

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

BEATRIZ GIACOMELLI RODRIGUES DA SILVA

**NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA CONTENDO DOXORRUBICINA
PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CÂNCER**

SÃO CARLOS

2025

BEATRIZ GIACOMELLI RODRIGUES DA SILVA

**NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA CONTENDO DOXORRUBICINA
PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CÂNCER**

Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a conclusão do curso de Bacharelado em Química com ênfase em materiais.

Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

SÃO CARLOS

2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, Maria e Mario, pelo apoio e incentivo incondicionais durante não somente aos meus anos de graduação, mas em toda e qualquer decisão que eu tomo. Às minhas tias Marcia, Marilene e Rita, ao tio Bila e meus primos Carol, Pedro, Julia e Lariane por sempre me incentivarem a continuar e ir além.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pela orientação ao longo dos meus anos de iniciação científica no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano).

Aos meus colegas membros ou associados ao GNano, principalmente a Dra. Valéria Maria de Oliveira Cardoso por ter me convidado a conhecer e fazer parte desse grupo de pesquisa e ao Dr. Thales Rafael Machado que mesmo de longe sempre esteve tão presente e disposto a me ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos de vida (Gabriel, Gabriela, Mateus, Luís, Rafael, Thainá e Vinícius), da graduação e os que tive o prazer de fazer durante meus anos em São Carlos (Angélica, Cauê, Diego, Henrique, Isabela, Larissa, Lucas Q., Paulo e Vinícius.), que me acompanharam e me incentivaram durante os últimos 4 anos e meio.

Ao Prof. Dr. Danilo Manzani, a Dra. Raquel Riciati do Couto Vilela, ao Profa. Dra. Laís Canniatti Brazaca e a Dra. Marylyn Setsuko Arai por aceitarem fazer parte da banca examinadora dessa monografia.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) e a Universidade de São Paulo (USP) pela minha formação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas minhas duas bolsas de iniciação científica concedidas (2021/10911-7 e 2023/16759-8).

RESUMO

A efetividade dos tratamentos atuais contra o câncer de pulmão é limitada, dentre outros fatores, pelo direcionamento ineficaz e rápida eliminação de antineoplásicos como a doxorrubicina (DOX). Ademais, a inespecificidade dessas moléculas bioativas resulta em efeitos colaterais sistêmicos devido à toxicidade que apresentam em células normais. Para superar essas adversidades, a utilização de nanopartículas (NPs), como as baseadas em hidroxiapatita (HA), tem emergido como uma opção promissora para a entrega de fármacos de forma mais eficiente. Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de carregamento de moléculas bioativas e fotoluminescência intrínseca, a HA é um biomaterial inorgânico com amplo potencial para ser utilizado no diagnóstico e na terapia de diversos tipos de câncer, bem como em aplicações teragnósticas. O presente trabalho de conclusão de curso visa a síntese e a caracterização de NPs de HA carregadas com DOX para aplicação no tratamento do câncer de pulmão. As propriedades estruturais, morfológicas e fotoluminescentes das NPs obtidas foram analisadas, juntamente com sua estabilidade coloidal e o potencial de superfície. Foram determinadas as eficiências de carregamento e o perfil de liberação do fármaco carregado nas NPs. O trabalho buscou contribuir com o desenvolvimento de novos sistemas nanocarreadores com potenciais aplicações teragnósticas.

ABSTRACT

The effectiveness of current lung cancer treatments is limited by several factors, including ineffective targeting and rapid elimination of antineoplastic agents such as doxorubicin (DOX). Furthermore, the non-specificity of these bioactive molecules leads to systemic side effects due to their toxicity in healthy body cells. To overcome these challenges, the use of nanoparticles (NPs), such as those based on hydroxyapatite (HA), has emerged as a promising option for more efficient drug delivery. Due to its high biocompatibility, biodegradability, ability to carry bioactive molecules, and intrinsic photoluminescence, HA is an inorganic biomaterial with great potential for use in the diagnosis and treatment of various types of cancer, as well as in theranostic applications. This study aims to synthesize and characterize HA NPs loaded with DOX for application in lung cancer treatment. The structural, morphological, and photoluminescent properties of the NPs were investigated. The colloidal stability and surface potential of the NPs were analyzed, and the drug loading efficiency and release profile of the DOX-loaded NPs were determined. This study aims to contribute to the development of new nanocarrier systems with potential theranostic applications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro de emissão de fotoluminescência para a amostra de HA-Cit-DOX excitada em (a) $\lambda_{exc} = 405$ nm e (b) $\lambda_{exc} = 470$ nm, bem como para a amostra de HA-PEI-DOX excitada em (c) $\lambda_{exc} = 405$ nm e (d) $\lambda_{exc} = 470$ nm.....	22
Figura 2. Espectros obtidos por FTIR das amostras de HA pura, funcionalizadas com íons citratos e PEI e carregadas com DOX.....	23
Figura 3. Espectros obtidos por microespectroscopia RAMAN com laser em 785nm e 10% de potência das amostras de HA pura, funcionalizadas com íons citratos e PEI e carregadas com DOX.....	25
Figura 4. Padrões de DRX obtidos para as NPs HA, HA-Cit, HA-Cit-DOX, HA-PEI e HA-PEI-DOX.....	26
Figura 5. Micrografias obtidas por TEM e gráficos de distribuição de tamanho: (a-c) HA-Cit, (d-f) HA-PEI, (g-i) HA-Cit-DOX, e (j-l) HA-PEI-DOX.....	27
Figura 6. Curva de calibração para a quantificação de íons citrato.....	30
Figura 7. a) Espectros de UV-Vis nas diferentes concentrações de fármaco em água e (b) curva obtida por meio deles.....	31
Figura 8. Curvas obtidas nas diferentes concentrações de fármaco em (a) tampão acetato pH 5,5 e (b) PBS 0,1X pH 7,4.....	33
Figura 9. Perfil de liberação cumulativa em PBS pH = 7,4 diluído e tampão acetato pH 5,5 como meios de liberação.....	34
Figura 10. Potencial Zeta de HA-Cit-DOX medidos em diferentes valores de pH.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de tamanho aproximado das NPs de HA funcionalizadas com íons citrato ou PEI e carregadas com DOX..... 28

Tabela 2. Valores de tamanho médio das partículas, PDI e potencial Zeta das NPs de HA pura, funcionalizadas com íons citrato ou PEI e carregadas com DOX..... 29

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

- λ_{exc} – Comprimento de onda de excitação
- ACP – Do inglês “*Amorphous Calcium Phosphate*” - Fosfato de cálcio amorf
- DLS – Do inglês “*Dynamic Light Scattering*” - Espalhamento dinâmico de luz
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DOX – Doxorrubicina
- DRX – Difratometria de Raio-X
- f-HA – Hidroxiapatita fluorescente
- FTIR – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
- HA – Hidroxiapatita
- HA-Cit – Hidroxiapatita funcionalizada com íons citrato
- HA-Cit-DOX – Hidroxiapatita funcionalizada com íons citrato carregada com doxorrubicina
- HA-PEI – Hidroxiapatita funcionalizada com polietilenoimina
- HA-PEI-DOX – Hidroxiapatita funcionalizada com polietilenoimina citrato carregada com doxorrubicina
- ICSD – Do inglês “*Inorganic Crystal Structure Data*” - Base de Dados de Estrutura Cristalina Inorgânica
- LOD – Do inglês “*Limit of Detection*” - Limite de detecção
- LOQ – Do inglês “*Limit of Quantification*” - Limite de quantificação
- NPs – Nanopartículas
- PBS – Tampão fosfato-salino
- PDI – Do inglês “*Polydispersity Index*” - Índice de polidispersividade
- PEI – Polietilenoimina
- pH – Potencial hidrogeniônico
- TEM – Do inglês “*Transmission Electron Microscopy*” - Microscopia eletrônica de transmissão
- ZP – Do inglês “*Zeta Potential*” - Potencial Zeta

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	12
2.	Objetivo Geral	15
2.1	Objetivos Específicos	15
3.	Procedimento Experimental.....	16
<u>3.1.</u>	Síntese das NPs de HA	16
3.2.	Funcionalização das NPs.....	16
3.3.	Carregamento das NPs de HA com DOX.....	17
3.4.	Caracterização das NPs de HA.....	17
3.4.1	<i>Espectroscopia de fotoluminescência.....</i>	17
3.4.2	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	17
3.4.3	<i>Espectroscopia RAMAN</i>	18
3.4.4	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	18
3.4.5	<i>Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)</i>	18
3.4.6	<i>Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta</i>	19
3.4.7	<i>Espectroscopia UV-Vis.....</i>	19
3.4.8	<i>Determinação do perfil de liberação das NPs de HA-Cit-DOX.....</i>	20
3.4.9	<i>Determinação do potencial Zeta em distintos pHs</i>	20
4.	Resultados e discussões	21
4.1	Caracterização das NPs de HA.....	21
4.1.1	<i>Fotoluminescência das NPs de HA contendo carbonato e tratadas termicamente</i>	21
4.1.2	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	22
4.1.3	<i>Espectroscopia RAMAN</i>	24
4.1.4	<i>Difração de Raios-X (DRX).....</i>	25
4.1.5	<i>Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)</i>	26
4.1.6	<i>Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta</i>	28
4.1.7	<i>Espectroscopia UV-Vis.....</i>	30
4.1.8	<i>Determinação do perfil de liberação das NPs de HA-Cit-DOX.....</i>	32
4.1.9	<i>Determinação do potencial Zeta em diferentes pHs</i>	34
5.	Conclusão	35
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. Introdução

O câncer abrange mais de 100 doenças, caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que se espalham pelos tecidos e órgãos do ser humano.¹ Ele é considerado uma das causas mais comuns de mortalidade mesmo com diversas modalidades de diagnóstico e tratamento atualmente disponíveis.²

O câncer de pulmão é um dos mais comuns e uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, incluindo o Brasil.³ Em relação a outros tipos de câncer, ele se enquadra como o segundo mais comum em mulheres e o primeiro em homens.⁴ Este câncer resulta do acúmulo gradual de anormalidades genéticas que transformam o tecido bronquial benigno em um tumor, além disso, sua principal causa conhecida é o tabagismo.⁴ Ademais, devido à falta de diagnóstico precoce, em sua grande maioria, ele é detectado em estágios avançados, dificultando o tratamento,⁵ o qual é fundamentado em cirurgia, radioterapia e quimioterapia.⁶ O tratamento mais comum para o câncer de pulmão, a quimioterapia, é usualmente associada à alta toxicidade e à baixa especificidade, além da resistência das células cancerosas às drogas, diminuindo assim seus resultados.⁵ Dessa forma, a fim de estruturar novos tratamentos anticâncer, é de suma importância considerar tanto medicamentos que combatam as células cancerígenas, quanto avaliar métodos que diminuam os efeitos colaterais deles.¹

A nanotecnologia surge como opção para terapias avançadas do câncer, uma vez que tem desempenhado um papel significativo no desenvolvimento de sistemas de liberação direcionada de fármacos.⁷ Além disso, é conhecido que nanocarreadores com dimensões entre 10 e 200 nm podem se acumular no local do tumor por meio da permeabilidade e retenção aprimorada, do inglês, *retention and permeability effect (EPR)*.⁸ Esse efeito pode ser potencializado através da funcionalização de suas superfícies com grupos direcionadores, permitindo que eles alcancem as células cancerígenas de forma específica, sem afetar as células saudáveis e, consequentemente, minimizar os efeitos colaterais.⁹

