



PROJETO – DE – PESQUISA

Programa de Iniciação científica e Tecnológica CBPF

Nome do pesquisador ou tecnologista (orientador interno):

Elena Mavropoulos

Coordenação: **COMAN**

Nome do pesquisador ou tecnologista (coorientador/colaborador externo, se houver):

Andréa Machado Costa (pos-doutoranda CBPF)

Instituição de Pesquisa Externa (se houver):

Título do projeto: **Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio nanoestruturados associados a bifosfonatos para o reparo ósseo**

Palavra-chave: **hidroxiapatita, nanopartículas, bifosfonatos**

Área de conhecimento: **Farmácia, Química, e áreas afins**

Pré-requisito desejado (se houver): **Curso técnico**

Possibilidade de orientação remota: () Sim (x) Não

Resultante principal do Projeto:

- (x) Publicação (horizonte de 4 anos).
- (x) Preparação do bolsista para área científica.
- () Produto tecnológico.
- () Produto educacional ou didático.

Rio de Janeiro, 29 de março de 2024

Projeto

(máximo de 3 páginas)

A Nanomedicina utiliza tecnologias e materiais obtidos em escala nanométrica, para diagnosticar, tratar, curar, monitorar, prever e prevenir doenças, a partir dos avanços da Nanotecnologia. Compreende dois grandes campos, os nanodispositivos e os medicamentos nanoestruturados, neste último caso, encontram-se os sistemas de administração de fármacos que levariam a melhores efeitos terapêuticos e vias de administração, a partir de menores índices de toxicidade, solubilidade, efeitos adversos e maior especificidade ao alvo [1,2].

Os bisfosfonatos são drogas antireabsortivas utilizadas para o tratamento de osteoporose, assim como, para a metástase óssea, onde destacam-se o aledronato e o zoledrontato, bisfosfonatos nitrogenados que apresentam afinidade aos cristais de bioapatita presentes na matriz mineralizada do tecido ósseo. Estudos demonstram que essa classe de fármacos reduz o risco de fratura por meio da inibição da reabsorção óssea, além reduzir a dor na metástase óssea. Essa ação ocorre devido a inibição da atividade de osteoclastos, células de remodelação óssea cuja principal função é absorver o tecido ósseo, além de prevenir a apoptose de osteoblastos e de osteócitos, células responsáveis pela produção de colágeno e matriz extracelular, e por favorecer a manutenção do tecido sadio, respectivamente. Vale ressaltar que a administração via oral de bisfosfonatos apresenta limitações devido à má absorção gastrointestinal e aos efeitos colaterais como osteonecrose de maxilares [3,4].

A interação entre bisfosfonatos e a hidroxiapatita tem motivado trabalhos na literatura internacional devido o potencial do composto para a regeneração óssea. De acordo com Kim *et al*, 2010 [5] a ligação entre bisfosfonatos e a hidroxiapatita dá-se pela coordenação entre o cálcio da hidroxiapatita e oxigênios pertencentes à grupos fosfonatos do fármaco. Em geral, a técnica de associação dos bisfosfonatos à HA é executada a partir da co-precipitação da hidroxiapatita em presença de bisfosfonatos. É importante ressaltar que muito poucos trabalhos reportam a associação dos bisfosfonatos por adsorção na superfície de nanopartículas de hidroxiapatita. De acordo com Boanini *et al*, 2012, [6] estudando ambos os processos de associação do zoledrontato à HA, verificou que na rota de co-precipitação ocorre a formação de cristais de HA e do zoledronato interagindo através de ligações entre o cálcio da HA e oxigênios do zoledronato, com o aumento do tempo de digestão. No caso do preparo por adsorção, ocorre uma complexação da molécula do zoledronato na superfície dos cristais de HA, levando à uma eficiência inferior de carregamento do bisfosfonato ao material. As variações encontradas sugerem que as interações entre o fármaco e a HA são também diferentes para cada rota de associação do fármaco a HA, o

que provavelmente resultaria em diferentes cinéticas de liberação do fármaco pela hidroxiapatita.

