

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
(CEFET-MG)**

João Lucas Isidoro dos Santos

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA PURA,
INCORPORADAS COM METOTREXATO, E DOPADAS COM Cu COMO UM
POTENCIAL AGENTE TERAPÊUTICO CONTRA OSTEOSSARCOMA**

Belo Horizonte (MG)

2021

João Lucas Isidoro dos Santos

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA PURA,
INCOPORADAS COM METOTREXATO, E DOPADAS COM Cu COMO UM
POTENCIAL AGENTE TERAPÊUTICO CONTRA OSTEOSSARCOMA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica. Orientador: Prof.^a Dra. Esther M. F. Lucas. Coorientadora: Prof.^a Dra. Edésia M. B. de Sousa.

CEFET-MG

Belo Horizonte (MG)

2021

João Lucas Isidoro dos Santos

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA PURA,
INCOPORADAS COM METOTREXATO, E DOPADAS COM Cu COMO UM
POTENCIAL AGENTE TERAPÊUTICO CONTRA OSTEOSSARCOMA**

Trabalho de conclusão de curso do Bacharelado em Química Tecnológica

CEFET-MG

Belo Horizonte, 24 de março de 2021.



Prof.ª Dra. Esther Maria Ferreira Lucas.

(orientadora – CEFET-MG)



Prof.ª Dra. Edésia M. B. de Sousa.

(coorientadora – CDTN-CNEN)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a você mãe, Rosa, por investir em mim e acreditar no meu potencial e sonhos. Essa conquista é nossa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe Rosa pelo apoio incondicional e compreensão nos momentos difíceis, sem ela eu não chegaria aonde estou! Você é o maior presente que a vida me deu, amo você!

Agradeço ao meu pai e irmão, João e Gabriel, pelo enorme apoio e incentivo nessa empreitada. Vocês foram fundamentais nessa caminhada, amo vocês!

Sou imensamente agradecido às professoras Dra. Edésia Martins Barros de Sousa e Dra. Esther Maria Ferreira Lucas pela dedicação, ensinamentos, paciência e confiança em mim. A Ciência ficou mais bela ao lado de vocês.

Agradecimento aos membros do Laboratório de Materiais Nanoestruturados para Bioaplicações (LMNB), Áurea, Barbara Nery, Daniele, Gabriel (iniciação científica), Gabriel Monteiro, Gracielle, Isabela, Luísa, Nathália Cunha, Rafaela e Wellington. A minha querida amiga Clara, você e sua família são o suporte que eu mais precisei na minha caminhada científica e pessoal. A você Marcelo por todo o conhecimento compartilhado deixo um agradecimento especial, sem sua ajuda esse trabalho não estaria moldado. E por todos os amigos feitos no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN), de todas as áreas e setores, vocês foram fundamentais na minha permanência no mundo científico.

Ao Professor, Coordenador de curso, ex-diretor do CEFET-MG e amigo Dr. Márcio Silva Basílio pelo apoio incondicional e ajuda no meu caminho pelo sonhado diploma. Deixo aqui um abraço a todos os pilares (servidores, alunos) do CEFET-MG (Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais), e todos que de alguma forma fizeram parte dessa instituição, eu amo vocês.

DCE (Diretório Acadêmico) do CEFET-MG, Rosana e toda a equipe, sou imensamente grato a todos vocês.

Geraldo Neto (Gê), Christianna Lemos (Chris), Natália Marinho (Natt), Letícia Alves (Lets), Gabriela Fernandes (Gabi), com vocês aprendi o significado de amizade e amor. Se hoje me formo nessa instituição e por conta do forte laço que criei com vocês. Espero que sejamos assim unidos enquanto a ciência nos rodear. A palavra amor não é suficiente para descrever o que sinto por vocês.

Ao CDTN pelo suporte e estrutura e por me aceitar como parte desse importante centro de pesquisas, por financiarem o congresso que participei e que foi fundamental na minha formação. Agradeço à CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao MCTIC (Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações) pela bolsa de estudos.

EPÍGRAFE

“Há alguns que nascem com estrelas, e outros com
mais algumas, e mesmo que você não queira
acreditar, nasci com constelações...”

(Frida Khalo)

RESUMO

Nanopartículas de hidroxiapatita são amplamente estudadas no âmbito de bioaplicações, principalmente em pesquisas relacionadas a diagnóstico e terapia do câncer. Por possuir semelhança com a fase mineral do tecido ósseo, além de propriedades como biocompatibilidade e osteoindução, a hidroxiapatita é um material com grande potencial para ser aplicado no tratamento de osteossarcoma. As aplicações como biomaterial são ampliadas quando tal material é dopado com um agente teranóstico, que confere ao nanobiomaterial a característica de poder ser usado tanto para diagnóstico por imagem quanto para terapia de câncer. Um dos elementos que pode conferir propriedades teranósticas aos nanobastões de hidroxiapatita (HA) é o ^{64}Cu , um radioisótopo emissor de pósitrons, radiação beta menos e radiação gama, sendo um promissor agente teranóstico quando incorporado na estrutura da HA. A superfície de materiais como a hidroxiapatita pode ser modificada por meio do processo de incorporação, conferindo propriedades específicas ao sistema, como por exemplo, favorecendo a internalização de nanomateriais em células tumorais. Sendo assim, o presente trabalho busca sintetizar nanopartículas de hidroxiapatita pura e dopada com Cu, incorporando o metotrexato na hidroxiapatita pura, visando avaliar a sua estabilidade para a possível utilização desses compostos como sistemas terapêuticos. Ainda neste sentido, as características físico-químicas e morfológicas das amostras puras e incorporadas foram avaliadas por diferentes técnicas de caracterização, tais como Difração de raios X (XRD), Microscopia eletrônica de varredura (SEM), Microscopia eletrônica de transmissão (TEM), Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Análise termogravimétrica (TGA). Além disso, foi feito o teste de estabilidade a fim de investigar a força de interação entre o material de incorporação e a hidroxiapatita pura.

Palavra-chave: nanomaterial, hidroxiapatita, metotrexato.

ABSTRACT

Hydroxyapatite nanoparticles are widely studied in the scope of bioapplications, mainly in research related to cancer diagnosis and therapy. Because it is similar to the mineral phase of bone tissue, in addition to properties such as biocompatibility and osteoinduction, hydroxyapatite is a material with great potential to be applied in the treatment of osteosarcoma. The applications as biomaterial are expanded when such material is doped with a theranostic agent, which gives the nanobiomaterial the characteristic of being able to be used for both diagnostic imaging and cancer therapy. One of the elements that can confer theranostic properties to hydroxyapatite (HA) nanobonds is ^{64}Cu , a positron emitting radioisotope, beta minus radiation and gamma radiation, being a promising theranostic agent when incorporated into the structure of HA. The surface of materials such as hydroxyapatite can be modified through the incorporation process, giving specific properties to the system, such as, for example, favoring the internalization of nanomaterials in tumor cells. Therefore, the present work seeks to synthesize nanoparticles of pure hydroxyapatite and doped with Cu, incorporating methotrexate in pure hydroxyapatite, aiming to evaluate its stability for the possible use of these compounds as therapeutic systems. Still in this sense, the physical-chemical and morphological characteristics of the pure and embedded samples were evaluated by different characterization techniques, such as X-ray diffraction (XRD), Scanning electron microscopy (SEM), Transmission electron microscopy (TEM), X-ray excited photoelectron spectroscopy (XPS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Thermogravimetric Analysis (TGA). In addition, the stability test was carried out in order to investigate the interaction force between the incorporation material and the pure hydroxyapatite.

Keywords: nanomaterial, hydroxyapatite, methotrexate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Proliferação de Células cancerígenas.	18
Figura 2 – Regiões do tecido ósseo.	20
Figura 3 – Sistema esquelético humano.	20
Figura 4 - Possíveis modificações na estrutura dos nanomateriais para conferir diversas funcionalidades.	26
Figura 5 - Célula unitária da estrutura da hidroxiapatita, os sítios de Ca, P, O e H representados pelas cores prata, rosa, vermelho e branco, respectivamente.	28
Figura 6 - Mecanismo de formação da HA porosa via processo sol-gel.	28
Figura 7 - Representação estrutural molecular do Metotrexato.	31
Figura 8 - Visão geral do metabolismo e transporte do folato.	31
Figura 9 - Esquema ilustrativo da ação do metotrexato.	32
Figura 10 - Difração de raios-X da amostra sintetizada de HA.	40
Figura 11 - Difração de raios-X da amostra sintetizada de HA-Cu.	41
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura das amostras de HA (a) e HA-Cu (b).	42
Figura 13 - Intervalo de distribuição dos nanobastões de HA e HA-Cu.	42
Figura 14 - Microscopia eletrônica de transmissão das amostras de HA (a - b) e da HA-Cu (c - d).	43
Figura 15 - Espectro amplo de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X de HA.	44
Figura 16 - Espectro amplo de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X de HA-Cu.	45
Figura 17 - Representação estrutural molecular do Metotrexato.	46

Figura 18 - Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier da HA, HA-Cu, MTX e HA-MTX.....	47
Figura 19 - Análise Termogravimétrica da HA-MTX, MTX, HA-Cu e HA.	48
Figura 20 - Teste de estabilidade da HA-MTX (pH5) e HA-MTX (pH7).	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEFET-MG - Centro Federal de Educação tecnológica de Minas Gerais

CDTN - Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear

CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear

EPR – Efeito de permeabilidade e retenção aumentadas

FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier)

HA - Hidroxiapatita

HA-Cu - Hidroxiapatita dopada com ⁶⁴Cu

HA-MTX - Hidroxiapatita incorporada com metotrexato

ICDD - *International Centre for Diffraction Data* (Centro Internacional para Dados de Difração)

LMNB - Laboratório de Materiais Nanoestruturados para Bioaplicações

MCTIC - Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações MTX - Metotrexato

SENAN - Serviço de Nanotecnologia e Materiais Nucleares

SEM - *Scanning Electron Microscopy* (Microscopia Eletrônica de Varredura)

TGA - *Thermogravimetric Analysis* (Análise Termogravimétrica)

TEM - *Transmission Electron Microscopy* (Microscopia Eletrônica de Transmissão)

XPS - *X Rays Photoelectrons Spectroscopy* (Espectroscopia por Fotoelétrons de Raios-X)

XRD - *X-Ray Diffraction* (Difração de Raios-X)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MOTIVAÇÃO	17
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1. NEOPLASIAS E SEUS TRATAMENTOS	18
4.1.1. AS PATOLOGIAS PROMOVIDAS PELAS NEOPLASIAS	18
4.1.2. CÂNCER ÓSSEO (OSTEOSSARCOMA)	19
4.1.3. OS TRATAMENTOS EMPREGADOS PELA MEDICINA.....	21
4.1.4. ENGENHARIA DE TECIDOS E BIOMATERIAIS	22
4.1.5. SISTEMA DE LIBERAÇÃO LOCALIZADA DE FÁRMACOS	24
4.2. AS POTENCIALIDADES DA HIDROXIAPATITA NO TRATAMENTO DO OSTEOSSARCOMA .	26
4.2.1. ESTRUTURA DA MATRIZ ÓSSEA E HIDROXIAPATITA	26
4.2.2. DOPAGEM DA HIDROXIAPATITA COM ⁶⁴ Cu	29
4.2.3. METOTREXATO E SUA INCORPORAÇÃO NA HIDROXIAPATITA COMO POTENCIAL AGENTE QUIMIOTERÁPICO	30
4.3. MÉTODOS EMPREGADOS NA CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS FORMADOS	32
5. METODOLOGIA	34
5.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA	34
5.2. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA DOPADAS COM Cu	34
5.3. INCORPORAÇÃO COM METOTREXATO	35
5.4. TESTE DE ESTABILIDADE	36
5.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA	37
5.5.1. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X	37
5.5.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	37
5.5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	37
5.5.4. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X.....	38
5.5.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ÍNFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	38
5.5.6. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
6.1. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X	39

6.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	41
6.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	43
6.4. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X	44
6.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER	45
6.6. TERMOGRAVIMETRIA.....	48
6.7. TESTE DE ESTABILIDADE.....	49
7. CONCLUSÃO	50
8. PREPOSIÇÕES FUTURAS.....	51
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

O estudo dos fármacos iniciou-se com a utilização de plantas medicinais praticada desde o início do desenvolvimento das civilizações humanas, evoluindo à fase da química sintética na metade do século XX e, finalmente, a era biotecnológica no início do século XXI. Atualmente os grandes avanços tecnológicos, incluindo o acentuado desenvolvimento de novas formas de liberação de fármacos envolvem pesquisas científicas multidisciplinares. Uma formulação farmacêutica ideal é aquela capaz de liberar a substância ativa no seu órgão alvo em doses terapêuticamente relevantes, com mínimos desconfortos e efeitos colaterais para o paciente. Uma das principais características de um medicamento é a sua estabilidade, conferindo segurança, eficácia e minimização dos efeitos colaterais. A fim de estender a ação do medicamento, a sua segurança e eficiência é utilizado o sistema de liberação de drogas controlado no organismo. Atualmente os sistemas estudados capazes de promover a liberação de maneira controlada dos fármacos no organismo são: Lipossomas, filmes poliméricos, sistemas transdérmicos, microemulsões, nano e micropartículas, entre outros (BIZERRA; SILVA, 2016).

A necessidade de novos materiais para construção de dispositivos de liberação controlada de drogas surge como um desafio inovador para profissionais das áreas de engenharia e saúde. A seleção dos materiais mais adequados para o desenvolvimento de dispositivos carreadores é baseada na investigação das propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, biorreabsorvibilidade, taxa de degradação, tamanho de poro e morfologia da superfície do material (ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, 2006).

Nas últimas décadas, pesquisas baseadas na associação de radioisótopos e sistemas carreadores nanoestruturados têm demonstrado resultados significativos na melhoria da seletividade de ação, bem como na redução da dose de radiação a tecidos, quando estes são utilizados no tratamento de câncer. O grande interesse em promover o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de radiofármacos no tratamento do osteossarcoma advém do fato de que, dentre os tumores ósseos malignos primários, o osteossarcoma é o tipo mais comum, atingindo principalmente crianças e adolescentes na segunda década de vida, ou seja, durante a fase de crescimento na puberdade, representando 20% dos cânceres primários e 5% dos tumores na infância (CASTRO et al., 2014).

