

NANOMEDICINA: DA UTOPIA À REALIDADE

Carina Crucho

Centro de Química-Física Molecular e Instituto de Nanociência e Nanotecnologia,
Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa
carina.crucho@tecnico.ulisboa.pt

Nanomedicine: from utopia to reality – *A very small particle can cast a very large shadow if we change the scale we see the world. With this new look, we will see armies of nanoparticles fighting sick cells with precision, leaving the healthy ones to follow its natural course. Between nanoparticles and grains of sugar, this PhD was focused in the synthesis and characterization of polymeric nanoparticles (PNPs), compounds with increasing pharmaceutical interest. However if medicine continues to be the keystone of the well-being of society, nanomedicine is already a reality. In the near future, we will undoubtedly see significant advances in the battle man vs disease.*

Uma partícula muito pequena pode projectar uma sombra muito grande, se mudarmos a escala com que vemos o mundo. Com este novo olhar, veremos exércitos de nanopartículas a combater de forma precisa células enfermas, deixando as saudáveis seguir o seu curso natural. Por entre nanopartículas e grãos de açúcar, este doutoramento teve como abordagem central a síntese e caracterização de nanopartículas poliméricas (NPPs), compostos de crescente interesse farmacêutico. Contudo se a medicina continua a ser a pedra basilar do bem-estar da sociedade, a nanomedicina já é uma realidade. Num futuro próximo, assistiremos indubitavelmente a avanços significativos no combate homem *versus* doença.

NANOTECNOLOGIA E A VISÃO FUTURISTA DE RICHARD FEYNMAN

No dia 29 de Dezembro de 1959, Richard Feynman lançou as primeiras ideias sobre a miniaturização. Durante a sua palestra, intitulada, “Há muito espaço lá em baixo”, Feynman visualizou uma tecnologia capaz de construir objectos átomo a átomo e inclusive chegou a propor que um dia os pacientes poderiam engolir o médico na forma de minúsculas máquinas. No entanto, as inúmeras possibilidades decorrentes da miniaturização também traziam grandes desafios para conseguir trabalhar a uma escala tão pequena.

"Os princípios da física, pelo que eu posso perceber, não falam contra a possibilidade de manipular as coisas átomo a átomo. Não seria uma violação das leis da Natureza; é algo que, teoricamente pode ser feito mas que, na prática, nunca foi levado a cabo porque somos grandes de mais" - Richard Feynman.

A mente humana estimulada pelo desafio, cedo fez desenvolver a capacidade moderna de ver e manipular átomos e moléculas através de equipamentos de alta precisão. Surgiu assim a nanotecnologia, que tem assumido um papel determinante em quase todos os aspectos da investigação científica e do desenvolvimento tecnológico.

O termo Nanotecnologia refere-se à manipulação da matéria a uma escala que varia de um átomo individual a moléculas com cerca de 100 nm. A esta escala fenómenos únicos permitem obter materiais com novas propriedades. Porém quão pequeno é um nanómetro? A escala nano representa a bilionésima parte de um metro, ou seja, cerca de 100 000 vezes mais pequeno do que a espessura de um cabelo (0,1 mm). Visualmente, a relação entre um nanómetro e uma

moeda de 1 cêntimo, seria o mesmo que comparar uma bola de futebol com a Lua! Uma escala verdadeiramente pequena. Contudo, da profecia de Feynman à realidade percorreu-se já um longo caminho e muitas aplicações da nanotecnologia estão actualmente no mercado [1].

QUERIDA, ENCOLHI OS FÁRMACOS!

Hoje em dia os avanços na nanotecnologia permitiram o aparecimento da nanomedicina que visa o diagnóstico e a terapia de doenças recorrendo à nanoescala [2]. Dentro do doseamento inteligente, o ideal é que o fármaco chegue ao sítio certo, na dose certa e no tempo certo. Mas, como é que o fármaco sabe? O fármaco não sabe e circula livremente por todo o nosso organismo. Vejamos o exemplo da aspirina. Quando tomamos uma aspirina, as suas moléculas vão para o nosso estômago, seguem para o intestino onde são absorvidas, entram na corrente sanguínea e circulam por todo o organismo. Como circulam livremente, no local onde temos a dor temos o efeito terapêutico, mas nos outros locais surgem os efeitos secundários, como por exemplo os efeitos colaterais da quimioterapia. Assim, o que os sistemas modernos de veiculação de fármacos pretendem é proporcionar alguma orientação, para que o fármaco chegue preferencialmente ao sítio de acção. Como os fármacos são geralmente moléculas pequenas, por exemplo a molécula da aspirina que tem cerca de 1 nm, é pequena o suficiente para atravessar a parede dos vasos sanguíneos em quase todas as regiões do corpo. Se a encapsularmos dentro de uma nanoestrutura com cerca de 30 a 200 nm em média, este veículo não vai ser capaz de atravessar a parede dos vasos sanguíneos em células saudáveis, porque o espaço entre estas células é de cerca de 2 a 6 nm. No entanto, nas regiões com um tumor, ou nas regiões inflamadas, estas cé-