Perante o exposto, nanocarreadores biodegradáveis, como os baseados em nanopartículas (NPs) poliméricas, lipossomais, de organossilica e de hidroxiapatita (HA), são estudados para a entrega de moléculas antineoplásicas. Desse modo, as NPs de HA

recebem ainda mais visibilidade, já que elas apresentam altas biocompatibilidade e biofuncionalidade, as quais são definidas, respectivamente, pela aceitação do biomaterial pelo corpo e pela sua habilidade em desempenhar a função desejada.^{10,11}

A HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, é um biomaterial cerâmico amplamente utilizado na nanomedicina devido à sua semelhança estrutural com a matriz óssea.¹² Além disso, ela tem sido explorada como uma alternativa para a entrega de fármacos devido à sua elevada eficiência de carregamento dessas moléculas, e também por apresentar propriedade pH-responsiva, sendo degradada em íons cálcio e fosfato em condições ácidas fracas. Essa propriedade promove o escape das NPs carregadas com fármacos das vesículas endolisossômicas após serem internalizadas via rotas endocíticas, melhorando, assim, as suas biodisponibilidades nas células-alvo.¹³ Neste contexto, é indesejável que os bioagentes terapêuticos sejam aprisionados e degradados pelos lisossomos quando sua ação terapêutica ocorre em outras organelas celulares. Portanto, o escape pelas NPs de HA torna-se uma importante ferramenta para permitir o tráfego de drogas para fora desses compartimentos.¹³

Por outro lado, estudos apontam que as NPs de HA apresentam fotoluminescência intrínseca, não necessitando de dopantes baseados em íons lantanídeos ou de fluoróforos orgânicos conjugados para apresentarem emissões radiativas na região visível.¹⁴ Sendo assim, elas podem ser utilizadas em bioimagem, monitorando do sistema nanocarreador e liberação controlada de fármacos em aplicações teragnósticas do câncer.¹⁵ Para otimizar esse fenômeno, é possível adicionar impurezas, como grupos carbonatos (CO_3^{2-}), à estrutura cristalina das NPs. Isso gera estados localizados de energia entre as bandas de valência e de condução da estrutura eletrônica do material, com energia de bandgap $\sim 5,6$ eV.¹⁴ Tal otimização, associada a posteriores tratamentos térmicos em temperaturas intermediárias (350-450°C), é crucial para permitir que altas densidades de recombinações radiativas de pares elétron-buraco ($e^- - h^+$) ocorram ao excitar as amostras em comprimentos de onda na região do visível ($\lambda_{exc} = 405-640$ nm), conforme apontam estudos conduzidos pelo nosso grupo¹⁶ e por outros centros de pesquisa.¹⁷ A HA com elevada fotoluminescência intrínseca pode ser utilizada para carrear fármacos antineoplásicos, levando a uma liberação gradual e direcionada dos medicamentos no local da lesão tumoral, além de permitir o monitoramento de tal liberação via fotoluminescência. Os fármacos podem ser adicionados ao nanocarreador de HA em uma etapa posterior à síntese das NPs, via adsorção, ou durante a etapa de síntese, permitindo,

assim, envelopar elevadas quantidades de diversas moléculas hidrofóbicas e hidrofilicas.¹⁸

A DOX é um fármaco utilizado no tratamento do câncer de pulmão.¹⁹ Sendo altamente eficaz, mas apresenta efeitos colaterais significativos -como mielossupressão, carditoxicidade, constipação, neuropatia, hepatotoxicidade, anemia, diarreia, náusea, dentre outros-, causados principalmente pela incapacidade em distinguir entre células cancerígenas e células normais.²⁰

Este quimioterápico supracitado pertence à classe dos antibióticos antraciclínicos e atua através da intercalação com o DNA das células cancerígenas, causando a quebra de sua fita, o que leva à apoptose das células durante o processo de replicação, contribuindo para a inibição da proliferação tumoral.²⁰ Segundo estudos de Dong *et al.*,²¹ a HA apresentou 72% de eficiência de carregamento e 16% de teor de carregamento (0,16 mg de DOX por miligrama de HA), o que muda a coloração da NPs de branco para vermelho. Além disso, em dados obtidos por TEM, notou-se que a forma de bastonetes da HA foi mantida quando o fármaco foi adsorvido, possuindo um comprimento médio de ~50 nm e largura de ~30 nm. Em outros estudos realizados por Aval *et al.*,^{22,23} a HA mesoporosa atua como um excelente carreador para moléculas de DOX, apresentando eficiência de carregamento de aproximadamente 93%. Além disso, em estudos realizados por Sunita *et al.*,²⁴ foi demonstrado que as NPs sintetizadas apresentaram alta capacidade de absorção de drogas e exibiram intensa fotoluminescência mesmo após o carregamento com DOX, ademais, as HA apresentaram eficiência de carregamento de 60% e 90% do fármaco em questão para as NPs não dopada e dopada com neodímio, respectivamente.

A literatura traz estudos sobre o uso de NPs de HA dopadas com íons lantanídeos com propriedades fotoluminescentes, carregadas com fármacos, buscando o desenvolvimento de sistemas teragnósticos. Neste cenário, Gu *et al.*²⁵ fizeram uso de DOX encapsulada em HA dopada com íon térbio para terapia quimioterápica guiada por imagem. Além disso, Sengar *et al.*²⁶ estudaram DOX encapsulada em HA dopada com gadolínio e obtiveram resultados satisfatórios na entrega e no monitoramento da liberação do fármaco. Ademais, Kim *et al.*²⁷ conduziram estudos sobre a liberação de DOX em diferentes condições de pH utilizando as HA dopadas com zinco, observando que houve liberação máxima do fármaco em pH 4,5 com cerca de 66% da carga do fármaco sendo liberada, enquanto em pH 7,2 apenas 14% foi liberado, esses resultados evidenciam que condições ácidas são favoráveis para a administração de medicamentos específicos para o câncer, uma vez que as células cancerígenas apresentam um ambiente

ácido. Além disso, *Li et al.*²⁸ sintetizaram nanobastões de hidroxiapatita com estrôncio revestidos com aptâmeros dopados com gadolínio e incorporaram DOX com a eficiência de carregamento de até 52,8% em peso e obtiveram, com sucesso NPs de HA com fluorescência autoativada via radicais CO_2^- e propriedades paramagnéticas. Entretanto, *Jiang et al.*²⁹ apresentaram evidências experimentais que contradiziam a presença de radicais CO_2^- na f-HA e propuseram que os efeitos ópticos observados são, na verdade, devido a pontos de carbono amorfos e nanométricos ricos em N presos na estrutura da f-HA ou em posições intersticiais, atuando assim como centros luminescentes. Dessa forma, não há relatos sobre o uso de nanocarreadores de HA com fotoluminescência intrínseca utilizando carbonato como impureza para moléculas de DOX, evidenciando a necessidade de estudos envolvendo NPs de HA apresentando fotoluminescência intrínseca otimizada como nanocarreadores de fármacos quimioterápicos.

Diante do exposto, o presente trabalho de conclusão de curso visa realizar a síntese e a caracterização de NPs fotoluminescentes de HA carregadas com DOX para aplicações no diagnóstico e no tratamento do câncer de pulmão.

2. Objetivo Geral

Síntese e caracterização de NPs de HA carregadas com DOX para sua aplicação no tratamento de câncer de pulmão e análise da luminescência intrínseca dos nanocarreadores desenvolvidos.

2.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar NPs de HA carregadas com DOX via precipitação química seguida ou não de tratamento térmico;
- Caracterizar as propriedades estruturais, morfológicas, compositionais, optoeletrônicas das NPs;
- Estimar a eficiência de carregamento do fármaco e caracterizar seu perfil de liberação;
- Analisar a luminescência intrínseca das NPs depois do carregamento.

3. Procedimento Experimental

3.1. Síntese das NPs de HA

As NPs de HA foram sintetizadas pela metodologia de precipitação química desenvolvida em estudos prévios.³⁰ Utilizaram-se como fontes precursoras de íons Ca²⁺ e fosfato, respectivamente, soluções aquosas de Ca(NO₃)₂.4H₂O (solução 1, 50 mL, 10 mmol, Sigma-Aldrich) e (NH₄)₂HPO₄ (solução 2, 100 mL, 6 mmol, Sigma-Aldrich) com valores de pH próximos de 10,0 ajustados pela adição de NH₄OH. Em seguida, a solução 2 foi vertida rapidamente na solução 1 e a mistura resultante ficou sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas para permitir a completa cristalização da fase hexagonal da HA. Ressalta-se que a síntese foi realizada com e sem a adição de 24 mmol do sal solúvel (NH₄)₂CO₃ na solução 2 com o objetivo de otimizar a propriedade luminescente das NPs. A fim de se remover espécies residuais provenientes dos reagentes de partida, as suspensões de NPs foram lavadas 6 vezes com H₂O e 1 vez com etanol por centrifugação a 8000 rpm por 3 min sendo, posteriormente, secadas em estufa a 80°C/12 h e moídas em almofariz de ágata. Posteriormente, a amostra para obtenção de luminescência otimizada foi submetida a um tratamento térmico a 400°C/4 h em um forno convencional e em condições de atmosfera ambiente.¹⁴

3.2. Funcionalização das NPs

As NPs foram funcionalizadas com íons citrato (HA-Cit) ou PEI (HA-PEI) com o objetivo de estabilizar as NPs em forma de suspensões através de metodologias previamente estabelecidas pelo grupo, além de verificar a influência das moléculas na superfície na eficiência de carregamento do fármaco. No caso da funcionalização com íons citrato, preparou-se uma suspensão aquosa das NPs ao dispersá-las a 0,5 mg.mL⁻¹ em citrato trissódico (Sigma-Aldrich) em concentração igual a 24 mM e pH = 7,4. O processo de dispersão consistiu em deixá-las em banho de ultrassom por 10 min com potência igual a 100% e temperatura inferior a 10 °C. Em seguida, as NPs foram submetidas a agitação constante por 3 h em banho de gelo. Por fim, as suspensões foram centrifugadas a 12.000 rpm/10 min a 4°C Os pellets de NPs foram estocados para posterior caracterização e carregamento com DOX e o sobrenadante utilizado para a quantificação de íons citratos adsorvidos.

Realizou-se também a funcionalização das NPs com PEI fazendo uso de uma solução aquosa de PEI 2 kDa (Sigma-Aldrich, 1% v/v). Inicialmente, preparou-se uma suspensão a 1 mg.mL^{-1} de HA em H_2O , a qual foi disposta em um sonicador (30s, amplitude 15%, 3s on e 2s off). Em seguida, a suspensão foi transferida para um bêquer com agitador magnético e adicionou-se a solução de PEI 1% gota a gota a cada 5s (a cada mL de suspensão, adicionou-se 100 uL de PEI) e deixou-se em agitação por 24 h. Após este período, centrifugou-se três vezes em H_2O (12.000 rpm a 25°C por 20 min). O pellet de NPs foi então estocado para posterior caracterização e carregamento com o fármaco de interesse.

3.3 Carregamento das NPs de HA com DOX

Os pellets de NPs de HA-Cit e HA-PEI foram carregados com DOX ao ressuspenderem em banho de ultrassom por 2 min a 1 mg.mL^{-1} em uma solução de DOX a $400\text{-}470 \text{ ug.mL}^{-1}$. Em seguida, fracionou-se as suspensões em volumes iguais a 500 uL em eppendorfs de 2 mL, deixando-os sob agitação a 1000 rpm por 24 h em um termoshaker a temperatura ambiente. Posteriormente, os materiais carregados foram lavados duas vezes com H_2O por centrifugação (12.000 rpm, 10 min, 20°C) para remover o excesso do fármaco não carregado. Como grupo controle, o mesmo procedimento foi utilizado para carregar o fármaco nas NPs de HA não funcionalizadas. Os pellets de HA-DOX, HA-Cit-DOX e HA-PEI-DOX foram estocados para posterior caracterização.

