UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais

Amanda Alves Barbosa

Hidroxiapatita Multifuncional: da Síntese e Caracterização à Aplicação Biomédica

Recife

2020

Amanda Alves Barbosa

Hidroxiapatita Multifuncional: da Síntese e Caracterização à Aplicação Biomédica

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência de Materiais junto ao programa de pós-graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Materiais Não Metálicos

Orientador interno: Profº. Drº. Severino Alves Júnior
Orientadora externa: Profª. Drª. Andréa de Vasconcelos Ferraz

Recife
2020

Catalogação na fonte
Bibliotecária Arabelly Ascoli CRB4-2068

B238h Barbosa, Amanda Alves
Hidroxiapatita multifuncional: da síntese e caracterização à aplicação biomédica / Amanda Alves Barbosa. – 2020.
122 f.: fig., tab.

Orientadores: Severino Alves Júnior; Andréa de Vasconcelos Ferraz
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2020.
Inclui referências e apêndice.

1. Materiais não metálicos. 2. Biomaterial luminescente. 3. Atividade antibacteriana. 4. Teranóstica. I. Alves Júnior, Severino (orientador). II. Ferraz, Andréa de Vasconcelos (orientadora). III. Título.

620.19 CDD (22. ed.) UFPE-CCEN 2020-27

AMANDA ALVES BARBOSA

HIDROXIAPATITA MULTIFUNCIONAL: DA SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO À APLICAÇÃO BIOMÉDICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 24/01/2020.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Dra. Andréa de Vasconcelos Ferraz (Orientadora)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

_____

Profº. Dr. Rodrigo José de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Estadual da Paraíba

_____

Profª. Dra. Ana Paula Silveira Paim (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profª. Dra. Patrícia Maria Albuquerque de Farias (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profª. Dra. Yêda Medeiros Bastos de Almeida (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir finalizar mais esta etapa na minha vida.

A minha mãe por ter me educado e me guiado pelos melhores caminhos que me fizeram chegar até este momento.

Ao meu marido por todo o apoio, amor e compreensão.

A minha irmã, cunhado e sobrinha pelo apoio e carinho.

A minha orientadora Profª. Dra. Andréa de V. Ferraz, pela orientação, amizade, dedicação, companheirismo e por todos os ensinamentos que me fizeram chegar à conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador, Profº. Dr. Severino A. Júnior, pela confiança, orientação, compreensão, amizade e por todos os ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Um agradecimento mais que especial para tia Leda e minha cunhada Marcela pelo apoio, suporte, amizade e abrigo durante minha temporada em Recife.

As minhas amigas queridas, as “Lindas de Materiais”, Karolyne, Maysa, Jéssica e Fátima pela amizade, conversas, estudos, risadas e por toda ajuda que vocês todas de uma forma ou de outra me deram.

Aos meus colegas de laboratório, Deborah, Victor, Lucas, Patrick, Pâmela, Murilo, Tainá e Tássila pela amizade e ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu amigo Fernando Antonio pela amizade e por me ajudar nas análises com bactérias.

Ao profº. Dr. Mateus Matiuzzi, coordenador do laboratório de microbiologia, por disponibilizar o laboratório, reagentes e bactérias para os estudos antibacterianos.

A profª. Dra. Rosemairy Luciane Mendes, coordenadora do Laboratório de Oncologia Experimental, por disponibilizar o laboratório, reagentes e animais para os estudos de citotoxicidade dos materiais.

As alunas de farmácia, Marília, Gabriela, Larissa e Monique pela receptividade, amizade e por me ensinarem e me ajudarem nos experimentos com os animais.

A profª. Dra. Raquel Aline pelo refinamento dos difratogramas das amostras.

Ao profº. Dr. Nelson Cárdenas por disponibilizar o laboratório de ensaios mecânicos para confecção de pastilhas.

A profª. Dra. Débora dos Anjos e ao IF-Sertão por disponibilizar o uso do FTIR para análise das amostras.

A Ginetton e ao Instituto de Pesquisa em Materiais da Univasf pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

A Leonis do BSTR pelas análises de luminescência de diversas amostras.

Ao CETENE pelas análises de BET e DRX de todos os materiais estudados.

A UNIVASF por me permitir ficar afastada das minhas atividades para dedicação exclusiva a este trabalho.

A todos o meu muito obrigada!