lulas apresentam espaços entre si de até 1,2 micra. Assim, as nanoestruturas acumulam preferencialmente nestes tecidos através do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) (Figura 1). As nanopartículas também podem ser decoradas com moléculas que se ligam especialmente a receptores celulares sobreexpressos em células cancerígenas (Figura 1). Péptidos, açúcares e anticorpos, têm sido utilizados para aumentar a absorção celular, maximizando a concentração do fármaco no tumor. No entanto, a presença dos receptores não implica um aumento do número de nanopartículas que atingem os tumores se a biodistribuição estiver dependente do efeito de EPR.

A libertação controlada de fármacos no organismo também pode ser conseguida através do desenho de nanopartículas que alterem o seu comportamento macroscópico em resposta a estímulos específicos (Figura 1) [3]. Estes materiais podem responder ao microambiente particular de determinadas doenças, através de mudanças de pH, temperatura e força iónica. Estes gatilhos internos, juntamente com estímulos externos, como a alteração do campo magnético ou luz, permitem uma libertação temporalmente e espacialmente controlada.

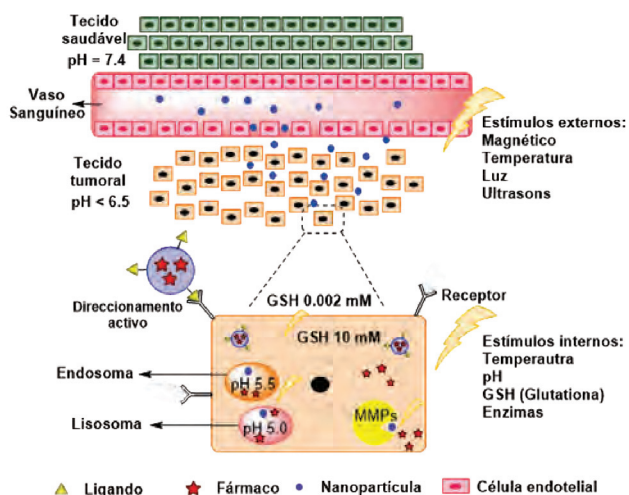


Figura 1 – Representação esquemática das várias estratégias desenvolvidas no desenho de sistemas de libertação controlada. Visão esquemática de um tecido doente apresentando ambientes intracelulares [3].

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E A NANOMEDICINA

A nanotecnologia é ubíqua na natureza onde nanoarquitecturas poliméricas desempenham um papel central nos sistemas biológicos. A eficiência da natureza na construção e montagem dos seus blocos básicos constituintes, tem impulsionado os químicos sintéticos a desenvolver nanoestruturas e respectiva incorporação em macroestruturas, procurando mimetizar a natureza. Neste contexto, um dos sistemas de veiculação mais estudados têm sido as nanopartículas poliméricas (NPPs) [4]. NPPs são partículas coloidais, que apresentam um tamanho na ordem dos 10 a 1000 nm, embora haja algum grau de ambiguidade na literatura quanto ao limite superior. Contudo, para aplicações *in vivo*, NPPs de tamanho intermédio (20-100 nm) apresentam maior potencial, devido à sua capacidade de circular no sangue durante longos períodos de tempo, bem

como os seus padrões de biodistribuição. Fármacos ou biomoléculas podem ser aprisionados ou adsorvidos nas NPPs e dependendo do método de preparação, podem ser obtidas nanocápsulas ou nanoesferas (Figura 2). Uma nanocápsula consiste num núcleo líquido na qual o fármaco está confinado e rodeado por uma membrana de polímero. Por outro lado uma nanoesfera tem uma estrutura do tipo matriz que consiste no fármaco e polímero dispersos uniformemente.

