WIPF, 2009).

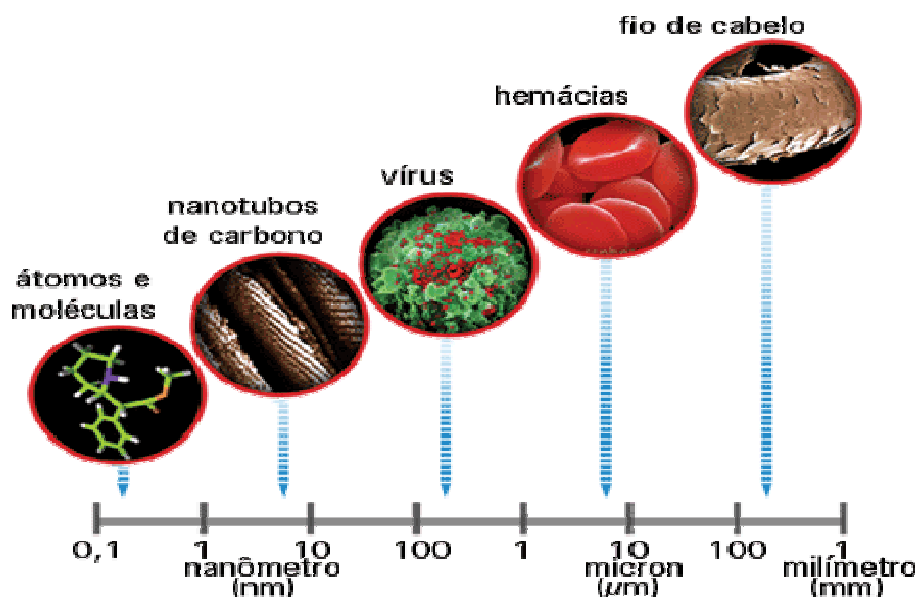


Figura 1.3 – Representação esquemática da escala nanométrica (Fonte: www.cienciasparalelas.com.br).

A nanotecnologia tem sido bastante utilizada na área de desenvolvimento de medicamentos, pois os nanocarreadores promovem uma melhoria na liberação dos fármacos, direcionando e controlando a liberação de fármacos com baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e alta toxicidade, por exemplo (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007; SAKATA et al, 2007).

1.3.3 Sistemas de Liberação Controlada - SLC

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das áreas mais dinâmicas da ciência, envolvendo aspectos multidisciplinares diversos e contribuindo bastante para o avanço na pesquisa de novas alternativas terapêuticas. O principal objetivo desta tecnologia é a liberação progressiva e controlada da substância pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontra, manutenção dos níveis plasmáticos do fármaco em concentrações constantes dentro da faixa terapêutica, eliminando desta forma as variações que geralmente são observadas no decorrer do tratamento como os efeitos tóxicos (picos além da faixa terapêutica) e falta de efetividade (dose subterapêutica) da substância ativa (Figura 1.4). Portanto, os sistemas de liberação controlada oferecem o uso otimizado do composto (LO et al, 2001; DUNNE et al, 2003).

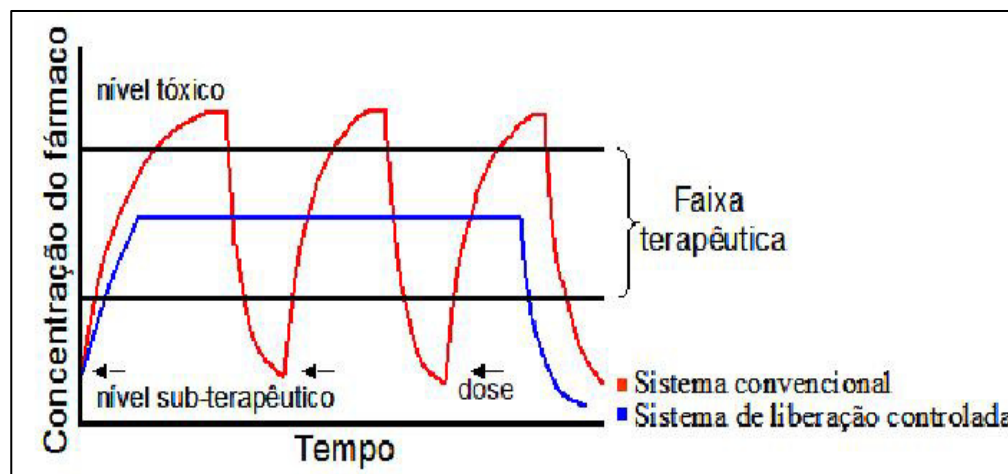


Figura 1.4 – Farmacocinética comparativa de formas farmacêuticas convencionais e de liberação controlada (Fonte: LIRA, 2007).

A utilização destes sistemas em relação às formas farmacêuticas convencionais apresenta vantagens, como: o uso de substâncias lábeis e/ ou tóxicas, pois o encapsulamento promove a proteção do composto frente a fatores externos, protegendo ainda o organismo, pois proporciona uma diminuição dos efeitos tóxicos (ALLEN; HANSEN; LOPES DE MENEZES, 1995; VOINEA, SIMIONESCU, 2002); otimização do número de doses; liberação do fármaco por um tempo maior; direcionamento a alvos específicos e maior conveniência para o paciente (BRANNON-PEPPAS, 1995; PETITTI; VANNI; BARRESI, 2008).

Há uma variedade de nanocarreadores que podem ser utilizados como sistemas de liberação controlada, como micropartículas, nanopartículas, lipossomas, dendrímeros, nanotubos, dentre outros (Figura 1.5); como também diferentes tipos de liberação podem ser produzidos (contínua, pulsátil) de acordo com o fármaco, o dispositivo escolhido e a via de administração (PETITTI; VANNI; BARRESI, 2008).

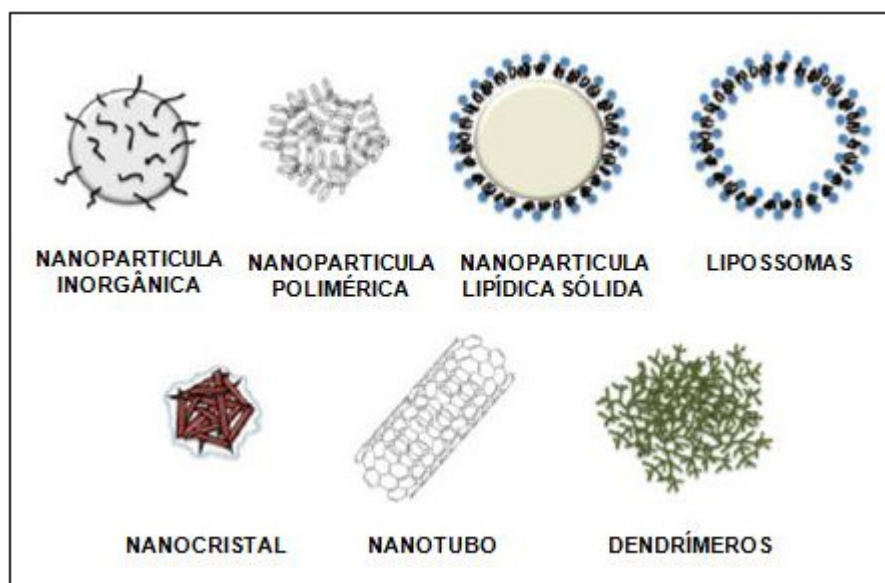


Figura 1.5 - Ilustração de alguns tipos de nanocarreadores (Fonte: adaptado de FARIJ; WIFP, 2009).

1.3.4 Lipossomas

Das várias formas de sistema de liberação controlada de fármacos, os lipossomas despertam grande interesse para pesquisa. Eles vêm sendo estudados há mais de 40 anos sendo descritos, na década de 60, por Bangham e colaboradores (1965) como modelos de membranas biológicas, sendo esta pesquisa pioneira nos estudos com lipossomas. Em termos gerais, essa pesquisa tinha como objetivo investigar as características físicas e físico-químicas das membranas artificiais formadas por compostos anfifílicos em soluções. Com os resultados obtidos no trabalho de Bangham, os lipossomas impuseram-se como um sistema modelo simples para o estudo de membranas biológicas (SANTOS; CASTANHO, 2002).

A utilização dos lipossomas como sistemas de liberação de fármacos foi proposta na década de 70, por Gregory Gregoriadis (GREGORIADIS; LEATHWOOD; RYMAN, 1971 apud SANTOS; CASTANHO, 2002). Entretanto, as primeiras formulações de lipossomas estudadas não produziram os resultados esperados, devido à instabilidade das vesículas, ao baixo teor de encapsulação dos fármacos e à escolha inadequada da via de administração (LASIC, 1998). Com isso, percorreu-se um longo caminho para que os lipossomas se convertessem em carreadores terapêuticos de uma diversidade de agentes como quimioterápicos, antígenos, hemoglobina e cofatores, imunomoduladores e material genético (TORCHILIN, 2005; BATISTA, CARVALHO, SANTOS-MAGALHÃES, 2007).

1.3.4.1 Aspectos gerais

Os lipossomas são definidos como sistemas lipídicos dispersos constituídos frequentemente por fosfolípides, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas. A orientação em bicamadas é determinada pela natureza dos grupos polares e das cadeias carbônicas. Essas bicamadas circundam uma cavidade aquosa interna onde se encontra um meio aquoso. Considerando que os lipossomas são constituídos por moléculas anfifílicas, os mesmos são capazes de encapsular substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas. Moléculas hidrofílicas são encapsuladas na sua cavidade aquosa interna, onde estão presentes os grupos polares dos fosfolípides. As substâncias lipofílicas são acomodadas na região apolar da bicamada e as anfifílicas ao longo de toda sua extensão, interagindo com a região apolar e polar (Figura 1.6) (CARVALHO JÚNIOR, 2008).

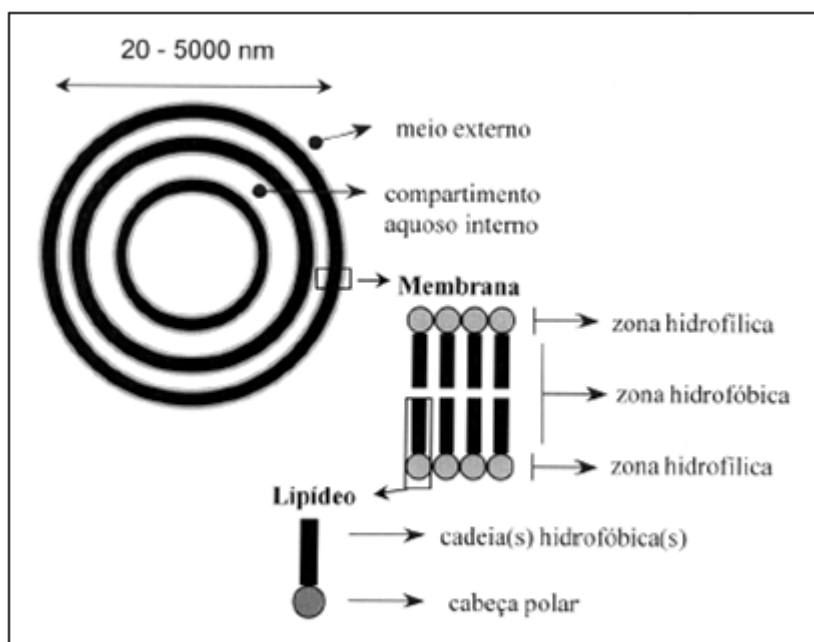


Figura 1.6 – Representação esquemática dos lipossomas (Fonte: CARVALHO JÚNIOR, 2008).

Estas vesículas são consideradas como uma excelente forma de sistema de liberação controlada de fármacos e substâncias biologicamente ativas devido a sua flexibilidade estrutural seja no tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica, como na sua capacidade de encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas. Além disso, os

lipossomas também apresentam algumas propriedades biológicas bastante atrativas: são biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos (LAPENDA et al, 2012).

1.3.4.2 Composição

Os lipossomas são constituídos por moléculas com características anfifílicas, principalmente por fosfolípidios, os quais podem ter origem natural ou sintética. Desde a preparação original de Bangham em 1960, ocorre uma constante evolução, em razão dos significativos avanços na tecnologia de produção, que implicam em modificações nas propriedades dessas estruturas, objetivando sempre a otimização dos efeitos desejados (OLIVEIRA, 1993).

Um componente lipídico relevante, parte da maioria das formulações de lipossomas, é o colesterol que atua melhorando a fluidez da bicamada lipídica, além de melhorar a estabilidade da vesícula na presença de fluidos biológicos como o sangue, através da redução da interação das proteínas plasmáticas com as membranas dos lipossomas, diminuindo assim a desestruturação dos mesmos. Algumas preparações também possuem lípidios apresentando carga efetiva negativa, por exemplo, fosfatidilserina e fosfatidilglicerol, ou positiva, como a estearilamina. A presença de cargas nos lipossomas pode influenciar a taxa de incorporação de substâncias, impedir a agregação/fusão das vesículas lipídicas por repulsão eletrostática e modular o seu destino no organismo (FRÉZARD et al, 2005; LIRA, 2007).

1.3.4.3 Classificação

O tamanho das vesículas, o número de lamelas e a composição química dos lipossomas, ou seja, as suas características de interação com os sistemas biológicos, são as formas mais comuns de classificação dos lipossomas (TORCHILIN, 2005).

De acordo com o número de bicamadas os lipossomas são classificados em vesículas unilamelares pequenas (SUV – Small Unilamellar Vesicles) e vesículas unilamelares grandes (LUV– Large Unilamellar Vesicles) - quando constituídos de uma única bicamada lipídica. Quando as vesículas são formadas por bicamadas sucessivas separadas por compartimentos aquosos, os lipossomas são denominados multilamelares (MLV– Multilamellar Vesicles) (Figura 1.7) (CARVALHO JÚNIOR, 2008). Essas variações

influenciam diretamente na absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e no perfil de toxicidade das drogas encapsuladas.

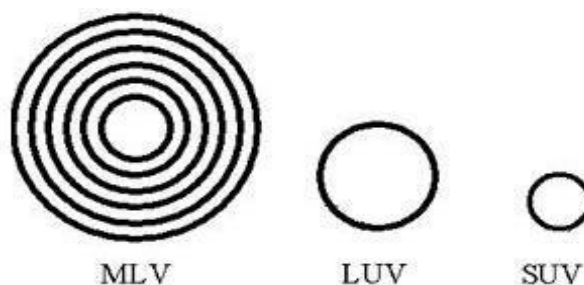


Figura 1.7 - Classificação dos lipossomas quanto ao número de lamelas (Fonte: LASIC, 1998).

A obtenção de lipossomas com diâmetro reduzido e distribuição homogênea das vesículas é um importante fator para a garantia da estabilidade desta forma farmacêutica. Com isso, a eficiência de encapsulação aumenta de acordo com o aumento do diâmetro – $LUV > MLV > SUV$, a estabilidade dos lipossomas diminui com o aumento do diâmetro e a capacidade de extravasamento diminui com o aumento do diâmetro (CARVALHO JUNIOR, 2008; OLIVEIRA, 1993).