RESUMO

Diversos materiais estão sendo estudados para o desenvolvimento de sistemas teranósticos, no entanto, fatores como: alto custo, baixo rendimento, estabilidade das NPs e questões relacionadas à toxicidade dificultam sua aplicação na medicina. Assim sendo, este estudo propõe a síntese do biomaterial hidroxiapatita (HAp) utilizada como matriz, empregando metodologia simples e de baixo custo, bem como, a análise do comportamento desta com a adição de substâncias capazes de agregar propriedades de elevado interesse para sua utilização na área médica. Para isso, realizou-se a dopagem da HAp incorporando diferentes concentrações (0,1 a 5,0%) de íons Eu^{3+} na sua rede cristalina no intuito de avaliar suas propriedades luminescentes (HAp:Eu^{3+}). Em uma etapa posterior, NPs de óxido de zinco (ZnO) foram adicionadas sobre a superfície de partículas de HAp com o objetivo de conferir efeito antibacteriano no material. Na sequência, após definição dos melhores parâmetros da HAp:Eu e HAp@ZnO, realizou-se a síntese do sistema multifuncional HAp:Eu@ZnO. Todos os materiais desenvolvidos foram caracterizados por diversas técnicas como: Difratometria de raios X, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, Análise de BET (Brunauer-Emmett-Teller), Microscopia Eletrônica de Varredura, Fotoluminescência e análise do efeito antibacteriano. Ensaios biológicos *in vitro* avaliando-se a hemocompatibilidade em células sanguíneas de camundongos Swiss e toxicidade em células de sarcoma 180 (S-180) foram realizados para a HAp multifuncional. De acordo com os resultados obtidos, o sistema HAp:Eu@ZnO é biocompatível, bioativo, luminescente e com atividade antibacteriana. A capacidade de utilização deste sistema como suporte para antineoplásicos foi verificada a partir da incorporação de dois diferentes fármacos modelo, o 5-Fluorouracil e a curcumina, e em seguida, sua cinética de liberação em solução tampão fosfato salina, com pH = 7,4 e T = 37 ºC indicou eficiência no prolongamento da dessorção dos fármacos em solução. O potencial do sistema como nanocarreador foi verificado a partir da sua capacidade de internalizar os fármacos em células tumorais (S-180) e para tal, a viabilidade celular foi obtida a partir de ensaio colorimétrico MTS. Os dados obtidos nesta pesquisa indicam o desenvolvimento de um novo material com aplicação promissora no campo biomédico com potencial de utilização na teranóstica do câncer.

Palavras-chave: Biomaterial luminescente. Atividade Antibacteriana. Teranóstica.

ABSTRACT

Several materials are being studied for the development of teranostic systems, however, factors such as high cost, low yield, stability of NPs and toxicity issues make it difficult to apply them in medicine. Therefore, this study proposes the synthesis of the hydroxyapatite (HAp) a biomaterial used as a matrix, using a simple and low cost methodology, as well as the analysis of its behavior with the addition of substances capable of adding properties of high interest for its use in the field medical. For this, HAp doping was performed by incorporating different concentrations (0.1 to 5.0 %) of Eu^{3+} ions in its crystal lattice in order to evaluate its luminescent properties (HAp:Eu^{3+}). In a later stage, zinc oxide (ZnO) NPs were added to the surface of HAp particles in order to confer antibacterial effect on the material. After defining the best parameters of HAp:Eu and HAp@ZnO, the HAp:Eu@ZnO multifunctional system was synthesized. All developed materials were characterized by various techniques such as: X-ray diffraction, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, BET (Brunauer-Emmett-Teller) Analysis, Scanning Electron Microscopy, Photoluminescence and antibacterial effect analysis. *In vitro* biological assays evaluating hemocompatibility in blood cells of Swiss mice and toxicity in sarcoma cells 180 (S-180) were performed for multifunctional HAp. According to the results obtained, the HAp:Eu@ZnO system is biocompatible, bioactive, luminescent and with antibacterial activity. The ability to use this system as an antineoplasic support was verified by incorporating two different model drugs, 5-Fluorouracil and curcumin, and then their release kinetics in saline phosphate buffer, with pH = 7.4. and T = 37 ºC indicated efficiency in prolonging drug desorption in solution. The potential of the nanocarrier system was verified from its ability to internalize the drugs in tumor cells (S-180) and for this, the cell viability was obtained from MTS colorimetric assay. The data obtained in this research indicate the development of a new material with promising application in the biomedical field with potential use in cancer theranostic.

Keywords: Luminescent Biomaterial. Antibacterial activity. Theranostic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Esquema representando ocorrência da metástase. 21
Figura 2-Esquema ilustrando aplicação de implante carregado com droga antitumoral e a recuperação de defeito ósseo. 24
Figura 3-Relação entre o método da terapia convencional (I) e a terapia através de sistemas de liberação controlada (II). 25
Figura 4-Esquema mostrando o interligamento entre a terapia e diagnóstico proporcionado pela nanociência resultando na teranóstica. 27
Figura 5-Esquema representando uma nanopartícula multifuncionalizada com perspectiva de aplicação na nanomedicina teranóstica. 28
Figura 6-Imagem de fotoluminescência *in vivo* de ratos após injeção subcutânea de nanocarreador, a) sem e b) com Eu^{3+}/Gd^{3+}; c) Imagens de emissão fotoluminescente para nanobastões Eu^{3+}/Gd^{3+} em diferentes concentrações. O comprimento de onda de excitação foi de 430 nm. 34
Figura 7-Arranjo estrutural dos íons em torno do eixo c da HAp. 36
Figura 8-Determinação da captação de NPs de HAp por células de osteossarcoma usando imagens de citometria de fluxo. A segunda coluna mostra imagens de fluorescência do fármaco. a) Células de controle, b) Doxorrubicina (DOX), c) Nanoesferas de HAp carregadas com DOX e d) Nanotubos de HAp carregados com DOX. 41
Figura 9-Excitação direta do íon lantanídeo com baixa luminescência e excitação por meio do ligante (Efeito antena). 44
Figura 10-a) Luminescência em complexos de lantanídeos e b) Algumas transições envolvidas na luminescência do íon Eu^{3+}. 44
Figura 11-Exemplos das diversas aplicações para os nanomateriais antibacterianos. ... 46
Figura 12-Possíveis mecanismos da ação de NPs metálicas na destruição de bactérias 47
Figura 13-Estrutura química do 5-FU. 49
Figura 14 a) Planta da espécie *Cúrcuma longa*, b) Rizomas da cúrcuma e c) Curcumina. 51
Figura 15-Estrutura química da curcumina. 51
Figura 16-Fluxograma com resumo de todas as etapas de síntese e caracterização dos materiais. 54

