



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Uso de nanopartículas de sílica em aplicações médicas

Joana Isabel Ferreira Pereira

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas**

**Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João
Paulo Gil Lourenço**

2022

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Uso de nanopartículas de sílica em aplicações médicas

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados nos textos e constam da listagem de referências incluída.

(Joana Isabel Ferreira Pereira)

Copyright © 2022 Joana Isabel Ferreira Pereira

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de reportórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Várias foram as pessoas que contribuíram de forma positiva para que este caminho árduo se tornasse mais amenizado.

Aos meus pais e irmão, pois são a base de tudo. Sem eles nada seria possível. Proporcionar-me enveredar num segundo curso, foi sem dúvida um esforço para eles que espero orgulhá-los. Um agradecimento especial à minha mãe, que é a minha melhor amiga e a minha maior ajuda em todos os segundos da minha vida.

Ao Professor Doutor João Paulo Lourenço, não só por toda a paciência e apoio prestado, como a sua exigência e motivação em ser mais e melhor. Sem dúvida que quem teve a oportunidade de cruzar os caminhos letivos com o professor, saiu de lá um profissional mais rico em conhecimentos.

Agradeço também a todos os docentes que fizeram parte do meu percurso académico e que contribuíram para a minha formação.

Aos meus melhores amigos, Daniela Sobral, Joana Rolo, Ana Catarino, João Santos, Alberto Ferreira e Júlio Barbosa. Sem eles, a vida académica não teria sido tão benéfica quanto foi. Por todas as noites de saídas, mas também por todos os dias de estudo e companheirismo longe dos nossos. Um agradecimento especial, por toda a força e carinho, aos meus amigos que não fizeram parte da minha vida académica, no entanto, sempre se mantiveram presentes.

Ao Ricardo, pela sua eterna paciência e ajuda, mesmo em dias menos bons foi um pilar essencial para o término deste curso. Sem ele, o meu mundo não seria tão colorido.

Resumo

Na área da nanomedicina, as nanopartículas de sílica têm sido apresentadas como uma ferramenta de elevado valor. Importantes características como a boa estabilidade e biodisponibilidade, tornam as nanopartículas de sílica muito interessantes para áreas como a terapêuticas, diagnóstico e teranóstica.

A metodologia de Stöber é muito utilizada nas sínteses de nanopartículas. No entanto, existem outros métodos para a síntese de nanopartículas que lhes conferem características estruturais, texturais e morfológicas específicas. Além disso, a possibilidade de funcionalização possibilita uma aptidão para o carregamento de fármacos bastante usados nos dias de hoje, como sejam fármacos anti-inflamatórios e anti-tumorais.

Os fármacos anti-tumorais têm sido de grande interesse nesta área, visto que a sua libertação do interior das nanopartículas de sílica pode, em determinadas condições, ser dependente do pH do tecido/órgão. Assim, caso o pH do tecido/órgão seja ácido, as nanopartículas perdem o revestimento que protege o fármaco no seu interior e libertam o mesmo. Estes nanosistemas podem tornar a terapia mais seletiva e menos tóxica.

O uso de nanopartículas de sílica em medicina não é, no entanto, isento de riscos. Aquando de uma exposição a uma elevada concentração de nanopartículas, estas parecem demonstrar alguma toxicidade, ainda que seja dependente do tempo de exposição às mesmas. Deve ainda referir-se que sistemas mais complexos envolvendo nanopartículas de sílica possuem um elevado custo de obtenção, comparativamente a formulações farmacêuticas tradicionais.

Ao longo desta monografia, é feita uma revisão sobre as características das nanopartículas de sílica, métodos de síntese e potenciais aplicações médicas das nanopartículas que evidenciam a versatilidade destes materiais.

Palavras-chave: nanopartículas, sílica, libertação controlada, funcionalização.

Abstract

In the field of nanomedicine, silica nanoparticles have been presented as a highly valuable tool. Important characteristics such as good stability and bioavailability make silica nanoparticles very interesting for areas such as therapeutics, diagnostics and theranostics.

Stöber's methodology is widely used in the synthesis of nanoparticles. However, there are other methods for the synthesis of nanoparticles that give them specific structural, textural and morphological characteristics. In addition, the possibility of functionalization makes it possible to load drugs that are widely used nowadays, such as anti-inflammatory and anti-tumor drugs.

Anti-tumor drugs have been of great interest in this area, since their release from within the silica nanoparticles may, under certain conditions, be dependent on the pH of the tissue/organ. Thus, if the pH of the tissue/organ is acidic, the nanoparticles lose the coating that protects the drug inside and release it. These nanosystems can make therapy more selective and less toxic.

The use of silica nanoparticles in medicine is, however, not without risk. When exposed to a high concentration of nanoparticles, they do appear to demonstrate some toxicity, although this is dependent on the time of exposure. It should also be noted that more complex systems involving silica nanoparticles may be more expensive to obtain than traditional pharmaceutical formulations.

Throughout this monograph, a review is made on the characteristics of silica nanoparticles, synthesis methods and potential medical applications of nanoparticles that highlight the versatility of these materials.

Keywords: nanoparticles, silica, controlled release, functionalization.

ÍNDICE REMISSIVO

ÍNDICE	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABELAS	XI
Lista de abreviaturas e siglas	XII

ÍNDICE

1. Introdução.....	15
2. Síntese de nanopartículas de sílica	17
2.1. Método Stöber	17
2.2. Método da microemulsão	18
3. Nanopartículas de sílica mesoporosa	20
4. Nanopartículas núcleo-invólucro	22
4.1. Coprecipitação	22
4.1.1. Nanopartículas magnéticas revestidas por sílica.....	23
4.2. Processo sol-gel	24
5. Funcionalização dos materiais de sílica	25
5.1. Método de enxerto pós-síntese.....	25
5.2. Método de co-condensação	26
6. Aplicações médicas	28
6.1. Transporte e libertação de fármacos	28
6.1.1. Funcionalização dos sistemas de entrega de fármacos controlada	32
6.1.2. Libertação de fármacos de acordo com o pH.....	40
6.2. Uso de nanopartículas de sílica em vacinas.....	46
6.2.1. Vacinas de subunidades proteicas.....	48
6.2.2. Vacinas de ADN	50
6.2.3. Desenvolvimento de vacinas promissoras baseadas em vesículas extracelulares ..	51
6.3. Uso de nanopartículas de sílica para diagnóstico	54
6.3.1. Imagem ótica.....	55
6.3.2. Imagem por ressonância magnética	61
6.3.3. Tomografia por emissão de positrões	66
6.3.4. Ultrassonografia.....	69
7. Toxicidade das nanopartículas	71
7.1. Toxicidade das nanopartículas de sílica	71

8. Conclusão e perspectivas futuras	78
9. Bibliografia.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1- Reação hidrolise e condensação para formação de nanopartículas de sílica (adaptado de ¹¹).	17
Figura 2.2- Método de Stöber, possibilitando a incorporação de outras moléculas (adaptado de ¹²).	18
Figura 2.3 – Método da microemulsão reversa (adaptado de ¹⁸).	19
Figura 3.1- Formação de MCM-41 (adaptado de ²⁶).	21
Figura 3.2- Imagem por microscopia eletrónica de varrimento SEM (a) e microscopia eletrónica de transmissão TEM (b) de sílica SBA-15 ²⁹	21
Figura 4.1- Formação de nanopartículas núcleo-invólucro (adaptado de ³²).	22
Figura 4.2- Formação do invólucro através de coprecipitação (adaptado de ³⁶).	23
Figura 4.3- Estrutura da magnetite ³⁸	24
Figura 4.4- Formação de invólucros de sílica em partículas de magnetite superparamagnéticas (Fe ₃ O ₄ @SiO ₂) (adaptado de ³⁶).	25
Figura 5.1- Funcionalização da sílica mesoporosa através de reação de condensação entre organosilanos RSi(OR') ₃ , RSiCl ₃ ou HN(SiR ₃) ₂ e grupo silanol livre (adaptado de ⁴⁴).	26
Figura 5.2- Funcionalização da sílica mesoporosa através do método de co-condensação (adaptado de ⁴⁴).	26
Figura 5.3- Funcionalização da sílica mesoporosa através do método de co-condensação (adaptado de ⁴⁴).	27
Figura 5.4- Reação dos tióis do MSN com 2-aldrítiois produzindo 2-piridotona (adaptado de ⁴⁴).	27
Figura 6.1- Comparação do tamanho de poros entre MCM-41 e SBA-15 (adaptado de ³⁰). ...	30
Figura 6.2- Libertação de ibuprofeno (%) em função do tempo (h) em materiais de MCM-41. (adaptado de ⁵⁴).	31

Figura 6.3- Libertação de ibuprofeno incorporado nos poros (wt%) em função do tempo (adaptado de ⁶⁶).	32
Figura 6.4- Funcionalização dos MSNs e estruturas de fármacos possíveis de incorporar nesses sistemas (adaptado de ⁵⁵).	33
Figura 6.5- Ligação de ibuprofeno a um MSNs. a) Matriz não funcionalizada, ligações fracas entre grupo carboxílico e silanol (esquerda), o ibuprofeno pode ligar-se entre si e formar um dímero (direita).b) Matriz amino-funcionalizada: o IBU é ligado à parede do poro através interações iônicas entre o ácido carboxílico e a amina (adaptado de ⁵⁵).	34
Figura 6.6- Reação de condensação entre MSN e DAMO (agente de direcionamento). ⁷⁴	35
Figura 6.7- Libertação de LEVO em função do tempo em matriz funcionalizada (MSN-DAMO@Levo) e matriz não funcionalizada (MSN@Levo) (adaptado de ⁷⁴).	36
Figure 6.8- Microscopia do biofilme S.aureus sem tratamento (a), com tratamento sem agente de direcionamento (b), com tratamento com agente de direcionamento (c) (adaptado de ⁷⁴). 36	
Figura 6.9- Adsorção e libertação da ampicilina contida em SBA-15-NH2 (azul), SBA-15 (vermelho) e MCM-41(verde) (adaptado de ⁷⁷).	37
Figura 6.10- Uso de MSN-VAN em tecido infeccioso sem causar dano aos macrófagos, reconhecimento seletivo obtido através de sinal fluorescente dado por FITC. (adaptado de ⁷⁸).	38
Figura 6.11- Imagem de sinal fluorescente dado por FITC contido em MSN-VAN (adaptado de ⁷⁸).	39
Figura 6.12- Comparação da contagem bacteriana em células sem tratamento (cinzento), com rifampicina livre (vermelho), MSN-RIF 40 (laranja) e MSN-RIF 100 (verde) (adaptado de ⁸¹).	40
Figura 6.13-Formação de MSNs e entrada na célula (adaptado de ⁸⁷).	41
Figura 6.14- Estruturas de α -ciclodextrina (i) β -ciclodextrina (ii) γ -ciclodextrina, os átomos de hidrogênio, carbono e oxigênio estão coloridos em preto, branco e cinza, respetivamente (iii) ⁸⁷	41
Figura 6.15-Estrutura molecular do precursor de p- anisidina ligada à superfície da sílica. ⁹⁰	42
Figura 6.16- Saída do fármaco devido ao pH ácido do meio (adaptado de ⁸⁶).	42

Figura 6.17- A- Constituição da MSNs B- Percentagem de libertação da doxorubicina em função do pH do ambiente e da utilização de laser C- NH_4HCO_3 transformada em bolhas de CO_2 e destruição do revestimento em polidopamina (PDA) (adaptado de ⁸⁴).....	43
Figura 6.18- Ilustração de diversas abordagens para o tratamento do cancro: terapia combinada, MSNs com bicarbonato de amónio e utilização de NIR a 808 nm para gerar ROS. (adaptado de ⁸⁴).....	44
Figura 6.19- Comparação da fluorescência em grupo de ratos tratados com DOX livre ou MSN funcionalizado (adaptado de ⁸⁴).....	45
Figura 6.20- Imagens TEM de nanopartículas nanorattle, ou seja, sílica oca. A) Água pura B) Saline ¹¹⁰	48
Figura 6.21- Estrutura das nanopartículas de sílica nanorattle. (adaptado de ¹¹²).....	49
Figura 6.22- Resposta do sistema imunitário ao usar nanopartículas tipo rambutão, aumento das células T CD4+ e CD8+ bem como aumento da produção de anticorpos e interferão- γ (adaptado de ¹¹⁵).....	50
Figura 6.23- Teor absoluto de silício (%) nos órgãos principais comparando um controlo (PBS) com RAM-MSNs- PEI. (adaptado de ¹¹⁵).	51
Figura 6.24- MSNs funcionalizadas com ácido carboxílico e proteínas imunomoduladoras (adaptado de ¹¹⁶).....	52
Figura 6.25- Níveis de citocina pró-inflamatória que pertence à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) por macrófagos RAW 264, comparando o controlo com MSNs sem funcionalização e LPS (controlo positivo) (adaptado de ¹¹⁶).	53
Figura 6.26- Níveis de interleucina por macrófagos RAW 264, comparando o controlo com MSNs sem funcionalização e LPS (controlo positivo) (adaptado de ¹¹⁶).	53
Figura 6.27- Diversas técnicas de imagem (imagem ótica, imagem por ressonância magnética (MRI), tomografia por emissão de positrões (PET), tomografia computadorizada (TC), ultrassom) usando nanopartículas de sílica mesoporosa (adaptado de ¹¹⁹).	54
Figura 6.28- Nanopartícula de sílica mesoporosa com diversas funcionalidades para aplicação em teranóstica (adaptado de ¹²¹).....	55
Figura 6.29- Diagrama de Perrin-Jablonski (adaptado de ¹²⁷)	56

Figura 6.30- Derivatização de corantes orgânicos para incorporação em matrizes de sílica. (i) iodeto de alilo, Cs_2CO_3 , DMF; (ii) trimetosilano, Pt/C, metanol; $\text{R1} = -\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{R2} = -(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OMe})_3$, $\text{R3} = -(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OEt})_3$ (adaptado de ¹³⁰).....	57
Figura 6.31- a) e b) SiO_2 precipitado preparado pelo método conjugado FITC-APTES; c) e d) SiO_2 disperso preparado por uma modificação direta da molécula de fluoresceína como descrito na imagem 35. ¹³⁰	58
Figura 6.32- Comparação da intensidade da fluorescência entre FSNPS's e os seus respetivos corantes livres (adaptado de ¹³¹).....	59
Figura 6.33- Resultados ao longo do tempo da fotoestabilidade in vivo após injeção subcutânea de a) FSNP-1 e b) FSNP-4 em ratos. ¹³¹	59
Figura 6.34- Nanopartícula núcleo-invólucro composta por dois corantes ligados covalentemente a sílica. ¹³⁴	60
Figura 6.35- Imagens obtidas por microscopia confocal a) corante referência; b) corante sensor; c) fluorescência sobreposta de FITC e TRITC; d) Alteração da intensidade da fluorescência de acordo com o pH (adaptado de ¹³⁴).	61
Figura 6.36- Protão, atua como um pequeno magneto girando em torno do seu eixo (adaptado de ¹³⁸).....	62
Figura 6.37- Aplicação de um campo magnético forte a fim de orientar os protões (adaptado de ¹³⁸).....	62
Figura 6.38- Gráfico A apresenta a concentração vs tempo de relaxamento T1 comparando Gd-DTPA e Gd_2O_3 incorporado em nanopartículas de sílica mesoporosa; Imagem B compara o brilho de imagem dado por Gd-DTPA (esquerda) comparativamente a Gd_2O_3 incorporado em nanopartículas de sílica. (adaptado de ¹⁴¹).	64
Figura 6.39- Molécula do corante verde de indocianina (ICG) ¹⁴⁵	65
Figura 6.40- Comparação da intensidade de fluorescência entre o corante ICG e o corante ICG incorporado em nanopartículas de sílica (adaptado de ¹⁴³).	65
Figura 6.41- A) Tempo de relaxamento T1 esquerda (imagens de controlo), direita (ICG encapsulada em NPs com Gd^{3+} quelado); B) Tempo de relaxamento T2 esquerda (imagens de controlo), direita ICG encapsulada em NPs com Gd^{3+} quelado) (adaptado de ¹⁴³).	66
Figura 6.42- Funcionalização da sílica mesoporosa, primeiramente com 3-aminopropiltriétoxissilano a fim de ancorar posteriormente o isótopo ^{18}F . ¹⁴⁹	67

Figura 6.43- A) Nanopartículas de sílica mesoporosa com ²² Na incorporado comparativamente a B) ²² Na livre. (adaptado de ¹⁵⁰).....	68
Figura 6.44- Comparação da intensidade das imagens capturadas usando um sistema de ultrassom Philips CX50, sendo F-MSN (sílica mesoporosa superhidrofóbica), F-SS (sílica superhidrofóbica não porosa), MSN (sílica mesoporosa), (adaptado de ¹⁵⁷).	70
Figura 7.1- Viabilidade das células derivadas do carcinoma broncoalveolar humano dependendo da dosagem, comparativamente à exposição a sílica cristalina (Min-U-Sil-5) sendo este usado como controlo positivo. (adaptado de ¹⁶⁷).	72
Figura 7.2- Formação de espécies reativas de oxigénio induzida por sílica e o seu papel na carcinogénese. (adaptado de ¹⁶⁸).	73
Figura 7.3- Alterações histopatológicas e ultraestruturais do endotélio vascular exposto a SiNPs. A) grupo controlo. B) exposição a uma concentração 1,8 mg/kg. C) exposição a uma concentração 5,4 m/kg. D) exposição a uma concentração de 16,2 m/kg. E) F) G) H) Morfologia do arco aórtico no grupo de controlo, no grupo exposto a 1,8 mg/kg, 5,4 mg/kg, 16,2 mg/kg, respetivamente. (adaptado de ¹⁶⁹).	74
Figura 7.4- Ensaio de hemólise com nanopartículas de sílica puras. (A) Percentagem de hemólise em eritrócitos humanos após incubação com suspensão de nanopartículas obtido por diferentes métodos (stöber, nanopartículas mesoporosas, e ainda diferentes proporções (AR2;Ar4;Ar8)). A presença de hemoglobina no sobrenadante (vermelho) foi observada em (B) suspensão Stöber (nanopartículas de sílica não porosa (115 nm diâmetro)), (C) suspensão Meso S (nanopartículas de sílicas mesoporosa (120 nm diâmetro)), (D) suspensão AR2 (nanopartículas de sílica mesoporosa (80-200 nm diâmetro)), (E) suspensão AR4 (nanopartículas de sílica mesoporosa (150-600 nm diâmetro)) e (F) suspensão AR8 (nanopartículas de sílica mesoporosa (130-1000 nm diâmetro)). Os tubos são alinhados (da esquerda para a direita) como controlo negativo (PBS), controlo positivo (água), suspensão de 10 µg/mL, suspensão de 50 µg/mL, suspensão de 100 µg/mL, suspensão de 250 µg/mL e 500 Suspensão µg/mL. (adaptado de ¹⁷¹).	75
Figura 7.5- Ensaio de hemólise com nanopartículas de sílica funcionalizadas com grupo amino. (A) Percentagem de hemólise em eritrócitos humanos após incubação com suspensão de nanopartículas em diferentes concentrações. A presença de hemoglobina no sobrenadante (vermelho) foi observada em (B) suspensão Stöber (nanopartículas de sílica não porosa (115 nm diâmetro)), (C) suspensão Meso S (nanopartículas de sílicas mesoporosa (120 nm	

diâmetro)), (D) suspensão AR2 (nanopartículas de sílica mesoporosa (80-200 nm diâmetro)), (E) suspensão AR4 (nanopartículas de sílica mesoporosa (150-600 nm diâmetro)) e (F) suspensão AR8 (nanopartículas de sílica mesoporosa (130-1000 nm diâmetro)). Os tubos são alinhados (da esquerda para a direita) como controlo negativo (PBS), controlo positivo (água), suspensão de 10 µg/mL, suspensão de 50 µg/mL, suspensão de 100 µg/mL, suspensão de 250 µg/mL e 500 Suspensão µg/mL. (adaptado de ¹⁷¹)..... 76

Figura 7.6- Método Western Blott usado para detetar proteínas indicadoras de fibrose, inflamação e por consequência problemas renais, após 2 e 12 dias de exposição a nanopartículas de sílica. Fibronectina(FN), moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), fator de transformação do crescimento beta (TGF-β), fator nuclear kappa B (FN-kB). α- tubulina é a proteína usada como controlo. (adaptado de ¹⁷²)..... 77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 6.1- Diferentes tipos de materiais passíveis de serem carregados nos MSN's e alterações subjacentes.	29
Tabela 6.2-Quantidade de fármaco carregada em diferentes amostras de SBA-15 sintetizadas usando o método de co-condensação. ⁷²	33

Lista de abreviaturas e siglas

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APCS	Células apresentadoras de antígeno (do inglês, <i>Antigen-presenting cells</i>)
APTES	(3-aminopropil) trietoxissilano
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
BCG	Bacilo <i>Calmette–Guérin</i>
CDs	Ciclodextrinas
CT	Tomografia computadorizada (do inglês, <i>Computed tomography</i>)
CTA	Cetiltrimetilamônio
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio (do inglês, <i>Cetyltrimethylammonium bromide</i>)
DAMO	Aminopropiltrietoxissilano
DDS	Sistemas de entrega de fármacos (do inglês, <i>Drug Delivery System</i>)
DMF	Dimetilformamida
DOX	Doxorrubicina
EU	União Europeia
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, <i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
FN	Fibronectina
FSNPs	Corante fluorescente em nanopartículas de sílica (do inglês, <i>fluorescent silica nanoparticles</i>)
Gd	Gadolínio
HF	Ácido fluorídrico (do inglês, <i>Hydrogen fluoride</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (do inglês, <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IBU	Ibuprofeno
ICG	Indocianina verde (do inglês, <i>indocyanine green</i>)
ICAM-1	Moléculas de adesão intercelular-1 (do inglês, <i>Intercellular adhesion molecule-1</i>)
IFA	Adjuvante incompleto de Freund (do inglês, <i>Incomplete Freund's adjuvant</i>)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)

LDH	Lactato desidrogenase
LEVO	Levofloxacina
MCM-41	do inglês, Mobile Crystalline Material nº 14
mNPs	Nanopartículas magnéticas (do inglês, <i>Magnetic nanoparticles</i>)
MSNs	Nanopartículas de sílica mesoporosa (do inglês, <i>Mesoporous Silica Nanoparticles</i>)
MSU	do inglês, Sílica de <i>Michigan State University</i>
NF- Kβ	Fator nuclear <i>kappa B</i>
NIR	Infravermelho próximo (do inglês, <i>near infrared</i>)
NIRS	Espectroscopia no infravermelho próximo (do inglês <i>near infrared spectroscopy</i>)
NPs	Nanopartículas
OPS	do inglês, <i>one-pot synthesis</i>
OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão de fosfato salino (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>)
PDA	Polidopamina
PDT	Terapia fotodinâmica (do inglês, <i>Photodynamic therapy</i>)
PEI	Poliétilenoimina (do inglês, <i>Polyethylenimine</i>)
PET	Tomografia por emissão de positrões (do inglês, <i>Positron emission tomography</i>)
PTT	Terapia fototérmica (do inglês, <i>Photothermal Therapy</i>)
RGD	Ácido arginilglicilaspártico (do inglês, <i>Arginylglycylaspartic acid</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive oxygen species</i>)
SBA	Sílica amorfa de Santa Bárbara (do inglês, <i>Santa Barbara Amorphous</i>)
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento (do inglês, <i>scanning electron microscope</i>)
siNPs	Nanopartículas baseadas em materiais de sílica (do inglês, <i>Silica Nanoparticles</i>)
SN	do inglês, <i>silica nanorattle</i>
SPIONs	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (do inglês, <i>Superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i>)
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês, <i>Transmission electron microscopy</i>)
TEOS	Tetraetoxissilano (do inglês, <i>tetraethoxysilane</i>)
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta (do inglês, <i>transforming growth factor beta</i>)

TMB	Trimetilbenzeno
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>Tumor necrosis factor</i>)
TRITC	isotiocianato de tetrametilrodamina (do inglês, <i>Tetramethylrhodamine isothiocyanate</i>)
VEs	Vesículas extracelulares

1. Introdução

A sílica, representada pela fórmula química SiO_2 , também conhecida como dióxido de silício, é constituída por um elemento da série química dos semimetais, o silício e por um elemento químico não metálico, o oxigénio. Estes elementos pertencem, respetivamente, ao grupo 8 e 14 da tabela periódica.^{1,2}

A sílica está presente em muitas rochas, minerais e pedras semipreciosas. Pode apresentar-se sob forma amorfa ou forma cristalina, nomeadamente, quartzo, cristobalite ou tridimite. Este mineral é o material mais usado em nanotecnologia.³

A nanotecnologia é um ramo da ciência que enquadra todos os processos que manipulam ou exploram materiais à nanoescala. Esta ciência remonta a 1965, quando o vencedor do Prémio Nobel da Física, Richard Feynman, descreveu um processo com o qual se podia manipular e controlar átomos e moléculas.⁴

Estes materiais têm-se mostrado cada vez mais importantes para a medicina, pelo que nas últimas décadas, o uso de sílica tem aumentado cada vez mais devido ao avanço da nanomedicina. A nanomedicina é uma área da medicina que utiliza ferramentas da nanotecnologia, como sejam nanopartículas para o diagnóstico (nanodiagnóstico), prevenção e tratamento da doença, libertação controlada de medicamentos (nanoterapia) e medicina regenerativa.^{4,5}

As nanopartículas (NPs) são semelhantes às microesferas, no entanto, apresentam dimensões dentro do intervalo de 1 nanómetro a 1 micrómetro. Esta característica é vantajosa face às partículas encontradas na macroescala visto que pode superar algumas limitações encontradas no diagnóstico e terapêutica tradicional:⁵

- Distribuição controlada do fármaco;
- Libertação do fármaco no alvo terapêutico, diminuindo os efeitos adversos;
- Possibilidade de integrar moléculas eficazes que através de outra via não poderiam ser usadas devido à sua toxicidade;⁶

Um dos casos mais notáveis relativamente ao potencial das nanopartículas aplica-se à sílica devido ao facto de esta poder ser sintetizada com diferentes morfologias e propriedades texturais. Esta versatilidade confere-lhe capacidade para apresentar uma grande área de superfície (pode ser superior a $1000 \text{ m}^2/\text{g}$) e diâmetro de poros ajustável (entre cerca de 2 e mais de 10 nm), em arranjos cúbicos ou hexagonais. Além disso, a sílica é um material inorgânico e possui inúmeras aplicações devido à sua alta biocompatibilidade e estabilidade em condições ácidas.⁷

Recentemente, as nanopartículas baseadas em materiais de sílica (SiNPs) têm sido cada vez mais estudadas com a finalidade de serem usadas como NPs núcleo-invólucro. Estes nanosistemas consistem na combinação de um determinado material (que pode ou não ser sílica) com outro material diferente, de modo a tirar partido simultaneamente das propriedades texturais e morfológicas bem como das propriedades químicas dos materiais combinados. Para tal é necessário um revestimento apropriado, sendo o revestimento metálico (como o ouro, cobre, paládio e níquel) o mais usado quando o núcleo é constituído por sílica. Contrariamente, quando o núcleo é de outro material o revestimento pode ser de sílica.⁷

Para que as nanopartículas de sílica possam ser usadas para aplicações terapêuticas têm de entrar no corpo humano por inalação, injeção intravenosa, ou outros tipos de administração. No entanto, a exposição humana às SiNPs pode também ocorrer involuntariamente em ambientes ocupacionais.⁸

Embora as vantagens das nanopartículas de sílica sejam importantes, também existem algumas desvantagens, como a possível toxicidade, falta de biocompatibilidade dos materiais utilizados e alto custo de obtenção de nanosistemas em comparação com formulações farmacêuticas tradicionais. Não obstante, esta área tem vindo a alcançar um papel de relevo e importância, como evidenciado pelo número de produtos no mercado e o número de patentes concedidas.^{9,10}

O objetivo da presente monografia centra-se no uso de nanopartículas de sílica em aplicações médicas. Será descrita a constituição, síntese e funcionalização das nanopartículas de sílica, bem como feita uma análise bibliográfica aprofundada e crítica das possíveis aplicações médicas em que esta pode ser vantajosa, seja para diagnóstico ou tratamento. Além disso, ir-se-á analisar as suas desvantagens, bem como o papel que estas poderão desempenhar na evolução desta área.

2. Síntese de nanopartículas de sílica

Ao longo de várias décadas, foram desenvolvidas inúmeras técnicas de síntese de nanopartículas nas quais se produzem partículas com uma faixa estreita de tamanhos e composição quase uniforme.

2.1. Método Stöber

Este método foi desenvolvido em 1968 e continua a ser o método mais usado para sintetizar nanopartículas de sílica.

A síntese consiste na preparação das partículas de sílica e utiliza uma solução aquosa contendo alcóxido de silício ($\text{Si}(\text{OR})_4$), sendo o alcóxido mais utilizado o tetraetilortosilicato (TEOS), ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) e um catalisador (usualmente hidróxido de amônio) em álcool. Variações nas quantidades relativas de reagentes permitem o controlo sobre diversas propriedades físicas e químicas das SiNPs preparadas.

As reações que ocorrem durante a síntese são simples reações de hidrólise e condensação tal como indica a figura 2.1. Estas reações têm como finalidade fornecer espécies precursoras e a supersaturação necessária para a formação de partículas.¹¹

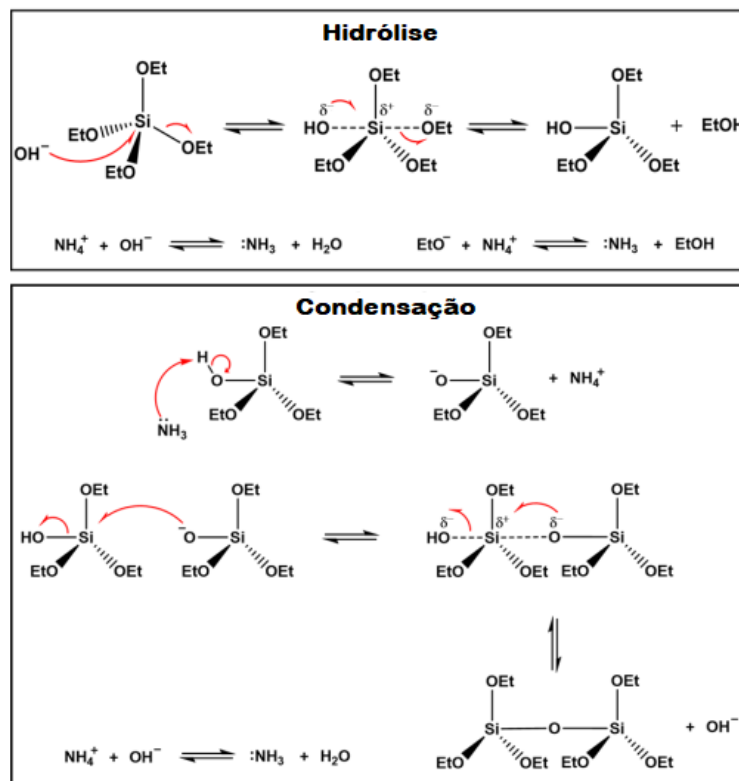


Figura 2.1- Reação hidrólise e condensação para formação de nanopartículas de sílica (adaptado de ¹¹).