De acordo com a composição química e em relação às características de interação com os sistemas biológicos, os lipossomas podem ser classificados em convencionais, furtivos, sítio-específicos e polimórficos (Figura 1.8) (CARVALHO JUNIOR, 2008; LAPENDA et al, 2012).

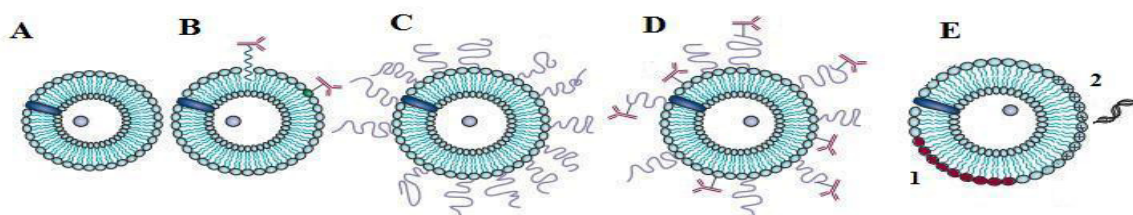


Figura 1.8 - Classificação dos lipossomas quanto à constituição. **A-** Lipossomas convencionais. **B-** Lipossomas sítio-específicos. **C-** Lipossomas furtivos. **D-** Lipossomas direcionados de longa circulação. **E-** Lipossomas polimórficos: 1- lipossoma sensível ao pH; 2- lipossoma catiônico (Fonte: TORCHILIN, 2005).

Os lipossomas convencionais são compostos basicamente de fosfolípidos, como por exemplo, lipídios naturais (fosfatidilcolina de ovo ou soja) ou sintéticos como a dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e a dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), colesterol e um lipídio com carga (positiva ou negativa), como estearilamina. Eles foram os primeiros a serem preparados sendo então conhecidos como lipossomas de primeira geração. Em administrações intravenosas, esses lipossomas podem se associar com as opsoninas do plasma e serem reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear sendo removidos da circulação, principalmente pelo fígado e pelo baço. Lipossomas do tipo LUV e MLV são rapidamente reconhecidos e eliminados da circulação, enquanto que os SUV têm meia-vida mais longa (TORCHILIN, 2005; CARVALHO JUNIOR, 2008; LAPENDA et al, 2012).

Os lipossomas de longa circulação também contêm fosfolípidos, como constituinte principal, mas apresentam na superfície da bicamada lipídica outro componente que torna a superfície das vesículas mais hidrofílica, como por exemplo, os fosfolípidos acoplados à cadeia de polietilenoglicol (PEG), podendo-se citar o diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀). Esses derivados hidrofílicos conferem aos lipossomas furtivos a sua característica mais importante que é a prevenção da opsonização e consequente diminuição da captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear, o que aumenta a sua biodisponibilidade (TORCHILIN, 2005; CARVALHO JUNIOR, 2008; LAPENDA et al, 2012).

Os lipossomas direcionados ou sítio-específicos foram desenvolvidos na tentativa de aumentar a acumulação de fármacos carregados por lipossomas nos tecidos e órgãos alvos (BATISTA et al, 2007). Moléculas como anticorpos, proteínas, peptídeos, carboidratos e folatos ficam acopladas na superfície dos lipossomas sem comprometer a integridade da membrana e as propriedades do ligante, através de ligação covalente ou pela inserção na membrana lipídica depois de serem modificadas com resíduos hidrofóbicos. Há um aperfeiçoamento dos lipossomas sítio-específicos através da combinação de suas propriedades com as dos lipossomas furtivos em uma só preparação, obtendo-se então lipossomas direcionados de longa circulação (TORCHILIN, 2005; LAPENDA et al, 2012).

Por fim, os lipossomas polimórficos são aqueles que se tornam reativos devido à mudança na sua estrutura desencadeada por uma alteração de pH, temperatura ou carga eletrostática. Lipossomas sensíveis ao pH são utilizados para liberar o fármaco no citoplasma ou no tecido intersticial de tumores, visto que estes têm o pH menor que o fisiológico. Eles são preparados com fosfolípidos derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) (TORCHILIN, 2005; CARVALHO JUNIOR, 2008). Os lipossomas termo-sensíveis são formados por uma mistura de lipídios

que têm sua T_c (Temperatura de transição de fase) um pouco acima da temperatura fisiológica. Em locais com hipertermia, como tecidos tumorais, há a liberação do conteúdo do lipossoma. Os lipossomas catiônicos, por sua vez, apresentam carga positiva na superfície e eles têm sido utilizados para terapia gênica, liberando ácidos nucleicos dentro das células (TORCHILIN, 2005; BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007; LAPENDA et al, 2012)

1.3.4.4 Métodos de preparação

A preparação de lipossomas não é apenas a formação aleatória das membranas, mas obter membranas formadoras de vesículas com estrutura e tamanho ideais com propósito de encapsular substâncias biologicamente ativas (ANDRADE et al, 2004).

Existem vários métodos de preparação de lipossomas, como extrusão, ultrassom, microfluidização, evaporação em fase reversa e hidratação de filme lipídico. Nesse, a fase orgânica é preparada com a solubilização dos lipídeos em solventes orgânicos, formando-se o filme lipídico pela evaporação do(s) solvente(s) à pressão reduzida. Então, a fase aquosa é adicionada ao recipiente contendo o filme lipídico formando-se espontaneamente as vesículas (SANTOS; CASTANHO, 2002; FRÉZARD et al, 2005). Os lipossomas obtidos pelo método da hidratação do filme lipídico podem ser submetidos à ação de ultrassom com ajuda de uma sonda ou banho, convertendo os MLVs em SUVs (ANDRADE et al, 2004; HATZI et al, 2007).

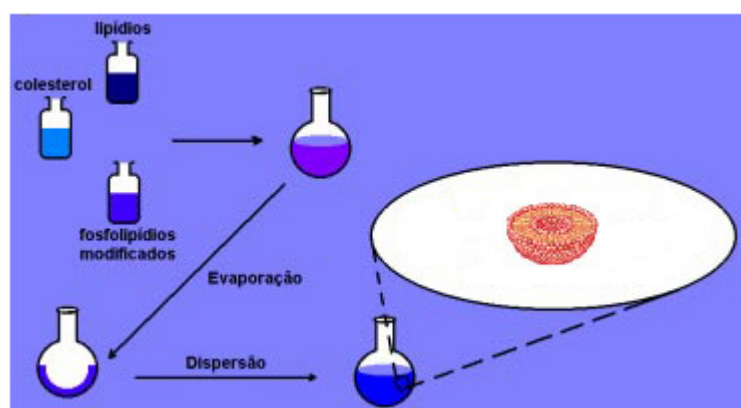


Figura 1.9 – Etapas comuns a todos os métodos de preparação de lipossomas (Fonte: adaptado de New, 1990).

1.3.4.5 Caracterização

Vários métodos de caracterização podem ser utilizados para garantir o controle de qualidade dos lipossomas imediatamente após a sua preparação e durante o seu armazenamento. Os parâmetros físico-químicos utilizados para caracterização dos lipossomas são diversos, dentre eles: estudos de estabilidade acelerada e em tempos pré-determinados, avaliação macroscópica e microscópica, tamanho de partícula, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação e potencial zeta (SANTOS-MAGALHÃES et al, 2000; ANDRADE et al, 2004).

A estabilidade de um produto farmacêutico é definida como a capacidade de uma formulação permanecer dentro de certos limites estabelecidos em relação às suas características químicas, físicas e microbiológicas (ANDRADE et al, 2004). Os estudos de estabilidade acelerada e em tempos pré-determinados ajudam na definição da melhor formulação durante o processo de otimização. O estudo de estabilidade acelerada tem como objetivo submeter as preparações obtidas a condições de estresse para simular processos como transporte e armazenamento, então as formulações são avaliadas através de testes de centrifugação, estresse mecânico e ciclos de congelamento/ descongelamento. Já o estudo de estabilidade em tempos pré-determinados tem como objetivo estabelecer a durabilidade das formulações, e os parâmetros avaliados neste estudo são: determinação do teor do fármaco e taxa de encapsulação, diâmetro da partícula e o índice de polidispersão, potencial zeta e variação do pH das formulações ao longo do tempo (LAPENDA et al, 2012).

Os aspectos macroscópicos e microscópicos também são observados. Quanto aos aspectos macroscópicos pode-se observar o surgimento de alterações no aspecto geral das preparações, como: homogeneidade, cor, viscosidade, deposição de materiais, formação de grumos, cremagem, floculação, coalescência e separação de fases. Através da avaliação dos aspectos microscópicos, que podem ser obtidos através da microscopia óptica, eletrônica de varredura e de transmissão, avaliam-se a morfologia e homogeneidade no tamanho dos nanossistemas obtidos (ANDRADE et al, 2004).

O potencial zeta reflete o potencial de superfície dos lipossomas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Este parâmetro é determinado utilizando-se técnicas de eletroforese. Um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas

tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais dos lipossomas adjacentes. A determinação do potencial zeta também pode ser útil na elucidação do mecanismo de associação dos fármacos aos lipossomas (SCHAFFAZICK et al, 2003).

1.3.4.6 Mecanismos de interação dos lipossomas com as células

A interação dos lipossomas com as células pode acontecer variando de acordo com vários fatores, como: a dimensão, composição e carga elétrica das vesículas, propriedades físico-químicas do fármaco carregado e características específicas das células (NEW, 1990).

Conforme New (1990), a interação dos lipossomas com as células agrupa-se em quatro processos: adsorção, onde o lipossoma é fixado na célula, através de forças físicas de atração, estabelecimento de ligações entre a membrana das vesículas e receptores celulares, liberando lentamente para o espaço extracelular o seu conteúdo que vai penetrando na célula; endocitose, processo pelo qual as células (monócitos, macrófagos e outras células) interiorizam variados produtos, os quais são fixados em estruturas vacuolares, ditas fagossomas, só depois disso havendo liberação dos fármacos que veiculam; transferência lipídica, que consiste na passagem de fosfolípidios através das membranas celulares e; fusão, onde os fosfolípidios dos lipossomas fundem-se à membrana, e passam a fazer parte da mesma.

1.3.4.7 Aplicação dos lipossomas na terapia antitumoral

O uso de lipossomas como vetor de quimioterápicos abre grandes perspectivas para o tratamento do câncer, pois possibilita maior eficácia, reduzindo a toxicidade e a dosagem do medicamento antineoplásico (MOGHIMI; PATEL, 1992). É possível ainda adicionar mais de um fármaco ao lipossoma, gerando assim um complexo farmacológico sinérgico (MINKO et al, 2006). A adição de ligantes à superfície dos lipossomas com afinidade para receptores específicos para células tumorais, direcionam o fármaco exclusivamente aos tecidos que apresentam células neoplásicas. Isso aumenta a eficácia terapêutica do fármaco encapsulado e reduz seus efeitos colaterais em relação àqueles convencionais (ARAÚJO, 2005; SAPRA, TYAGI, ALLEN, 2005)

Com o uso de formulações de lipossomas, Oliveira (1993) demonstrou um efeito no prolongamento do tempo de meia-vida da daunomicina e vimblastina, e ainda redução da toxicidade terapêutica da actinomicina, podendo-se observar uma DL_{50} de 0.8 µg/ g para o fármaco livre e 8 µg/ g com o fármaco encapsulado em lipossomas. Andrade e

colaboradores (2004) constataram que a encapsulação da lectina de *Cratylia mollis* (*Cra*) em lipossomas produziu um aumento da atividade antitumoral *in vivo* contra o Sarcoma 180 comparando-se com o tratamento com *Cra* em solução, além disso, a análise histopatológica revelou que a encapsulação da *Cra* produziu uma redução no efeito hepatotóxico. Carvalho Júnior (2008) observou que lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo cisplatina foram capazes de manter o efeito antitumoral da cisplatina sem induzir toxicidade aparente. Estes estudos demonstram a efetividade da utilização de lipossomas na terapia antitumoral, sendo possível, também, encontrar formulações de lipossomas comercializadas como o DOXIL[®] (injeção de lipossomos de Cloridrato de doxorubicina), indicado para o tratamento do sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS (SEQUUS, 2013).

1.3.5 Compostos heterocíclicos

Os compostos heterocíclicos correspondem a uma classe de compostos que apresentam diversas propriedades biológicas a serem exploradas, sendo as propriedades farmacêuticas, agroquímicas, e veterinárias mais amplamente reconhecidas cientificamente (HO, 2005).

Entre as várias classes de compostos heterocíclicos que merecem atenção por sua ampla aplicação, temos as pirimidinas, amplamente distribuídas na natureza, tendo em vista que tomam parte na constituição de estruturas químicas fundamentais para a vida, estando presentes em organismos vivos, em moléculas de ácidos nucleicos, como DNA e RNA, os quais são essenciais para a biossíntese de proteínas (PORTE, 2011).

1.3.6 Pirimidinas

Pirimidinas são aminas heterocíclicas aromáticas (heteroaromáticas), isoeletrônicas ao benzeno (JOULE; MILLS, 2013), nas quais dois átomos dos seis que constituem o anel benzênico estão substituídos por nitrogênio (Figura 1.10) (CAREY; SUNDBERG, 1990).

Por serem compostos intimamente relacionados à célula e conseqüentemente à vida apresentam numerosas aplicações, no que diz respeito à Química Farmacêutica, devido às suas propriedades farmacológicas e biológicas que têm sido extensivamente estudadas. A atividade farmacológica é observada principalmente quando o grupo *amino* está ligado ao anel pirimidínico nas posições 2 e 4 (SILVA et al, 2008).

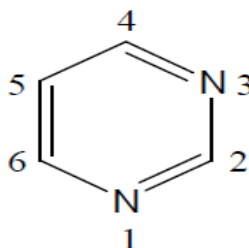


Figura 1.10 – Anel Pirimidínico

Inúmeros trabalhos relatam a aplicabilidade farmacológica e biológica de drogas contendo este anel, citando-se como exemplos atividades antifúngica (ANDERSON et al, 1945; MANGALAGIU et al, 2001), antivirais (NASR; GINEINAH, 2002), antimalárica (TOKUTAKE, 1977), antimicrobianas (CHOWDHURY, MATIN, ANWAR, 1997; KANTH et al, 2006; BHUIYAN et al, 2006), anti-inflamatória (SONDHI et al, 2001; FALCÃO et al, 2006), anti-histamínica (SHISHOO et al, 2001), analgésica (BRUNO et al, 2002), protetora da mucosa gástrica (SANFILIPPO et al, 1992), diurética (PAPESEH; GROVE; SHROEDER, 1956), além de anticancerígeno (EL-GABY et al, 1999) e antitumoral (BARALDI et al, 2002; FALCÃO et al, 2006). O anel da pirimidina pode ser encontrado na estrutura química de vários produtos farmacêuticos, como medicamentos para hipertensão (HO et al, 2009) e ansiolíticos (LOEW et al, 1984), bem como em outros agentes antimicrobianos e antitumorais (BARALDI et al, 2002).