A Hidroxiapatita parcialmente substituída por íons carbonato, vem sendo estudada pelo Laboratório de Biomateriais do CBPF devido a sua maior similaridade à fase mineral do tecido ósseo e taxa de degradação *in vivo*. A proponente deste projeto participou de diversas publicações sobre hidroxiapatita e hidroxiapatita substituída com íons carbonatos, além de estudar a interação do biomaterial com proteínas e antibióticos [7-10].

Este projeto propõe associar bisfosfonatos, como alendronato de sódio, à CHA nanoestruturada de forma a obter um nanossistema carreador do fármaco, capaz de auxiliar o tratamento de reparo ósseo. A substituição dos íons fosfatos por carbonato aumenta a ósseointegração melhorando a capacidade regenerativa da apatita. Pretende-se utilizar ambos os métodos anteriormente citados de associação do alendronato à estrutura da HA (co-precipitação e adsorção à superfície das nanopartículas), de forma a avaliar qual método de preparação que teria maior capacidade de associação com a estrutura e taxa de liberação. Estas características definiriam o desempenho do compósito para uma possível aplicação terapêutica.

2. MATERIAIS

As nanopartículas de hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita carbonatada (CHA) utilizados neste estudo serão sintetizadas no Laboratório de Materiais Biocerâmicos, e os ensaios *in vitro* em cultura de células serão realizados no Laboratório de Cultura de Células, ambos laboratórios do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF.

3. METODOLOGIA

3.1- Síntese de hidroxiapatita parcialmente substituída por carbonato (3-5% Molar)

Duas soluções 0,125 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e 0,012 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ serão adicionadas à solução 0,21 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ por gotejamento através de bomba peristáltica em fluxo de 30 mL/min e mantido a pH 12 pela adição de KOH. O sistema será mantido em agitação por 3h a uma temperatura de 90°C. Em seguida os sólidos sintetizados serão filtrados e lavados com água milli-Q até atingir o pH neutro. Os materiais serão secos por liofilização e peneirados para obter partículas $\leq 75 \mu\text{m}$.

3.2- Síntese por co-precipitação de hidroxiapatita parcialmente substituída por carbonato em presença de alendronato de sódio

As amostras de CHA contendo o fármaco serão obtidas de forma similar à síntese do material puro em via úmida. A partir de soluções de 0,125 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e 0,012 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ adicionadas à uma solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ contendo concentrações variadas de alendronato ($10 \times 10^{-3}\text{M}$ a $50 \times 10^{-3}\text{M}$). Posteriormente, as amostras serão secas por liofilização e peneiradas a 75 microns. Todas as sínteses serão realizadas no Laboratório de Biomateriais do CBPF.

3.3- Adsorção de bisfosfonatos nas nanopartículas de CHA

Serão utilizados tubos de 50 mL contendo pós nanocristalinos de CHA e soluções aquosas de alendronato de sódio em concentrações entre 0,05 e 5% numa razão de 50 mg CBHA/mL sol alendronato, que permanecerão em agitador orbital (60 ciclos/minutos) por diferentes tempos (3h-24h). Serão desenvolvidos ensaios de adsorção/dessorção com o objetivo de construir as isotermas de adsorção/dessorção das moléculas de vancomicina na CBHA e definir os mecanismos de interação com a superfície a partir de simulações, utilizando o programa Origin 7, das curvas obtidas com as equações de Lagmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich para adsorção [13,14].

A eficiência de carregamento se relaciona com a quantidade encontrada de fármaco direta ou indiretamente pela quantidade teoricamente adicionada nas preparações. A determinação da concentração de alendronato nas amostras será realizada em espectrofotômetro UV-Vis com medidas de absorvância do fármaco após reação a ninidrina no comprimento de onda de 568 nm. A curva de calibração será realizada contendo pontos de concentração conhecidos do fármaco (0,25 – 25 µg/ml). A partir da equação da reta será possível determinar a concentração do quimioterápico em uma amostra com concentração desconhecida.