Figura 17-Arranjo experimental da síntese e etapas envolvidas na produção da hidroxiapatita. 56
Figura 18-Resumo das etapas experimentais do ensaio antibacteriano. 58
Figura 19-Resumo das etapas do experimento de hemólise. 61
Figura 20-Esquema mostrando etapas do experimento de citotoxicidade com células de sarcoma 180 de camundongo. 64
Figura 21-Espectro de FTIR para HAp pura calcinada à 900 ºC. 66
Figura 22-Difratograma de raios X da HAp pura calcinada à 900ºC. 67
Figura 23-Isoterma de adsorção e dessorção de nitrogênio e área de superfície BET da HAp. 68
Figura 24-a) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para HAp pura e b) Espectro de energia dispersiva correspondente a área pontual da amostra. 69
Figura 25- Micrografias da superfície de pastilhas de HAp após diferentes tempos de imersão em SBF a 37 ºC e pH = 7,4: a) , b) e c) 0 dia; d), e) e f) 3 dias; g), h) e i) 7 dias; j), l) e m) 14 dias; n), o) e p) 21 dias. 70
Figura 26-Difratogramas de raios X do pó para HAp dopada com diferentes concentrações de íons Eu^{3+} e padrões das fichas de referências ICSD 16742 (HAp) e ICSD 6191 (TCP). 72
Figura 27-a) Representação dos dois diferentes sítios catiônicos ocupados pelos íons Ca^{2+} na hidroxiapatita e b) Substituição de íons Ca^{2+} por Eu^{3+} nos respectivos sítios do Ca^{2+}. Célula cristalina da HAp obtida com o software X'Pert High Score Plus versão 2.0a. Fonte: Autoria própria. 73
Figura 28-Espectros de FTIR para a matriz de HAp comparada ao material dopado com diferentes concentrações de íons Eu^{3+}. 74
Figura 29-Amostra de HAp dopada com 2,0% de íons Eu^{3+}: a) Sem excitação e b) Sob lâmpada UV. 74
Figura 30-a) Espectro de excitação e b) espectros de emissão da Hap dopada com diferentes concentrações de íons Eu^{3+} (0,1; 1,0; 2,0 e 5,0%). 76
Figura 31-Isoterma de adsorção e dessorção de nitrogênio e área de superfície BET para HAp:5,0%Eu^{3+}. 77
Figura 32-a) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura e b) Espectro de energia dispersiva para amostra HAp:5,0%Eu^{3+}. 78

Figura 33-Placas com amostras de HAp e HAp dopada (Eu^{3+}, ZnO, curcumina) após incubação a 35 ºC/24h e seus halos de inibição, com: a) *Staphylococcus aureus*, b) e c) *Escherichia coli*. 79
Figura 34-Espectros de FTIR: (i) ZnO e (ii) HAp@10%ZnO 81
Figura 35-Difratogramas de raios X: (i) ZnO e (ii) HAp@10%ZnO. 82
Figura 36-Isoterma de adsorção e dessorção de nitrogênio e área de superfície BET para HAp@10%ZnO. 83
Figura 37-a) e b) Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para HAp@10%ZnO e c) Espectro de energia dispersiva correspondente a área pontual da amostra (Região 1 da Figura 37-a)..... 84
Figura 38-a) Espectro de FTIR e b) Difratograma de raios X para HAp multifuncional. 85
Figura 39-Isoterma de adsorção e dessorção de nitrogênio e área de superfície BET para HAp:Eu@ZnO. 86
Figura 40- a) e b) Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para HAp:Eu@ZnO e c) Espectro de energia dispersiva correspondente a varredura da amostra..... 87
Figura 4-Imagem do mapeamento da distribuição simultânea dos elementos baseados na varredura da amostra HAp:Eu@ZnO obtida a partir da análise de EDS. ... 88
Figura 42-a) Espectro de excitação e b) emissão para HAp multifuncional. 89
Figura 43-Placas com amostras de HAp:Eu@ZnO após incubação a 35 ºC/24h com:.. 91
Figura 44-a) Micrografias da superfície de pastilhas de HAp:Eu@ZnO após diferentes tempos de imersão em SBF a 37 ºC e pH = 7,4: a) , b) e c) 0 dia; d), e) e f) 3 dias; g), h) e i) 7 dias; j), l) e m) 14 dias; n), o) e p) 21 dias. 92
Figura 45-Espectro de EDS para varredura da superfície de HAp:Eu@ZnO após 21 dias de contato com solução SBF..... 93
Figura 46-Hemocompatibilidade *in vitro* para HAp e HAp:Eu@ZnO. 94
Figura 47- Espectros de absorção com $\lambda_{máx}$: a) 5-FU e c) Curcumina e Curvas de calibração de uma solução: b) 5-FU a 240 nm e d) Curcumina a 425 nm .. 95
Figura 48– Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio e área de superfície BET: a) HAp:Eu@ZnO/5-FU e b) HAp:Eu@ZnO/curcumina. 97
Figura 49- Espectros de FTIR: a) (i) 5-FU, (ii) HAp:Eu@ZnO/5-FU e b) (i) Curcumina, (ii) HAp:Eu@ZnO/curcumina. 98