Podem também ser incorporadas outras moléculas, figura 2.2, que terão propriedades específicas para a aplicação pretendida e que podem ou não estar ligadas quimicamente à rede da sílica.¹¹

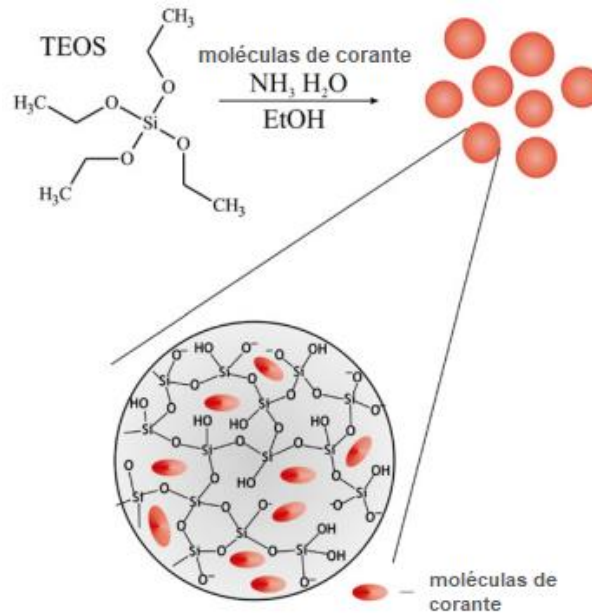


Figura 2.2- Método de Stöber, possibilitando a incorporação de outras moléculas (adaptado de ¹²).

À medida que a reação progride, há formação de partículas tridimensionais dando início à polimerização e formando pontes Si-O-Si. O diâmetro das nanopartículas de sílica é afetado pela concentração de TEOS e de solventes. O tamanho da partícula aumenta com a concentração de TEOS sendo que este aumento é proporcional à velocidade das reações de hidrólise e de condensação, ou seja, o ácido silícico (intermediário) aumenta rapidamente e atinge a supersaturação. Assim, o consumo de intermediário na reação de condensação é também bastante rápido, o que encurta o período de nucleação, levando a uma menor formação de núcleos. Consequentemente, o tamanho final da partícula de sílica será relativamente maior.

13

2.2. Método da microemulsão

O método da microemulsão é outro dos métodos usados para a síntese de SiNPs. Este método envolve a formação de micelas de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), tal como indica a figura 2.3.¹⁴

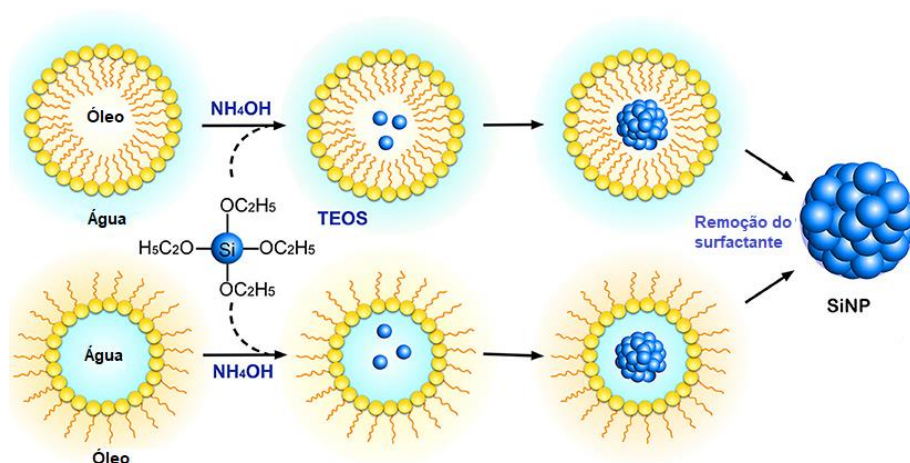


Figura 2.3 – Método da microemulsão reversa (adaptado de ¹⁴).

Estas “nanodispersões” coloidais são estabilizadas por surfactantes. Após a estabilização, são usadas como nanoreatores, sendo um nanoreator uma estrutura nanotecnológica utilizada para sintetizar partículas ou alterar a sua composição num volume confinado.¹⁵

Embora estas estruturas supramoleculares possam ser usadas para o carregamento de fluoróforos e fármacos ¹⁵, neste caso (síntese de nanopartículas) permitem que no seu interior os precursores de sílica sofram hidrólise e condensação a fim de formar as SiNPs.^{16,17} As partículas obtidas por este método têm normalmente formas esféricas e bastante uniformes com dimensões entre 10 e 50 nm. De uma maneira geral é possível obter partículas de tamanhos menores em comparação com a síntese de Stöber.¹⁸

Porém, para que este método seja eficaz é necessário utilizar uma grande quantidade de surfactante, sendo o seu excesso removido posteriormente.¹⁹

3. Nanopartículas de sílica mesoporosa

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), os materiais mesoporosos são materiais que possuem um tamanho de poro entre 2–50 nm e um arranjo ordenado dos mesmos.^{20,21}

As primeiras nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs) foram sintetizadas na década de 1990 por Tsuneo Yanagisawa et al.²² no Japão e pela *Mobile Oil Corporation* nos EUA²³, usando diferentes métodos de síntese.

Existem diversos tipos de MSN relatados, em que se incluem a bem conhecida sílica *Santa Barbara Amorphous* (SBA) e a sílica de *Michigan State University* (MSU). No entanto, a família *Mobile Crystalline Material* é uma das mais importantes e mais estudadas, sendo que o material mais conhecido é o *Mobile Crystalline Material* nº41 (MCM-41).^{24,25} O MCM-41 possui um arranjo hexagonal de poros com diâmetros de 2,5 a 6 nm. Foi, e continua a ser um dos materiais mais explorados, sendo relevante devido ao seu potencial para realizar marcação de células, entregar fármacos, catálise e imobilização de enzimas.^{21,24,25}

As nanopartículas de sílica mesoporosa podem ser sintetizadas modificando o método de Stöber através da adição de surfactantes como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), alguns polímeros e outros compostos que formam micelas em soluções aquosas. Durante o crescimento das partículas mesoporosas, há um aumento da condensação de silicato, resultando numa maior quantidade de pontes Si – O – Si e menos grupos Si – OH.²⁴

O surfactante usado atua como um molde para direcionar a estrutura de cada um dos tipos de MSNs. Estes procedimentos evoluíram de modo a incluir uma ampla gama de composições e uma variedade de condições, possibilitando o direcionamento da estrutura de acordo com a função a que se destina. Na síntese destes materiais têm sido exploradas interações eletrostáticas, ligações de hidrogénio e de Van der Waals.²⁴

Os materiais MCM-41 que foram sintetizados utilizando SiO₂ com surfactantes catiónicos de cetiltrimetilamônio (CTA) e TEOS (precursor da sílica) geralmente têm um espaçamento de cerca de 4 nm. Após a calcinação (processo de remoção do componente orgânico a elevada temperatura) produzem um sólido poroso ordenado hexagonalmente com tamanhos de poros uniformes de 2 a 3 nm, figura 3.1. Usando moléculas orgânicas como co-solventes, tais como 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB), é possível expandir o tamanho do poro do MCM-41 até 10 nm. Estes materiais apresentam áreas superficiais bastante elevadas que nalguns casos podem ultrapassar os 1000 m²/g, bem como volumes porosos próximos de 1cm³/g.^{24,26}

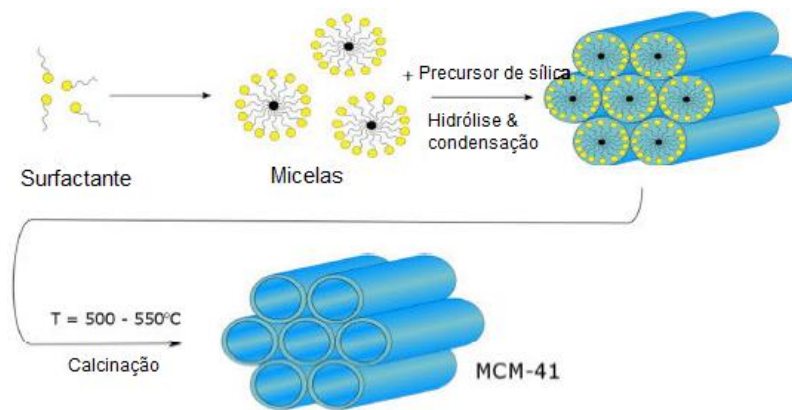


Figura 3.1- Formação de MCM-41 (adaptado de ²⁶).

Qiang Cai et al. ²⁷ estudaram pela primeira vez os fatores que influenciam a morfologia e o tamanho das partículas do tipo MCM-41. Concluíram, como já antes referido, que a síntese de materiais do tipo MCM-41 envolve nucleação do precursor de sílica sob condições alcalinas na presença de um molde (micelas de CTAB). Depreenderam que a morfologia da partícula formada é determinada pelo tipo de catalisador utilizado. Neste estudo, o uso de NH_4OH conduziu a uma morfologia em forma de bastão enquanto NaOH leva à formação de micelas de tamanho menor, dando origem a partículas esféricas

Para alcançar um tamanho de poros maiores, de 4,6-30 nm, Dongyuan Zhao et al. ²⁸ sintetizaram nanopartículas denominadas por sílica SBA-15 (*Santa Barbara Amorphous-15*), (figura 3.2).

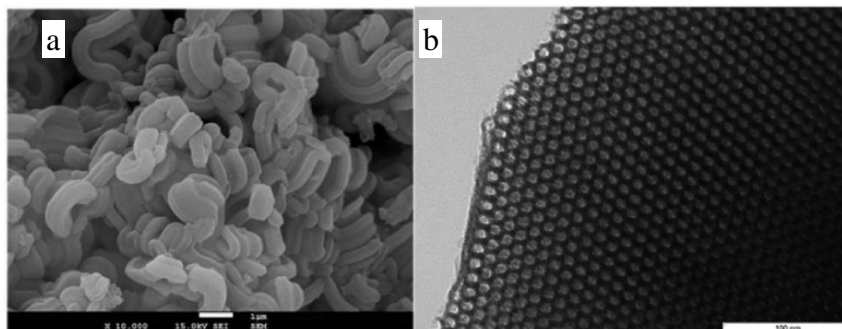


Figura 3.2- Imagem por microscopia eletrônica de varrimento SEM (a) e microscopia eletrônica de transmissão TEM (b) de sílica SBA-15 ²⁹.

Contrariamente ao MCM-41, a sílica SBA-15 é sintetizada em meio fortemente ácido usando como componente orientador de porosidade o copolímero de blocos *Pluronic P123* (óxido de polietileno-óxido de polipropileno-óxido de polietileno). Embora através de outro mecanismo reacional, as reações envolvidas na formação e crescimento das partículas a partir dos precursores de sílica são igualmente de hidrólise e condensação. Estes materiais apresentam também um volume poroso próximo de $1\text{cm}^3/\text{g}$ e áreas superficiais um pouco inferiores às apresentadas pelos materiais do tipo MCM-41, ainda assim da ordem de várias centenas de metros quadrados por grama. ²⁸

O SBA-15 tem vantagem relativamente a outros tipos de nanopartículas com tamanho de poros menores, visto que tem capacidade para carregar materiais maiores, como por exemplo proteínas. ³⁰

4. Nanopartículas núcleo-invólucro

Este tipo de partículas é constituído por um núcleo (*core*), sendo este núcleo coberto por uma outra substância designada por invólucro (*shell*). ³¹

Inicialmente, o principal objetivo do invólucro era a proteção do núcleo contra influências ambientais e a estabilização das propriedades do núcleo. Posteriormente, essa estrutura foi utilizada para alterar as propriedades e funcionalidades das nanopartículas. A combinação de dois ou mais materiais dentro de um único, figura 4.1, propicia uma variedade de novas possibilidades para obter novos materiais multifuncionais. ³¹

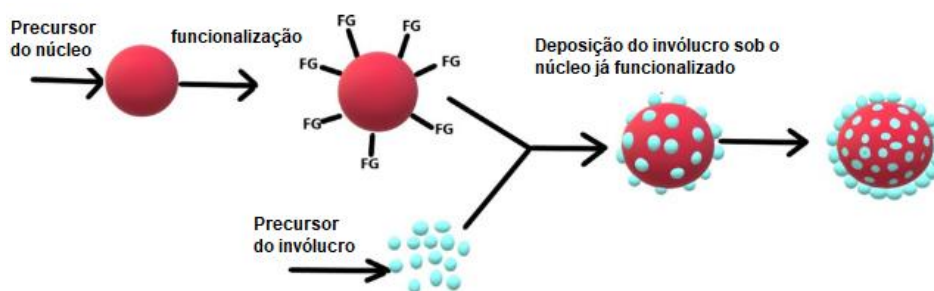


Figura 4.1- Formação de nanopartículas núcleo-invólucro (adaptado de ³²).

Os métodos de preparação deste tipo de materiais são variados e naturalmente adaptados à fase a preparar, núcleo ou invólucro, e à composição química dessa fase. Têm ainda de ser tidas em conta as propriedades finais do material combinado no que diz respeito à sua aplicabilidade.

4.1 Coprecipitação

O método de coprecipitação é o método com menor custo e maior eficácia para a preparação de magnetites envolvendo sais de Fe(II) e Fe(III). Esta técnica de precipitação alcalina foi inicialmente descrita por Massart, com a finalidade de sintetizar nanopartículas magnéticas. ^{33,34}

Esta técnica é também usada para formar invólucros em núcleos pré-formados. Na reação de coprecipitação típica, a característica de solubilidade diferente dos sais em água é aproveitada. São usados como reagentes dois ou mais sais solúveis que reagem entre si em água, formando-se um ou mais sais insolúveis. Os iões recém-formados precipitam na

superfície do núcleo, formando assim o invólucro. Caso a supersaturação destas espécies seja muito baixa, a nucleação não ocorre. Contrariamente, no caso de a supersaturação ser muito elevada, ocorre a nucleação homogénea em solução.³⁵

Para garantir a formação do invólucro nas nanopartículas, as espécies precipitadas devem depositar-se de forma heterogénea na superfície do núcleo permitindo formar o invólucro, figura 4.2.³⁵

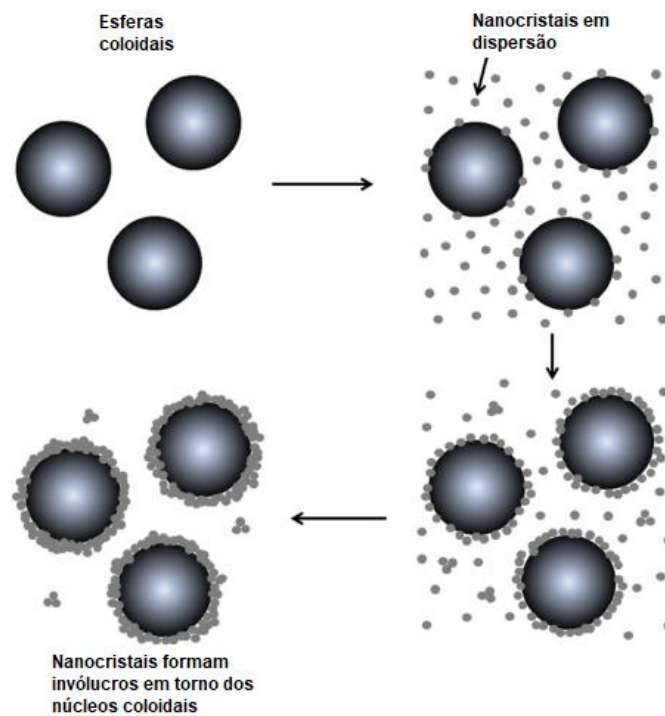


Figura 4.2- Formação do invólucro através de coprecipitação (adaptado de ³⁶).

4.1.1. Nanopartículas magnéticas revestidas por sílica

O uso de nanopartículas magnéticas (mNPs) revestidas por sílica apresenta um potencial elevado para o desenvolvimento de nanoestruturas estáveis e biocompatíveis para aplicações biomédicas. Sendo a sílica um material inorgânico, possui inúmeras aplicações devido à sua alta biocompatibilidade e estabilidade em condições ácidas. O revestimento de sílica fornece uma superfície inerte para as mNPs, aumentando a hidrofiliabilidade e a sua estabilidade em solução.^{33,37}

No que diz respeito ao núcleo, as fases cristalinas que têm suscitado mais interesse são os óxidos de ferro e em particular a magnetite (Fe_3O_4)³⁷, a qual a sua estrutura é apresentada na figura 4.3.

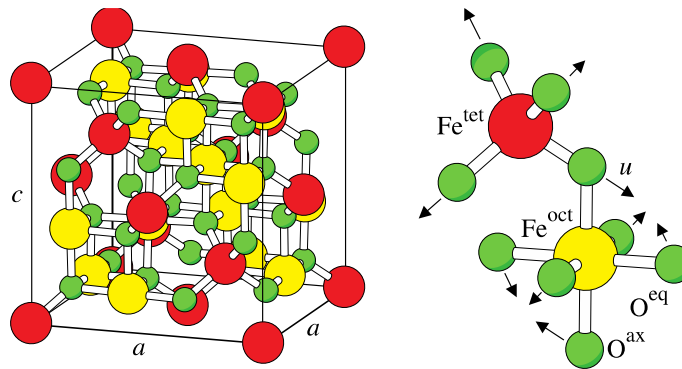


Figura 4.3- Estrutura da magnetite ³⁸.

Estas nanopartículas de ferro são conhecidas como nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs). Existe um enorme potencial para utilizar as SPIONs em aplicações biomédicas, não só para permitir a libertação controlada de fármacos ou terapia génica, mas também em diagnóstico, como por exemplo, como agentes de contraste em ressonância magnética nuclear (RMN).³⁴

É conveniente referir que na União Europeia (EU) e nos Estados Unidos da América (EUA) foram aprovados e estiveram em uso clínico como agentes de contraste diversos fármacos baseados em nanopartículas de magnetite em que, apesar de atualmente já não serem usados na sua formulação original, a combinação com sílica pode potencialmente permitir ultrapassar alguns problemas de toxicidade então encontrados.³⁹

4.2 Processo sol-gel

O processo sol-gel é o método mais comum usado para a preparação de óxidos metálicos tendo como base os sistemas de partículas. Este processo permite a síntese de materiais com propriedades de superfície controladas e estruturas de poros entre 1 - 500 nm.⁴⁰

O método de Werner Stöber descrito anteriormente, foi desenvolvido inicialmente somente para a preparação de nanopartículas monodispersas de sílica. Posteriormente, foi usado para revestimento de diversos substratos e partículas, sendo assim útil para produzir nanopartículas núcleo-invólucro (*core-shell*)^{11,40} (figura 4.4).

Na primeira etapa, os núcleos pré-formados são adicionados a uma mistura de álcool, água e amónia. Na segunda etapa, os precursores de óxidos metálicos são adicionados à mistura anterior e após algum tempo as partículas revestidas podem ser recolhidas por centrifugação.⁴¹

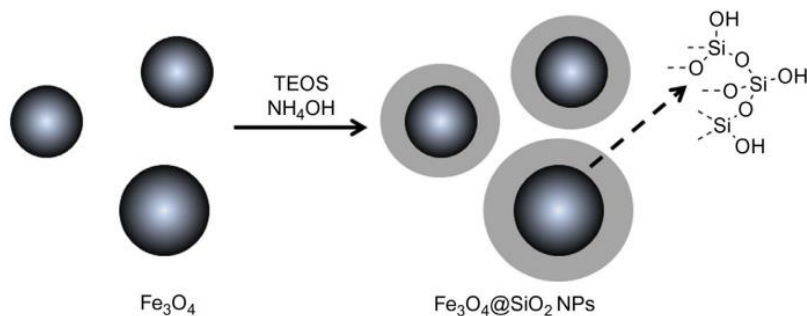


Figura 4.4- Formação de invólucros de sílica em partículas de magnetite superparamagnéticas ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) (adaptado de ³⁶).

A sílica derivada do processo sol-gel é obtida em condições compatíveis com a estabilidade da maioria dos compostos bioativos. A matriz da sílica assim formada pode ser explorada para imobilização de biomoléculas, membranas inorgânicas e suporte para catalisadores, possuindo alta estabilidade em condições fisiológicas.⁴¹

Além disso, as superfícies da sílica podem ser facilmente alteradas promovendo um direcionamento de acordo com os seus propósitos biológicos, nomeadamente para a fixação de anticorpos ou biomoléculas para direcionamento sendo usadas para terapêutica.⁴¹⁻⁴³

A espessura do invólucro é decidida alterando-se a concentração da solução sol-gel podendo variar numa faixa entre 2-100 nm.⁴²

5. Funcionalização dos materiais de sílica

Para possibilitar uma interação fármaco-nanopartícula adequada, é necessário funcionalizar a superfície da sílica. Para tal, foram desenvolvidos diferentes métodos para promover e controlar esta funcionalização orgânica. Os grupos funcionais orgânicos podem ser imobilizados na superfície da sílica através de ligações covalentes ou não covalentes entre esta mesma fração orgânica e o grupo silanol.⁴⁴

5.1. Método de enxerto pós-síntese

O método do enxerto pós-síntese permite incorporar covalentemente funcionalidades orgânicas na superfície de materiais de sílica usando organosilanos.

Este método consiste numa reação de condensação entre $\text{RSi}(\text{OR}')_3$, RSiCl_3 ou $\text{HN}(\text{SiR}_3)_2$ e o grupo silanol livre ($\equiv\text{Si-OH}$) presente na superfície da sílica, figura 5.1. No entanto, ainda que seja um método utilizado para funcionalizar a sílica, conferindo-lhe

propriedades orgânicas, o enxerto pós-síntese confere uma cobertura de superfície não homogênea às nanopartículas de sílica. Esta falta de homogeneidade deve-se à presença de os silanóis nos materiais de sílica, visto que são mais acessíveis na superfície externa e na abertura do poro do que na superfície interna do poro. Havendo uma distribuição não homogênea, a interação com o fármaco não será eficiente.⁴⁴

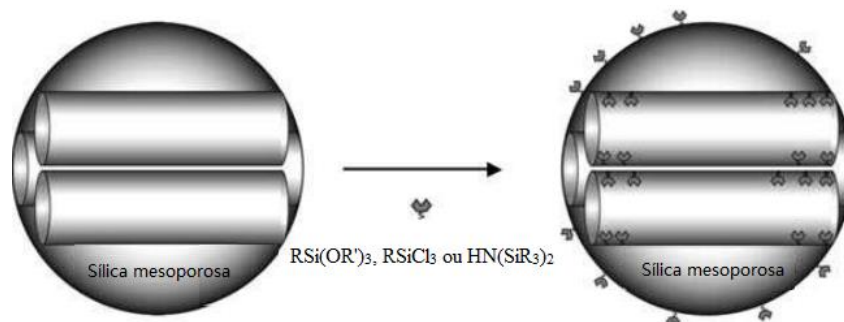


Figura 5.1- Funcionalização da sílica mesoporosa através de reação de condensação entre organosilanos $\text{RSi}(\text{OR}')_3$, RSiCl_3 ou $\text{HN}(\text{SiR}_3)_2$ e grupo silanol livre (adaptado de ⁴⁴).

5.2. Método de co-condensação

Outra possibilidade que permite a preparação de materiais de sílica organicamente funcionalizada é um método de síntese direta denominado de co-condensação, figura 5.2. Este método consiste na adição de um organosilano à solução aquosa contendo CTAB e TEOS.⁴⁴

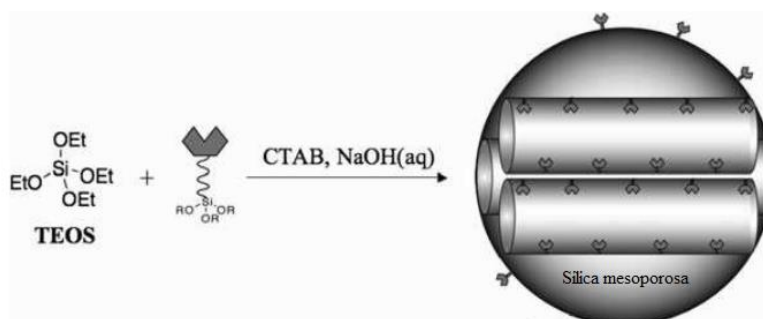


Figura 5.2- Funcionalização da sílica mesoporosa através do método de co-condensação (adaptado de ⁴⁴).

Os precursores organosilanos competem com os aniões de silicato possibilitando a interação eletrostática ou não covalente com as micelas de surfactante, neste caso, CTAB.⁴⁴

Para promover uma síntese eficaz de sílica mesoporosa, é necessário escolher os precursores de organosilanos tendo em conta as características dos seus grupos funcionais. Estes grupos funcionais orgânicos têm de ser solúveis em água e devem apresentar uma tolerância a pH extremos visto que a interação entre estes grupos ocorre durante a reação de condensação, a qual é catalisada por um ácido ou uma base.⁴⁴

A distribuição dos grupos funcionais apresenta-se mais homogênea comparativamente ao método anteriormente mencionado, o que torna este método vantajoso. Todavia, esta cobertura não pode exceder 25% da totalidade, caso contrário destruirá a integridade estrutural.

O método de co-condensação permite algumas modificações no sentido de otimizar não só a variedade como também a quantidade de grupos funcionais incorporados. A utilização de organosilanos com grupos funcionais aniônicos, que interagem electrostaticamente com as micelas de CTAB, permitem a sua estabilização e conseqüente formação da estrutura mesoporosa, figura 5.3. O material orgânico que constitui a micela é posteriormente removido, deixando acessível os grupos funcionais introduzidos pelo organosilano. A figura 5.4 exemplifica a possível reação dos grupos tiol com diversas moléculas dando origem à funcionalização pretendida.

Estes tióis podem depois reagir com outras moléculas adequadas à funcionalização pretendida. ⁴⁴

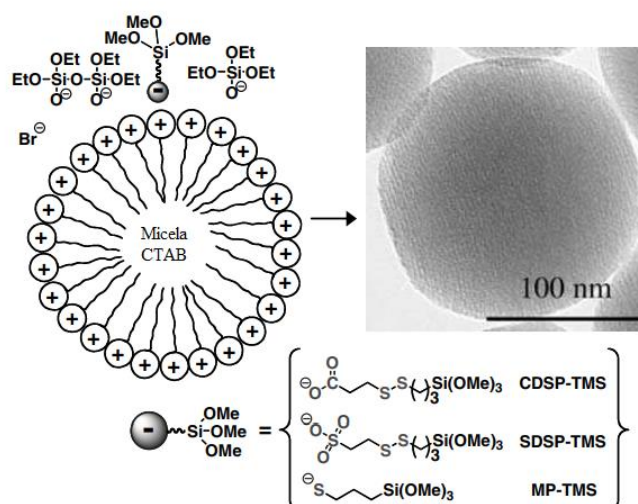


Figura 5.3- Funcionalização da sílica mesoporosa através do método de co-condensação (adaptado de ⁴⁴).

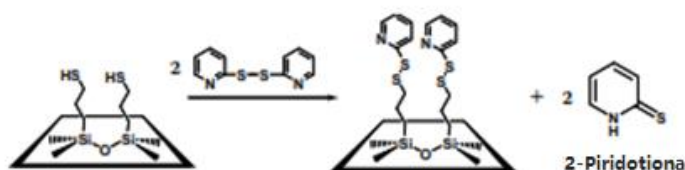


Figura 5.4- Reação dos tióis do MSN com 2-alditiois produzindo 2-piridotona (adaptado de ⁴⁴).

Os resultados obtidos por John W. Larsen et al ⁴⁵ e Daniela R. Radu et al ⁴⁶, os quais são consistentes entre si, permitiram concluir que a quantidade de grupos funcionais orgânicos quimicamente acessíveis nos materiais de sílica pode ser ajustada através da interação eletrostática interfacial entre o surfactante e os precursores de grupos funcionais orgânicos referidos acima.

6. Aplicações médicas

Nos últimos anos, a medicina tem beneficiado da grande evolução da nanotecnologia, nomeadamente no que diz respeito ao desenvolvimento de novos materiais e à sua manipulação à escala nanométrica.^{47,48}

As nanopartículas de sílica (ou contendo sílica), e em particular as nanopartículas de sílica mesoporosa, têm sido alvo de grande interesse neste campo. Estas estruturas apresentam potencial para poderem ser usadas em diagnóstico ou terapêutica uma vez que muitos tipos de corantes e agentes de contraste podem ser incorporados nos seus poros, assim como diversos outros compostos com atividade terapêutica. Esta capacidade de incorporação, torna as nanopartículas passíveis de serem utilizadas como sistemas de entrega de fármacos.^{47,48}

6.1. Transporte e libertação de fármacos

Para um fármaco atingir o local de ação obtendo-se efeito terapêutico desejado e minimizando a toxicidade, é necessário passar por diversos processos, sendo eles: absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME).⁴⁹

No entanto, existe a possibilidade de alterar a eficácia de um fármaco através de um sistema de entrega. Estes sistemas de entrega de fármacos (DDSs) fornecem o fármaco de forma controlada e fazem parte das descobertas mais promissoras na área da saúde. Os DDSs permitem superar as barreiras físicas e consequentemente proteger os fármacos das possíveis degradações enzimáticas, químicas ou mecânicas, antes de atingirem o tecido alvo. Espera-se que estes sistemas também permitam uma atuação mais seletiva dos fármacos, nos tecidos ou células alvo, com menores doses administradas e menos efeitos adversos.⁵⁰

Assim, um sistema de entrega de fármacos deve ser capaz de fornecer uma molécula a um local alvo de maneira controlada, doseando a libertação ao longo do tempo. Os pré-requisitos para sistemas de entrega controlada ideais são:⁵⁰⁻⁵²

- Biocompatibilidade e biodegradabilidade;
- Distribuição controlada do fármaco;
- Libertação do fármaco no alvo terapêutico;
- Evitar uma libertação precoce, a qual pode causar toxicidade visto que não é efetuada no tecido alvo.

Todavia, é difícil encontrar um material ideal para um sistema de entrega com todas estas propriedades e funcionalidades. Têm sido desenvolvidos e testados vários sistemas de

entrega, como por exemplo nanopartículas poliméricas, dendrímeros e lipossomas. Verifica-se que é comum nestes sistemas a ocorrência de libertação prematura da maioria dos fármacos devido à degradação da matriz polimérica.^{50,51,53}

Para ultrapassar esta adversidade, têm sido desenvolvidos sistemas baseados em nanopartículas, incluindo MSNs.⁵³

As MSNs apresentam as características que as tornam candidatas ideais para o transporte e libertação de fármacos. Estas características foram descritas por M.Valet-Regí et al.⁵⁴ em 2001 e têm sido a principal razão para o interesse destes materiais na área da medicina, cujo potencial tem sido descrito em inúmeros estudos.

