

André Brito Coimbra

Nanotecnologia na Saúde: Aplicações e Perspetivas

Monografia realizada no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Ana Rita Figueiras, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



Monografia

Nanotecnologia na Saúde: Aplicações e Perspetivas

A tutora

(Professora Doutora Ana Rita Figueiras)

O aluno

(André Brito Coimbra)

Eu, André Brito Coimbra, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2008028880, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacoterapêutico.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 12 de Setembro de 2013.

(André Brito Coimbra)

Agradecimentos...

Aos meus pais e irmão, não só pelo apoio e coragem ao longo destes cinco anos mas por tudo o que me proporcionaram até aqui;

À minha melhor amiga, por ter estado sempre, sem exceção, ao meu lado, por toda a força que me deu e por nunca duvidar de mim;

Aos amigos, pelo companheirismo e bons momentos que partilharam comigo;

À Professora Doutora Joana Isabel Paixão, pelo acompanhamento e aconselhamento prestados;

À Professora Doutora Ana Rita Figueiras, pela enorme disponibilidade, por todos os conselhos e ajuda dada na elaboração da monografia;

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por todos os ensinamentos que me prestou...

A todos o meu mais sincero agradecimento!

Índice

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de abreviaturas.....	vii
Lista de figuras.....	ix
1. Introdução.....	I
2. Nanotecnologia: definição e áreas de utilização.....	I
3. Nanotecnologia na Saúde e suas aplicações	2
3.1 Diagnóstico.....	4
3.1.1 Dispositivos de diagnóstico <i>in vitro</i>	4
3.1.1.1 Nanobiossensor	4
3.1.1.2 <i>Microarrays</i>	6
3.1.1.3 <i>Lab-on-a-chip</i>	8
3.1.2 Diagnóstico <i>in vivo</i>	8
3.1.2.1 Imagiologia	8
3.1.3 <i>Nano-harvesting</i> de biomarcadores	10
3.2 Nanofármacos.....	10
3.2.1 Sistemas de entrega de fármacos.....	11
3.2.2 <i>Nanothranostics</i>	13
3.3 Medicina Regenerativa.....	15
4. Perspetivas Futuras.....	17
5. Conclusão.....	18
6. Bibliografia.....	19

Resumo

Recentemente, as nanopartículas foram definidas como materiais com dimensão inferior a 100 nm. O seu estudo tornou-se uma área prioritária na investigação científica e desenvolvimento tecnológico.

A Nanotecnologia é um ramo da Ciência que enquadra todas as tecnologias e processos que manipulam ou exploram materiais à nanoescala, permitindo significativos avanços em áreas que, não sendo novas, começam a ser reinventadas. Nos últimos anos, estes materiais têm-se mostrado cada vez mais importantes para a medicina.

Um novo conceito, a nanomedicina, concilia a nanotecnologia e a medicina de forma a desenvolver novas terapêuticas e melhorar as já existentes.

Palavras-chave: nanotecnologia, nanomedicina, diagnóstico, terapia

Abstract

Nanoparticles have recently been defined as materials with dimensions under 100 nm. The study of these materials has become a priority area for scientific research and technological development.

Nanotechnology is a science field that brings together all the technologies and procedures that manipulate or study the materials at the nanoscale, allowing important developments in different areas. In recent years, these materials have gained an important role in modern medicine.

A new concept, nanomedicine, brings nanotechnology and medicine together in order to develop new therapies and improve the ones that already exist.

Key words: nanotechnology, nanomedicine, diagnostics, therapy

Lista de Abreviaturas

cDNA – DNA complementar

DNA – Ácido desoxirribonucleico

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

RNA – Ácido ribonucleico

MRI – Ressonância magnética molecular

MRS – Espetroscopia de ressonância magnética

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PET – Tomografia de emissão de positrões

QD – Quantum dots

SPECT – Tomografia de emissão de fóton único

UV – Ultra-violeta

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo das várias aplicações da nanomedicina.....	3
Figura 2 – Esquema geral de um biossensor.....	5
Figura 3 – Aplicações da tecnologia de <i>nanotheranostics</i>	15
Figura 4 – Esquema geral da tecnologia de <i>nanotheranostics</i>	15

"Os princípios da física, pelo que eu posso perceber, não falam contra a possibilidade de manipular as coisas átomo por átomo. Não seria uma violação da lei; é algo que, teoricamente, pode ser feito mas que, na prática, nunca foi levado a cabo porque somos grandes de mãos" - Richard Feynman, Prémio Nobel da Física 1965

1. Introdução

Durante muitos séculos, médicos e agentes de saúde pública procuraram auxiliar o corpo humano no seu esforço de se curar e reparar a si mesmo. De forma progressivamente mais célere, novos métodos e instrumentos foram adicionados à lista de ferramentas disponíveis para tal efeito: anestesia e técnicas de raio-x, antibióticos, técnicas de microcirurgia e, mais recentemente, técnicas como a biotecnologia, a medicina molecular ou a farmacogenómica.

Os constantes avanços e novas necessidades na investigação continuam a fomentar o desenvolvimento de novas áreas. Entre elas, uma das mais proeminentes e com maior rapidez de desenvolvimento é a nanotecnologia. Esta área tem sido foco de especial atenção e é alvo de grande entusiasmo devido ao seu potencial para revolucionar qualquer campo onde possa ser explorada.

Nem todos os avanços na nanotecnologia se reportam à saúde, nomeadamente à área médica. Os seus princípios e conceitos foram, aliás, desenvolvidos em estudos de outros campos do conhecimento, nos quais também despertou enorme interesse. Cientistas das mais diversas áreas de estudo (física, química, toxicologia, engenharia de materiais, entre outros) convergiram os seus interesses com o intuito de estudar e compreender a matéria à nanoescala.

2. Nanotecnologia: definição e áreas de utilização

As Nanociências e Nanotecnologias constituem abordagens à investigação e desenvolvimento que se referem ao estudo dos fenómenos e manipulação de materiais às escalas atómica, molecular e macromolecular, onde as propriedades diferem significativamente das de grande escala.

A nanotecnologia é uma área multidisciplinar de ciências aplicadas e engenharia que lida com o *design* e manuseamento de componentes e sistemas extremamente pequenos.

Pode definir-se como a ciência que estuda a compreensão e o controlo da matéria de dimensões entre 1 a 100 nanómetros, onde fenómenos únicos potenciam novas aplicações [1].