Considerando os motivos expostos no texto acima, este trabalho se propôs a sintetizar e a investigar a estabilidade de nanopartículas de hidroxiapatita incorporadas com metotrexato e de nanopartículas de hidroxiapatita dopadas com Cu.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de hidroxiapatita pura e dopada com Cu, incorporando o metotrexato na hidroxiapatita pura, visando avaliar a sua estabilidade para a possível utilização desses compostos como sistemas terapêuticos.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de hidroxiapatita pura e dopada com Cu com morfologia controlada;
- Incorporar as nanopartículas de hidroxiapatita pura com metotrexato;
- Caracterizar físico-química e morfologicamente as nanopartículas de hidroxiapatita pura e dopada com Cu e as incorporadas com metotrexato;
- Submeter o material preparado a testes de estabilidade com as nanopartículas de hidroxiapatita pura incorporada com metotrexato.

3. MOTIVAÇÃO

O osteossarcoma é um tipo de tumor definido como neoplasia mesenquimal maligna, provocando diferenciações na formação óssea. Os locais mais comuns para incidência de osteossarcoma são regiões com altas taxas de crescimento, como as metáfises dos ossos tubulares, como fêmur distal e tíbio proximal (CHEN; EHLERDING; CAI, 2014). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva o tratamento do osteossarcoma tem dois pilares principais: quimioterapia multimodal sistêmica neoadjuvante e adjuvante e o tratamento local, através da abordagem cirúrgica (INCA, 2018).

Considerando esta realidade, existe uma necessidade emergente de se desenvolver alternativas terapêuticas mais efetivas para esta patologia, principalmente de forma a se evitar a reincidência da doença. Nesse contexto, a síntese de hidroxiapatita pura e incorporada com metotrexato, e dopada com radioisótopo terapêutico ^{64}Cu , é de grande importância na busca de opções terapêuticas mais eficazes. A hidroxiapatita atua como tecido mimético ao tecido ósseo, o ^{64}Cu como agente terapêutico radioativo (teranóstico), e o metotrexato como agente quimioterápico.

A avaliação da estabilidade do sistema hidroxiapatita, Cu e metotrexato também será avaliada neste estudo.

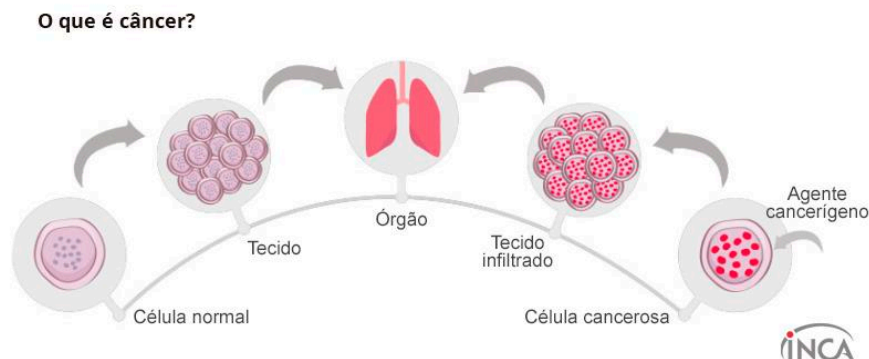
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Neoplasias e seus tratamentos

4.1.1. As patologias promovidas pelas neoplasias

A neoplasia é um tumor ocasionado pela multiplicação desordenada celular, que penetra os tecidos e os órgãos, uma doença que apresenta mais de 100 tipologias. Havendo dois tipos de neoplasias, as benignas e as malignas, sendo que as células dos tumores benignos crescem lentamente mantendo estrutura semelhante à estrutura de uma célula normal. Enquanto os tumores malignos possuem bordas mal delimitadas com contornos irregulares e mal definidas, sem respeitar a estrutura e funções do tecido, sendo este segundo tipo denominado câncer. As células cancerosas tendem a se dividir muito rápido, com muita agressividade e descontroladamente, criando focos de tumores onde podem se espalhar pelo corpo todo, esse fenômeno é conhecido como metástase de acordo com a Figura 1 (INCA, 2019).

Figura 1 - Proliferação de Células cancerígenas.



Fonte: (INCA, 2019).

A classificação dos diferentes tipos de câncer corresponde aos vários tipos de células do corpo. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas.

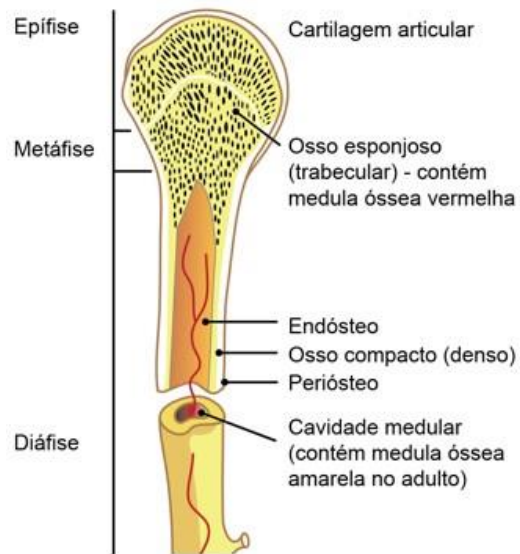
O diagnóstico do sarcoma, geralmente se dá pelo histórico clínico dos pacientes, em conjunto com a realização de exames complementares como cintilografia óssea com radioisótopos, Tomografia computadorizada (TC), Ressonância Nuclear Magnética (RMN), além de biópsia dos tecidos lesionados (CHEN et al., 2015). Durante as últimas décadas, as

principais abordagens terapêuticas empregadas no tratamento dos diversos tipos de câncer foram a cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A cirurgia tem como objetivo, além da cura através da retirada do tumor, o aumento da sobrevida e da qualidade de vida dos pacientes portadores de tumores sólidos. A quimioterapia, em suas várias formas, destina-se principalmente a atacar pequenos agregados de células tumorais, incluindo aqui tumores primários e metástases, já que esses tipos celulares são mais susceptíveis a ação dessas drogas por apresentarem taxa de crescimento maior que as células saudáveis. Os agentes quimioterápicos são administrados sistemicamente e, apesar de serem mais eficazes contra células tumorais agem também sobre os tecidos sadios, provocando uma série de efeitos colaterais como: supressão de medula óssea, náusea e vômitos, alopecia, toxicidade renal, cardíaca e neurológica etc. (SMITH; PREWETT, 2020). A radioterapia utiliza radiação ionizante, produzida por cátions específicos para o tratamento do câncer, como por exemplo o ^{64}Cu . Existem, basicamente, duas formas de radioterapia, a teleterapia, conhecida como radioterapia externa, é realizada com uso de aceleradores lineares, aparelhos de cobalto, entre outros. Nessa técnica, existe uma distância física entre o paciente e a fonte da radiação. E a braquiterapia, em que geralmente usam-se fontes de radiação em contato direto com os tecidos a serem irradiados. O objetivo da radioterapia é destruir o tecido doente e preservar, tanto quanto possível, as estruturas normais adjacentes ao tumor (MARTA, 2014; SALVAJOLI; SALVAJOLI, 2012).

4.1.2. Câncer ósseo (Osteossarcoma)

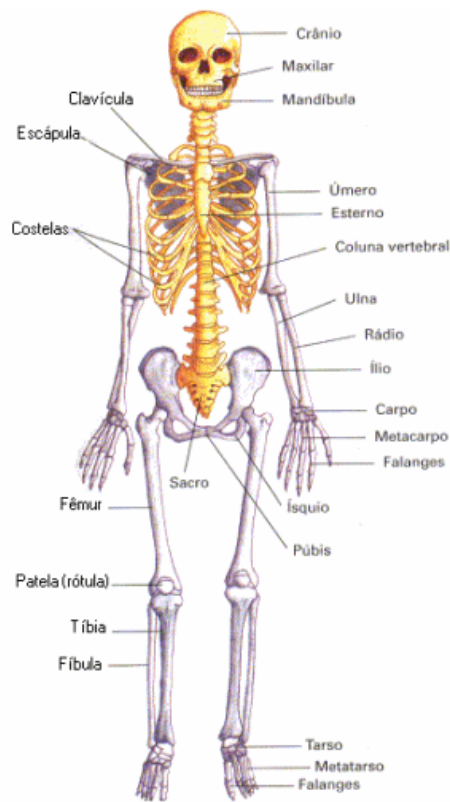
De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva o osteossarcoma é uma neoplasia, ocasionada pelo crescimento anormal e desordenado celular do tecido ósseo (INCA, 2018). Acomete principalmente a população infanto juvenil com idade entre 0 a 19 anos, mais frequente no sexo masculino. A região mais afetada por essa neoplasia é a região óssea da metáfise, porção de um osso comprido, situada entre a epífise e a diáfise, e onde se situa a cartilagem que assegura o crescimento ósseo como se pode ser visto na Figura 2. Os principais tecidos ósseos de ocorrência desse tipo de câncer são: fêmur, tíbia e região proximal de úmero mostradas na Figura 3, podendo ocorrer fraturas patológicas nestes pacientes.

Figura 2 – Regiões do tecido ósseo.



Fonte: (PROENEM, 2010).

Figura 3 – Sistema esquelético humano.



Fonte:(CATELLI INFANTOZZI COSTA RIBEIRÃO PRETO, 2008).

O osteossarcoma se apresenta na maioria dos casos como uma doença localizada, mas quando apresenta metástase, os principais órgãos afetados por ela são os pulmões e outros locais que possuem tecido ósseo. Quanto ao prognóstico, alguns fatores são muito relevantes como a localização do tumor, presença de metástase, idade do paciente e o índice de necrose neoadjuvante (INCA, 2018).

4.1.3. Os tratamentos empregados pela medicina

Atualmente dentre os métodos de tratamento oncológico a quimioterapia é a que possui maior índice de cura nos mais diversos níveis e tipos de cânceres. Esse método utiliza agentes químicos que possuem a capacidade de interferir no processo de desenvolvimento e divisão celular podendo ser usados com a finalidade de acabar com células tumorais do organismo podendo ser utilizados separadamente ou em combinação. Podem ser administrados pelas vias oral, intramuscular, subcutânea, intravenosa, intra-arterial, intratecal, intraperitoneal, intravesical, aplicação tópica e intra-retal, sendo a intravenosa a mais utilizada. Esses tipos de agente-químicos recebem o nome de quimioterápicos (CHEN; EHLERDING; CAI, 2014).

Os quimioterápicos comumente são classificados de acordo com a sua especificidade de ação no ciclo celular, seja esse um ciclo celular específico e/ou não específico. Os agentes químicos que atuam em um ciclo celular específico são mais letais a células que se encontram em uma determinada fase do ciclo, já os que atuam em ciclos celulares não específicos são letais às células em qualquer fase (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Outra classificação é em relação a sua estrutura química e função em nível celular, que se dividem como:

- 1) **Agentes alquilantes:** causam alterações nas cadeias de DNA, impedindo sua replicação, sendo capazes de destruir células em repouso ou em processo de divisão ativa.
- 2) **Agentes antimetabólitos:** estruturalmente semelhantes aos metabólitos naturais, atuam sobre células em fase de síntese do DNA, pois, incorporam-se a célula e, conseqüentemente, bloqueiam a produção das enzimas necessárias à síntese de substâncias fundamentais ou transmitem mensagens errôneas por se interporem às cadeias do DNA e RNA.
- 3) **Antibióticos antitumorais:** interferem na síntese dos ácidos nucléicos com conseqüente impedimento da duplicação e separação das cadeias de DNA e RNA (doxorubicina, daunorubicina, bleomicina e mitoxantrona).

- 4) **Inibidores de topoisomerase:** Esses medicamentos interferem nas enzimas denominadas topoisomerasas, que separam os filamentos de DNA para que possam ser copiados.
- 5) **Inibidores mitóticos:** compostos derivados de produtos naturais, como plantas. Eles agem impedindo as células de se dividirem para formar novas células, mas podem danificar as células em todas as fases do ciclo, ao impedirem que as enzimas produzam as proteínas necessárias para a reprodução celular.
- 6) **Corticosteroides:** também chamados de esteróides, são hormônios úteis no tratamento de muitos tipos de câncer, bem como de outras doenças. São medicamentos de ação anti-inflamatória e imunossupressora, ou seja, usada para suprimir os mecanismos de defesa do corpo.

De acordo com a (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015) existem também medicamentos quimioterápicos que agem de maneira adversa e não se classificam em nenhuma das categorias listadas acima. Exemplos incluem quimioterápicos como L-asparaginase, que é uma enzima, e o bortezomibe que é um inibidor de proteossoma.

Diante desses fatos, pode-se inferir que a quimioterapia é um tratamento sistêmico e os quimioterápicos aplicados nessa modalidade são tóxicos a qualquer tipo de proliferação, normais ou cancerosas, caracterizado por uma alta atividade mitótica e ciclo celular curto e, deste modo, tem como consequência o aparecimento de efeitos colaterais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Especificamente, em relação ao osteossarcoma, o tratamento padrão empregado é feito por meio da aplicação de um agente neoadjuvante quimioterápico, que é administrado após um tratamento considerado definitivo, em geral cirúrgico ou, mais raramente, radioterápico, juntamente à interseção cirúrgica. A radioterapia não é um tratamento utilizado com frequência, pois não discrimina as células sadias das células cancerígenas, ocasionando severos efeitos colaterais (CHEN; EHLERDING; CAI, 2014). Considerando as dificuldades expostas, existe uma necessidade emergente de estudos de novas formas de terapias e diagnóstico do osteossarcoma.

