

Título em Português: Nanopartículas de hidroxiapatita contendo doxorubicina e carboplatina para a aplicação no tratamento de câncer

Título em Inglês: Hydroxyapatite nanoparticles containing doxorubicin and carboplatin for application in cancer treatment

Autor: Larissa Daniela Dias Rafael

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Valtencir Zucolotto

Área de Pesquisa / SubÁrea: Biotecnologia

Agência Financiadora: CNPq - PIBIC

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

Larissa D. D. Rafael, Beatriz G. R. da Silva, Thales R. Machado

Valtencir Zucolotto

Universidade de São Paulo/ Instituto de Física de São Carlos

larissaddias.rafael@usp.br

Objetivos

Neste projeto, nanopartículas (NPs) de hidroxiapatita (HA) foram sintetizadas e carregadas com o quimioterápico doxorubicina (DOX), visando o desenvolvimento de novos sistemas nanocarreadores com potencial aplicação no tratamento de câncer de pâncreas.

Métodos e Procedimentos

As NPs de HA foram sintetizadas utilizando protocolos já estabelecidos, baseados no uso de soluções aquosas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (solução 1) e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (solução 2) com valores de pH próximos de 10 ajustados pela adição de NH_4OH . A solução 2 foi vertida rapidamente à solução 1, e a mistura foi agitada à temperatura ambiente por 24 horas para cristalização da fase hexagonal da HA. As NPs foram então lavadas com água e etanol, secas e moídas em almofariz de ágata. Posteriormente, as NPs foram funcionalizadas com íons citrato ou polietilenoimina (PEI) para aumentar sua estabilidade em suspensão. Finalmente, DOX foi imobilizada nas nanopartículas por interações eletrostáticas utilizando concentrações predefinidas do fármaco por 24 h. Os materiais foram finalmente lavados para remover o excesso de fármaco. As propriedades físico-químicas das

NPs foram analisadas detalhadamente via microscopia eletrônica de transmissão (TEM), FTIR, DLS, potencial zeta (ZP) e UV-vis. Após o carregamento do fármaco, foram realizados ensaios de liberação.

Resultados

A estrutura morfológica das NPs foi caracterizada por imagens de TEM. As NPs de HA apresentaram morfologia de nanobastões, com comprimento médio de 20 nm e largura de aproximadamente 10 nm. Além disso, as amostras de HA/Cit e HA/Cit-DOX demonstraram menor tendência de aglomeração em comparação com as amostras contendo PEI.

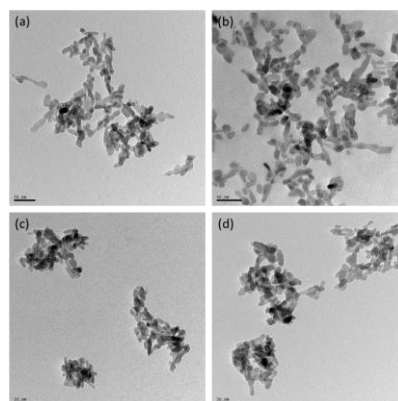


Figura 1: Micrografias obtidas por TEM: (a) HA-Cit, (b) HA-Cit-DOX, (c) HA-PEI, e (d) HA-PEI-DOX.

A **Figura 2** apresenta os espectros de FTIR obtidos para as amostras de HA pura, funcionalizadas com citrato e PEI, bem como às correspondentes carregadas com DOX. Bandas características dos grupos funcionais da DOX foram identificadas tanto nas HA/Cit-DOX quanto nas HA/PEI-DOX sugerindo o encapsulamento da DOX nessas estruturas.

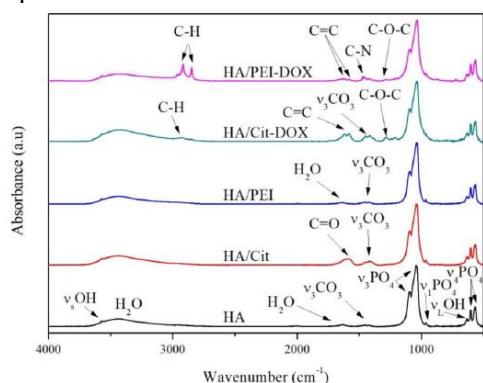


Figura 2: Espectros obtidos por FTIR das amostras de HA pura, funcionalizadas com íons citratos e PEI e carregadas com DOX.