Figura 50-Micrografias da HAp multifuncional carregada com fármacos: a) e b) HAp:Eu@ZnO/5-FU; c) e d) HAp:Eu@ZnO/curcumina. 99
Figura 51-Liberação dos fármacos adsorvidos ao biomaterial multifuncional em PBS: a) HAp:Eu@ZnO/5-FU e b) HAp:Eu@ZnO/curcumina. 100
Figura 52-Toxicidade da HAp pura e HAp multifuncional, incubadas por 24 h com células do sarcoma 180 de camundongos. Citotoxicidade para concentrações similares de 5-FU (Controle positivo) e Curcumina livre em solução, além de HAp:Eu@ZnO carregada com os respectivos fármacos, analisadas nas mesmas condições a partir de ensaio MTS. 101
Figura 53-Partícula de HAp multifuncional: HAp:Eu@ZnO. 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fosfatos de cálcio com relevância na área biológica. 37
Tabela 2- Concentrações iônicas do plasma e SBF. 59
Tabela 3- Reagentes para o preparo de 1000 mL de SBF. 60
Tabela 4- Principais bandas de absorção para HAp e seus respectivos grupos funcionais. 67
Tabela 5- Identificação de amostras e formação de halos de inibição em bactérias. 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
Anti-EGFR	Anticorpo monoclonal
ATCC	Coleção de culturas do tipo americana
AuNPs	Nanopartículas de ouro
BET	Brunauer-Emmett-Teller
DNA	Ácido dexorribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DRX	Difração de raios X
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
FdUMP	5-flúor-2'-desoxiuridina-5'-fosfato
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier
HAp	Hidroxiapatita
HAp:Eu@ZnO	Hidroxiapatita multifuncional
HAp:Eu^{3+}	Hidroxiapatita com íons európio incorporados
HAp@ZnO	Hidroxiapatita com óxido de zinco na superfície
ICSD	Banco de dados da estrutura cristalina inorgânica
IO	Imagem óptica
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTS	Message Transfer System
NPs	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução fosfato salina
PET	Tomografia por emissão de pósitron
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	Fluido corporal simulado
S_{BET}	Área superficial
siRNA	Pequeno RNA interferente

SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
TC	Tomografia computadorizada
TTP	Timidina trifosfato
US	Ultrassom
UV-vis	Espectroscopia de absorção no Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 OBJETIVOS 20

