



Lucas Torres Miranda Sá

Síntese, caracterização e avaliação de sistemas de liberação de fármacos baseados em sílica mesoporosa para imagem em medicina nuclear

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da PUC-Rio.

Orientadora: Profa. Maria Isabel Pais da Silva

Co-orientador: Dr. Ralph Santos-Oliveira

Rio de Janeiro
Março de 2012



Lucas Torres Miranda Sá

Síntese, caracterização e avaliação de sistemas de liberação de fármacos baseados em sílica mesoporosa para imagem em medicina nuclear

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof^a. Maria Isabel Pais da Silva

Orientadora
Departamento de Química - PUC-Rio

Dr. Ralph Santos-Oliveira

Co-orientador
Instituto de Engenharia Nuclear (IEN)

Prof^a. Maria Inês Bruno Tavares

Instituto de Macromoléculas Heloísa Mano (IMA) - UFRJ

Dr. Alexandre Malta Rossi

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF)

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial do Centro
Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 21 de março de 2012

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem a autorização da universidade, do autor e do orientador.

Lucas Torres Miranda Sá

Graduou-se em Farmácia Industrial na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) em 2009. Durante a graduação foi aluno de iniciação científica, desenvolvendo pesquisas nas áreas de química medicinal e parasitologia. Já trabalhou com Analista de garantia da qualidade em empresa farmacêutica.

Ficha Catalográfica

Sá, Lucas Torres Miranda

Síntese, caracterização e avaliação de sistemas de liberação de fármacos baseados em sílica mesoporosa para imagem em medicina nuclear / Lucas Torres Miranda Sá ; orientadora: Maria Isabel Pais da Silva; co-orientador: Ralph Santos-Oliveira. – 2012.

113 f. : il. (color.) ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2012.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Sílica mesoporosa. 3. SBA-15. 4. Hidroxiapatia. 5. Drug delivery systems. 6. DDS. 7. Oncologia. 8. Sistema de liberação de fármacos. 9. Medicina nuclear. 10. Aptâmeros. 11. Câncer. I. Silva, Maria Isabel Pais da. II. Santos-Oliveira, Ralph. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

Para a minha família.

Agradecimentos

À minha orientadora Maria Isabel e ao meu co-orientador Ralph Santos-Oliveira pela oportunidade e empenho no desenvolvimento da pesquisa.

À equipe dos Laboratórios de Catálise e Combustíveis da PUC-Rio e Nanoradiofármacos do HUCFF/IEN.

Ao Johnny e à Sabrina pelas discussões e ajudas no dia-a-dia.

À CAPES, ao CNPq e à PUC-Rio pelos auxílios concedidos para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Alexandre Rossi pelas discussões edificantes e à equipe do CBPF pelo auxílio.

Ao Maurício e André pela ajuda com o MEV.

Ao Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ pelo auxílio com os experimentos para avaliação de biodistribuição e marcação.

Ao Maurício Dupim pelas análises de ICP-OES.

Ao Henrique pela ajuda e assistência nas análises sempre que necessário.

A todos os mestrandos 2010/I do departamento de química da PUC-Rio.