A comunidade científica atribui a primeira referência à importância da possibilidade de dominar a matéria à nanoescala ao físico vencedor de um Prémio Nobel, *Richard Feynman* na sua famosa conferência “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” na qual foi, pela primeira vez, proposta a teoria de que as propriedades dos materiais e aparelhos à nanoescala poderiam apresentar futuras oportunidades. Este cientista referiu que:

“I want to build a billion tiny factories, models of each other, which are manufacturing simultaneously... The principles of physics, as far as I can see, do not speak against the possibility of maneuvering things atom by atom. It is not an attempt to violate any laws; it is something, in principle, that can be done; but in practice, it has not been done because we are too big.” [1].

O termo “nanotecnologia” foi posteriormente criado e definido por *Norio Taniguchi*, professor da *Tokio University of Science*, em 1974 como uma “ciência que consiste principalmente no processamento da separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou uma molécula” [2].

O conceito foi depois popularizado e aprofundado nos anos 80 pelo engenheiro americano *Kim Eric Drexler*. À medida que a aceitação do conceito aumentou, o seu significado foi sofrendo alterações de modo a poder enquadrar as mais simples formas de tecnologia à escala nanométrica. A Iniciativa Nacional de Nanotecnologia foi criada, nos Estados Unidos da América, para financiar este tipo de tecnologia e a sua definição inclui qualquer elemento inferior a 100 nanómetros com propriedades novas [3].

A investigação em Nanotecnologia foca-se em perceber e criar materiais, dispositivos e sistemas melhorados que explorem essas propriedades.

Sendo uma área transversal aos vários domínios científicos, as suas aplicações são utilizadas em inúmeros setores tecnológicos e industriais como as tecnologias de informação, energias, ciências ambientais, medicina, segurança alimentar, transportes entre outros.

3. Nanotecnologia na Saúde e suas aplicações

Entre as várias aplicações da nanotecnologia, algumas das mais promissoras e com maior potencial para ter impacto direto na vida dos seres humanos estão relacionadas com

as ciências biomédicas. As nanociências e a nanotecnologia têm criado e transformado uma grande variedade de produtos e serviços passíveis de melhorarem a prática clínica e a saúde pública.

De acordo com *Richard Feynman*, a ideia original da utilização médica da nanotecnologia surgiu de *Albert R. Hibbs* a partir da sua teoria inicial:

“A friend of mine (Albert R. Hibbs) suggests a very interesting possibility for relatively small machines. He says that, although it is a very wild idea, it would be interesting in surgery if you could swallow the surgeon. You put the mechanical surgeon inside the blood vessel and it goes into the heart and looks around. (Of course the information has to be fed out.) It finds out which valve is the faulty one and takes a little knife and slices it out. [Imagine] that we can manufacture an object that maneuvers at that level!. Other small machines might be permanently incorporated in the body to assist some inadequately functioning organ.” [4].

O crescente interesse nas aplicações médicas da nanotecnologia levou ao aparecimento de uma área conhecida como nanomedicina.

A nanomedicina refere-se à aplicação da nanotecnologia no tratamento, diagnóstico, monitorização, prevenção e controlo de sistemas biológicos, tendo como principal objetivo melhorar a qualidade de vida das populações [4].

Algumas das mais importantes aplicações da nanotecnologia na área de medicina encontram-se esquematizadas na figura seguinte.

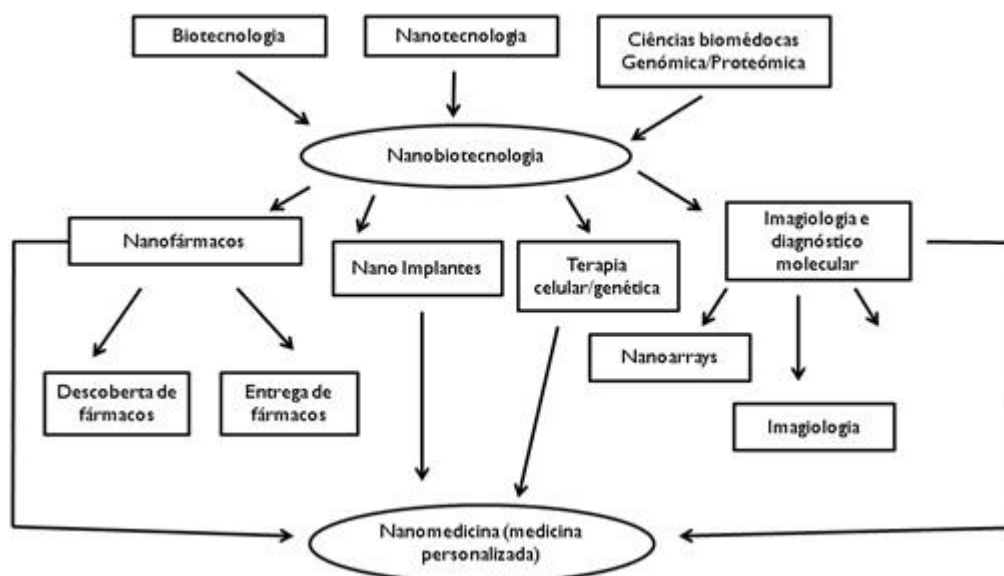


Figura 1 – Esquema representativo das várias aplicações da nanomedicina. Adaptado de [5]

3.1 Diagnóstico

3.1.1 Dispositivos de diagnóstico *in vitro*

Segundo a Directiva 98/79/CEE, de 27 de Outubro “Um dispositivo para diagnóstico *in vitro*, é qualquer dispositivo médico que consista num reagente, produto reagente, conjunto, instrumento, aparelho ou sistema, utilizado isoladamente ou combinado, destinado pelo fabricante a ser utilizado *in vitro* no exame de amostras provenientes do corpo humano, por forma a obter informações sobre estados fisiológicos ou estados de saúde, de doença, ou de anomalia congénita”.

O diagnóstico *in vitro* tradicional apresenta algumas condicionantes como o custo, deterioração da amostra, longa duração, resultados inconclusivos para amostras mais pequenas, entre outras.

O recurso à nanotecnologia trouxe uma nova geração de aparelhos de menores dimensões, mais rápidos e a custos menores e que não requerem manuseamento especializado, possibilitando, apesar disso, resultados fiáveis. Estes aparelhos necessitam de quantidades menores de amostra e podem fornecer resultados e dados biológicos muito mais completos a partir de uma medição [5].

3.1.1.1 Nanobiossensor

Um nanobiossensor define-se como um aparelho compacto de análise que incorpora um sensor contendo um elemento biológico, por exemplo um enzima, capaz de reconhecer e sinalizar a presença, atividade ou concentração de uma determinada espécie biológica. Os atributos principais dos biossensores são a sua especificidade e sensibilidade.

Um biossensor é geralmente composto por três elementos: o elemento biológico sensível, o detetor ou transdutor e um aparelho de leitura [6].

Na imagem seguinte encontra-se representado o esquema geral de um biossensor.