A elevada área superficial determina a capacidade de carga das moléculas, sendo que quanto maior a superfície de contacto, maior o número de moléculas que é possível incorporar nas nanopartículas. O volume dos poros também influencia a quantidade de fármaco carregado.⁵⁵ Aquando da síntese das MSNs é possível controlar o diâmetro dos poros, e tendo em conta que diversos fármacos apresentam diferentes dimensões, esta característica influencia as moléculas que são passíveis de serem carregadas, através de um efeito de seleção de tamanho. O efeito do tamanho de poro manifestar-se-á no processo de libertação do fármaco, podendo ter influência na atividade e toxicidade do fármaco.⁵⁶⁻⁵⁸

A tabela 6.1 mostra alguns exemplos de fármacos, proteínas e corantes para exames de diagnóstico passíveis de serem libertados através de nanopartículas de sílica mesoporosas.

Tabela 6.1- Diferentes tipos de materiais passíveis de serem carregados nos MSN's e alterações subjacentes.

MATERIAL	FÁRMACO/ PROTEINA/ CORANTE	MODIFICAÇÃO	MECANISMO DE LIBERTAÇÃO	REFERÊNCIA
MCM-41	Ibuprofeno	Sem modificação	Difusão a partir de diferentes tamanhos de poros	55
MCM-41	Ibuprofeno	Funcionalização -NH ₂	Difusão	54
MCM-41	Camptotecin a	Funcionalização amino e fosfonato	Difusão	59
MCM-41	Paclitaxel	Funcionalização -NH ₂	Captação celular dependente de energia	60
MCM-41	Atenolol	Hidroxil apatite (MCM-41-HA incorporação da hidroxiapatita na sílica demonstrou excelente biodegradabilidade)	Difusão lenta devido à composição (HA /MCM-41)	61
MSN'S	Rodamina B	α -CD revestindo os MSNs	Libertação devido a estímulo enzimático	62
SBA-15	Albumina sérica bovina	Sem funcionalização	Difusão controlada	63

Tal como mostra a tabela, a sílica MCM-41 pode carregar fármacos como o ibuprofeno (IBU) e o atenolol, entre outros.

Este nanomaterial possui limitações no tamanho da molécula de fármaco que pode incorporar, 2-3 nm, devido ao seu pequeno tamanho de poros. Como tal, para carregar moléculas de maior dimensão, como proteínas, enzimas ou ácido desoxirribonucleico (ADN), foi necessário adequar a dimensão e capacidade dos materiais. Assim, surgiu como uma alternativa viável, a sílica mesoporosa SBA-15, possuindo poros de maiores dimensões (6-7 nm) e podem ainda apresentar uma rede secundária de microporos, figura 6.1.²⁷ Esta estrutura porosa de grandes dimensões é particularmente importante, porque os materiais do tipo SBA-15 apresentam maior estabilidade térmica e química do que a sílica do tipo MCM-41.⁶⁴

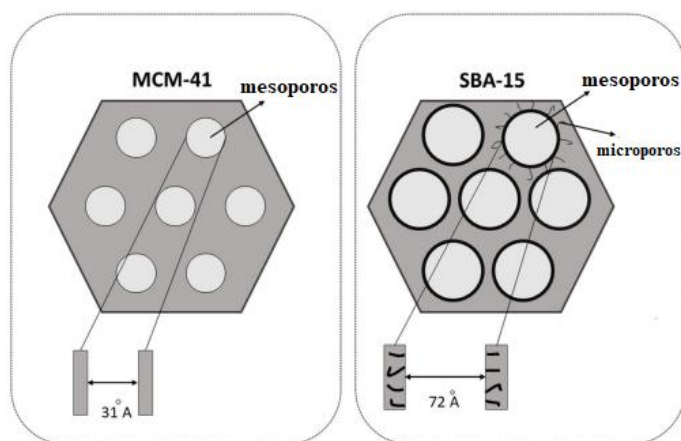


Figura 6.1- Comparação do tamanho de poros entre MCM-41 e SBA-15 (adaptado de³⁰).

A parede dos poros dos MCM-41 é constituída por uma rede desordenada de pontes de siloxano e grupos silanol livres, o que permite interatuar com moléculas orgânicas sendo um dos exemplos, o ibuprofeno. Como o ibuprofeno contém um grupo ácido carboxílico, interage com o grupo silanol e assim, estas nanopartículas MCM-41 podem funcionar como DDs.⁵⁴

M. Vallet-Regí et al.⁵⁴ procuraram depreender como se comportariam os materiais MCM-41 sem funcionalização interagendo com moléculas orgânicas, bem como qual seria a consequência na libertação do fármaco, diferindo o tamanho de poro.

Estudos anteriores mostraram que o tamanho dos poros está relacionado com o surfactante usado na síntese, sendo que quanto maior o tamanho da cadeia do surfactante, maior é o tamanho do poro.⁶⁵

Tal como indica a figura 6.2, existe uma diferença na libertação de fármacos entre a amostra 1 e a amostra 2, sendo que na preparação foi usado como surfactante C₁₂TAB e C₁₆TAB, respetivamente.

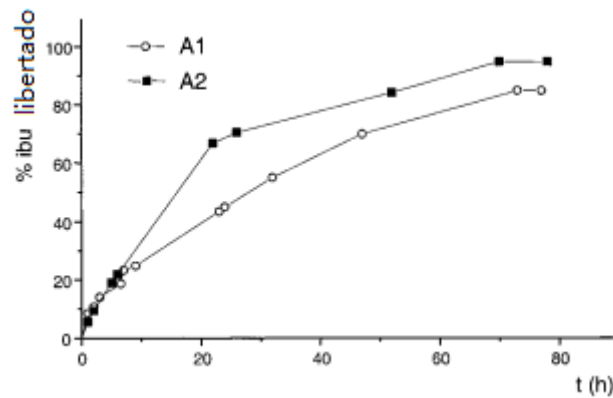


Figura 6.2- Liberação de ibuprofeno (%) em função do tempo (h) em materiais de MCM-41. (adaptado de⁵⁴).

Foi possível depreender que durante o primeiro dia a amostra 2 libertou 68% do ibuprofeno contido nos poros, já a amostra 1 libertou 55% do ibuprofeno. Isto corrobora a informação supracitada, visto que o tamanho de poro é ligeiramente maior na amostra 2.⁵⁴

A fim de compreender a influência da estrutura interna e morfologia externa de SBA-15 na taxa de liberação de ibuprofeno em fluido corporal simulado, Zhengwei Jin et al.⁶⁶ sintetizaram três tipos de sílica mesoporosa. Nomeadamente, CPS-SBA-15 (tamanho de poro convencional e morfologia em forma de bastão), preparada de acordo com o método relatado por Dongyuan Zhao et al.²⁴ anteriormente descrito. LPS-SBA-15 (morfologia em forma de bastão de tamanho grande de poro), o qual foi sintetizado de acordo com o método anterior adicionando 1,3,5-trimetilbenzeno. Por último, com o objetivo de controlar a morfologia, foi adicionado K_2SO_4 de acordo com o método relatado por Xiuguo Cui et al.⁶⁷ originando a amostra T-SBA-15 (morfologia em forma de comprimido).

A sílica CPS-SBA-15, tal como indica a figura 6.3, sem qualquer tipo de modificação, mostra uma liberação mais lenta comparativamente a LPS-SBA-15. Para ser libertado 64,6% de ibuprofeno, a amostra CPS demorou mais de 2h, sendo que o tempo para a liberação completa foi de 12h. Já a amostra LPS demorou cerca de 0,6h a libertar 65 %, sendo finalizada a liberação ao fim de 24h.

No entanto, para a amostra T-SBA-15, mais de 50,0% em peso de ibuprofeno é libertado em 1 h, sendo completamente libertado ao fim de 24h. Comparativamente à amostra CPS, a liberação total decorre durante o mesmo período. Contudo, este possui uma liberação mais rápida inicialmente e deverá apresentar um efeito terapêutico mais rápido.⁶⁶

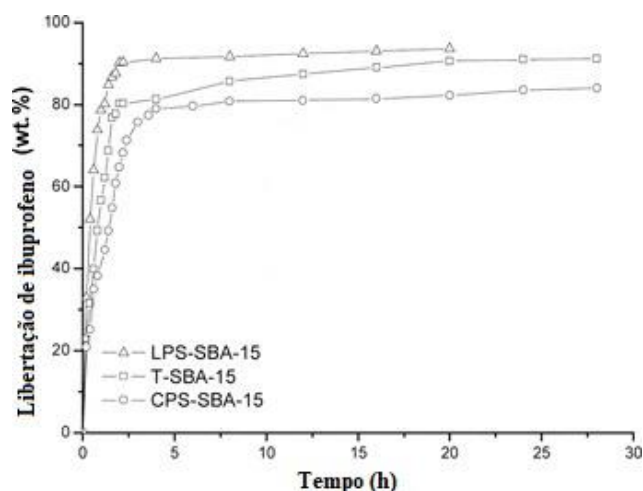


Figura 6.3- Libertação de ibuprofeno incorporado nos poros (wt%) em função do tempo (adaptado de ⁶⁶).

Um outro exemplo das potencialidades do SBA-15 como transportador de fármacos foi dado por um estudo de Tae-Wan Kim et al.⁶⁴ Neste trabalho, os autores prepararam nanopartículas de sílica mesoporosa semelhante ao SBA-15 usando o copolímero de blocos *Pluronic P104* e TEOS como precursor de sílica, tendo obtido partículas com um tamanho médio de 500-600 nm.

Foi incorporado dentro dos poros da sílica uma macromolécula (dextrano) e foi perceptível a capacidade de as nanopartículas a transportarem através da membrana celular, libertando-a de forma controlada no interior da célula de acordo com o pH.

Neste caso, a modificação foi efetuada no sentido de permitir o carregamento de uma molécula de grande tamanho, bem como de alterar as características necessárias para permitir o transporte das MSNs através da membrana celular, no entanto, a funcionalização da superfície pode ter outros propósitos, tais como a discriminação entre fármacos a serem transportados e/ou o controlo da libertação dos fármacos.

6.1.1. Funcionalização dos sistemas de entrega de fármacos controlada

A modificação ou funcionalização da superfície dos DDSs através de grupos orgânicos permite controlar a absorção e libertação dos fármacos.⁶⁸⁻⁷⁰ Como já referido anteriormente, a sílica mesoporosa apresenta uma alta densidade de grupos silanol pelo que um tratamento com alcóxidos orgânicos de silício (alcoxilanos) permite obter superfícies funcionalizadas. Alguns exemplos de grupos funcionais ancorados na superfície de sílicas mesoporosas através deste processo são apresentados na figura 6.4.⁵⁵

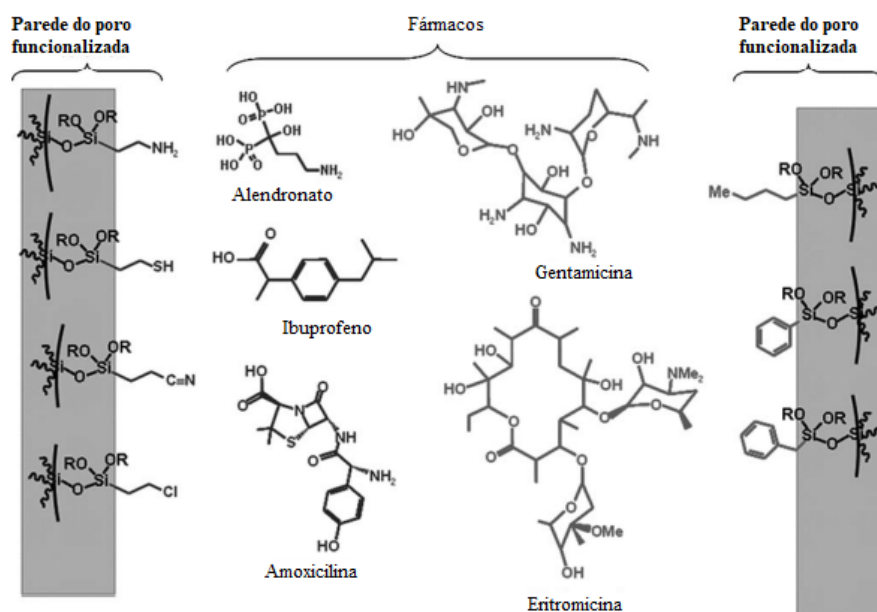


Figura 6.4- Funcionalização dos MSNs e estruturas de fármacos possíveis de incorporar nesses sistemas (adaptado de ⁵⁵).

A liberação dos fármacos pode ser efetivamente controlada por diferentes métodos sendo o mais desenvolvido o aumento da interação fármaco-superfície. Para isso, a superfície é funcionalizada com grupos químicos que são capazes de se ligar às moléculas do fármaco por meio de ligações não covalentes. ⁷¹

S.W. Song et al. ⁷² relataram o carregamento do fármaco em SBA-15 puro e compararam estes resultados com os obtidos através de funcionalização.

Para sintetizar e funcionalizar o SBA-15, podem ser utilizados dois métodos, o método de co-condensação ou *one pot-synthesis* (OPS), onde o material é formado e ao mesmo tempo funcionalizado ou o método pós-síntese em que o material é primeiro sintetizado e posteriormente funcionalizado. ⁷³

Os materiais SBA-15 referidos na tabela 6.2 foram funcionalizados usando o método OPS sendo OPS0 o SBA-15 sem funcionalização e OPS1, OPS2, OPS3 SBA-15 funcionalizados com grupos amino com aumento gradual de grupos funcionais.

Tabela 6.2-Quantidade de fármaco carregada em diferentes amostras de SBA-15 sintetizadas usando o método de co-condensação. ⁷²

Amostra	Quantidade de ibuprofeno carregado (wt%)
OPS0	14,6
OPS1	16,9
OPS2	23,8
OPS3	17,5

O resultado mostra que uma quantidade crescente de grupos funcionais aumenta a quantidade de carga de ibuprofeno (IBU) exceto para a amostra OPS3, que possui estruturas amorfas e desordenadas, o que não permite uma ligação tão eficiente entre a amina e o fármaco, visto que possui uma grande quantidade de poros inacessíveis. Este resultado indica que tanto os grupos funcionais, quanto as estruturas ordenadas desempenham papéis fundamentais na influência da quantidade de fármaco adsorvido no SBA-15.⁷²

Os dados da tabela 2 mostram também que é possível carregar uma quantidade significativa de ibuprofeno no SBA-15 não funcionalizado dado que, existindo grupos silanol nas paredes dos poros, é possível a formação de ligações de hidrogénio com o grupo carboxílico do ibuprofeno, como exemplificado na figura 6.5 a).⁷²

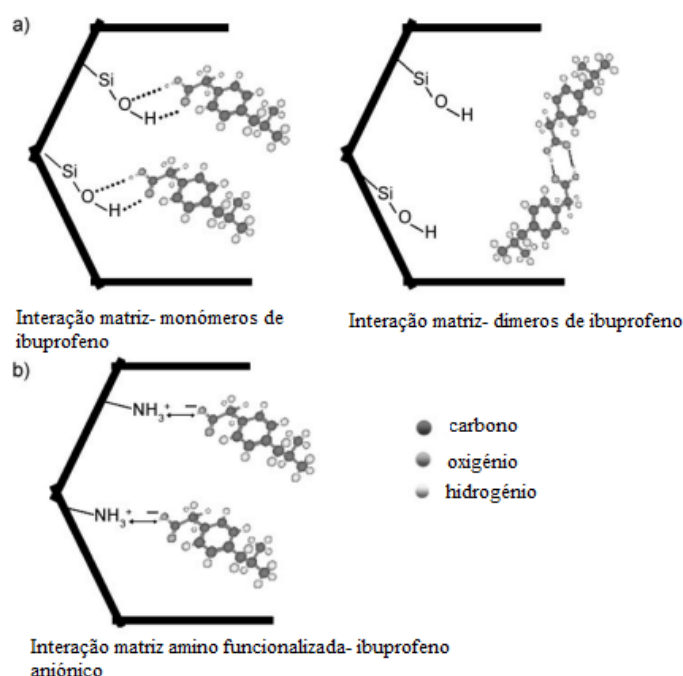


Figura 6.5- Ligação de ibuprofeno a um MSNs. a) Matriz não funcionalizada, ligações fracas entre grupo carboxílico e silanol (esquerda), o ibuprofeno pode ligar-se entre si e formar um dímero (direita). b) Matriz amino-funcionalizada: o IBU é ligado à parede do poro através de interações iônicas entre o ácido carboxílico e a amina (adaptado de ⁵⁵).

Além disso existe a possibilidade de formação de dímeros através da interação fármaco-fármaco existindo ligações do hidrogênio intermoleculares através dos grupos carboxilos.⁵⁵

Para comprovar que a funcionalização é um método eficaz, foi realizada análise de ressonância magnética nuclear (RMN). O RMN revelou que as moléculas de ibuprofeno se encontram fortemente ligadas à matriz das MSNs. Assim, provou-se que as interações que ocorrem quando os MSNs estão funcionalizados (neste caso com adição de grupos amino) são mais fortes do que quando as MSNs não estão funcionalizadas.^{55,72}

Os MSNs têm captado o interesse como objeto de investigação ao longo dos anos, tendo sido estudada uma variedade de classes de fármacos, não só anti-inflamatórios como referido anteriormente, mas também fármacos anticancerígenos, antifúngicos e antibióticos.

Daniel Pedraza et al.⁷⁴ mostraram que as nanopartículas de sílica mesoporosa funcionalizadas com um agente de direcionamento podem ser utilizadas para carregar um antibiótico, levofloxacina (LEVO), permitindo que este penetre diretamente nas bactérias.

A levofloxacina é uma fluoroquinolona de largo espectro e é utilizada para infeções ósseas. O tratamento de infeções ósseas continua a ter adversidades devido à alta taxa de efeitos colaterais nos pacientes, longa permanência nos hospitais e alta morbidade. Isto deve-se ao facto de a terapêutica atual possuir uma elevada toxicidade, baixa seletividade para as bactérias e uma baixa eficácia.⁷⁵

A nanomedicina envolvendo MSNs surge como uma solução para os problemas acima descritos. Para possibilitar aos MSNs terem propriedades de direcionamento para bactérias, a superfície foi funcionalizada com N-(2-aminoetil)-3-aminopropiltriétoxissilano (DAMO, agente de direcionamento), por meio de um enxerto pós-síntese.⁷⁴

Para sintetizar MSN-DAMO, promoveu-se uma reação de condensação entre as moléculas de DAMO e os grupos silanol na superfície do MSN, conforme indicado na figura 6.6.⁷⁴

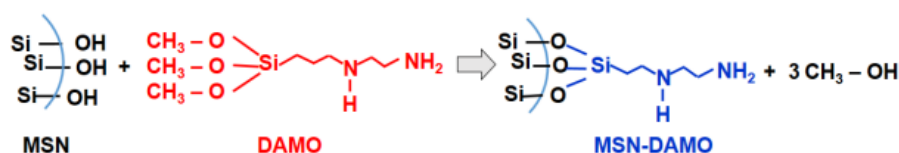


Figura 6.6- Reação de condensação entre MSN e DAMO (agente de direcionamento).⁷⁴

A funcionalização dos MSNs pode torná-los detentores de cargas positivas (grupos amina carregados positivamente), melhorando a afinidade com a parede bacteriana e com o biofilme bacteriano de carga negativa, permitindo interações eletrostática atrativas.

Além disso, os resultados exibidos na figura 6.7 indicam que a libertação de LEVO do MSN é mais lenta do que do MSN-DAMO. Comparando a libertação do fármaco após 330 horas, é possível denotar-se que a amostra MSN-DAMO libertou a totalidade de fármaco contido no MSN, enquanto no MSN não funcionalizado apenas libertou 0,4%.⁷⁴

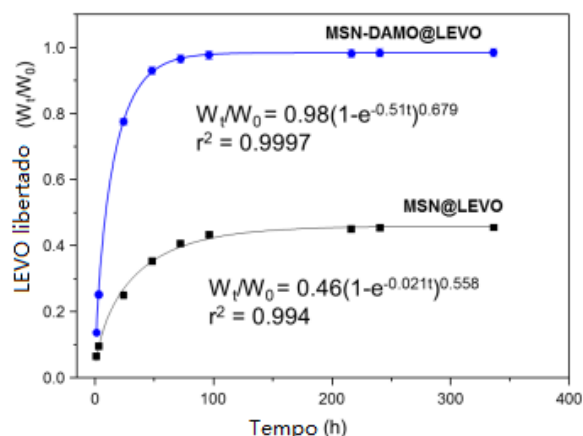


Figura 6.7- Liberação de LEVO em função do tempo em matriz funcionalizada (MSN-DAMO@Levo) e matriz não funcionalizada (MSN@Levo) (adaptado de ⁷⁴).

Neste trabalho foi avaliada a eficácia do nanoantibiótico (antibiótico + nanopartículas) contra um biofilme de *Staphylococcus aureus*, como mostra a figura 6.8. Esta avaliação envolveu um estudo de microscopia confocal correspondente ao biofilme de *S. aureus* pré-formado. ⁷⁴

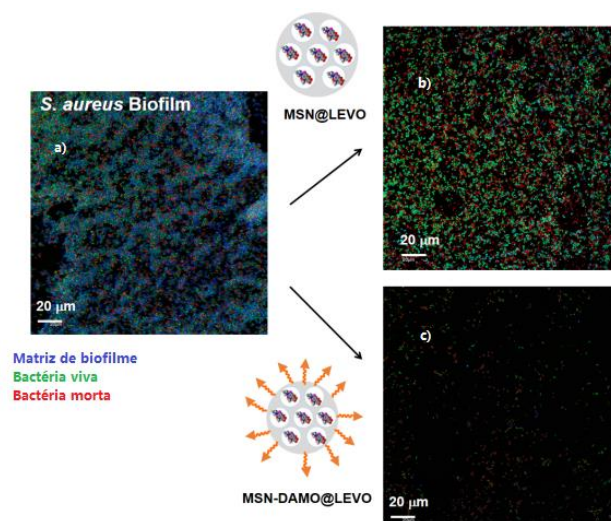


Figure 6.8- Microscopia do biofilme *S.aureus* sem tratamento (a), com tratamento sem agente de direcionamento (b), com tratamento com agente de direcionamento (c) (adaptado de ⁷⁴).

Quando não é adicionado ao biofilme qualquer nanossistema, este apresenta diversas bactérias vivas (a cor verde) e apenas uma pequena quantidade de bactérias mortas (vermelho), as quais se encontram revestidas por uma matriz polissacárida. Após o tratamento com MSN@LEVO observa-se um grande número de bactérias vivas contrariamente ao tratamento com MSN-DAMO@LEVO que leva a uma destruição completa do biofilme (figura 6.8c). ⁷⁴

Os autores concluíram que a incorporação sinérgica de agente de direcionamento e antibiótico num nanomaterial permite alcançar bons resultados no tratamento da infecção óssea.

Adicionalmente, outros antibióticos tal como ampicilina, vancomicina, rifampicina, carregadas em MSNs permitiram reduzir drasticamente as bactérias viáveis e diminuir a densidade do biofilme sendo assim uma possibilidade para a irradiação de *S.aureus*.⁷⁶

Valentina Nairi et al.⁷⁷ estudaram a influência na adsorção e libertação de ampicilina em diversas estruturas tendo em conta o tamanho de poro (o MCM-41 tem uma dimensão de poro menor do que o SBA-15 sem funcionalização) e de acordo com os grupos funcionais presentes (grupo amina em SBA-15, SBA-15 e MCM-41 sem funcionalização).

Verificou-se que tanto a adsorção quanto a libertação são mais influenciadas pela carga superficial do que pelo tamanho dos poros. A baixa carga superficial negativa das duas matrizes de sílica pura SBA-15 e MCM-41 favorece uma libertação rápida a pH 7,4, como demonstra a figura 6.9.

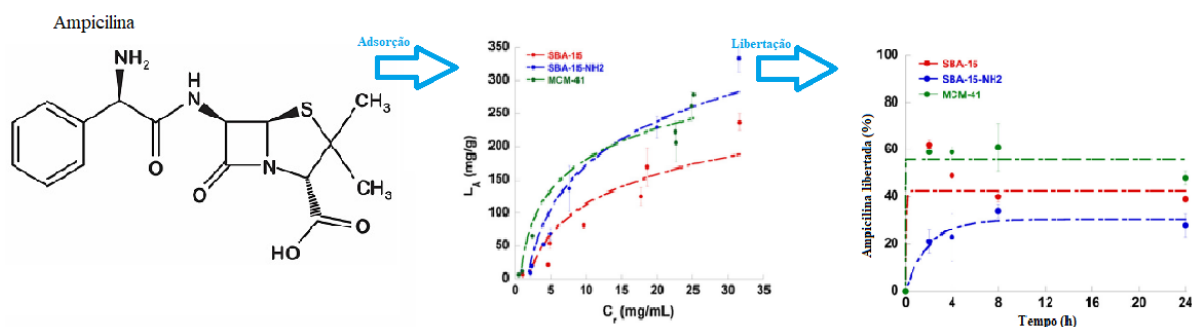


Figura 6.9- Adsorção e libertação da ampicilina contida em SBA-15-NH₂ (azul), SBA-15 (vermelho) e MCM-41 (verde) (adaptado de ⁷⁷).

Tanto o SBA-15 como o MCM-41 libertaram abruptamente o fármaco, no entanto o MCM-41 alcançou uma libertação total superior devido ao facto deste material possuir um menor tamanho de poro, o que faz com que as moléculas de fármaco (de dimensão significativa) sofram algumas restrições difusionais no interior dos poros e, devido a este efeito, se localizem preferencialmente na superfície mais externa.

Relativamente à funcionalização, no caso da matriz de SBA-15-NH₂ as interações eletrostáticas entre o grupo carboxilo de carga negativa da ampicilina e o grupo amina protonado do SBA-15 possibilitam uma libertação mais controlada.⁷⁷

Para proporcionar uma maior semelhança com o ambiente fisiológico Guobin Qi et al.⁷⁸ testaram em ratos o uso de nanopartículas de sílica mesoporosa funcionalizadas e com vancomicina (MSNs=Van) no seu interior e discutiram os seus efeitos em células semelhantes a macrófagos.

Os macrófagos são as primeiras células que se mobilizam localmente quando existe uma infecção bacteriana. No entanto, o tratamento da infecção bacteriana com um fármaco pode ser prejudicial para os macrófagos visto que se não existir seletividade para o tecido infeccioso pode causar-lhes dano.

No sentido de mitigar este efeito, os autores ⁷⁸ funcionalizaram a MSN com grupos amina e ao adicionarem vancomicina ocorreu formação de interações específicas de ligação de hidrogénio entre a vancomicina e as porções terminais D-alanil-D-alanina das bactérias gram-positivas (ligação de cinco hidrogénios entre o esqueleto heptapeptídico da vancomicina e o dipeptídeo D-alanil-D-alanina). Estas interações podem ser comprovadas através do sinal de fluorescência obtido por moléculas fluorescentes, isotiocianato de fluoresceína (FITC), as quais se encontram dentro dos mesoporos do MSN, figura 6.10. Por outro lado, o fraco sinal de fluorescência que advém da interação entre MSN-Van e *Escherichia coli* deve-se ao facto de esta ser uma bactéria gram-negativa, havendo interação eletrostática não específica entre o MSN-VAN carregado positivamente e a superfície da membrana bacteriana carregada negativamente.

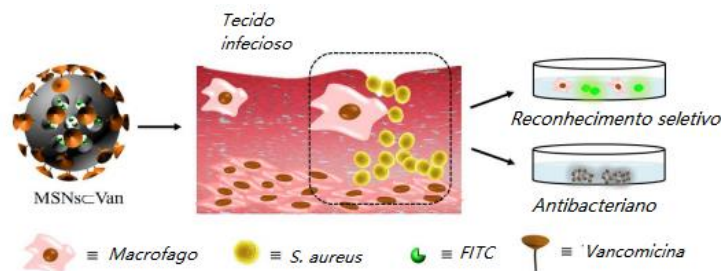


Figura 6.10- Uso de MSN-VAN em tecido infeccioso sem causar dano aos macrófagos, reconhecimento seletivo obtido através de sinal fluorescente dado por FITC. (adaptado de ⁷⁸).

As células Raw 264.7 (linhagem de células de macrófagos do rato) foram escolhidas para imitar o ambiente tecidual infeccioso no qual se encontram as células de macrófagos. Os autores incubaram as células Raw 264.7 com *S. aureus* e *E.coli* separadamente e posteriormente adicionaram as MSN-VAN, sendo possível concluir que *S.aureus* apresentou fluorescência contrariamente às células Raw 264.7 com *E.coli* (figura 6.11), o que tornou o tratamento promissor visto que mostrou não danificar as mesmas. ⁷⁸



Figura 6.11- Imagem de sinal fluorescente dado por FITC contido em MSN-VAN (adaptado de ⁷⁸).

As MSN-VAN mostraram atividade antibacteriana notável e foi possível observar uma diminuição de 10 vezes da contagem bacteriana nos tecidos infetados 5 dias após a administração de MSNs-VAN em comparação com os grupos de controlo tratados com PBS (tampão de fosfato salino) ou MSNs (sem funcionalização nem adição de vancomicina).

Este sistema não só possui uma maior eficácia terapêutica, mas também um efeito colateral minimizado visto que se observa uma ausência de diminuição da viabilidade celular de células semelhantes a macrófagos.⁷⁸

É importante notar que os MSNs demonstraram ser biocompatíveis tanto *in vitro* quanto *in vivo* e exibiram estabilidade adequada em diferentes meios biológicos.^{79,80}

Com o passar dos anos, percebeu-se que não é apenas nas células do sistema imunológico que os antibióticos podem ter efeitos adversos.

No que diz respeito à rifampicina, esta também é um antibiótico eficaz para combater *S.aureus*, no entanto possui baixa solubilidade e permeabilidade no intestino, bem como uma elevada hepatotoxicidade em doses muito altas. Para resolver estas adversidades Santhni Subramaniam et al.⁸¹ estudaram a eficácia e melhorias a nível da toxicidade, administrando rifampicina em MSNs.

Tal como demonstra a figura 6.12, ao usar-se MSN como transportador para a rifampicina, esta apresenta bastante mais eficácia em diminuir o número de bactérias quando comparada com a administração de rifampicina livre. A rifampicina livre não demonstrou atividade antibacteriana contra *S.aureus* comparativamente a um grupo de controlo sem tratamento, o que se deve à baixa capacidade de captação de rifampicina intracelularmente.