A funcionalização e carregamento das NPs também pôde ser confirmado através de análises de DLS e ZP, onde as nanopartículas de HA/Cit e HA/PEI apresentaram um ligeiro aumento de tamanho após o carregamento com o fármaco, além de alterações no potencial de superfície (**Tabela 1**).

Tabela 1: Valores de tamanho médio das partículas, PDI e potencial Zeta das NPs funcionalizadas com íons citrato ou PEI e carregadas com DOX.

	DLS (nm)	PDI	ZP (mV)
HA/Cit	62	0,54	-23
HA/Cit-DOX	89	0,48	+21
HA/PEI	147	0,56	+28
HA/PEI-DOX	196	0,41	+23

A determinação da eficiência de encapsulação da DOX nas NPs foi realizada utilizando a técnica de UV-Vis por meio da absorção residual de DOX em 480 nm, após o procedimento de carregamento. As amostras de HA/Cit demonstraram uma eficiência de

encapsulamento significativamente maior (82%) em comparação com as HA/PEI (43%). Sendo assim, optou-se por utilizar exclusivamente as HA/Cit para os ensaios de liberação do fármaco onde uma liberação pH dependente foi observada. Sob condições fracamente ácidas que simularam o microambiente tumoral e as vesículas intracelulares, verificou-se a dissolução parcial das NPs de HA em íons cálcio e fosfato, permitindo uma liberação mais efetiva do fármaco.¹⁻³

Conclusões

NPs de HA foram sintetizadas e funcionalizadas com íons citrato e PEI, conforme evidenciado por técnicas de caracterização. Os nanossistemas apresentaram estabilidade, liberação controlada do fármaco em resposta ao pH ácido. Essas propriedades favoráveis tornam o HA/Cit-DOX uma alternativa promissora para futuras aplicações terapêuticas.

Agradecimentos

CNPq (#104730), FAPESP, Capes e GNano.

Referências

- [1] MIN, Kyung Hyun et al. The tumor accumulation and therapeutic efficacy of doxorubicin carried in calcium phosphate-reinforced polymer nanoparticles. *Biomaterials*, v. 33, n. 23, p. 5788-5797, 2012.
- [2] RIM, Hwa Pyeong et al. pH-tunable calcium phosphate covered mesoporous silica nanocontainers for intracellular controlled release of guest drugs. *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 50, n. 38, p. 8853-8857, 2011.
- [3] CASOLARO, Mario et al. Long-term doxorubicin release from multiple stimuli-responsive hydrogels based on α -amino-acid residues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 88, n. 2, p. 424-433, 2014.

HYDROXYAPATITE NANOPARTICLES CONTAINING DOXORUBICIN FOR APPLICATION IN PANCREATIC CANCER TREATMENT

Larissa D. D. Rafael, Beatriz G. R. da Silva, Thales R. Machado

Valtencir Zucolotto

University of São Paulo/ São Carlos Institute of Physics

larissaddias.rafael@usp.br

Objectives

In this project, hydroxyapatite (HA) nanoparticles (NPs) were synthesized and loaded with the chemotherapeutic drug doxorubicin (DOX), aiming at the development of new nanocarrier systems with potential application in the treatment of pancreatic cancer.

Materials and Methods

HA NPs were synthesized using established protocols, utilizing aqueous solutions of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (solution 1) and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (solution 2) with pH values close to 10, adjusted by the addition of NH_4OH . Solution 2 was quickly poured into solution 1, and the mixture was stirred at room temperature for 24 hours to crystallize the hexagonal phase of HA. The NPs were then washed with water and ethanol, dried, and ground in an agate mortar. Subsequently, the NPs were functionalized with citrate ions or polyethyleneimine (PEI) to increase their stability in suspension. Finally, DOX was immobilized on the nanoparticles through electrostatic interactions using predefined concentrations of the drug for 24 hours. The materials were then washed to remove excess drug. The physicochemical properties of the NPs were fully analyzed using transmission electron microscopy (TEM), FTIR,

DLS, zeta potential (ZP), and UV-Vis. After drug loading, release assays were conducted.