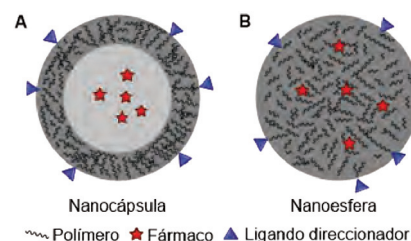


Figura 2 – Tipos de Nanopartículas Poliméricas: A, Nanocápsulas e B, Nanoesferas [3].

A escolha do polímero, o desafio de criar novos polímeros combinando propriedades hidrofílicas e lipofílicas e a capacidade de controlar a libertação do fármaco, têm sido intensivamente investigadas, de modo a modificar a distribuição do fármaco *in vivo*, ambicionando uma distribuição mais selectiva do mesmo e, assim um aumento do índice terapêutico.

Neste doutoramento prepararam-se NPPs de polietileno glicol (PEG) [5] e de poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) [6], incorporando uma unidade de açúcar e um ácido biliar (Figura 3). A síntese dos polímeros foi conseguida utilizando a experiência anterior do grupo em glúcidos [7,8]. Todos os conjugados poliméricos foram caracterizados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e por calorimetria diferencial de varrimento (DSC).

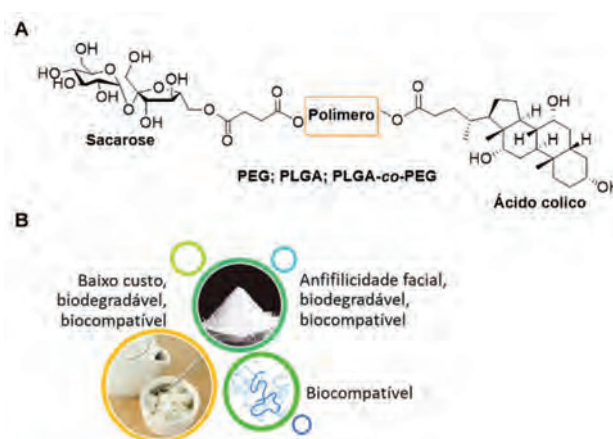


Figura 3 – A, Estrutura geral do conjugado polimérico sintetizado. B, Principais características dos blocos de construção utilizados.

A concentração de associação crítica (CAC) e a capacidade dos polímeros conjugados se auto-organizarem em meios aquosos foi estudada utilizando pireno como sonda fluorescente (Figura 4). O aumento da intensidade de emissão de fluorescência com o aumento da concentração de po-

límero indicou a incorporação de moléculas de pireno no domínio hidrofóbico dos conjugados.

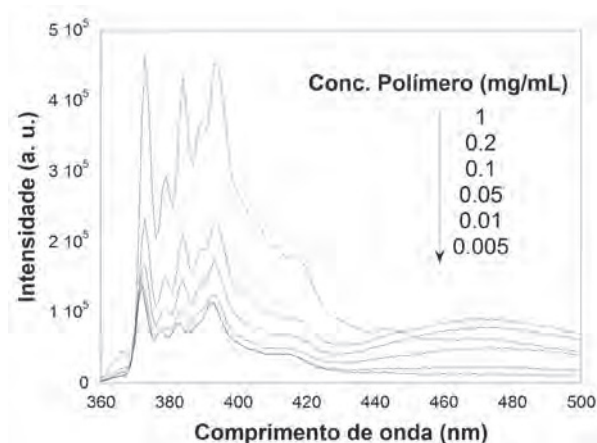


Figura 4 – Espectros de emissão de fluorescência do pireno/Sacrose-PEG-Cólico em função da concentração do polímero em água destilada [5].

A influência do método de preparação nas propriedades físico-químicas das NPPs foi analisada, assim como os efeitos de vários parâmetros experimentais inerentes. Por exemplo, as NPPs foram sintetizadas por dois métodos diferentes (Tabela 1), assim como para o melhor método estudou-se o tipo de solvente orgânico utilizado (Figura 5), a influência da concentração do polímero e a velocidade de evaporação do solvente.

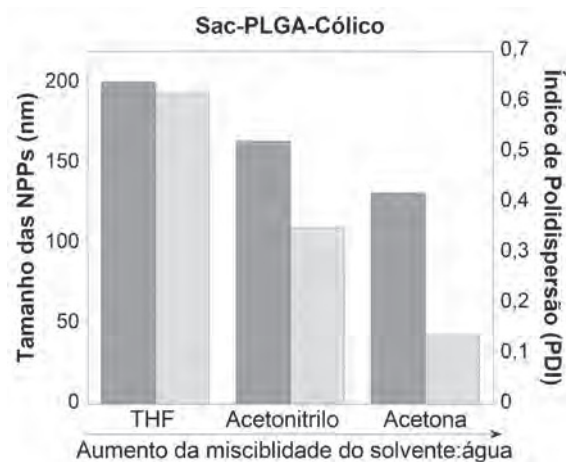


Figura 5 – Efeito da variação do solvente orgânico no tamanho (barra cinzenta) e no índice de polidispersão (barra listrada) das NPPs de Sacrose-PLGA-Cólico obtidas por nanoprecipitação [6].