2.1 Objetivo Geral 20

2.1.1 Objetivos Específicos 20

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 21

3.1 Câncer 21

3.2 Nanocarreadores e Liberação Controlada de Fármacos 24

3.3 Teranóstica: Terapia e Diagnóstico 26

3.4 Hidroxiapatita e Sistemas Nanocarreadores 35

3.4.1 Hidroxiapatita 35

3.4.2 Hidroxiapatita como Nanocarreador de Fármacos 39

3.4.3 Hidroxiapatita como Sonda 41

3.5 Íons Lantanídeos 43

3.6 Óxido de Zinco e Atividade Antibacteriana 45

3.7 Fármacos Antineoplásicos 48

3.7.1 5-Fluorouracil (5-FU) 49

3.7.2 Curcumina 50

4 METODOLOGIA 53

4.1 Síntese de nanopartículas de HAp 55

4.2 Síntese da HAp dopada com íons Eu^{3+} 56

4.3 Síntese de NPs de HAp revestidas com ZnO 57

4.4 Ensaio antibacteriano para HAp@ZnO 57

4.5 Síntese da HAp dopada com íons Eu^{3+} e revestidas com ZnO 59

4.6 Teste de Bioatividade *in vitro* da HAp e HAp:Eu@ZnO 59

4.7 Citotoxicidade *in vitro*: Hemocompatibilidade 61

4.8 Estudos da incorporação e cinética de liberação dos fármacos 5-FU e Curcumina em HAp:Eu@ZnO 62

4.8.1 Carregamento da curcumina e do 5-Fluorouracil 62

4.8.2 Cinética de liberação dos fármacos in vitro 62

4.9 Ensaio MTS para avaliação da citotoxicidade em células 63

4.9.1 Toxicidade da HAp e HAp:Eu@ZnO 63

4.9.2 Efeito dos fármacos carregados em HAp:Eu@ZnO sobre células cancerígenas 64
4.10 Técnicas de Caracterização 64
4.10.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 64
4.10.2 Difração de Raios X (DRX) 64
4.10.3 Análise de BET (Brunauer-Emmett-Teller) 65
4.10.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 65
4.10.5 Espectroscopia de absorção no Ultravioleta-Visível (UV-vis) 65
4.10.6 Espectroscopia de Luminescência 65
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 66
5.1 Nanopartículas de HAp 66
5.1.1 Caracterização química e física 66
5.1.2 Bioatividade in vitro 69
5.2 HAp dopada com íons Eu^{3+} 72
5.2.1 Caracterização química e física 72
5.3 HAp revestida com NPs de ZnO (HAp@ZnO) 78
5.3.1 Atividade Antibacteriana 78
5.3.2 Caracterização química e física 81
5.4 Hidroxiapatita multifuncional (HAp:Eu@ZnO) 84
5.4.1 Caracterização química e física 84
5.4.2 Atividade antibacteriana 90
5.4.3 Bioatividade in vitro 91
5.4.4 Hemocompatibilidade in vitro 93
5.4.5 Análise química, estrutural e cinética de liberação dos fármacos adsorvidos em HAp:Eu@ZnO 94
5.4.6 Toxicidade e eficiência como suporte para fármacos antineoplásicos frente à células do sarcoma 180 100
5.4.7 Esquema representativo de HAp:Eu@ZnO 103
5 CONCLUSÃO 104
6 PERSPECTIVAS 105
REFERÊNCIAS 106
APÊNDICE A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA 121

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública que atinge pessoas em todo o mundo. No Brasil, para o biênio 2018-2019, estima-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer por ano (INCA, 2018). O principal tratamento da doença é realizado empregando antineoplásicos por meio da quimioterapia, esta por sua vez, apresenta fatores bastante negativos, pois os fármacos administrados não possuem especificidade, e, portanto, atingem não apenas as células cancerosas, mas também, as células sadias, causando efeitos colaterais graves ao paciente (MOUSA; BHARALI, 2011).

A veiculação de antineoplásicos empregando sistemas formados por nanopartículas (NPs) representa um dos meios mais promissores no tratamento do câncer. A utilização de nanocarreadores promete a redução dos efeitos colaterais causados pelo uso do fármaco livre, levando-o até o local do tumor, melhorando sua taxa de internalização, biodisponibilidade e eficácia terapêutica (DON SOM; KIM, 2017 e SRIVASTAV *et al.*, 2019). Junto a isso, técnicas de imagens não invasivas podem auxiliar na observação de tumores e no acompanhamento de mecanismos referentes à proliferação e invasão de neoplasias.

Um sistema de veiculação de fármacos com a propriedade de geração de imagens se caracteriza como um sistema teranóstico. O termo “teranóstico” é definido como um material capaz de vetorizar agentes terapêuticos e agentes de diagnóstico de forma simultânea. A utilização destes sistemas poderá facilitar a visualização de tumores e tecidos doentes, melhorar seu monitoramento e acertar doses de antineoplásicos que sejam ideais ao tratamento (KELKAR; REINEKE, 2011).

Diversos materiais estão sendo estudados para o desenvolvimento de sistemas teranósticos como: NPs de óxido de ferro devido às suas propriedades de interesse para aplicação em sondas de contraste em ressonância magnética, bem como, transportadores de agentes terapêuticos (HADJIPANAYIS, 2010; XIE; LEE; CHEN, 2010); NPs de ouro têm características ópticas e eletrônicas que fornecem habilidade de direcionamento para tumores e potencial de imagem simultânea com a terapia fototérmica (CHOI, 2012; XIE; LEE; CHEN, 2010); Nanotubos de carbono apresentam alta capacidade de carregamento de drogas e possibilidade de ancoragem de outras NPs, como óxido de ferro e NPs de ouro (XIE; LEE; CHEN, 2010; WANG, 2015). No entanto, muitos fatores dificultam a aplicação destes materiais na medicina, como o alto custo por grama do produto, sínteses com rendimento muito baixo, estabilidade das

NPs, além dos possíveis efeitos colaterais e questões de toxicidade dos seus subprodutos (QUARTA *et al*., 2019). Neste caso, a busca por novos materiais que possam superar tais problemas é de grande relevância para o desenvolvimento de um sistema teranóstico.

NPs à base de fosfato de cálcio, como a HAp, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, tem despertado interesse para utilização como portador de fármacos, pois trata-se de um componente natural do corpo humano e possui características de biocompatibilidade e não toxicidade (DON SOM; KIM, 2017; SRIVASTAV *et al*., 2019; ACCESS, 2018). Além disso, apresenta a possibilidade de incorporação de diversos tipos de cátions e ânions em seu arranjo, o que permite sua funcionalização (HUGHES; RAKOVAN, 2002). Um exemplo disso trata-se da adição de íons lantanídeos que pode agregar a propriedade de luminescência na matriz transformando-a em uma sonda fluorescente, como verificado no trabalho de Li, *et al*. (2008) que desenvolveram um sistema HAp/Tb^{3+} e sugeriram que este pode ser utilizado como uma sonda biológica estável para pesquisas celulares.