1.3.6.1 Síntese de compostos pirimidínicos

Além de serem encontrados na natureza, compostos heterocíclicos como as pirimidinas, podem ser obtidos a partir de reações de condensação envolvendo a participação da malononitrila ou seus derivados, de maneira simplificada pode-se definir que a mais ampla rota para síntese de pirimidinas envolve a combinação de reagentes com esqueletos contendo N – C – N com aqueles contendo C – C – C (TAYLOR; MCKILLOP, 1970).

1.3.6.2 Atividade antitumoral dos compostos pirimidínicos

Os agentes utilizados no tratamento anticâncer incluem uma grande variedade de compostos que agem por vários mecanismos, porém apresentam significativa toxicidade sobre os tecidos normais (BOENTE; SAMPAIO; DEL GIGLIO, 2010). Com isso, se faz necessário uma pesquisa contínua por novas drogas mais eficazes, mais seletivas e menos tóxicas.

Os derivados pirimidínicos apresentam uma promissora atividade antitumoral e esta atividade varia em função das substituições efetuadas na molécula. As pirimidinas 2,4-bissubstituídas e 2,4,6-trissubstituídas apresentam potente atividade anticancerígena como: inibidores de CDK, inibidores de α -TNF, inibidores de proteína tirosina quinase, inibidores da quinase (PI-3 e AKT) e inibidores de citocina (XIE et al, 2009) e seu efeito citotóxico ainda pode ser atribuído à sua atuação como: inibidores de quinases dependentes de ciclina, inibidores de xantina oxidase, antagonistas do receptor de adenosina (GHORAB et al, 2010).

De uma forma geral, os análogos da pirimidina, como Gencitabina, Citarabina (AraC; também chamado citosina arabinósido), 5-Fluorouracil, Floxuridina e outros têm a capacidade de inibir a biossíntese dos nucleotídeos de pirimidina. A Gencitabina, por exemplo, atua incorporando-se ao DNA inibindo o alongamento das cadeias de DNA nascente (CHABNER; WILSON; SUPKO, 2001).

O 5-fluorouracil atua como um antimetabólito e age como um inibidor irreversível da timidilato-sintase (BOENTE; SAMPAIO; DEL GIGLIO, 2010), além de ser análogo dos antifolatos. Estes inibidores apresentam uma especificidade elevada sendo bastante úteis como agentes terapêuticos (VOET; VOET; PRATT, 2006). Os compostos pirimidínicos, possivelmente atuam por mecanismo semelhante, tendo em vista a similaridade química dos seus núcleos fundamentais.

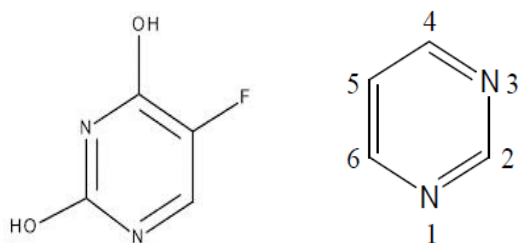
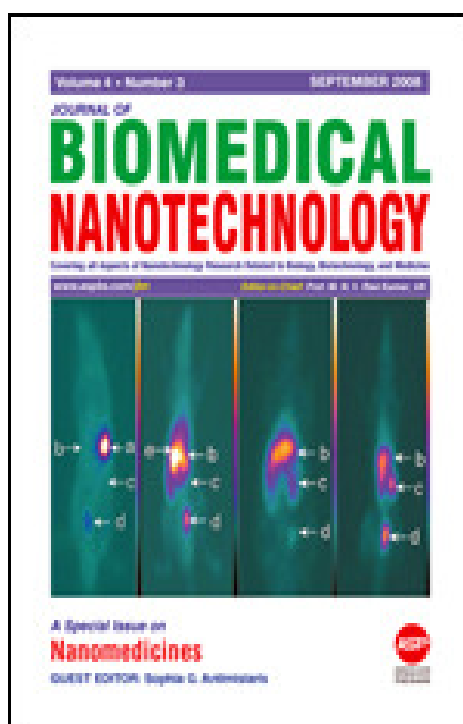


Figura 1.11 – Estrutura química do 5-Fluorouracil e anel pirimidínico (Fonte: merckbiosciences.com).

Artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Biomedical Nanotechnology*.



(FI: 5.256; QUALIS: A2).

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de sistemas de lipossomas contendo composto 2-fenil-4-amino-6-*p*-fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina e avaliação de seu potencial antitumoral

Janice Vasconcelos Oliveira^{1, 2, 3}

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular - Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Vitória-PE, Brasil

²Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

³Laboratório de Biotecnologia e Fármacos - Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Vitória-PE, Brasil

* Autor para correspondência:

Janice Vasconcelos Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Centro Acadêmico de Vitória (CAV)

Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista,

55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil

Tel: +55-81-3523 3351 (fone/fax)

E-mail: nicinha5@hotmail.com>

2.1 Resumo

Este trabalho descreve o desenvolvimento de lipossomas contendo o composto 2-fenil-4-amino-6-*p*-fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina e a avaliação de sua atividade antineoplásica *in vivo*. Os lipossomas foram preparados através do método de hidratação do filme lipídico e sonificados para obtenção de lipossomas unilamelares pequenos (SUV). Os nanossistemas foram submetidos a ensaios de estabilidade acelerada, a tempos pré-determinados e verificação da eficiência de encapsulação. Foram realizados ensaios de citotoxicidade com células *HeLa*, utilizando redução com sal tetrazólico (MTT) e a atividade antineoplásica foi investigada utilizando-se Sarcoma 180 em camundongos albinos Swiss. O comportamento celular foi observado através da determinação do índice mitótico. Os lipossomas contendo o composto pirimidínico não exibiram alterações com relação ao tamanho de partícula e pH após os testes de centrifugação e agitação mecânica e mantiveram-se estáveis em suspensão durante 30 dias. A eficiência de encapsulação foi de $82,93 \pm 0,04\%$. Observou-se maior citotoxicidade frente ao composto encapsulado com uma IC_{50} de $2,28 \mu\text{g}/\text{ml}$. O teste *in vivo* utilizando lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico, sua forma livre e 5-Fluorouracil demonstrou uma inibição tumoral de $66,47 \pm 26,8\%$, $50,46 \pm 16,24\%$ e $14,47 \pm 9,22$, respectivamente. A determinação do índice mitótico demonstrou uma redução do número de mitoses nos animais tratados quando comparado ao grupo controle. Este trabalho demonstra que o desenvolvimento de formulações de lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico pode ser uma alternativa a ser adotada com o objetivo de superar as limitações relacionadas ao atual tratamento antineoplásico, garantindo desta forma segurança e eficácia terapêutica.

Palavras-chave: neoplasias; 4-amino-pirimidina; lipossomas; viabilidade celular; índice mitótico.

2.2 Abstract

The major objective of this study was to develop a liposomal based controlled release system containing compound 4-amino-2-phenyl-6-(*p*-fluor-phenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine-bissubstituted and evaluate its antineoplastic *in vivo* activity. Liposomes were prepared by the method of hydrating the lipid film and sonicated to obtain small unilamellar liposomes (SUV). The nanosystems were tested for accelerated stability and predetermined times and verification of encapsulation efficiency. Cytotoxicity assays were performed with *HeLa* cells, using tetrazolium salt reduction (MTT) method and the antineoplastic activity was investigated using the experimental Sarcoma 180 tumor in Swiss mice. The cell behavior was observed by determining the mitotic index. Liposomes containing the pyrimidine compound exhibited no change with respect to particle size and pH testing after centrifugation and mechanical stirring and remained stable in suspension for 30 days. The encapsulation efficiency was $82.93 \pm 0.04\%$. There was a greater reduction of cell viability when compared to the encapsulated compound with an IC_{50} of $2.28 \mu\text{g/ml}$. The *in vivo* tests using liposomes containing compound 4-amino-pyrimidine, unencapsulated pyrimidine compound and 5-Fluorouracyl shown an inhibition of tumor 66.47 ± 26.8 , $50.46\% \pm 16.24\%$ and 14.47 ± 9.22 , respectively. The determination of the mitotic index showed a reduction in the number of mitoses in treated animals compared to the control group. This results demonstrates that the development of liposome formulations containing compound 4-amino-pyrimidine can be an alternative overcome the limitations related to the toxicity of current anticancer treatment, thus ensuring more safety and therapeutic efficacy.

Keywords: cancer; 4-amino-pyrimidine; liposomes; cell viability; mitotic index.

2.3 Introdução

Os processos patológicos de natureza neoplasica têm aumentado de maneira considerável em todo mundo, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade.¹ Atualmente, estas patologias constituem um dos mais importantes problemas de saúde pública.² Este quadro, e o fato da atual terapia causar toxicidade sistêmica, resultando em citotoxicidade para as células normais,³ tem estimulado pesquisas que visam desenvolver novos fármacos e alternativas terapêuticas que possibilitem enfrentar o problema.

Assim, uma estratégia é o uso de sistemas de liberação controlada como carreadores de antineoplásicos, para alcançar a acumulação seletiva do fármaco no tecido onde se encontra o tumor ou nas células tumorais. Os lipossomas têm sido aceitos clinicamente no tratamento do câncer, visto que alteram a farmacocinética e biodistribuição dos fármacos antineoplásicos.⁴

Os compostos heterocíclicos vêm apresentando grande importância devido à sua grande aplicabilidade nos mais diversos campos da química moderna e devido à enorme variedade e complexidade estrutural,⁵ sendo fonte de diversos e extensos estudos. Dentre os sistemas heterocíclicos destacam-se as pirimidinas e seus derivados devido a suas propriedades biológicas. Os compostos contendo pirimidina apresentam atividade antifúngica,^{6, 7} antiviral,⁸ antimicrobiana,⁹⁻¹¹ antitumoral^{12, 13} e anti-inflamatória,^{13, 14} estando presentes na estrutura química de vários produtos farmacêuticos, como medicamentos para o tratamento da hipertensão e ansiolíticos, bem como em outros agentes antimicrobianos e antitumorais.¹⁵

Um trabalho recentemente publicado por LUNA e colaboradores (2011)¹⁵ demonstrou interessante interação de compostos pirimidínicos 4-aminados e membranas lipídicas. Além disso, estes compostos apresentam potente atividade anticancerígena atuando como inibidores de CDK, inibidores de α -TNF, inibidores de proteína tirosina quinase, inibidores da quinase (PI-3 e AKT) e inibidores de citocina.¹⁶

Considerando a aplicabilidade dos derivados pirimidínicos e suas diversas propriedades farmacológicas, com enfoque em sua ação antitumoral, as vantagens obtidas com a utilização dos sistemas de liberação controlada na terapia antineoplásica, a saber os lipossomas, objetivou-se realizar esta abordagem, pois a associação destes compostos permanece ainda em campo aberto a estudos associado a escassez de trabalhos. Portanto, o presente estudo visou o desenvolvimento de lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído, realização de ensaios de citotoxicidade frente a linhagem celular *HeLa* e avaliação da sua atividade antitumoral frente ao Sarcoma 180, com avaliação da taxa de inibição tumoral e determinação do índice mitótico.

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Materiais

O composto pirimidínico 4-aminado foi fornecido pelo “Grupo de pesquisa em novos fármacos e produtos naturais bioativos”, supervisionado pelo Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão. O colesterol (CHO), a estearilamina (SA) e o 5-Fluorouracil (5-Fu) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). A fosfatidilcolina de soja (PC) foi obtida da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O metanol e o clorofórmio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). As soluções aquosas foram preparadas com água purificada obtida do sistema de purificação Human UP 900 (Human Corporation, Seoul, Korea).

2.4.2 Síntese dos compostos pirimidínicos

O derivado pirimidínico foi produzido pelo “Grupo de pesquisa em novos fármacos e produtos naturais bioativos” a partir de reações consecutivas (Figura 2.1), utilizando a metodologia descrita por Melo e colaboradores (2002),¹⁷ onde um aldeído aromático apropriado reage inicialmente com a malononitrila, originando bisnitrila substituída, que após

ser purificada e cristalizada reage com uma amidina, originando o composto 2-fenil-4-amino-6-*p*-fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina. A reação sintética é monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD).

A estrutura sintetizada é avaliada por técnica usual de espectrometria de massa (espectrômetro de massas modelo Delsi-Nermag, acoplado ao cromatógrafo gasoso - HP 5890), Ressonância Magnética de Prótons (RMN-H) (espectrôfotometro Varian modelo UNITY), Infravermelho (espectrômetro Burkert, modelo IFS 66) e ponto de fusão (Electrothermal digital - modelo 9100).¹³

2.4.3 Preparação de lipossomas contendo composto 2-fenil-4-amino-6-*p*-fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina

Os lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído foram preparados conforme o método de formação do filme lipídico obtido através da evaporação dos solventes.¹⁸ Assim como os lipídios (PC, CHO e SA - 7:2:1, 42 mM), o derivado pirimidínico (10 mg) foi solubilizado no sistema de solventes orgânicos clorofórmio:metanol (3:1 v/v). A mistura foi submetida à evaporação a vácuo para completa eliminação do solvente orgânico e consequente formação do filme lipídico. O filme formado foi hidratado com tampão fosfato pH 7,4 para formação das vesículas lipídicas multilamelares (MLV – vesículas multilamelares). Com objetivo de diminuir as vesículas a lipossomas unilamelares pequenos (SUV – vesículas unilamelares pequenas), os lipossomas foram sonificados (Vibra cell, BRANSON, USA) a 200 W e 40 Hz por 300s.

2.4.3 Caracterização dos lipossomas contendo composto 2-fenil-4-amino-6-*p*-fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina

Os lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído foram submetidos a testes de estabilidade acelerada e em tempos pré-determinados com o

objetivo de se verificar a durabilidade das preparações. Com a realização dos testes foram avaliadas as características físico-químicas, como aspecto macroscópico, tamanho de partícula, índice de polidispersão, pH, potencial Zeta, além da eficiência de encapsulação.

Os testes de estabilidade acelerada submetem as preparações obtidas a condições de estresse para simular processos como transporte e armazenamento.¹⁹ Para tanto, as formulações preparadas foram divididas em alíquotas e submetidas à centrifugação a 6.000 r.p.m. por 1 h a 4 ± 1 °C (Centrífuga KN-70, Kubota, Japão), simulando a passagem acelerada do tempo e; estresse mecânico, onde as amostras foram colocadas em tubo eppendorff® e em seguida imersas em banho-maria, e submetidas a agitação horizontal sob 180 vibrações/ min., a uma temperatura controlada de 37 ± 1 °C, durante 48 h (Polytest® 20 Bioblock Scientific, France), para simular condições de transporte.

O teste de estabilidade em tempos pré-determinados tem o objetivo de estabelecer a durabilidade das formulações.¹⁹ Neste sentido, o teste avaliou as condições das formulações logo após a preparação e a intervalos de tempos regulares (7, 15 e 30 dias).

A avaliação dos aspectos macroscópicos foi realizada a fim de observar o surgimento de alterações no aspecto geral das preparações, como a homogeneidade, cor, viscosidade, deposição de materiais, formação de grumos, cremagem, floculação, coalescência e separação de fases.