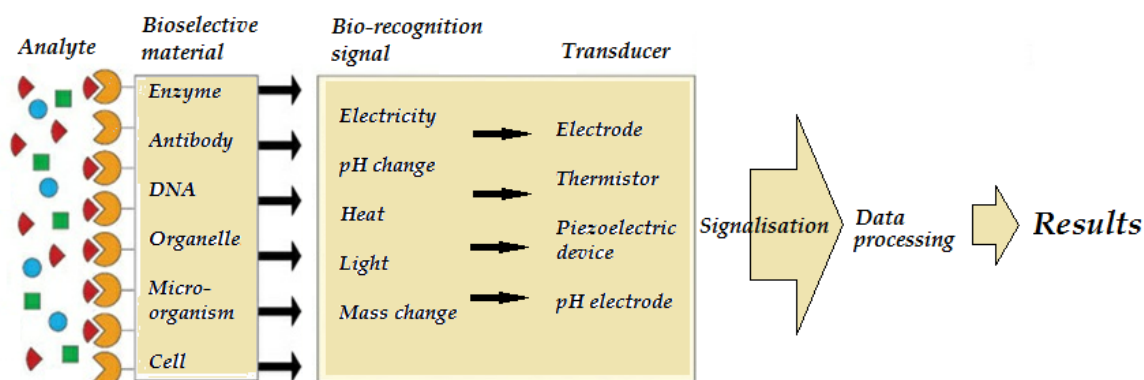


Figura 2 – Esquema geral de um biossensor. Adaptado de [7]

A interação entre um composto ou microorganismo de interesse e o elemento biológico do biossensor produz uma variação nas propriedades físico-químicas deste (por exemplo, pH, transferência de eletrões, calor, massa, entre outros) que são detetadas pelo transdutor. O sinal resultante indica a presença do analito de interesse e a sua concentração. Estes sensores utilizam métodos de medição baratos e diretos pelo que a sua produção se torna de baixo custo e são facilmente transportáveis. Permitem, também, a medição simultânea de vários parâmetros com recurso a um teste simples, efetivo e preciso [8].

A capacidade de detetar biomoléculas associadas a doenças, tais como metabolitos específicos, ácidos nucleicos, proteínas, patogénios e células, tais como as tumorais circulantes, é essencial, não só para o diagnóstico de uma doença, mas também para a investigação biomédica que envolve a descoberta e desenvolvimento de fármacos [6].

O estabelecimento de métodos rápidos e fiáveis que possam ser usados em laboratórios bioquímicos para determinação de substâncias em fluidos biológicos é uma necessidade urgente, bem como a facilitação da sua utilização por indivíduos com menor grau de especialização. Tem igualmente sido presenciado uma deslocação das análises nos laboratórios centralizados para o consultório de um médico ou para a casa do próprio doente.

A título de exemplo, algumas das principais aplicações dos nanobiossensores são:

- Biossensor de Glucose: A nanotecnologia foi incorporada nos sensores de glucose com duas abordagens principais. Em primeiro, os sensores podem ser desenhados utilizando componentes à macro ou micro escala (tais como elétrodos, membranas e *hardware* de suporte) incorporando uma superfície nanoestruturada ou um nanomaterial no seu *design*.

As propriedades destes materiais à nanoescala trazem diversas vantagens, como maior área de superfície e atividade catalítica melhorada. Em segundo, técnicas de nanofabricação podem gerar sensores de glucose que são completamente à nanoescala. Estes sensores oferecem algumas vantagens sobre os sensores tradicionais: são sensores injetáveis, o que facilita a administração em relação à corrente técnica de implantação; devido ao seu reduzido tamanho possuem a capacidade de evitar uma resposta do sistema imune tendo assim uma maior duração. No entanto, estes sensores são uma mudança radical em relação aos correntes aparelhos de medição contínua de glucose e é ainda necessária investigação para que possam ser usados nos pacientes [9].

- **Biossensor de DNA:** Os biossensores de DNA têm um papel importante no diagnóstico clínico de doenças hereditárias. A rápida deteção de infeções patogénicas e o *screening* de colónias de cDNA são necessários em biologia molecular. Os métodos convencionais de análise de sequências de genes específicas são baseados ou na sequenciação direta ou hibridização de DNA [10].

Devido à sua simplicidade, a maior parte das técnicas utilizadas baseiam-se na hibridização. Várias técnicas de imobilização como adsorção, ligação covalente, ou a imobilização envolvendo complexação avidina-biotina foram adotadas para uma sonda de DNA para a superfície de um transdutor eletroquímico.

3.1.1.2 Microarrays

Os *arrays* têm-se tornado, cada vez mais, numa extensa variedade de ferramentas para estudos biológicos. Tradicionalmente, os *arrays* consistem em coleções de moléculas – tipicamente cDNA ou oligonucleótidos, ligadas a um substrato, normalmente uma lâmina de vidro e em posições pré-determinadas, formando um padrão em rede. No entanto, hoje em dia, os formatos são mais diversos. Existem vários tipos de tecnologias de *microarray*; não só de DNA mas também de proteínas, hidratos de carbono, moléculas com propriedades farmacológicas, células ou tecidos [11].

Apesar das suas variadas “arquiteturas”, todos os *arrays* partilham uma característica comum: esta tecnologia permite análises *multiplex*, ou seja, permite a realização de múltiplos testes simultaneamente, quer recorrendo à medição de vários analitos numa só amostra, quer várias amostras serem testadas ao mesmo tempo para um analito específico [11].

Os *microarrays* de DNA são suportes sólidos, pequenos, nos quais sequências de diferentes genes são imobilizadas. Estes suportes são normalmente lâminas de vidro microscópico, podendo também ser *chips* de silicone ou membranas de *nylon* [12]. Estas sequências são usadas para determinar se há ou não emparelhamento por complementaridade com as sequências em estudo [13].

Esta tecnologia é utilizada para testar padrões de expressão de uma doença bem como para determinar a suscetibilidade individual a patologias várias [14].

Os *microarrays* de proteína compreendem detetores de proteínas (normalmente anticorpos) arrançados de forma sistemática numa lâmina de vidro que permite a investigação de perfis de expressão e a definição precisa das funções da proteína em relação a processos biológicos [15].

Os *microarrays* de tecido permitem a análise simultânea da expressão de proteínas, RNA e DNA em múltiplas amostras de tecidos biológicos [16].