Comparando MSN-Rif 40 nm com MSN-Rif 100 nm (diferente tamanho de poro) é de notar que existe uma ligeira diferença na contagem bacteriana usando MSN-Rif 100 nm, no entanto esta diferença não foi estatisticamente relevante ($p>0,05$).

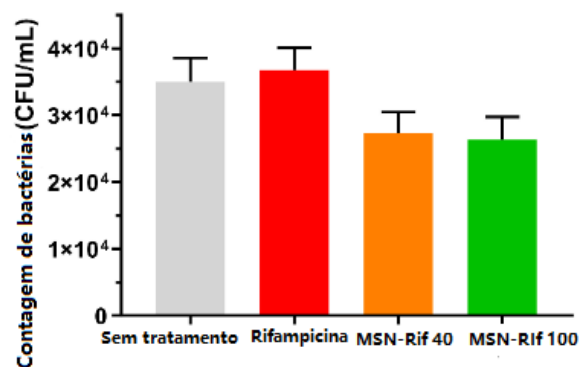


Figura 6.12- Comparação da contagem bacteriana em células sem tratamento (cinzento), com rifampicina livre (vermelho), MSN-RIF 40 (laranja) e MSN-RIF 100 (verde) (adaptado de ⁸¹).

Após análise dos resultados foi possível concluir que usar MSN como nanotransportador vai facilitar a internalização do fármaco e por consequência uma melhor eficácia terapêutica. Adicionalmente, devido à maior seletividade bacteriana diminui a toxicidade, reduzindo o risco de hepatotoxicidade. ⁸¹

6.1.2. Liberação de fármacos de acordo com o pH

Os fármacos possuem maioritariamente ação benéfica, no entanto podem também apresentar efeitos colaterais que limitem a sua aplicação clínica. O objetivo primordial sempre foi alcançar a liberação seletiva dos fármacos em áreas-alvo do corpo, de modo a maximizar o potencial terapêutico e minimizar os efeitos adversos. Por exemplo, compostos citotóxicos usados no tratamento do cancro podem afetar células-alvo, mas também células normais do corpo, resultando em efeitos adversos indesejados. Havendo a necessidade de direcionar a terapêutica para o local alvo, a entrega seletiva de fármacos pode ser uma das estratégias com elevado potencial para este fim. ^{82,83}

A quimioterapia baseada em nanopartículas tem potencial para tratar tanto tumores primários quanto metastáticos, o que permite que as nanopartículas sejam amplamente aplicadas em pesquisas antitumorais. ⁸⁴

Tratamentos específicos de longo prazo podem necessitar de um aumento ou diminuição da taxa de liberação do fármaco, dependendo da evolução da patologia, sendo que, para tal, é necessário implementar sistemas capazes de responder a mudanças internas de pH. ^{82,83}

Uma abordagem possível, e que tem vindo a ser estudada para dar resposta a estes e outros problemas relacionados, é a utilização de sistemas de entrega de fármacos envolvendo MSNs sensíveis a estímulos exteriores, tais como o pH, radiação luz ou campo magnético. ⁸⁵

No que diz respeito à libertação estimulada por pH, um sistema eficiente deve permitir a libertação do fármaco na quantidade adequada com pequenas variações de pH no meio. Para este efeito Ling Bai et al.⁸⁶ descreveram como estratégia o revestimento das MSNs com macromoléculas orgânicas, nanopartículas, ou biomoléculas, que permitem apenas a saída das moléculas encapsuladas no interior dos poros da sílica quando o estímulo adequado é fornecido. Estas moléculas são designadas por *gatekeepers*, sendo que uma das metodologias que parece ser mais eficaz é o uso de moléculas orgânicas macrocíclicas para fabricar *gated-MSNs*, neste caso β -ciclodextrina, figura 6.13.

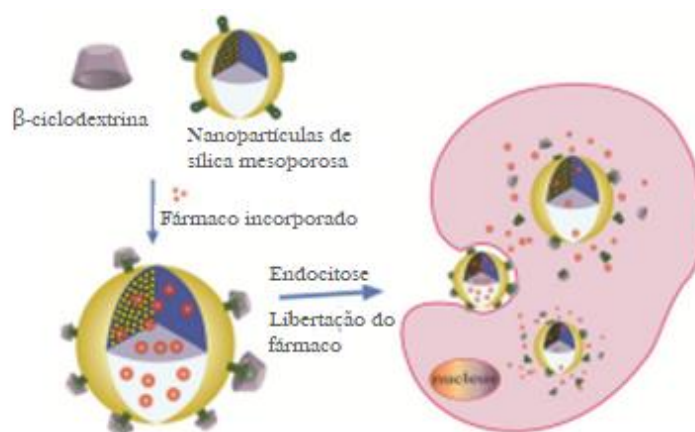


Figura 6.13-Formação de MSNs e entrada na célula (adaptado de⁸⁷).

As ciclodextrinas pertencem a uma classe de oligossacarídeos cíclicos que possuem cavidades molecularmente compatíveis. São as moléculas-hospedeiro mais utilizadas por serem produtos naturais de baixo custo, solúveis em água, não tóxicos, prontamente funcionalizados e comercialmente disponíveis.⁸⁸

De entre todos os *gatekeepers* baseados em moléculas orgânicas macrocíclicas, as ciclodextrinas (CDs), α -, γ - , β -ciclodextrina (figura 6.14) têm recebido maior atenção para libertação de farmacos, dado que estas têm dimensões compatíveis com a saída dos poros.⁸⁶

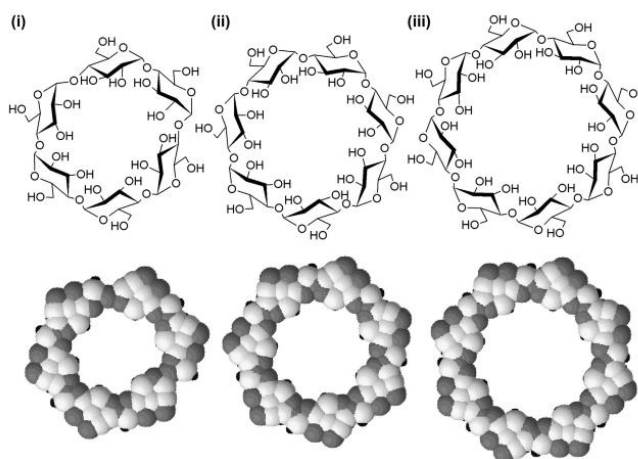


Figura 6.14- Estruturas de α -ciclodextrina (i) β -ciclodextrina (ii) γ -ciclodextrina, os átomos de hidrogénio, carbono e oxigénio estão coloridos em preto, branco e cinza, respetivamente (iii)⁸⁷.

No trabalho experimental Ling Bai et al.⁸⁶ usaram ciclodextrina a fim de revestir firmemente a extremidade da haste de p-anisidina previamente ligada à superfície da sílica. A ciclodextrina devido ao seu tamanho, impede a saída de qualquer molécula que se encontre no interior do MSN quando o pH se encontra neutro, regulando a libertação das moléculas inseridas nos canais de sílica. Este revestimento pode ser revertido, através da adição de um ácido, o qual torna o átomo de azoto da p-anisidina (figura 6.15) protonado, e conseqüentemente provoca a saída da ciclodextrina. Estando a haste de p-anisidina livre, leva à abertura dos poros da sílica e permite a saída da molécula de fármaco que esta carregava, tal como mostra a figura 6.16.^{86,87,89}

Foi observada uma libertação mais rápida de doxorrubicina (DOX) a pH levemente ácido 5,5.⁸⁶

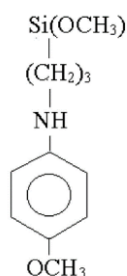


Figura 6.15-Estrutura molecular do precursor de p- anisidina ligada à superfície da sílica.⁹⁰

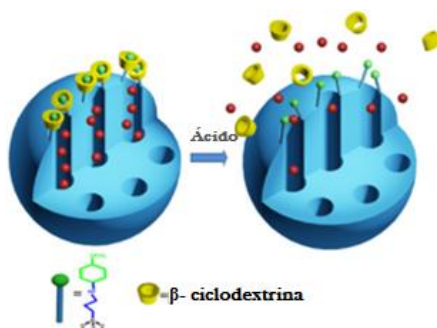


Figura 6.16- Saída do fármaco devido ao pH ácido do meio (adaptado de ⁸⁶).

As condições de pH ácido observam-se em locais de inflamação, compartimentos lisossômicos ou no tecido tumoral, o qual difere do pH neutro presente na maioria dos tecidos humanos. Por exemplo, o ambiente extracelular nos tecidos tumorais é mais ácido (pH 6,5) do que no sangue e tecidos normais (pH 7,4), e os valores de pH do endossoma e lisossoma nas células cancerígenas estão entre 5,0 e 5,5^{86,89}

Assim, este sistema é considerado um candidato promissor para a terapia do cancro, permitindo a entrega intracelular de fármacos, como doxorrubicina, através de entrada por endocitose.⁸⁶

A doxorubicina é um antibiótico antitumoral, que atua intercalando o ADN em sequências específicas, formando radicais livres que provocam a separação das cadeias de ADN. Este antibiótico atua através da inibição da ação das Topoisomerases I e II, que são necessárias para o desenrolamento das cadeias de ADN durante a replicação.⁹¹ É também considerado vantajoso devido à sua capacidade de afetar as células tumorais de forma eficaz, no entanto pode causar efeitos adversos a nível da função cardíaca, o que pode ser um grave inconveniente.⁹²

Existem outras estratégias, além da libertação através do estímulo gerado pela diferença de pH, para permitir que o fármaco tenha uma libertação mais seletiva e prolongada evitando a sua excreção prematura pelos rins. Zhiming Zhang et al.⁸⁴ realizaram um estudo no qual a DOX foi incorporada em MSNs e simultaneamente foi também incorporado nos poros bicarbonato de amónio, NH_4HCO_3 , figura 6.17 A.

O bicarbonato de amónio decompõe-se quando o ambiente se torna ácido (presença de inflamação ou de tumores) e com condições de aquecimento. O NH_4HCO_3 tem a capacidade de se decompor em bolhas de CO_2 , NH_3 , H_2O ⁸⁴, figura 6.17 C o que permite uma libertação mais rápida da DOX, figura 6.17 B, possibilitando a sua saída pelos poros.⁹³

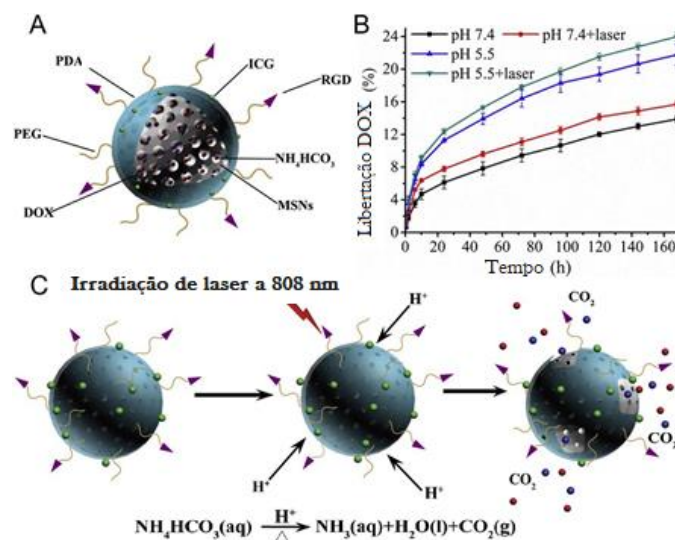


Figura 6.17- A- Constituição da MSNs B- Percentagem de libertação da doxorubicina em função do pH do ambiente e da utilização de laser C- NH_4HCO_3 transformada em bolhas de CO_2 e destruição do revestimento em polidopamina (PDA) (adaptado de ⁸⁴).

Para funcionalizar as MSNs é possível modificar a sua superfície através da adição de polímeros ou pequenas moléculas, particularmente polidopamina (PDA), ácido fólico, fosfato de cálcio. Esta funcionalização permite uma atração electrostática bem como uma biomineralização no caso do fosfato de cálcio.^{84,94}

A PDA é um polímero biomimético com propriedades adesivas o que facilita a modificação da superfície. Este comportamento deve-se ao facto deste polímero conter um

grupo quinona, com conhecido potencial de reatividade, o que lhe permite ligar-se a aminas, tióis ou imidazóis, através do ataque nucleofílico ao carbonilo ou ao anel benzênico.⁹⁵⁻⁹⁷

Este polímero forma um revestimento adesivo em volta das MSNs evitando a liberação precoce da DOX, no entanto sendo sensível ao pH, permite o direcionamento e liberação no tecido alvo, evitando a toxicidade a nível cardíaco. Adicionalmente, os autores incorporaram um agente fototérmico e fotodinâmico à camada de PDA, indocianina verde (IGC), e modificaram a mesma com RGD (ácido arginilglicilaspártico) para aumentar a estabilidade e precisão. Esta funcionalização é vantajosa visto que permite o direcionamento das nanopartículas, podendo estas ser direcionadas para o local onde se encontra o tumor.⁸⁴

Tal como mencionado anteriormente, a quimioterapia baseada em nanopartículas tem sido estudada para tumores primários e metastáticos, no entanto existem ainda muitas limitações, como seja a complexidade e a resistência dos tumores aos fármacos administrados.

Além do uso de nanopartículas, surgem como estratégias promissoras o uso de terapias combinadas, envolvendo estes sistemas e terapia fotodinâmica (PDT) ou terapia fototérmica (PTT).⁹³ Com agentes fotossensibilizantes, a terapia fototérmica pode originar hipertermia local sob irradiação de laser infravermelho próximo (NIR), o que pode aumentar ainda mais a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos colaterais. Alguns agentes fotossensibilizantes (ex. Indocianina verde (ICG)) também são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) se irradiado com laser NIR (808 nm), emitindo calor. ROS é um tipo de composto de vida curta com capacidade de danificar o ADN e originar apoptose celular.^{98,99}

Em suma, as MSNs sensíveis ao pH e com NH_4HCO_3 parecem ser ideais para usar em terapia combinada com PDT e PTT, a fim de aumentar o efeito terapêutico no tratamento do tumor, figura 6.18.⁸⁴

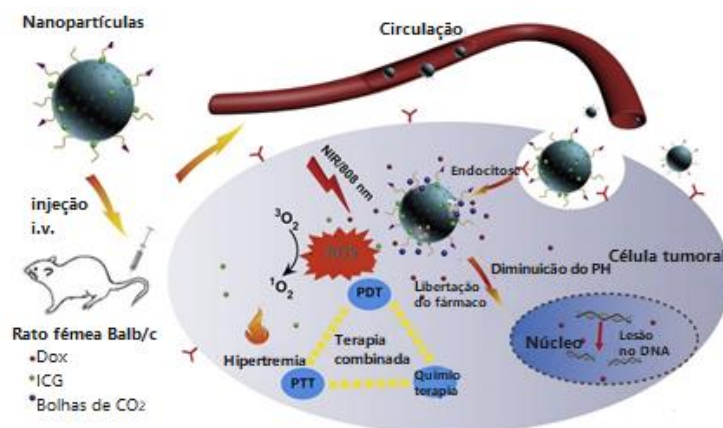


Figura 6.18- Ilustração de diversas abordagens para o tratamento do cancro: terapia combinada, MSNs com bicarbonato de amónio e utilização de NIR a 808 nm para gerar ROS. (adaptado de⁸⁴)

Para testar o sistema *in vivo*, este foi administrado em ratos permitindo concluir que o efeito de direcionamento é favorável. As nanopartículas são bastante mais seletivas para o local do tumor comparativamente à administração do fármaco livre. Além disso, após 72 horas da administração no grupo de animais tratado com ICG + DOX já não se visualizava qualquer fluorescência, contrariamente ao observado no grupo tratado com nanopartículas (figura 6.19). Assim, é possível concluir que o uso de nanopartículas prolonga o tempo de circulação do fármaco no sangue.⁸⁴

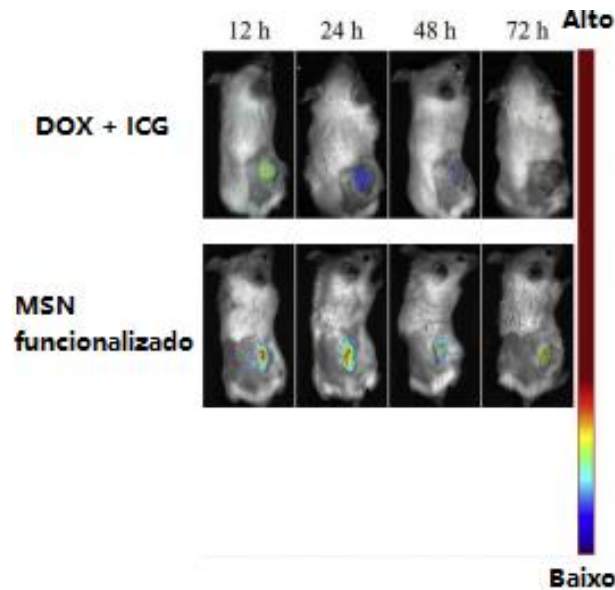


Figura 6.19- Comparação da fluorescência em grupo de ratos tratados com DOX livre ou MSN funcionalizado (adaptado de ⁸⁴).

Após 12h de tratamento, os diferentes grupos de animais foram irradiados com laser de 808 nm durante 5 minutos, com a finalidade de registar a temperatura. Nos animais tratados com as MSN funcionalizadas com RGD, observou-se um aumento da temperatura local do tumor acima dos 50° (hipertermia local), causando desnaturação das proteínas e apoptose das células tumorais. Já o grupo de animais no qual não foi utilizada MSN mas apenas ICG + Dox livre, não apresentou efeito fototérmico devido à baixa estabilidade.

Assim, a irradiação a laser pode causar hipertermia local e formar ROS que podem alcançar efeitos terapêuticos sinérgicos com a quimioterapia para inibir o crescimento do tumor.

84

Além da capacidade que estes sistemas têm para carregar fármacos podendo estes ser anti-inflamatórios, antibióticos ou até antitumorais, tem sido também demonstrada a possibilidade de as nanopartículas de sílica serem adjuvantes de vacinas desempenhando um papel importante em sistemas de entrega de constituintes das vacinas como sejam péptidos ou ADN.

6.2. Uso de nanopartículas de sílica em vacinas

Ao longo dos anos têm sido aprovadas vacinas importantes que fornecem proteção contra infecções bacterianas e virais. As vacinas tradicionais englobam as vacinas vivas atenuadas e as vacinas inativadas e ambas podem provocar uma forte resposta imunológica.^{100,101}

As vacinas vivas atenuadas são preparadas a partir de um agente patogénico “vivo”, de uma forma atenuada, permitindo que o organismo desencadeie uma resposta imunitária, no entanto, sem capacidade para provocar doença. As vacinas inativadas são preparadas a partir de um agente patogénico inativado ou a partir de organismos mortos, componentes celulares ou toxinas excretadas, sendo estas partes do organismo causador da doença.^{100,101}

As vacinas tradicionais podem ter inúmeros efeitos colaterais como por exemplo, inflamação no local da vacinação e necessidade de múltiplas doses para uma imunização eficaz.¹⁰⁰

Surgiu a necessidade de desenvolver outro grupo de vacinas, as vacinas de subunidades, que são compostas por antígenos recombinantes altamente purificados como proteínas e péptidos. Estas vacinas possuem uma maior estabilidade e melhor perfil de segurança comparativamente às vacinas anteriormente mencionadas.¹⁰²

Além destas vacinas têm vindo a ser estudadas outro tipo de vacinas terapêuticas, vacinas de ácidos nucleicos que incluem vacinas de ácido ribonucleico (ARN) e vacinas de ADN.¹⁰² Deve ser notado que algumas destas vacinas têm dado um contributo extremamente importante no combate à atual pandemia.

O desenvolvimento de uma formulação de vacina eficiente requer seleção criteriosa, tendo em conta a necessidade de um antígeno potente e um adjuvante eficiente. Os adjuvantes são agentes imunológicos que, ao serem adicionados à formulação das vacinas, permitem uma eficácia acrescida do antígeno. Por exemplo, em vacinas de subunidades que podem ter baixa imunogenicidade e incapacidade de atravessar a mucosa intestinal, os adjuvantes ativam as células apresentadoras de antígenos (APCs) e induzem uma forte resposta imunológica.¹⁰³

A partir de 1925 foram descobertas algumas substâncias com capacidade de melhorar a resposta imunológica específica. Atualmente, as substâncias usadas são maioritariamente os sais de alumínio, hidróxido ou fosfato.^{104,105}

Com o aumento do interesse pela nanotecnologia, têm sido estudados os requisitos necessários para que os nanomateriais tenham capacidade de ser usados como adjuvantes. Estes requisitos incluem o tamanho da partícula (deve ser menor que 100 nm para atravessar

facilmente as barreiras), ser biocompatível, permitir que o antigénio se liberte de forma controlada mantendo a concentração constante, e a capacidade de ser produzido em massa visto que não será necessário apenas uma parca quantidade.¹⁰⁵

A sílica SBA-15 foi o primeiro nanomaterial a ser estudado como adjuvante. Em 2006, Lucildes P. Mercuri et al.¹⁰⁶ estudaram a aplicabilidade destes nanomateriais não só como adjuvantes, mas também como transportadores para a proteína recombinante bacteriana Int1b, sendo esta uma das proteínas encontradas em *Escherichia Coli* responsável pela sua falta de efetividade. Assim procurou-se usar a forma recombinante dessa proteína para desenvolver uma vacina com o objetivo de induzir a imunidade.

O estudo experimental foi realizado por estes autores em ratos Balb/c. A fim de sintetizar um controlo, a proteína recombinante foi adsorvida em hidróxido de alumínio, Al(OH)₃ (adjuvante usado em humanos e animais para diagnóstico e terapêutica). Paralelamente, a proteína recombinante, Int1b, foi também emulsificada com o adjuvante incompleto de Freund (IFA), sendo este um adjuvante usado para imunizar animais.

De acordo com os resultados obtidos por estes autores, foi possível concluir que o SBA-15 se comporta como um adjuvante, induzindo uma resposta semelhante ou em alguns casos melhor, em comparação com o adjuvante usado em animais, IFA. Foi ainda possível concluir que o SBA-15, contrariamente a IFA, não provoca danos teciduais nem induz necrose no local da injeção, mostrando-se atóxico e vantajoso.

Comparativamente ao adjuvante usado maioritariamente em humanos, o hidróxido de alumínio, o SBA-15 apresentou melhores propriedades adjuvantes que este.

A utilização de SBA-15 como adjuvante promove um aumento dos anticorpos IgG mantendo o nível de anticorpos por 30 dias durante a resposta primária. Relativamente à resposta secundária foi perceptível a indução de memória visto que, após uma segunda dose de antigénio, há um aumento significativo de anticorpos contra Int1b. Os títulos médios de anticorpos para ratos imunizados com a proteína carregada em Al (OH)₃ foi de 5,2 log₂, enquanto para ratos imunizados com a proteína em SBA-15 foi de 8,5 log₂ o que mostrou existir um melhor efeito de indução de memória.

Deste modo, é possível concluir que as sílicas mesoporosas ordenadas, como SBA-15, podem ser úteis como adjuvantes, sendo capazes de transportar, proteger e distribuir o antigénio, promovendo uma estimulação eficiente de APCs.

6.2.1. Vacinas de subunidades proteicas

As vacinas de péptidos sintéticos permitem que se adquira imunidade através da apresentação das células-T ao antígeno, sendo esta estimulada pela vacina.

Os péptidos são subunidades de proteínas apresentadas por APCs. As APCs são capazes de processar proteínas expressas por vírus ou células tumorais em péptidos curtos.

Os péptidos mimetizam os epítopos dos antígenos que têm capacidade de induzir imunidade mediada por células visto que levam o organismo a desencadear um mecanismo de defesa. Assim, ao identificar-se estas sequências peptídicas é possível usar a sua versão sintética.¹⁰⁷

Com o uso destas vacinas evita-se o risco de mutação ou contaminação, no entanto, sabe-se que este tipo de vacinas possui uma baixa estabilidade e semi-vida curta. Para solucionar estes problemas é necessário adicionar ou conjugar adjuvantes para permitir um aumento da sua estabilidade.^{108,109} Neste caso, o uso de sílica na formulação da vacina também é alvo de estudo, nomeadamente com o objetivo de transportar o péptido. Dado que o tamanho de poro nesta situação é extremamente importante, Tianlong Liu et al.¹⁰⁵ estudaram a possibilidade de carregar os péptidos em estruturas de *silica nanorattle* (SN). A figura 6.20 permite-nos visualizar estas nanopartículas a partir de microscopia eletrónica de transmissão (TEM).

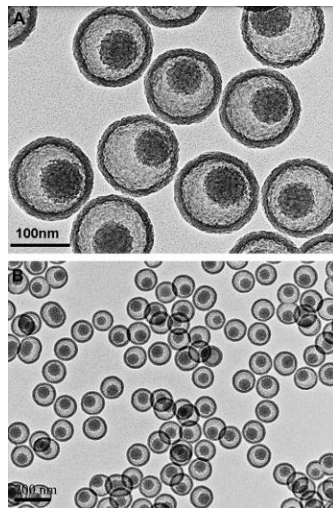


Figura 6.20- Imagens TEM de nanopartículas nanorattle, ou seja, sílica oca. A) Água pura B) Saline¹¹⁰

As nanopartículas de sílica *nanorattle* têm estrutura oca entre duas camadas esféricas de sílica, figura 6.21. O processo de síntese usando ácido fluorídrico (HF) leva a que se formem canais mesoporosos da superfície externa até este espaço. Assim, este espaço “vazio” possibilita que uma quantidade de proteína ou de fármaco relativamente grande possa ser incorporada. Por

outro lado, a eficácia no seu carregamento também é elevada visto que tem capacidade para acomodar seletiva e eficientemente. Como estas nanopartículas possuem grupos amino na sua superfície permitem a conjugação com biomoléculas. ¹¹¹

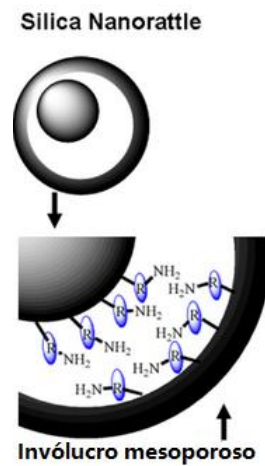


Figura 6.21- Estrutura das nanopartículas de sílica nanorattle. (adaptado de ¹¹²).

Tianlong Liu et al. ¹⁰⁵ analisaram o impacto do carregamento do péptido ovabulmina (OVA) em SNs, o seu efeito *in vivo* usando ratos Balb/c e a sua biocompatibilidade. Estes autores verificaram que o facto de carregar OVA nestes nanomateriais não provoca qualquer tipo de alteração a nível dos órgãos, mais especificamente no baço e no fígado, os quais não possuíam diferenças relativamente aos animais do controlo. Assim, foi possível comprovar a biocompatibilidade dos SNs no sistema *in vivo*.

Adicionalmente, para corroborar estes estudos de biocompatibilidade foi estudada a citotoxicidade *in vitro*, a qual mostrou que o uso de SNs não alterou a viabilidade celular. Para avaliar o efeito destes nanomateriais na resposta imunológica foi medido o nível de anticorpos anti-OVA. Os anticorpos em ratos expostos a SNs- OVA (OD= 0,42) foram significativamente maiores que em OVA sem qualquer adjuvante (OD=0,11). Concomitantemente, os ratos expostos a SNs-OVA exibiram um aumento de células apresentadoras de antigénio.

Além da vacina de péptidos sintéticos, existem outras vacinas nas quais as nanopartículas podem ter um contributo significativo, como sejam as vacinas de ADN. Estas possuem grande potencial não só em oncologia, como no tratamento de infeções crónicas.

6.2.2. Vacinas de ADN

As vacinas de ADN envolvem a introdução direta de plasmídeos que contêm uma ou várias sequências que codificam para o antígeno de interesse. Pretende-se que o sistema imunitário responda produzindo uma resposta imunológica mediada por células, além de imunidade humoral. ^{113,114}

Para proporcionar uma resposta do sistema imunitário é necessário que a sequência de ADN entre no interior da célula humana, mais propriamente no núcleo, com o objetivo de ser transcrita em ARNm. Este ARNm é transportado para o citoplasma da célula correspondente, sendo traduzido para uma proteína correspondente ao antígeno. Este antígeno é exposto na superfície da célula, estimulando o sistema imunológico. ^{113,114}

As vacinas de ADN seriam um recurso revolucionário se não fosse a sua baixa imunogenicidade, isto deve-se ao facto de esta ter de ultrapassar diversas barreiras fisiológicas, o que faz com que a sua eficiência seja impedida. ¹¹⁴

Para melhorar estes inconvenientes, os sistemas de entrega de ADN baseados em nanopartículas de sílica mesoporosa têm sido extensivamente estudados, permitindo uma entrega e proteção de moléculas de ADN para transfeção intracelular.

Hao Song et al. ¹¹⁵ desenvolveram nanopartículas de sílica mesoporosa semelhantes a rambutão, RAM-MSNs, (fruto exótico semelhante à nanopartícula demonstrada na figura 6.22).

Ao usar-se este tipo de nanopartículas houve um aumento da eficiência no transporte e entrega do ADN, sendo que é este ADN que codifica para a proteína ovalbumina. Existiu um aumento na expressão de antígeno e aumentou a maturação de APCs bem como ativação tanto de CD4⁺ como de CD8⁺ (figura 6.22). ¹¹⁵

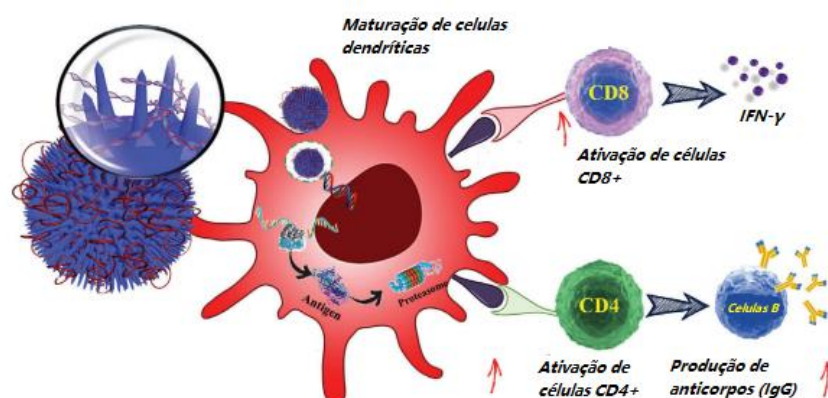


Figura 6.22- Resposta do sistema imunitário ao usar nanopartículas tipo rambutão, aumento das células T CD4⁺ e CD8⁺ bem como aumento da produção de anticorpos e interferão- γ (adaptado de ¹¹⁵).

Para proporcionar uma melhor interação com o ADN, as RAM-MSNs foram funcionalizadas com o polímero catiónico de polietilenoimina (PEI) (RAM-MSNs- PEI).