O tamanho de partícula e índice de polidispersão foram determinados pela Espectroscopia de Correlação de Fótons utilizando um Analisador de tamanho de partículas a laser (Beckman Coulter, UK), onde 3 amostras de cada formulação de lipossomas foram diluídas em água ultra-pura.²⁰

O teor de fármaco e eficiência de encapsulação foram analisados por espectrofotometria de UV-Vis (Ultrospec ® 3000 pro, Amersham Biosciences, Suécia). As análises foram realizadas em triplicata e os valores foram expressos como média $\pm$ D.P. O teor do composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído foi quantificado

retirando-se uma alíquota da suspensão de lipossomas (20 µL), que foi dissolvida em metanol e sonicada durante 5 min. Em seguida, o composto foi quantificado através de espectrofotometria (260 nm), usando a curva-padrão do 4-amino-pirimidínico-bissubstituído, com concentrações variando de 0,5 a 5 µg/ ml em metanol. A eficiência de encapsulação foi obtida através da técnica de ultrafiltração/ ultracentrifugação,^{18, 21} utilizando unidades Microcon ® (Millipore, EUA), onde uma alíquota da formulação de lipossomas (400 µL) foi centrifugada a 10.000 r.p.m. durante 1 h a 4 °C; em seguida, o produto filtrado foi quantificado por espectrofotometria de UV-Vis (260 nm), sendo calculada pela equação: $EE\% = (\text{total de 4-amino-pirimidínico-bissubstituído} - \text{4-amino-pirimidínico-bissubstituído livre}) / \text{total de 4-amino-pirimidínico-bissubstituído} \times 100\%.$ ²⁰

A carga superficial das vesículas, potencial Zeta, foi mensurada pela determinação da mobilidade eletroforética (Nanotracer®, USA), 3 amostras de 50 µl foram diluídas em 950 µl de água ultrapura. Todos os resultados são apresentados pela média ± desvio-padrão (D.P.).

2.4.4 Cultura de células

Os ensaios *in vitro* foram realizados no Laboratório Nanobiocell (UFPE-CAV) utilizando a linhagem celular *HeLa* (carcinoma epidermóide de colón de útero) em fase exponencial de crescimento. As células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de antibióticos (penicilina 1000 UI/ ml + estreptomicina 250 mg/ ml) e 1% de L-glutamina 200 mM e mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e 80% de umidade.²²

2.4.6 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) que se baseia na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/ visível. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico.²³

Uma suspensão celular (10^5 células/ mL) foi distribuída em placa de cultura com 96 poços (198 μ L/ poço). As placas foram incubadas a 37 °C em estufa (Sedas, Milão-Itália), com atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂. Após 24h de incubação, o composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído em suas formas livre (diluído em DMSO), encapsulada e 5-Fluorouracil, foram todos diluídos em DMEM para obter as concentrações finais de 20; 10; 5; 2,5 μ g/ mL e em seguida 22 μ L foram adicionados aos poços. Foi realizado controle com DMEM. 72 h após o tratamento, os efeitos citotóxicos das amostras testes foram avaliados, sendo as células incubadas por 3 h com MTT, para posterior leitura.

A leitura da absorbância foi realizada em leitor de placas, utilizando comprimento de onda de 490 nm. A média das absorbâncias do grupo controle foi considerada como 100% de viabilidade. Com isso, os resultados foram avaliados pela determinação da inibição da proliferação celular em relação ao controle. Cada teste foi realizado, três vezes para confirmação dos resultados apresentados pela média $\pm$ D.P.

2.4.7 Ensaio antitumoral *in vivo*

2.4.7.1 Animais experimentais

Os animais utilizados foram camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), machos com idade de 35 a 60 dias e peso médio de 30,0 g, provenientes do Biotério do Laboratório

de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA – UFPE. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob ciclo dia/ noite natural (12 h luz e 12 h escuro), com livre acesso de água e alimento durante o experimento e distribuídos em grupos segundo delineamento experimental.

Os experimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o protocolo da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE (Recife, Brasil), Processo nº 23076.050686/2012-43.

2.4.7.2 Atividade antitumoral do composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído em suas formas livre e encapsulada

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído, em suas formas livre e encapsulada, frente ao tumor sarcoma 180.

Células do tumor ($5,0 \times 10^6$ células ml^{-1}), na forma ascítica obtidas de animais com manutenção a cada 7 dias, foram inoculadas via subcutânea (S.C.) na região axilar direita dos camundongos. O teste foi realizado com 4 grupos de 6 animais. O tratamento foi iniciado, 24 h após inoculação do tumor por 7 dias consecutivos. Injeções de soluções de 4-amino-pirimidínico-bissubstituído livre e lipossomas contendo 4-amino-pirimidínico-bissubstituído numa dose equivalente a 15 mg/ Kg do peso corpóreo do animal, 5-Fluorouracil (controle positivo) numa dose de 20 mg/ Kg de peso do animal e o placebo (solução salina) em dose peso-dependente foram administrados intraperitonealmente (I.P.). As doses terapêuticas foram previamente estudadas. A solução de 4-amino-pirimidínico-bissubstituído foi preparada em 2,5% Tween 80 e solução estéril de NaCl a 0,9%.¹³

Após uma semana de tratamento, os animais foram sacrificados com overdose do anestésico urethane (1,25g/ Kg). Os tumores foram removidos e, antes da análise

microscópica, foram pesados. A inibição tumoral foi determinada a partir do peso médio dos tumores dos grupos de animais tratados em relação ao grupo controle não tratado, através da equação: $IT\% = C - T / C \times 100\%$, onde C é o peso médio dos tumores dos animais do grupo controle (solução salina) e T corresponde ao peso médio dos tumores dos animais dos grupos tratados (composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído livre e encapsulado e o 5-Fluorouracil).²⁰

2.4.8 Determinação do índice mitótico (IM)

O tumor dos animais foi removido e submetido à análise do índice mitótico. Os tecidos foram mantidos em uma solução de formol a 10% neutro tamponado até inclusões em parafina. Os cortes, realizados em micrótomo ajustado para 4 µm, foram submetidos à técnica de coloração Hematoxilina-Eosina (H.E.). As imagens histológicas destas lâminas foram capturadas por câmera digital (Moticam 3.0) acoplada ao microscópio óptico (Nikon-E200), sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 10 campos por lâmina com aumento final de 400X. As fotomicrografias foram avaliadas através do software Image J versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.), onde em cada um dos campos foram contados e determinados o número de mitoses, determinando a partir destes a média do número de mitoses por tumor. Para confecção do gráfico, os valores obtidos foram normalizados para o controle, sendo o controle igual a 100%.

2.4.9 Análise estatística

Os dados obtidos da avaliação histomorfométrica foram estatisticamente analisados através do teste T de student, realizados no Software SPSS 15.0 (Statistical Package for the

Social Sciences), com o intuito de se verificar possíveis diferenças entre os grupos. Foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

2.5 Resultados e discussão

2.5.1 Preparação e caracterização dos lipossomas

Os lipossomas contendo o composto 2-fenil-4-amino-6-*p*-fluor-fenil-5-carbonitrilapirimidina foram preparados usando o método de hidratação do filme lipídico, por este ser adequado para encapsulação de substâncias lipossolúveis,²⁴ aplicando-se às características apresentadas pelo composto: baixa polaridade que o deixa insolúvel em solução aquosa, identificada através de testes de solubilidade, com isso, o mesmo foi adicionado à fase orgânica (clorofórmio:metanol), sendo, portanto, incorporado nas membranas dos lipossomas.²⁵

Foram utilizados 10 mg do composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído na preparação dos lipossomas, onde os valores do composto encapsulado foram equivalentes a 1 mg/ mL. Após o processo de preparação, os lipossomas apresentaram aspecto leitoso opaco, homogêneo, com efeito *tyndall* evidente, confirmando a presença de vesículas unilamelares pequenas (SUV).²⁰

O estudo da estabilidade das formulações foi realizado para analisar o comportamento do composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído nas formulações. Uma abordagem anterior já demonstrou interessante interação de compostos pirimidínicos 4-aminados e membranas lipídicas.¹⁵

No estudo de estabilidade acelerada (Tabela 2.1) foram avaliados aspectos macroscópicos, o tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI) e pH das formulações como preconizado pela literatura.²⁶ As formulações de lipossomas contendo

composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído não apresentaram alterações na aparência visual e apresentaram-se estáveis durante a centrifugação e estresse mecânico.

Os ensaios de estabilidade em tempos pré-determinados (Tabela 2.2), realizados num período de 30 dias, demonstraram que não houve alterações macroscópicas nas formulações e estas mantiveram as características iniciais apresentadas após a preparação. O diâmetro médio dos lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído foi de 298,75 nm, e o PDI permaneceu em torno de 0,37. O diâmetro da mesma foi aumentado pela presença de substância lipofílica²⁷ e, além disso, seu discreto aumento ao longo do tempo pode estar relacionado à tendência que as partículas apresentam de agregarem-se em função do tempo²⁸. O índice de polidispersão não apresentou alterações significativas, indicando homogeneidade na distribuição do tamanho das vesículas.²⁷ Foi observado um ligeiro decréscimo nos valores de pH. Estas variações não constituem ou representam instabilidade nas formulações.

Os lipossomas contendo composto apresentaram um valor de potencial zeta de $37,7 \pm 2,26$, enquanto os lipossomas brancos, sem composto, apresentaram um potencial de $37,5 \pm 1,62$. A presença da estearilamina, lípideo carregado positivamente, na composição da bicamada, confere aos lipossomas uma superfície carregada positivamente. Lipossomas com valores de potencial zeta negativos ou positivos, acima de 30 mV, apresentam uma boa estabilidade em suspensão, pois forças repulsivas atuam prevenindo a agregação das vesículas.^{28, 29}

A eficiência de encapsulação, calculada relacionando o percentual total e livre do composto, apresentou-se como $82,93 \pm 0,04$.

2.5.2 Estudo da Viabilidade celular

O estudo da viabilidade celular foi realizado objetivando-se avaliar o efeito do composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído em suas formas livre e encapsulada e do 5-Fluorouracil, fármaco com atividade conhecida, sobre esta linhagem celular.

A figura 2.2 demonstra a viabilidade celular de *HeLa* frente aos compostos testados. Observa-se que o aumento da concentração dos compostos gera um decréscimo na viabilidade celular, significando aumento da mortalidade, conforme apresentado na literatura.³⁰

Lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído apresentaram uma maior citotoxicidade quando comparado aos demais compostos testados, nas concentrações 5, 10 e 20 ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Este resultado corrobora com a literatura, comprovando o aumento da eficácia terapêutica de compostos encapsulados em lipossomas.³¹

A atividade citotóxica dos compostos foi determinada de acordo com a escala do National Cancer Institute (NCI),³² onde os compostos são considerados sem atividade citotóxica quando a inibição percentual apresenta-se no intervalo de 1 - 20%, com pouca atividade quando essa percentagem situa-se entre 20 e 50%, atividade moderada quando a inibição é de 50 para 70% e de alta atividade, quando o intervalo de inibição fica entre 70 a 100%. Portanto, o composto encapsulado na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ apresentou alta atividade (75,91 %), enquanto o composto livre, na mesma concentração, apresenta pouca atividade (46,63 %) e 5-FU atividade moderada (60%). Estes dados reiteram as vantagens associadas ao uso dos lipossomas.

Os valores de CI_{50} foram calculados baseados nos perfis dose-resposta obtidos para a viabilidade celular. Assim uma redução na viabilidade celular em 50% das células é obtida quando 3,91; 2,28 e 3,09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pirimidina livre e encapsulada e 5-Fluorouracil, respectivamente, são aplicados nas células *Hela*. Estes resultados reforçam as análises realizadas neste estudo, demonstrando que o composto encapsulado em lipossomas

apresenta maior citotoxicidade em menores concentrações quando comparado aos demais compostos testados, sendo superior, inclusive, ao 5-Fluorouracil.

2.5.3 Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

Nesta avaliação, além do composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído em suas formas livre e encapsulada, utilizou-se o 5-Fluorouracil, como controle positivo, por ser um fármaco clinicamente efetivo contra o câncer humano e em camundongos,³³ e além disso ser um análogo da pirimidina, de modo a poder se atribuir possível mecanismo de ação ao fármaco em estudo.

As doses utilizadas foram definidas a partir de estudos preliminares. Um estudo realizado por Falcão e colaboradores (2006)¹³ com o objetivo de definir a toxicidade de alguns derivados pirimidínicos demonstrou que estes apresentam baixa toxicidade, sendo, portanto, definida, para este estudo, uma dose mínima capaz de produzir efeito antitumoral.

A atividade antitumoral foi calculada através da comparação do peso médio dos tumores dos diversos grupos experimentais e comparação com os grupos controle.

Após o tratamento, houve uma mudança no peso dos tumores (Figura 2.3), sendo observada uma maior redução no grupo tratado com lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído ($1,42 \pm 1,14$ g), em comparação com o composto livre ($2,10 \pm 0,69$ g) e o 5-Fluorouracil ($3,63 \pm 0,39$ g), tendo os animais do grupo controle tumores com uma massa média de $4,24 \pm 0,91$ g. Estes resultados demonstram que os lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído produziram um maior efeito regressivo na massa tumoral que o composto livre e até mesmo com relação ao 5-Fluorouracil, fármaco com atividade antitumoral reconhecida.

Os animais tratados com lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído apresentaram uma inibição satisfatória (Figura 2.4), $66,47 \pm 26,8\%$, conforme protocolos do NCI que consideram como satisfatórios os resultados cujo percentual de

inibição tumoral apresentam-se acima de 60%.³³ O composto em suspensão apresentou uma inibição de $50,46 \pm 16,24\%$, enquanto o grupo tratado com 5-Fluorouracil apresentou uma inibição de $14,47 \pm 9,22\%$, inibição inferior ao produzido pelo composto testado.

A atividade antitumoral do composto em estudo já é descrita na literatura e é atribuída a compostos contendo o núcleo pirimidínico,^{13, 16, 32} porém o aumento da efetividade destes compostos quando encapsulados ainda não foi relatado na literatura, sendo confirmada pelos trabalhos que abordam os lipossomas como responsáveis pelo aumento da eficácia das substâncias encapsuladas por eles.^{25, 31}

Os derivados da pirimidina apresentam potente atividade antitumoral como inibidores de CDK, inibidores de α -TNF, inibidores de proteína tirosina quinase, inibidores da quinase (PI-3 e AKT) e inibidores de citocina¹⁶ e o 5-Fluorouracil, análogo da pirimidina, atua, principalmente interferindo na síntese do timidilato.³³ É possível que o composto 4-amino-pirimidínico estudado apresente um mecanismo de ação semelhante entretanto dados adicionais seriam necessários para se inferir com certeza um mecanismo de atuação.