As principais aplicações de *microarrays* utilizadas estão sumariadas em baixo [17]:

- Análise da expressão genética, usada para determinar padrões de expressão genética e simultaneamente quantificar a expressão de um largo número de genes, permitindo a comparação da sua ativação entre tecidos saudáveis e alterados;
- Detecção de mutações e polimorfismos mesmo em genes complexos;
- Sequenciação de pequenos fragmentos de DNA;
- Seguimento de terapias, permitindo a avaliação de características genéticas que podem afetar a resposta terapêutica;
- Medicina preventiva, desenvolvimento do conhecimento das características genéticas de doenças, de forma a tratar e prevenir antes do aparecimento de sintomas;
- *Screening* de potenciais moléculas terapêuticas e toxicologia, analisando alterações na expressão de genes durante a administração de um fármaco, assim como localizar novos possíveis alvos terapêuticos e testar efeitos toxicológicos associados;
- Diagnóstico clínico, permitindo a rápida identificação de agentes patogénicos com recurso a marcadores genéticos apropriados.

3.1.1.3 Lab-on-a-chip

Trata-se de um aparelho que integra uma ou várias funções laboratoriais num único *chip* de milímetros. Um dos conceitos chave com que esta tecnologia lida é a “*microfluidics*”

uma vez que lida com volumes extremamente pequenos de fluido. Estes aparelhos incorporam funções como a preparação da amostra, purificação, armazenamento, mistura, deteção, entre outras. Entre as vantagens da utilização deste tipo de tecnologia inclui-se a rápida análise de amostras que podem ser pequenas, facilidade de utilização e o baixo custo. É utilizado em *immunoassays* e PCR para deteção de bactérias, vírus e células cancerígenas e ainda para extração do respetivo DNA [18].

Estes aparelhos podem ser utilizados em vários tipos de teste, destacando-se:

- Deteção de ácidos, proteínas e células relevantes para o diagnóstico de diferentes doenças;
- Isolamento de células, reconhecimento e marcação de biomarcadores para deteção de alguns tipos de cancro, evitando assim a realização de uma biopsia;
- Deteção de conjuntos de proteínas presentes na saliva para diagnóstico cardíaco, do vírus HIV e outras proteínas indicativas de uma subida nos níveis virais, associadas à progressão da doença, tendo como vantagem a capacidade de monitorizar marcadores virais e imunológicos num único *chip* [19].

3.1.2 Diagnóstico *in vivo*

3.1.2.1 Imagiologia

A imagiologia tornou-se essencial ao longo dos últimos anos. Inicialmente, apenas se conseguiam detetar alterações na aparência dos tecidos quando os sintomas se encontravam já relativamente avançados. Mais tarde, foram introduzidos os agentes de contraste para facilitar a identificação. Hoje em dia, através da aplicação da nanotecnologia, tanto os métodos imagiológicos como os de contraste têm sido melhorados com o objetivo de possibilitar a deteção da doença o mais precocemente possível.

A imagiologia convencional é realizada com a inserção de corantes na amostra. Alguns problemas que ocorrem neste tipo de imagiologia são a ocorrência de uma intensidade de fluorescência inadequada e a fotodegradação, para além da potencial iatrogenia para o doente [20].

A nanotecnologia permitiu a criação de novos agentes de contraste para a imagiologia médica. A associação da nanotecnologia a esta área da medicina é sem dúvida revolucionária.

O termo “imagiologia molecular” pode ser definido como a caracterização e medição *in vivo* de processos biológicos a nível celular e molecular [21]. Os principais benefícios da imagiologia molecular no diagnóstico *in vivo* são a possibilidade de deteção precoce da doença e a monitorização da sua evolução (por exemplo, do processo de metastização) [8].

Existem vários tipos de imagiologia, nomeadamente, bioluminescência ótica, fluorescência ótica, ultrassons dirigidos, ressonância magnética molecular (MRI), espetroscopia de ressonância magnética (MRS), tomografia de emissão de fóton único (SPECT) e tomografia de emissão de positrões (PET) [22].

- Imagiologia ótica

Esta tecnologia é um método relativamente pouco dispendioso. Na imagiologia de fluorescência, a luz de excitação ilumina a amostra e a luz de emissão é recolhida noutra comprimento de onda. As nanopartículas melhor estudadas para aplicação na imagiologia ótica são os *quantum dots*(QDs). Tratam-se de nanopartículas compostas por moléculas inorgânicas semicondutoras que emitem forte luz fluorescente quando iluminadas por luz ultravioleta (UV) e que possuem várias propriedades vantajosas para imagiologia biológica, nomeadamente, alto coeficiente de extinção molar, resistência à fotodegradação e degradação química, entre outras.

Como são substâncias inorgânicas, os QDs são insolúveis em soluções aquosas. Sendo assim, é importante o seu revestimento com uma fina camada de um material solúvel em água. Este passo é, normalmente, seguido pelo revestimento por um material que ligue preferencialmente a uma célula ou componente celular específico. A superfície de cada QD possui um grande número de locais onde moléculas solúveis e/ou bioativas se podem ligar. Além disso, mais do que um tipo de moléculas se pode ligar a cada QD conferindo-lhe múltiplas funcionalidades [20].

- MRI molecular

MRI é uma técnica de diagnóstico não-invasiva baseada na interação de certos núcleos (tipicamente protões) entre si e com as moléculas circundantes num tecido de interesse. Esta técnica utiliza a espetroscopia magnética de ressonância para analisar átomos de hidrogénio que estão naturalmente presentes no tecido. Diferentes nanopartículas têm sido utilizadas com êxito como agentes de contraste com capacidade resolutiva para áreas como

os rins ou o cérebro, células cancerígenas e pequenas metástases, tais como as linfáticas em doentes com cancro da próstata [20].

3.1.3 *Nano-harvesting* de biomarcadores

Os investigadores que tentam identificar biomarcadores de determinada doença no sangue deparam-se com dois problemas principais. Um deles é que duas proteínas (albumina e imunoglobulina) correspondem a 90% das moléculas do sangue, enquanto qualquer potencial biomarcador só se encontrará em quantidades ínfimas. Muitas das moléculas presentes no sangue estão ligadas a estas duas proteínas principais, dificultando a sua posterior análise. Para além disso, muitos dos potenciais biomarcadores são proteínas que sofrem rápida degradação por vários enzimas presentes no sangue quase imediatamente após a colheita do mesmo [23].

A nanotecnologia oferece novas abordagens para poder contornar estas barreiras. Uma dessas abordagens consiste nas nanopartículas designadas por *smart hydrogel coreshell*. Uma partícula de hidrogel é uma partícula de dimensões sub-micrométricas composta de polímeros hidrofílicos capazes de dilatar e contrair em resultado de um estímulo ambiental como a temperatura, pH, ou um campo elétrico. Estas partículas permitem a captura, o enriquecimento e encapsulamento de classes selecionadas de proteínas e peptídeos de misturas complexas de biomoléculas como plasma, evitando a sua degradação durante o manuseamento da amostra. Os analitos capturados podem ser extraídos das partículas por eletroforese permitindo a subsequente análise quantitativa [23].