A HAp também é capaz de adsorver substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo esta uma particularidade de grande importância para sua aplicação como veículo de fármacos devido aos diversos tipos de composições químicas farmacológicas existentes (SRIVASTAV *et al*., 2019). Ela também se destaca como um biomaterial extensivamente utilizado em tratamentos ósseos devido a sua similaridade com a fase inorgânica destes (ACCESS, 2018). Em casos de doenças como o câncer ósseo, cirurgias de remoção do tumor resultam em defeitos que necessitam da inserção de próteses ou enxertos, tal procedimento possui riscos de infecções bacterianas capazes de gerar graves complicações (INSTITUTO ONCOGUIA, 2018). Deste modo, a combinação de determinados óxidos metálicos com a HAp, tem sido investigada para a produção de um material com propriedade antibacteriana intrínseca (TANK et al., 2014; MARTÍNEZ *et al*., 2015). O óxido de zinco, ZnO, se apresenta como um candidato ideal a esta aplicação, pois é considerado um material não tóxico para os seres humanos, além de possuir efetiva atividade antibacteriana (LIU *et al*., 2009; NAZOORI; KARIMINIK, 2018). Inúmeros estudos também indicam que o Zn contribui para o crescimento de tecido ósseo, isto é, aumenta a osseointegração e melhora a fixação de implantes (ALVAREZ, FUKUDA; YAMAMOTO, 2010; LI *et al*., 2011; ZHAO *et al*., 2013).

Diante do exposto, o presente trabalho propõe a união de íons Eu^{3+} na matriz de HAp para incorporação de propriedades luminescentes tornado-a um sistema com

potencial de utilização como sonda ou ainda nanotermômetro, e NPs de ZnO para agregar atividade antibacteriana ao biomaterial, resultando em uma HAp multifuncional. Dois fármacos modelos antineoplásicos (5-Fluorouracil) e (Curcumina) foram utilizados para estudar o emprego do material como nanocarreador, avaliando-se sua capacidade de carregamento, cinética de liberação e eficiência frente a células tumorais a partir de ensaios de viabilidade celular com células do sarcoma-180 de camundongos. Depois, testes com diferentes bactérias mostraram o potencial antibacteriano da HAp multifuncional e sua bioatividade foi confirmada a partir de ensaios com solução simuladora de fluidos corporais à 37 ºC e pH=7,4.

Deste modo, a partir do estudo realizado verifica-se que o material desenvolvido se apresenta como um novo sistema com múltiplas propriedades de interesse para aplicações na área biomédica e, portanto, sugere-se que o mesmo possa ter sucesso quando utilizado como suporte para fármacos, enxertos no tratamento de doenças ósseas, a exemplo do câncer ou como revestimento de implantes metálicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um sistema multifuncional com o intuito de obter um suporte para fármacos antineoplásicos com propriedade luminescente e antibacteriana, empregando um biomaterial à base de hidroxiapatita, visando aplicação biomédica com foco na teranóstica do câncer.

2.1.1 Objetivos Específicos

» Sintetizar e caracterizar nanopartículas de hidroxiapatita para sua utilização como matriz;

» Dopar a hidroxiapatita com diferentes proporções de íons Eu^{3+} para estudo de suas propriedades fotofísicas;

» Sintetizar nanopartículas de óxido de zinco e adicionar diferentes concentrações destas sobre a superfície de partículas de hidroxiapatita para estudo da ação antibacteriana do material frente a bactérias gram positivas e gram negativas;

» Sintetizar um biomaterial à base de HAp com propriedade luminescente e antibacteriana e que apresente capacidade para utilização como suporte para fármacos antineoplásicos;

» Estudar a incorporação de dois diferentes fármacos modelos (5-Fluorouracil e Curcumina) a HAp multifuncional e realizar estudos da sua liberação em meio fisiológico simulado;

» Estudar a bioatividade e avaliar o comportamento de citotoxicidade *in vitro* para HAp pura e HAp multifuncional;

» Realizar estudo preliminar para investigar a eficiência da HAp multifuncional como suporte para fármacos frente à linhagem de células tumorais.

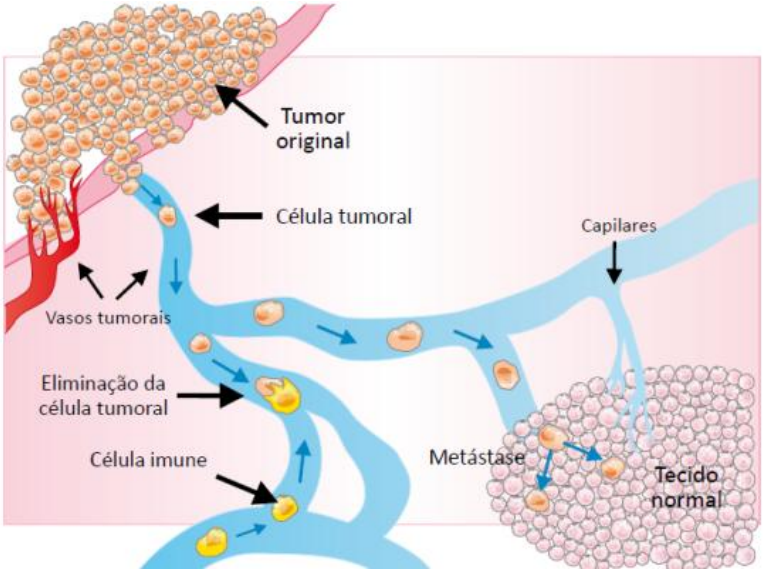
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Câncer

A perda do controle da divisão celular, bem como, a habilidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos, caracteriza a presença do câncer no corpo humano (JANEIRO; HELENA; OLIVEIRA, 2011; BELIZÁRIO, 2002). A palavra "câncer" refere-se a um grande grupo de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células (JANEIRO; HELENA; OLIVEIRA, 2011; OMS, 2018).