A maior inibição observada pelo composto 4-amino – pirimidínico testado, quando encapsulado, demonstra que os lipossomas podem representar carreadores adequados para esta classe de compostos, na terapia antitumoral, devido à sua capacidade para aumentar a eficácia da droga.²⁰ É possível que tal efeito deva-se a uma alteração da farmacocinética e biodistribuição do fármaco, já documentada para outros fármacos antineoplásicos.⁴

2.5.4 Determinação do Índice Mitótico (IM)

Independente do grupo estudado, o tumor invadiu a musculatura, o tecido ósseo e gorduroso. Também foram observadas áreas de necrose e hemorragia. As células neoplásicas apresentaram-se arranjadas predominantemente em padrão sólido, pleomórficas, grandes, com citoplasma abundante e sem bordas definidas. Os núcleos

apresentaram-se hipercromáticos, grandes, variando de ovais a alongados. Foram observadas várias figuras de mitose, algumas atípicas.

O número de mitoses expressa a atividade da divisão celular, então quanto maior a atividade proliferativa de um tecido, maior será o número de mitoses verificadas,³⁴ sendo a análise do índice mitótico um importante indicador de proliferação adequada das células,³⁵ possibilitando o conhecimento do nível de atividade celular do tecido em estudo, fornecendo informações sobre o seu comportamento biológico.³⁶

A inibição da divisão celular observada através dos valores dos índices mitóticos (Figura 2.5) demonstra que os animais tratados com lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído apresentaram uma maior inibição do número de mitoses, 32,15%, quando comparado ao 5-Fluorouracil (71,39%) e composto na forma livre (87,69). Estes dados demonstram que o composto testado apresenta capacidade antiproliferativa³⁵ e esta é intensificada pela encapsulação em lipossomas, sendo estes responsáveis pelo aumento da eficácia terapêutica do composto testado.³¹

2.6 Conclusões

Os resultados obtidos demonstraram que as formulações de lipossomas contendo composto 2-fenil-4-amino-6-*p*-fluor-fenil-5-carbonitrila-pirimidina mantiveram-se estáveis após terem sido submetidas aos testes de estabilidade acelerada e em tempos pré-determinados.

Os ensaios *in vitro* demonstraram que o encapsulamento do composto em lipossomas potencializou o efeito do composto testado em comparação à utilização do mesmo em sua forma livre.

A utilização de lipossomas nos testes *in vivo* aumentou a eficácia do composto, produzindo uma inibição tumoral relevante quando comparado ao grupo controle. Estes

resultados demonstraram que a atividade antitumoral do composto 4-amino-pirimidínico testado foi maior em relação ao 5-Fluorouracil.

A análise histológica, através da determinação do índice mitótico, apresentou concordância com os resultados obtidos na avaliação do peso tumoral, uma vez que em ambos foi observado uma inibição da proliferação celular, seja pelo aumento da inibição tumoral, seja com a redução do número de mitoses nos grupos tratados com lipossomas contendo composto.

O resultados obtidos demonstram que o desenvolvimento de lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído é uma alternativa que pode ser adotada com objetivo de superar as limitações relacionadas ao atual tratamento antineoplásico, garantindo desta forma segurança e eficácia terapêutica. Além disso, o composto mostrou-se mais efetivo do que o 5-Fluorouracil, fármaco clinicamente aceito na terapia antitumoral.

2.7 Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido através da bolsa de pós-graduação em nível de Mestrado fornecida através do Plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI).

2.8 Referências Bibliográficas

1. M. F. Garrido, L. A. C. Martinez, J. H. Rodríguez, A. E. Roca, E. P. Valdés, B. F. Ramos, Mortalidad por neoplasias malignas en la población adulta de la provincia de Cienfuegos durante el decenio 1988-1997, *Rev. cubana med.*, 42 (2) **(2003)**. Disponível em: <http://www.bvs.sld.cu/revistas/med/vol42_2_03/med04203.htm>. Acesso em: 14 mar. 2012.
2. M. R. Guerra, C. V. M. Gallo, G. A. S. Mendonça, Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes, *Rev. Bras. de Canc.* 51 (3), 227-234 **(2005)**.
3. P. Sapra, T. M. Allen, Ligand-targeted liposomal anticancer drugs, *Prog. Lipid Res.* 42, 439-462 **(2003)**.
4. C. Mamot, D. C. Drummond, K. Hong, D. B. Kirpotin, J. W. Park, Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance, *Drug Res. Update* 6, 271-279 **(2003)**.
5. L. Pizzuti, Síntese de 4-(fur-2-il)- e 4-(tien-2-il)-pirimidinas a partir de β -alcoxivinil trifluormetil cetonas, **2005**. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul **(2005)**.
6. G.W. Anderson, I. F. Halverstadt, W. H. Miller, R. O. Roblin Junior, Studies in chemotherapy; Antithyroid compounds; synthesis of 5-substituted and 6-substituted 2-thiouracils from beta-oxoesters and thiourea, *J. Am. Chem. Soc.* 67, 2197–2200, **(1945)**.
7. G. Mangalagiu, M. Mungureanu, G. Grosu, I. Mangalagiu, M. Petrovanu, New pyrrolo-pyrimidine derivatives with antifungal or antibacterial properties, *Ann. Pharm. Fr.* 59, 139–140 **(2001)**.
8. M. N. Nasr, M. M. Gineinah, Pyrido_2,3-d_pyrimidines and pyrimido_5',4':5,6_pyrido_2,3-d_pyrimidines as new antiviral agents: Synthesis and biological activity, *Arch. Pharm.* 335, 289–295 **(2002)**.
9. A. Z. M. S. Chowdhury, M. M. Matin, M. N. Anwar, Synthesis and antimicrobial activities of fused pyrimidines: Benzothieno_2,3-d_imidazo_1,2-c_pyrimidine, *Chittagong Univ. Stud.* 21, 79–83 **(1997)**.

10. S. R. Kanth, G. V. Reddy, K. H. Kishore, P. S. Rao, B. Narsaiah, U. S. N. Murthy, Convenient synthesis of novel 4-substituted-amino-5-trifluoromethyl-2,7-disubstituted pyrido[2,3-d]pyrimidines and their antibacterial activity, *Eur. J. Med. Chem.* 41, 1011–1016 **(2006)**.
11. M. H. Bhuiyan, K. M. Rahman, K. Hossain, A. Rahim, I. Hossain, M. A. Naser, Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thienopyrimidine derivatives, *Acta Pharm.* 56, 441–450 **(2006)**.
12. P.G. Baraldi, M. G. Pavani, M. C. Nuñez, P. Brigidi, B. Vitali, R. Gambari, R. Romagnoli, Antimicrobial and antitumor activity of N-heteroimine-1,2,3-dithiazoles and their transformation in triazolo-, imidazo-, and pyrazolopyrimidines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 449–456 **(2002)**.
13. E.P.D. Falcao, S. J. Melo, R. M. Srivastava, M. T. J. A. Catanho, S. C. Nascimento, Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3-and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines, *Eur. J. Med. Chem.* 41, 276–282 **(2006)**.
14. S. M. Sondhi, M. Johar, S. Rajvanshi, S. G. Dastidar, R. Shukla, R. Raghubir, J. W. Lown, Anticancer, anti-inflammatory and analgesic activity evaluation of heterocyclic compounds synthesized by the reaction of 4-isothiocyanato-4-methylpentan-2-one with substituted *o*-phenylenediamines, *o*-diaminopyridine and (un)substituted *o*-diaminopyrimidines, *Australian J. Chem.* 54, 69–74 **(2001)**.
15. D. M. N. Luna, E. P. S. Falcão, S. J. Melo, C. A. S. Andrade, Interfacial properties of a novel pyrimidine derivative and poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid floating monolayers, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 373, 22–28 **(2011)**.
16. F. Xie, H. Zhao, L. Zhao, L. Lou, Y. Hu, Synthesis and biological evaluation of novel 2,4,5-substituted pyrimidine derivatives for anticancer activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 275–278 **(2009)**.
17. S. J. Melo, L. C. Santos, E. P. S. Falcão, R. M. Srivastava, C. L. Duc, Synthesis of new 4-amino-2,6-diarypyrimidine-5-carbonitriles, *J. Chem. Res. (S)*, 216-217 **(2002)**.
18. C. A. S. Andrade, M. T. S. Correia, L. C. B. B. Coelho, S. C. Nascimento, N. S. Santos-Magalhães, Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes, *Int. J. Pharm.* 278, 435-445 **(2004)**.
19. N. S. Santos-Magalhães, A. Pontes, V. M. W. Pereira, M. N. P. Caetano, Colloidal carriers for benzatine penicillin G: nanoencapsulation and nanocapsules, *Int. J. Pharm.* 208, 71-80 **(2000)**.

20. T. L. S. Lapenda, W. A. Morais, F. J. F. Almeida, M. S. Ferraz, M. C. B. Lira, N. P. S. Santos, M. A. M. Maciel, N. S. Santos-Magalhães, Encapsulation of t-DCTN in liposomes: An enhancement of the antitumor activity, *J. Biomed. Nanotechnol.* 9 (3) **(2012)**.
21. N. P. S. Santos, S. C. Nascimento, N.T. Pontes-Filho, J. F. da Silva, C. M. M. B. de Castro, E. C. Pereira, N. H. da Silva, N. K. Honda, N. S. Santos-Magalhães, Nanoencapsulation of usnic acid: Na attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 64, 154-160 **(2006)**.
22. N. P. Santos, S. C. Nascimento, J. F. Silva, E. C. G. Pereira, N. H. Silva, N. K. Honda, N. S. Santos-Magalhães, *J. Drug Deliv. Sc. Tech.* 15, 355-361 **(2005)**.
23. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63 **(1983)**.
24. A. I. F. S. Conceição, C. M. Matos, C. G. Moutinho, Encapsulação de dois fármacos anticancerígenos (5-fluorouracilo e metotrexato) em lipossomas unilamelares, *Rev. FCS* 6, 50-59 **(2009)**.
25. F. Frézard, D. A. Schettini, O. G. F. Rocha, C. Demicheli, Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na Quimioterapia à base de antimônio, *Quim. Nova* 28 (3), 511-518 **(2005)**.
26. C. M. Batista, C.M.B. Carvalho, N. S. Santos-magalhães, Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 43, 167-179 **(2007)**.
27. M. Chorilli, T. C. Rimério, A. G. de Oliveira, M. V. Scarpa, Obtenção e Caracterização de Lipossomas Unilamelares Pequenos contendo Cafeína, *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (5), 715-722 **(2007)**.
28. S. R. Schaffazick, S. S. Guterres, L. L. Freitas, A. R. Pohlmann, Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos, *Quim. Nova* 26 (5), 726-737 **(2003)**.
29. P. Calvo, J. L. Vila-Jato, M. J. Alonso, Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carries, *J. Pharm. Sci.* 85 (530) **(1996)**.

30. Z. Zhang, S. H. Lee, S. Feng, Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery, *Biomaterials* 28, 1889–1899 **(2007)**.
31. L. F. Pimentel, A. T. Jácome Júnior, V. C. F. Mosqueira, N. S. Santos-Magalhães, Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária, *Rev. bras. ciênc. farm.* 43 (4), 503-514 **(2007)**.
32. M. T. Cocco, C. Congiu, V. Lilliu, V. Onnis, Synthesis and in vitro antitumoral activity of new hydrazine pyrimidine-5-carbonitrile derivates, *Bioorg. Med. Chem.* 14, 366-372 **(2006)**.
33. C. Zhang, G. Li, Y. Wang, F. Cuib, J. Zhang, Q. Huang, Preparation and characterization of 5-fluorouracil-loaded PLLA–PEG/PEG nanoparticles by a novel supercritical CO₂ technique, *Int. J. Pharm.* 436, 272– 281 **(2012)**.
34. Ministério da Saúde, BRASIL. Manual de Bases técnicas APAC/ ONCO **(2013)**. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/decas/neoplas.mansia.htm>.> Acesso em: 03 jul. 2013.
35. A. Gadano, A. Gurni, P. López, G. Ferraro, M. Carballo, *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *Ethnopharmacol.* 81, 11-16 **(2002)**.
36. S. S. L. V. Barros, R. A. Freitas, Argrophilia in nucleolar organizer regions in epithelial dysplasia of the oral mucosa, *Rev. Odontol. UNESP* 26 (1), 189-202 **(1997)**.

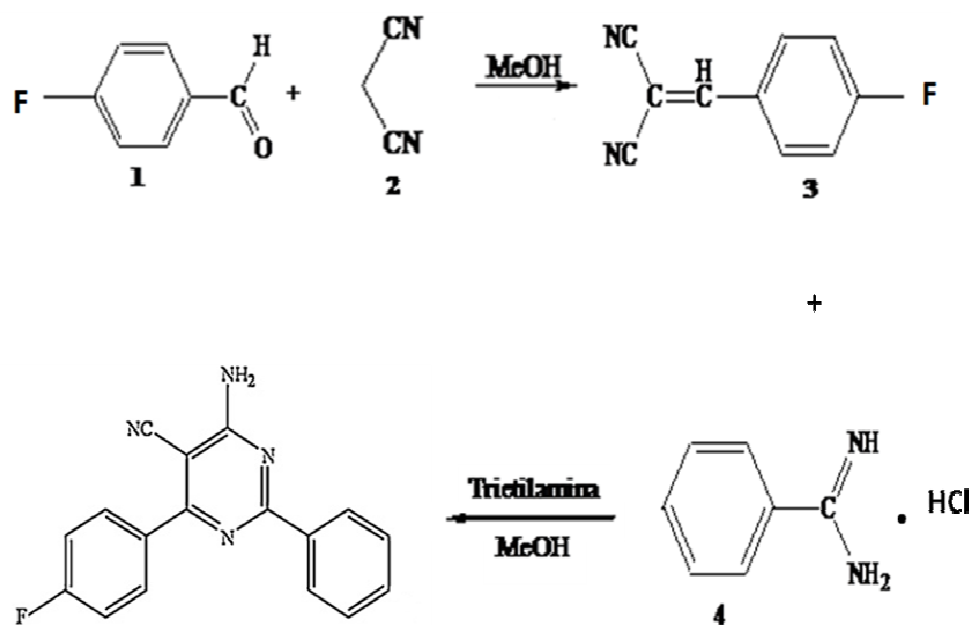


Figura 2.1 - Esquema reacional. 1 - aldeído aromático; 2 – Malononitrila; 3 - Bisnitrilas substituídas; 4 – Amidina.

PARÂMETROS	LIPO BRANCO	LIPO p-F-pirimidina
CARACTERÍSTICAS	Ø: 138,45 ± 25,04	Ø: 270,04 ± 24,94
INICIAIS	IPD: 0,32 ± 0,04	IPD: 0,39 ± 0,10
	pH: 6,53 ± 0,05	pH: 7,17 ± 0,23
	Análise macroscópica: sem alterações	Análise macroscópica: sem alterações
CENTRIFUGAÇÃO	Ø: 149,55 ± 9,83	Ø: 276,90 ± 35,21
	IPD: 0,31 ± 0,05	IPD: 0,34 ± 0,05
	pH: 7,34 ± 0,13	pH: 7,16 ± 0,16
	Análise macroscópica: sem alterações	Análise macroscópica: sem alterações
ESTRESSE	Ø: 103,82 ± 8,73	Ø: 285,18 ± 20,88
MECÂNICO	IPD: 0,36 ± 0,01	IPD: 0,38 ± 0,02
	pH: 6,58 ± 0,10	pH: 7,41 ± 0,13
	Análise macroscópica: sem alterações	Análise macroscópica: sem alterações

Tabela 2.1 - Estudo de estabilidade acelerada dos lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído. Ø: Tamanho de partícula; IPD: Índice de polidispersão; pH: potencial Hidrogênionico; Análise micro e macroscópica: homogeneidade, cor, viscosidade, deposição de materiais, formação de grumos, cremagem, floculação, coalescência e separação de fases.