Resumo

Miranda Sá, Lucas Torres; Da Silva, Maria Isabel; Santos-Oliveira, Ralph. **Síntese, caracterização e avaliação de sistemas de liberação de fármacos baseados em sílica mesoporosa para imagem em medicina nuclear.** Rio de Janeiro, 2012. 113p. Dissertação de mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo inteiro e estima-se que até 2030, serão 27 milhões de novos casos e 17 milhões de mortes. Devido a esse fato, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação (*Drug delivery systems* - DDS) que permitam a distribuição de um agente bioativo no seu sítio terapêutico na dose certa, numa taxa específica, acarretando menor toxicidade, e que possa ser utilizado tanto para o tratamento como para o diagnóstico de enfermidades. Atualmente, as sílicas mesoporosa surgem como potenciais DDS ou carreadores em radiofármacos, devido a sua estrutura organizada, alta área superficial e tamanhos e volumes de poros ajustáveis. Nesse trabalho foram sintetizados três potenciais sistemas de liberação ou carreadores para radiofármacos para exames de imagem em medicina nuclear. A SBA-15 e sua associação com a hidroxiapatita (HAP) por dois métodos diferentes: adição dos precursores durante formação da mesofase (SBA-15/HAP_1) e o segundo por impregnação na estrutura da SBA-15 já sintetizada e calcinada (SBA-15/HAP_2). Os materiais foram marcados com o radioisótopo ^{99m}Tc e tiveram suas marcações e biodistribuições avaliadas. A SBA-15 também foi conjugada com o aptâmero anti-MUC1 para realização de direcionamento ativo para células tumorais. Os materiais foram caracterizados por: espectroscopia de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES); análise termogravimétrica (ATG); fisissorção de nitrogênio; difração de raios-X (DRX); infravermelho (IV); microscopia eletrônica de transmissão e varredura (MET e MEV); e difração a laser. As avaliações da marcação e da biodistribuição foram realizadas por contador de

raios gama e gama-câmara respectivamente. A SBA-15 apresentou uma estrutura mesoporosa altamente ordenada, com alta área superficial. Os materiais impregnados com hidroxiapatita apresentaram diferenças estruturais: Na SBA-15/HAP_1 houve bloqueio quase total dos mesoporos com nanopartículas de hidroxiapatita, enquanto na SBA-15/HAP_2, houve um bloqueio parcial dos mesoporos, apresentando também agregados de hidroxiapatita. A metodologia de marcação com o ^{99m}Tc apresentou estabilidade de 8 horas. A conjugação da SBA-15 com o aptâmero anti-MUC1 apresentou maior reconhecimento das partículas de SBA-15 por células tumorais.

Palavras-Chave

Sílica mesoporosa; SBA-15; hidroxiapatita; *drug delivery systems*; DDS; oncologia; sistema de liberação de fármacos; medicina nuclear; aptâmeros; câncer.

Abstract

Miranda Sá, Lucas Torres; Da Silva, Maria Isabel (Advisor); Santos-Oliveira, Ralph (Co-Advisor). **Synthesis, characterization and evaluation of drug delivery systems based on mesoporous silica for image in nuclear medicine.** Rio de Janeiro, 2012. 113p. MSc. Dissertation – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Cancer is the second major leading cause of death worldwide and is estimated till 2030, 27 million new cases and 17 million of deaths. So, the development of new drug delivery systems (DDS) that allows a bioactive agent distribution in its therapeutic site in the right dose, in a specific rate, leading lower toxicity, and that can be used for treatment and diagnosis of several diseases. Recently, mesoporous silicas arise as promising DDS or carriers for radiopharmaceuticals, because of its highly organized structure, high superficial area and tunable pore size and volumes. In this work, were synthesized three potential DDS or carriers for radiopharmaceuticals for imaging in nuclear medicine. SBA-15 and its association with hydroxyapatite (HAP) by two distinct methodologies: precursors addition during mesophase formation (SBA-15/HAP_1); and precursors impregnation in SBA-15 previously synthesized and calcined (SBA-15/HAP_2). The materials were labelled with technetium-99m radioisotope and its labeling methodology and biodistribution were evaluated. SBA-15 was also conjugated with the aptamer Anti-MUC1 for active delivery to tumoral cells. The materials were characterized by: inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES); thermogravimetric analysis (TGA); nitrogen physisorption; x-ray diffraction (DRX); infrared (IR), transmission and scanning electronic microscopy (TEM and SEM); and laser diffraction. The labeling and biodistribution evaluation were performed by gamma-ray counter and gamma-camera respectively. The materials were synthesized and have shown peculiar characteristics. SBA-15 has highly ordered mesoporous structure with

high superficial area. The materials impregnated with hydroxyapatite showed structural differences: In SBA-15/HAP_1, hydroxyapatite nanocrystals almost blocked the entire mesopores, while in SBA-15/HAP_2, there were a partially blocking of the mesopores and also presented hydroxyapatite nanocrystals aggregates. The tecnecium-99m labeling methodology of the materials showed an 8 hours stability. SBA-15 conjugation with Anti-MUC1 for active delivery has shown a better recognition by tumor cells.