Os autores realizaram testes *in vitro* e *in vivo*, sendo o maior desafio aplicar *in vivo* visto que o ADN está sujeito a degradação por parte das nucleases.¹¹⁵

Foi possível concluir através da comparação com ratos não imunizados, que além dos sistemas de entrega possuem um desempenho superior, promovem a potência da vacina através da maturação de APCs no baço, bem como a ativação de células T.¹¹⁵

A produção de IgG específicas do antígeno e a secreção elevada de citocinas interferão-gama (IFN- γ) foram observadas para a vacina de ADN mediada por nanopartículas de sílica, mostrando desempenho superior aos produtos comerciais.¹¹⁵

Os autores analisaram também a biocompatibilidade destes sistemas, sendo que o teor absoluto de silício nos órgãos para formulações à base de nanopartículas foi semelhante ao grupo de controlo negativo de PBS (figura 6.23), indicando resíduos de silício limitados nos tecidos após as imunizações.¹¹⁵

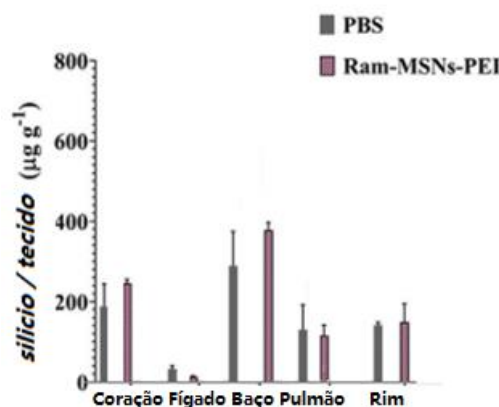


Figura 6.23- Teor absoluto de silício (%) nos órgãos principais comparando um controlo (PBS) com RAM-MSNs-PEI. (adaptado de¹¹⁵).

6.2.3. Desenvolvimento de vacinas promissoras baseadas em vesículas extracelulares

Sandra Montalvo-Quirós et al.¹¹⁶ testaram a possibilidade de utilizar nanopartículas de sílica mesoporosa como plataforma para o desenvolvimento de vacinas contra a tuberculose.

Com o avançar dos anos, têm surgido estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* altamente resistentes, mas com uma característica bastante peculiar, estas estirpes produzem vesículas extracelulares (VEs) derivadas de membrana contendo proteínas responsáveis por modular a resposta imunológica patológica após a infeção.

As VEs são constituídas por lípidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, biomoléculas e uma grande variedade de proteínas algumas das quais foram identificadas como antígenos imunodominantes, como lipoproteínas e Ag85B. Desempenham um papel

importante, funcionando como veículos para moléculas e sinais biológicos, ao conterem uma variedade de recetores com capacidade de reconhecer moléculas específicas de tumores / bactérias/ parasitas, sendo úteis para auxiliar no diagnóstico e tratamento de doenças.¹¹⁷

As vesículas extracelulares podem ser administradas por via intraperitoneal ou subcutânea antes da infeção e foi perceptível que a resposta induzida por estas é semelhante à resposta aquando da vacinação com bacilo *Calmette–Guérin* (BCG).^{117,118}

Assim, se as vesículas extracelulares que são componentes micobacterianos provocam respostas imunológicas semelhantes ao BCG, isto significa que é possível criar vacinas que não apresentam os problemas de uma vacina viva, uma vez que estas são muito sensíveis à temperatura e luz e possuem um perfil de reações adversas mais marcado. As vesículas extracelulares possuem um diâmetro nanométrico, o que permite uma eficiente carga bem como uma elevada biocompatibilidade e segurança.^{117,118}. Todas estas características potenciam a possibilidade de se criar uma vacina bastante promissora.

Não obstante, a produção natural de vesículas extracelulares, demonstrou alguma variação, o que não é favorável para o fabrico de vacinas em larga escala. Além disso, a administração direta de proteínas imunomodadoras possui uma baixa estabilidade físico-química ou incapacidade de atravessar a membrana celular. Assim, uma forma de ultrapassar este problema é incorporar proteínas imunomodadoras mimetizando as vesículas extracelulares de *Mycobacterium tuberculosis* expressas de forma recombinante em nanomateriais. Para tal, os autores funcionalizaram as nanopartículas primeiramente com ácido carboxílico e seguidamente com proteínas imunomodadoras (Ag85B, LprG e LprA) (figura 6.24), com o objetivo de mimetizar estas vesículas extracelulares.¹¹⁶

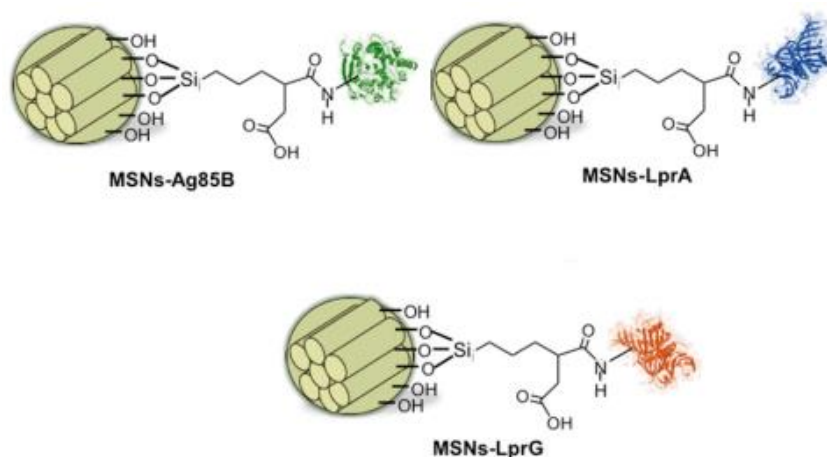


Figura 6.24- MSNs funcionalizadas com ácido carboxílico e proteínas imunomodadoras (adaptado de ¹¹⁶).

Os três nanosistemas funcionalizados (MSNs-Ag85B, MSNs-LprG e MSNs-LprA) mostraram uma citotoxicidade, dependente da dose, semelhante em macrófagos expostos a cada um dos nanosistemas, o que pode ser explicado pela interferência dos MSNs e das proteínas imunomoduladoras com as vias de sinalização envolvidas na ativação da resposta imunológica.

116

A exposição dos macrófagos RAW 264 aos nanosistemas provocou uma libertação acrescida do fator de necrose tumoral (TNF) comparativamente ao controlo, assim depreende-se que a incorporação das proteínas Ag85B, LprG e LprA na superfície externa das nanopartículas provoca um efeito aditivo.

Além da secreção significativa da citocina pró-inflamatória TNF (figura 6.25), houve também aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 (figura 6.26), em comparação com o controlo e com MSNs não funcionalizados. ¹¹⁶

Em suma, confirma-se o efeito imunomodelador das proteínas que mimetizam as vesículas extracelulares. Comparativamente às vesículas extracelulares da *Mycobacterium tuberculosis*, os nanosistemas alcançaram uma indução de citocinas equitativa. ¹¹⁶

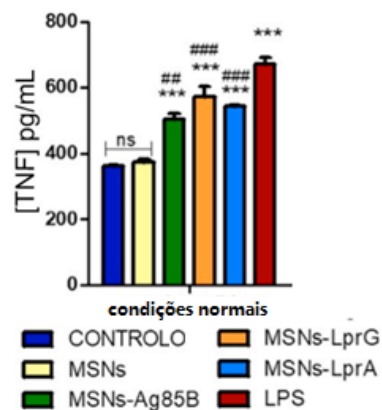


Figura 6.25- Níveis de citocina pró-inflamatória que pertence à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) por macrófagos RAW 264, comparando o controlo com MSNs sem funcionalização e LPS (controlo positivo) (adaptado de ¹¹⁶).

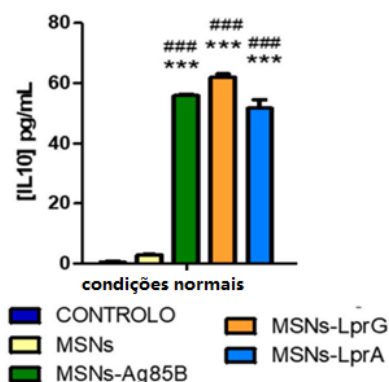


Figura 6.26- Níveis de interleucina por macrófagos RAW 264, comparando o controlo com MSNs sem funcionalização e LPS (controlo positivo) (adaptado de ¹¹⁶).

6.3. Uso de nanopartículas de sílica para diagnóstico

Um diagnóstico precoce proporciona um tratamento eficaz e bem-sucedido. O uso de nanopartículas na área do diagnóstico pode ser útil para ajudar a superar muitas das limitações técnicas atuais. É importante ressaltar que o diagnóstico no processo terapêutico é crucial para articular um direcionamento do tratamento durante a terapêutica.

Devido às características das nanopartículas de sílica existe a possibilidade de introduzir diversos tipos de moléculas, incluindo moléculas fluorescentes ou agentes de imagem de ressonância magnética, originando sistemas promissores para o desenvolvimento de agentes de contraste de bioimagem com alta estabilidade e seletividade.¹¹⁹

Além da aptidão que as nanopartículas têm para serem usadas na terapêutica, também podem ser úteis em diversas técnicas de imagem incluindo imagem ótica, ressonância magnética, tomografia por emissão de positrões, tomografia computadorizada ou ultrassons, tal como se demonstra na figura 6.27.¹¹⁹

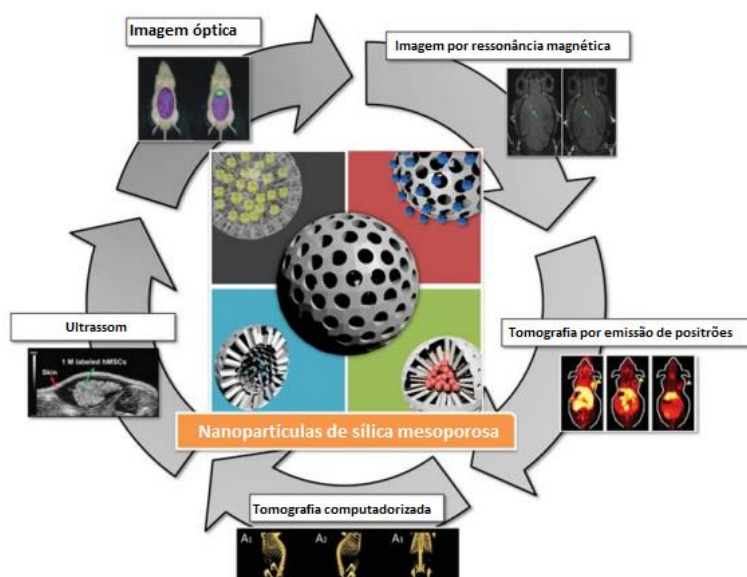


Figura 6.27- Diversas técnicas de imagem (imagem ótica, imagem por ressonância magnética (MRI), tomografia por emissão de positrões (PET), tomografia computadorizada (TC), ultrassom) usando nanopartículas de sílica mesoporosa (adaptado de ¹¹⁹).

Como referido em capítulos precedentes, a superfície das nanopartículas de sílica pode ser facilmente ajustada e funcionalizada com diferentes grupos orgânicos, figura 6.28, e conjugada com diversas biomoléculas como anticorpos monoclonais, proteínas ou ácidos nucleicos. No entanto, a conjugação com biomoléculas a fim de obter um efeito terapêutico não é a sua única finalidade. As nanopartículas podem ser conjugadas com um material luminescente permitindo o seu uso em diagnóstico.¹¹⁹

Com o desenvolvimento do conhecimento acerca da área do diagnóstico e terapêutica, tem sido possível a preparação de nanosistemas com elevado potencial para teranóstica baseados em nanopartículas. Esses nanosistemas co-entregam agentes terapêuticos, bem como agentes de imagem.¹²⁰

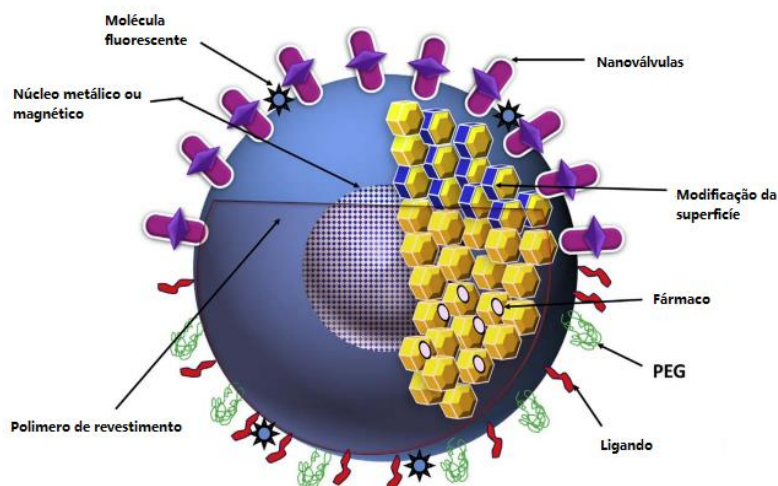


Figura 6.28- Nanopartícula de sílica mesoporosa com diversas funcionalidades para aplicação em teranóstica (adaptado de ¹²¹).

Como as nanopartículas são emissoras de luz, podem ser usadas para técnicas de imagem, inclusive técnicas que necessitem do uso de corantes fluorescentes. Uma das desvantagens dos corantes orgânicos ou inorgânicos é o facto de estes serem hidrofóbicos logo incompatíveis com o meio aquoso. Para combater estes obstáculos uma solução viável é o aprisionamento dos mesmos em nanopartículas, sendo que o material aprisionado estará protegido do meio aquoso, permitindo assim a sua utilização em técnicas de imagem.^{120,122}

As técnicas de imagem de fluorescência surgiram como uma das ferramentas mais poderosas para visualização não invasiva de processos biológicos no contexto de um sistema vivo em tempo real com alta resolução temporal e espacial.

A sílica é um dos materiais com capacidade para fornecer todos os recursos necessários para aplicações diagnósticas e teranósticas eficazes, pelo que as nanopartículas são uma plataforma útil que permite uma multifuncionalização.¹²²

Nas secções seguintes apresentam-se alguns dos muitos exemplos de estudos de nanosistemas desenvolvidos para imagiologia e em que a nanopartículas de sílica desempenham um papel fundamental.

6.3.1. Imagem ótica

A imagem ótica é uma técnica de imagem altamente sensível e não invasiva. Esta técnica possibilita a utilização de corantes orgânicos fluorescentes e nanopartículas inorgânicas

fluorescentes que se encontram numa faixa do espectro a partir do visível até ao infravermelho próximo. Além da alta sensibilidade, a imagem ótica também possui alta resolução, sendo possível corroborar a eficiência da técnica com a particularidade de ser bastante económica. Estas características tornam a imagem ótica complementar a outras técnicas de bioimagem, como a ressonância magnética ou a tomografia computadorizada.¹¹⁹

A imagem ótica, mais propriamente, a imagem de fluorescência no visível e infravermelho próximo (650-900 nm), fornece uma plataforma inovadora e altamente versátil para imagens moleculares *in vivo* não invasivas.¹²³ Esta técnica de imagem utiliza uma variedade de plataformas alvo, incluindo as nanopartículas, proporcionando maior versatilidade. Para o seu uso é necessário empregar agentes de contraste biocompatíveis. Os materiais luminescentes são amplamente aplicados devido às suas propriedades óticas.¹²⁴

Um material luminescente é um material sólido que converte certos tipos de energia em radiação eletromagnética além da radiação térmica. Estes materiais são constituídos por uma matriz hospedeira e um ativador, sendo a função do ativador absorver a energia que provoca a subida para um estado excitado que então retorna ao estado fundamental por emissão de radiação. A função de uma matriz hospedeira é absorver a radiação incidente transferindo-a para o ativador.¹²⁵

Técnicas de imagem baseadas em processos de luminescência são ferramentas bioanalíticas que possibilitam o seu uso em ensaios quantitativos, como sejam a deteção simultânea de um analito em várias amostras ou analitos diferentes na mesma amostra. Permite também analisar a distribuição espacial de uma molécula, incluindo a avaliação *in vivo* de processos biológicos e patológicos.¹²⁶

Os métodos designados por luminescência molecular mais correntes em análise química são: a fluorescência, a fosforescência e a quimioluminescência, figura 6.29.¹²⁵

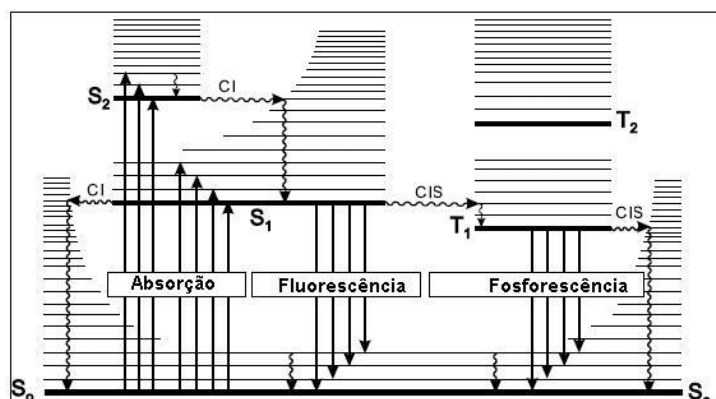


Figura 6.29- Diagrama de Perrin-Jablonski (adaptado de ¹²⁷).

Os materiais luminescentes são pouco biocompatíveis e altamente tóxicos. Para permitir o seu uso é necessário alterar as suas características de modo a satisfazer os requisitos. Uma das formas de possibilitar o seu uso é através de transporte por um sistema com uma matriz compatível. A sílica é a matriz ideal para melhorar as propriedades dos materiais luminescentes devido às suas características, possibilita a integração de um ou mais nanomateriais através de diferentes processos originando nanossistemas multifuncionais.¹²⁸

Moléculas corantes com um grupo funcional isotiocianato, por exemplo FITC são moléculas luminescentes orgânicas relevantes. Para proporcionar uma estabilidade, seletividade e biocompatibilidade, A. Van Blaaderen et al.¹²⁹ sintetizaram esferas de sílica coloidal contendo um corante. Inicialmente, o FITC foi ligado a um agente de acoplamento, (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) e posteriormente o APTES foi usado para a síntese de sílica coloidal por hidrólise e condensação do TEOS.

No entanto, este método para formar nanossistemas para uso em técnicas de imagem tem diversas desvantagens, entre elas o facto de ser necessário uma quantidade excessiva de APTES para proporcionar a ligação, sendo que ao ser necessário uma quantidade excessiva afeta adversamente a uniformidade das partículas.

Além disso, contrariamente a ambientes com condições de pH ácidos, a presença de grupos amina primários torna-se problemático em ambientes com condições neutras e básicas, levando à precipitação.

Para ultrapassar este problema, Shin-Woo Ha et al.¹³⁰ desenvolveu um novo método sintético para preparar nanopartículas de sílica fluorescente sem necessidade de usar APTES.

Para tal, os ácidos carboxílicos existentes em moléculas corantes foram desprotonados com uma base em dimetilformamida (DMF) e tratados com iodeto de alilo. Os grupos terminais alilo foram convertidos em grupos trialcóxissililo por reação de hidrosilação com trimetossilano na presença de catalisador Pt/c, tal como descrito na figura 6.30.

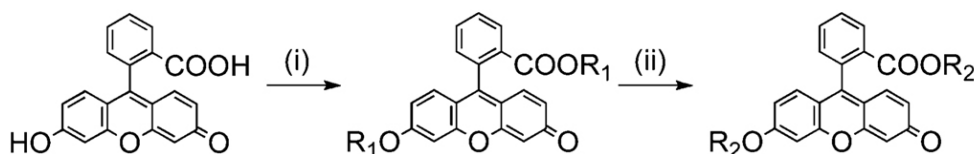


Figura 6.30- Derivatização de corantes orgânicos para incorporação em matrizes de sílica. (i) iodeto de alilo, Cs₂CO₃, DMF; (ii) trimetossilano, Pt/C, metanol; R1 = -CH₂-CH=CH₂, R2 = -(CH₂)₃Si (OMe)₃, R3 = -(CH₂)₃Si(OEt)₃ (adaptado de ¹³⁰).

O facto de não estar presente qualquer grupo amina terminal torna o nanosistema altamente dispersível em etanol e água em pH ácido a básico, contrariamente a moléculas de corante isotiocianato que se encontram ligadas a APTES, tal como indica a figura 6.31.

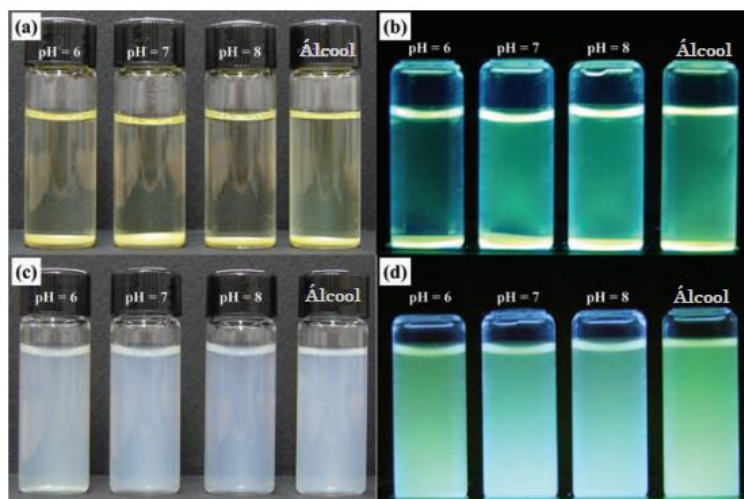


Figura 6.31- a) e b) SiO₂ precipitado preparado pelo método conjugado FITC-APTES; c) e d) SiO₂ disperso preparado por uma modificação direta da molécula de fluoresceína como descrito na imagem 35.¹³⁰

Além do método anteriormente descrito, existe a possibilidade de incorporar os corantes em nanopartículas sintetizadas de acordo com os métodos descritos no capítulo anterior, nomeadamente, incorporar em nanopartículas obtidas através do processo sol-gel, em nanopartículas núcleo-invólucro, ou em nanopartículas magnéticas revestidas por sílica.¹¹⁹ Uma vez que existem diversos métodos para sintetizar nanopartículas de sílica passíveis de incorporar o corante, estes nanosistemas tornam-se uma mais-valia na área do diagnóstico. São capacitados para originar um sistema luminescente estável ao pH e com maior intensidade de fluorescência, tal facto foi comprovado por Long Jiao et al.¹³¹ Neste trabalho, os autores analisaram quatro corantes de aminocianina. Sendo estes corantes pertencentes à família das cianinas, apesar de serem compostos orgânicos, são considerados corantes sintéticos devido à sua ampla faixa espectral (absorção e emissão).

O uso das cianinas torna-se vantajoso devido à sua capacidade de emitir radiação intensa e fortemente fluorescente. Possuem um alto coeficiente de extinção molar ($\epsilon \approx 105 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e todas as suas propriedades óticas tornam-nas capacitadas para gerar corantes que absorvem luz com alta efetividade na região de comprimentos de onda maiores que 600 nm.^{132,133}

Os autores carregaram as nanopartículas de sílica com estes corantes através do método de microemulsão reversa, diferindo o método de ligação. Os corantes 1-Si, 3-Si e 4-Si

continham um trietoxissilano, dois trietoxissilano e três trietoxissilanos, respectivamente, como grupos funcionais de ancoragem entre a sílica e o corante.

Analisando a figura 6.32 é perceptível que os corantes fluorescentes encapsulados em nanopartículas de sílica (FSNPs) possuem uma maior intensidade de fluorescência comparativamente aos seus corantes livres. Estes são uma mais-valia na utilização em técnicas de imagem, demonstrando a sua bioestabilidade e favorável ligação covalente. Anteriormente, diversos autores, testaram a possibilidade de incorporar os corantes de aminocianina através de ligações não covalentes, no entanto, a libertação completa do corante foi imediata o que prejudicou o sinal.¹³¹

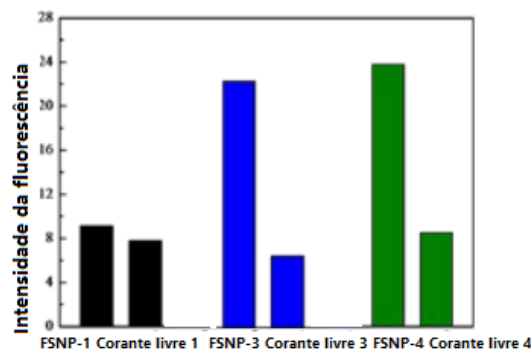


Figura 6.32- Comparação da intensidade da fluorescência entre FSNPS's e os seus respetivos corantes livres (adaptado de ¹³¹).

Relativamente à fotoestabilidade, através de testes *in vivo* em ratos foi possível compreender que quantos mais sítios de ancoragem entre as nanopartículas e os corantes maior a sua fotoestabilidade. A figura 6.33 compara o sinal dado por FSNP-1 (corante fluorescente em nanopartículas-1) e FSNP-4 sendo notório que, além de possuir uma maior intensidade de fluorescência, também se mantém durante mais tempo.¹³¹

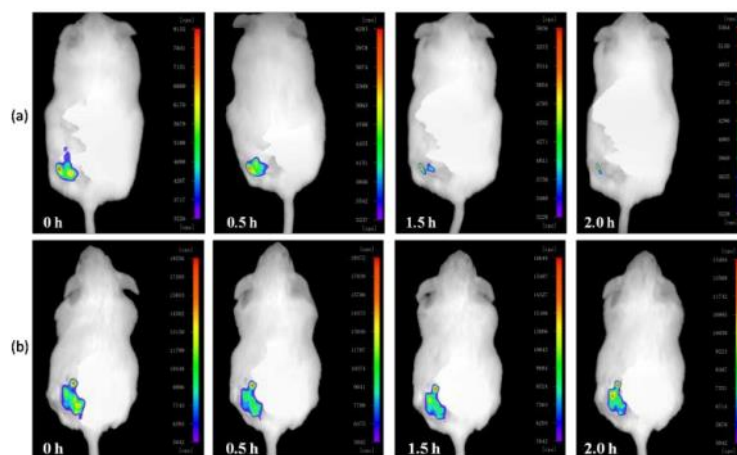


Figura 6.33- Resultados ao longo do tempo da fotoestabilidade *in vivo* após injeção subcutânea de a) FSNP-1 e b) FSNP-4 em ratos.¹³¹

Todavia, os corantes possuem limitações como por exemplo, o aumento da fluorescência não ser consistente com o aumento da concentração. Andrew Burns et al.¹³⁴ tentaram colmatar o problema que persistia no uso de corantes para diagnóstico: estes apenas podem ser utilizados para diagnóstico qualitativo.

Para determinar a concentração do analito independentemente da concentração do sensor, os autores integraram os corantes através de ligação covalente a uma matriz de sílica derivada do processo sol-gel.

Tirando partido das nanopartículas núcleo-invólucro, os autores incorporaram um corante de referência, isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), no interior do núcleo, o qual é envolvido por um invólucro de sílica ligado covalentemente a um corante sensor, fluoresceína, na forma de isotiocianato de fluoresceína, figura 6.34.

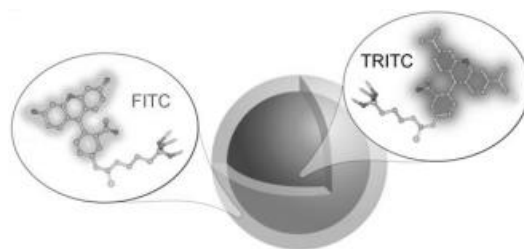


Figura 6.34- Nanopartícula núcleo-invólucro composta por dois corantes ligados covalentemente a sílica.¹³⁴

Como referido precedentemente, o invólucro de sílica tem como mais valia ser facilmente funcionalizável, possibilitando ser direcionado biologicamente. No caso específico da sua utilização na área do diagnóstico, os autores pretenderam estudar quais são as vantagens em se usar simultaneamente dois tipos de corantes, um corante de referência e um corante sensor.¹³⁴

Segundo a IUPAC, existem dois tipos de sensores, sendo de nosso interesse, o sensor químico. Um sensor químico tem capacidade para transformar a informação química, dependente da concentração, num sinal analítico mensurável. Os sensores óticos, pertencentes aos sensores químicos, fornecem uma resposta ótica seja ela fluorescência, fosforescência ou luminescência, em função da concentração de analito na amostra. Assim, um corante sensor possibilita não só a detecção qualitativa, mas também quantitativa.^{134,135}

O FITC, localizado no invólucro, encontra-se ligado a uma matriz de sílica funcionalizada. A matriz de sílica tem como objetivo proteger o corante sensor de interações com proteínas ou outras moléculas que podem interferir com a técnica de imagem. Como o corante sensor se encontra ligado covalentemente ao invólucro, além de não existir o risco de dispersão completa, também proporciona uma maior área de superfície.¹³⁴

Para testar *in vivo*, os autores implementaram os nanosistemas a fim de compreender como se comportam, em células RBL-2H3. Estas células são uma linhagem celular de leucemia basofílica isolada e clonada em 1978.¹³⁶ As partículas foram observadas por microscopia confocal e foi perceptível a sua presença, em diferente intensidade, em zonas com pH entre 5,1 a 6,6 tal como indica a figura 6.35.¹³⁴

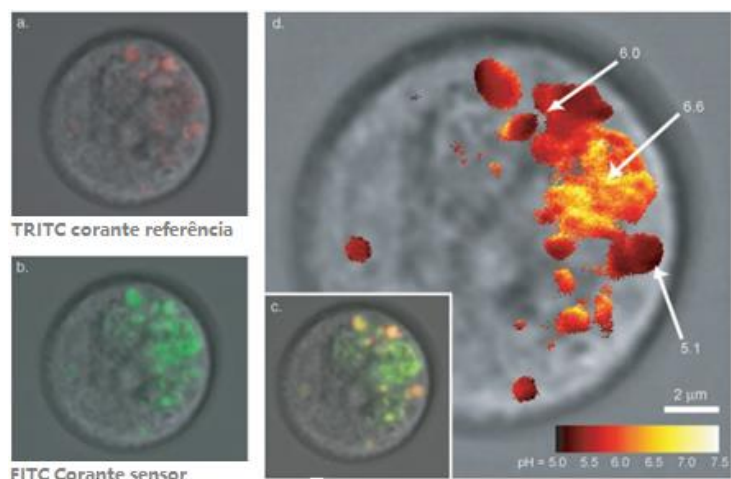


Figura 6.35- Imagens obtidas por microscopia confocal a) corante referência; b) corante sensor; c) fluorescência sobreposta de FITC e TRITC; d) Alteração da intensidade da fluorescência de acordo com o pH (adaptado de ¹³⁴).