Results

The morphological structure of the NPs was characterized by TEM images. The HA NPs exhibited a nanorod morphology, with an average length of 20 nm and a width of approximately 10 nm. Additionally, the HA/Cit and HA/Cit-DOX samples showed a lower tendency for agglomeration compared to the samples containing PEI.

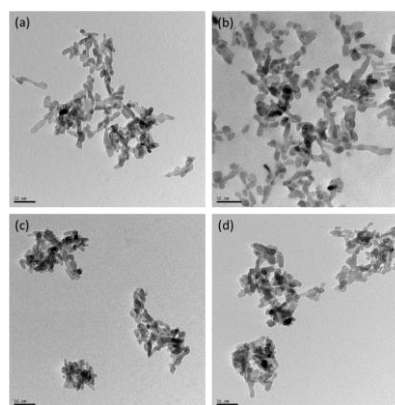


Figure 1: TEM micrographs: (a) HA-Cit, (b) HA-Cit-DOX, (c) HA-PEI, and (d) HA-PEI-DOX.

Figure 2 presents the FTIR spectra obtained for the pure HA samples, NPs functionalized with citrate and PEI, as well as the

corresponding samples loaded with DOX. Characteristic bands of the functional groups of DOX were identified in both HA/Cit-DOX and HA/PEI-DOX, indicating the encapsulation of DOX within these structures.

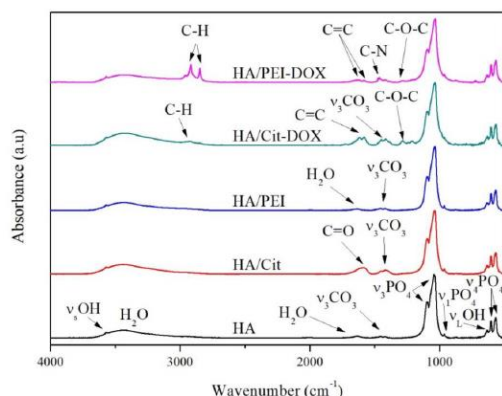


Figure 2: FTIR spectra of pure HA samples, NPs functionalized with citrate ions and PEI, and loaded with DOX.

The functionalization and loading of the NPs were also confirmed through DLS and ZP analyses, where the HA/Cit and HA/PEI nanoparticles showed a slight increase in size after drug loading, as well as changes in surface potential (**Table 1**).

Table 1: Average particle size values, PDI, and Zeta potential of nanoparticles functionalized with citrate ions or PEI and loaded with DOX.

	DLS (nm)	PDI	ZP (mV)
HA/Cit	62	0,54	-23
HA/Cit-DOX	89	0,48	+21
HA/PEI	147	0,56	+28
HA/PEI-DOX	196	0,41	+23

The determination of DOX encapsulation efficiency in the NPs was performed using UV-Vis spectroscopy by measuring the residual absorption of DOX at 480 nm after the loading procedure. The HA/Cit samples demonstrated significantly higher encapsulation efficiency

(82%) compared to HA/PEI (43%). Therefore, HA/Cit was selected for the drug release assays, where a pH-dependent release was observed. Under mildly acidic conditions simulating the tumor microenvironment and intracellular vesicles, partial dissolution of the HA NPs into calcium and phosphate ions was observed, allowing for more effective drug release.¹⁻³

Conclusions

HA NPs were synthesized and functionalized with citrate ions and PEI, as evidenced by characterization techniques. The nanosystems exhibited stability and controlled drug release in response to acidic pH. These favorable properties make HA/Cit-DOX a promising alternative for future therapeutic applications.

Acknowledgements

CNPq (#104730), FAPESP, Capes, and GNano.

References

- [1] MIN, Kyung Hyun et al. The tumor accumulation and therapeutic efficacy of doxorubicin carried in calcium phosphate-reinforced polymer nanoparticles. *Biomaterials*, v. 33, n. 23, p. 5788-5797, 2012.
- [2] RIM, Hwa Pyeong et al. pH-tunable calcium phosphate covered mesoporous silica nanocontainers for intracellular controlled release of guest drugs. *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 50, n. 38, p. 8853-8857, 2011.
- [3] CASOLARO, Mario et al. Long-term doxorubicin release from multiple stimuli-responsive hydrogels based on α -amino-acid residues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 88, n. 2, p. 424-433, 2014.