3.4 Caracterização das NPs de HA

3.4.1 Espectroscopia de fotoluminescência

As amostras de HA-Cit-DOX e HA-PEI-DOX com luminescência intrínseca otimizada foram analisadas por espectroscopia de fotoluminescência em um espectrofluorímetro Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon) equipado com lâmpada de xenônio (450W). Foram coletados os espectros de emissão das NPs carregadas com DOX suspensas em H_2O a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ao excitá-las nos comprimentos de onda de 405 e 470 nm.

3.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia FTIR foi realizada para determinar os modos vibracionais das NPs de HA sem tratamento térmico e sem adição de carbonato, bem como confirmar a

funcionalização com íons citrato ou PEI e o carregamento do fármaco através de seus modos vibracionais específicos. Para tal caracterização, as amostras foram previamente secas em estufa a 60 °C. As medidas foram realizadas pelo método de pastilha de KBr em um espectrômetro Nicolet iS50 (Thermo Scientific), operando em modo transmitância e convertido automaticamente em absorbância usando a equação $A = -\log(T)$, onde A é a absorbância e T é a transmitância. A leitura foi realizada no intervalo de 4000 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 32 acumulações. Os espectros foram corrigidos na linha de base e normalizados usando o software OMNIC 9.

3.4.3 Microespectroscopia Raman

Os espectros de microespectroscopia Raman foram coletados em um microscópio Raman confocal modelo InViaTM (Renishaw) equipado com um laser em 785 nm. Os espectros foram obtidos no intervalo de 380 a 1135 cm⁻¹ através de parâmetros otimizados, incluindo a objetiva de 20x, potência do laser de 10%, tempo de aquisição de 10 s e 30 acumulações. As amostras foram previamente preparadas e secas em estufa a 60°C.

3.4.4 Difração de Raios X (DRX)

A difração de Raios X (DRX) tem como objetivo analisar as fases cristalinas presentes nas amostras de HA. As medidas foram obtidas com um difratômetro modelo Ultima IV (Rigaku, Japão), utilizando radiação Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). A taxa de varredura empregada foi de 0,02°/s para um intervalo em 2 θ de 20° a 80°, com velocidade de 5 min e tensão de 40kv e 20mA.

3.4.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As NPs de HA-Cit, HA-PEI, HA-Cit-DOX e HA-PEI-DOX foram analisadas por TEM em um microscópio FEI TECNAI G2F20 (Holanda) operando a 200 kV. As amostras foram ressuspensas a 100 ug.mL⁻¹ em H₂O utilizando banho de ultrassom por 2 min. Seguidamente, 4 uL das amostras foram depositadas nas grids de TEM compostas por Cu/filme de carbono. Utilizando o software ImageJ, foi possível determinar a distribuição de tamanho das amostras e plotar gráficos de distribuição.

3.4.6 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta

As NPs de HA, HA-Cit, HA-PEI, HA-Cit-DOX e HA-PEI-DOX foram avaliadas pela técnica de DLS e potencial Zeta com o objetivo de avaliar a distribuição de tamanho e índice de polidispersividade das NPs, bem como obter valores de potencial de superfície. Com isso, foi possível avaliar a estabilidade coloidal das NPs em meios aquosos, as mudanças de carga oriundas da adequada funcionalização com citrato ou PEI, bem como do carregamento com DOX. As medidas foram realizadas em um espectrômetro Nano-ZS (Malvern Instruments) em suspensões das NPs em H₂O a 100 ug.mL⁻¹ para as medidas de DLS e a 1 mg.mL⁻¹ para as medidas de potencial Zeta. Os pellets obtidos após as funcionalizações e carregamento foram ressuspensos em banho de ultrassom por 2 min.

3.4.7 Espectroscopia UV-Vis

A quantidade de citrato adsorvido foi determinada usando espectroscopia UV-Vis, seguindo o procedimento analítico descrito por Krukowski *et al.*³¹ A curva de calibração foi plotada misturando 2 mL de solução de Na₃Cit, com concentrações variando de 0,25 a 5 mM, com 2 mL de solução de HCl 0,25 M, e registrando os espectros de absorção. O pico de absorção a 210 nm, correspondente aos grupos carboxila do citrato, foi utilizado para construir a curva de calibração. As medições foram realizadas em duplicata para cada concentração.³²

Para determinar indiretamente a quantidade de citrato adsorvido nas HA NPs, a concentração de íons citratos livres nos sobrenadantes após a funcionalização foi medida em triplicata. A quantidade de citrato adsorvido foi então calculada subtraindo-se essa concentração da quantidade inicial de citrato. Para esta análise, as amostras foram diluídas quatro vezes e misturadas com 2 mL de HCl 0,25 M. As medidas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Hitachi U2008.

As amostras carregadas com DOX foram analisadas por espectroscopia UV-Vis. Neste caso, utilizou-se esta técnica para estimar a quantidade de fármaco carregado através da *Lei de Lambert-Beer*. Para isso, foram obtidas curvas de calibração do fármaco livre em H₂O ao monitorar suas bandas de absorção características em 480 nm. A porcentagem de fármaco carregado foi calculada de maneira indireta por espectroscopia UV-Vis de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de fármaco carregado} = [(A-B)/A]*100$$

Onde A e B representam as concentrações inicial e final no sobrenadante da primeira centrifugação da etapa de carregamento.

Utilizou-se esta técnica também para estimar a quantidade de fármaco liberado através da Lei de Lambert-Beer. Para isso, foram obtidas curvas de calibração dos fármacos livres em PBS 10 vezes diluído (PBS 0,1x) e em tampão acetato pH 5,5 ao monitorar suas bandas de absorção características em 480 nm.

3.4.8 Determinação do perfil de liberação das NPs de HA-Cit-DOX

A liberação da DOX foi testada em PBS pH 7,4 e tampão acetato pH 5,5 como meios de liberação com o objetivo de simular os meios encontrados na corrente sanguínea e nos endossomos das células tumorais, respectivamente. De modo geral, 5 mg de HA-Cit carregadas com DOX utilizando a metodologia descrita foram ressuspensos em 5 mL de PBS pH 7,4 e em 5 mL de tampão acetato pH 5,5 em bêqueres de 10 mL e colocados em agitação constante a 37 °C. Fez-se também uma suspensão controle (branco), contendo 5 mg das NPs de HA-Cit ressuspensas nos meios testados. Em seguida, retirou-se 500 uL das soluções em intervalos de tempo pré-determinados (0,5, 1, 4, 12, 24, 72 e 144 h) e essas alíquotas foram substituídas por um mesmo volume de meio fresco.

As alíquotas foram centrifugadas (8.000 rpm, 10 min, 20° C) tendo seus sobrenadantes analisados por espectroscopia na região UV-Vis e as concentrações de fármacos liberados foram determinadas utilizando as curvas de calibrações dos fármacos livres obtidas em PBS pH 7,4 e em tampão acetato pH 5,5.

3.4.9 Determinação do potencial Zeta em distintos pHs

A amostra de HA-Cit-DOX foi avaliada por potencial Zeta em diferentes pHs com o objetivo de analisar as mudanças de carga oriundas da alteração do pH do meio. Tal análise foi realizada variando o pH entre 10-3 adicionando solução de HCl 0,05 mol.L⁻¹ e NaOH 0,05 mol.L⁻¹. As medidas foram realizadas em um espetrômetro Nano-ZS (Malvern Instruments) em suspensões das NPs em H₂O a 100 ug.mL⁻¹.

4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização das NPs de HA

4.1.1 Fotoluminescência das NPs de HA contendo carbonato e tratadas termicamente

As amostras de NPs de HA-Cit-DOX e HA-PEI-DOX previamente sintetizadas com carbonato e submetidas a tratamento térmico a 400 °C/4 h foram caracterizadas em relação às suas propriedades fotoluminescentes. Essas amostras foram excitadas utilizando comprimentos de onda de 405 e 470 nm. Foram escolhidos esses λ_{exc} devido à eficácia de excitação das NPs de HA em 405 nm e ao pico máximo de excitação da DOX em 470 nm.^{14,33} A Figura 1(a,d) ilustra os espectros de emissão obtidos. Ao analisar os espectros obtidos no $\lambda_{exc} = 405$ nm, nota-se uma banda muito pequena próxima de 471 nm, a qual está relacionada a NPs.¹⁴ Os espectros apresentam três bandas em torno de 560, 594 e 638 nm associados ao fármaco.³⁴ Dessa forma, nota-se que mesmo em $\lambda_{exc} = 405$ nm, os perfis de emissão são similares aos obtidos quando $\lambda_{exc} = 470$ nm e, assim, é possível concluir que a luminescência do fármaco é superior a intrínseca das HA, inviabilizando o seu uso como agente de imageamento. Consequentemente, os testes subsequentes foram realizados utilizando as NPs sem tratamento térmico e sem a adição de carbonato e a função de diagnóstico será utilizada em função da fotoluminescência do fármaco.

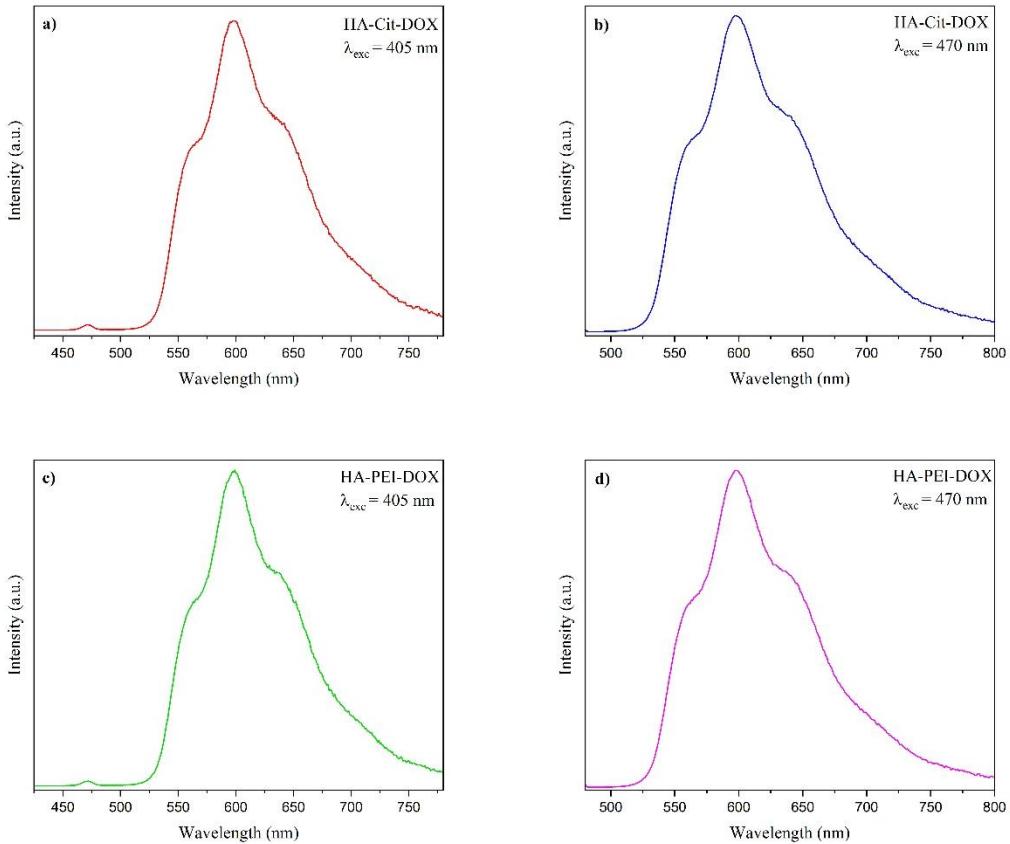


Figura 1. Espectro de emissão de fotoluminescência para a amostra de HA-Cit-DOX excitada em (a) $\lambda_{exc} = 405$ nm e (b) $\lambda_{exc} = 470$ nm, bem como para a amostra de HA-PEI-DOX excitada em (c) $\lambda_{exc} = 405$ nm e (d) $\lambda_{exc} = 470$ nm.