Neste caso, o nanosistema ao ter uma arquitetura núcleo-invólucro permite uma maximização da área de superfície. Estando o corante de referência envolvido com o invólucro evita que haja qualquer dispersão. As nanopartículas núcleo-invólucro com o corante de referência incorporado estão em conformidade com o objetivo do estudo: indicar a localização bem como a concentração e atuar como padrão interno para medição de pH, alterando a intensidade da fluorescência de acordo com o pH.¹³⁴

6.3.2. Imagem por ressonância magnética

A ressonância magnética é uma técnica não invasiva. A sua utilização envolve um forte campo magnético e ondas de rádio de muito alta frequência, com o objetivo de produzir imagens de alta resolução. A imagem molecular por ressonância magnética pode fornecer informações anatómicas, funcionais e moleculares.¹³⁷

A ressonância magnética é uma propriedade física que ocorre quando os núcleos de certos elementos são submetidos a um campo magnético forte e são excitados por ondas rádio

em determinada frequência. Posteriormente emitem um sinal que é transformado em imagem.¹³⁸

Para se realizar esta técnica de imagem, é necessário ter uma fonte de prótons, figura 6.36, existente nos núcleos dos átomos de hidrogénio. Os átomos de hidrogénio estão presentes em grande quantidade no corpo humano (maioritariamente associados a moléculas de água).¹³⁸

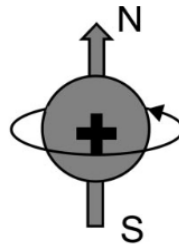


Figura 6.36- Protão, atua como um pequeno magneto girando em torno do seu eixo (adaptado de ¹³⁸).

Estes prótons presentes no corpo estão em condições normais sem aplicação de campo magnético externo, orientados de forma aleatória, como demonstra a figura 6.37. Quando são expostos a um campo magnético forte (B_0), a maioria dos prótons alinha-se de acordo com o campo magnético.¹³⁸

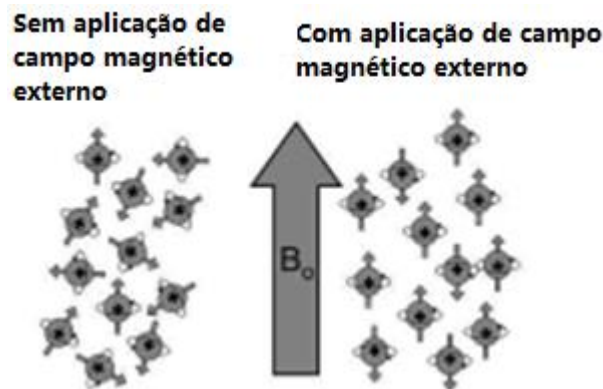


Figura 6.37- Aplicação de um campo magnético forte a fim de orientar os prótons (adaptado de ¹³⁸).

A orientação do momento magnético dos prótons, de acordo com o campo magnético externo ou em oposição a este, resulta em dois níveis energéticos cuja diferença de energia é tanto maior quanto maior for a magnitude do campo externo. A inversão da população destes níveis energéticos, ou seja, a excitação para o nível energético mais elevado é efetuada com recurso a pulsos de radiação eletromagnética. Para tal, é aplicada uma frequência na região das ondas de rádio e cuja energia corresponde exatamente à diferença de energia entre os dois níveis energéticos. A relaxação para o estado inicial, em que na maioria dos momentos magnéticos individuais está alinhada com o campo magnético, ocorre por diversos mecanismos. A deteção

da forma e do tempo de relaxação permite a obtenção de um sinal que é depois processado por meios informáticos e transformado numa imagem.¹³⁷

Diversos parâmetros podem ser controlados de modo a obter uma imagem adequada. A natureza, número, tempo de pulso e o número de ciclos são alguns dos parâmetros que podem ser controlados pelo operador do equipamento. De uma maneira geral, a imagem obtida por ressonância magnética depende da quantidade de prótons. Quanto maior for a sua quantidade num determinado tecido mais clara será a imagem, contrariamente a um tecido com poucos prótons para o qual se obterá uma imagem mais escura. Assim, cada tecido pode ser diferenciado de acordo com a quantidade de prótons que possui.^{138,139}

Embora a diferenciação dos tecidos seja, na maior parte das vezes, obtida pela diferente quantidade de prótons e sequência adequada de pulsos, muitas situações beneficiam do uso de agentes que permitem aumentar o contraste entre diversos tecidos, órgãos ou outras estruturas orgânicas. Estes agentes atuam modificando o tempo de relaxação dos prótons na sua vizinhança próxima (tempo de relaxação longitudinal, T_1 , e/ou tempo de relaxação transversa T_2).¹³⁸ Devido à sua alta sensibilidade e detetabilidade, diversos quelatos solúveis de gadolínio (Gd^{3+}) são os agentes de contraste T_1 preferenciais para aplicações clínicas de ressonância magnética. Atualmente estão em uso clínico diversas moléculas desta família como sejam o Gd-DOTA (Dotarem®), o Gd-DTPA (Magnevist®), o Gd-DTPA-BMA (Omniscan®) ou o Gd-BOPTA (Multihance®). A escolha do ligando depende do objetivo da análise, podendo ser utilizados ligandos mais ou menos polares ou com outra particularidade que condicione a sua farmacocinética. Em alguns casos a rápida filtração renal limita a sensibilidade.¹⁴⁰

Zhongtao Li et al.¹⁴¹ estudaram a possibilidade de incorporar óxido de gadolínio (Gd_2O_3), material de contraste T_1 , em nanopartículas de sílica mesoporosa. Esta incorporação em MSNs, evitou uma libertação precoce de Gd^{3+} , logo aumentou o tempo em circulação sanguínea, permitindo uma melhoria no desempenho da ressonância magnética.

A figura 6.38A mostra a diferença no tempo de relaxamento, dependendo este da concentração de gadolínio, denotando-se um aumento significativo quando o gadolínio é incorporado em nanopartículas de sílica. A figura 6.38B mostra as imagens *in vitro* usando Gd-DTPA e $Gd_2O_3@MSN$ com gadolínio em diferentes concentrações. É possível observar um aumento significativo de brilho quando este agente é incorporado em nanopartículas de sílica comparativamente a Gd-DTPA.

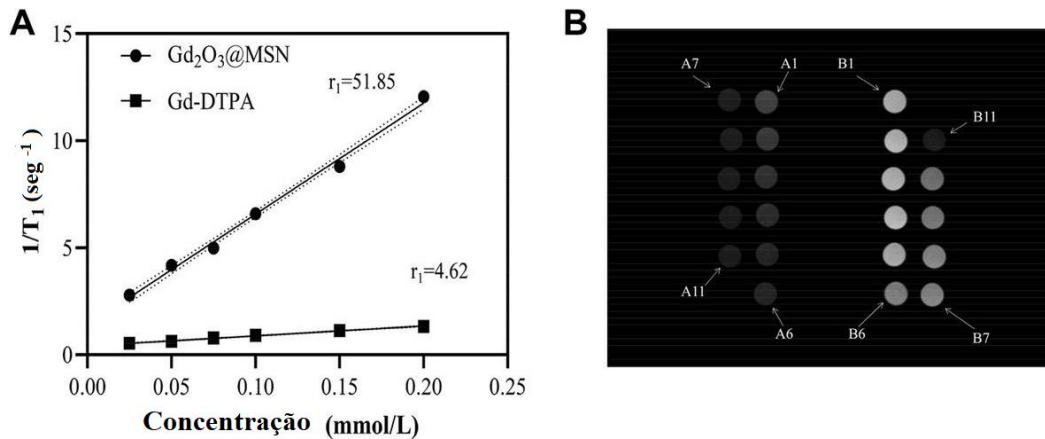


Figura 6.38- Gráfico A apresenta a concentração vs tempo de relaxamento T₁ comparando Gd-DTPA e Gd₂O₃ incorporado em nanopartículas de sílica mesoporosa; Imagem B compara o brilho de imagem dado por Gd-DTPA (esquerda) comparativamente a Gd₂O₃ incorporado em nanopartículas de sílica. (adaptado de ¹⁴¹).

Os autores concluíram que a utilização de um nanossistema para incorporar Gd₂O₃ provocou um aumento de contraste T₁ devido à estrutura geométrica das nanopartículas de sílica que impede a sua libertação precoce. Além disso, pode-se obter mais ou menos brilho de acordo com a concentração de gadolínio presente nas nanopartículas. A capacidade e viabilidade de incorporação de agentes de contraste em nanopartículas é uma possibilidade para no futuro se expandir o potencial destas nanopartículas usando-as para ressonância magnética.¹⁴¹ Além disso, existe a possibilidade de combinar as técnicas de ressonância magnética nuclear e a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), podendo ser utilizados para imagens pré-operatórias e intra-operatórias, respetivamente.¹⁴²

A combinação das técnicas é possível devido ao uso concomitante de agentes de contraste baseado em Gd com outros agentes. Neste sentido, Parvesh Sharma et al. ¹⁴³ elaboraram nanossistemas compostos não só por Gd³⁺ incorporado em sílica, mas ICG encapsulado no seu interior.

O verde de indocianina, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1959, foi inicialmente usado para avaliar a função hepática intraoperatória e posteriormente para avaliar a função cardiológica. Atualmente, é utilizado como agente de contraste ótico em angiografia oftálmica, neurocirurgia, para localizar tumores e metástases, para mapeamento linfático por administração subcutânea ou intradérmica, entre outros. ¹⁴⁴

ICG possui baixa toxicidade o que é bastante vantajoso, no entanto, tem várias limitações como o seu curto tempo de semi-vida, baixa estabilidade, facilidade em agregar devido à sua fácil ligação a proteínas. Além disso, a sua estrutura química não possibilita reações de conjugação vantajosas com anticorpos e outras moléculas de direcionamento cruciais para obtenção de uma boa bioimagem. ¹⁴³

Para colmatar a sua baixa estabilidade química e fotoestabilidade em condições aquosas e básicas, diversos autores estudaram a possibilidade de os corantes poderem ser encapsulados para protegê-los contra processos de degradação. Para viabilizar esta encapsulação, Parvesh Sharma et al.¹⁴³ modificaram a estrutura da molécula do corante, através de uma interação eletrostática entre cátions de bário divalentes adicionados com os grupos sulfonato existentes na molécula do corante ICG, figura 6.39. Esta interação modifica as propriedades físico-químicas e ajuda na encapsulação e viabilização do corante nas nanopartículas.

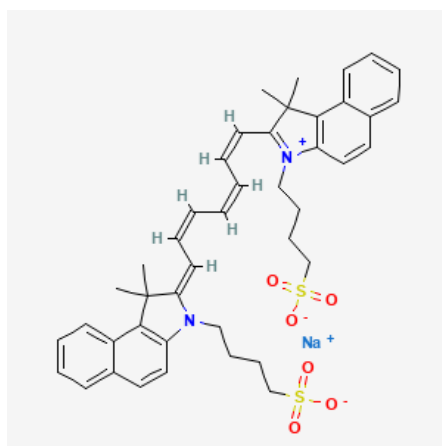


Figura 6.39- Molécula do corante verde de indocianina (ICG)¹⁴⁵.

Ao encapsular o corante ICG em nanopartículas de sílica e modificando os seus grupos, verifica-se um aumento da estabilidade e da intensidade da fluorescência comparativamente a um ICG não incorporado em nanopartículas, figura 6.40.¹⁴³

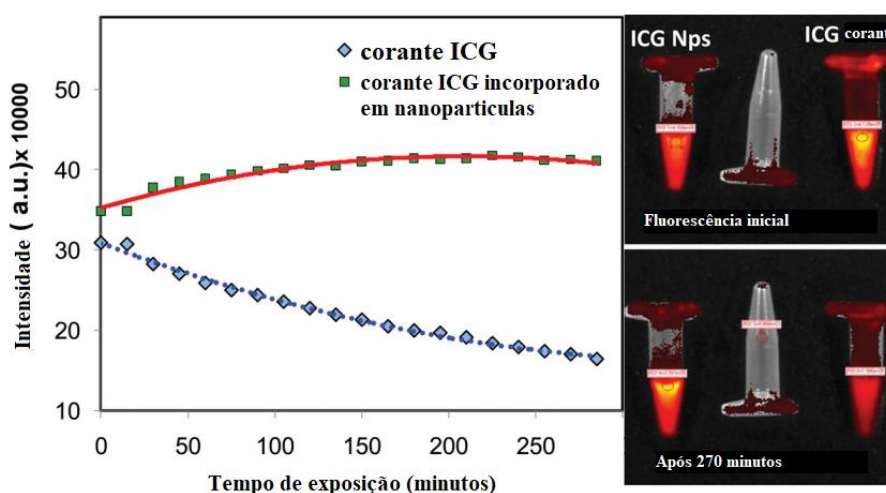


Figura 6.40- Comparação da intensidade de fluorescência entre o corante ICG e o corante ICG incorporado em nanopartículas de sílica (adaptado de ¹⁴³).

Além do uso em NIR, a estratégia de síntese permitiu também o seu uso para imagens por ressonância magnética, através da adição de moléculas quelantes à superfície das partículas e posterior incorporação de Gd^{3+} , tornando-as capacitadas para RM.

Em comparação com os agentes de contraste disponíveis comercialmente, as nanopartículas de sílica com ICG encapsulado no seu interior e Gd^{3+} no seu revestimento exibiu relaxividades mais altas, figura 6.41, para o mesmo campo magnético de 4,7 T. Superou a baixa sensibilidade existente em agentes de contraste comerciais, logo não é necessária uma concentração tão alta dos mesmos para proporcionar os mesmos resultados.¹⁴³

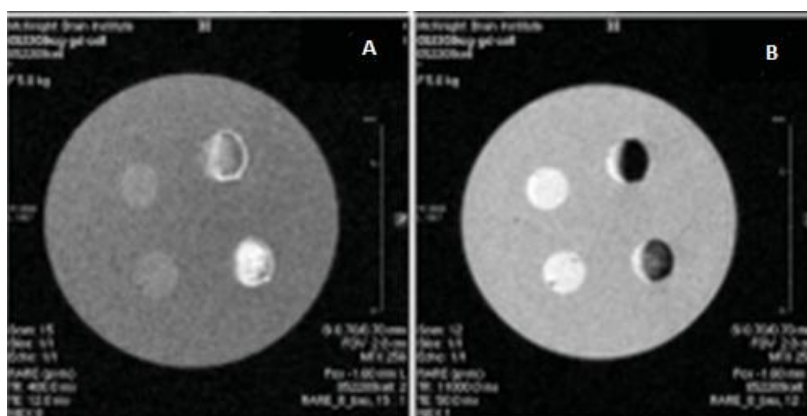


Figura 6.41- A) Tempo de relaxamento T1 esquerda (imagens de controlo), direita (ICG encapsulada em NPs com Gd^{3+} quelado); B) Tempo de relaxamento T2 esquerda(imagens de controlo), direita ICG encapsulada em NPs com Gd^{3+} quelado) (adaptado de ¹⁴³).

6.3.3. Tomografia por emissão de positrões

Tomografia por emissão de positrões (PET) é uma técnica de diagnóstico na qual a imagem se obtém através da distribuição de um radiofármaco no organismo. Esta técnica é útil para investigações clínicas e pré-clínicas de várias patologias devido à sua excelente sensibilidade. Os radiofármacos são marcados por isótopos radioativos, como halogénios radioativos (F-18; Br-76, 77; I-124), carbono -11 e metais radioativos (Ga-68, Cu-64).¹⁴⁶

O radiofármaco concentra-se em tecidos de acordo com as suas características, libertando positrões por decaimento do radioisótopo. Estes positrões quando libertados colidem imediatamente com eletrões e a massa de ambos transforma-se em dois fotões de radiação γ que são projetados em sentidos opostos. O equipamento deteta externamente estes fotões e produz uma imagem.^{146,147}

A imagem produzida pelo equipamento não apresenta uma definição anatômica rica em detalhes. Para produzir uma imagem detalhada, é usual existir uma correlação com tomografia computadorizada (CT) para uma interpretação conjunta (PET-CT).¹⁴⁸

Santiago Rojas et al.¹⁴⁹ utilizaram o radioisótopo ^{18}F (flúor-18), dado que este radioisótopo tem as características necessárias para ser incorporado em nanopartículas de sílica sem alterar as suas propriedades químicas, aumentando a sua especificidade. Os autores funcionalizaram a sílica coloidal com 3-aminopropiltriétoxissilano, através de ligação covalente entre grupos OH da sílica e grupo amino do 3-aminopropiltriétoxissilano.

As nanopartículas de sílica mesoporosa funcionalizadas com grupos amino tornaram-se capazes de reagir com N-succinimidil 4- ^{18}F fluorobenzoato marcado isotopicamente com ^{18}F -SFB, figura 6.42, permitindo identificar a biodistribuição destes nanosistemas.

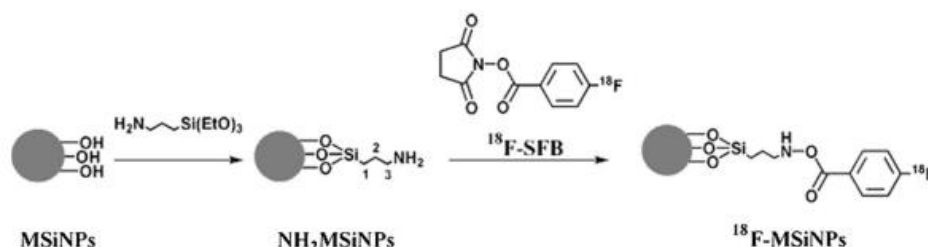


Figura 6.42- Funcionalização da sílica mesoporosa, primeiramente com 3-aminopropiltriétoxissilano a fim de ancorar posteriormente o isótopo ^{18}F .¹⁴⁹

Os autores avaliaram a distribuição farmacocinética destes nanosistemas e concluíram que as nanopartículas acumulam-se nos órgãos do sistema reticuloendotelial por fagocitose, na rede capilar dos pulmões por aprisionamento vascular e são excretadas na biliar e na urina. Devido a esse acúmulo, a biodisponibilidade plasmática é baixa.

Comparativamente com metodologias anteriores, os autores conseguiram uma funcionalização mais eficaz e facilitada, visto que as metodologias anteriores exigiam condições mais drásticas para funcionalizar diretamente a sílica com o isótopo ^{18}F .¹⁴⁹

Existem inúmeros radiofármacos, no entanto, alguns não podem ser utilizados para diagnóstico clínico como por exemplo o sódio-22 (^{22}Na). O sódio-22 é um isótopo artificial com tempo de meia-vida de 2,6 anos, sendo por isso inútil por si só para aplicações biomédicas. Para viabilizar a sua utilização em aplicações pré-clínicas, foi incorporado em nanosistemas biocompatíveis de modo a otimizar a sua biodistribuição e eliminação, controlando o tamanho, revestimento de superfície e carga destes nanosistemas.¹⁵⁰

Achraf Al Faraj et al.¹⁵⁰ testaram a viabilidade e efetividade de nanopartículas de sílica mesoporosa com o isótopo incorporado. Após injeção intravenosa obtiveram-se imagens PET não invasivas, permitindo comparar ^{22}Na livre com ^{22}Na em nanopartículas (figura 6.43).

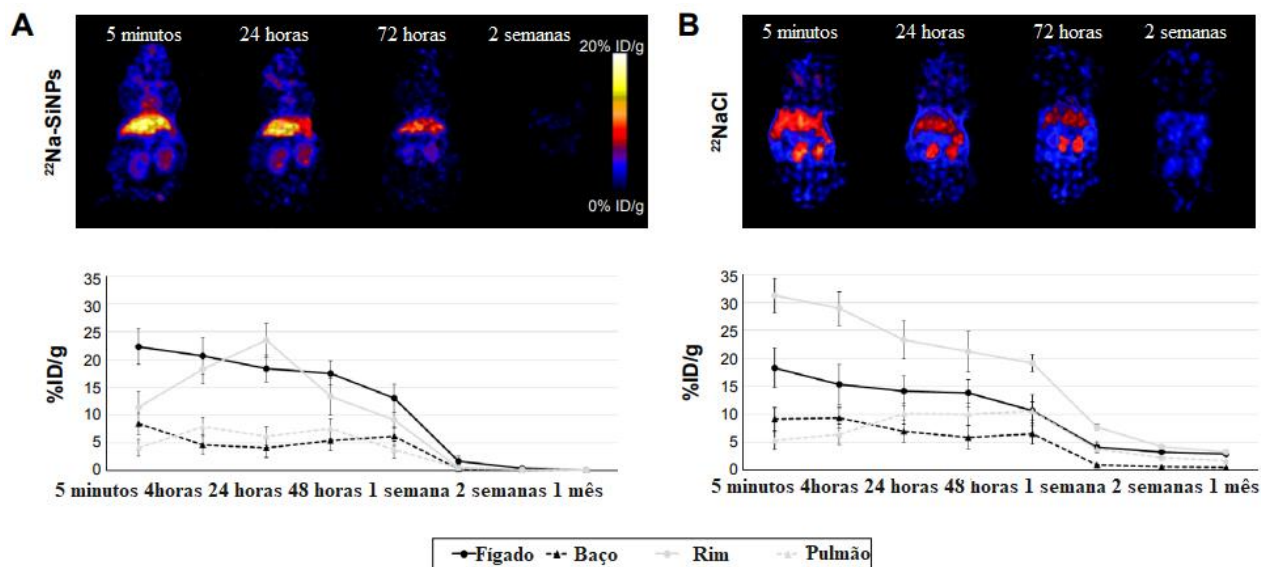


Figura 6.43- A) Nanopartículas de sílica mesoporosa com ^{22}Na incorporado comparativamente a B) ^{22}Na livre. (adaptado de ¹⁵⁰).

Os nanossistemas com ^{22}Na foram detetados no fígado e em menor extensão no baço, rim e pulmão. A quantificação do teor de sílica na urina e nas fezes revelou que os SiNPs acumulados nos órgãos foram eliminados do corpo num período de 2 semanas e completamente em 1 mês, contrariamente ao sódio-22 livre (sem estar incorporado em nanopartículas, b)). As avaliações de biocompatibilidade feitas pelos autores tinham como objetivo avaliar se existia dano no ADN ou indução de stress oxidativo, sendo que os nanossistemas demonstraram segurança para aplicações pré-clínicas.

A medicina de diagnóstico dispõe de numerosas técnicas de imagem passíveis de serem combinadas. A combinação de PET e RMN, junta as mais-valias de cada uma das técnicas, sendo que a imagiologia PET possui alta sensibilidade, porém tem baixa resolução espacial, já a RMN fornece imagens com alta resolução espacial, apresentando, no entanto, baixa sensibilidade.¹⁵¹

Elham Sattarzadeh et al.¹⁵¹ entre outros autores¹⁵², combinaram PET e RM a fim de obter um diagnóstico exato com alta sensibilidade e resolução. Para tal, revestiram as nanopartículas de sílica com um agente quelante que se liga simultaneamente à nanopartícula e ao radioisótopo.

6.3.4. Ultrassonografia

A ultrassonografia ou ecografia, é uma técnica de imagem que utiliza ultrassons para avaliar as estruturas anatómicas do nosso organismo. Esta técnica é amplamente utilizada no diagnóstico do cancro da mama e para localização intraoperatória em tempo real de tumores localizados na mama.¹⁵³

A ultrassonografia é uma técnica bastante utilizada devido à sua segurança e baixo custo. Além disso, destaca-se de outras técnicas devido à capacidade de obtenção de imagem em tempo real.¹⁵⁴

Também neste caso, para melhorar a resolução das imagens de ultrassons existe a possibilidade de utilizar agentes de contraste.¹⁵⁴ Um dos agentes passíveis de serem utilizados são microbolhas de gás encapsuladas em proteínas ou transportadores lipossomais, no entanto, embora possam melhorar a razão sinal-ruído das imagens obtidas, possuem fraca estabilidade e apresentam uma grande dimensão, o que restringe a circulação e consequentemente o direcionamento para o tecido alvo.¹⁵⁵

Sabendo que o tamanho micrométrico seria uma grande desvantagem, uma estratégia apresentada por diversos autores incluindo Jean-Marie Gorce et al.¹⁵⁶ seria produzir nanobolhas. No entanto, o resultado foi ainda pior, demonstrando um tempo de semi-vida menor e uma menor capacidade de contraste o que não contribui para a ecogenicidade em frequências de ultrassom.

Para ultrapassar estes constrangimentos, foi necessário o desenvolvimento de precursores de bolhas em nanoescala com capacidade de conversão em microbolhas *in situ* aquando da exposição a um estímulo. Assim, Qiaofeng Jin et al.¹⁵⁷ estudaram a possibilidade de se modificar a hidrofobicidade de diversas nanopartículas de sílica mesoporosa para este efeito. Foi possível concluir que as nanopartículas superhidrofóbicas e porosas (F-MSN) são o agente de contraste mais favorável para obtenção de imagens por ultrassom, comparativamente a nanopartículas superhidrofóbicas sem porosidade (F-SS) ou nanopartículas mesoporosas hidrofóbicas sem a capacidade de superhidrofobicidade (MSN) (figura 6.44). Com F-MSN obteve-se um maior contraste, bem como um tempo de semi-vida de 30 minutos, sendo bastante relevante comparativamente a microbolhas que possuem um tempo de semi-vida de 5 minutos. Assim, a estimulação por ultrassons em nanopartículas de sílica mesoporosa superhidrofóbicas pode resultar num agente de contraste promissor.

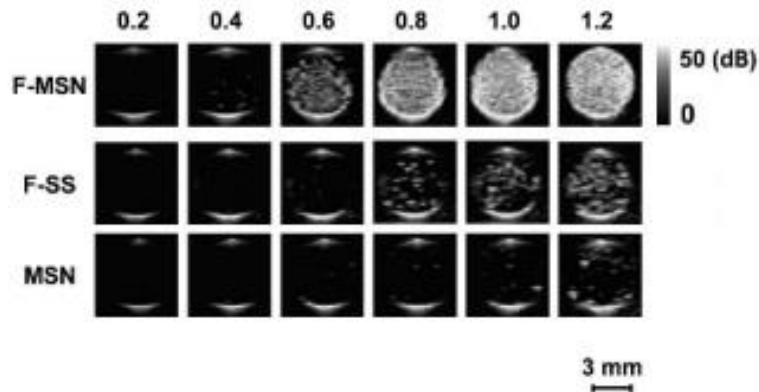


Figura 6.44- Comparação da intensidade das imagens capturadas usando um sistema de ultrassom Philips CX50, sendo F-MSN (sílica mesoporosa superhidrofóbica), F-SS (sílica superhidrofóbica não porosa), MSN (sílica mesoporosa), (adaptado de ¹⁵⁷).

Atualmente, os agentes de contraste em fase gasosa são ideais para realce de contraste em sistemas dinâmicos, como fluxo cardiovascular, e as nanopartículas de sílica mesoporosa podem ser mais eficazes em sistemas estáticos, como ambientes tumorais locais. Alexander Liberman et al.¹⁵⁸ mostraram que as nanopartículas de sílica com boro incorporado e preenchida com gás têm uma vida útil relativamente longa *in vivo* e podem ser injetadas até 24 h antes da ressecção para orientação intraoperatória, permitindo maior flexibilidade durante a cirurgia.

Além da capacidade da sílica mesoporosa para obtenção de imagens por ultrassons, esta pode ser usada para teranóstica, visto que pode concomitantemente incorporar um fármaco (por exemplo um anticorpo monoclonal, trastuzumab,) e isotiocianato de fluoresceína (o corante mais utilizado na marcação por conjugação de anticorpos). O seu uso para teranóstica foi comprovado por Andrew Milgroom et al.¹⁵⁹ através de ensaios *in vivo*, os quais demonstraram que a ligação foi bem-sucedida entre MSN-Herceptina e as células cancerígenas HER²⁺.

7. Toxicidade das nanopartículas

Foi no século XVII, que um fármaco foi proscrito pela primeira vez devido à sua toxicidade. O aumento do conhecimento e dos ensaios toxicológicos tem vindo ao encontro do que Paracelso afirmava “Todas as substâncias são tóxicas. Não há nenhuma que não seja tóxica. A dose estabelece a diferença entre um tóxico e um medicamento”. O medicamento pode ter o seu efeito alterado dependendo do indivíduo que o toma, da dose administrada e das interações concomitantes. ^{160,161}

Nos últimos anos, a possibilidade de as nanopartículas poderem carregar e entregar fármacos tem despertado bastante interesse. Como referido em capítulos precedentes, este carregamento possibilita uma maior eficácia, bem como uma redução da toxicidade do fármaco incorporado. Todavia, aquando da avaliação toxicológica, todo o nanosistema deverá ser investigado pelo que, para se determinar a toxicidade das nanopartículas, é necessária uma avaliação não só do fármaco, mas também da nanopartícula. ^{162,163}

Todas as nanopartículas podem provocar efeitos toxicológicos semelhantes às partículas “tradicionais” de maior dimensão como por exemplo, inflamação, cancro do pulmão, entre outros. No entanto, devido às suas dimensões, os efeitos podem ser mais exacerbados pois possuem uma maior área de superfície. Estes efeitos incluem entre outros, danos mitocondriais e danos cardiovasculares. ¹⁶²

7.1. Toxicidade das nanopartículas de sílica

Em 1997, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) da Organização Mundial de Saúde, após anos de investigação, confirmou a relação entre a exposição a sílica cristalina através de inalação em ambientes ocupacionais e o aparecimento de silicose, doença pulmonar e cancro do pulmão, já anteriormente confirmado em animais. ¹⁶⁴

Por outro lado, a sílica amorfa aprovada pela FDA é geralmente considerada segura visto que a sua exposição através de inalação ou ingestão apresenta um risco mínimo para a saúde. Nesta época foi possível inferir que possivelmente o potencial tóxico da sílica poderia advir do facto da mesma se apresentar na forma cristalina.

Mais recentemente, e devido à progressão contínua da nanotecnologia, Francesco Turci et al. ¹⁶⁵ concluíram que as nanopartículas de sílica amorfa podem ser tão reativas quanto partículas cristalinas. Os autores verificaram que a toxicidade da sílica não depende exclusivamente da sua forma (amorfa ou cristalina) mas sim da interação das nanopartículas de

sílica com biomoléculas e células dentro do sistema respiratório, sendo que esta interação depende das características físico-químicas das partículas.

Como “a dose faz o veneno”, a toxicidade da sílica depende da sua dose. Segundo Jenq-Sheng Chang et al.¹⁶⁶ as nanopartículas de sílica são tóxicas em altas dosagens. Se as células forem expostas a uma alta dosagem existe, por consequência, uma redução da proliferação celular e um aumento de lactato desidrogenase (LDH) sendo indicativo de danos na membrana celular. Porém, os autores também concluíram que a possibilidade de funcionalização das nanopartículas de sílica por exemplo, alterando a superfície com aminosilanos, permite maior segurança e baixa ou nenhuma toxicidade.