4.1.4. Engenharia de Tecidos e Biomateriais

A Engenharia de tecidos surgiu com a necessidade de criar tecnologias e alternativas viáveis para o desenvolvimento de células e órgãos para a substituição em tecidos lesionados,

tendo em vista que os biomateriais são uma ferramenta utilizada nesse ramo de conhecimento para aprimorar e dar assistência às funções de um tecido lesionado (OLIVEIRA et al., 2010). Essa especialidade da engenharia engloba três grandes princípios, divididos em: cultivo de tecidos humanos fora do corpo humano (*in vitro*); a implantação de dispositivos capazes de induzir a regeneração de tecidos humanos funcionais (*in vivo*) e o desenvolvimento de dispositivos, que podem ser internos ou externos, e que já contém o tecido humano arquitetado para substituir um tecido já degenerado (OLIVEIRA et al., 2010).

Na atualidade os procedimentos envolvidos na recuperação de tecidos podem ser subdivididos em autotransplantes, aloenxertos e xenoenxertos e o emprego de biomateriais. O primeiro se baseia no transplante de um tecido do próprio paciente na região afetada, reduzindo riscos de rejeição no organismo, haja vista que o tecido utilizado no procedimento é reconhecido pelo corpo, porém tem limitações quanto a disponibilidade de tecido. Já o segundo é um tipo de transplante que utiliza tecidos de outros indivíduos para recompor um tecido já danificado. Tendo em vista que o doador é de uma mesma espécie, porém a possibilidade de rejeição do tecido no corpo do transplantado é maior, além da possibilidade de transmissão de doenças e a demora no tempo para doações de órgãos. O terceiro, ou seja: são procedimentos que utilizam tecidos de doadores de espécies diferentes da humana, o que aumenta drasticamente o risco de rejeição e a transmissão de doenças e, por fim, têm-se a possibilidade de realizar os enxertos também com os biomateriais, que são alvos de diversos estudos pela busca por soluções que sejam menos danosas ao paciente (OLIVEIRA et al., 2010).

Os biomateriais são empregados em diversos tipos de problemas associados a saúde humana. Há registros de suas aplicações no Antigo Egito datadas em 2000 a.C.. Eles são definidos como sendo uma classe de materiais compatíveis com sistemas biológicos, podem ter origem sintética ou natural, são utilizados nas formas de sólidos, pastas, géis e líquidas. Os biomateriais podem ser biocompatíveis, biodegradáveis, biomiméticos e bioativos (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

A adesão celular nos biomateriais é um pré-requisito crucial para a reparação e regeneração tecidual, e neste caso a morfologia e estrutura da superfície dos biomateriais são consideradas características chaves que afetam a capacidade das células de aderirem. Assim, é muito importante entender a morfologia da estrutura, em particular a porosidade, porque esse

parâmetro afeta fortemente o desempenho mecânico e biológico das estruturas desenvolvidas (ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, 2006).

A aplicação dos biomateriais se inicia com a identificação da necessidade com posterior desenvolvimento do dispositivo, síntese do material, testes do material, fabricação, esterilização e embalagens, testes do dispositivo (toxicológicos, *in vitro* e *in vivo*), regulamentação, uso clínico e acompanhamento a longo prazo (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

A utilização e escolha incorreta dos biomateriais podem provocar inflamações crônicas, infecções, alergias, instabilidade interfacial tecido implante, incompatibilidade biomecânica, desempenho insatisfatório em longo prazo, que podem gerar perda do implante, deterioração dos tecidos, dor e cirurgias de revisão. As estratégias para o sucesso na aplicação dos biomateriais são: promover estabilidade interfacial entre tecidos e implantes, apresentar compatibilidade biomecânica, favorecer a regeneração de tecidos e órgãos, ser progressivamente substituído por tecidos saudáveis, substituir parcial ou totalmente tecidos e órgãos a partir de cultivos *in vitro*. Os estudos pautados no aperfeiçoamento de biomateriais são extremamente importantes para garantir melhores condições de vida para a população (LAKES, RODERIC S., PARK, 2007).

4.1.5. Sistema de liberação localizada de fármacos

Os novos sistemas de liberação de transporte de drogas vêm ganhando muita atenção nas últimas décadas, principalmente, porque a utilização da maioria dos compostos terapêuticos é sempre limitada pela impossibilidade de aumento de dosagem. Problemas inerentes à utilização do fármaco em concentrações elevadas levaram a um grande esforço dos pesquisadores, no sentido de desenvolver sistemas capazes de transportar o fármaco até um alvo específico, diminuindo, assim, os efeitos indesejáveis resultantes de sua ação em outros sítios (HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006).

Esses novos sistemas apresenta um transportador (carreador) ligado ao fármaco, responsável por sobrepor as propriedades físico-químicas limitantes dos fármacos encapsulados, melhorando, desta forma, a farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinética (controle da absorção e distribuição no organismo) e os efeitos toxicológicos (redução da toxicidade local e sistêmica) dos mesmos (HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006).

Para estudos de liberação de fármacos, primeiramente é realizada a incorporação do fármaco ao material, a etapa de encapsulamento, na qual o agente bioativo é adicionado ao material, seja nos poros ou na superfície externa do mesmo (KHATTI; HASHEMIANZADEH, 2016). A etapa de encapsulamento pode ser também realizada pela ligação covalente do fármaco ao material (CARVALHO et al., 2018). A interação do material ao fármaco, entretanto, tende a diminuir a efetividade do agente bioativo caso essa ligação não seja rompida quando em contato com o meio de liberação (LIU et al., 2014). O ensaio de liberação, por fim, consiste do contato de um material com um meio de liberação que reproduza as condições do organismo no qual o quimioterápico será liberado e a mediação a intervalos regulares da quantidade de fármaco que deixou o material (KHATTI; HASHEMIANZADEH, 2016).

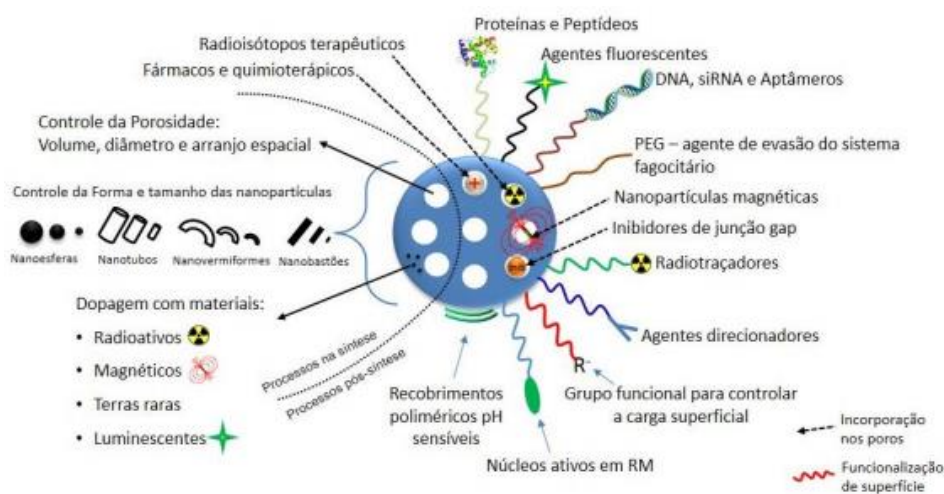
A entrega direcionada ou seletiva (*target delivery*) de agentes terapêuticos é uma propriedade extremamente desejada no tratamento de doenças oncológicas em que se objetiva a entrega da dose do agente citotóxico (fármaco, radiofármaco ou radioisótopo) por um longo período sem que haja comprometimento de tecido não-tumoral (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

Para um controle mais preciso da liberação de fármacos carreando antitumorais são desenvolvidos com o intuito de que esses medicamentos se acumulem no tecido tumoral, esse tipo de sistema denomina-se como *drug delivery system* (DDS). Este tipo de direcionamento pode ser ativo, por receptores, ou passivo, ao se aproveitar do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR). Por meio do EPR, que é caracterizado por um aumento da permeabilidade de vasos capilares na região tumoral, sistemas nanoscópicos de tratamento de câncer podem ser transportados do sangue para dentro do tumor, pois o fármaco se encontra encapsulado dentro de nanopartículas com tamanho médio entre 50 e 800 nm, não sendo capazes de atravessar vasos de regiões sadias, contrariamente das regiões inflamadas ou com a presença de tumores que apresentam um certo afastamento nas suas células endoteliais, resultando em um acúmulo de nanopartículas no tecido tumoral vizinho ao vaso sanguíneo (VIEIRA; GAMARRA, 2016). Isto possibilita a concentração do material nesse interior e uma entrega mais específica de agentes bioativos na região. A faixa de dimensão ideal para esse tipo de aplicação é da ordem de 100 nm, uma vez que partículas menores que essa faixa podem ser retiradas da corrente sanguínea pela ação renal (FERREIRA et al., 2015; FREITAS et al., 2016; LEE; YEO, 2015). A influência exercida pelas dimensões do material na efetividade como carreador para fármacos antitumorais estimula o desenvolvimento de sistemas com tamanho e

morfologia controlados adicionalmente à capacidade de resposta ao ambiente em que está suspenso (CIPRESTE et al., 2018).

O EPR possibilita o acúmulo de nanopartículas no sangue, promovendo uma circulação prolongada dessas substâncias. Diante desse fato é importante ressaltar que as nanopartículas têm que ser dispersáveis no sangue, possuir tamanho apropriado e não podem ser removidas pelo sistema fagocitário. É de grande importância que o conteúdo terapêutico presente na estrutura das nanopartículas só seja liberado no momento da sua incorporação nas células alvo, o que exige o equilíbrio entre hidrofobicidade e cargas (LIM et al., 2015). Recentes avanços nos estudos de nanomateriais têm explorado técnicas de modificação de superfície para prover essas características às nanopartículas como mostrado na Figura 4, que ilustra várias possibilidades para obtenção de um sistema constituído por nanopartículas multifuncionais.

Figura 4 - Possíveis modificações na estrutura dos nanomateriais para conferir diversas funcionalidades.



Fonte:(CIPRESTE et al., 2018).

4.2.As potencialidades da hidroxiapatita no tratamento do osteossarcoma

4.2.1. Estrutura da matriz óssea e hidroxiapatita

O osso humano é conhecido pelas suas capacidades de crescimento, regeneração e remodelação. As funções do tecido ósseo são a sustentação, proteção dos demais órgãos internos e estruturação corpórea. Ele é denominado como um tecido conjuntivo, pois apresenta rigidez, derivada de suas características mecânicas estruturais, e capacidade conectiva, servindo de suporte de várias outras estruturas do corpo (DOYLE, 1988).

Existem mais de 200 tipos de ossos no esqueleto humano, analisando macroscopicamente. Cada osso possui uma morfologia própria, dinâmica e altamente diversificada. Eles podem se diferir quanto ao tamanho e suas irregularidades morfológicas (LIU et al., 2020).

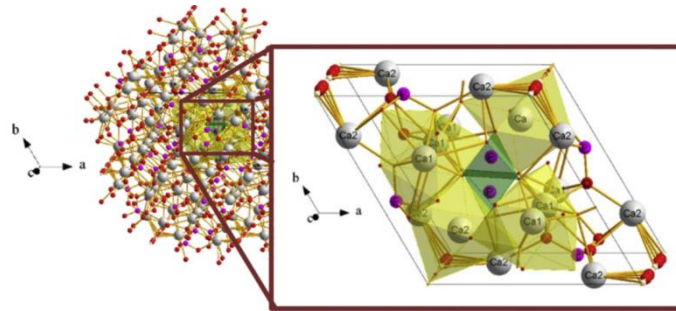
As principais formas de tecido ósseo são o esponjoso (trabecular) e o compacto (cortical), que se diferem por seus módulos de resistência. O osso é uma matriz celular com um nível de complexidade microscópica muito baixa. A sua estrutura é composta prioritariamente por uma fase líquida e uma sólida, caracterizando como um compósito. A matriz extracelular óssea é composta basicamente por um composto orgânico não mineralizado (principalmente o colágeno) e um composto inorgânico mineralizado (cálcio e fosfatos, principalmente a hidroxiapatita) o que lhe confere alta dureza. Dessa forma, a nanoestrutura dessas fibras de colágeno (resistentes e flexíveis) e reforçadas pela hidroxiapatita garantem ao tecido ósseo uma resistência à compressão satisfatória e elevada resistência à fratura (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012).

A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio hidratado do grupo mineral das apatitas, termo geral que designa os minerais cristalinos com a composição genérica de $M_{10}(ZO_4)_6X_2$. A HA apresenta fórmula química $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ e razão Ca/P de 1,67. Esse material apresenta notória biocompatibilidade, bioatividade, osteoindução e similaridade química com componentes minerais do corpo humano presentes em tecidos dentários e ósseos, o que a torna um importante tema de pesquisas atualmente (BAO; MITRAGOTRI; TONG, 2013; BOHARA; THORAT; PAWAR, 2016; LIM et al., 2015).

Temperaturas acima de 250 °C favorecem a transição alotrópica da forma monoclinica da hidroxiapatita para hexagonal, com seis grupos de PO_4 e dois OH conforme a Figura 5. Algumas impurezas, ou substituições parciais da hidroxila por íons cloreto ou fluoreto, estabilizam a forma hexagonal à temperatura ambiente. Por esse motivo, monocristais naturais de HA geralmente exibem uma conformação hexagonal com densidade de 3,16 kg/m³(VASCONCELOS; SANTOS; ROSA, 2016). O mecanismo de produção *via* sol-gel da HA porosa está representado na Figura 6, ele permite misturar a nível molecular os precursores de cálcio e fósforo, favorecendo a formação de HA de alta pureza utilizando temperaturas relativamente baixas de processamento. Outra versatilidade do processo sol-gel é a possibilidade de recobrimento de substratos metálicos, formando filmes homogêneos através

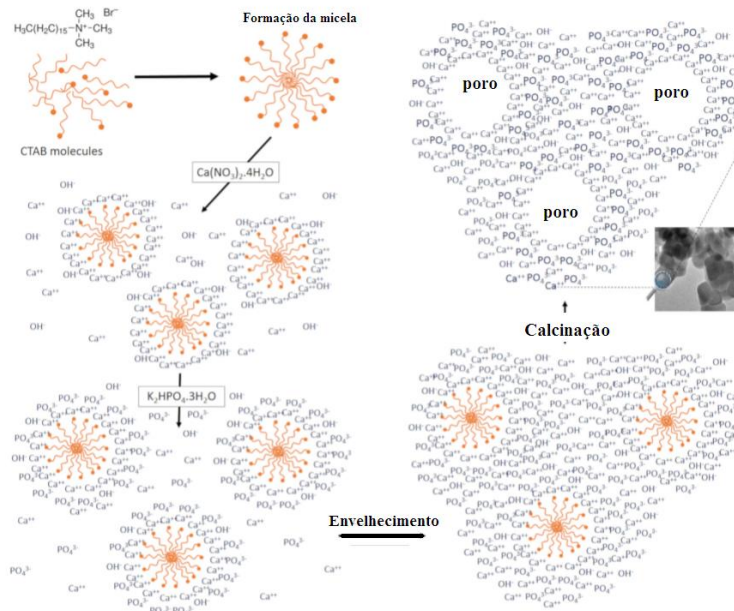
de processamento simples e de baixa temperatura. A síntese de HA via sol-gel ainda permite a produção de partículas nanométricas, que favorecem a integração óssea. Além da utilização do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) é um tensoativo catiônico constituído de um nitrogênio quaternário. Este surfactante é de fácil manipulação e tem suas propriedades bem definidas como solubilidade e concentração micelar crítica (CMC) (CIPRESTE et al., 2016).