Uma proliferação anormal do tecido é também denominada de neoplasia, esta palavra trata-se do nome científico para o câncer ou tumor maligno, e significa "novo crescimento" (BELIZÁRIO, 2002). Uma neoplasia pode apresentar crescimento organizado, lento e com limites nítidos, neste caso, se tem uma neoplasia ou tumor benigno. Por outro lado, uma neoplasia ou tumor maligno é caracterizado por um maior grau de autonomia, além da capacidade de alastrar-se por tecidos vizinhos provocando metástase, como mostra a Figura 1 (HEJMADI, 2010; JANEIRO; HELENA; OLIVEIRA, 2011).

Figura 1-Esquema representando ocorrência da metástase.



(JANEIRO; HELENA; OLIVEIRA, 2011).

No primeiro estágio do câncer as células encontram-se localizadas somente na camada de tecido onde se originaram, sendo classificado como câncer não invasivo. Neste caso, as taxas de cura são elevadas se a neoplasia for tratada antes da sua

evolução para outras áreas do organismo (JANEIRO; HELENA; OLIVEIRA, 2011). Em um segundo estágio, as células cancerosas se espalham rapidamente para outras camadas celulares, entram na corrente sanguínea e se distribuem para outras partes do corpo, sendo denominado de câncer invasivo ou metástase (JANEIRO; HELENA; OLIVEIRA, 2011; HEJMADI, 2010; OMS, 2018).

O câncer é um problema de saúde pública que atinge pessoas em todo o mundo. No entanto, os países desenvolvidos e em desenvolvimento apresentam maior grau de incidência da doença. Calcula-se que 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes ocorreram no mundo em 2012 (INCA, 2018). No ano de 2018, o número de mortes devido ao câncer foi de 9,6 milhões em todo o mundo, isto significa que a cada seis mortes, uma foi atribuída a esta doença (OMS, 2018).

No Brasil, para o biênio 2018-2019, estima-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer por ano. As maiores incidências da doença no país são para os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto, porém, os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago também têm ocorrência expressiva (INCA, 2018).

O diagnóstico precoce do câncer pode ser um dos fatores determinantes para a sua cura. Assim, quanto mais cedo o câncer for detectado e tratado, mais efetivo será o tratamento, e, portanto, maior a possibilidade de cura e melhor será a qualidade de vida do paciente (JANEIRO; HELENA; OLIVEIRA, 2011; OMS, 2018). Muitos avanços tecnológicos estão sendo desenvolvidos para aprimorar o diagnóstico do câncer, como por exemplo, sondas de imagem molecular, assinaturas eletromagnéticas, combinação de informações anatômicas obtidas por técnicas de imagem como a Ressonância magnética com dados metabólicos, moleculares e fisiológicos da Tomografia por emissão de pósitrons, além de estudos para realização da biópsia líquida não invasiva baseada em amostras de sangue (AABME, 2019).

Existem três diferentes formas mais conhecidas de tratamentos para o câncer: quimioterapia, radioterapia e cirurgia, geralmente utilizadas em conjunto. A quimioterapia se caracteriza pelo emprego de medicamentos, denominados “antineoplásicos”, portanto, esta modalidade consiste no tratamento sistêmico do câncer. A radioterapia emprega equipamentos capazes de incidir radiação sobre áreas afetadas do organismo (JANEIRO; HELENA; OLIVEIRA, 2011; OMS, 2018).

O tratamento com a quimioterapia apresenta fatores bastante negativos, pois os fármacos administrados não possuem especificidade, e, portanto, atingem não apenas as células cancerosas, mas também, as células sadias, causando efeitos colaterais graves ao

paciente. Diversas pesquisas têm buscado encapsular e direcionar a droga ao local exato do tumor, diminuindo assim os efeitos adversos e aumentando a eficiência do medicamento (MOUSA; BARALI, 2011).

Algumas outras formas mais recentes e inovadoras de tratamento contra o câncer também já podem ser observadas, como por exemplo, a Hormonioterapia que consiste em um tratamento sistêmico e tem como objetivo a diminuição de hormônios ou o bloqueio destes nas células de tumores malignos que são dependentes dos mesmos. A Terapia Alvo é um tratamento sistêmico que emprega medicamentos com alvos específicos para a superfície ou o interior das células cancerosas. Imunoterapia utiliza anticorpos do próprio paciente ou produzidos em laboratório provocando aumento da resposta imune, fazendo com que o tumor seja reconhecido como um corpo estranho pelas células de defesa (ONCOGUIA, 2019). A Icecure trata-se do emprego do processo de crioablação que usa o frio extremo para destruir tecidos indesejados, apenas a utilização de uma sonda e nitrogênio líquido são necessários para eliminar tumores sólidos de mama em estágio inicial (ICECURE, 2019).