3.4- Caracterização físico-química dos materiais

Os teores de Ca dos pós precipitados serão determinados por análise química quantitativa usando espectroscopia de absorção atômica (AAS) em um espectrofotômetro Shimadzu 6800. O teor de fosfato será obtido pelo método colorimétrico de ácido fosfórico vanadomolibdato, usando uma espectrofotometria UV-Vis (Shimadzu UV-2450) a 420 nm.

As fases cristalográficas, parâmetros de rede e ordem cristalina serão analisados em difratômetro X-Pert Pro PANalytical equipado com detector proporcional (gás Xe) e radiação Cu-K α ($\lambda = 1,542 \text{ \AA}$) a 40 kV e 40 mA. Os padrões de difração serão coletados em uma etapa de 0,02° a 50 s/etapa entre 7° < 2 θ < 60°. O tamanho médio do cristalito (Dv, nm) e os parâmetros da rede foram determinados a partir da equação de Scherrer e a distância interplanar (dhkl) em função de a = b e c para uma rede hexagonal.

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) será usada para detectar os modos de vibração de amostras de CHA e CHA contendo alendronato. Os espectros de FTIR serão coletados em um espectrofotômetro Shimadzu IR-Prestige-21/AIM-880 em uma faixa de 4000–400 cm⁻¹ com uma resolução de 4 cm⁻¹ e 500 varreduras usando pastilhas KBr.

O potencial zeta (PZ) das superfícies das partículas será determinado em um instrumento Zetasizer Nano ZS90. As medições serão realizadas com os pós de CHA e CHA contendo alendronato suspensos em KCl 0,01 M em pH 6,0. A distribuição do tamanho das partículas será determinada por difração a laser (SALD-2201, Shimadzu), e a área superficial específica (BET) e o tamanho médio dos poros serão determinados usando uma técnica de fisissorção (ASAP-2020, Micromeritics). A análise termogravimétrica (TGA) será realizada em um instrumento Shimadzu DTG-60 (5–15 mg, 25–800 °C, 10 K min⁻¹).

3.5- Ensaio Viabilidade Celular

Células MC3T3, subcultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1 x 10⁴ células/poço, serão expostas a cada extrato por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂.



Células cultivadas em meio regular suplementado serão usadas como controle negativo (C-) e uma solução de dodecil sulfato de sódio a 1% será usada como controle positivo (C+). A viabilidade celular após exposição ao biomaterial será determinada com o PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Todos os materiais serão esterilizados por radiação gama (fonte Cobalt 60, 15 KGy, 19,72 Gy/min, total de 12 h). Células viáveis reduzem a resazurina a resorufina sob respiração celular, um processo que é acompanhado por mudanças de fluorescência na solução. Portanto, as medidas de fluorescência e absorvância da solução indicam atividade metabólica celular e, conseqüentemente, a presença de células viáveis. Após 24 h de exposição das células a cada meio condicionado, 20 µL de PrestoBlue serão adicionados a cada poço e as placas serão incubadas a 37°C por 30 min. Após a incubação, a mudança na fluorescência (resazurina para resorufina) será medida a 590 nm. Três experimentos independentes serão realizados em sextuplicata. Os dados de viabilidade celular normalizados (onde C-=100%) serão submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste post-hoc de Tukey, onde um valor de $p < 0,05$ será considerado estatisticamente diferente de C-. Os testes estatísticos serão realizados no programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4. CRONOGRAMA

O plano de trabalho consistirá das etapas descritas na metodologia, ordenadas no esquema a seguir. Vale notar que algumas alterações no cronograma podem ocorrer de acordo com interpretações nos resultados obtidos, podendo prolongar a sua execução ou mesmo ocorrer a inclusão de novas técnicas e procedimentos ao longo da realização do projeto.