Figura 5 - Célula unitária da estrutura da hidroxiapatita, os sítios de Ca, P, O e H representados pelas cores prata, rosa, vermelho e branco, respectivamente.



Fonte: (CIPRESTE et al., 2016).

Figura 6 - Mecanismo de formação da HA porosa via processo sol-gel.



Fonte: (CIPRESTE et al., 2016).

As aplicações como biomaterial são ampliadas quando tal material é dopado com um agente terapêutico e posteriormente incorporado com um fármaco (BAO; MITRAGOTRI;

TONG, 2013; BOHARA; THORAT; PAWAR, 2016; LIM et al., 2015). A dopagem confere ao nanobiomaterial a característica de poder ser usado tanto para diagnóstico por imagem quanto para terapia de câncer (CIPRESTE et al., 2016), e a sua incorporação favorece o tratamento ativo do sarcoma (BAO; MITRAGOTRI; TONG, 2013).

4.2.2. Dopagem da hidroxiapatita com ^{64}Cu

A estrutura cristalina da hidroxiapatita é estável e flexível, podendo hospedar cátions nas posições típicas dos íons Ca^{2+} ou em posições intersticiais (MIYAJI; KONO; SUYAMA, 2005). Essa característica permite a dopagem da rede de HA com o elemento cobre, especificamente o ^{64}Cu .

Mais recentemente, ^{64}Cu tem sido utilizado como um traçador para determinar o papel das proteínas chaperonas de cobre (uma quantidade significativa de proteínas precisa de ajuda para atingir a configuração terciária correta. Essa ajuda é fornecida por uma família de proteínas que, além de auxiliar o enovelamento proteico, encaminha a proteína à destruição, caso não seja possível atingir a configuração correta) como transportadores de cobre através da membrana celular, e para a via secretora nas células. Junto com o uso de radionuclídeos de cobre para sondar o bioquímica do cobre, há um número relativamente grande de radionuclídeos de cobre que são potencialmente adequados para uso em diagnóstico por imagem e / ou radioterapia direcionada, especificamente: ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{62}Cu , ^{61}Cu e ^{60}Cu (KARIMI; SADEGHI; MATAJI-KOJOURI, 2018). Esses radionuclídeos de cobre apresentam diversas propriedades nucleares, incluindo meia-vida de 10 min a 62 h, e decaimento por emissão de pósitrons (β^+) e / ou beta menos (β^-) e emissão gama (γ). A distribuição regional no tecido de todos esses radionuclídeos de cobre pode ser externamente avaliada com técnicas de imagem gama ou pósitron. Os cátions ^{67}Cu e ^{64}Cu foram objeto de investigações iniciais em imagens de tumor, seja como complexos de porfirina ou citrato. Nas últimas 2 décadas, tem havido um interesse crescente no uso de radionuclídeos de cobre no desenvolvimento de radiofármacos para imagens de tomografia por emissão de pósitrons (do inglês, *positron emission tomography* PET) de várias patologias, incluindo doenças cardiovasculares, inflamação e câncer. Houve grandes avanços nas áreas de produção de radiofármacos de cobre e desenvolvimento de radiofármacos de cobre para imagens PET e radioterapia direcionada (KARIMI; SADEGHI; MATAJI-KOJOURI, 2018).

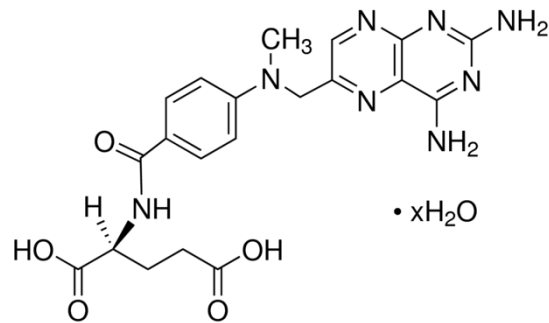
Um dos maiores desafios na produção de radionuclídeos para uso como traçadores biológicos ou diagnóstico por imagem e aplicações de radioterapia direcionada, está a produção de radionuclídeos com alta atividade específica. Isso significa que a quantidade de massa do nuclídeo não radioativo deve ser mantida em um mínimo. Na produção de radionuclídeos de cobre, este é um desafio ainda maior do que para outros radionuclídeos, uma vez que o cobre é onipresente no meio ambiente (HOLLAND et al., 2009). Para todos os isótopos de cobre, um alvo não cobre é usado para produzir radionuclídeos de cobre sem portador adicionado. Ao usar um alvo que possui um número atômico diferente, uma separação química do radionuclídeo de cobre do material alvo é possível. Além de usar material alvo sem cobre, as condições experimentais para preparar o alvo e separar os radionuclídeos de cobre do alvo devem ser tão isentas de metal quando possível (PIBIDA et al., 2017).

O ^{64}Cu foi escolhido como cátion radioterápico de estudo deste presente trabalho por apresentar vantagens em áreas como a medicina, pela redução na dose de radiação. Na eliminação de contaminação radioativa dos produtos industriais durante a manufatura, onde é usado como controle nos processos. Na possibilidade de fazer medidas repetidas num mesmo sistema sem ser necessário aplicar correções para a radioatividade residual e na eliminação ou diminuição do problema de dose residual (ATOMIC; AGENCY, 1963; EM; PESQUISA, 1978).

4.2.3. Metotrexato e sua incorporação na hidroxiapatita como potencial agente quimioterápico

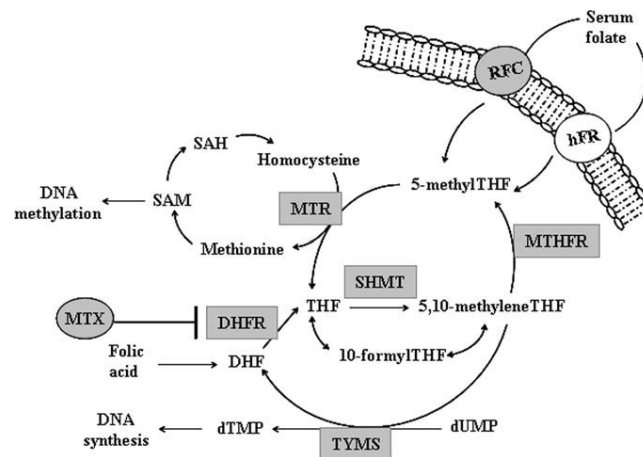
O metotrexato, representado na Figura 7, é caracterizado como um pó cristalino marrom-alaranjado, praticamente insolúvel em água, álcool, clorofórmio ou éter e solúvel em soluções alcalinas e com peso molecular de 454,4. É um antimetabólito análogo do ácido fólico, seja como terapia adjuvante ou neoadjuvante, que em altas doses (HD-MTX) é um dos principais medicamentos utilizados para o osteossarcoma. O MTX é um potente inibidor da diidrofolato redutase (DHFR), que converte diidrofolato (DHF) em tetraidrofolato (THF) ativo, um cofator essencial na biossíntese da desoxitimidina monofosfato (dTMP), um precursor na biossíntese do DNA como pode ser visto na Figura 8. Além disso, o poliglutamato, forma metabolizada de MTX, inibe várias outras enzimas envolvidas no ciclo do folato, como timidilato sintetase (TYMS), e o efeito combinado é a inibição do RNA e síntese de DNA.

Figura 7 - Representação estrutural molecular do Metotrexato.



Fonte: (PRICE, 2013).

Figura 8 - Visão geral do metabolismo e transporte do folato.



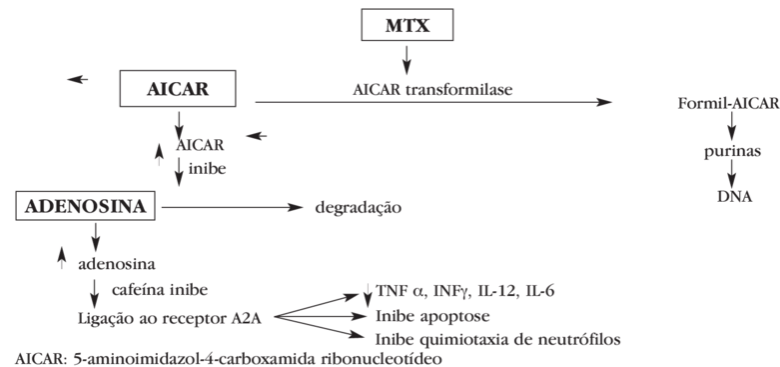
Fonte: (PATIÑO-GARCÍA et al., 2009)

A sensibilidade à deficiência da dMTP é mais acentuada quando as células cancerosas estão em um estado de divisão celular mais acentuado. Assim, o metotrexato, quando aplicado na dose apropriada, impede a síntese do DNA e RNA, conseqüentemente inibindo também o crescimento do tumor, por este motivo é utilizado como terapia neoadjuvante.

Estudos deixaram claro que o metotrexato possui efeito nos linfócitos cutâneos e nos circulantes (CRONSTEIN, 1997). *In vitro*, os queratinócitos se mostraram mil vezes mais

resistentes aos seus efeitos citotóxicos do que as células linfóides, confirmando sua propriedade imunossupressora. A droga age sobre o metabolismo da adenosina, gerando o seu acúmulo. A adenosina em excesso, por sua vez, se liga ao receptor A2A nas células endoteliais, inibindo apoptose, quimiotaxia de neutrófilos e liberação de $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-12, IL6 de acordo com a Figura 9. Daí resulta sua atividade antiinflamatória. Após uma hora de sua ingestão, a distribuição e a captação celulares estão completas. Na circulação, 50% do metotrexato encontram-se ligados a proteínas. Ele tem afinidade particular com hepatócitos, precursores mielóides, eritrócitos e fibroblastos. É convertido na forma poliglutaminada (predominantemente ativa), que persiste por meses e permite posologia semanal.

Figura 9 - Esquema ilustrativo da ação do metotrexato.



Fonte: (BRESSAN et al., 2010)

Os riscos iminentes associados ao seu uso em tratamento estimulam o desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada desse fármaco que levam ao uso de doses tão baixas quanto possível (CRONSTEIN, 1997; ŠUBR et al., 1997). O MTX vem sendo estudado como droga modelo para liberação a partir de nanomateriais, obtendo resultados de modulação da taxa de liberação pelo meio por diversos materiais (ALINEJAD; KHAKZAD; MAHDAVIAN, 2018; FREITAS et al., 2017; MONTEIRO et al., 2019), estimulando o seu uso como droga modelo neste estudo.

4.3. Métodos empregados na caracterização dos sistemas formados

Para a caracterização dos materiais sintetizados foram utilizadas as técnicas de difração de raios X (do inglês *X-Ray Diffraction*, XRD) para analisar as fases cristalinas nos nanobastões

de HA puros, dopados e incorporados, na qual os átomos em arranjos cristalinos fazem com que um feixe de raios X incidentes difratem em muitas direções específicas, possibilitando medir os ângulos e as intensidades dos feixes difratados. A Microscopia eletrônica de varredura (do inglês *Scanning Electron Microscopy*, SEM) e a Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês *Transmission Electron Microscopy*, TEM) são um tipo de microscopia em que um feixe de elétrons focalizado varre a superfície da amostra, interagindo com a matéria, gerando diferentes tipos de sinais que podem oferecer informações sobre a morfologia e composição química dos materiais obtidos, respectivamente. A Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (do inglês *X-Rays Photoelectrons Spectroscopy*, XPS) permite a investigação da superfície, sendo principalmente usada na investigação de mudanças química e estrutural dos elementos presentes na superfície do material estudado, através do efeito fotoelétrico. A Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) baseia-se no fato de que a maioria das moléculas absorvem luz na região infravermelha do espectro eletromagnético, convertendo-a em vibração molecular. Esta absorção é característica da natureza das ligações químicas presentes em uma amostra, técnica essa usada para caracterizar as bandas de absorção dos sistemas formados. A Análise termogravimétrica (do inglês *Thermogravimetric Analysis*, TGA) relaciona a perda de massa com um gradiente de temperatura, podendo assim, através da análise dos dados, avaliar a estabilidade térmica do material estudado, além de permitir uma avaliação do processo de incorporação do fármaco MTX.

5. METODOLOGIA

A metodologia adotada no presente trabalho se baseia em trabalhos já desenvolvidos e publicados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Materiais Nanoestruturados para Bioaplicações (LMNB) do CDTN (FERREIRA et al., 2015; FREITAS et al., 2016, 2017; MONTEIRO et al., 2019). Foi utilizado o fármaco metotrexato, a fim de se estudar a influência de suas interações com os materiais estudados na incorporação e estabilidade desse quimioterápico. As amostras de hidroxiapatita pura e dopadas com Cu foram sintetizadas e purificadas. O metotrexato foi incorporado posteriormente as amostras de hidroxiapatita pura. Após cada etapa, síntese, purificação e incorporação de moléculas específicas, os materiais foram caracterizados.