À medida que os biomarcadores presentes no sangue forem sendo melhor caracterizados, as plataformas de “*nano-harvesting*” terão um potencial cada vez maior para melhorar a deteção de uma doença num estado que se pretende cada vez mais precoce.

3.2 Nanofármacos

O foco da prática farmacêutica engloba aspetos mais tradicionais como a preparação e administração de fármacos, pelo que a grande maioria das patologias é abordada com a terapêutica farmacológica que vai desde pequenas moléculas de síntese químicas a moléculas biológicas. No entanto, o uso de fármacos sistémicos pode produzir alguns efeitos laterais. De forma a tentar evitar esses mesmos efeitos e melhorar algumas das características dos

fármacos tradicionais, nomeadamente a biocompatibilidade, solubilidade ou a estabilidade tem sido desenvolvida uma nova área - a dos nanofármacos.

O termo “nanofármacos” designa os produtos farmacêuticos desenhados com recurso à nanotecnologia e inclui a descoberta, desenvolvimento e administração do fármaco.

3.2.1 Sistemas de entrega de fármacos

A entrega do composto terapêutico ao seu alvo é um problema no tratamento de várias doenças. A administração convencional de fármacos é caracterizada por uma eficácia limitada, fraca biodistribuição e falta de seletividade. Estas limitações podem ser evitadas recorrendo à libertação controlada dos princípios ativos. Neste sistema, o fármaco é levado para o seu tecido alvo minimizando assim a sua influência noutras células com os consequentes efeitos laterais indesejáveis [24].

Este sistema de entrega pode ser alcançado ligando o fármaco a transportadores individualmente desenhados designados por nanoveículos. Estes, são compostos à nanoescala usados como ferramentas terapêuticas e desenhados para se acumular especificamente nos locais do organismo onde são necessários de forma a melhorar os resultados farmacoterapêuticos. O principal objetivo desta aplicação é aumentar a eficácia terapêutica, ao mesmo tempo que se obtém uma menor toxicidade. Devido às pequenas dimensões destes nanomateriais, estes não são reconhecidos pelo organismo evitando possíveis respostas imunológicas [5].

O processo utilizado para a conjugação do fármaco com o veículo e a sua estratégia de direcionamento são muito importantes para esta terapia. O fármaco pode ser adsorvido, ligado covalentemente à superfície do transportador, ou encapsulado por este. A ligação covalente tem a vantagem de possibilitar controlar o número de compostos terapêuticos que se ligam. A entrega num alvo específico é alcançada utilizando mecanismos ativos ou passivos. A primeira estratégia baseia-se na atração do fármaco pelo transportador; este último conjuga-se no local afetado utilizando ligandos de reconhecimento de baixo peso molecular, ligados à superfície de anticorpos. Após a chegada do conjugado fármaco-nanoveículo aos tecidos alvo, os agentes terapêuticos são libertados; sendo o controlo desta libertação feito através de alterações no ambiente fisiológico, tais como temperatura, pH, osmolalidade ou via atividade enzimática [24].

As nanopartículas podem ultrapassar os efeitos laterais das chamadas terapêuticas convencionais pelos seguintes meios: possibilitando uma libertação prolongada do fármaco; aumentando a permeabilidade passiva (ou seja, por exemplo, direcionamento para o tecido tumoral); direcionando como alvo a superfície celular, recorrendo a ligandos associados à internalização por endossomas com a rutura das membranas, permitindo a libertação do fármaco no citoplasma, e protegendo-o da degradação enzimática [8].

Dos principais objetivos da libertação controlada do fármaco destacam-se a diminuição dos efeitos laterais das terapias convencionais, ao reduzir de forma significativa a concentração do fármaco no organismo; a melhoria dos perfis farmacocinético e farmacodinâmico; permitir a administração intravenosa de alguns fármacos ao aumentar a sua solubilidade; reduzir a perda de fármaco no seu ciclo e aumentar a concentração no alvo; melhorar a estabilidade e evitar a degradação do fármaco; alcançar um *uptake* celular e entrega intracelular ótimos; e assegurar biocompatibilidade e biodegradabilidade [8]. Alguns exemplos de partículas utilizadas nesta técnica são explanados de seguida:

- **Micelas:** uma micela trata-se de um agregado de moléculas anfílicas que surge espontaneamente mediante a sua imersão em água, formando, mediante estabelecimento de interações hidrofóbicas, vesículas esféricas. Caracterizam-se por possuírem um núcleo hidrofóbico, no qual, substâncias hidrofóbicas, como compostos farmacológicos, podem ser introduzidas para libertação em diferentes partes do organismo [25].

- **Nanoemulsões:** são sistemas heterogêneos que consistem em duas fases imiscíveis, uma fase oleosa e outra aquosa. São utilizados diferentes tipos de surfactantes para estabilizar a emulsão, prevenindo que a fase dispersa coalesça numa fase macroscópica. Ao contrário das emulsões normais, as nanoemulsões são termodinamicamente e cineticamente estáveis; são limpas e translúcidas; possuem maior área de superfície em relação ao volume e maior energia livre; a quantidade de surfactante necessário para a sua estabilização é também menor [26].

A capacidade das nanoemulsões para dissolver grandes quantidades de compostos hidrofóbicos, assim como a sua compatibilidade e habilidade para proteger o fármaco de hidrólise e degradação enzimática, torna-as os veículos ideais para o transporte parenteral. Além disso, a frequência e dosagem das injeções podem ser reduzidas ao longo do período

de terapia, uma vez que estas emulsões garantem a libertação do fármaco de uma forma sustentada e controlada [27].

- **Dendrímeros:** são uma classe de polímeros sintéticos que possuem peso molecular monodisperso e uma estrutura tri-dimensional ramificada bem definida. O tamanho e forma dos dendrímeros dependem do número de ramos e dos constituintes destes. Os dendrímeros acomodam pequenas moléculas e nanopartículas no seu interior através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas [28]. Estas estruturas são utilizadas para transportar fármacos de duas maneiras: a) ao ligar moléculas de fármaco a grupos funcionais na superfície dendrímica; b) ao prender o fármaco nos canais dendríticos dentro da esfera [8].

- **Lipossomas:** Os lipossomas são estruturas vesiculares esféricas formadas por uma bicamada lipídica composta de moléculas de fosfolípidos e colesterol caracterizados por duas fases separadas, uma hidrofílica e outra hidrofóbica.