LIPO p-F-pirimidina			
Intervalo (dias)	Ø	IPD	pH
0	270,04 ± 24,94	0,39 ± 0,10	7,17 ± 0,23
7	287,88 ± 20,58	0,37 ± 0,01	7,12 ± 0,39
15	295,74 ± 73,10	0,36 ± 0,03	6,58 ± 0,04
30	341,35 ± 25,32	0,36 ± 0,02	6,61 ± 0,12

Tabela 2.2 – Estudo da estabilidade em tempos pré-determinados de lipossomas branco e lipossomas contendo 4-amino-pirimidínico-bissubstituído durante 30 dias. Ø: Tamanho de partícula; IPD: Índice de polidispersão; pH: potencial Hidrogênionico.

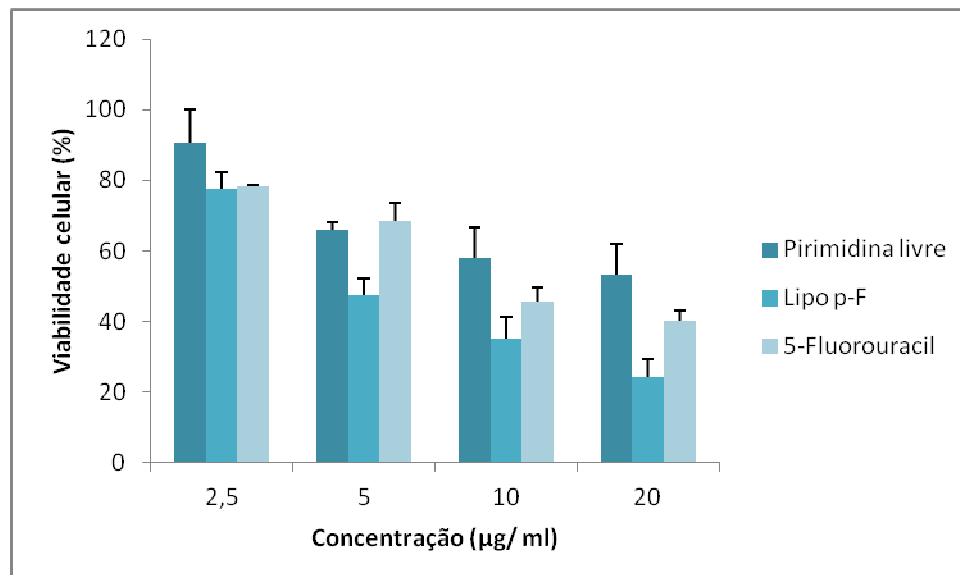


Figura 2.2 – Viabilidade celular de *HeLa* frente aos compostos livre e encapsulado (Lipo *p*-F) e 5-Fluorouracil nas concentrações de 2,5; 5; 10; 20 µg/ ml.

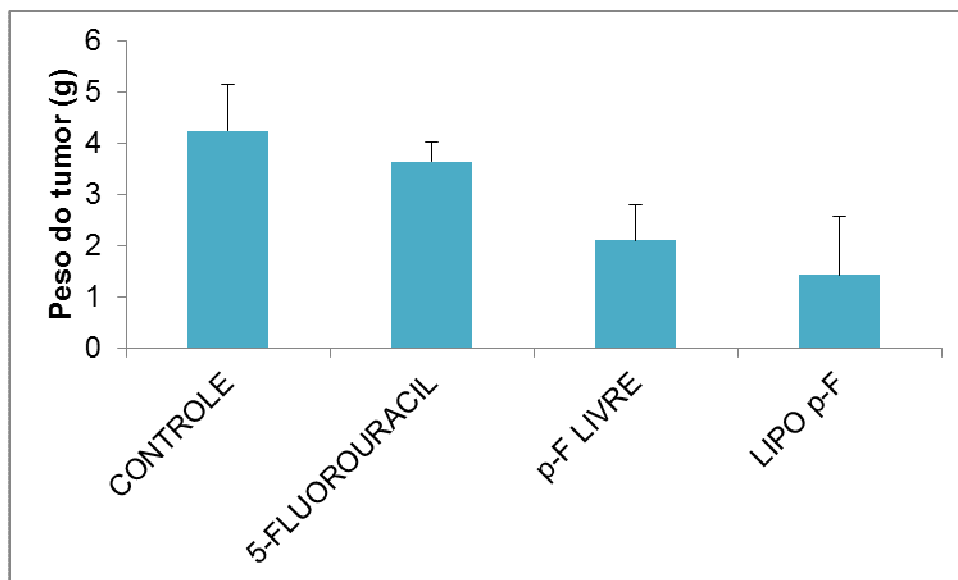


Figura 2.3 – Peso dos tumores dos grupos tratados com solução salina, 20 mg/ Kg de peso corpóreo de 5-Fluorouracil e 15 mg/ Kg de peso corporal do composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído livre e encapsulado.

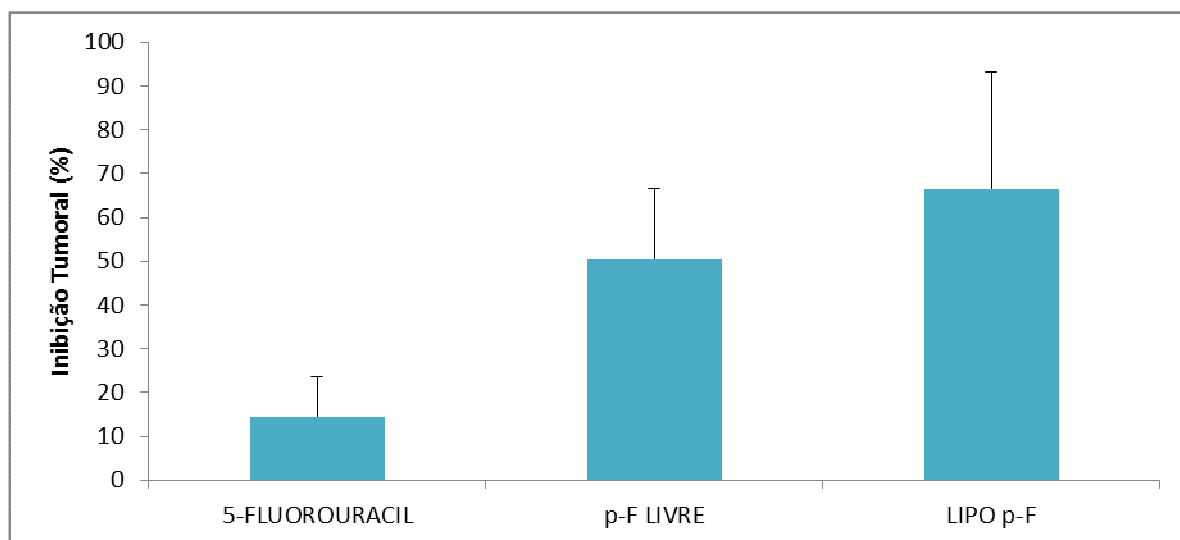


Figura 2.4 – Avaliação da inibição tumoral dos grupos tratados com 5-Fluorouracil (20 mg/ Kg), 4-amino-pirimidínico-bissubstituído livre (15 mg/ Kg de peso corporal) e lipossomas contendo 4-amino-pirimidínico-bissubstituído (15 mg/ Kg de peso corporal).

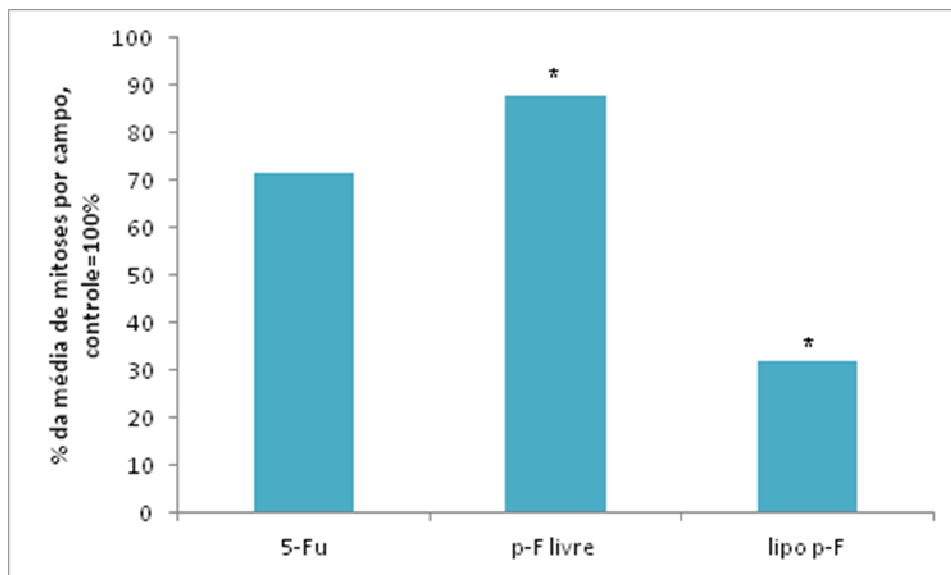


Figura 2.5 - Efeito da administração de 5-Fluorouracil (20 mg/ Kg), 4-amino-pirimidínico-bissubstituído livre (15 mg/ Kg de peso corporal) e lipossomas contendo 4-amino-pirimidínico-bissubstituído (15 mg/ Kg de peso corporal) sobre o número de mitoses. Os valores foram normalizados para o controle (100%). * aponta diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O desenvolvimento de lipossomas contendo composto 2-fenil-4-amino-6-*p*-flour-fenil-5-carbonitrila-pirimidina, preparados através da técnica de hidratação do filme lipídico, apresentou bons resultados. Foram realizados testes de estabilidade acelerada e em tempo pré-determinado e estes permitiram a avaliação de várias características como aspecto macroscópico, tamanho de partícula, índice de polidispersão, pH, potencial zeta e eficiência de encapsulação. A avaliação destes parâmetros possibilitou o acompanhamento da estabilidade da formulação, demonstrando que não houve alterações significativas ao longo do estudo.

Os testes *in vitro* permitiram confirmar a atividade do composto, frente a uma linhagem celular indiferenciada (*HeLa*), e além disso demonstraram a eficácia da utilização de lipossomas como carreadores de fármacos otimizando a ação dos compostos, ampliando, assim, a atividade citotóxica.

No que se refere à atividade antitumoral, verificou-se uma expressiva inibição do crescimento da massa neoplásica realizada pelo composto testado, tanto em sua forma livre como encapsulada, sendo mais expressiva no último. A encapsulação em lipossomas contribuiu com uma maior eficácia terapêutica.

Com a análise histológica, foi observado uma redução da proliferação celular no grupo que apresentou melhor inibição tumoral, o grupo tratado com lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído, corroborando com os resultados do trabalho, confirmando o aumento da eficácia dos compostos encapsulados em lipossomas.

O resultados obtidos confirmam que sistemas de liberação controlada baseados em lipossomas contendo composto 4-amino-pirimidínico-bissubstituído podem ser uma boa alternativa para se superar as limitações relacionadas ao metabolismo do hospedeiro possibilitando melhores prognósticos no tratamento de neoplasias malignas e representando um promissor horizonte para futuras pesquisas, já que o composto, além de apresentar atividade antitumoral, mostrou-se mais efetivo que o 5-Fluorouracil. .

REFERÊNCIAS

- ALLEN, T. M.; HANSEN, C. B.; LOPES DE MENEZES, D. E. Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 16, p. 267-284, 1995.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, v. 28, n.1, p.118-129, 2005.
- AL-SHAMMAA, H. A. H.; YONEMURA, Y. L. Y. Current status and future strategies of cytoreductive surgery plus intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for peritoneal carcinomatosis. **World J. Gastroenterol.**, v. 8, n. 14, p. 1159-1166, 2008.
- ANDERSON, G.W.; HALVERSTADT, I. F.; MILLER, W. H.; ROBLIN JUNIOR, R. O. Studies in chemotherapy; Antithyroid compounds; synthesis of 5-substituted and 6-substituted 2-thiouracils from beta-oxoesters and thiourea. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 67, p. 2197–2200, 1945.
- ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 278, p.435-445, 2004.
- ARAÚJO, A. R. Expresso Lipossoma: Farmácia propõe uso de nanopartículas para levar fármacos a áreas afetadas por tumores. **Boletim Informativo UFMG** [Online], v. 1503, n. 32, p. 24-31, 2005. Disponível em: <<http://www.ufmg.br/boletim/bol1503/sexta.shtml>>. Acesso em: 15 mar.2012.
- BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J. Mol. Biol.**, v. 13, n. 1, p. 238-252, 1965.
- BARALDI, P.G.; PAVANI, M. G.; NUÑEZ, M. C.; BRIGIDI, P.; VITALI, B.; GAMBARI, R. ROMAGNOLI, R. Antimicrobial and antitumor activity of N-heteroimine-1,2,3-dithiazoles and their transformation in triazolo-, imidazo-, and pyrazolopirimidines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 10, p. 449–456, 2002.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 43, p. 167-179, 2007.
- BHUIYAN, M. H.; RAHMAN, K. M.; HOSSAIN, K.; RAHIM, A.; HOSSAIN, I.; NASER, M. A. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thienopyrimidine derivatives. **Acta Pharm.**, v. 56, p. 441–450, 2006.

BOENTE, P. C.; SAMPAIO, C.; DEL GIGLIO, A. Agentes Antineoplásicos. *In*: SILVA, P. **Farmacologia**, 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

BOYLE, P.; LEVIN, B. World Cancer Report 2008. Lyon, France: **World Health Organization**. International Agency for Research on Cancer, 2008.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v.116, p.1-9, 1995.

BRUNO, O.; BRULLO, C.; SCHENONE, S.; RANISE, A.; BONDAVALLI, F.; BAROCELLI, E.; TOGNOLINI, M.; MAGNANINI, F.; BALLABENI, V. Progress in 5H-1_benzopyrano_4,3-d_pyrimidin-5-amine series: 2-methoxyderivatives effective as antiplatelet agents with analgesic activity, **Farmaco**, v. 57, p. 753–758, 2002.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry**: Structure and Mechanisms. 3. ed., Plenum Publishing Corporation, 1990.

CARVALHO JÚNIOR, A. D. **Avaliação pré-clínica de lipossomas ph-sensíveis de longa circulação contendo cisplatina**, 2008. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2008.

CHABNER, B. A.; WILSON, W.; SUPKO, J. Pharmacology and Toxicity of Antineoplastic Drugs, 2001. *In*: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLIER, B. S.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U. **Williams Hematology**, 6th Edition, McGraw-Hill, New York, p. 185-200, 2001.