O método da nanoprecipitação revelou ser o melhor procedimento para a síntese das nanopartículas. Este oferece vantagens de formulação simples à temperatura ambiente sem a utilização de tensoativos. As NPPs apresentaram um tamanho médio pequeno e adequado em torno de 100 nm, um valor baixo de polidispersão e uma carga superficial negativa, o que garante a estabilidade a longo prazo e evita a agregação das partículas.

As NPPs foram observadas por microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varrimento (SEM) (Figura 6). Após a preparação das NPPs, as condições pós-síntese, tais como a centrifugação e a liofilização, influenciaram as características morfológicas das partículas. Particularmente, a centrifugação aumentava substancialmente o seu tamanho. Na literatura este efeito é normalmente atribuído à liofilização. A secagem das partículas sobre pentóxido de fósforo foi explorada como uma alternativa à liofilização.

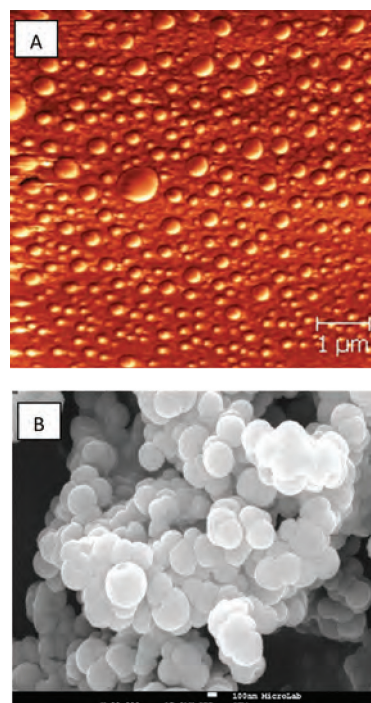


Figura 6 – A, Imagem de fase de AFM das NPPs liofilizadas de Sac-PEG2000-Cólico preparadas por nanoprecipitação, a partir de uma solução de 0,1 mg de NPPs/mL. B, Imagem de SEM das NPPs liofilizadas de Sac-PLGA-Cólico preparadas por nanoprecipitação [5,6].

Tabela 1 – Características físico-químicas das NPPs obtidas pelo método da nanoprecipitação e emulsificação - evaporação do solvente

| Polímeros | Nanoprecipitação | | | Emulsificação - evaporação do solvente | |
|--------------------|-----------------------|-------|---------------------|--|-------|
| | Tamanho das NPPs (nm) | PDI | Potencial zeta (mV) | Tamanho das NPPs (nm) | PDI |
| Sac-PEG2000-Cólico | 117 | 0,169 | -26 | 194 | 0,350 |
| Sac-PEG4000-Cólico | 96 | 0,280 | -19 | 205 | 0,400 |
| Sac-PEG6000-Cólico | 219 | 0,140 | -12 | 233 | 0,510 |
| PLGA | 96 | 0,47 | -12 | 370 | 1,39 |
| Sac-PLGA-Cólico | 132 | 0,140 | -28 | 488 | 0,520 |

A MARY POPPINS TINHA RAZÃO?

No clássico musical da Disney de 1964, Mary Poppins cantolava que “Uma colherada de açúcar ajuda o remédio a descer de uma maneira maravilhosa”, o que não estava muito longe da verdade.

A sacarose, açúcar que colocamos habitualmente no café, é onnipresente no reino vegetal, mas a razão para esta seleção natural não é evidente. É um composto de valor acrescentado, sendo uma matéria-prima com elevado potencial devido à sua ocorrência natural, produção em larga escala, baixo preço e natureza polifuncional [8].

Polímeros feitos com unidades de açúcar apresentam um elevado potencial para o desenvolvimento de sistemas de longa circulação, uma vez que conseguem circular no nosso organismo sem serem detectados precocemente pelo nosso sistema imunitário [9].