5.1. Síntese de nanopartículas de hidroxiapatita

As nanopartículas de hidroxiapatita foram sintetizadas, com pequenas alterações da metodologia descrita na (NGUYEN et al., 2013; VERMA et al., 2013) a partir da preparação de duas soluções precursoras. A solução (i) foi preparada promovendo-se a completa dissolução de 800 mg do Pluronic®F-127 (Sigma-Aldrich) como direcionador de rede, em 40 mL de água Milli-Q® (pH 6,5) e a posterior adição de 3,124 g de nitrato de cálcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) para se obter uma concentração final de $0,167 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ de cálcio, seguida do ajuste do pH do meio para 10 com NH_4OH ($3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). A solução (ii) foi preparada com a dissolução de 1,82 g de monohidrogênio fosfato de dipotássio, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) em 30 mL de água Milli-Q® para se obter uma solução com concentração final de $0,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ de potássio, seguida do ajuste do pH do meio para 10 com NH_4OH ($3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). Esta solução foi transferida para o reservatório da bureta automática. Deixou-se a solução (i) sob agitação moderada, gotejando lentamente a solução (ii) utilizando uma bureta digital. Após o processo de adição da solução (ii) sobre a solução (i), a suspensão resultante foi transferida para uma autoclave onde foi realizado um tratamento hidrotérmico a 150°C por 3 horas. Em seguida, a suspensão obtida foi centrifugada, lavada e submetida à filtração a vácuo com água Milli-Q® e acetona. O material filtrado foi seco em estufa durante 24 horas à temperatura de 60°C .

5.2. Síntese de nanopartículas de hidroxiapatita dopadas com Cu

As nanopartículas de hidroxiapatita dopadas com Cu foram sintetizadas, empregando método descrito na literatura com pequenas alterações da literatura a partir da preparação de

três soluções precursoras. A solução (i) foi preparada com a completa dissolução de 800 mg do Pluronic®F-127 (Sigma-Aldrich) como direcionador de rede, em 40 mL de água Milli-Q® (pH 6,5) e a posterior adição de 3,124 g de nitrato de cálcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) para se obter uma concentração final de $0,167 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ de cálcio, seguida do ajuste do pH do meio para 10 com NH_4OH ($3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). A solução (ii) foi preparada com a dissolução de 1,82 g de monohidrogênio fosfato de dipotássio, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) em 30 mL de água Milli-Q® para se obter uma solução com concentração final de $0,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ de potássio, seguida do ajuste do pH do meio para 10 com NH_4OH ($3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), transferindo para o reservatório da bureta automática. A solução (iii) foi preparada adicionando 22,5 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 10 mL de água Milli-Q®. Deixou-se a solução (i) sob agitação moderada, gotejando simultaneamente lentamente sobre a solução (i) a solução (ii) utilizando uma bureta digital e a solução (iii) com auxílio de uma bureta comum (gota a gota). Após o processo de adição das soluções (ii) e (iii) sobre a solução (i), a suspensão resultante foi transferida para uma autoclave onde foi realizado um tratamento hidrotérmico a 150°C por 3 horas. Em seguida, a suspensão foi centrifugada e lavada a vácuo sob filtração com água Milli-Q® e acetona. O material filtrado foi seco em estufa durante 24 horas à temperatura de 60° .

5.3. Incorporação com metotrexato

A incorporação do fármaco foi efetuada apenas na HA pura (MTX/HA). Tal adição se deu pela suspensão do material em uma solução do fármaco Metotrexato (Sigma-Aldrich) em água Milli-Q® de concentração $750 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. O sistema foi submetido a agitação magnética constante por 72 h à 20°C para promover a incorporação do fármaco. A proporção entre fármaco e substrato foi de 1:1 (massa). Após o processo de incorporação a amostra foi filtrada e a concentração do fármaco no filtrante foi medida por espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), medida essa que foi utilizada para quantificar a quantidade de fármaco incorporado pelo material (MTX/HA). Após a incorporação, a amostra foi seca por 24 h à 60°C em estufa antes que os ensaios de estabilidade fossem realizados.

Os valores referidos das concentrações e frações incorporadas foram obtidos, empregando-se as equações apresentadas a seguir: apresentadas na Equação 1, Equação 2 e Equação 3. Na equação 4 é apresentada a fórmula para a determinação da fração mássica de fármaco nos materiais após a incorporação do agente quimioterápico a estrutura desse material sintetizado (MTX/HA).

Equação 1

$$\text{Concentração Filtrante} = \text{Concentração Lida} * \frac{\text{Volume Inicial} + \text{Volume Lavagem}}{\text{Volume Inicial}}$$

Equação 2

$$\begin{aligned} \text{Massa Incorporada} &= \text{Massa Inicial} - \text{Massa Filtrante} \\ &= \text{Massa Inicial} - (\text{Concentração Filtrante} * \text{Volume Inicial}) \end{aligned}$$

Equação 3

$$\text{Eficiência de Encapsulamento} = \frac{\text{Massa Incorporada}}{\text{Massa Inicial}}$$

Equação 4

$$\begin{aligned} \text{Fração Mássica de Fármaco no Material} \\ = \frac{\text{Massa Incorporada}}{\text{Massa do Material} + \text{Massa Incorporada}} \end{aligned}$$

5.4. Teste de estabilidade

Para realização do teste de estabilidade 4,0 mg da amostra foi posicionado no centro de membranas de diálise, para evitar que esta amostra se espalhasse pelo meio. As membranas foram imersas separadamente em 40 mL de solução-tampão de mesma força iônica (0,15 g.mol⁻¹), uma de fosfato com pH 5,0 e uma de borato com pH 7,0. Todo esse sistema foi vertido em potes de análise para encubação que ao final apresentava uma concentração de 0,1 mg.mL⁻¹. Todo o conjunto foi mantido sob agitação de 50 rpm à 37 °C em shaker, durante o ensaio.

A quantidade de fármaco liberada pelo material foi aferida pelo UV-Vis, sendo tomadas medidas em intervalos regulares de 15 minutos na primeira hora de ensaio, posteriormente em intervalos regulares de 1 hora no primeiro dia e diariamente a partir desse ponto até completar 7 dias e/ou os materiais apresentarem um patamar de estabilidade nas concentrações aferidas. O tempo de ensaio foi iniciado assim que a amostra foi adicionada ao interior das membranas semipermeáveis de diálise e posteriormente inseridas nos potes de análise contendo as soluções

tampão. Os experimentos foram realizados em um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-Vis V-2550, sendo que o comprimento de onda utilizado para os ensaios foi de 303 nm.

5.5. Caracterização Físico-Química e Morfológica

Todas as análises de caracterização foram conduzidas no Laboratório de Materiais Nanoestruturados para Bioaplicações (LMNB) do Setor de Nanotecnologia e Materiais Nucleares (SENAN) do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) exceto quando discriminado outro centro onde o ensaio foi realizado.

5.5.1. Difração de Raios-X

A identificação do arranjo hexagonal da HA e da HA-Cu foi realizada por meio da Difração de Raios-X, em um difratômetro de Raios X Ultima IV® (Rigaku Inc.). O instrumento é equipado com um anodo de cobre (comprimento de onda $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). O gerador 3 kW de rotação foi operado com 40 kW e 30 mA. A radiação espalhada foi gravada utilizando um contador de cintilação. Uma fita de níquel foi utilizada para filtrar os brancos de radiação gerados pelo anodo de cobre. A distância amostra-detector foi cerca de 30 cm e os ângulos de espalhamento percorridos foram $2\Theta = 0,1 - 8,0^\circ$.

5.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para o estudo da morfologia do material cerâmico, foram obtidas imagens do material puro e dopado com Cu através da microscopia eletrônica de varredura. As imagens foram obtidas por microscópio eletrônico de varredura modelo MEV Quanta 200-FEG-FEI-2006 do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN). Para a realização da análise, foram preparadas soluções de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ de cada amostra em etanol. As soluções foram submetidas a banho de ultrassom por 10 minutos. Uma gota de cada solução foi adicionada a uma fita condutora de carbono dupla-face, que foram expostas a uma nuvem de ouro sublimado por cerca de 20 segundos.

5.5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens do material cerâmico puro e dopado com Cu, para o estudo da morfologia, foram obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Utilizou-se o equipamento do Centro de Microscopia da UFMG para a realização dessas imagens. As amostras foram dispersas em

etanol e sonificadas por 5 minutos em banho de ultrassom. Após decantação por 10 minutos, uma gota da solução foi depositada sobre uma grade-suporte de cobre de 300 mesh de malha, revestida com carbono. As imagens foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 – Spirit – FEI-2006 (operando a 120kV). A captura das imagens foi realizada com câmera CCD, com o software iTEM da Analyses.

5.5.4. Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X

A investigação da composição química superficial foi realizada por Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X. Os resultados de XPS fornecem uma análise quantitativa da composição química dos estados de oxidação dos elementos e dos compostos formados em uma amostra (SEAH, MARTIN P.; BRIGGS, 1994). As medidas foram realizadas com Raio-X monocromático de Al K α (E = 1486,6 eV) e com um analisador de hemisférios concêntricos (CLAM2 da VG Microtech). A energia dos elétrons excitados, provenientes da superfície do material estudado foi medida utilizando-se um analisador de energia de elétrons Specs Phoibos 150 MCD-9 detector XP. Os espectros amplos de XPS foram obtidos na região entre 0 e 1200 eV. As análises foram realizadas com as amostras colocadas em fita condutora sobre um porta amostras de inox com a câmara em uma pressão de base $5,0 \times 10^{-10}$ mbar.

5.5.5. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

A técnica de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier foi empregada para caracterizar os grupos funcionais típicos da rede da hidroxiapatita bem como avaliar a presença de grupos orgânicos incorporados na superfície da hidroxiapatita. Os espectros foram analisados utilizando o equipamento FTIR Nicolet 6700, Thermo Scientific operado em pastilhas de brometo de potássio (KBr) na proporção 1:10 de KBr, na faixa de comprimento de onda de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . Com resolução de 4 cm^{-1} com 64 varreduras.

5.5.6. Análise Termogravimétrica

As medidas de termogravimetria foram realizadas no equipamento (Shimadzu). O experimento foi realizado submetendo 3 mg da amostra em pó nas seguintes condições: condições de aquecimento $5^\circ\text{C}/\text{min}$, faixa de temperatura de 25 a 600°C e sob atmosfera de N_2 com fluxo de $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e célula de platina aberta.

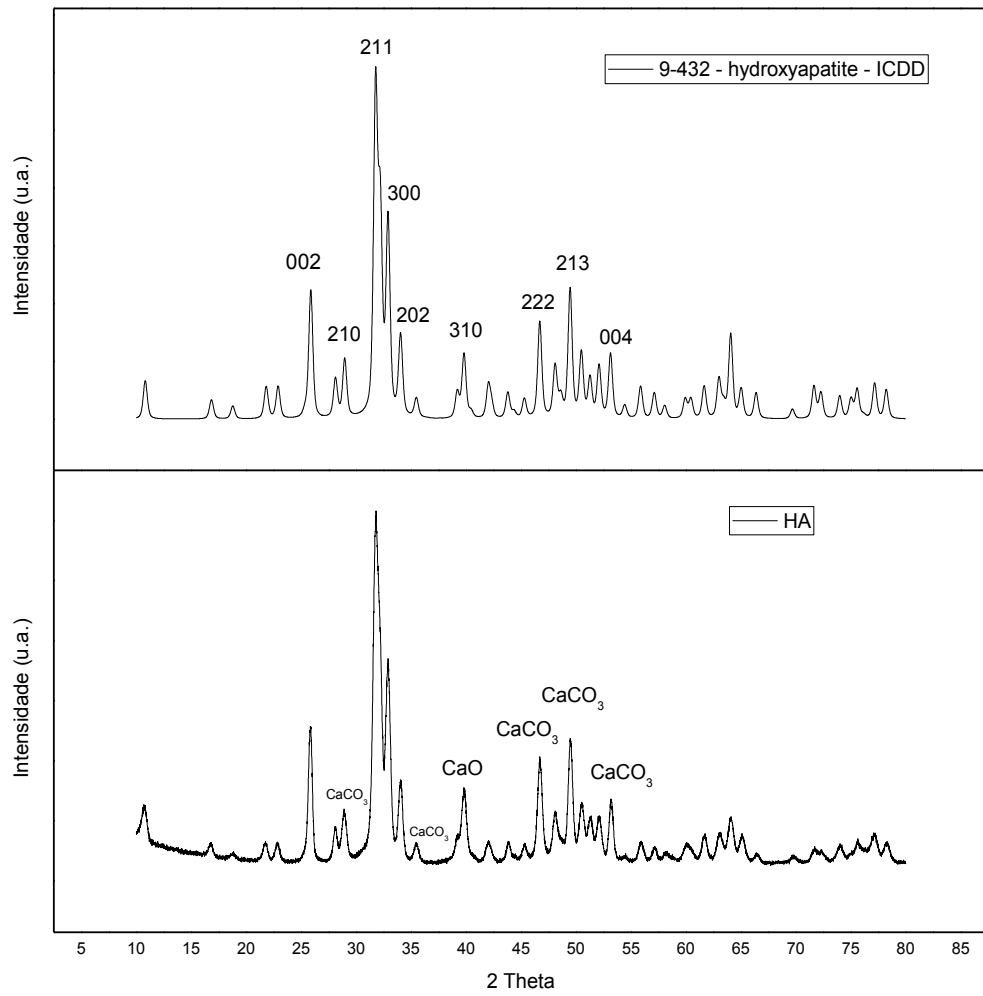
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O sistema de interesse a ser obtido nesse trabalho visando o diagnóstico e tratamento do osteossarcoma consiste em dopar a hidroxiapatita, que constitui a fase cristalina óssea atuando na recuperação da área afetada pelo tumor, com o agente teranóstico ^{64}Cu , que atuará principalmente na detecção/diagnóstico do tumor e em seu tratamento. Para potencializar o tratamento do osteossarcoma será inserido a estrutura da HA o fármaco metotrexato (MTX). Era esperado que os perfis de estabilidade do fármaco pelos materiais sintetizados fossem fortemente influenciados em função das interações presentes entre o material e antitumoral