A eficácia dos lipossomas como veículo de fármacos está relacionada com a sua farmacocinética e depende das condições físico-químicas (e.g. tamanho, carga, dose, via de administração). Uma vantagem dos lipossomas é a sua longa persistência na corrente sanguínea. Estudos realizados demonstraram que os lipossomas são capazes de aumentar a solubilidade de fármacos e melhorar as suas propriedades farmacocinéticas [24].

O fármaco é incorporado no lipossoma por um processo de encapsulação. A libertação do fármaco depende da composição do lipossoma, do pH, do gradiente osmótico e do ambiente circundante. Adicionalmente, proporcionam ao fármaco encapsulado um tempo prolongado de residência aumentando a sua duração de ação. As interações dos lipossomas com as células podem ocorrer por: adsorção, fusão, endocitose e transferência lipídica [24].

3.2.2 *Nanotheranostics*

O termo *nanotheranostics* define a integração e combinação das modalidades de terapêutica e diagnóstico num único sistema, utilizando para tal os benefícios da nanotecnologia [29]. O seu objetivo é desenvolver estratégias terapêuticas específicas e individualizadas em direção a uma medicina personalizada, tendo em conta o facto de que uma eficácia aceitável num determinado tratamento seria alcançada apenas em alguns

pacientes. Ao combinar diagnóstico e terapêutica num único agente, surge um novo tipo de protocolo, permitindo adaptar o tratamento com base nos resultados dos testes [30].

A ideia surgiu do facto de doenças, como por exemplo o cancro, serem muito heterogéneas, e os tratamentos existentes são eficazes apenas em algumas subpopulações de pacientes e em determinados estágios da progressão da doença [31].

Uma das características mais promissoras da utilização das nanopartículas como agentes de *theranostics* é a possibilidade de as direcionar a locais específicos e diminuir os efeitos secundários indesejados. Devido ao seu tamanho reduzido, há uma menor probabilidade de eliminação renal, aumentando o tempo de circulação na corrente sanguínea. Além disso, os vasos sanguíneos tumorais têm tendência a ser irregularmente dilatados e permeáveis permitindo assim às nanopartículas extravasar dos vasos para o tecido. Outra importante vantagem, é a sua maior área de superfície em relação ao volume, aumentando a sua capacidade de ligação de agentes terapêuticos e de imagiologia, ou a própria existência de agentes de imagiologia em alguns dos nanomateriais utilizados [30].

Ao combinar a imagiologia molecular com a terapia molecular, esta tecnologia pode ser aplicada em diversos campos da medicina personalizada, tais como, deteção precoce da doença, determinação do estágio da doença, seleção da terapia, planeamento da terapia, reconhecer possíveis efeitos adversos em momentos iniciais do tratamento e planeamento de terapias de *follow-up*. Um sistema de *theranostic* utilizado em pacientes que sofram de cancro, por exemplo, consistiria em diagnosticar, em primeiro lugar, o tipo e classe de cancro, fazer imagiologia e perceber a heterogeneidade do tumor, aplicar um tratamento adaptado baseado no diagnóstico e resultados da imagiologia e, por fim, monitorizar a eficácia do tratamento [29].

Outro exemplo, consiste na identificação de um biomarcador que esteja expresso de forma exagerada na superfície das células cancerígenas, ligando seguidamente um vetor que permita o seu reconhecimento aos nanoveículos de forma a permitir a sua veiculização para o tumor [31].

As figuras seguintes representam, respetivamente, alguns exemplos de aplicações concretas desta tecnologia e um esquema geral da mesma.

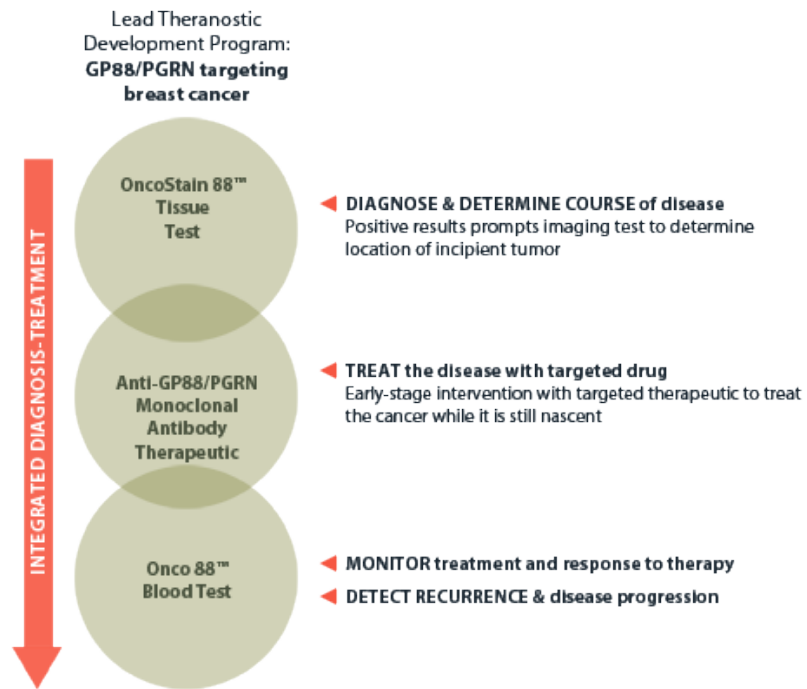


Figura 3 – Aplicações da tecnologia de *nanotheranostics*. Adaptado de [32]

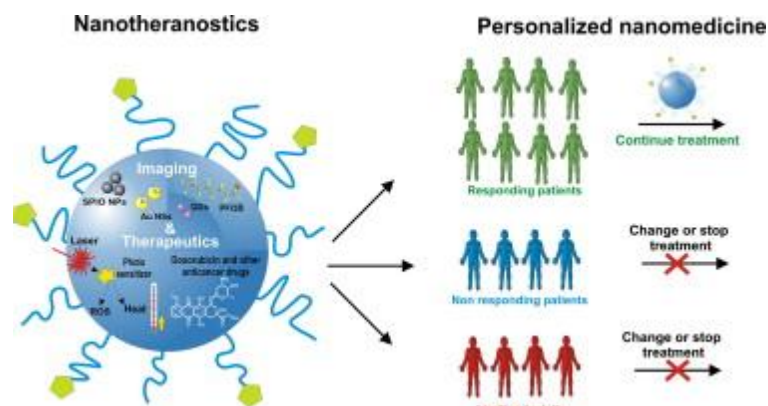


Figura 4 – Esquema geral da tecnologia de *nanotheranostics*. Adaptado de [33]

3.3 Medicina Regenerativa

A engenharia de tecidos aproxima princípios e inovações da engenharia e das ciências biomédicas para o melhoramento, reparação ou substituição da função de um tecido/órgão. Desde a conceção da ideia, este campo tem sido regido pelo conceito genérico de combinar

propriedades celulares com diversas abordagens tecnológicas no *design* e fabrico de novos tecidos/órgãos [34].