4.1.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 2 ilustra os espectros de FTIR obtidos para as amostras de HA pura, funcionalizadas com citrato e PEI, bem como às correspondentes carregadas com DOX. Observa-se que as bandas das NPs puras são características dos modos vibracionais de amostras de HA, destacando-se as bandas do grupo fosfato em 602 e 566 cm^{-1} (v_4), 964 cm^{-1} (v_1), 1093 e 1040 cm^{-1} (v_3), além das bandas referentes ao grupo carbonato em 1454 e 1420 cm^{-1} e em 633 e 3570 cm^{-1} derivadas dos modos de libração (v_L) e estiramento (vs) dos grupos OH, respectivamente.¹⁶ Por fim, observa-se nos espectros as bandas entre 3700 - 3000 cm^{-1} e em 1640 cm^{-1} associados à presença de H_2O absorvida e estrutural.¹⁶

A presença de carbonato nas NPs de HA é praticamente inevitável devido à estrutura do material, que permite a substituição dos grupos fosfato e hidroxila por íons carbonato, e à constante exposição ao CO_2 do ambiente. Essa substituição é energeticamente favorável e ocorre espontaneamente durante a síntese ou manipulação,

tornando inviável a produção de HA totalmente livre de carbonato em condições laboratoriais convencionais.¹⁶

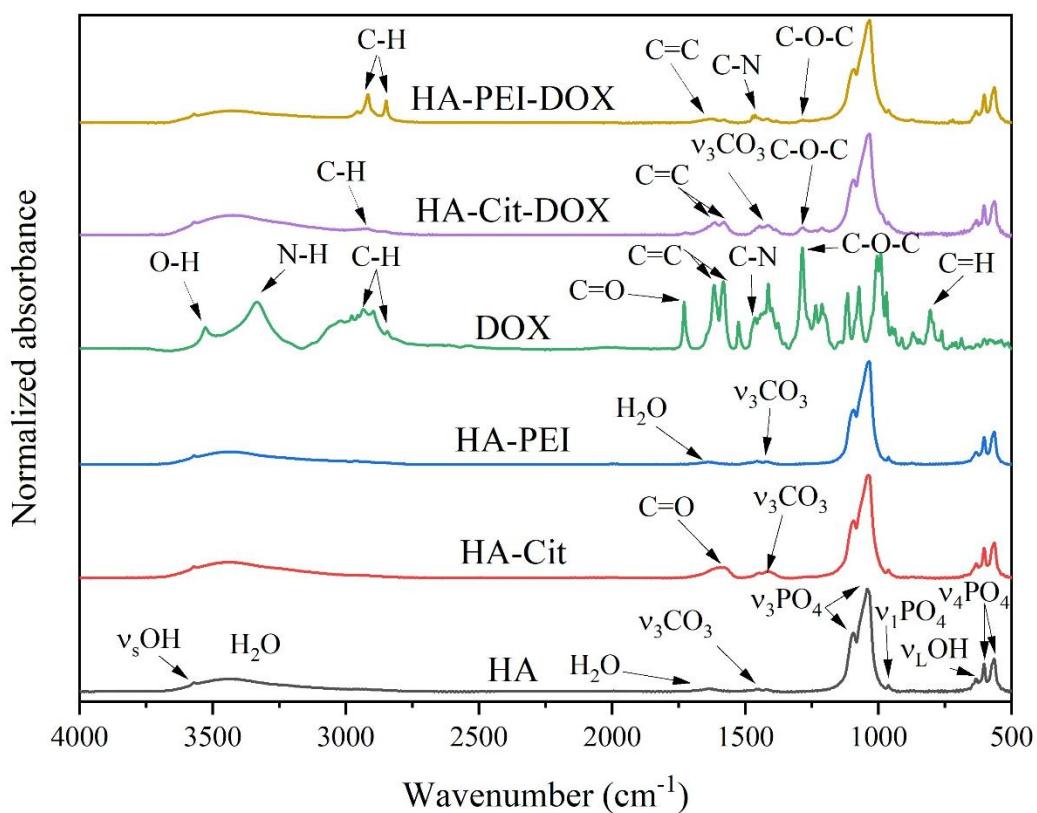


Figura 2. Espectros obtidos por FTIR das amostras de HA pura, funcionalizadas com íons citratos e PEI e carregadas com DOX.

A análise do espectro de FTIR das HA-Cit revelou a presença de bandas semelhantes às encontrados na HA pura. Observou-se também uma banda em 1588 cm⁻¹ atribuída ao estiramento assimétrico do C=O do grupo COOH presente nos íons citrato, demonstrando a eficácia da funcionalização. Essa banda indica a coordenação dos íons citrato à superfície das NPs por meio de interações com os íons Ca²⁺, presentes na estrutura da HA. Essa coordenação é favorecida pela natureza de ácido duro do Ca²⁺, que interage com o citrato, uma base dura, altamente carregada, pequena e com baixa polarizabilidade.³⁵ Ao analisar o espectro da HA-PEI, foram identificadas bandas referentes as HA, mas não foram identificadas outras bandas características, como às relacionadas ao estiramento das ligações N-H em torno de 3400 cm⁻¹.³⁶ Essa ausência pode ser justificada pela presença da banda larga de água nesta região.³⁷ Além disso, as aminas costumam exibir bandas em torno de 1600 cm⁻¹, associadas à deformação angular

das ligações N–H, que também não foram identificadas no espectro, tal ausência pode ser atribuída à baixa concentração de PEI adsorvida na superfície do material.

Após o carregamento das NPs com o fármaco, foram identificadas na amostra HA-Cit-DOX bandas em 2917 e 2848 cm⁻¹ que correspondem ao estiramento das ligações C–H dos grupos CH₂ e CH₃ na molécula de DOX. Além disso, foram observadas bandas em 1615 e 1582 cm⁻¹, associadas ao estiramento C=C dos anéis aromáticos do fármaco, e uma banda em 1284 cm⁻¹, relacionada ao estiramento da ligação C-O-C. Ao carregar as nanopartículas de HA-PEI com DOX, as bandas em 2917 e 2848 cm⁻¹ também foram observadas, indicando o estiramento das ligações C-H presentes tanto no fármaco quanto no polímero. Adicionalmente, foram identificadas bandas em 1622 e 1579 cm⁻¹, correspondentes ao estiramento C=C dos anéis aromáticos da DOX, e uma banda em 1290 cm⁻¹, associada ao estiramento da ligação C-O-C. Observou-se ainda uma banda adicional em aproximadamente 1470 cm⁻¹, atribuída à vibração da ligação C-N do PEI. Essas características espectroscópicas confirmam que tanto as nanopartículas de HA-Cit quanto as de HA-PEI foram carregadas com sucesso com DOX.^{36,38-40}

4.1.3 Microespectroscopia Raman

A Figura 3 ilustra os espectros derivados da microespectroscopia Raman para as NPs em sua forma pura, funcionalizadas e após o carregamento com DOX. Essa técnica é importante, uma vez que complementa as informações obtidas por meio do FTIR, sendo que há bandas ativas em uma técnica que não são observadas na outra. Ao analisar o espectro da amostra pura, notam-se picos característicos da fase hexagonal da HA: em 430-500 cm⁻¹ associadas aos modos vibracionais v₂PO₄, picos em 550-650 cm⁻¹ associados aos modos vibracionais v₄PO₄, um pico intenso em 960 cm⁻¹ referente ao modo v₁PO₄ e, por fim, picos em 1036-1080 cm⁻¹ do modo v₃PO₄.³⁰ Especificamente, o pico localizado em 960 cm⁻¹ é um forte indicativo da formação da HA, já que outros compostos de fosfato de cálcio exibem este modo vibracional em outras regiões espetrais.⁴¹ Os espectros das amostras HA-Cit e HA-PEI apresentam picos similares aos encontrados na amostra de HA pura.

Além disso, observa-se a presença de um pico em 1098 cm⁻¹, relacionada à vibração da ligação N-H do grupo amina do fármaco na amostra HA-PEI-DOX, a qual não aparece na outra amostra carregada e nem na do fármaco. Isso se deve à presença do PEI, que possui alta concentração de grupos amina responsáveis por essa vibração. Nas amostras HA-Cit-DOX e DOX, essa banda não é detectada devido à menor quantidade

de aminas ou à baixa intensidade do sinal. Além disso, interações entre PEI e DOX podem intensificar a vibração N–H, tornando-a mais evidente.

Por fim, observam-se picos em ~441, 462, 506, 993, 1080 cm⁻¹, associados às vibrações das ligações C-C-O, estiramento simétrico C-O, C-OH, C-C de anel e C-O, respectivamente do fármaco.⁴²⁻⁴⁶ Nota-se, ainda, que a intensidade relativa dos picos relacionadas ao fármaco entre 400-500 cm⁻¹ e do modo $\nu_1\text{PO}_4$ da HA é superior na amostra HA-Cit-DOX em relação a amostra HA-PEI-DOX, fato que possivelmente está relacionado a maior capacidade de carregamento das NPs de HA-Cit.

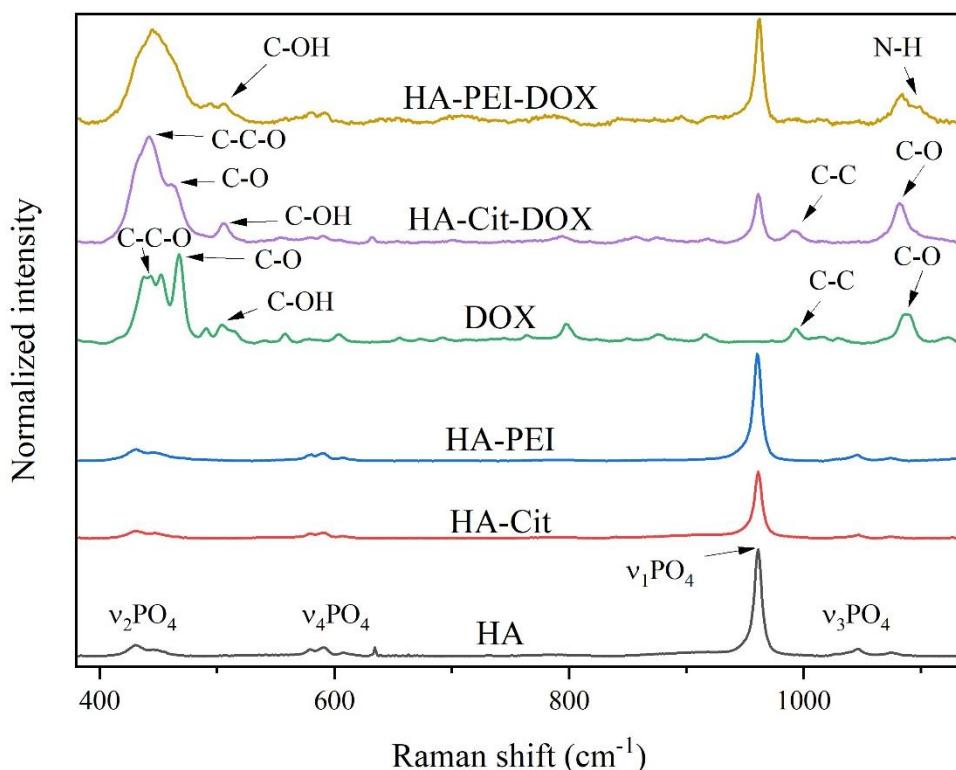


Figura 3. Espectros obtidos por microespectroscopia Raman com laser em 785nm e 10% de potência das amostras de HA pura, funcionalizadas com íons citratos e PEI e carregadas com DOX.