Weisheng Lin et al.¹⁶⁷ investigaram a citotoxicidade das nanopartículas de sílica usando como controlo positivo sílica cristalina (Min-U-Sil 5) em células derivadas de carcinoma broncoalveolar. As nanopartículas de sílica mostraram-se mais citotóxicas que o controlo, diminuindo a viabilidade celular especialmente em altas dosagens, como indica a figura 7.1.

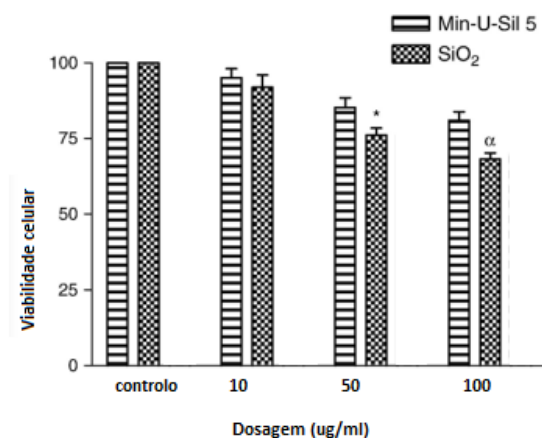


Figura 7.1- Viabilidade das células derivadas do carcinoma broncoalveolar humano dependendo da dosagem, comparativamente à exposição a sílica cristalina (Min-U-Sil-5) sendo este usado como controlo positivo. (adaptado de ¹⁶⁷).

Os autores concluíram que a exposição das células às nanopartículas de sílica aumenta o número de espécies reativas de oxigénio, o que provoca um aumento do stress oxidativo. Houve ainda uma correlação entre o aumento de LDH e a diminuição da viabilidade celular, como consequência da rutura da membrana.

O aumento das espécies reativas de oxigénio devido à exposição à sílica é ainda um mecanismo não explicado. Porém, sabe-se que o aumento das mesmas provoca stress oxidativo e consequentemente, após uma serie de processos provoca cancro, como descrito na figura 7.2.

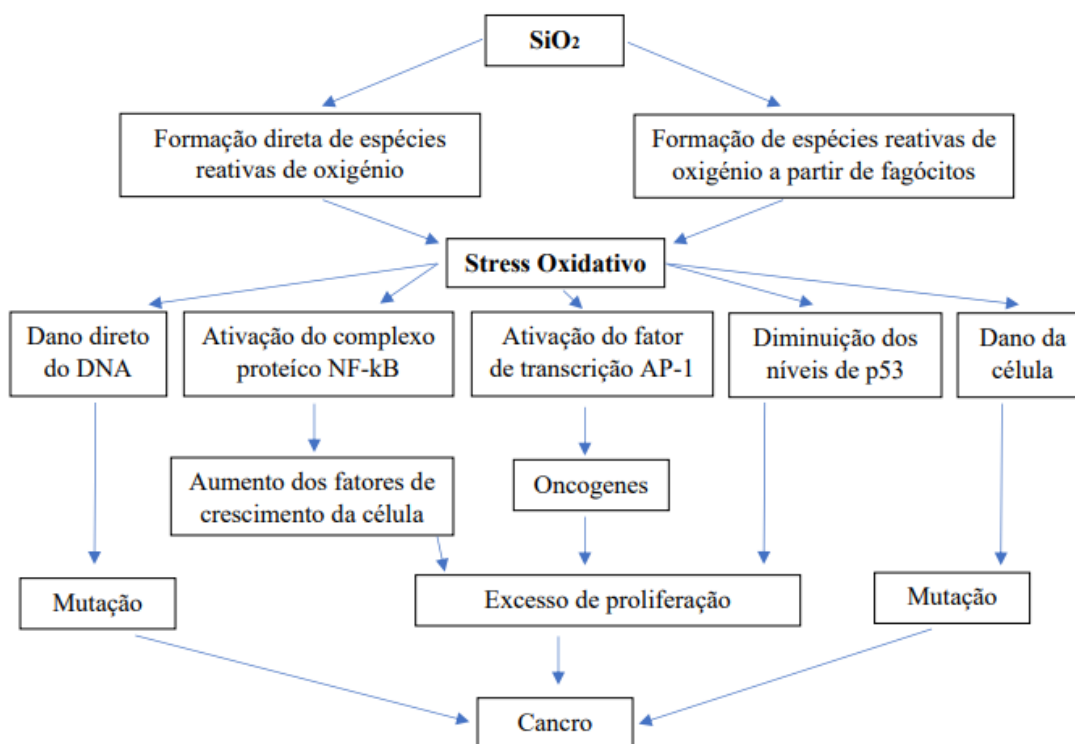


Figura 7.2- Formação de espécies reativas de oxigênio induzida por sílica e o seu papel na carcinogênese. (adaptado de ¹⁶⁸).

Dependendo dos diferentes métodos para produzir nanopartículas de sílica com diferentes propriedades físico-químicas, também estas possuem diferente capacidade para provocar efeitos nas células. Relativamente à aptidão para provocar toxicidade nas células sanguíneas, Lin Feng et al.¹⁶⁹ concluíram que as nanopartículas de sílica coloidal induzem o stress oxidativo o que provoca agregação das plaquetas e dano vascular endotelial.

A disfunção endotelial é um tipo de doença arterial coronariana não obstrutiva, que aparece devido a alterações do endotélio, e dos vasos sanguíneos. Esta disfunção endotelial resulta na secreção de moléculas de adesão o que pode causar trombose vascular e aterosclerose.

170

Como demonstrado na figura 7.3, as células endoteliais vasculares mostraram danos graves com o aumento da concentração de SiNPs. Acima de uma concentração de 5,4 mg/kg os resultados da análise mostraram uma vacuolização local das células endoteliais. Relativamente à morfologia do arco aórtico, a exposição a uma concentração de 5,4 mg/kg apresenta células inflamatórias bem como edema.¹⁶⁹

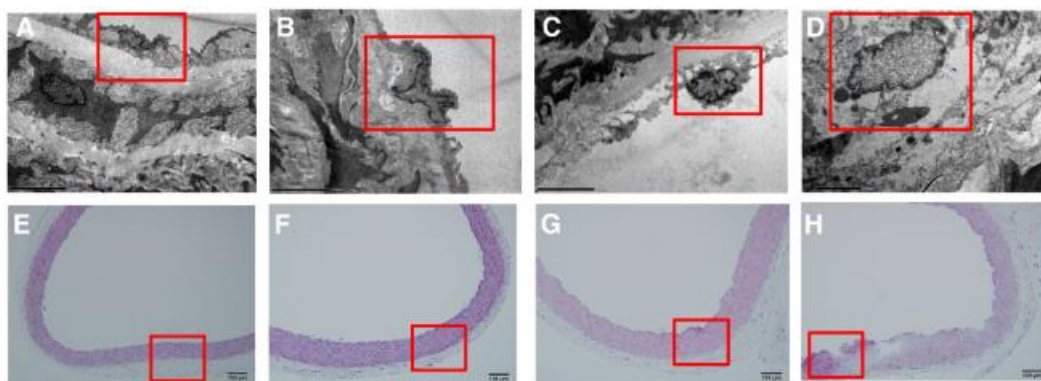


Figura 7.3- Alterações histopatológicas e ultraestruturais do endotélio vascular exposto a SiNPs. A) grupo controlo. B) exposição a uma concentração 1,8 mg/kg. C) exposição a uma concentração 5,4 mg/kg. D) exposição a uma concentração de 16,2 mg/kg. E) F) G) H) Morfologia do arco aórtico no grupo de controlo, no grupo exposto a 1,8 mg/kg, 5,4 mg/kg, 16,2 mg/kg, respetivamente. (adaptado de ¹⁶⁹).

Através deste estudo, foi também perceptível a capacidade de as nanopartículas de sílica causarem hemólise sendo que depende do tamanho, da carga e da porosidade das mesmas.¹⁶⁹ Tian Yu et al.¹⁷¹ estudaram a capacidade de hemólise de diferentes nanopartículas de sílicas sintetizadas a partir de diversos métodos.

A hemólise é a destruição prematura das hemácias, podendo ser provocado por nanopartículas de sílica dotadas de certas características.¹⁷⁰

Tal como mostra a figura 7.4, os eritrócitos apresentaram um início rápido de hemólise, 17% de hemólise quando expostos a uma concentração de 250 µg/ml de nanopartículas de sílica sintetizadas pelo método de Stöber. No entanto, com o aumento da concentração houve uma ligeira inversão da percentagem de hemólise. Isto pode dever-se ao facto de as nanopartículas de sílica sintetizadas pelo método de Stöber apresentarem carga negativa, impedindo a interação com os eritrócitos quando estas se apresentam em alta concentração.

O impacto da geometria das nanopartículas tornou-se mais pronunciado à medida que a concentração aumentava. As áreas de superfície externa de nanopartículas de sílica não porosa (sintetizadas por o método de Stöber) e nanopartículas de sílica mesoporosa (Meso S) foram 24 e 109 m²/g, respetivamente. Sabendo-se que as dimensões das nanopartículas e a sua geometria possuem um impacto na interação com os eritrócitos, os autores pretenderam comparar os seus resultados com resultados obtidos em trabalhos anteriores os quais justificavam o aumento da dimensão com a percentagem de hemólise. No entanto, os autores depreenderam que Meso S não levou a uma taxa hemolítica mais alta do que Stöber até que a concentração ultrapassasse os 190 µg/mL.¹⁷¹

Foi perceptível que não só a dimensão contribui para a percentagem de hemólise, mas também é importante a densidade de grupos silanol em cada nanopartícula exposta aos eritrócitos. Acima de um limite, sendo o limite no caso de Meso S 190 µg/ml, as nanopartículas provocam hemólise nos eritrócitos.¹⁷¹

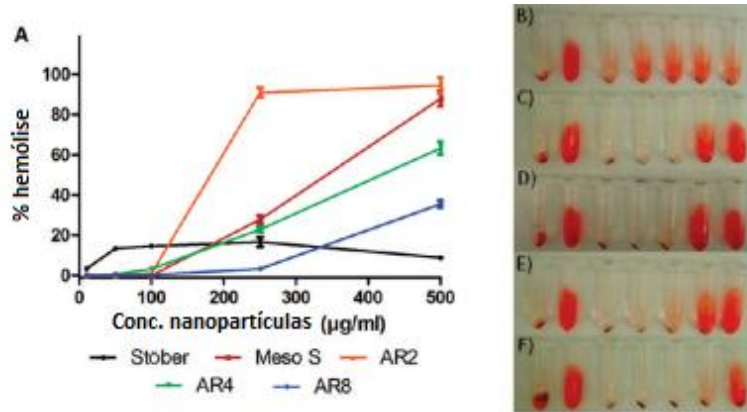


Figura 7.4- Ensaio de hemólise com nanopartículas de sílica puras. (A) Percentagem de hemólise em eritrócitos humanos após incubação com suspensão de nanopartículas obtido por diferentes métodos (stöber, nanopartículas mesoporosas, e ainda diferentes proporções (AR2;Ar4;Ar8)). A presença de hemoglobina no sobrenadante (vermelho) foi observada em (B) suspensão Stöber (nanopartículas de sílica não porosa (115 nm diâmetro)), (C) suspensão Meso S (nanopartículas de sílica mesoporosa (120 nm diâmetro)), (D) suspensão AR2 (nanopartículas de sílica mesoporosa (80-200 nm diâmetro)), (E) suspensão AR4 (nanopartículas de sílica mesoporosa (150-600 nm diâmetro)) e (F) suspensão AR8 (nanopartículas de sílica mesoporosa (130-1000 nm diâmetro)). Os tubos são alinhados (da esquerda para a direita) como controlo negativo (PBS), controlo positivo (água), suspensão de 10 µg/mL, suspensão de 50 µg/mL, suspensão de 100 µg/mL, suspensão de 250 µg/mL e 500 Suspensão µg/mL. (adaptado de ¹⁷¹).

Como descrito anteriormente, a funcionalização das nanopartículas torna-as capacitadas para diversas funcionalidades. Assim, os autores pretenderam também estudar a capacidade de nanopartículas de sílica funcionalizadas com grupos amina provocarem hemólise.

Neste caso, a funcionalização foi o fator mais importante para a percentagem de hemólise, sendo que a geometria e o método de síntese não mostraram um efeito significativo.

Como apresentado na figura 7.5, a atividade hemolítica foi dependente da carga e concentração de superfície. À medida que a concentração aumentou, houve um rápido início de hemólise em todos os tipos de nanopartículas. Comparando as nanopartículas de sílica sintetizadas pelo método de Stöber funcionalizadas com grupo amina (SA) com as restantes nanopartículas verificou-se que estas apresentam uma menor capacidade de percentagem de hemólise. Isto deve-se ao facto das nanopartículas SA apresentarem uma menor carga de superfície.¹⁷¹

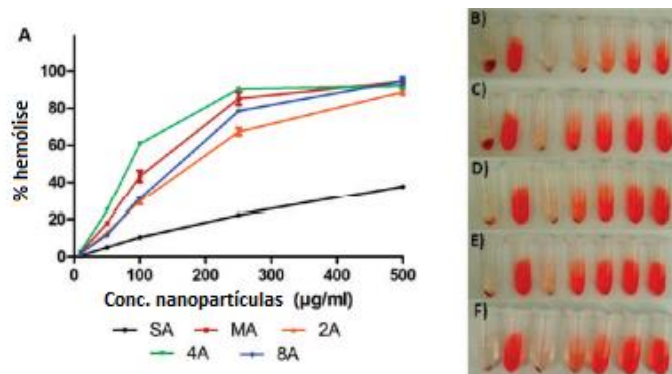


Figura 7.5- Ensaio de hemólise com nanopartículas de sílica funcionalizadas com grupo amino. (A) Percentagem de hemólise em eritrócitos humanos após incubação com suspensão de nanopartículas em diferentes concentrações. A presença de hemoglobina no sobrenadante (vermelho) foi observada em (B) suspensão Stöber (nanopartículas de sílica não porosa (115 nm diâmetro)), (C) suspensão Meso S (nanopartículas de sílicas mesoporosa (120 nm diâmetro)), (D) suspensão AR2 (nanopartículas de sílica mesoporosa (80-200 nm diâmetro)), (E) suspensão AR4 (nanopartículas de sílica mesoporosa (150-600 nm diâmetro)) e (F) suspensão AR8 (nanopartículas de sílica mesoporosa (130-1000 nm diâmetro)). Os tubos são alinhados (da esquerda para a direita) como controlo negativo (PBS), controlo positivo (água), suspensão de 10 µg/mL, suspensão de 50 µg/mL, suspensão de 100 µg/mL, suspensão de 250 µg/mL e 500 Suspensão µg/mL. (adaptado de ¹⁷¹).

Relativamente à toxicidade causada pelas nanopartículas de sílica, estas afetam os principais órgãos do sistema reticuloendotelial, como o fígado e o baço. Poucos estudos até à atualidade relataram lesão no rim, sendo que é o principal órgão responsável por excretar as nanopartículas de sílica.

Atualmente, sabe-se que essa possível nefrotoxicidade induzida por nanopartículas de sílica mesoporosa existe. Xi Chen et al.¹⁷² injetaram ratos Balb/c com concentrações crescentes de nanopartículas de sílica mesoporosa com o objetivo de perceber a relação entre a toxicidade renal e a inflamação. Para tal, foi testada a hipótese a fim de compreender se o fator nuclear kappa B (NF-kB) está associado a lesão renal e fibrose intersticial renal.

Como apresentado na figura 7.6, o tratamento com nanopartículas de sílica mesoporosa altera a homeostase endotelial, aumenta a expressão de fibronectina (FN), moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), fator de transformação do crescimento beta (TGF-β), e FN-kB, bem como aumenta as fibras de colagénio. Todos estes parâmetros aumentados, induzem lesão renal e fibrose.

Comparando a presença destas proteínas após 2 dias de exposição e 12 dias de exposição, os autores concluíram que a sua expressão aumenta de acordo com a concentração das nanopartículas e o tempo. Os autores depreenderam ainda que as células tubulares renais mostram capacidade de regeneração bem como significativa recuperação da função renal após convalescença. A fibrose tubular intersticial mostrou-se igualmente desenvolvida. Assim, após 12 dias de exposição a nefrotoxicidade não possui capacidade de resolução.

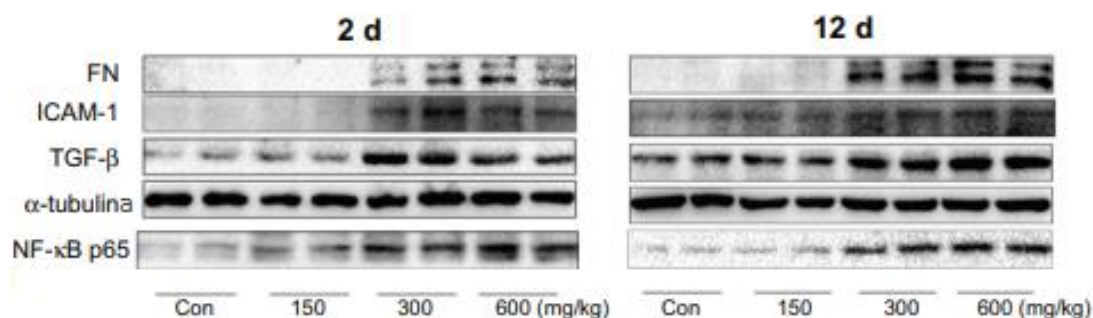


Figura 7.6- Método Western Blott usado para detetar proteínas indicadoras de fibrose, inflamação e por consequência problemas renais, após 2 e 12 dias de exposição a nanopartículas de sílica. Fibronectina(FN), moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), fator nuclear kappa B (NF- κ B). α -tubulina é a proteína usada como controlo. (adaptado de ¹⁷²).

Aquando da exposição após um determinado tempo ou uma determinada concentração de nanopartículas de sílica mesoporosa, existe ativação da via inflamatória do NF- κ B. ¹⁷² NF- κ B é um fator de transcrição associado à inflamação, sendo que a sua ativação pode aumentar os mediadores pró-inflamatórios/ inflamatórios resultando no desenvolvimento de inflamação. Além disso, esta ativação pode aumentar a expressão de TGF- β , aumentando ainda mais a ativação do fator de transcrição NF- κ B e promovendo o processo de fibrose. ¹⁷³

Xi Chen et al. ¹⁷² concluíram que a inflamação é um dos principais fatores causadores da toxicidade renal aguda, resultando em fibrose. Além disso, averiguaram que uma única injeção intraperitoneal com uma concentração elevada de nanopartículas de sílica levou a uma toxicidade renal grave e seletiva.

O facto de as nanopartículas possuírem dimensões na escala “nano”, apresentando-se como partículas ultrafinas, proporciona-lhes facilidade para se deslocarem do pulmão para a circulação sistémica, bem como o sistema nervoso central. Esta deslocação, permite-lhes causar danos a nível endotelial, ocorrência de trombos e efeitos a nível cardiovascular.

Zhongjun Du et al. ¹⁷⁴ estudaram a toxicidade cardiovascular causada por nanopartículas de sílicas de diferentes tamanhos e diferentes concentrações em ratos Wistar através de instilação intratraqueal. As nanopartículas de sílica amorfa aumentaram a resposta inflamatória transitória após instilação intratraqueal, induzindo resposta pró-inflamatória, aumentaram a libertação de espécies reativas de oxigénio e consequentemente, causam danos cardiovasculares. Além disso foi perceptível que a libertação de ROS bem como de citocinas pró-inflamatórias foi dose dependente.

Todos estes resultados corroboram com a citação anteriormente referida “a dose faz o veneno”.

8. Conclusão e perspectivas futuras

Nas últimas décadas, a nanotecnologia tornou-se uma das tecnologias líderes. Este ramo da ciência desenvolveu materiais com uma dimensão na faixa 1 a 100 nm sendo as nanopartículas à base de sílica candidatas muito promissoras para a sua tendência de crescimento.

As nanopartículas de sílica que devido à composição química são por natureza relativamente inertes, possuem ainda assim algumas características texturais e de superfície que as tornam particularmente vocacionadas para serem modificadas através de grupos funcionais orgânicos. A incorporação destes grupos funcionais tem revelado o enorme potencial de aplicação destes sistemas, uma vez que é possível a carga e entrega de diversos tipos de fármacos de forma controlada e com vantagens relativamente a outros tipos de administração.

Tendo em conta a contínua evolução nesta área de investigação e o elevado número de estudos que é possível encontrar na literatura científica publicada, foram selecionados exemplos de estudos e aplicações que pretendem mostrar a aplicabilidade das partículas de sílica, ou em que a sílica é um componente essencial, em diversas áreas da medicina. Entre estas contam-se as aplicações terapêuticas, em que beneficiando da capacidade de funcionalização destes materiais se consegue uma entrega de fármacos mais seletiva e com menos efeitos adversos, as aplicações em diagnóstico como é o caso da imagiologia por ultrassons ou ainda aplicações em teranóstica em que são conciliados a terapêutica e o diagnóstico. Embora pudessem ter sido apresentados muitos mais exemplos envolvendo estas aplicações, consideramos que os exemplos apresentados são bastante ilustrativos do potencial destes materiais.

Naturalmente que o uso destes materiais não é isento de riscos. De facto, alguns estudos têm demonstrado que existe alguma toxicidade no uso de partículas de sílica, sendo que esta parece estar relacionada com a concentração de nanopartículas, a existência ou não de funcionalização e, como seria de esperar, com o tempo de exposição das células às nanopartículas.

Muitos dos estudos apresentados bem como outros que podem ser encontrados na literatura, evidenciam uma lacuna que seria importante colmatar. A maioria dos estudos são efetuados *in vitro* e, embora estes estudos sejam de extrema importância e muitas vezes permitem a simulação de um ambiente *in vivo*, não incorporam todas as barreiras e alterações farmacocinéticas que as partículas podem sofrer num organismo vivo. Assim, espera-se que no futuro sejam mais frequentemente avaliadas a eficácia da terapia e a toxicidade *in vivo*, o que permitirá certamente o desenvolvimento de fármacos que possam ser usados na prática clínica.

9. Bibliografia

- 1 Oxygen (O) - Chemical properties, Health and Environmental effects, <https://www.lenntech.com/periodic/elements/o.htm>, (accessed 29 November 2021).
- 2 Silicon (Si) - Chemical properties, Health and Environmental effects, <https://www.lenntech.com/periodic/elements/si.htm>, (accessed 29 November 2021).
- 3 R. Szostak, *Molecular Sieves: Principles of Synthesis and Identification*, Springer Dordrecht, London, Second edition., 1989.
- 4 J. Kewal K., *The Handbook of Nanomedicine*, Humana Press, Totowa, New Jersey, First edition., 2008.
- 5 Z. Li, Y. Mu, C. Peng, M. F. Lavin, H. Shao and Z. Du, Understanding the mechanisms of silica nanoparticles for nanomedicine, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2021, **13**, e1658.
- 6 P. G. Jeelani, P. Mulay, R. Venkat and C. Ramalingam, Multifaceted Application of Silica Nanoparticles. A Review, *Silicon 2019 12:6*, 2019, **12**, 1337–1354.
- 7 B. J. Jankiewicz, D. Jamiola, J. Choma and M. Jaroniec, Silica-metal core-shell nanostructures, *Adv Colloid Interface Sci*, 2012, **170**, 28–47.
- 8 P. Mohammadi, M. Abbasinia, M. J. Assari and M. Oliaei, The Toxicology of Silica Nanoparticles: A Review, *Toxicol Environ Chem*, 2018, **100**, 285–316.
- 9 Z. Cheng, A. al Zaki, J. Z. Hui, V. R. Muzykantov and A. Tsourkas, Multifunctional Nanoparticles: Cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities, *Science*, 2012, **338**, 903.
- 10 A. Ray, A. Mandal, M. Joseph and A. K. Mitra, Recent Patents on Nanoparticles and Nanoformulations for Cancer Therapy, *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2016, **10**, 11–23.
- 11 R. Curley, J. D. Holmes and E. J. Flynn, Can sustainable, monodisperse, spherical silica be produced from biomolecules? A review, *Applied Nanoscience 2021 11:6*, 2021, **11**, 1777–1804.
- 12 B. Korzeniowska, R. Nooney, D. Wencel and C. McDonagh, Silica nanoparticles for cell imaging and intracellular sensing, *Nanotechnology*, 2013, **24**, 442002.
- 13 I. A. M. Ibrahim, A. A. F. Zikry, M. A. Sharaf and A. Zikry, Preparation of spherical silica nanoparticles: Stober silica, *Journal of American Science*, 2010, **6**, 1545–1003.
- 14 V. Selvarajan, S. Obuobi and P. L. R. Ee, Silica Nanoparticles—A Versatile Tool for the Treatment of Bacterial Infections, *Front Chem*, 2020, **8**, 602.
- 15 M. Tagliacucchi, I. Szleifer, Y. Matsuki, M. Iwamoto, K. Mita, K. Shigemi, S. Matsunaga, S. Oiki, R. P. Johnson, A. M. Fleming, L. R. Beuth, C. J. Burrows, H. S. White, F. C. Macazo, R. J. White, Z.-C. Zeng, S. J. Huang, X. Am ; Han, S. Bian, Y. Liang, K. N. Houk and A. B. Braunschweig, Nanoreactors: Small Spaces, Big Implications in Chemistry, *J Am Chem Soc*, 2016, **138**, 7443–7445.
- 16 M. A. Malik, M. Y. Wani and M. A. Hashim, Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials: 1st Nano Update, *Arabian Journal of Chemistry*, 2012, **5**, 397–417.
- 17 M. A. López-Quintela, Synthesis of nanomaterials in microemulsions: formation mechanisms and growth control, *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2003, **8**, 137–144.
- 18 Y. Han, J. Jiang, S. S. Lee and J. Y. Ying, Reverse microemulsion-mediated synthesis of silica-coated gold and silver nanoparticles, *Langmuir*, 2008, **24**, 5842–5848.
- 19 M. P. Pileni, The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals, *Nature Materials 2003 2:3*, 2003, **2**, 145–150.
- 20 L. B. McCusker, F. Liebau and G. Englehardt, Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts: (IUPAC recommendations 2001), *Microporous and Mesoporous Materials*, 2003, **58**, 3–13.

- 21 Q. Huo, D. I. Margolese and G. D. Stucky, Surfactant Control of Phases in the Synthesis of Mesoporous Silica-Based Materials, *Chemistry of Materials*, 1996, **8**, 1147–1160.
- 22 T. Yanagisawa, T. Shimizu, K. Kuroda and C. Kato, The Preparation of Alkyltrimethylammonium–Kanemite Complexes and Their Conversion to Microporous Materials, *Bull Chem Soc Jpn*, 2006, **63**, 988–992.
- 23 Jadhav KS, Dumbare PS and Pande VV, Mesoporous Silica Nanoparticles (MSN): A Nanonetwork and Hierarchical Structure in Drug Delivery, *J Nanomed Res*, 2015, **2**, 156–161.
- 24 D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka and G. D. Stucky, Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores, *Science*, 1998, **279**, 548–552.
- 25 C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli and J. S. Beck, Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism, *Nature* 1992 359:6397, 1992, **359**, 710–712.
- 26 T. M. Albayati and A. M. AlKafajy, Mesoporous Silica MCM-41 as a Carriers Material for Nystatine Drug in Delivery System, *Al-Khwarizmi Engineering Journal*, 2019, **15**, 34–43.
- 27 Q. Cai, Z. S. Luo, W. Q. Pang, Y. W. Fan, X. H. Chen and F. Z. Cui, Dilute Solution Routes to Various Controllable Morphologies of MCM-41 Silica with a Basic Medium†, *Chemistry of Materials*, 2001, **13**, 258–263.
- 28 D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka and G. D. Stucky, Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures, *J Am Chem Soc*, 1998, **120**, 6024–6036.
- 29 A. E. Ferreira, M. L. Cerrada, E. Pérez, V. Lorenzo, H. Cramail, J. P. Lourenço and M. R. Ribeiro, UHMWPE/SBA-15 nanocomposites synthesized by in situ polymerization, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2016, **232**, 13–25.
- 30 A. C. de Abreu Rosa, C. M. Correa, R. Faez, M. A. Bizeto, T. da Silva Martins and F. F. Camilo, Direct synthesis of SILVER nanoparticles and polyaniline into the MESOPORES of SBA-15, *Journal of Polymer Research* 2018 25:8, 2018, **25**, 1–9.
- 31 M. L. Focarete and A. Tampieri, *Core-shell nanostructures for drug delivery and theranostics: Challenges, strategies, and prospects for novel carrier systems*, Elsevier Inc., 2018.
- 32 R. Singh and R. Bhateria, Core–shell nanostructures: a simplest two-component system with enhanced properties and multiple applications, *Environmental Geochemistry and Health* 2020 43:7, 2020, **43**, 2459–2482.
- 33 K. Gdula, A. Dąbrowski and E. Skwarek, Synthesis, surface characterization and electrokinetic properties of colloidal silica nanoparticles with magnetic core, *Adsorption*, 2016, **22**, 681–688.
- 34 M. M. Lin, D. K. Kim, A. J. el Haj and J. Dobson, Development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) for translation to clinical applications, *IEEE Trans Nanobioscience*, 2008, **7**, 298–305.
- 35 D. Primc, B. Belec and D. Makovec, Synthesis of composite nanoparticles using coprecipitation of a magnetic iron-oxide shell onto core nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research*, 2016, **18**, 1–13.
- 36 S. Dembski, C. Schneider, B. Christ and M. Retter, Core-shell nanoparticles and their use for in vitro and in vivo diagnostics, *Core-Shell Nanostructures for Drug Delivery and Theranostics*, 2018, 119–141.
- 37 D.-W. Lee, H. Fatima and K.-S. Kim, Preparation of Silica Coated Magnetic Nanoparticles for Bioseparation, *J Nanosci Nanotechnol*, 2018, **18**, 1414–1418.