Todos os tecidos ou órgãos do nosso corpo são compostos por células do parênquima e mesênquima que se encontram numa matriz extracelular para formar um microambiente, e estes, coletivamente, formam os nossos tecidos ou órgãos. Em termos de desenvolvimento e manutenção dos tecidos e órgãos, o nosso organismo atua como um biorreator expondo o microambiente da célula e a matriz extracelular a forças biomecânicas e sinais bioquímicos.

O principal objetivo desta técnica é permitir ao organismo curar-se a si próprio ao introduzir um tecido desenvolvido exteriormente mas que o corpo reconhece como sendo seu, usando-o para regenerar tecidos funcionais [34].

Tem sido colocada a hipótese que de forma a replicar todas as reações intercelulares essenciais e promover respostas intracelulares normais, deve ser conseguida a mimetização da matriz extracelular. Esta matriz extracelular deve ser desenhada de acordo com alguns requisitos. O primeiro é que o material deve ser biocompatível e funcionar sem interromper outros processos fisiológicos; em segundo, o *scaffold* não deve promover ou iniciar qualquer tipo de reação adversa no tecido; a produção do *scaffold* deve ser simples mas versátil, de forma a produzir tecidos de diferentes formas, tamanhos e/ou forças [34].

Esta tecnologia aborda duas estratégias principais. A primeira consiste em semear e expandir células estaminais do paciente em *scaffolds* 3D num biorreator. O tecido híbrido resultante é depois implantado no paciente (juntamente com fatores de crescimento) como uma matriz de tecido. A necessidade de colher e expandir as células estaminais coloca ainda alguns problemas de eficácia e eficiência no processo. A segunda estratégia baseia-se no desenvolvimento de materiais inteligentes que são capazes de enviar sinais às células estaminais já presentes no tecido doente ou ferido que permitem despoletar um processo de regeneração [35].

No entanto, atualmente, apenas algumas técnicas são capazes de produzir eficazmente nanofibras e subsequentemente *scaffolds* [34].

4. Perspetivas Futuras

O recurso à nanotecnologia e às nanopartículas tem permitido enormes contribuições à prática clínica. Pode oferecer soluções interessantes para várias doenças que ameaçam a vida. Algumas doenças que se espera serem das mais beneficiadas pela nanotecnologia nos próximos anos são cancro, doenças cardiovasculares, pulmonares, de sangue, doenças neurodegenerativas, diabetes, doenças infecciosas, problemas ortopédicos e doenças como *Alzheimer* ou *Parkinson* [36].

Esta tecnologia tem alterado a forma como as doenças são diagnosticadas, tratadas e prevenidas. Nos últimos anos a aposta no campo da nanotecnologia cresceu exponencialmente e prevê-se que assim continue nos próximos anos. Aparelhos multifuncionais capazes de detetar e monitorizar doenças, “conduzir” medicamentos, entre outros estarão brevemente ao nosso alcance [37].

De seguida, são apresentadas algumas das aplicações que se encontram atualmente em fase de investigação [38]:

- **Sequenciação de nanoporos:** trata-se de um método ultra-rápido de sequenciação baseado na nanoengenharia e montagem de poros. Um pequeno potencial elétrico “empurra” uma cadeia de DNA carregada através de um poro com 1-2nm de diâmetro num complexo de proteína alfa-hemolisina, inserida numa camada bilipídica que separa dois compartimentos condutores. O perfil de tempo e da cadeia são recolhidos e posteriormente traduzidos para sinais elétricos para identificar cada base. Este método pode sequenciar mais de 1000 bases por segundo. Esta tecnologia tem muito potencial para a deteção de polimorfismos em nucleótidos, e para diagnóstico de patogénios em genes [39], [40]

- **Microagulhas:** Agulhas e lancetas micromanipuladas com capacidade de ajustar ângulos de entrada, espessura da parede e dimensão do canal foram construídas a partir de cristais de silicone combinando ligação por fusão, fotolitografia e *anisotropic plasma etching*. Esta tecnologia está a ser aplicada na administração indolor de fármacos, injeções celulares e em vários procedimentos de diagnóstico (por exemplo monitorização de níveis de glucose) [41].

- **Microchips para entrega de fármacos:** são aparelhos microfabricados, que incorporam bombas, válvulas e canais de fluxo à microescala, permitindo a libertação controlada de um ou vários fármacos. Estes aparelhos são particularmente úteis para tratamentos de longa duração em doenças que requerem a libertação “pulsátil” do fármaco. O mecanismo de libertação é baseado na dissolução eletroquímica de membranas finas que cobrem um microreservatório onde se encontram os fármacos. Assim, os sistemas de libertação controlada podem ser desenhados de forma a libertar pequenas quantidades de diferentes fármacos ao utilizar diferentes matérias para esta membrana [42].

5. Conclusão

A nanotecnologia é um campo interdisciplinar emergente, resultante da combinação da biologia, da química e da engenharia. Tem sido alvo de grande atenção devido ao seu potencial para revolucionar cada área onde seja explorada e utilizada. Um dos ramos onde tem tido evidentes progressos e têm sido feitos grandes investimentos é no campo das ciências biomédicas e da medicina. As suas aplicações na medicina podem criar novas oportunidades de desenvolvimento de técnicas e aparelhos que permitem melhorar a qualidade de vida das populações, o que gera enormes expectativas em torno do seu estudo e desenvolvimento.

Recentemente, o estudo e aplicação das nanopartículas têm proporcionado uma grande contribuição para a prática clínica, principalmente nas áreas da imagiologia médica e da libertação controlada de fármacos. No entanto, ainda muitas tecnologias se encontram em fase de desenvolvimento, e outras por surgir.

Estão criadas expectativas para que num futuro próximo assuma um papel preponderante nos avanços em direção a uma medicina personalizada, melhorando a sensibilidade e especificidade de técnicas já existentes, assim como desenvolvendo novos instrumentos de diagnóstico, permitindo um diagnóstico e terapia mais precoces e personalizados, e desta forma, melhorar a eficácia dos tratamentos e reduzir os efeitos secundários. No entanto, por diversas razões, a implementação da nanomedicina na prática clínica de rotina irá ainda enfrentar alguns desafios por parte das agências regulamentares, da população em geral, companhias de seguros, entre outros.