4.1.4 Difração de Raios-X (DRX)

A identificação das fases cristalinas das amostras de NPs de HA, HA-Cit, Ha-Cit-DOX, HA-PEI e HA-PEI-DOX foi realizada por meio de DRX, conforme ilustra a Figura 4. Os picos observados em todas as amostras estão associados à fase hexagonal HA (grupo espacial $P6_3/m$) de baixa cristalinidade, consistente com os dados reportados na base Inorganic Crystal Structure Data (ICSD) nº 26204.^{47,48} Não foram identificadas mudanças

significativas entre as amostras, indicando que a estrutura cristalina do material foi preservada após as modificações realizadas.

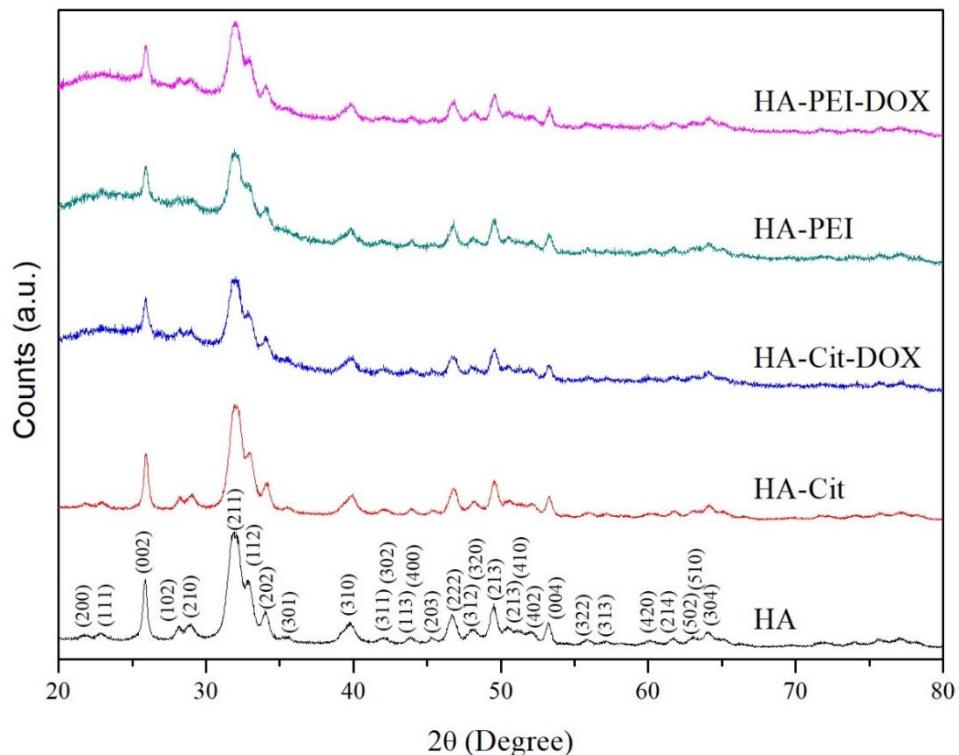


Figura 4. Padrões de DRX obtidos para as NPs HA, HA-Cit, HA-Cit-DOX, HA-PEI e HA-PEI-DOX.

4.1.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A forma e tamanho das larguras e comprimentos das NPs funcionalizadas e carregadas foram avaliadas por TEM. A Figura 5(a-1) ilustra as micrografias obtidas e as curvas de distribuição de tamanho.

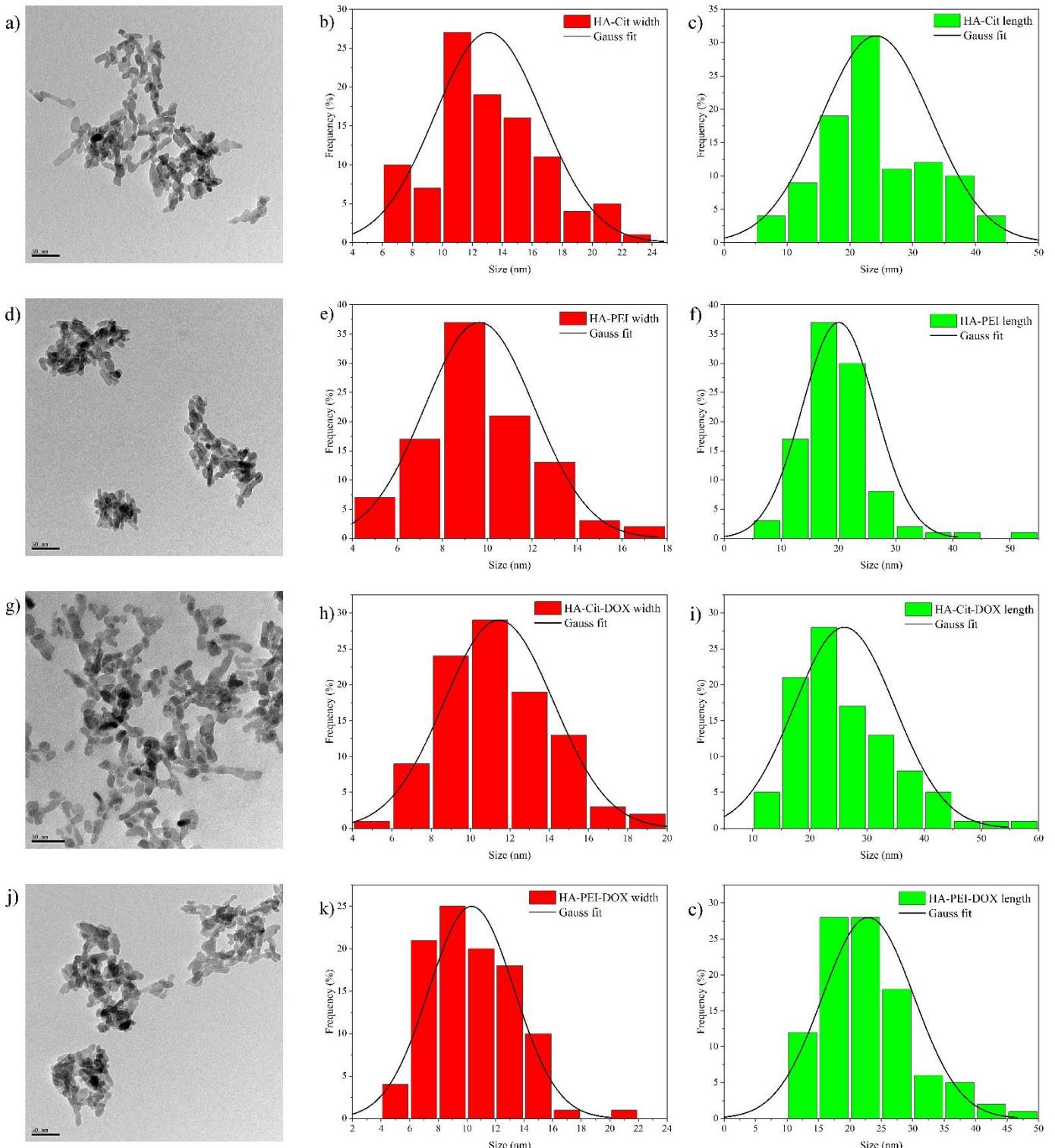


Figura 5. Micrografias obtidas por TEM e gráficos de distribuição de tamanho: (a-c) HA-Cit, (d-f) HA-PEI, (g-i) HA-Cit-DOX, e (j-l) HA-PEI-DOX.

Observa-se que todas as amostras analisadas exibiram uma morfologia característica de nanobastões com valores de comprimentos ao redor de 20 nm e de largura ao redor de 10 nm, conforme resumido na Tabela 1. Nota-se que as amostras apresentam razão de aspecto, definida como a relação entre o comprimento e a largura de

um objeto, próxima de 2. Tal resultado atesta que o comprimento da partícula é o dobro da sua largura, sendo consistente com a definição de um nanobastão, que tem uma forma alongada. Nota-se também que as amostras apresentam uma menor tendência de aglomeração na amostra HA-Cit e HA-Cit-DOX em comparação com as correspondentes contendo PEI. Estas observações podem ser melhor evidenciadas através do estudo pela técnica de DLS descrito a seguir.

Tabela 1. Valores de tamanho aproximado das NPs de HA funcionalizadas com íons citrato ou PEI e carregadas com DOX.

Amostra	Comprimento médio das	Largura média das	Razão de aspecto
	partículas (nm)	partículas (nm)	
HA-Cit	$23,5 \pm 8,72$	$12,7 \pm 3,59$	1,8
HA-PEI	$19,3 \pm 6,41$	$9,42 \pm 2,44$	2,0
HA-Cit-DOX	$23,8 \pm 8,81$	$11,2 \pm 2,79$	2,1
HA-PEI-DOX	$21,9 \pm 7,28$	$7,96 \pm 2,99$	2,7

4.1.6 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta

A Tabela 2 resume os dados de tamanho médio das partículas. Observa-se um valor de tamanho médio de partículas significativamente elevado ($594,5 \pm 63,3$ nm) para a amostra de HA pura devido à aglomeração intensa, enquanto a amostra de HA-Cit, que apresenta íons citrato de baixo peso molecular na superfície, registrou o menor valor ($62,4 \pm 11,46$ nm), confirmando a melhora na dispersão das NPs com esta funcionalização. Ademais, estes valores encontram-se mais próximos aos observados via TEM para as NPs individuais. Posteriormente, houve um ligeiro aumento em 30 nm após o carregamento com o fármaco ($89,41 \pm 4,569$ nm) na amostra HA-Cit-DOX.

Por outro lado, a amostra HA-PEI ($146,93 \pm 7,376$ nm) apresentou um valor de tamanho superior em comparação a amostra HA-Cit provavelmente devido a presença de um recobrimento polimérico mais espesso. Tal fato pode estar relacionado ao maior peso molecular (2 kDa) do PEI em comparação ao do íon citrato. Ademais, a análise via TEM revelou que as NPs de HA-PEI estão dispersas na forma de pequenos clusters possivelmente unidos pelo recobrimento com PEI e com tamanhos próximos ao observado no DLS. O menor valor encontrado para a amostra HA-PEI em comparação a HA pura também evidencia o sucesso na funcionalização com o polímero e a estabilização

das NPs em suspensão. Após o carregamento com o fármaco, o valor de tamanho de partículas ($195,6 \pm 10,04$ nm) sofreu um incremento de ~40 nm.

A Tabela 2 apresenta os valores de PDI das amostras, nota-se que todas exibem valores elevados, distantes de zero, o que indica uma distribuição de tamanhos polidispersa ou presença de agregados.⁴⁹ Embora o PDI seja comumente utilizado para avaliar a homogeneidade do tamanho das nanopartículas, é importante ressaltar que se trata de uma medida estatística baseada na suposição de que as partículas são esféricas. No caso das NPs de HA com morfologia de nanobastão, os valores de PDI observados refletem principalmente o grau de agregação das nanopartículas. Destaca-se ainda a redução do PDI e de seu desvio padrão após a funcionalização e o carregamento, em comparação com a amostra de HA pura, sugerindo uma diminuição na agregação e, consequentemente, na polidispersividade das amostras.