6.1. Difração de Raios-X

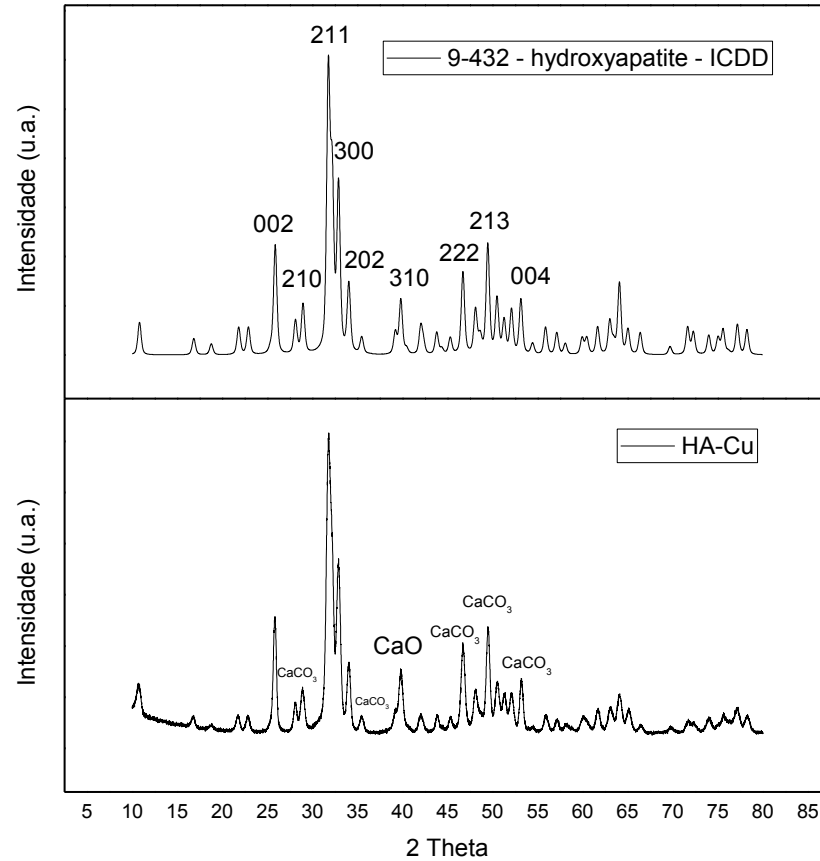
Os difratogramas apresentados nas Figuras 10 e 11, referentes respectivamente às amostras sintetizadas de HA pura e HA-Cu, apresentaram picos característicos de hidroxiapatita com cristalinidade média, similar ao padrão da fase mineral do osso humano, abrangendo os picos característicos do plano estrutural cristalino da hidroxiapatita, compreendendo os nove principais picos de posição angular entre 25° e 50° , indexados aos planos entre (002) e (310) {002, 210, 211, 300, 202, 310, 222, 213 e 004}. As impurezas de óxido de cálcio (CaO), possuem pico característico em $37,45^\circ$ decorrente da reação incompleta do nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$). O Carbonato de cálcio (CaCO_3) é outra impureza bastante comum na síntese da HA (29° , 36° , 47° , 49° e 54°). A formação do CaCO_3 também é decorrente de reação incompleta entre os precursores. O CaCO_3 tende a se decompor em CaO e CO_2 quando há aplicação de temperatura. O difratograma dos nanobastões de hidroxiapatita sintetizados sem a presença do íon cobre está apresentado na Figura 10. De acordo com o arquivo 09-0432 do banco de dados PDF do Centro Internacional para Dados de Difração (do inglês *International Centre for Diffraction Data*, ICDD), observa-se a formação de HA com arranjo hexagonal, grupo espacial P63/m e picos característicos no ângulo de Bragg (2θ) de aproximadamente 32° , 33° e 34° . Esses picos podem ser atribuídos às reflexões dos planos (211), (300) e (202) respectivamente, confirmando a formação de uma estrutura cristalina pura de hidroxiapatita em acordo com resultados encontrados na literatura (MANSO et al., 2002). O difratograma dos nanobastões de hidroxiapatita sintetizados com a presença do íon cobre está apresentado na Figura 11, esse resultado sugere que os cristais de hidroxiapatita podem se formar mesmo na presença de íons cobre.

Figura 10 - Difração de raios-X da amostra sintetizada de HA.



Fonte: Autor, 2021.

Figura 11 - Difração de raios-X da amostra sintetizada de HA-Cu.

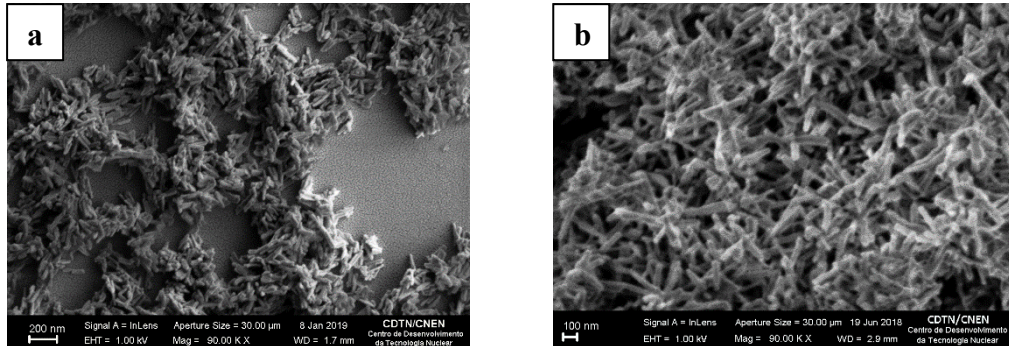


Fonte: Autor, 2021.

6.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Nas imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura mostradas na Figura 9, da amostra HA (a) e HA-Cu (b) respectivamente, é possível observar a formação de nanopartículas com morfologia de nanobastões, o que pode assegurar que a síntese foi feita com êxito e que o processo de dopagem com o cobre não alterou a morfologia característica da hidroxiapatita.

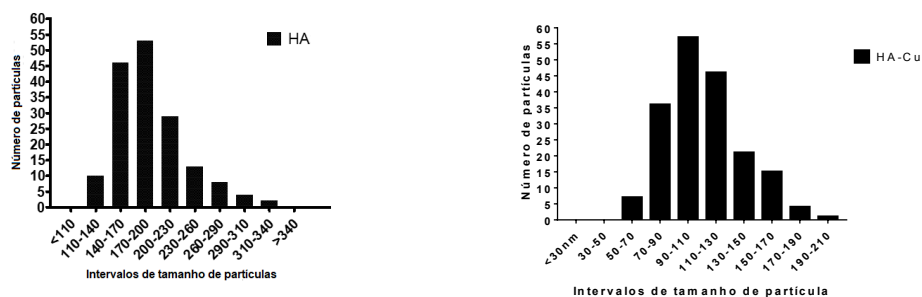
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura das amostras de HA (a) e HA-Cu (b).



Fonte: Autor, 2021.

Na Figura 13 é mostrada a distribuição do número de nanobastões de HA e HA-Cu pelo seu tamanho. Nela é possível evidenciar que há uma concentração de nanobastões na região que equivale ao tamanho de 170 a 200 nm de nanobastões de HA e 90 a 110 nm em nanobastões de HA-Cu, evidenciando a eficácia na obtenção de um nanomaterial e sugerindo uma tendência a distribuição normal para esse conjunto de dados. É possível perceber que a dopagem da HA com o íon Cu afetou o tamanho das nanopartículas, os diminuindo em relação aos nanobastões de HA pura. O tamanho dos poros foi compatível com tamanho mínimo para que seja possível hospedar componentes celulares e extracelulares dos ossos, além dos vasos sanguíneos, que deve ser acima de 100 nm.

Figura 13 - Intervalo de distribuição dos nanobastões de HA e HA-Cu.

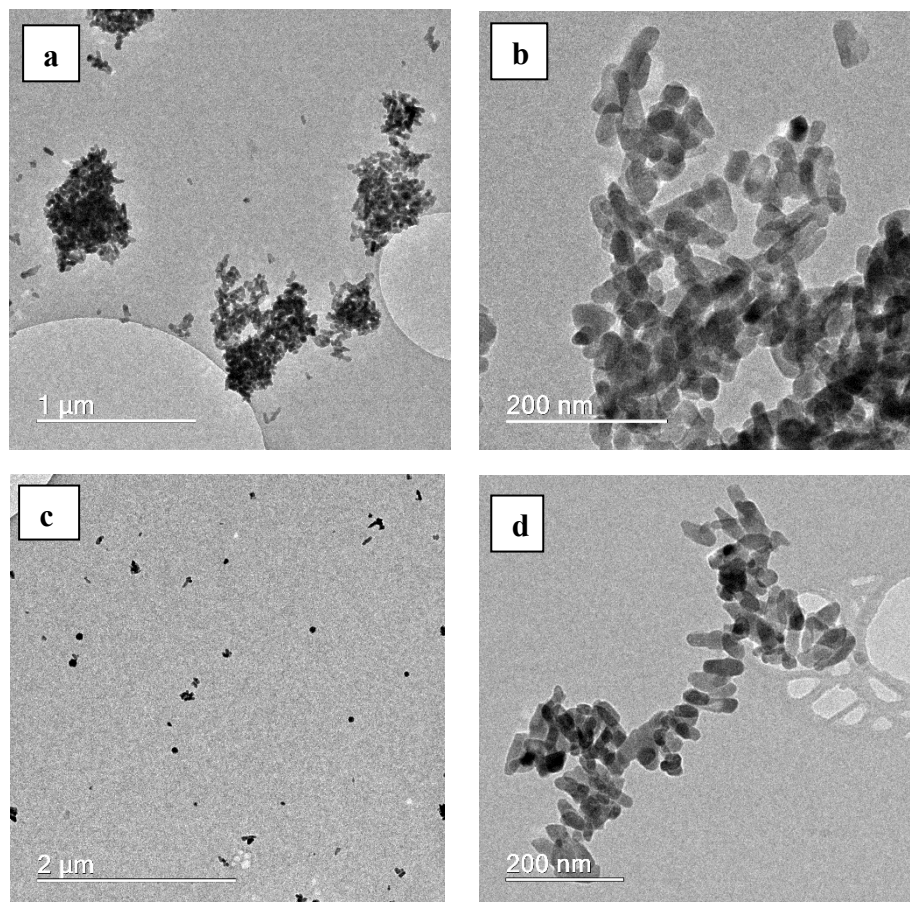


Fonte: Autor, 2021.

6.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para elucidar a estrutura cristalográfica da HA e da HA-Cu, a microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada. Essa técnica gera imagem de uma estrutura muito pequena a partir de feixes de elétrons focalizados em direção à amostra. A intensidade da difração depende da orientação dos planos dos átomos em um cristal em relação ao feixe de elétrons. A figura 14 (HA (a - b) e da HA-Cu (c - d)) confirma a morfologia de nanobastões das nanopartículas e através das imagens de alta resolução é possível observar que os nanobastões são constituídos de cristalitos menores (LI et al., 2014). As imagens na Figura 14 (HA-Cu (c - d)), mostram que o processo de dopagem não altera a estrutura e a morfologia dos nanobastões.

Figura 14 - Microscopia eletrônica de transmissão das amostras de HA (a - b) e da HA-Cu (c - d).

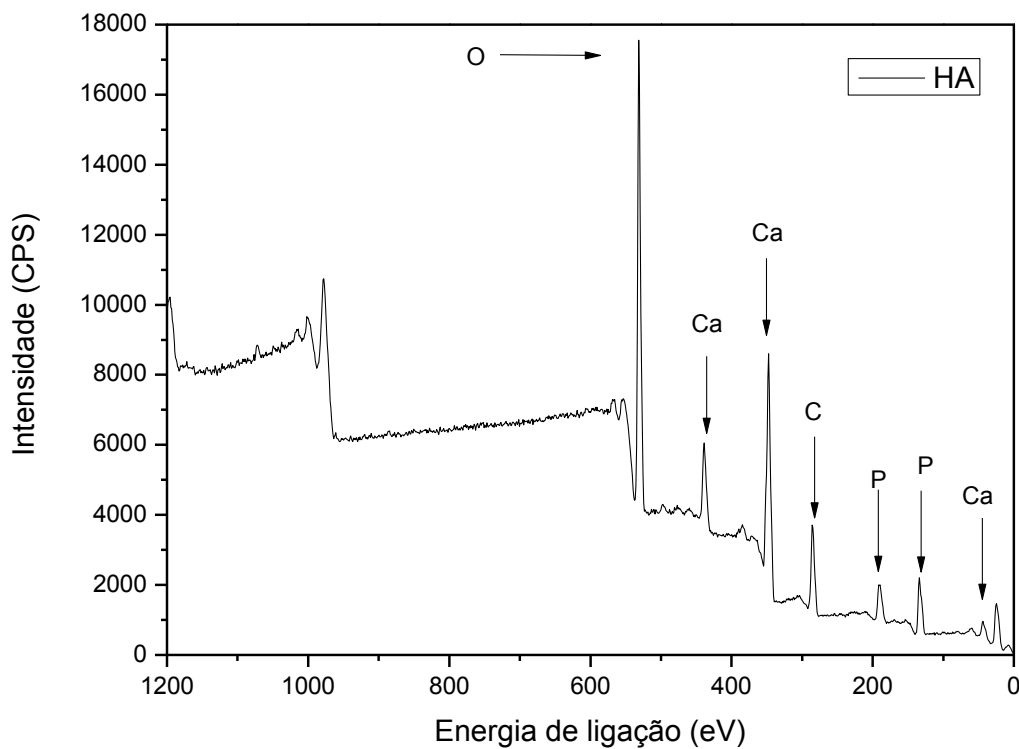


Fonte: Autor, 2021.