Etapa	Mês											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1) Síntese das amostras de nanopartículas	x	x	x									
2) Caracterização de Hidroxiaptita e hidroxiapatita carbonatada			x	x	x	x						
3) Ensaios de Adsorção de aledronato						x	x	x	x			
4) Ensaios <i>In vitro</i> - viabilidade celular									x	x	x	
5) Produção de relatório										x	x	x

5. BIBLIOGRAFIA

- 1- A Andrew, D Jones, Gujie Mi, Thomas J Webster, Trends Biotechnol., A Status Report on FDA Approval of Medical Devices Containing Nanostructured Materials, 2019 Feb;37(2):117-120.
- 2- Bruna de Paula Dias, Erica Milena de Castro Ribeiro, Ricardo Lemes Gonçalves, Diego Santos Oliveira, Tiago Hilário Ferreira, Breno de Mello Silva, A Nanotecnologia no Brasil e o desenvolvimento de produtos com atividade antimicrobiana, Quim. Nova, Vol. 44, No. 8,



1084-1092, 2021.

- 3- Adriana Bigi, Elisa Boanini, Review Calcium Phosphates as Delivery Systems for Bisphosphonates, *J. Funct. Biomater.* 2018, 9, 6; doi:10.3390/jfb9010006.
- 4- Muhammad Usman Munira , Sajal Salmanb, Ibrahim Javedc, Syed Nasir Abbas Bukharia, Naveed Ahmadd , Naveed Akhter Shade, Farooq Azizf, Nano-hydroxyapatite as a delivery system: overview and advancements, *ARTIFICIAL CELLS, NANOMEDICINE, AND BIOTECHNOLOGY* 2021, VOL. 49, NO. 1, 717–727.
- 5- C W Kim, Y-P Yun, H J Lee, Y-S Hwang, I K Kwon, S C Lee, In situ fabrication of alendronate-loaded calcium phosphate microspheres: Controlled release for inhibition of osteoclastogenesis, *J. Control. Release*, 147 (2010), pp. 45-53.
- 6- Elisa Boanini, Massimo Gazzano, and Adriana Bigi, Time Course of Zoledronate Interaction with Hydroxyapatite Nanocrystals, *J. Phys. Chem. C* 2012, 116, 29, 15812–15818.
- 7- Suzana dos Anjos, Elena Mavropoulos, Gutemberg G. Alves, Andrea M. Costa, Moema de Alencar Hausen, Carolina N. Spiegel, Mariana M. Longuinho, Mirta Mir, José M. Granjeiro, Alexandre M. Rossi, Impact of crystallinity and crystal size of nanostructured carbonated hydroxyapatite on pre-osteoblast in vitro biocompatibility, *J Biomed Mater Res A*. 2019 Sep;107(9):1965-1976.
- 8- Luisa A. Scudeller, Elena Mavropoulos, Marcelo N. Tanaka, Andrea M. Costa, Carolina A.C. Braga, Elvis O. López, Alexandre Mello, Alexandre M. Rossi, Effects on insulin adsorption due to zinc and strontium substitution in hydroxyapatite, *Materials Science and Engineering: C*, 79, 1 October 2017, 802-811.
- 9- Carlos Soriano-Souza, Helder Valiense, Elena Mavropoulos, Victor Martinez-Zelaya, Andrea Machado Costa, Adriana T. Alves, Mariana Longuinho, Rodrigo Resende, Carlos Mourão, Jose Granjeiro, Maria H. Rocha-Leao, Alexandre Rossi, Mônica Calasans-Maia, Doxycycline containing hydroxyapatite ceramic microspheres as a bone-targeting drug delivery system, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2020 May;108(4):1351-1362.
- 10- Mônica Diuana Calasans-Maia 1, Carlos Alberto Brazil Barboza Junior 2, Carlos Alberto Soriano-Souza 3, Adriana Terezinha Neves Novellino Alves 4, Marcelo Jose de Pinheiro Uzeda 1, Victor R Martinez-Zelaya 3, Elena Mavropoulos 3, Maria Helena Rocha Leão 5, Ronaldo Barcellos de Santana 2, Jose Mauro Granjeiro 1, Alexandre Malta Rossi, Microspheres of alginate encapsulated minocycline-loaded nanocrystalline carbonated hydroxyapatite: therapeutic potential and effects on bone regeneration, *Int J Nanomedicine*, 2019, 24;14:4559-4571.