Tabela 2. Valores de tamanho médio das partículas, PDI e potencial Zeta das NPs de HA pura, funcionalizadas com íons citrato ou PEI e carregadas com DOX.

Amostra	Tamanho médio das partículas (d.nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
HA	$594,5 \pm 63,3$	$0,8 \pm 0,2$	$+2,5 \pm 0,1$
HA-Cit	$62,4 \pm 11,46$	$0,5 \pm 0,06$	$-23,9 \pm 0,2$
HA-PEI	$146,93 \pm 7,376$	$0,5 \pm 0,03$	$+28,1 \pm 0,6$
HA-Cit-DOX	$89,41 \pm 4,569$	$0,5 \pm 0,1$	$+21,4 \pm 1,0$
HA-PEI-DOX	$195,6 \pm 10,04$	$0,4 \pm 0,01$	$+23,5 \pm 0,5$

Na aplicação de entrega de medicamentos, é importante caracterizar a carga superficial dos nanomateriais que serão empregados como transportadores de fármacos, pois essa propriedade influencia diretamente as interações com o ambiente biológico. Além disso, o potencial Zeta fornece informações acerca da presença das moléculas e íons de interesse na superfície. Observou-se que o potencial Zeta das NPs de HA pura encontra-se na faixa de $+2,5 \pm 0,1$ mV. O valor de potencial Zeta das NPs de HA funcionalizadas com íons citrato (HA-Cit) foi determinado como sendo $-23,9 \pm 0,2$ mV. A carga observada sugere a adsorção de íons citrato na superfície da HA através da interação dos grupos carboxílicos desprotonados do íon citrato com os íons Ca^{2+} na superfície das NPs, sendo que os grupos carboxílicos desprotonados remanescentes não ligados à superfície conferem o valor negativo de potencial Zeta.⁵⁰ A presença de carga superficial negativa torna as NPs HA-Cit mais propícias para interações eletrostáticas

com fármacos que possuem carga positiva, como é o caso da DOX (ponto isoeletroico = 9.03). Ao estimar o potencial Zeta das NPs de HA-Cit-DOX, observou-se um valor positivo de $+21,4 \pm 1,0$ mV devido aos grupos amina da DOX, confirmando o carregamento das NPs com o fármaco.

Por outro lado, as NPs funcionalizadas com PEI (HA-PEI) apresentaram um valor de potencial Zeta igual a $+28,1 \pm 0,6$ mV, o que indica a efetiva funcionalização com PEI. Tal molécula polimérica é carregada positivamente, pois possui em sua estrutura múltiplos grupos amina positivos que interagem com os grupos fosfatos da HA, sendo que os grupos que permanecem livre conferem a carga positiva ao estarem em suas formas protonadas. Após o carregamento com o fármaco, o potencial Zeta foi determinado como $+23,5 \pm 0,5$ mV. Apesar de cargas positivas similares, o que dificultaria o carregamento com a DOX, a formação da partícula HA-PEI-DOX pode ser atribuída a possível ocorrência de ligações de hidrogênio entre o PEI e a DOX.⁵¹

4.1.7 Espectroscopia UV-Vis

A quantidade de citrato adsorvida por miligrama de NPs foi determinada usando a técnica UV-Vis. A Figura 6 apresenta a curva de calibração para a quantificação de íons citrato na NPs. Tal quantificação resultou em um valor de $252,1 \pm 32,4$ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, uma quantidade de citrato carregado similar ao relatado por Machado *et al.*³² para NPs de fosfato de cálcio amorfo (ACP) carbonatadas ($191,9 \pm 21,3$ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)

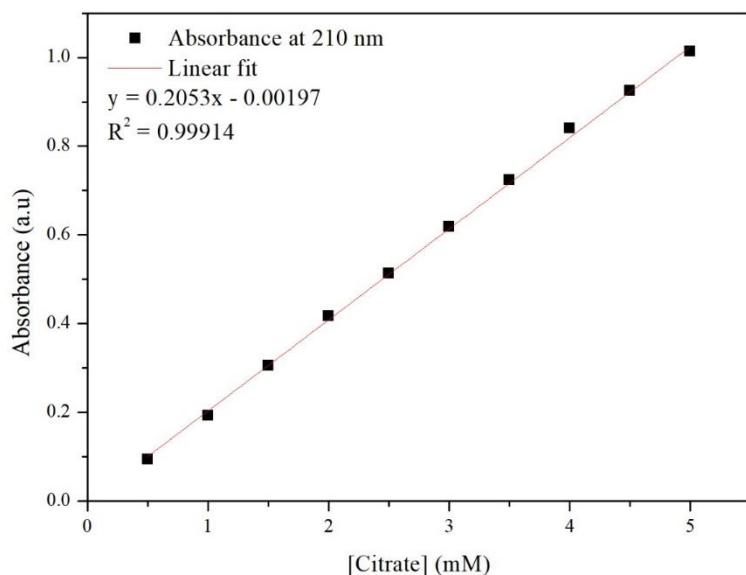


Figura 6. Curva de calibração para a quantificação de íons citrato.

Com o objetivo de quantificar o fármaco carregado nas NPs, obtiveram-se curvas de calibração da DOX livre em água monitorando sua banda de absorção em 480 nm. A

Figura 7(a-b) ilustra o espectro obtido em diferentes concentrações de fármaco no respectivo meio, juntamente com a curva resultante. Ao analisar a curva obtida nas diferentes medidas, observa-se que a banda permaneceu constante, indicando a preservação dos grupos cromóforos da DOX. O perfil observado no espectro de absorção do fármaco revela uma banda principal centrada em 480 nm, a qual está associada à transição $\pi \rightarrow \pi^*$, relacionada ao sistema conjugado de anéis aromáticos que compõem o núcleo antraciclina da molécula, o qual permite a delocalização dos elétrons π ao longo da estrutura, resultando na absorção de luz na região visível do espectro. Além disso, o espectro apresenta um ombro em aproximadamente 360 nm, atribuído à transição parcialmente proibida $n \rightarrow \pi^*$ que envolvem os três grupos C=O.³⁴ Esse tipo de transição é menos intensa que a transição $\pi \rightarrow \pi^*$, pois o orbital não ligante (n) apresenta pouca sobreposição com o orbital antiligante π^* , que é pequeno, além de ambos geralmente possuírem a mesma paridade, o que viola as regras de seleção eletrônica. Como resultado, a transição $n \rightarrow \pi^*$ manifesta-se como uma banda de baixa intensidade, como o ombro observado no espectro.

Ademais, determinou-se o limite de detecção (LOD) e o de quantificação (LOQ) como sendo 1,37 e 4,58 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, os quais representam a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado e a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão.

52

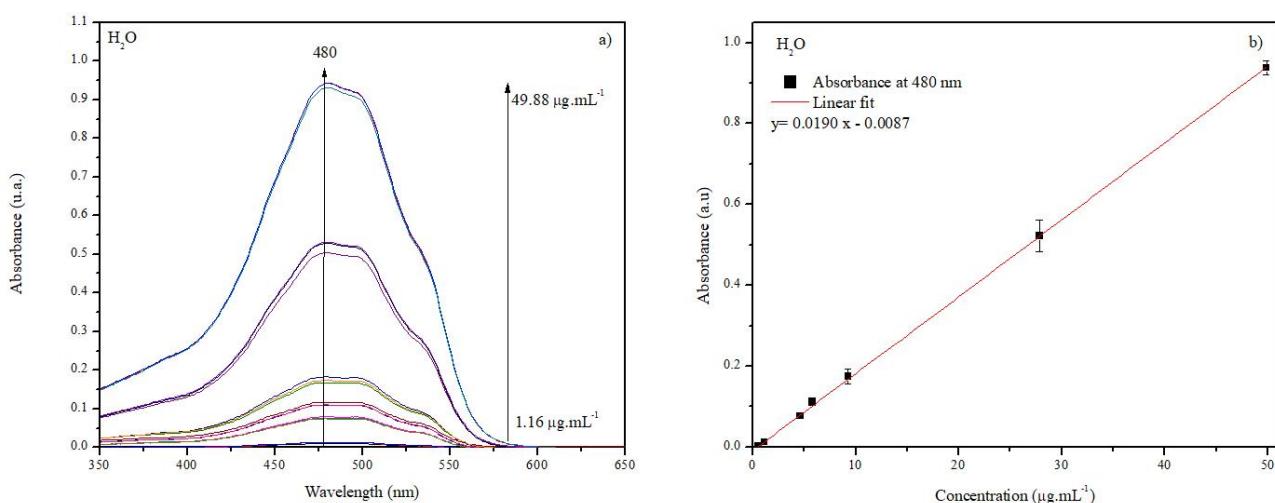


Figura 7. a) Espectros de UV-Vis nas diferentes concentrações de fármaco em água e (b) curva obtida por meio deles.

Com o objetivo de avaliar a eficiência de carregamento da DOX nas NPs de HA sem funcionalização e também as funcionalizadas com íons citrato e PEI, foram registradas as absorbâncias em 480 nm do sobrenadante após a centrifugação das NPs carregadas, comparando-as com a solução da DOX pura antes do carregamento. A eficiência de carregamento do fármaco nas NPs de HA pura foi de aproximadamente $23,95 \pm 0,544\%$, já para a amostra de HA-Cit foi estimada em aproximadamente $82 \pm 2,83\%$, enquanto nas HA-PEI foi de $43 \pm 1,65\%$.

Dessa forma, observa-se a maior eficiência de carregamento de DOX no caso das NPs de HA-Cit, e, portanto, os testes de liberação serão conduzidos somente com essa funcionalização das NPs, a qual proporciona um carregamento de $399,65 \pm 13,35 \text{ ug.mg}^{-1}$ de NPs, enquanto na amostra de HA e HA-PEI o carregamento foi de $99,84 \pm 2,23 \text{ ug.mg}^{-1}$ e $203,63 \pm 7,81 \text{ ug.mg}^{-1}$ de NPs, respectivamente, sendo valores consideradamente inferiores ao obtido para a HA-Cit-DOX.

A elevada carga de DOX nas HA-Cit é resultante da ligação eletrostática entre o fármaco carregado positivamente e as NPs carregadas negativamente, devido à presença de grupos citrato. Adicionalmente, a presença de grupos -OH e a natureza porosa das HA-Cit facilitam a adsorção de DOX por meio de ligações de hidrogênio e aprisionamento físico, respectivamente.³⁵

4.1.8 Determinação do perfil de liberação das NPs de HA-Cit-DOX

Com o objetivo de quantificar o fármaco liberado das NPs de HA-Cit-DOX, foram plotadas curvas de calibração da DOX livre, monitorando sua banda de absorção em 480 nm em tampão acetato pH 5,5, o qual simula os endossomos das células tumorais,⁵³ e em PBS pH 7,4 diluído 10 vezes. Optou-se por fazer tal diluição devido a formação de dímeros insolúveis de fármaco no tampão PBS 1x com pH 7,4.⁵⁴ Essa diluição reduz a concentração dos sais no meio, evitando a formação do dímero, que interferiam no perfil de liberação da HA-Cit-DOX, gerando um platô abaixo dos valores reais. A Figura 8 ilustra as curvas obtidas a partir das diferentes concentrações de fármaco nos respectivos meios.