Keywords

Mesoporous silica; SBA-15; hydroxyapatite; drug delivery system; DDS; oncology; nuclear medicine; aptamers; cancer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Câncer	15
1.2. Sistemas de liberação.....	16
1.3. Sílicas Mesoporosas	17
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
4.1. Câncer	21
4.1.1. Definição.....	21
4.1.2. Estatística.....	22
4.2. Radiofármacos.....	25
4.3. Sistemas de liberação (DDS).....	30
4.4. Sílicas mesoporosas e sistemas SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅	33
4.4.1. Síntese.....	35
4.4.2. Sistemas de liberação.....	38
4.4.3. Funcionalizações superficiais	41
4.4.4. Partículas de sílica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	43
4.5. Aptâmeros e glicoproteína MUC1	47
5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	49
5.1. Síntese dos materiais.....	49
5.1.1. SBA-15.....	49
5.1.2. SBA-15 impregnada com hidroxiapatita (SBA-15/HAP_1)	50
5.1.3. SBA-15 impregnada com hidroxiapatita (SBA-15/HAP_2)	52
5.1.4. Hidroxiapatita	53
5.2. Marcação com ^{99m} Tc.....	54
5.3. Aptâmero Anti-MUC1.....	55
5.3.1. Preparação	55
5.3.2. Conjugação com a SBA-15	55
5.4. Caracterização dos Materiais.....	55
5.4.1. Análise elementar (AE)	55
5.4.2. Análise termogravimétrica (ATG).....	56

5.4.3.	Difração de raios-X (DRX)	56
5.4.4.	Fisissorção de nitrogênio	57
5.4.5.	Infravermelho com transformada de Fourier (IVTF).....	57
5.4.6.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	58
5.4.7.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	58
5.4.8.	Difração a laser	59
5.5.	Avaliação da atividade e citotoxicidade.....	59
5.5.1.	Marcação	59
5.5.2.	Biodistribuição.....	60
5.5.3.	Microscopia confocal	60
5.5.4.	Citotoxicidade	61
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
6.1.	Análise elementar (AE)	63
6.2.	Análise termogravimétrica (ATG).....	66
6.3.	Difração de raios-x (DRX).....	69
6.4.	Fisissorção de nitrogênio	73
6.5.	Infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)	77
6.6.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	80
6.7.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	85
6.8.	Difração a laser	89
6.9.	Marcação e estabilidade.....	91
6.10.	Cintilografia e biodistribuição.....	92
6.11.	Microscopia Confocal	95
6.12.	Citotoxicidade	97
7.	CONCLUSÃO	98
8.	PERSPECTIVAS	101
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