6. Bibliografia

1. KARKARE, M., - **Nanotechnology: Fundamentals And Applications**. 2008: I.K. International Publishing House Pvt. Limited.p. 1-21
2. NNI. **What is nanotechnology?** [Acedido a 3 de Abril de 2013]; Disponível na internet: <http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>.
3. RAMSDEN, J., - **Nanotechnology: An Introduction**. 2011: William Andrew.p. 1-13
4. FREITAS, R. A., Jr. - **Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery**. International Journal of Surgery. (2005). 3(4), p. 243-246.
5. SAHOO, S., - **Nanotechnology in Health Care**. 2012: Pan Stanford Publishing.p. 1-20
6. CHOI, C. - **Integrated nanobiosensor technology for biomedical application**. Nanobiosensors in Disease Diagnosis. (2012). 2012:1, p. 1-4.
7. KIVIRAND, K., KAGAN, M., and RINKEN, T., - **Calibrating Biosensors in Flow-Through Set-Ups: Studies with Glucose Optrodes**. State of the Art in Biosensors - General Aspects. 2013.p. 332
8. BOULAIZ, H., [et al]. - **Nanomedicine: application areas and development prospects**. International Journal of Molecular Sciences. (2011). 12(5), p. 3303-3321.
9. CASH, K. J. and CLARK, H. A. - **Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes**. Trends in Molecular Medicine. (2010). 16(12), p. 584-593.
10. MARRAZZA, G., CHIANELLA, I., and MASCINI, M. - **Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection**. Biosensors and Bioelectronics. (1999). 14(1), p. 43-51.
11. MÜLLER, U. R. and NICOLAU, D. V., - **Microarray Technology and Its Applications**. 2006: Springer.p. 1-8
12. **Microarrays: chipping away at the mysteries of science and medicine**. 2007 [Acedido a 12 de Agosto de 2013]; Disponível na internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>.

13. **DNA Microarray Technology**. 2011 [Acedido a 12 de Agosto de 2013]; Disponível na internet: <http://www.genome.gov/10000533>.
14. SCHULZE, A. and DOWNWARD, J. - **Navigating gene expression using microarrays--a technology review**. *Nature Cell Biology*. (2001). 3(8), p. E190-1955.
15. MACBEATH, G. - **Protein microarrays and proteomics**. *Nature Genetics*. (2002). 32 Suppl, p. 526-532.
16. BRAUNSCHWEIG, T., CHUNG, J. Y., and HEWITT, S. M. - **Tissue microarrays: bridging the gap between research and the clinic**. *Expert Review of Proteomics*. (2005). 2(3), p. 325-336.
17. CLARKE, P. A., [et al]. - **Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology, and drug development: progress and potential**. *Biochemical Pharmacology*. (2001). 62(10), p. 1311-1336.
18. GHALLAB, Y. H. and BADAWEY, W., - **Lab-on-a-chip: Techniques, Circuits, and Biomedical Applications**. 2010: Artech House, Incorporated.p. 1-9
19. **Nanobiossensores**, I.N.d.P. Industrial, Editor. 2010: Portugal.
20. MURTHY, S. K. - **Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges**. *International Journal of Nanomedicine*. (2007). 2(2), p. 129-141.
21. WEISSLEDER, R. and MAHMOOD, U. - **Molecular imaging**. *Radiology*. (2001). 219(2), p. 316-333.
22. CAI, W. and CHEN, X. - **Nanoplatfoms for targeted molecular imaging in living subjects**. *Small*. (2007). 3(11), p. 1840-1854.
23. LUCHINI, A., [et al]. - **Smart hydrogel particles: biomarker harvesting: one-step affinity purification, size exclusion, and protection against degradation**. *Nano Letters*. (2008). 8(1), p. 350-361.
24. WILCZEWSKA, A. Z., [et al]. - **Nanoparticles as drug delivery systems**. *Pharmacological Reports*. (2012). 64(5), p. 1020-1037.
25. XU, W., LING, P., and ZHANG, T. - **Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs**. *Journal of Drug Delivery*. (2013). 2013, p. 340315.

26. THAKUR, N., [et al]. - **Nanoemulsions: A Review on Various Pharmaceutical Application**. Global Journal of Pharmacology. (2012). 6(3), p. 222-225.
27. LOVELYN, C. and ATTAMA, A. A. - **Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery**. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology. (2011). 2(5A), p. 626-639.
28. SATO, K. and ANZAI, J.-i. - **Dendrimers in Layer-by-Layer Assemblies: Synthesis and Applications**. Molecules. (2013). 18(7), p. 8440-8460.
29. KIM, T. H., LEE, S., and CHEN, X. - **Nanotheranostics for personalized medicine**. Expert Review of Molecular Diagnostics. (2013). 13(3), p. 257-269.
30. WANG, L. S., CHUANG, M. C., and HO, J. A. - **Nanotheranostics--a review of recent publications**. International Journal of Nanomedicine. (2012). 7, p. 4679-4695.
31. XIE, J., LEE, S., and CHEN, X. - **Nanoparticle-based theranostic agents**. Advanced Drug Delivery Reviews. (2010). 62(11), p. 1064-1079.
32. **A & G Theranostics Products**. 2009 [Acedido a 28 de Agosto de 2013]; Disponível na internet: <http://agpharma.com/products/agrxdx.html>.
33. MURA, S. and COUVREUR, P. - **Nanotheranostics for personalized medicine**. Advanced Drug Delivery Reviews. (2012). 64(13), p. 1394-1416.
34. BARNES, C. P., [et al]. - **Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds**. Advanced Drug Delivery Reviews. (2007). 59(14), p. 1413-1433.
35. ENGEL, E., [et al]. - **Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side**. Trends in Biotechnology. (2008). 26(1), p. 39-47.
36. SAHA, M. - **Nanomedicine: promising tiny machine for the healthcare in future-a review**. Oman Medical Journal. (2009). 24(4), p. 242-247.
37. BAWARSKI, W. E., [et al]. - **Emerging nanopharmaceuticals**. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. (2008). 4(4), p. 273-282.
38. MOGHIMI, S. M., HUNTER, A. C., and MURRAY, J. C. - **Nanomedicine: current status and future prospects**. The FASEB Journal. (2005). 19(3), p. 311-330.
39. CHEN, C. M. and PENG, E. H. - **Nanopore sequencing of polynucleotides assisted by a rotating electric field**. Applied Physics Letters. (2003). 82(8), p. 1308-1310.

40. ZHENG, j. s., ZUO, s. h., and LI, w. q. - **Nanopore Technology and Its Applications**. Progress in Biochemistry and Biophysics. (2001)(2), p. 202-205.
41. SPARKS, D. and HUBBARD, T. - **Micromachined needles and lancets with design adjustable bevel angles**. Journal of Micromechanics and Microengineering. (2004). 14(8), p. 1230-1233.
42. RICHARDS GRAYSON, A. C., [et al]. - **Multi-pulse drug delivery from a resorbable polymeric microchip device**. Nature Materials. (2003). 2(11), p. 767-772.