Para estudar a influência da unidade de sacarose nas propriedades físico-químicas das NPPs, foram preparados polímeros conjugados sem a molécula de sacarose. Como os melhores resultados tinham sido obtidos pelo método da nanoprecipitação, os mesmos parâmetros experimentais foram aplicados a estes conjugados. Contudo, os polímeros sem a unidade de sacarose eram muito insolúveis. Por conseguinte, ocorria a precipitação de agregados de polímero de dimensões superiores ao tamanho coloidal. Por outro lado, a presença da molécula de sacarose nos polímeros conduziu a valores de potencial zeta mais elevados, traduzindo-se em dispersões mais estáveis.

Em 2009, Song e seus colaboradores demonstraram que lipossomas modificados com unidades de sacarose apresentavam uma maior incorporação em várias linhas celulares de cancro, através de uma endocitose mediada por lectinas (proteínas que reconhecem a unidade da sacarose) [10]. NPPs funcionalizadas com unidades de açúcar podem assim, aumentar a afinidade para as lectinas existentes na superfície das células.

NANOMEDICINA, NANODOCES E PERSPECTIVAS FUTURAS

As nanopartículas têm conseguido construir progressivamente a sua história com uma ampla variedade de aplicações. Contudo, existem muitos desafios associados à nanomedicina e, talvez, um dos desafios mais importantes seja a transição da escala de laboratório para a escala industrial mantendo as mesmas propriedades físico-químicas e com elevado rendimento. Este é um ponto-chave que normalmente não é abordado na literatura.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que NPPs com unidades de sacarose constituem um sistema de veiculação de fármacos promissor. Este estudo abre ainda a possibilidade de incorporar pela primeira vez polímeros de sacarose em nanopartículas e beneficiar não só das propriedades de direcionamento do nanoveículo, mas também das propriedades únicas que a sacarose pode imprimir nas características físico-químicas das nanopartículas. Ademais o que propomos não é um fármaco novo, mas sim um veículo que pode transportar pelo nosso organismo alguns dos fármacos já existentes, o que constitui uma vantagem para se conseguir de forma rápida a aprovação pela FDA (*Food and Drug Administration*).

Aos poucos, a Ciência vai-se aproximando da visão futurista de Feynman. Os cientistas têm unido esforços no desenvolvimento de sistemas mais eficazes, com substâncias biocompatíveis, como por exemplo os açúcares, permitindo que o fármaco chegue na altura certa, na dose certa, ao sítio certo, aproveitando a janela da oportunidade antes de ser eliminado. Encaro com espírito entusiástico o meu futuro científico e o da nanomedicina.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Maria Teresa Barros, ao Prof. Christopher D. Maycock, a todos os que me ajudaram na concretização deste trabalho, e à FCT pela concessão da bolsa de doutoramento (SFRH/BD/71648/2010).

REFERÊNCIAS

- [1] I.Y. Wong, S.N. Bhatia, M. Toner, *Genes Dev.* **27** (2013) 2397-2408
- [2] R. Duncan, R. Gaspar, *Mol. Pharmaceutics* **8** (2011) 2101-2141
- [3] C.I.C. Crucho, *ChemMedChem* **10** (2015) 24-38
- [4] M. Elsabahy, K.L. Wooley, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 2545-2561
- [5] a) C.I.C. Crucho, M.T. Barros, *J. Mater. Chem. B* **2** (2014) 3946-3955 b) C.I.C. Crucho, M.T. Barros, *Microscopy and Microanalysis* **21** (2015) (Suppl. 6) 74-75
- [6] C.I.C. Crucho, M.T. Barros, *Polymer* **68** (2015) 41-46
- [7] C.I.C. Crucho, K.T. Petrova, R.C. Pinto, M.T. Barros, *Molecules* **13** (2008) 762-770
- [8] K.T. Petrova, P. Correia-da-Silva, C.I.C. Crucho, M.T. Barros, *Current Organic Chemistry* **18** (2014) 1788-1802
- [9] C.I.C. Crucho, P. Correia-da-Silva, K.T. Petrova, M.T. Barros, *Carbohydrate Research*, **402** (2015) 124-132
- [10] C.K. Song, S.H. Jung, D.-D. Kim, K.-S. Jeong, B.C. Shin, H. Seong, *Int. J. Pharm.* **380** (2009) 161-169

Faça-se sócio da SPQ, receba o Boletim QUÍMICA e tenha acesso:

Às últimas notícias do mundo da Química ■ A artigos de relevo sobre a Química ■ A entrevistas com membros ilustres da Química ■ A uma agenda dos mais importantes eventos sobre Química aqui e além fronteiras.