Lista de figuras

Figura 1 – Evolução da concentração plasmática de fármacos em terapias convencionais comparadas com liberação controlada através de DDS. (Vallet-Regí, 2007)	17
Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma. (INCA, 2011).	25
Figura 3 – Estruturas de diferentes fosfatos e fosfonatos utilizados na radiofarmácia. (Saha, 2003)	30
Figura 4 – Diferentes sistemas de liberação de agentes bioativos já descritos. (Faraji, 2009).....	31
Figura 5 - Interações entre os componentes envolvidos na síntese e formação do sistema mesoporoso.	36
Figura 6 – Sistemas mesoporosos utilizados como DDS, com áreas específicas, diâmetros de poro e fármacos. (Wang, 2009)	39
Figura 7 – Exemplo de funcionalização de sílicas mesoporosas com grupos funcionais amina e fosfato. (Lu, 2007).....	42
Figura 8 – Mecanismos de direcionamento de agentes bioativos. (Parveen, 2011).....	44
Figura 9 – Mecanismos de endocitose de agentes bioativos. (Sahay, 2010)	46
Figura 10 – Fluxograma da síntese da SBA-15.....	50
Figura 11 – Fluxograma da síntese da SBA-15/HAP_1.	52
Figura 12 – Fluxograma da síntese da SBA-15/HAP_2.	53
Figura 13 – Esquema da metodologia de marcação das amostras.....	54
Figura 14 – Esquema da avaliação da marcação por cromatografia.	59
Figura 15 – Esquema da avaliação da biodistribuição em ratos.	60
Figura 16 – Perfis termogravimétricos dos materiais não calcinados.....	66
Figura 17 – Difrátogramas de $2\theta = 0 - 10$ dos materiais calcinados.....	70
Figura 18 – Difrátogramas de $2\theta = 10 - 80$ dos materiais calcinados.....	72

Figura 19 – Isotermas de adsorção-desorção de N ₂ dos materiais calcinados.	73
Figura 20 – Distribuição de tamanho de poros por BJH dos materiais calcinados.	76
Figura 21 – Espectros da região do infravermelho e aproximação no numero de onda 966 cm ⁻¹	78
Figura 22 – Micrografias das partículas e agregados da SBA-15 feitas por MEV (a, b, c, d).	81
Figura 23 – EDS da SBA-15.....	81
Figura 24 – Micrografias das partículas e agregados da SBA-15/HAP_1 feitas por MEV (a, b, c, d).....	82
Figura 25 – EDS da SBA-15/HAP_1.	83
Figura 26 – Micrografias das partículas e agregados da SBA-15/HAP_2 feitas por MEV (a, b, c, d).....	84
Figura 27 – EDS da SBA-15/HAP_2.	85
Figura 28 – Micrografias das partículas da SBA-15 feitas por MET (a, b, c, d).	86
Figura 29 – Micrografias das partículas da SBA-15/HAP_1 feitas por MET (a, b, c, d).	87
Figura 30 – Micrografias das partículas da SBA-15/HAP_2 feitas por MET (a, b, c, d, e).	88
Figura 31 – Tamanhos de partículas (nm) dos materiais em suspensão.	90
Figura 32 – Distribuição dos materiais marcados com o 99mTc por porcentagem dose / órgão.	92
Figura 33 – Imagens das biodistribuição obtidas por gama-câmara dos materiais SBA-15 e SBA-15/HAP_1 marcadas com 99mTc após 30 minutos e 1,5 hora após injeção intravenosa.	94
Figura 34 – Micrografias das células: com o aptâmero apenas (a); com o conjugado SBA-15/Anti-MUC1 (b); e com o conjugado SBA-15/Anti-MUC1 em campo brilhante (c).....	95

Lista de tabelas

Tabela 1 – Principais causas de morte no mundo em 2008 (em milhares), segundo a WHO, 2008.	23
Tabela 2 – Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária (INCA, 2011).	24
Tabela 3 – Análise Química dos materiais em porcentagem e razões atômicas Si : Ca : P teórica e experimental e razão atômica Ca : P.	63
Tabela 4 – Faixas de temperatura (°C), perdas de massa (%) associadas e eventos relacionados obtidos pela ATG.	67
Tabela 5 – Propriedades texturais dos materiais calcinados.	75
Tabela 6 – Grupos e respectivos comprimentos de onda atribuídos.	80
Tabela 7 – Eficiência da marcação das amostras.	91
Tabela 8 – Estabilidade da marcação das amostras.	91
Tabela 9 – Porcentagem de inibição do crescimento celular nas três linhagens celulares testadas na concentração de 5 µg / mL na amostra SBA-15/Anti-MUC1.	97