6.4. Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X

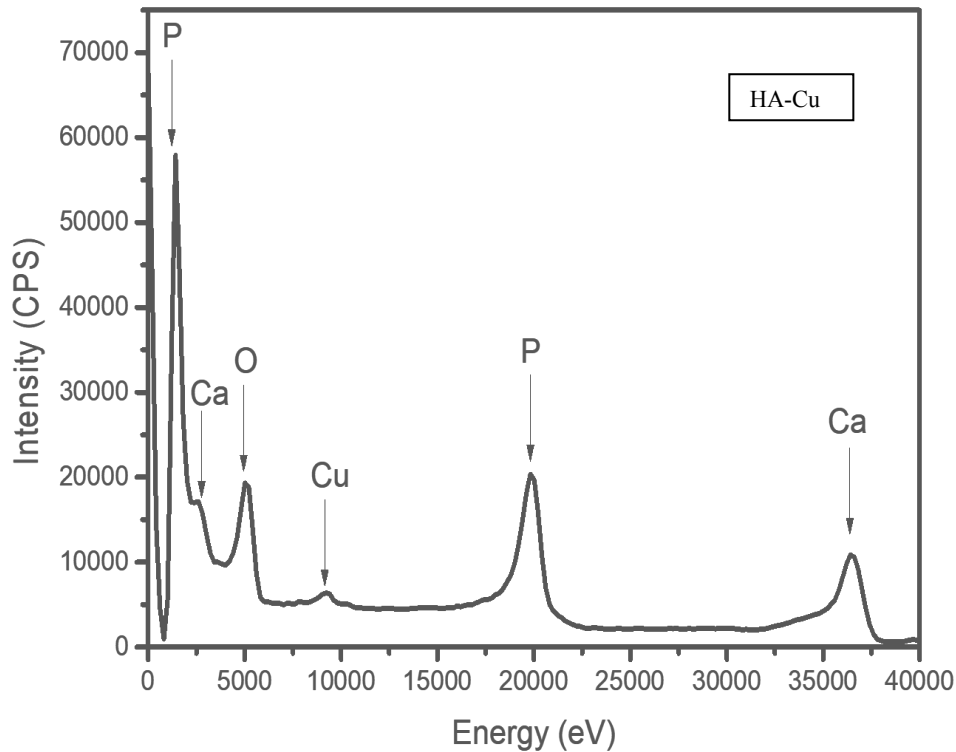
A técnica de XPS foi utilizada para obter informações sobre a composição química da superfície dos nanobastões, fazendo uma investigação no efeito de interação entre as duas fases através das propriedades elétricas da HA. A Figura 15 apresenta o espectro amplo das amostras de HA. A superfície da amostra de HA é constituída apenas de P, Ca, O e C. Na Figura 16, a amostra de HA-Cu apresenta em seu espectro um pico relacionado ao íon Cu. Os picos de carbono aparecem devido à presença de íons carbonato, e a contaminantes normalmente detectados na técnica de XPS.

Figura 15 - Espectro amplo de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X de HA.



Fonte: Autor, 2021.

Figura 16 - Espectro amplo de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X de HA-Cu.



Fonte: Autor, 2021.

6.5. Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier

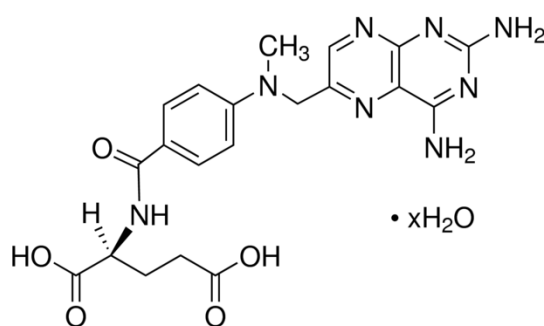
A técnica de FTIR possibilitou identificar bandas de absorção referentes aos modos de vibração dos principais grupos funcionais presentes na hidroxiapatita e metotrexato. Os resultados obtidos estão representados na Figura 14, juntamente com a estrutura molecular do MTX na Figura 13.

Os espectros de FTIR foram adquiridos para confirmar a composição química da Hidroxiapatita. A amostra apresentou bandas de transmitância referentes aos modos vibracionais característicos de HA, em acordo com a literatura (CIPRESTE *et al.*, 2016). Banda larga na região de 1036 cm^{-1} correspondem aos modos vibracionais de estiramento ν_1 e ν_3 do grupo fosfato, enquanto a região de bandas em 561 e 601 cm^{-1} indicam a presença dos modos vibracionais ν_2 e ν_4 de flexão desse mesmo grupo. As bandas referentes as vibrações do grupo O-H podem ser observadas em 3571 , 1636 e 625 cm^{-1} . A banda larga observada em 3734 e

2917 cm^{-1} pode ser atribuída aos modos vibracionais da água (KIM et al., 2004). As bandas observadas em 1412 e 1471 cm^{-1} podem ser atribuídas à presença de carbonato substitucional.

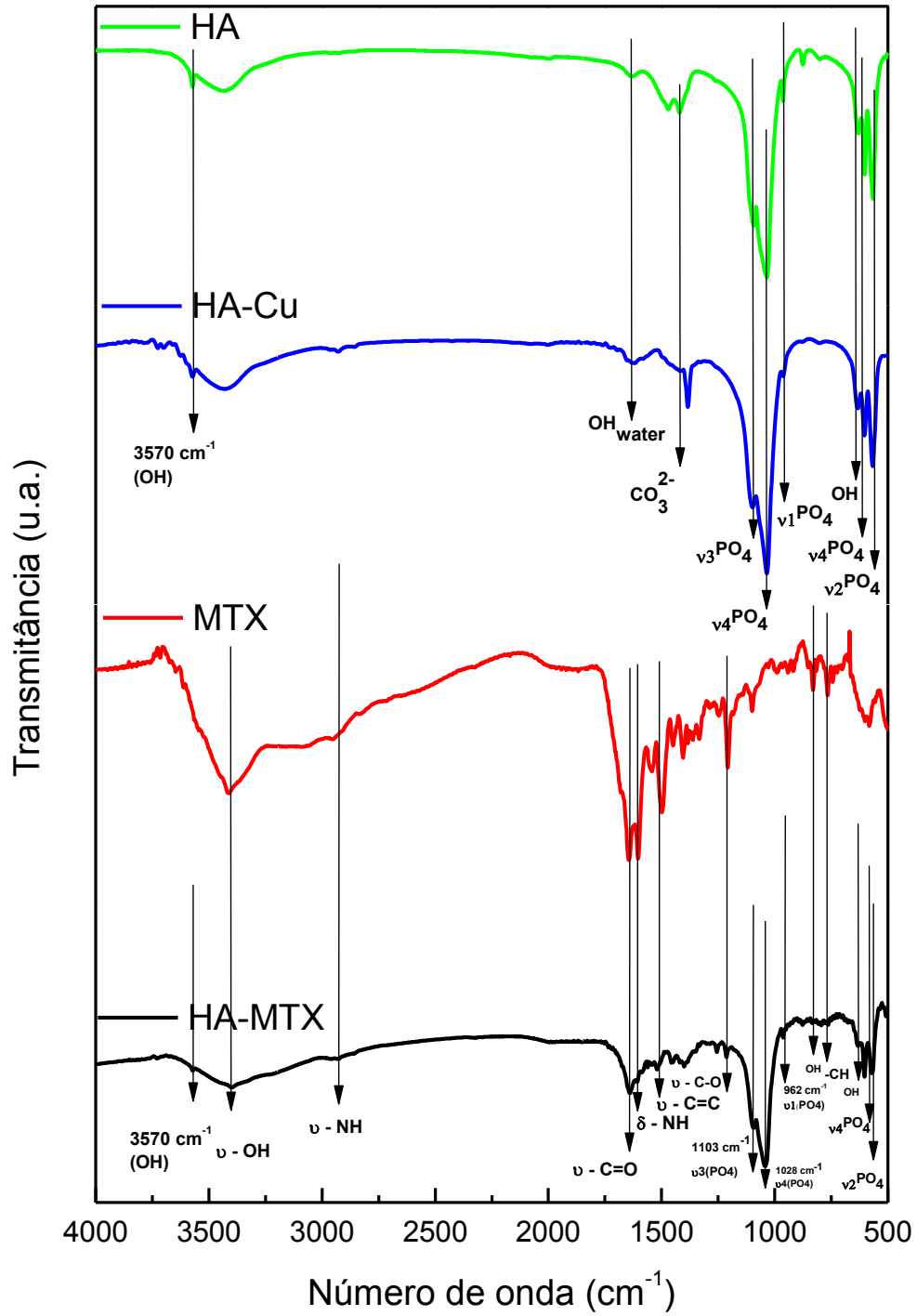
O espectro de FTIR do MTX mostra uma banda de absorção característica como um sinal amplo em 3450 cm^{-1} (O-H estendendo-se dos grupos carboxila superpostos com o O-H estendendo-se da água de cristalização), em 3080 cm^{-1} (alongamento da amina primária N-H), em 1670-1600 cm^{-1} atribuído ao estiramento C=O (estiramento C=O do grupo carboxílico e estiramento C=O do grupo amida, de modo que a banda C=O é dividida em um duplete na amostra de MTX). As bandas correspondentes à curvatura N-H do grupo amida aparecem na faixa espectral de 1550–1500 cm^{-1} , parcialmente sobrepondo-se ao estiramento aromático C=C. Outras bandas proeminentes, como 1400-1200 cm^{-1} correspondem a C–O que se estende do grupo carboxílico, 930 cm^{-1} para O-H que se curva para fora do plano e 820 cm^{-1} para C-H (2 hidrogênios adjacentes em um anel aromático, substituição para) (CHADHA et al., 2009; FULIAŞ et al., 2014). Todas as bandas identificadas no espectro FTIR estão em concordância com a estrutura molecular do MTX e confirmam sua pureza. Essas bandas estão presentes na amostra de HA-MTX evidenciando assim que a incorporação do MTX na estrutura da HA foi feita com sucesso.

Figura 17 - Representação estrutural molecular do Metotrexato.



Fonte: (PRICE, 2013).

Figura 18 - Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier da HA, HA-Cu, MTX e HA-MTX.



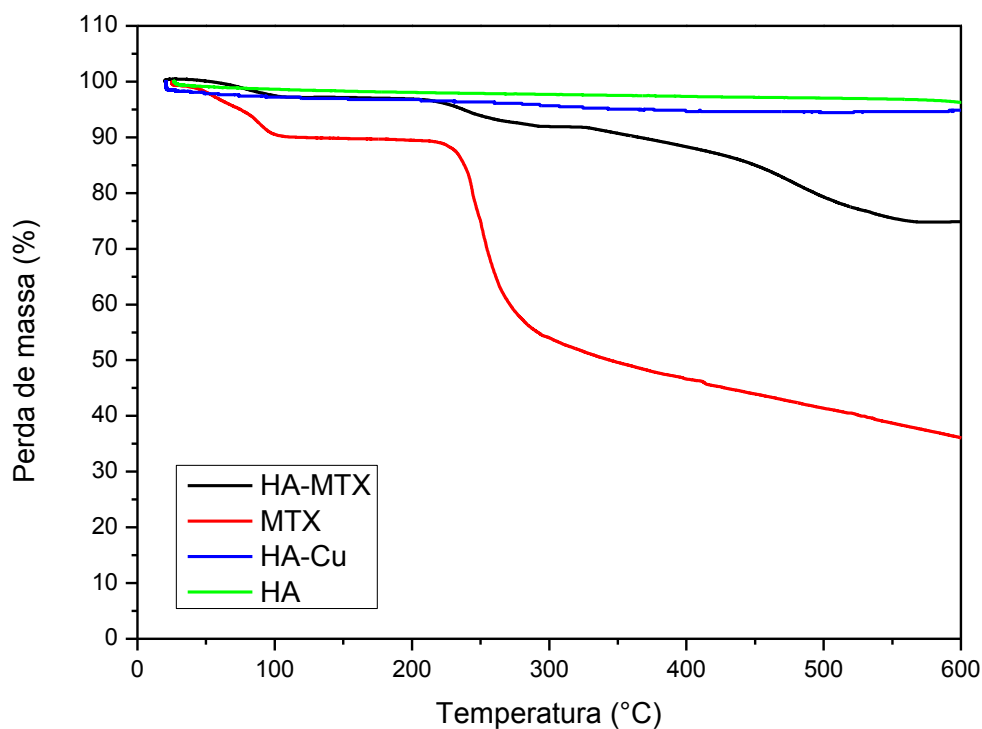
Fonte: Autor, 2021.

6.6. Termogravimetria

As perdas de massa foram avaliadas por análise termogravimétrica (TG) sendo divididos os eventos térmicos em dois momentos. No primeiro, entre 25 e 200 °C assumiu-se que as perdas decorrem devido à dessorção de moléculas de água fisicamente adsorvidas na superfície das amostras. O segundo momento pode ser atribuído a compostos orgânicos passíveis de decomposição acima de 200 °C, como pode ser visto na Figura 15.

De acordo com (HAK-KIM; GONDA, 1991) o MTX sofre fusão acompanhada de decomposição térmica mediante perda de massa em decorrência da carbonização, o que pode ser evidenciado nas análises termogravimétricas das amostras de MTX e HA-MTX. Como um material cerâmico, as amostras de HA e HA-Cu são estáveis durante o aquecimento, demonstrando perda de massa apenas em baixas temperaturas que pode ser associada à dessorção de água.

Figura 19 - Análise Termogravimétrica da HA-MTX, MTX, HA-Cu e HA.