- 38 M. Friák, A. Schindlmayr and M. Scheffler, Ab initio study of the half-metal to metal transition in strained magnetite, *New J Phys*, 2007, **9**, 5.
- 39 M. Sonmez, M. Georgescu, L. Alexandrescu, D. Gurau, A. Ficai, D. Ficai and E. Andronescu, SYNTHESIS AND APPLICATIONS OF Fe₃O₄/SiO₂ CORE-SHELL MATERIALS, *Curr Pharm Des*, 2015, **21**, 5324–5335.
- 40 E. R. Essien, O. A. Olaniyi, L. A. Adams and R. O. Shaibu, Sol-Gel-Derived Porous Silica: Economic Synthesis and Characterization, *Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering*, 2012, **11**, 976–981.
- 41 J. Lee, Y. Lee, J. K. Yoon, H. bin Na, T. Yu, H. Kim, S. M. Lee, Y. M. Koo, J. H. Kwak, H. G. Park, H. N. Chang, M. Hwang, J. G. Park, J. Kim and T. Hyeon, Simple synthesis of functionalized superparamagnetic magnetite/silica core/shell nanoparticles and their application as magnetically separable high-performance biocatalysts, *Small*, 2008, **4**, 143–152.
- 42 Y. Lu, Y. Yin, B. T. Mayers and Y. Xia, Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through a Sol-Gel Approach, *Nano Lett*, 2002, **2**, 183–186.
- 43 W. Stöber, A. Fink and E. Bohn, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *J Colloid Interface Sci*, 1968, **26**, 62–69.
- 44 Hung-Ting Chen, Seong Huh and Victor S.-Y. Lin, in *Catalyst Preparation*, ed. J. Regalbuto, Boca Raton, 1st edn., 2006, pp. 46–71.
- 45 J. W. Larsen and L. J. Magid, Calorimetric and Counterion Binding Studies of the Interactions between Micelles and Ions. Observation of Lyotropic Series, *J Am Chem Soc*, 1974, **96**, 5774–5782.
- 46 D. R. Radu, C. Y. Lai, J. Huang, X. Shu and V. S. Y. Lin, Fine-tuning the degree of organic functionalization of mesoporous silica nanosphere materials via an interfacially designed co-condensation method, *Chemical Communications*, 2005, 1264–1266.
- 47 Y. Wang, Q. Zhao, N. Han, L. Bai, J. Li, J. Liu, E. Che, L. Hu, Q. Zhang, T. Jiang and S. Wang, Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications, *Nanomedicine*, 2015, **11**, 313–327.
- 48 K. Gou, Y. Wang, L. Xie, X. Guo, Y. Guo, J. Ke, L. Wu, S. Li and H. Li, Synthesis, structural properties, biosafety and applications of chiral mesoporous silica nanostructures, *Chemical Engineering Journal*, 2021, **421**, 127862.
- 49 J. Vrbanac and R. Slauter, ADME in Drug Discovery, *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*, 2017, 39–67.
- 50 P. Couvreur and C. Vauthier, Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease, *Pharm Res*, 2006, **23**, 1417–1450.
- 51 G. Adlakha-Hutcheon, R. Khaydarov, R. Korenstein, R. Varma, A. Vaseashta, H. Stamm and M. Abdel-Mottaleb, *Nanomaterials, Nanotechnology*, 2009, 195–207.
- 52 J. Kopeček, Smart and genetically engineered biomaterials and drug delivery systems, *Eur J Pharm Sci*, 2003, **20**, 1–16.
- 53 J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins and J. L. Schlenker, A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates, *J Am Chem Soc*, 1992, **114**, 10834–10843.
- 54 M. Vallet-Regí, A. Rámila, R. P. del Real and J. Pérez-Pariente, A new property of MCM-41: Drug delivery system, *Chemistry of Materials*, 2001, **13**, 308–311.
- 55 M. Vallet-Regí, F. Balas and D. Arcos, Mesoporous materials for drug delivery, *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, **46**, 7548–7558.

- 56 P. Nadrah, F. Porta, O. Planinšek, A. Kros and M. Gaberšček, Poly(propylene imine) dendrimer caps on mesoporous silica nanoparticles for redox-responsive release: Smaller is better, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013, **15**, 10740–10748.
- 57 L. Sun, Y. Wang, T. Jiang, X. Zheng, J. Zhang, J. Sun, C. Sun and S. Wang, Novel chitosan-functionalized spherical nanosilica matrix as an oral sustained drug delivery system for poorly water-soluble drug carvedilol, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, **5**, 103–113.
- 58 Y. Hu, J. Wang, Z. Zhi, T. Jiang and S. Wang, Facile synthesis of 3D cubic mesoporous silica microspheres with a controllable pore size and their application for improved delivery of a water-insoluble drug, *J Colloid Interface Sci*, 2011, **363**, 410–417.
- 59 J. Lu, M. Liong, J. I. Zink and F. Tamanoi, Mesoporous Silica Nanoparticles as a Delivery System for Hydrophobic Anticancer Drugs, *Small*, 2007, **3**, 1341–1346.
- 60 J. Lu, M. Liong, S. Sherman, T. Xia, M. Kovichich, A. E. Nel, J. I. Zink and F. Tamanoi, Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy: Energy-Dependent Cellular Uptake and Delivery of Paclitaxel to Cancer Cells, *Nanobiotechnology*, 2007, **3**, 89–95.
- 61 A. Sousa, K. C. Souza and E. M. B. Sousa, Mesoporous silica/apatite nanocomposite: Special synthesis route to control local drug delivery, *Acta Biomater*, 2008, **4**, 671–679.
- 62 K. Patel, S. Angelos, W. R. Dichtel, A. Coskun, Y. W. Yang, J. I. Zink and J. F. Stoddart, Enzyme-responsive snap-top covered silica nanocontainers, *J Am Chem Soc*, 2008, **130**, 2382–2383.
- 63 M. Vallet-Regí, F. Balas, M. Colilla and M. Manzano, Bone-regenerative bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability, *Progress in Solid State Chemistry*, 2008, **36**, 163–191.
- 64 T. W. Kim, I. I. Slowing, P. W. Chung and V. S. Y. Lin, Ordered mesoporous polymer-silica hybrid nanoparticles as vehicles for the intracellular controlled release of macromolecules, *ACS Nano*, 2011, **5**, 360–366.
- 65 H. Naono, M. Hakuman, T. Tanaka, N. Tamura and K. Nakai, Porous Texture and Surface Character of Dehydroxylated and Rehydroxylated MCM-41 Mesoporous Silicas-Analysis of Adsorption Isotherms of Nitrogen Gas and Water Vapor, *J Colloid Interface Sci*, 2000, **225**, 411–420.
- 66 Z. Jin and H. Liang, Effects of Morphology and Structural Characteristics of Ordered SBA-15 Mesoporous Silica on Release of Ibuprofen, *J Dispers Sci Technol*, 2010, **31**, 654–659.
- 67 X. Cui, S. W. Moon and W. C. Zin, High-yield synthesis of monodispersed SBA-15 equilateral hexagonal platelet with thick wall, *Mater Lett*, 2006, **60**, 3857–3860.
- 68 M. Vallet-Regí, Revisiting ceramics for medical applications, *Dalton Transactions*, 2006, 5211–5220.
- 69 N. K. Mal, M. Fujiwara and Y. Tanaka, Photocontrolled reversible release of guest molecules from coumarin-modified mesoporous silica, *Nature* 2003 421:6921, 2003, **421**, 350–353.
- 70 V. S. Y. Lin, C. Y. Lai, J. Huang, S. A. Song and S. Xu, Molecular recognition inside of multifunctionalized mesoporous silicas: Toward selective fluorescence detection of dopamine and glucosamine, *J Am Chem Soc*, 2001, **123**, 11510–11511.
- 71 N. K. Mermer and M. S. Yilmaz, SYNTHESIS OF FUNCTIONALIZED MCM-41 MESOPOROUS SILICA, *CBU International Conference Proceedings*, 2017, **5**, 1164–1168.
- 72 S. W. Song, K. Hidajat and S. Kawi, Functionalized SBA-15 Materials as Carriers for Controlled Drug Delivery: Influence of Surface Properties on Matrix–Drug Interactions, *Langmuir*, 2005, **21**, 9568–9575.

- 73 A. M. Putz, L. Almásy, A. Len and C. Ianăși, Functionalized silica materials synthesized via co-condensation and post-grafting methods, *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 2019, **27**, 323–332.
- 74 D. Pedraza, J. Díez, I. I. Barba, M. Colilla and M. Vallet-Regí, Amine-functionalized mesoporous silica nanoparticles: A new nanoantibiotic for bone infection treatment, *Biomedical Glasses*, 2018, **4**, 1–12.
- 75 R. Haidar, A. der Boghossian and B. Atiyeh, Duration of post-surgical antibiotics in chronic osteomyelitis: empiric or evidence-based?, *International Journal of Infectious Diseases*, 2010, **14**, 752–758.
- 76 M. Martínez-Carmona, Y. K. Gun'ko and M. Vallet-Regí, Mesoporous Silica Materials as Drug Delivery: “The Nightmare” of Bacterial Infection, *Pharmaceutics*, 2018, **10**, 279.
- 77 V. Nairi, L. Medda, M. Monduzzi and A. Salis, Adsorption and release of ampicillin antibiotic from ordered mesoporous silica, *J Colloid Interface Sci*, 2017, **497**, 217–225.
- 78 G. Qi, L. Li, F. Yu and H. Wang, Vancomycin-modified mesoporous silica nanoparticles for selective recognition and killing of pathogenic gram-positive bacteria over macrophage-like cells, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, **5**, 10874–10881.
- 79 J. Lu, M. Liang, Z. Li, J. I. Zink and F. Tamanoi, Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals NIH Public Access, 2010, **6**, 1794–1805.
- 80 Y. S. Lin, N. Abadeer and C. L. Haynes, Stability of small mesoporous silica nanoparticles in biological media, *Chemical Communications*, 2010, **47**, 532–534.
- 81 S. Subramaniam, N. Thomas, H. Gustafsson, M. Jambhrunkar, S. P. Kidd and C. A. Prestidge, Rifampicin-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles for the Treatment of Intracellular Infections, *Antibiotics*, 2019, **8**, 39.
- 82 Y. Zhou, G. Quan, Q. Wu, X. Zhang, B. Niu, B. Wu, Y. Huang, X. Pan and C. Wu, Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery, *Acta Pharm Sin B*, 2018, **8**, 165–177.
- 83 Y. Gao, D. Gao, J. Shen and Q. Wang, A Review of Mesoporous Silica Nanoparticle Delivery Systems in Chemo-Based Combination Cancer Therapies, *Front Chem*, 2020, **8**, 1086.
- 84 Z. Zhang, C. Huang, L. Zhang, Q. Guo, Y. Qin, F. Fan, B. Li, B. Xiao, D. Zhu and L. Zhang, pH-sensitive and bubble-generating mesoporous silica-based nanoparticles for enhanced tumor combination therapy, *Acta Pharm Sin B*, 2021, **11**, 520–533.
- 85 Y. Song, Y. Li, Q. Xu and Z. Liu, Mesoporous silica nanoparticles for stimuli-responsive controlled drug delivery: advances, challenges, and outlook, *Int J Nanomedicine*, 2017, **12**, 87.
- 86 L. Bai, Q. Zhao, J. Wang, Y. Gao, Z. Sha, D. Di, N. Han, Y. Wang, J. Zhang and S. Wang, Mechanism study on pH-responsive cyclodextrin capped mesoporous silica: Effect of different stalk densities and the type of cyclodextrin, *Nanotechnology*, 2015, **26**, 1–11.
- 87 L. Chen, Z. Zhang, X. Yao, X. Chen and X. Chen, Intracellular pH-operated mechanized mesoporous silica nanoparticles as potential drug carriers, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2015, **201**, 169–175.
- 88 B. Gidwani and A. Vyas, A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs, *Biomed Res Int*, 2015, **2015**, 1–15.
- 89 E. M. Bachelder, T. T. Beaudette, K. E. Broaders, J. Dashe and J. M. J. Fréchet, Acetal-derivatized dextran: an acid-responsive biodegradable material for therapeutic applications, *J Am Chem Soc*, 2008, **130**, 10494–10495.

- 90 S. V. M. de Moraes, M. T. Laranjo, M. Zat, T. M. H. Costa, M. R. Gallas and E. v. Benvenuti, High-pressure effects on nanometric hybrid xerogels, p-phenylenediamine/silica and p-anisidine/silica, *Applied Physics A* 2004 81:5, 2005, **81**, 1053–1057.
- 91 A. Caley and R. Jones, The principles of cancer treatment by chemotherapy, *Surgery - Oxford International Edition*, 2012, **30**, 186–190.
- 92 L. Zhao and B. Zhang, Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes, *Scientific Reports* 2017 7:1, 2017, **7**, 1–11.
- 93 D. Zhu, F. Fan, C. Huang, Z. Zhang, Y. Qin, L. Lu, H. Wang, X. Jin, H. Zhao, H. Yang, C. Zhang, J. Yang, Z. Liu, H. Sun, X. Leng, D. Kong and L. Zhang, Bubble-generating polymersomes loaded with both indocyanine green and doxorubicin for effective chemotherapy combined with photothermal therapy, *Acta Biomater*, 2018, **75**, 386–397.
- 94 X. Chen, Y. Liu, A. Lin, N. Huang, L. Long, Y. Gang and J. Liu, Folic acid-modified mesoporous silica nanoparticles with pH-responsiveness loaded with Amp for an enhanced effect against anti-drug-resistant bacteria by overcoming efflux pump systems, *Biomater Sci*, 2018, **6**, 1923–1935.
- 95 L. P. Zhu, J. H. Jiang, B. K. Zhu and Y. Y. Xu, Immobilization of bovine serum albumin onto porous polyethylene membranes using strongly attached polydopamine as a spacer, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, **86**, 111–118.
- 96 H. Lee, J. Rho and P. B. Messersmith, Facile Conjugation of Biomolecules onto Surfaces via Mussel Adhesive Protein Inspired Coatings, *Advanced Materials*, 2009, **21**, 431–434.
- 97 M. E. Lynge, P. Schattling and B. Städler, Recent developments in poly(dopamine)-based coatings for biomedical applications, *Nanomedicine*, 2015, **10**, 2725–2742.
- 98 H. Zhang, X. Zhang, X. Zhu, J. Chen, Q. Chen, H. Zhang, L. Hou and Z. Zhang, NIR light-induced tumor phototherapy using photo-stable ICG delivery system based on inorganic hybrid, *Nanomedicine*, 2018, **14**, 73–84.
- 99 S. Ren, X. Cheng, M. Chen, C. Liu, P. Zhao, W. Huang, J. He, Z. Zhou and L. Miao, Hypotoxic and Rapidly Metabolic PEG-PCL-C3-ICG Nanoparticles for Fluorescence-Guided Photothermal/Photodynamic Therapy against OSCC, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, **9**, 31509–31518.
- 100 Ordem dos Farmacêuticos, *Administração de vacinas e medicamentos injetáveis por farmacêuticos Uma abordagem prática*, 2015.
- 101 D. Kristensen and M. Zaffran, Designing vaccines for developing-country populations: ideal attributes, delivery devices, and presentation formats, *Procedia Vaccinol*, 2010, **2**, 119–123.
- 102 A. K. Abbas, A. H. Lichtman and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*, Saunders/Elsevier, 10th edn., 2021.
- 103 G. M. Glenn and D. T. O'Hagan, Adjuvants: Progress, regress and pandemic preparedness, *Expert Rev Vaccines*, 2007, **6**, 651–652.
- 104 M. Ulanova, A. Tarkowski, M. Hahn-Zoric and L. Å. Hanson, The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism, *Infect Immun*, 2001, **69**, 1151–1159.
- 105 T. Liu, H. Liu, C. Fu, L. Li, D. Chen, Y. Zhang and F. Tang, Silica nanorattle with enhanced protein loading: a potential vaccine adjuvant, *J Colloid Interface Sci*, 2013, **400**, 168–174.
- 106 L. P. Mercuri, L. v. Carvalho, F. A. Lima, C. Quayle, M. C. A. Fantini, G. S. Tanaka, W. H. Cabrera, M. F. D. Furtado, D. v. Tambourgi, J. D. R. Matos, M. Jaroniec and O. A. Sant'Anna, Ordered Mesoporous Silica SBA-15: A New Effective Adjuvant to Induce Antibody Response, *Small*, 2006, **2**, 254–256.

- 107 A. L. Tornesello, M. Tagliamonte, M. L. Tornesello, F. M. Buonaguro and L. Buonaguro, Nanoparticles to improve the efficacy of peptide-based cancer vaccines, *Cancers (Basel)*, 2020, **12**, 1049–1069.
- 108 Synthetic peptide vaccines, <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccine-standardization/synthetic-peptide-vaccines>, (accessed 18 March 2022).
- 109 E. D. Quakkelaar and C. J. M. Melief, Experience with Synthetic Vaccines for Cancer and Persistent Virus Infections in Nonhuman Primates and Patients, *Adv Immunol*, 2012, **114**, 77–106.
- 110 T. Liu, L. Li, X. Teng, X. Huang, H. Liu, D. Chen, J. Ren, J. He and F. Tang, Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice, *Biomaterials*, 2011, **32**, 1657–1668.
- 111 L. Li, F. Tang, H. Liu, T. Liu, N. Hao, D. Chen, X. Teng and J. He, In vivo delivery of silica nanorattle encapsulated docetaxel for liver cancer therapy with low toxicity and high efficacy, *ACS Nano*, 2010, **4**, 6874–6882.
- 112 L. Tan, D. Chen, H. Liu and F. Tang, A Silica Nanorattle with a Mesoporous Shell: An Ideal Nanoreactor for the Preparation of Tunable Gold Cores, *Advanced Materials*, 2010, **22**, 4885–4889.
- 113 K. H. Khan, DNA vaccines: roles against diseases, *Germs*, 2013, **3**, 26–35.
- 114 V. Vetter, G. Denizer, L. R. Friedland, J. Krishnan and M. Shapiro, Understanding modern-day vaccines: what you need to know, *Ann Med*, 2018, **50**, 110–120.
- 115 H. Song, Y. Yang, J. Tang, Z. Gu, Y. Wang, M. Zhang and C. Yu, DNA Vaccine Mediated by Rambutan-Like Mesoporous Silica Nanoparticles, *Adv Ther (Weinh)*, 2020, **3**, 1900154.
- 116 S. Montalvo-Quirós, M. Vallet-Regí, A. Palacios, J. Anguita, R. C. Prados-Rosales, B. González and J. L. Luque-García, Mesoporous Silica Nanoparticles as a Potential Platform for Vaccine Development against Tuberculosis, *Pharmaceutics*, 2020, **12**, 1–15.
- 117 O. Y. Kim, J. Lee and Y. S. Gho, Extracellular vesicle mimetics: Novel alternatives to extracellular vesicle-based theranostics, drug delivery, and vaccines, *Semin Cell Dev Biol*, 2017, **67**, 74–82.
- 118 P. Gellings, M. Galeas-Pena and L. A. Morici, Mycobacterium bovis bacille Calmette–Guerin-derived extracellular vesicles as an alternative to live BCG immunotherapy, *Clin Exp Med*, 2022, 1–9.
- 119 B. G. Cha and J. Kim, Functional mesoporous silica nanoparticles for bio-imaging applications, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2019, **11**, 1515.
- 120 K. T. Yong, I. Roy, M. T. Swihart and P. N. Prasad, Multifunctional Nanoparticles as Biocompatible Targeted Probes for Human Cancer Diagnosis and Therapy, *J Mater Chem*, 2009, **19**, 4655.
- 121 S. Saroj and S. J. Rajput, Composite smart mesoporous silica nanoparticles as promising therapeutic and diagnostic candidates: Recent trends and applications, *J Drug Deliv Sci Technol*, 2018, **44**, 349–365.
- 122 M. Nakamura, Biomedical applications of organosilica nanoparticles toward theranostics, *Nanotechnol Rev*, 2012, **1**, 469–491.
- 123 F. A. Jaffer, P. Libby and R. Weissleder, Optical and Multimodality Molecular Imaging Insights Into Atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, **29**, 1017.
- 124 A. Cantelli, G. Battistelli, G. Guidetti, J. Manzi, M. di Giosia and M. Montalti, Luminescent gold nanoclusters as biocompatible probes for optical imaging and theranostics, *Dyes and Pigments*, 2016, **135**, 64–79.

- 125 N. Ugemuge, Y. R. Parauha and S. J. Dhoble, Synthesis and luminescence study of silicate-based phosphors for energy-saving light-emitting diodes, *Energy Materials*, 2021, 445–480.
- 126 A. Roda, M. Guardigli, R. Ziessel, M. Mirasoli, E. Michelini and M. Musiani, Molecular luminescence imaging, *Microchemical Journal*, 2007, **85**, 5–12.
- 127 B. Valeur and M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Second Edition*, Wiley-VCH, 2012.
- 128 J. Wang, Z. H. Shah, S. Zhang and R. Lu, Silica-based nanocomposites via reverse microemulsions: classifications, preparations, and applications, *Nanoscale*, 2014, **6**, 4418–4437.
- 129 A. van Blaaderen and A. Vrij, Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent, monodisperse silica spheres, *Langmuir*, 2002, **8**, 2921–2931.
- 130 S. W. Ha, C. E. Camalier, G. R. Beck and J. K. Lee, New method to prepare very stable and biocompatible fluorescent silica nanoparticles, *Chem Commun (Camb)*, 2009, 2881–2883.
- 131 L. Jiao, F. Song, B. Zhang, H. Ning, J. Cui and X. Peng, Improving the brightness and photostability of NIR fluorescent silica nanoparticles through rational fine-tuning of the covalent encapsulation methods, *J Mater Chem B*, 2017, **5**, 5278–5283.
- 132 E. Delaey, F. van Laar, D. de Vos, A. Kamuhabwa, P. Jacobs and P. de Witte, A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes, *J Photochem Photobiol B*, 2000, **55**, 27–36.
- 133 P. M. Froehlich and G. G. Guilbault, *Instrumentation for Fluorescence*, CRC Press, 1990.
- 134 A. Burns, P. Sengupta, T. Zedayko, B. Baird and U. Wiesner, Core/Shell fluorescent silica nanoparticles for chemical sensing: towards single-particle laboratories, *Small*, 2006, **2**, 723–726.
- 135 A. Hulanicki, S. Glab and F. Ingman, Chemical sensors: definitions and classification, *Pure and Applied Chemistry*, 1991, **63**, 1247–1250.
- 136 RBL-2H3 - CRL-2256 | ATCC, <https://www.atcc.org/products/crl-2256>, (accessed 6 August 2022).
- 137 C. Khemtong, C. W. Kessinger and J. Gao, Polymeric Nanomedicine for Cancer MR Imaging and Drug Delivery, *Chem Commun (Camb)*, 2009, 3497.
- 138 R. A. Pooley, Fundamental physics of MR imaging, *Radiographics*, 2005, **25**, 1087–1099.
- 139 A. Webb, in *New Developments in NMR*, Royal Society of Chemistry, 2016, vol. 2016-January, pp. 1–47.
- 140 A. Cabrera-García, A. Vidal-Moya, Á. Bernabeu, J. Pacheco-Torres, E. Checa-Chavarria, E. Fernández and P. Botella, Gd-Si Oxide Nanoparticles as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging, *Nanomaterials*, 2016, **6**, 109–114.
- 141 Z. Li, J. Guo, M. Zhang, G. Li and L. Hao, Gadolinium-Coated Mesoporous Silica Nanoparticle for Magnetic Resonance Imaging, *Front Chem*, 2022, **10**, 103.
- 142 W. M. Payne, D. A. Svechkarev, M. D. Boska and A. M. Mohs, Multimodal contrast agents for integrated preoperative and intraoperative imaging of cancer, *Cancer Res*, 2017, **77**, 19.
- 143 P. Sharma, N. E. Bengtsson, G. A. Walter, H. B. Sohn, G. Zhou, N. Iwakuma, H. Zeng, S. R. Grobmyer, E. W. Scott and B. M. Moudgil, Gadolinium-doped silica nanoparticles encapsulating indocyanine green for near infrared and magnetic resonance imaging, *Small*, 2012, **8**, 2856–2868.
- 144 J. R. van der Vorst, M. Hutteman, K. N. Gaarenstroom, A. A. W. Peters, J. S. D. Mieog, B. E. Schaafsma, P. J. K. Kuppen, J. v. Frangioni, C. J. H. van de Velde and A. L.

- Vahrmeijer, Optimization of near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping in cervical cancer patients, *Int J Gynecol Cancer*, 2011, **21**, 1472–1478.
- 145 sodium 4-[(2E)-2-[(2Z,4Z,6Z)-7-[1,1-dimethyl-3-(4-sulfonatobutyl)-1H-benzo[e]indolium-2-yl]hepta-2,4,6-trien-1-ylidene]-1,1-dimethyl-1,2-dihydro-3H-benzo[e]indol-3-yl]butane-1-sulfonate | C43H47N2NaO6S2 - PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284572#section=2D-Structure>, (accessed 3 May 2022).
- 146 J. N. DaSilva, A. C. Valadiva, I. Mylonas, T. Hadizad, R. A. deKemp and R. S. B. Beanlands, PET Radiopharmaceuticals, *Iran J Pharm Res*, 2011, **10**, 1.
- 147 W. Wadsak and M. Mitterhauser, Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT, *Eur J Radiol*, 2010, **73**, 461–469.
- 148 T. F. Lang, B. H. Hasegawa, S. C. Liew, J. K. Brown, S. C. Blankespoor, S. M. Reilly, E. L. Gingold and C. E. Cann, Description of a Prototype Emission Transmission Computed Tomography Imaging System, *J NucIMed*, 1992, **33**, 1881–1887.
- 149 S. Rojas, J. D. Gispert, C. Menchón, H. G. Baldoví, M. Buaki-Sogo, M. Rocha, S. Abad, V. M. Victor, H. García and J. R. Herance, Novel methodology for labelling mesoporous silica nanoparticles using the ¹⁸F isotope and their in vivo biodistribution by positron emission tomography, *Journal of Nanoparticle Research*, 2015, **17**, 1–9.
- 150 A. al Faraj, B. Alotaibi, A. P. Shaik, K. Z. Shamma, I. al Jammaz and J. Gerl, Sodium-22-radiolabeled silica nanoparticles as new radiotracer for biomedical applications: In vivo positron emission tomography imaging, biodistribution, and biocompatibility, *Int J Nanomedicine*, 2015, **10**, 6293–6302.
- 151 E. Sattarzadeh, M. M. Amini, S. Kakaei and A. Khanchi, ⁶⁸Ga-radiolabeled magnetic nanoparticles for PET–MRI imaging, *J Radioanal Nucl Chem*, 2018, **317**, 1333–1339.
- 152 V. L. Tran, V. Thakare, M. Natuzzi, M. Moreau, A. Oudot, J. M. Vrigneaud, A. Courteau, C. Louis, S. Roux, F. Boschetti, F. Denat, O. Tillement and F. Lux, Functionalization of gadolinium chelates silica nanoparticle through silane chemistry for simultaneous MRI/⁶⁴Cu PET imaging, *Contrast Media Mol Imaging*, 2018, **2018**, 1–10.
- 153 Breast Cancer Ultrasonography: Practice Essentials, Role of Ultrasonography in Screening, Breast Imaging Reporting and Data System, <https://medicine.medscape.com/article/346725-overview>, (accessed 7 August 2022).
- 154 A. Yildirim, R. Chattaraj, N. T. Blum, G. M. Goldscheitter and A. P. Goodwin, Stable Encapsulation of Air in Mesoporous Silica Nanoparticles: Fluorocarbon-Free Nanoscale Ultrasound Contrast Agents, *Adv Healthc Mater*, 2016, **5**, 1290–1298.
- 155 S. Paul, R. Nahire, S. Mallik and K. Sarkar, Encapsulated microbubbles and echogenic liposomes for contrast ultrasound imaging and targeted drug delivery, *Comput Mech*, 2014, **53**, 413.
- 156 J. M. Gorce, M. Arditi and M. Schneider, Influence of bubble size distribution on the echogenicity of ultrasound contrast agents: a study of SonoVue, *Invest Radiol*, 2000, **35**, 661–671.
- 157 Q. Jin, C. Y. Lin, S. T. Kang, Y. C. Chang, H. Zheng, C. M. Yang and C. K. Yeh, Superhydrophobic silica nanoparticles as ultrasound contrast agents, *Ultrason Sonochem*, 2017, **36**, 262–269.
- 158 A. Liberman, H. P. Martinez, C. N. Ta, C. v. Barback, R. F. Mattrey, Y. Kono, S. L. Blair, W. C. Trogler, A. C. Kummel and Z. Wu, Hollow silica and silica-boron nano/microparticles for contrast-enhanced ultrasound to detect small tumors, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5124.
- 159 A. Milgroom, M. Intrator, K. Madhavan, L. Mazzaro, R. Shandas, B. Liu and D. Park, Mesoporous silica nanoparticles as a breast-cancer targeting ultrasound contrast agent, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, **116**, 652–657.

- 160 J. Cabrita Da Silva, M. A. Soares, S. De and O. Martins, Análise da base de dados do Sistema Nacional de Farmacovigilância (SVIG), *INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.* .
- 161 P. Grandjean, Paracelsus Revisited: The Dose Concept in a Complex World, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2016, **119**, 126.
- 162 W. H. de Jong and P. J. A. Borm, Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards, *Int J Nanomedicine*, 2008, **3**, 133.
- 163 D. B. Buxton, S. C. Lee, S. A. Wickline and M. Ferrari, Recommendations of the National Heart, Lung, and Blood Institute Nanotechnology Working Group, *Circulation*, 2003, **108**, 2737–2742.
- 164 Silica - Silica, Some Silicates, Coal Dust and para-Aramid Fibrils - NCBI Bookshelf, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK410038/#p39-s2>, (accessed 29 May 2022).
- 165 F. Turci, C. Pavan, R. Leinardi, M. Tomatis, L. Pastero, D. Garry, S. Anguissola, D. Lison and B. Fubini, Revisiting the paradigm of silica pathogenicity with synthetic quartz crystals: the role of crystallinity and surface disorder, *Part Fibre Toxicol*, 2016, **13**, 1–12.
- 166 J. S. Chang, K. L. B. Chang, D. F. Hwang and Z. L. Kong, In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line, *Environ Sci Technol*, 2007, **41**, 2064–2068.
- 167 W. Lin, Y. wern Huang, X. D. Zhou and Y. Ma, In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, **217**, 252–259.
- 168 X. Shi, V. Castranova, B. Halliwell and V. Vallyathan, Reactive oxygen species and silica-induced carcinogenesis, *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 1998, **1**, 181–197.
- 169 L. Feng, X. Yang, S. Liang, Q. Xu, M. R. Miller, J. Duan and Z. Sun, Silica nanoparticles trigger the vascular endothelial dysfunction and prethrombotic state via miR-451 directly regulating the IL6R signaling pathway, *Part Fibre Toxicol*, 2019, **16**, 1–13.
- 170 Endothelial Dysfunction: Symptoms, Causes & Treatments, <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/23230-endothelial-dysfunction>, (accessed 7 August 2022).
- 171 T. Yu, A. Malugin and H. Ghandehari, Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity, *ACS Nano*, 2011, **5**, 5717–5728.
- 172 X. Chen, W. Zhouhua, Z. Jie, F. Xinlu, L. Jinqiang, Q. Yuwen and H. Zhiying, Renal interstitial fibrosis induced by high-dose mesoporous silica nanoparticles via the NF- κ B signaling pathway, *Int J Nanomedicine*, 2015, **10**, 1.
- 173 T. Lawrence, The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, **1**, 1–11.
- 174 Z. Du, D. Zhao, L. Jing, G. Cui, M. Jin, Y. Li, X. Liu, Y. Liu, H. Du, C. Guo, X. Zhou and Z. Sun, Cardiovascular toxicity of different sizes amorphous silica nanoparticles in rats after intratracheal instillation, *Cardiovasc Toxicol*, 2013, **13**, 194–207.