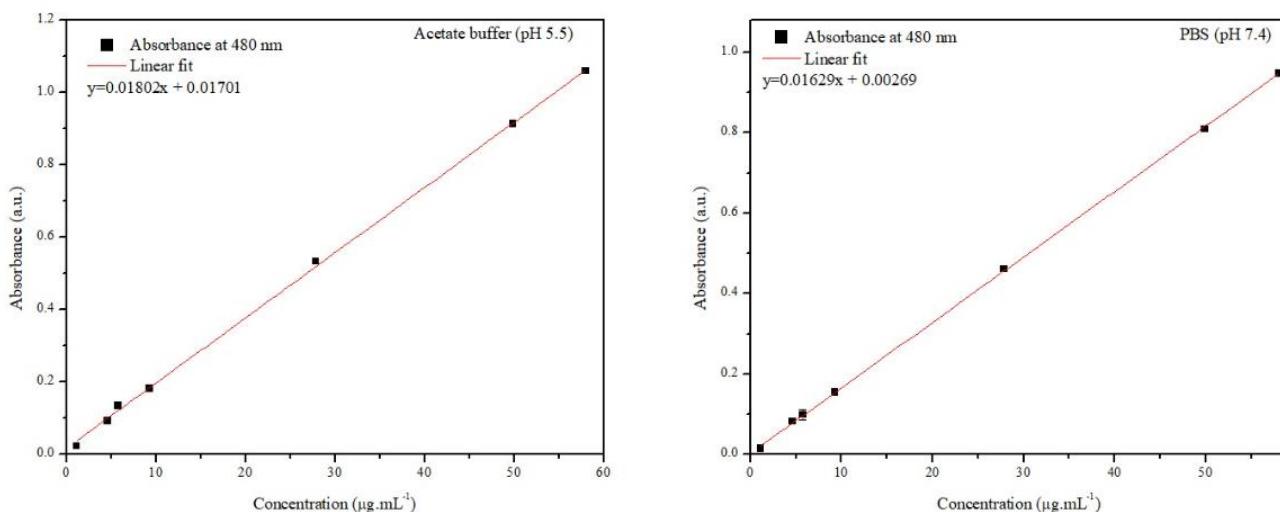


Figura 8. Curvas obtidas nas diferentes concentrações de fármaco em (a) tampão acetato pH 5,5 e (b) PBS 0,1X pH 7,4.

A Figura 9 apresenta os perfis de liberação do fármaco em PBS pH 7,4 e em tampão acetato pH 5,5. Nota-se que ambos possuem um padrão de liberação ao longo do tempo, caracterizado por dois estágios distintos: uma liberação inicial rápida até 4 horas (*burst release*), liberando aproximadamente 18,52% em PBS e 46,3% em tampão acetato, seguida por uma liberação subsequente mais lenta.³⁵ A liberação intensa inicial pode ser atribuída à remoção de moléculas de DOX fracamente ligadas à superfície das NPs. Ao longo de um período de 144 horas, a quantidade total de liberação do medicamento foi de 27,4% em PBS e 93,7% em tampão acetato. A liberação de quase 100% da droga revela que tal sistema libera DOX sob condições fracamente ácidas, como aquelas encontradas em vesículas endolisossômicas. Isso ocorre, pois a NP foi degradada em íons cálcio e fosfato em condições ácidas, ocorrendo a liberação da DOX.⁵⁵⁻⁵⁷ Vale ressaltar que tal experimento foi realizado mantendo-se as condições de sink do fármaco.

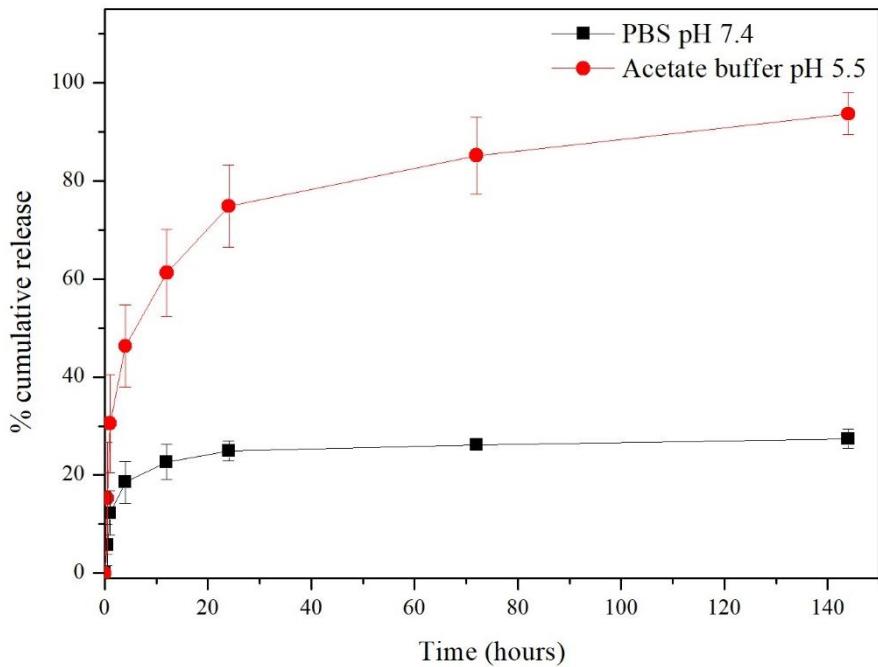


Figura 9. Perfil de liberação cumulativa em PBS pH = 7,4 diluído e tampão acetato pH 5,5 como meios de liberação.

Dessa forma, HA-Cit-DOX possui interessante propriedade pH-responsiva nos meios de liberação que simulam distintos pHs encontrados no corpo humano. Em condições fisiológicas com valores de pH próximos a 7,4, predominantes na corrente sanguínea e em tecidos saudáveis, pode-se inferir que a estrutura deste sistema nanoparticulado provavelmente permanece estável. Tal fato é relevante, pois evita-se uma significativa liberação prematura do fármaco, com uma consequente maximização da sua biodisponibilidade nas regiões de interesse. Já em condições ácidas, encontradas em tumores, a NP é degradada e a liberação do fármaco ocorre de maneira mais acentuada ao longo do tempo.

4.1.9 Determinação do potencial Zeta em diferentes pHs

Tendo em vista que a amostra HA-Cit-DOX foi considerada a mais promissora, a sua carga superficial foi avaliada por meio de medições de potencial zeta (ZP) em diferentes valores de pH, conforme ilustrado na Figura 10. O valor do ZP em água (pH 7,14) foi de $+19,1 \pm 0,3$ mV, valor próximo ao encontrado na corrente sanguínea (pH 7,4) e com magnitude frequentemente associada a partículas estáveis em suspensão. À medida que o meio foi tornando-se mais básico, o valor de ZP diminuiu progressivamente, possivelmente devido à desprotonação dos grupos da amina primária presente no fármaco ($-\text{NH}_3^+$ para $-\text{NH}_2$). O ponto isoelétrico das NPs (ZP = 0,0 mV) ocorre em valor de pH

próximo a 9,8. Em pH = 10, tem-se o valor de ZP de $-2,5 \pm 0,6$ mV devido a desprotonação de grupos –OH do fármaco adsorvido. Por outro lado, ao acidificar o meio em valores de pH inferiores a 7,14, o ZP tornou-se progressivamente mais positivo, uma vez que ocorre a protonação dos grupos amina presentes na DOX ($-\text{NH}_2$ para $-\text{NH}_3^+$), sendo o valor de ZP em pH 3 igual $30,7 \pm 3,3$ mV.^{58,59, 60}

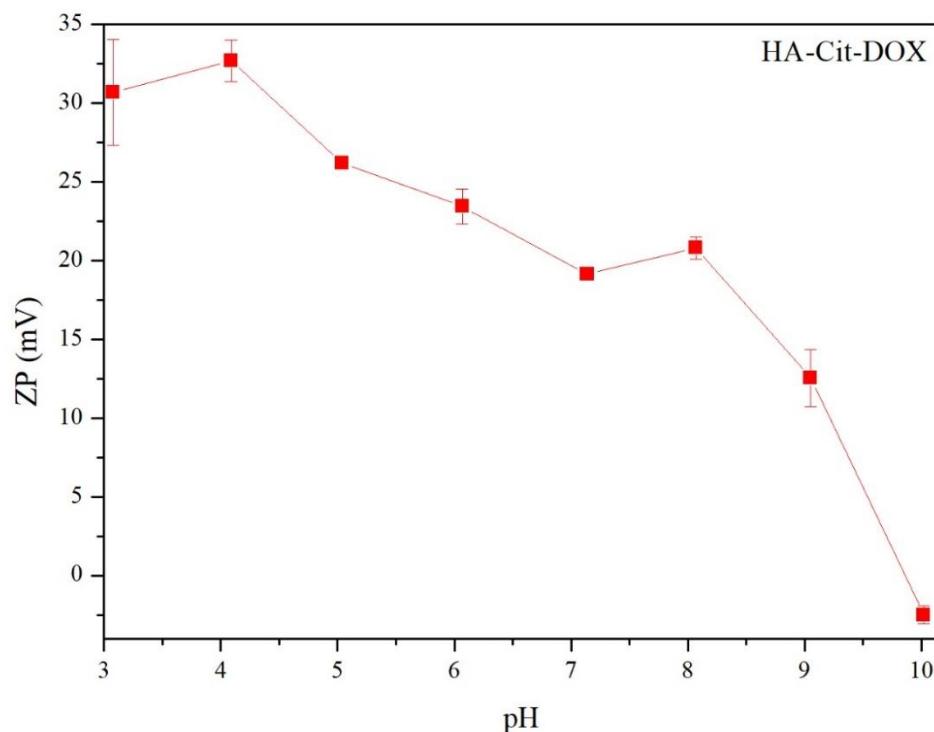


Figura 10. Potencial Zeta de HA-Cit-DOX medidos em diferentes valores de pH.

5. Conclusão

As NPs de hidroxiapatita foram sintetizadas e funcionalizadas com íons citrato e PEI, conforme evidenciado por técnicas de caracterização como FTIR, Raman, DLS e potencial zeta. Após o carregamento com DOX, as análises espectroscópicas confirmaram a presença do fármaco nas nanopartículas. Bandas características dos grupos funcionais da DOX foram identificadas tanto nas HA-Cit-DOX quanto nas HA-PEI-DOX, indicando a eficácia do processo de carregamento. A caracterização das amostras por DRX indicou a manutenção da estrutura cristalina hexagonal, sem mudanças significativas após as modificações realizadas. A análise por microscopia eletrônica revelou que todas as amostras exibem morfologia de nanobastões com uma razão de aspecto próxima de 2, o que contribui para propriedades como maior área de superfície, flexibilidade e reatividade. No entanto, as amostras de HA-Cit demonstraram uma eficiência de

carregamento significativamente maior em comparação com as HA-PEI. Dado esse desempenho superior, optou-se por utilizar exclusivamente as HA-Cit para os testes de liberação de fármaco, garantindo uma maior eficácia no controle da liberação da doxorrubicina adsorvida.

Por meio dos perfis de liberação do fármaco foi possível identificar uma liberação rápida inicial seguida por uma fase mais lenta, com quase 100% em condições fracamente ácidas, simulando o ambiente tumoral e vesículas endolisossômicas. Esses resultados indicam que o sistema HA-Cit-DOX apresenta uma boa estabilidade em pH fisiológico e ótima responsividade a pH ácido, sendo adequado para liberação controlada de medicamentos em ambientes tumorais, o que pode maximizar a eficácia terapêutica nas células alvo. Além disso, foi analisado a variação do potencial Zeta das nanopartículas conforme o pH, apresentando valores elevados em condições de pH neutro e ácido.