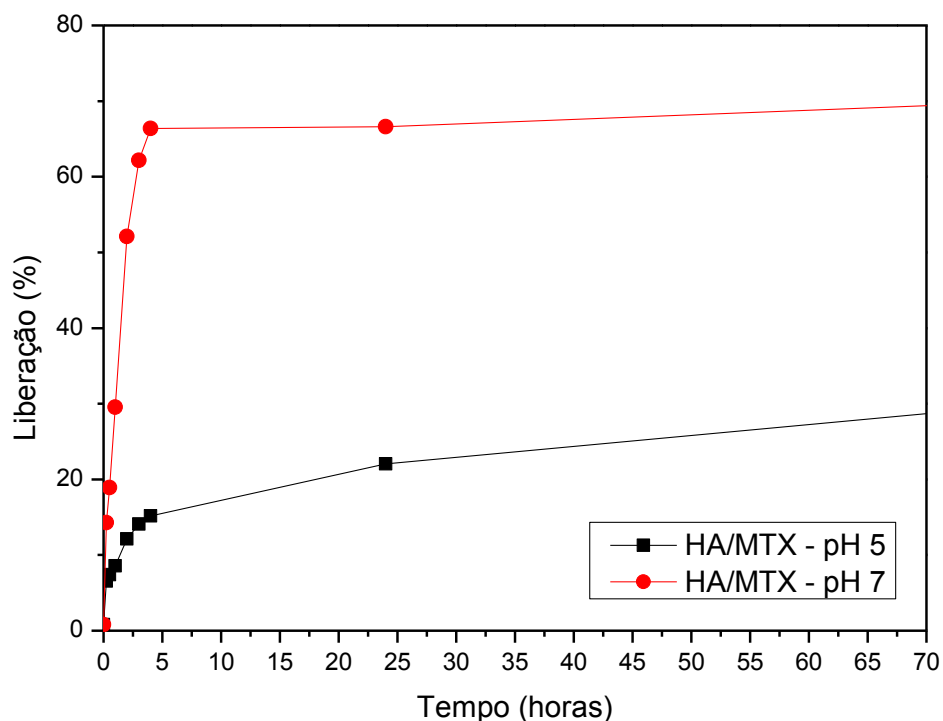


Fonte: Autor, 2021.

6.7. Teste de Estabilidade

O teste de estabilidade do MTX na amostra com HA em diferentes faixas de pH mostrado na Figura 16, aponta para uma liberação mais rápida da amostra de HA-MTX em pH 7,0 (simulando o pH extracelular tumoral) em um curto intervalo de tempo, situação essa denominada de *burst release*, de aproximadamente 70% do total liberado em um período de inferior há 5 horas. O favorecimento da liberação do fármaco MTX pela amostra HA-MTX pH 7 (pH fisiológico) reflete os valores de pKa dos grupos ionizáveis do fármaco. No ensaio de estabilidade em um pH 7,0 é esperado que uma das aminas da molécula de MTX não estivesse ionizada (pKa 5,6). Estando esta amina sem carga eletrostática, são esperadas ligação de hidrogênio entre a H-N (amina) e o H-O (carboxila), com os elétrons não ligantes do oxigênio da HA, mais fracas que as interações íon-dipolo esperadas entre o mesmo par de sítios de interação em pH 5,0, refletindo na liberação mais rápida no primeiro caso.

Figura 20 - Teste de estabilidade da HA-MTX (pH5) e HA-MTX (pH7).



Fonte: Autor, 2021.

7. CONCLUSÃO

Pela metodologia de crescimento em reator hidrotermal foram sintetizados a HA e a HA-Cu com elevada pureza e a incorporação do MTX na estrutura da HA pura. A partir dos estudos da físico-químicos e morfológicos dos materiais desenvolvidos aqui é possível afirmar que foram sintetizados HA e HA-Cu térmica e quimicamente estáveis, que podem ser modificados superficialmente. As proposições aqui a apresentadas são baseadas na extensiva caracterização dos materiais obtidos por meio de técnicas espectroscópicas, de análise térmica, de análise morfológica, de análise química e de análise física dos materiais.

O processo de dopagem da rede cristalina da HA com ^{64}Cu também é possível e ocorre provavelmente pela substituição desse elemento nas posições do Ca II e/ou pela alocação no interstício interatômico da rede da HA. A interação HA-Cu é estável sem que ocorra a liberação de cobre a partir da matriz da hidroxiapatita.

O mecanismo de incorporação de MTX a matriz da HA se mostrou eficiente e estável. Essa incorporação se faz necessária pois auxilia no tratamento do osteossarcoma, câncer ósseo abordado nesse estudo. É importante ressaltar que apenas um teste de estabilidade e com um tipo de amostra não é suficiente para adequar um composto como um possível agente antitumoral.

Parte das dificuldades encontradas durante a realização desse trabalho refletem a falta de tempo de permanência no laboratório onde os estudos estavam sendo realizados, além de mais caracterizações com o material incorporado com o agente antitumoral. Haja vista que o período de pandemia mundial ocasionado pelo surto de contaminação pelo vírus COVID-19, forçou a parada das atividades laboratoriais no CDTN, afetando todos os trabalhos em andamento, como o apresentado aqui.

Os resultados aqui obtidos foram satisfatórios com relação à obtenção e caracterização dos nanomateriais cerâmicos proposto como objetivo do estudo. Porém ainda são necessários mais análises e materiais de comparação para resultados mais conclusivos acerca do potencial do material desenvolvido com a finalidade do tratamento de tumores ósseos.

8. PREPOSIÇÕES FUTURAS

- Utilizar mais técnicas de caracterização (XRD, XPS, SEM, TEM) na amostra de HA-MTX;
- Incorporar o MTX na amostra de HA-Cu com a finalidade de comparação com a HA-MTX;
- Realizar ensaios de citotoxicidade e biocompatibilidade nas amostras obtidas para posterior realização de testes biológicos;
- Realizar um processo de aminação no MTX para aumentar o seu número de sítios ligantes com a HA.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALINEJAD, Z.; KHAKZAD, F.; MAHDAVIAN, A. R. Efficient approach to in-situ preparation of anisotropic and assemblable gold nanoparticles mediated by stimuli-responsive PDMAEMA. **European Polymer Journal**, v. 104, p. 106–114, 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cómo actúan los medicamentos de quimioterapia. **American Cancer Society**, p. 1–9, 2015.

AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. **Critical Reviews™ in Biomedical Engineering**, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.

ATOMIC, I.; AGENCY, E. PRODUCTION AND USE SHORT-LIVED RADIOISOTOPES. 1963.

BAO, G.; MITRAGOTRI, S.; TONG, S. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 15, n. 1, p. 253–282, 2013.

BIZERRA, A.; SILVA, V. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente-RESMA**, n. 2, p. 1–12, 2016.

BOHARA, R. A.; THORAT, N. D.; PAWAR, S. H. Role of functionalization: Strategies to explore potential nano-bio applications of magnetic nanoparticles. **RSC Advances**, v. 6, n. 50, p. 43989–44012, 2016.

BRESSAN, A. L. et al. Imunossupressores na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 1, p. 9–22, 2010.

CARVALHO, S. M. et al. Synthesis and in vitro assessment of anticancer hydrogels composed by carboxymethylcellulose-doxorubicin as potential transdermal delivery systems for treatment of skin cancer. **Journal of Molecular Liquids**, v. 266, p. 425–440, 2018.

CASTRO, J. R. L. et al. Características clínicas e epidemiológicas do paciente adolescente portador de osteossarcoma TT - Clinical and epidemiological characteristics of adolescent

patients with osteosarcoma. **Acta fisiátrica**, v. 21, n. 3, 2014.

CATELLI INFANTOZZI COSTA RIBEIRÃO PRETO, V. ANATOMIA GERAL HUMANA Apostila para fins didáticos. 2008.

CHADHA, R. et al. Characterization of solvatomorphs of methotrexate using thermoanalytical and other techniques. **Acta Pharmaceutica**, v. 59, n. 3, p. 245–257, 2009.

CHEN, F.; EHLERDING, E. B.; CAI, W. Theranostic nanoparticles. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 55, n. 12, p. 1919–1922, 2014.

CHEN, Q. et al. Nanoscale theranostics for physical stimulus-responsive cancer therapies. **Biomaterials**, v. 73, p. 214–230, 2015.

CIPRESTE, M. F. et al. Synthesis and characterization of ¹⁵⁹Gd-doped hydroxyapatite nanorods for bioapplications as theranostic systems. **Materials Chemistry and Physics**, v. 181, p. 301–311, 2016.

CIPRESTE, M. F. et al. Functionalized-radiolabeled hydroxyapatite/tenorite nanoparticles as theranostic agents for osteosarcoma. **Ceramics International**, v. 44, n. 15, p. 17800–17811, 2018.

CRONSTEIN, B. N. THE MECHANISM OF ACTION OF METHOTREXATE. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 739–755, nov. 1997.

DOYLE, C. Handbook of bioengineering. **Clinical Materials**, v. 3, n. 2, p. 171–172, jan. 1988.

EM, P. D. E. F.-; PESQUISA, R. D. E. Produção de flúor-18 em reator de pesquisa a partir de carbonato de lítio. 1978.

FERREIRA, T. H. et al. Folate-grafted boron nitride nanotubes: Possible exploitation in cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 481, n. 1, p. 56–63, 2015.

FREITAS, L. B. DE O. et al. Mesoporous silica materials functionalized with folic acid: preparation, characterization and release profile study with methotrexate. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 77, n. 1, p. 186–204, 25 jan. 2016.

FREITAS, L. B. DE O. et al. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for cancer-targeted, controlled drug delivery and imaging. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 242, p. 271–283, 2017.

FULIAŞ, A. et al. Thermoanalytical and spectroscopic study on methotrexate - active substance and tablet. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 9, n. 1, p. 93–98, 2014.

HAK-KIM, C.; GONDA, I. Methotrexate: Existence of different types of solid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 68, n. 1–3, p. 179–190, fev. 1991.

HENRIQUE, J. S.; FALCARE, R. S.; LOPES, P. S. Sistemas de liberação controlada. **Pharmacia Brasileira**, v. 56, p. 22, 2006.

HOLLAND, J. P. et al. Copper-64 Radiopharmaceuticals for Oncologic Imaging. **PET Clinics**, v. 4, n. 1, p. 49–67, 2009.

INCA. **Osteossarcoma - versão para profissionais da saúde**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-infantojuvenil/osteossarcoma/profissional-de-saude>>. Acesso em: 1 set. 2020.

INCA. **O que é câncer?** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 1 set. 2020.

KARIMI, Z.; SADEGHI, M.; MATAJI-KOJOURI, N. ⁶⁴Cu, a powerful positron emitter for immunoimaging and theranostic: Production via natZnO and natZnO-NPs. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 137, n. March, p. 56–61, 2018.

KHATTI, Z.; HASHEMIANZADEH, S. M. Boron nitride nanotube as a delivery system for platinum drugs: Drug encapsulation and diffusion coefficient prediction. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 291–297, 2016.

KIM, D. IL et al. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). **Journal of Plankton Research**, v. 26, n. 1, p. 61–66, 2004.

LAKES, RODERIC S., PARK, J. **Biomaterials. An Introduction**. Third ed. New York: [s.n.].

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**, v. 125, p. 75–84, 2015.

LI, M. et al. Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrophoretic nanotechnology for biological applications. **Carbon**, v. 67, p. 185–197, fev. 2014.

LIM, E. K. et al. Nanomaterials for theranostics: Recent advances and future challenges. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 1, p. 327–394, 2015.

LIU, J. et al. pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 693–710, 2014.

LIU, Z. L. et al. Synthesis of hollow mesoporous HAp-Au/MTX and its application in drug delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 586, n. September 2019, p. 124231, 2020.

MANSO, M. et al. Microstructural study of aerosol–gel derived hydroxyapatite coatings. **Biomolecular Engineering**, v. 19, n. 2–6, p. 63–66, ago. 2002.

MARTA, G. N. Radiobiologia: princípios básicos aplicados à prática clínica. **Diagnóstico e Tratamento**, v. 19, n. 11, p. 2013–2015, 2014.

MIYAJI, F.; KONO, Y.; SUYAMA, Y. Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite. **Materials Research Bulletin**, v. 40, n. 2, p. 209–220, fev. 2005.

MONTEIRO, G. A. A. et al. SBA-15/P[(N-*ip*aam)-co-(MAA)] thermo and pH-sensitive hybrid systems and their methotrexate (MTX) incorporation and release studies. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, p. 895–904, 2019.

NGUYEN, N. K. et al. Hydroxyapatite nanorods: Soft-template synthesis, characterization and preliminary in vitro tests. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 28, n. 1, p. 49–61, 5 jul. 2013.

OLIVEIRA, L. S. DE A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método

de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 37, 18 nov. 2010.

ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais fundamentos e aplicações**. First ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

PATIÑO-GARCÍA, A. et al. Methotrexate in Pediatric Osteosarcoma: Response and Toxicity in Relation to Genetic Polymorphisms and Dihydrofolate Reductase and Reduced Folate Carrier 1 Expression. **The Journal of Pediatrics**, v. 154, n. 5, p. 688–693, maio 2009.

PIBIDA, L. et al. Determination of photon emission probability for the main gamma ray and half-life measurements of ^{64}Cu . **Applied Radiation and Isotopes**, v. 129, n. March, p. 6–12, 2017.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PRICE, P. Product number. n. 314, p. 1–2, 2013.

PROENEM. **Tecidos Cartilagenoso e ósseo**. Disponível em:

<<https://www.proenem.com.br/enem/biologia/tecidos-cartilagenoso-e-osseo/>>. Acesso em: 27 mar. 2021.

SALVAJOLI, J. V.; SALVAJOLI, B. P. O papel da radioterapia no tratamento do câncer: avanços e desafios. **Onco&**, p. 32–36, 2012.

SEAH, MARTIN P.; BRIGGS, D. (ED. . Practical surface analysis. **Vacuum**, v. 45, n. 12, p. 1227, dez. 1994.

SMITH, S.; PREWETT, S. Principles of chemotherapy and radiotherapy. **Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine**, v. 30, n. 3, p. 72–78, 2020.

ŠUBR, V. et al. Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] conjugates of methotrexate: Synthesis and in vitro drug release. **Journal of Controlled Release**, v. 49, n. 2, p. 123–132, 1997.

VASCONCELOS, L. Q.; SANTOS, R. D. A.; ROSA, F. P. ARTIGO ORIGINAL Análise da

influência de duas faixas granulométricas de microesferas de hidroxiapatita e alginato na fase inicial do reparo ósseo. n. 71, p. 363–369, 2016.

VERMA, G. et al. Rod-like micelle templated synthesis of porous hydroxyapatite. **Ceramics International**, v. 39, n. 8, p. 8995–9002, dez. 2013.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 14, n. 1, p. 99–103, 2016.