CHOWDHURY, A. Z. M. S.; MATIN, M. M.; ANWAR, M. N. Synthesis and antimicrobial activities of fused pyrimidines: Benzo[thieno_2,3-d_imidazo_1,2-c_pyrimidine]. **Chittagong Univ. Stud.**, v. 21, p. 79–83, 1997.

COCCO, M. T.; CONGIU, C.; LILLIU, V.; ONNIS, V. Synthesis and in vitro antitumoral activity of new hydrazine pyrimidine-5-carbonitrile derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, p. 366-372, 2006.

DASHORA, N., SODDE, V., BHAGAT, J., PRABHU, K.S., LOBO, R. Antitumor activity of *Dendrophthoe falcata* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Pharmaceut. Crop**, v. 2, p. 1-7, 2011.

DUNNE, M.; BIBBY, D. C.; JONES, J. C.; CUDMORE, S. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. **J. Contr. Rel.**, v. 92, p. 209-219, 2003.

EL-GABY, M. S. A. E.-A.; ABDEL-HAMIDE, S. G.; GHORAB, M. M.; EL-SAYED, S. M. Synthesis and anticancer activity *in vitro* of some new pyrimidines, **Acta Pharm.**, v. 49, p. 149–158, 1999.

FALCAO, E. P. D.; MELO, S. J.; SRIVASTAVA, R. M.; CATANHO, M. T. J. A.; NASCIMENTO, S. C. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 41, p. 276–282, 2006.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorg. Med. Chem.**, v.17, p. 2950–2962, 2009.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na Quimioterapia à base de antimônio. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GARRIDO, M. F.; MARTINEZ, L. A. C.; RODRÍGUEZ, J. H.; ROCA, A. E.; VALDÉS, E. P.; RAMOS, B. F. Mortalidad por neoplasias malignas en la población adulta de la provincia de Cienfuegos durante el decenio 1988-1997. **Rev. cubana med.**, Ciudad de la Habana, v.42, n. 2, jun. 2003. Disponível em: <http://www.bvs.sld.cu/revistas/med/vol42_2_03/med04203.htm>. Acesso em: 14 mar. 2012.

GHORAB, M. M.; RAGAB, F. A.; ALQASOUMI, S. I.; ALAFEEFY, A. M.; ABOULMAGD, S. A. Synthesis of some new pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives of expected anticancer and radioprotective activity. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 171–178, 2010.

GLOBOCAN. **Incidence/ mortality**, 2008. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em 08 Jan. 2013.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev. Bras. de Canc.**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005. Disponível em: <www.eteavare.com.br/arquivos/81_392.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2012.

HATZI, P.; MOURTAS, S.; KLEPETSANIS, P.G.; ANTIMISIARIS, S.G. Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition. **Int. J. Pharm.**, v. 333, p. 167–176, 2007.

HO, K. K.; BEASLEY, J. R.; BELANGER, L.; BLACK, D.; CHAN, J.; DUNN, D.; HU, B.; KLON, A.; KULTGEN, S. G.; OHLMEYER, M.; PARLATO, S. M.; RAY, P. C.; PHAM, Q.; RONG, Y.; ROUGHTON, A. L.; WALKER, T. L.; WRIGHT, J.; XU, K.; XU, Y.; ZHANG, L.; WEBB, M. Triazine and pyrimidine based rock inhibitors with efficacy in spontaneous hypertensive rat model. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, p. 6027–6031, 2009.

HO, Y. W. Synthesis of some new azo pyrazolo[1,5- α]pyrimidine-thieno[2,3-*b*] pyridine derivatives and their application as disperse dyes. **Dyes Pigm.**, v. 64, p. 223-230, 2005.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **A situação do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2006.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Câncer**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 06 ago. 2010.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2013.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **O que é o câncer?** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 22 jun. 2013.

JAIN, R. K. Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function. **J. Control. Rel.**, v. 74, p. 7-25, 2001.

JOULE, J. A.; MILLS, K. **Heterocyclic Chemistry**. 2. ed. New York: Jonh Wiley & Sons, , 2013.

KANTH, S. R.; REDDY, G. V.; KISHORE, K. H.; RAO, P. S.; NARSAIAH, B.; MURTHY, U. S. N. Convenient synthesis of novel 4-substituted-amino-5-trifluoromethyl-2,7-disubstituted pyrido[2,3-*d*]pyrimidines and their antibacterial activity. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 41, p. 1011–1016, 2006.

KENNEDY, K. A.; TEICHER, B. A.; ROCKWELL, S.; SARTORELLI, A. C. The hypoxic tumor cell: A target for selective cancer chemotherapy. **Biochem. Pharmacol.**, v. 29, n. 1, 1980.

LAPENDA, T. L. S.; MORAIS, W. A.; ALMEIDA, F. J. F.; FERRAZ, M. S.; LIRA, M. C. B.; SANTOS, N. P. S.; MACIEL, M. A. M.; SANTOS-MGALHÃES, N. S. Encapsulation of t-DCTN in liposomes: An enhancement of the antitumor activity. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 9, n. 3, 2012.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 307-321, 1998.

LIRA, M. C. B. **Complexo de inclusão Ácido Úsnico: β -Ciclodextrina; Preparação, Caracterização e Nanoencapsulação em Lipossomas**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

LO, E. H.; SINGHAL, A. B.; TORCHILIN, V. P.; ABBOTT, N. J. Drug delivery to damage brain. **Brain Res. Rev.**, v. 38, p. 140-148, 2001.

LOEW, G.; TOLL, L.; LAWSON, J.; UYENO, E.; KAEGI, H. Pyrazolo[1,5 a]pyrimidines – receptor-binding and anxiolytic behavioral-studies. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 20, p. 343–348, 1984.

LUNA, D. M. N.; FALCÃO, E. P. S.; MELO, S. J.; ANDRADE, C. A. S. Interfacial properties of a novel pyrimidine derivative and poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid floating monolayers. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 373, p. 22–28, 2011.

MAMOT, C.; DRUMMOND, D. C.; HONG, K.; KIRPOTIN, D. B.; PARK, J. W. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. **Drug Res. Update**, Amsterdam, v. 6, p. 271-279, 2003.

MANGALAGIU, G.; UNGUREANU, M.; GROSU, G.; MANGALAGIU, I.; PETROVANU, M. New pyrrolo-pyrimidine derivatives with antifungal or antibacterial properties. **Ann. Pharm. Fr.**, v. 59, p. 139–140, 2001.

MENDONÇA, E.A.M. **Preparação, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de lipossomas contendo LPSF/ AC04 complexos de inclusão com ciclodextrinas**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

MINKO, T.; PAKUNLU, R. I.; WANG, Y.; KHANDARE, J. J.; SAAD, M. New generation of liposomal drugs for cancer. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 6, n. 6, p. 537-552, nov. 2006.

MOGHIMI, S. M.; PATEL, H. M. Opsonophagocytosis of liposomes by peritoneal macrophages and bone marrow reticuloendothelial cells. *Biochim Biophys Acta.*, v. 1135, n. 3, p. 269-274, jun. 1992. *In*: MACHADO, L. C.; GNOATTO, S. A.; KLÜPPEL, M. L. W. Lipossomas aplicados em farmacologia: uma revisão da literatura. **Estud. Biol.**, v. 29, n. 67, p.215-224, jun. 2007.

NASR, M. N.; GINEINAH, M. M. Pyrido_2,3-d_pyrimidines and pyrimido_5',4':5,6_pyrido_2,3-d_pyrimidines as new antiviral agents: Synthesis and biological activity. **Arch. Pharm.**, v. 335, p. 289–295, 2002.

NEW, R. R. C. **Liposomes: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1990.

NIE, S.; XING, Y.; KIM, G. J.; SIMONS, J. W. Nanotechnology applications in cancer. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 9, p. 257-288, 2007.

OLIVEIRA, A. G. de. Lipossomas: aplicações farmacêuticas e perspectivas futuras. **Cad. de Farm.**, v. 9, n. 2, p. 71-76, 1993.

OOYAMA, A.; OKA, T.; ZHAO, H.; YAMAMOTO, M.; AKIYAMA, S.; FUKUSHIMA, M. Anti-angiogenic effect of 5-Fluorouracil-based drugs against human colon cancer xenografts. **Canc. Letters**, v. 267, p. 26-36, 2008.

PAPESH, V.; GROVE, M.; SCHROEDER, E. F. **Cyanoacylalkenylureas**. Chicago, Pat 2729669, 1956.

PETITTI, M.; VANNI, M.; BARRESI, A. A. Controlled release of drug encapsulated as a solid core: Theoretical model and sensitivity analysis. **Chem. Eng. Res. Des.**, v. 86, p.1294-1300, 2008.

PIZZUTI, L. **Síntese de 4-(fur-2-il)- e 4-(tien-2-il)-pirimidinas a partir de β -alcoxivinil trifluormetil cetonas**. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2005.

PONCE, E. C. L.; GUZMÁN, V. T.; RUIZ, P. A.; ROMIEU, I.; CARRILHO, L. L. Câncer de Mama. Um Hilo Conductor Histórico, Presente y Futuro. **Salud Publica Mex.**, México, v. 38, n. 2, p. 139-152, 1996.

PORTE, L. M. F. **Estudo do comportamento químico de heterociclos trifluormetil substituídos em reações com DAST**. Tese (Doutorado) - Programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2011.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomed.: Nanotech. Biol. Med.**, v. 3, p. 20-31, 2007.

SAKATA, S.; UCHIDA, K.; KAESTSU, I.; KITA, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiat. Phys. Chem.**, v.76, p.733-737, 2007.

SANFILIPPO, P. J.; URBANSKI, M.; WILLIAMS, L.; PRESS, J. B. KATZ, L. B.; SHRIVER, D. A.; FERNANDEZ, J. A.; SHATYNSKI, D.; OFFORD, S. J. Novel tetrahydropyrido[4,3-d] pyrimidines as gastric antileSION agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 27, p. 655-661, 1992.

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

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carries for benzatine penicillin G: nanoencapsulation and nanocapsules. **Int. J. Pharm.**, v. 208, p. 71-80, 2000.

SAPRA, P.; TYAGI, P.; ALLEN, T.M. Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. **Curr. Drug. Deliv.**, v. 2, n. 4, p. 369-381, out. 2005.

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

SEQUUS Pharmaceuticals, Inc. **DOXIL®** - injeção de lipossomos de Cloridrato de doxorubicina. Disponível em: <<http://www.tradefarma.com.br/bulas/doxil.html>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

SHISHOO, C. J.; SHIRSATH, V. S.; RATHOD, I. S.; PATIL, M. J.; BHARGAVA, S. S. Design, synthesis and antihistaminic (H1) activity of some condensed 2-(substituted) arylaminoethylopyrimidine-4- (3H)-ones. **Arzneim. Forsch.**, v. 51, p. 221–231, 2001.

SILVA, J. B. P.; RAMOS, M. N.; NETO, B. B.; MELO, S. J.; FALCÃO, E. P. S.; CATANHO, M. T. J. A. Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) of 4-Amino-2,6-diarylpyrimidine-Diarylpyrimidine-5-Carbonitriles with Anti-inflammatory Activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 2, p.337-343, 2008.

SONDHI, S. M.; JOHAR, M.; RAJVANSHI, S.; DASTIDAR, S. G.; SHUKLA, R.; RAGHUBIR, R.; LOWN, J. W. Anticancer, anti-inflammatory and analgesic activity evaluation of heterocyclic compounds synthesized by the reaction of 4-isothiocyanato-4-methylpentan-2-

one with substituted *o*-phenylenediamines, *o*-diaminopyridine and (un)substituted *o*-diaminopyrimidines. **Australian J. Chem.**, v. 54, p. 69–74, 2001.

TAYLOR, E. C.; MCKILLOP, A. **The Chemistry of Cyclic Enaminonitriles and Aminonitriles**. Advances in Organic Chemistry: Methods and Results. v. 7, p. 103-126. New York: John Wiley & Sons, 1970.

TOKUTAKE, N. **Multi-variate data related presentation and analysis**. Estados Unidos., Pat 1468368, 1977.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Rev. Drug. Disc.**, v. 4, p. 145-160, 2005.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

VOINEA, M.; SIMIONESCU, M. Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 6, n. 4, p. 456-474, 2002.

WEINBERG, R. A. A natureza do câncer. *In*: _____ **A Biologia do Câncer**, cap. 2, p. 25-56. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WHO, World Health Organization. **National cancer control programmes: policies and managerial guidelines**. Roma: WHO, 2002.

WHO, World Health Organization. **Preventing chronic diseases: a vital investment**. Geneve: WHO, 2005.

XIE, F.; ZHAO, H.; ZHAO, L.; LOU, L.; HU, Y. Synthesis and biological evaluation of novel 2,4,5-substituted pyrimidine derivatives for anticancer activity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, p. 275–278, 2009.

3 ANEXOS

3.1 Normas do Periódico ao qual o trabalho será submetido

Journal of Biomedical Nanotechnology

ISSN: 1550-7033 (Print):

EISSN: 1550-7041 (Online)

Copyright © 2000- 2013

American Scientific

Publishers. All Rights

Reserved.

Instructions for Authors

Journal of Biomedical Nanotechnology (JBN) is an interdisciplinary peer-reviewed journal focused on all aspects of nanoscale research in the fields of nanobiotechnology, medicine, biology, biomaterials, biomedical devices, and applications of nanotechnology in all fields of life sciences. JBN publishes original full papers and timely state-of-the-art reviews with author's photo and biography, and short communications encompassing the fundamental and applied research aspects.

JOURNAL POLICY: It is journal policy to publish only original and unpublished research work therefore **Journal of Biomedical Nanotechnology** does not wish to receive any papers on research work that has already been reported in parts or contains already published text, data, figures, tables or other illustrations or any copyright materials whatsoever that has been submitted or accepted for publication either in a journal or conference proceedings elsewhere in any form, in print or in electronic media. When submitting a manuscript, authors should make a full statement to the Editor-in-Chief or Editors that the research work contained in their manuscript is completely original and unpublished. If redundant or duplicate publication is attempted or occurs authors should expect immediate editorial action to be taken including prompt rejection of the submitted manuscript. Submission of any manuscript that contains redundant or duplicate publication of the same or very similar research work violates the policies of this journal.

ETHICAL COMPLIANCE: Research papers reporting animal or clinical studies should, where appropriate, contain a statement that they have been carried out with animal or human ethics committee approval. All scientific studies should be carried out in accordance with the relevant national and local guidelines. Each author(s) warrants that his or her research institution has fully approved the protocol for all scientific studies involving animals or humans and that all experiments of any kinds were conducted in compliance with ethical and humane principles of research after ethics committee approval.