Sendo assim, o nanossistema desenvolvido de HA-Cit-DOX apresenta características altamente favoráveis para aplicação em terapias antitumorais. As análises comprovaram não apenas a eficácia do carregamento e a preservação da estrutura cristalina das NPs, mas também revelaram a liberação eficiente do fármaco por conta da responsividade ao pH ácido, aliada à estabilidade em pH fisiológico e à elevada eficiência de carregamento das HA-Cit, destaca o potencial terapêutico desse sistema.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 D. R. R. Batista, M. De Mattos and S. F. da Silva, *Revista de Enfermagem da UFSM*, DOI:10.5902/2179769215709.
- 2 Élida Lívia Rafael Dantas, Fernando Henrique de Lima Sá, Sionara Melo de Figueiredo de Carvalho, Anderson Pontes Arruda, Evelane Marques Ribeiro and Erlane Marques Ribeiro, .
- 3 L. H. Araujo, C. Baldotto, G. De Castro, A. Katz, C. G. Ferreira, C. Mathias, E. Mascarenhas, G. de L. Lopes, H. Carvalho, J. Tabacof, J. Martínez-Mesa, L. de S. Viana, M. de S. Cruz, M. Zukin, P. De Marchi, R. M. Terra, R. A. Ribeiro, V. C. C. De Lima, G. Werutsky and C. H. Barrios, *Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, 2018, preprint, DOI: 10.1590/s1806-37562017000000135.
- 4 R. F. Xavier, G. H. C. Silva, C. H. E. Gonçalves, D. E. Gonçalves, C. G. Moreira, J. L. C. Minervino and J. J. Bezerra, *Research, Society and Development*, 2022, **11**, e5411722903.
- 5 M. Norouzi and P. Hardy, *Acta Materialia Inc*, 2021, preprint, DOI: 10.1016/j.actbio.2020.12.009.

- 6 C. Mathias, G. F. Prado, E. Mascarenhas, P. A. Ugalde, A. C. Zimmer Gelatti, E. S. Carvalho, L. D. Faroni, R. Oliveira, V. C. Cordeiro de Lima and G. de Castro, *Elsevier Inc*, 2020, preprint, DOI: 10.1016/j.jtho.2019.07.028.
- 7 D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit and R. Langer, *Nat Nanotechnol*, 2007, **2**, 751–760.
- 8 E. Blanco, H. Shen and M. Ferrari, *Nature Publishing Group*, 2015, preprint, DOI: 10.1038/nbt.3330.
- 9 W. Sun, J. Fan, S. Wang, Y. Kang, J. Du and X. Peng, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**, 7832–7840.
- 10 M. del C. De Lama-Odría, L. J. del Valle and J. Puiggallí, *MDPI*, 2022, preprint, DOI: 10.3390/ijms231911352.
- 11 P. W. Brown, M. T. Fulmer and R. I. Martin, *Formation of calcium deficient hydroxyapatite at near-physiological temperature*, 1992.
- 12 H. Shi, Z. Zhou, W. Li, Y. Fan, Z. Li and J. Wei, 2021, preprint, DOI: 10.3390/cryst11020149.
- 13 R. Khalifehzadeh and H. Arami, *Elsevier B.V.*, 2020, preprint, DOI: 10.1016/j.cis.2020.102157.
- 14 Thales Rafael Machado, Jussara Soares da Silva, Eloisa Cordoncillo, Héctor Beltrán-Mir, Juan Andrés, Valtencir Zucolotto and Elson Longo, in *Research Topics in Bioactivity, Environment and Energy*, 2022, pp. 149–181.
- 15 T. R. Machado, I. S. Leite, N. M. Inada, M. S. Li, J. S. da Silva, J. Andrés, H. Beltrán-Mir, E. Cordoncillo and E. Longo, *Mater Today Chem*, DOI:10.1016/j.mtchem.2019.100211.
- 16 T. R. Machado, J. C. Sczancoski, H. Beltrán-Mir, I. C. Nogueira, M. S. Li, J. Andrés, E. Cordoncillo and E. Longo, *J Solid State Chem*, DOI:10.1016/j.jssc.2016.12.018.
- 17 G. Gonzalez, C. Costa-Vera, L. J. Borrero, D. Soto, L. Lozada, J. I. Chango, J. C. Diaz and L. Lascano, *J Lumin*, 2018, **195**, 385–395.
- 18 O. Geuli, N. Metoki, T. Zada, M. Reches, N. Eliaz and D. Mandler, *J Mater Chem B*, 2017, **5**, 7819–7830.
- 19 S. Saber-Samandari, N. Nezafati and S. Saber-Samandari, *The Effective Role of Hydroxyapatite-Based Composites in Anticancer Drug-Delivery Systems*, 2016, vol. 33.
- 20 C. Ajaykumar, in *Advances in Precision Medicine Oncology*, 2021.
- 21 X. Dong, Y. Sun, Y. Li, X. Ma, S. Zhang, Y. Yuan, J. Kohn, C. Liu and J. Qian, *Small*, DOI:10.1002/smll.202007672.
- 22 S. Mondal, S. V. Dorozhkin and U. Pal, *Wiley-Blackwell*, 2018, preprint, DOI: 10.1002/wnan.1504.
- 23 N. Abbasi Aval, J. Pirayesh Islamian, M. Hatamian, M. Arabfirouzjaei, J. Javadpour and M.-R. Rashidi, *Int J Pharm*, 2016, **509**, 159–167.

- 24 S. P. Victor, W. Paul, M. Jayabalan and C. P. Sharma, *CrystEngComm*, 2014, **16**, 9033–9042.
- 25 M. Gu, L. Jiang, L. Hao, J. Lu, Z. Liu, Z. Lei, Y. Li, C. Hua, W. Li and X. Li, *J Mater Chem B*, 2021, **9**, 6006–6016.
- 26 P. Sengar, K. Chauhan and G. A. Hirata, *Transl Oncol*, 2022, **24**, 101482.
- 27 H. Kim, S. Mondal, S. Bharathiraja, P. Manivasagan, M. S. Moorthy and J. Oh, *Ceram Int*, 2018, **44**, 6062–6071.
- 28 Z. Li, Z. Liu, M. Yin, X. Yang, Q. Yuan, J. Ren and X. Qu, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 4257–4263.
- 29 D. Jiang, H. Zhao, Y. Yang, Y. Zhu, X. Chen, J. Sun, K. Yu, H. Fan and X. Zhang, *J Mater Chem B*, 2017, **5**, 3749–3757.
- 30 T. R. Machado, J. C. Sczancoski, H. Beltrán-Mir, M. S. Li, J. Andrés, E. Cordoncillo, E. Leite and E. Longo, *Ceram Int*, 2018, **44**, 236–245.
- 31 S. Krukowski, M. Karasiewicz and W. Kolodziejski, *J Food Drug Anal*, 2017, **25**, 717–722.
- 32 T. R. Machado, C. E. Zanardo, R. R. C. Vilela, R. R. Miranda, N. S. Moreno, C. M. Leite, E. Longo and V. Zucolotto, *J Mater Chem B*, DOI:10.1039/d3tb02915h.
- 33 Y. Wu, F. Zhang, K. Wang, P. Luo, Y. Wei and S. Liu, *Anal Chem*, 2019, **91**, 14036–14042.
- 34 P. Changenet-Barret, T. Gustavsson, D. Markovitsi, I. Manet and S. Monti, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013, **15**, 2937–2944.
- 35 G. Verma, K. C. Barick, N. G. Shetake, B. N. Pandey and P. A. Hassan, *RSC Adv*, 2016, **6**, 77968–77976.
- 36 Y. Berbar, M. Amara and H. Kerdjoudj, in *Procedia Engineering*, 2012, vol. 33, pp. 126–133.
- 37 V. R. Khabibullin, M. R. Chetyrkina, S. I. Obydennyy, S. V. Maksimov, G. V. Stepanov and S. N. Shtykov, *Int J Mol Sci*, DOI:10.3390/ijms24054480.
- 38 R. Bansal, R. Singh and K. Kaur, *BMC Chem*, DOI:10.1186/s13065-021-00752-3.
- 39 S. R. Prasad, A. Jayakrishnan and T. S. S. Kumar, *J Mater Sci Mater Med*, DOI:10.1007/s10856-020-06379-5.
- 40 Z. Farhane, F. Bonnier, A. Casey and H. J. Byrne, *Analyst*, 2015, **140**, 4212–4223.
- 41 V. Uskoković and D. P. Uskoković, 2011, preprint, DOI: 10.1002/jbm.b.31746.
- 42 R. Zhang, J. Zhu, D. Sun, J. Li, L. Yao, S. Meng, Y. Li, Y. Dang and K. Wang, *Micromachines (Basel)*, DOI:10.3390/mi13060940.
- 43 C. Tapeinos, E. K. Efthimiadou, N. Boukos, C. A. Charitidis, M. Koklioti and G. Kordas, *J Mater Chem B*, 2013, **1**, 194–203.
- 44 Y. Zhang, F. Wang, H. Yin and M. Hong, *Adv Nanopart*, 2013, **02**, 104–111.

- 45 H. Kim, S. Mondal, S. Bharathiraja, P. Manivasagan, M. S. Moorthy and J. Oh, *Ceram Int*, 2018, **44**, 6062–6071.
- 46 S. Sanchez-Cortes, R. M. Berenguel, A. Madejón and M. Pérez-Méndez, *Biomacromolecules*, 2002, **3**, 655–660.
- 47 T. R. Machado, J. C. Sczancoski, H. Beltrán-Mir, I. C. Nogueira, M. S. Li, J. Andrés, E. Cordoncillo and E. Longo, *J Solid State Chem*, 2017, **249**, 64–69.
- 48 K. Sudarsanan and R. A. Young, *Significant Precision in Crystal Structural Details: Holly Springs Hydroxyapatite*, 1969, vol. 25.
- 49 J. Lim, S. P. Yeap, H. X. Che and S. C. Low, *Nanoscale Res Lett*, 2013, **8**, 1–14.
- 50 E. Skwarek, W. Janusz and D. Sternik, *J Radioanal Nucl Chem*, 2014, **299**, 2027–2036.
- 51 N. V. Mdlovu, K. S. Lin, M. T. Weng and Y. S. Lin, *Colloids Surf B Biointerfaces*, DOI:10.1016/j.colsurfb.2021.112168.
- 52 M. Ângela and F. Perez, *VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: COMO FAZER? POR QUE ELA É IMPORTANTE?*, vol. 22.
- 53 R. Jain, S. M. Standley and J. M. J. Fréchet, *Macromolecules*, 2007, **40**, 452–457.
- 54 Y. Yamada, *ACS Omega*, 2020, **5**, 33235–33241.
- 55 H. P. Rim, K. H. Min, H. J. Lee, S. Y. Jeong and S. C. Lee, *Angewandte Chemie - International Edition*, 2011, **50**, 8853–8857.
- 56 K. H. Min, H. J. Lee, K. Kim, I. C. Kwon, S. Y. Jeong and S. C. Lee, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5788–5797.
- 57 M. Casolaro, I. Casolaro, S. Bottari, B. Del Bello, E. Maellaro and K. D. Demadis, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2014, **88**, 424–433.
- 58 A. Trebinska-Stryjewska, O. Swiech, L. J. Opuchlik, E. A. Grzybowska and R. Bilewicz, *ACS Omega*, 2020, **5**, 7979–7986.
- 59 J. H. Beijnen, O. A. G. J. Van Der Houwen and W. J. M. Underberg, *Aspects of the degradation kinetics of doxorubicin in aqueous solution*, 1986, vol. 32.
- 60 C. Qiu, Y. Wu, Q. Guo, Q. Shi, J. Zhang, Y. Meng, F. Xia and J. Wang, *Elsevier B.V.*, 2022, preprint, DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100501.