

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: **Associação de fármacos em microesferas de alginato e hidroxiapatita para uso em liberação controlada de drogas**

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

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

Pré-requisito desejado (se houver):

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, 15 de setembro de 2025

Projeto

(máximo de 3 páginas)

As técnicas de encapsulamento de fármacos vêm se destacando como estratégia de administração por diversos fatores, como: i) para proteção contra degradação metabólica, (por exemplo, enzimática), ii) controle preciso na taxa de liberação do fármaco incorporado ao longo do tempo, (iii) fácil administração quando comparado com formas alternativas sejam implantes ou administração parenteral, e (iv) perfis de liberação de fármacos desejados e pré-programados que correspondam às necessidades terapêuticas do paciente [1,2].

Hidrogéis de alginato têm sido estudados para a liberação de fármacos com êxito, uma vez que sua reticulação com íons divalentes permite uma taxa de difusão das moléculas aprisionada controlando assim sua taxa de liberação. Entre suas vantagens destacam-se baixo custo, , biocompatibilidade, solubilidade em água, biodegradável e apresenta a transição sol-gel, podendo aprisionar macromoléculas biológicas, como DNA, células, proteínas ou mesmo fármacos de baixo peso molecular, mantendo sua atividade natural.

A gelificação ionotrópica do alginato pode ser realizada por dois métodos: gelificação externa e gelificação interna. Ambas diferem no tipo de sal de cátion divalente utilizado e na cinética de gelificação. No primeiro caso, a preparação de microesferas de alginato por gotejamento de solução de alginato de sódio (SA) em uma solução de um sal de cálcio solúvel, como o cloreto de cálcio, os íons divalentes se difundem para a solução de alginato a partir do exterior. Na gelificação interna, como o nome indica, a fonte do íon divalente já está presente na solução de alginato, e um gatilho controlado, seja pela variação de pH ou a solubilidade do íon divalente utilizado, induz a liberação dos íons na solução para reticulação. No caso da gelificação interna, são utilizados sais de cálcio de menor solubilidade, como carbonato de cálcio ou sulfato de cálcio. A gelificação externa é instantânea e resulta em densidade de reticulação e concentração de polímero não uniformes, enquanto a gelificação interna resulta em concentração uniforme de íons e é mais bem controlada [3,4].

A técnica mais simples de produção por extrusão de microesferas de alginato de sódio gelificadas pelo método externo em solução de cloreto de cálcio, porém em condições biológicas as ligações cruzadas do retículo de alginato são rapidamente quebradas liberando rapidamente o fármaco, “efeito burst”. Atualmente diversos estudos de modificação química das cadeias de alginato são realizados para evitar tal processo. Por outro lado, o grupo de Biomateriais do CBPF utiliza uma outra estratégia, associando o alginato à hidroxiapatita (HA) de forma a produzir um compósito, onde o fármaco esteja adsorvido à HA retardando a sua liberação [5,6].

Este projeto propõe estudar de forma sistemática a associação de fármacos à hidroxiapatita e microesferas de alginato-HA, verificando o efeito das propriedades físico-químicas dos fármacos: peso molecular, solubilidade, lipofilicidade, pKa, coeficiente de partição, polaridade na superfície, estabilidade do fármaco e ligação às proteínas tanto no processo de adsorção quanto no processo de dessorção/liberação.

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 $\leq 75 \mu\text{m}$.

3.3- Adsorção de fármacos nas nanopartículas de CHA

Serão utilizados tubos de 50 mL contendo pós nanocristalinos de CHA e soluções aquosas de fármaco em concentrações entre 0,05 e 5% 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 dos fármacos na HA e 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 Langmuir, 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 fármaco nas amostras será realizada em espectrofotômetro UV-Vis com medidas de absorbância 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 $\mu\text{g/ml}$). 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 $0,02^\circ$ a 50 s/etapa entre $7^\circ < 2\theta < 60^\circ$. O tamanho médio do cristalito (D_v , nm) e os parâmetros da rede foram determinados a partir da equação de Scherrer e a distância interplanar (d_{hkl}) 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 $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ 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 ($5\text{--}15 \text{ mg}$, $25\text{--}800^\circ\text{C}$, 10 K min^{-1}).

3.5- Ensaio Viabilidade Celular

Células MC3T3, subcultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células/poço, serão expostas a cada extrato por 24 h a 37°C e 5% de CO_2 . 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 K Gy, 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 absorbância 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 Hidroxiapatita e hidroxiapatita carbonatada			x	x	x	x						
3) Ensaios de Adsorção e Liberação de fármaco						x	x	x	x			
4) Ensaios <i>In vitro</i> - viabilidade celular									x	x	x	
5) Produção de relatório											X	X

5. BIBLIOGRAFIA

- 1- Md Saquib Hasnain, Amit Kumar Nayak, Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications, Elsevier, 2019.
- 2- Shivakalyani Adepur, Seeram Ramakrishna, Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions, Molecules 2021, 26(19), 5905.
- 3- Piotr Rosiak, Ilona Latanska, Paulina Paul, Witold Sujka, Beata Kolesinska, Review Modification of Alginates to Modulate Their Physic-Chemical Properties and Obtain Biomaterials with Different Functional Properties, Molecules 2021, 26, 7264.
- 4- Nguyen Hoc Thang, Truong Bach Chien 1 and Dang Xuan Cuong, Review Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview, Gels 2023, 9, 523.
- 5- 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-Leão, Alexandre Rossi, Mônica Calasans-Maia, Doxycycline containing hydroxyapatite ceramic microspheres as a bone-targeting drug delivery system, J Biomed Mater Res. 2020;108B:1351–1362.

6- C. A. Soriano de Souza, A. P. V. Colombo, R. M. Souto, C. M. Silva-Boghossian, J. M. Granjeiro, G.G. Alves, A. M. Rossi, M. Helena M. Rocha-Leão, Adsorption of chlorhexidine on synthetic hydroxyapatite and in vitro biological activity, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 87 (2), 2011, 310-318.