SUBMISSION OF MANUSCRIPT: Authors are kindly advised to read **Journal of Biomedical Nanotechnology** policy and also the uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals as proposed by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>) before submitting their manuscript to Editor-in-Chief or Editors. Authors are encouraged to submit high quality original research work that has not been published or nor under consideration by other journals or conference proceedings elsewhere. Authors should submit manuscript Submit manuscript online to the [Manuscript Tracking System](#)

EDITORS-IN-CHIEF

Nongyue He

Professor of State Key Laboratory of Bioelectronics
School of Biological Science and Medical Engineering
Southeast University
Nanjing 210096, P.R. China
Phone: +86-25-8379-0885
Fax +86-25-8379-0885
Email: nyhe1958@163.com

Omathanu Perumal

Associate Professor
Department of Pharmaceutical Sciences
College of Pharmacy
257 Avera Health Science Bldg, Box 2202 C
South Dakota State University
Brookings, SD-57007, USA
Phone: (605) 688-4745
Fax: (605) 688-6232
Email: omathanu.perumal@sdstate.edu

Authors should submit a **list of FIVE (5) potential referees** accompanied with their complete mailing address, telephone, fax and email address, who may be contacted for reviewing the manuscript though refereeing, is done by anonymous reviewers. In order to ensure that the highest quality manuscripts are published, reviewing process is carried out in two stages. A mandatory editor's approval is required in the first stage for the manuscripts before it is submitted to the peer review process in the second stage.

COMMUNICATIONS: Highest priority will be given to the communications reporting important new scientific and technological findings. Rapid publication is provided for concise and up-to-date reports. These articles should not exceed three-four published pages. No section headings should be used for these short communications.

RESEARCH ARTICLES: Full length papers that report original research work on new ideas in the fields of biomedical nanotechnology.

REVIEWS: The state-of-the-art review articles with author's short biography and photo will

be published. Reviews are limited to a maximum length of 30 journal pages. It is author's responsibility to obtain written copyright permissions to reproduce any copyright materials from other sources. Authors are advised to cite proper references in figure/tables captions of all previously published figures/tables/illustrations including their own published work and obtain copyright permissions from appropriate publishers and authors.

TYPING: All manuscripts must be in English, typed double-spaced on one side of the page throughout (including footnotes, references, tables, legends) on 8.5" x 11" or A4 white paper leaving at least 1 inch left hand margin.

INTRODUCTORY MATERIAL: The first page of the manuscript should have a concise title limited to about 15 words and the names of all authors, complete mailing address for correspondence, telephone, fax numbers and email address. Please indicate with an asterisk (*) the author to whom correspondence regarding the manuscript should be directed.

ABSTRACT: All manuscripts must contain an informative 100 to 250 words abstract explaining the essential contents of the work, key ideas and results.

KEYWORDS: A list of 5-10 "Keywords" should be included with the abstract.

MAIN AUTHOR'S BIOGRAPHICAL SKETCH (FOR REVIEW ARTICLES ONLY): JBN publishes author's biographical sketch for the review articles. Prepare the sketch based on the following template.

10 cm	
Stamp Size Photo	Main Author's Biographical Sketch (5 - 8 sentences)

FIGURES: It is very important to supply high quality figures in a form suitable for reproduction. All figures, tables, illustrations, photographs should be prepared in such a way that they could be printed in a single column size with a width of 3 1/4 inches or 8.25 cm. Only if absolutely necessary should figures/tables/photos occupy double columns. Each figure must be referred to in the text and will be printed in black and white unless otherwise instructed by the authors. Each Figure should be submitted on a separate sheet and marked with the name of the author, title of manuscript and figure number. All formulae and figures should be carefully drafted and never drawn freehand. Use same font and size for all figure legends. High quality original figures and glossy prints of all photographs are required. Photocopies of the figures and photographs are not acceptable. Use 12 font for numbering and 14 font for legends.

MANUSCRIPT PROCESSING FEES: Authors should understand that there are many occurring publishing expenses per journal page associated with manuscript processing, editorial, production, typesetting, printing, paper, binding, shipping, web-hosting, and archiving. However authors pay no publication fees as well as the costs of any color figure/illustration in a print edition to American Scientific Publishers whatsoever, therefore, publisher is doing all services to authors free of costs and/or at fractional costs, hence, publisher is not obligated to provide any hard/softcopies of journal issue and/or research article to anyone whatsoever. Authors may download pdf file of their published papers from Ingenta after paying fractional costs. If authors require a hardcopy of the journal issue having their research articles then authors may also purchase hardcopies of the journal issue or subscribe to the journal by contacting the publisher. No free hard/softcopies of journal issue and/or research article are provided. On the other hand, if authors want to support the journal by paying full manuscript processing fees plus all costs of color figures/illustrations/photos in a print edition through their research grants or affiliated institutions, then publisher will provide hardcopy of journal issue or pdf file of his/her research article after receiving a full payment. American Scientific Publishers highly appreciate for author's kind understanding and support.

FREE COLOR PRINTING: Color illustrations are most welcome by the journal as they are effective in conveying complex graphs and photographs. Free color printing at the Editor-in-Chief's discretion, will provide an opportunity to publish color figures/illustrations in print at NO COST to the authors.

Half-tone illustrations should be supplied as clear, glossy, unmounted prints. The author's name, title of manuscript and figure number should be written on the back.

TABLES: Each table must be referred to in the text. Each table should be typed double-spaced on a separate sheet and identified sequentially by Arabic numerals corresponding to the order in which they appear in the text. Each table should have a brief explanatory title, which should be labeled unambiguously. The position of each table should be clearly marked in the text.

UNITS: Internationally accepted units of measurement must be used. The units of measurement are used in conjunction with their numerical values; the units should be abbreviated as suggested below. If more commonly used units are adopted, conversion factors should be given at their first occurrence. Greek symbols may be used. %, °C, nm, Å μ m (not m), mm, cm, cm³, m, h (or hr), min, s (or sec), Å μ g, mg, g (or gm), kg, cal, kcal, in. (or write out inch), ml [write out liter(s)].

The APS style guide can be used as a general reference on matter of units, grammar and formatting.

ABBREVIATIONS: No abbreviations are allowed in the title and abstract and should be defined the first time they are used within the text. The "Journal of Biomedical Nanotechnology" should be abbreviated as J. Biomed. Nanotech. for the citation purpose.

.

REFERENCES: References should be in the proper format on a separate page, numbered in the sequence (1,2,3,4,5, ..) in which they occur in the text. Cite the references in the text as Arabic numbers in one consecutive series by the order of appearance in the text, with the text citations presented as unparenthesized superscripts. Include the title of the article in the cited reference. References should be listed in the following style:

1. Journal Article

J. Davda, V. Labhasetwar, Sustained activity of vascular endothelial growth factor following encapsulation in nanoparticles., J. Biomed. Nanotechnol. 1, 74-82 (2005).

J. M. Koziara, P. R. Lockman, D. D. Allen, and R. J. Mumper, The Blood-Brain Barrier and Brain Drug Delivery, J. Nanosci. Nanotechnol. 6, 2712–2735 (2006)

2. Book

H. S. Nalwa, Editor, Handbook of Nanostructured Biomaterials and Their Applications in Nanobiotechnology, Vol. 1-2, American Scientific Publishers, Los Angeles (2005)

3. Chapter in a Book

T. Schalkhammer, in Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Edited H. S. Nalwa, American Scientific Publishers, Los Angeles (2004), Vol. 1, pp.329-360.

4. Conference Proceedings

J. Kimura and H. Shibasaki, Editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology, (1995) October 15-19; Kyoto, Japan

5. Patent

C. E. Larsen, R. Trip, and C.R. Johnson, Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. U.S. Patent 5,529,067, Jun 25 (1995).

Do not use the phrases "et al." and "ibid." in the reference section. Instead, the names of all authors in a reference must be listed.

ACKNOWLEDGEMENTS: These should be brief and placed at the end of the text before the references.

PROOFS: Page proofs for the correction of printer's errors only will be dispatched to the corresponding author denoted with an asterik (*) unless otherwise requested. Alterations at this stage are not allowed as they are expensive and may have to be charged to the authors. The proofread copy and reprint order form must be returned within 72 hours.

OFFPRINTS: Authors may order reprints of articles with a minimum of 100 from ASP prior to publication. An order form accompanying the page proofs will be sent directly to the author. Please return your reprint order form with the page proofs.

ELECTRONIC SUBMISSION: Upon acceptance of the manuscript for publication, authors should submit to the publisher a diskette or CD containing the final version of the manuscript accompanied by a hard copy printout to improve the accuracy and speed up the typesetting process. The disk or CD should be clearly labeled with the author's name, manuscript title, the date, and the hardware and software package used in preparation. The preferred medium is 3.5-inch diskette or a CD in Windows/MS-DOS or Macintosh having TeX. We are also able to accept line artwork/graphics on disk or CD if you supply us the source files to enables us to modify the artwork as required for the journal format.

REFEREING: If you are interested in reviewing the manuscripts for JBN, please send 15-20 keywords in the field of your research expertise, your short biography and your complete mailing address, phone, fax and email address to the Editors-in-Chief. Referee's report can be submitted by e-mail to the Editors-in-Chief. To speed up the reviewing process, editors will communicate with authors and the referees via email. ASP or Editors

will not return manuscripts to authors and keep any records whatsoever after a formal decision has been made about the manuscript. Editors have the right to reject the manuscript.

WARRANTIES AND COPYRIGHTS: By submitting the manuscript, the authors warrant that the entire work is original and unpublished; it is submitted only to this Journal and all text, data, figures/tables or other illustrations included in the research article are completely original and unpublished, and these have not been previously published or submitted elsewhere in any form or media whatsoever. All authors are responsible for the complete contents of their manuscript. The author(s) warrant that the work contains no unlawful or libelous statements and opinions and liable materials of any kind whatsoever, do not infringe on any copyrights, intellectual property rights, personal rights or rights of any kind of others, and does not contain any plagiarized, fraudulent, improperly attributed materials, instructions, procedures, information or ideas that might cause any harm, damage, injury, losses or costs of any kind to person or property. Each author(s) agrees to defend, indemnify, and hold harmless American Scientific Publishers and the Editors for any breach of such warranties. It is authors' responsibility to obtain written copyright permissions from other sources (publishers) for reproduction of any figures, tables, photos, illustrations, text or other copyright materials from previously published work. It is the policy of American Scientific Publishers to own the copyright of all contributions it publishes. To comply with the U.S. Copyright Law, a Copyright Transfer Form that transfer copyright of the article to the publisher must be completed by the authors prior to publication of an accepted article in this journal. Authors must submit a signed copy of the Copyright Transfer Agreement with their manuscript.

ETHICAL ISSUES: Authors cannot submit a manuscript for publication to other journals simultaneously. It is waste of valuable resources because editors and referees spent a great deal of time processing submitted manuscripts. It is also unethical to republish similar research articles (text/figures/tables) again because journals have limited page space and it most likely violates copyrights which have already been transferred to the first journal. Therefore, all journals require a signed author's copyright transfer agreement stating the originality of the research work submitted through a manuscript. As stated above that authors should submit original, new and unpublished research work to the journal. The ethical issues such as plagiarism, fraudulent and duplicate publication, violation of copyrights, authorship and conflict of interest are serious issues concerning ethical integrity when submitting a manuscript to a journal for publication.

WITHDRAWAL OF MANUSCRIPTS: If the author requests withdrawal of manuscript after submission within the time span when the manuscript is still in the peer-reviewing process with Editors/Referees, author is allowed to withdraw the manuscript without paying any withdrawal penalty whatsoever. However, it is unethical to withdraw a submitted manuscript from one journal if accepted by another journal. The withdrawal of manuscripts from the journals after submitting to the publisher will incur a withdrawal penalty from American Scientific Publishers. After the manuscript is accepted for publication either through journal editors or guest editors or conference organizers, the withdrawal is not permitted by American Scientific Publishers. If the authors or conference organizers or a third party withdraw manuscripts any time after final manuscripts have already been submitted to American Scientific Publishers for processing, the request is not entertained without a significant withdrawal penalty. Authors or conference organizers or a third party are not allowed to withdraw submitted manuscripts because the withdrawal wastes valuable manuscript processing time, money and works invested by the publisher. The

authors or conference organizers or a third party must always pay \$200 per page manuscript processing charges as withdrawal penalty to the publisher even if the withdrawal is permitted. The withdrawal of the conference papers by conference organizers will never be permitted and the conference organizers will be punished for withdrawal by paying a withdrawal penalty of US\$500 per manuscript. Withdrawal of manuscripts is only allowed after withdrawal penalty has been fully paid to the American Scientific Publishers by the authors or conference organizers or a third party. Any reason whatsoever of withdrawal of submitted manuscripts is treated as invalid and completely unacceptable under any circumstances. Publisher is not responsible for any damages whatsoever resulting from this consequence of the author's or conference organizer's or a third party decision. All questions or differences whatsoever concerning manuscripts withdrawal from American Scientific Publishers whether as to construction or otherwise, shall be held in the County of Los Angeles, California, United States of America.

UNAUTHORIZED CONFERENCES: American Scientific Publishers would like to caution potential authors that there are fraudulent activities going on in some countries where Conference Organizers are cheating fellow colleagues by falsely promising the publication of their research papers in SCIE/EI journals. It is very unfortunate to mention that some conference organizers are using the ASP logo and the journal titles/covers from ASP's websites without any authorization, which is completely illegal. Be aware that such conference organizers also disconnect emails and phones after receiving full payment for registration and publication charges from potential authors. Kindly be vigilant of such illegal activity. American Scientific Publishers is not responsible for such fraudulent activities and for any kind of damages brought on by the author's decisions. Author(s) hereby undertake to indemnify and hold harmless American Scientific Publishers and the Editors for any and all damages/claims/liabilities incurred from any and all actions by the conference organizers or any third party.

WARRANTIES FOR CONFERENCE ORGANIZERS: The Conference Organizer(s) submitting manuscripts to American Scientific Publishers warrant and represent that any material prepared by the Author(s) for the Journal shall be 100% new, original and unpublished in any form, shall not infringe upon or violate any copyright, trademark, obligation of confidentiality or other right or the privacy of others, or contain any libelous or unlawful statements or material or instructions that may cause harm or injury to a person or property; and that he/she will not include in the Journal any Article that the Editor believes or has any reason to believe may infringe or violate such rights or contain such material or matter or instructions that may cause harm or injury.

The Conference Organizer(s) submitting manuscripts to American Scientific Publishers represent and warrant that they have full power and authority to enter into this agreement. The Conference Organizer(s) agree to indemnify and hold the Publisher and any of its representatives harmless from any and all claims, demands, for any special, indirect, incidental, consequential or punitive damages of any kind whatsoever, including, but not limited to all liabilities, lost opportunities, costs, charges and expenses (including counsel fees) that the Publisher incurs or sustains arising out of any breach by the Conference Organizer(s) of the foregoing warranties and representations. The Conference Organizer(s) hereby agrees to indemnify and defend American Scientific Publishers from claims, costs, charges, damages, fees, expenses or liabilities of any kind whatsoever brought or preferred by any third party against Publisher.

The relationship between the parties is that of independent contractors and does not constitute a partnership and the Conference Organizer(s) shall have no authority to bind American Scientific Publishers in any way. All questions or differences whatsoever which

may at any time hereafter arise between the parties hereto concerning this Agreement or the subject matter thereof and whether as to construction or otherwise, shall be held in the County of Los Angeles, California. These terms and conditions shall be construed and interpreted under the laws of the State of California.