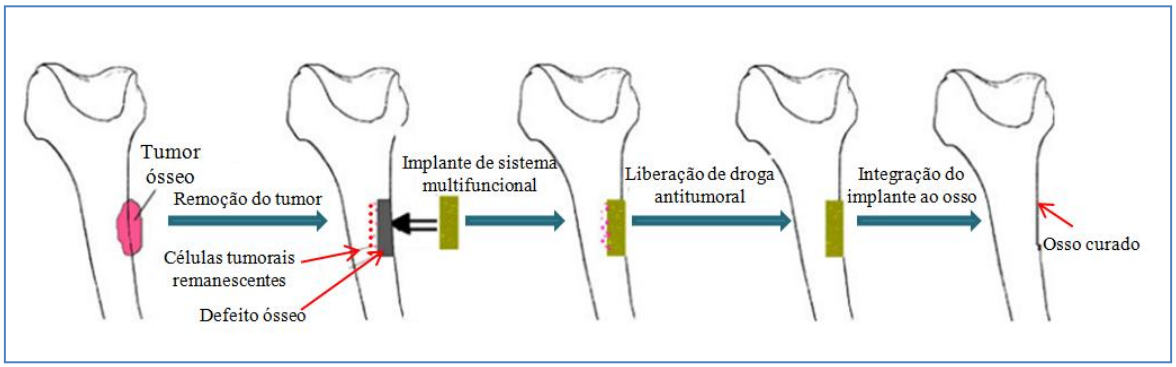
Entre os diversos tipos de cânceres e as mais variadas pesquisas na área, um tipo específico que se destaca é o câncer ósseo. Isto se deve ao fato de que o tumor ósseo é uma das formas mais comuns de câncer no mundo, evento que se atribui a ocorrência de metástases para o esqueleto (OUYANG *et al*., 2011; BUIJS; PLUIJM, 2009). Desta forma, o câncer ósseo é classificado como: “tumores primários”, os quais têm origem no osso e os “tumores secundários” que são resultado do espalhamento de cânceres primários que possuem preferência característica para o tecido ósseo (OUYANG *et al*., 2011). Os cânceres de mama e próstata são exemplos de neoplasias com predileção para metástase óssea, sendo estes responsáveis por mais de 80% dos casos. Cânceres de rim, tireoide e brônquios também são exemplos de carcinomas que resultam em metástase óssea (BUIJS; PLUIJM, 2009).

O tratamento quimioterápico utilizando a entrega específica do fármaco no osso ainda é bastante limitado, destaca-se que este é constituído principalmente de hidroxiapatita inorgânica. Deste modo, devido à elevada afinidade entre bisfosfonatos e HAp, estas substâncias têm sido empregadas em combinação com fármacos para o direcionamento seletivo ao osso, pois quando administrados por via intravenosa ou oral, são rapidamente detectados na superfície óssea (HIRABAYASHI; FUJISAK, 2003).

De forma geral, os cânceres ósseos resultam em intervenções cirúrgicas que geram um defeito ósseo. A deformidade pode ser preenchida com material de enxerto, e

este, pode ser carregado com um fármaco antineoplásico, otimizando assim, o tratamento quimioterápico (ANDRONESCU *et al*., 2010). A Figura 2 ilustra o processo de aplicação de enxerto como material de preenchimento e suporte para droga no tratamento de doenças ósseas.

Figura 2-Esquema ilustrando aplicação de implante carregado com droga antitumoral e a recuperação de defeito ósseo.



Adaptado de Andronescu *et al*. (2010).

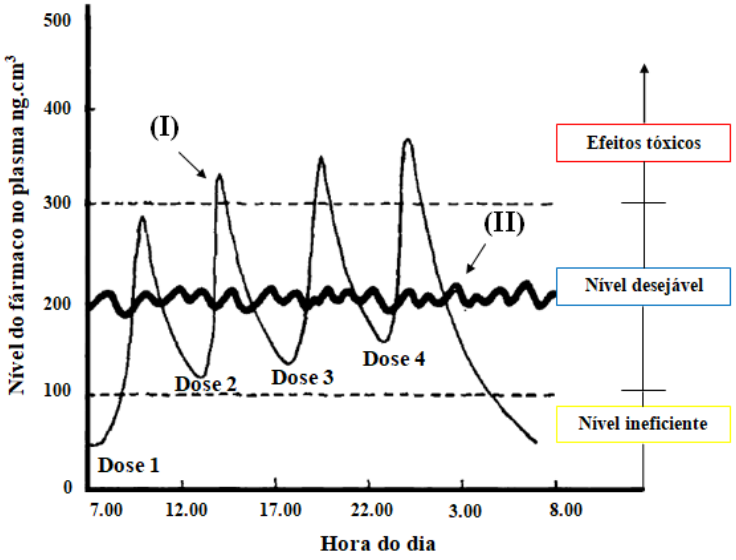
Pesquisas empregando HAp como suporte de fármacos para o tratamento de tumores ósseos podem ser encontrados na literatura. Itokazu *et al.* (1996) desenvolveram um bloco de HAp carregado com o fármaco adriamicina e implantaram de forma intramuscular em camundongos para o tratamento de sarcoma osteogênico. Neste caso, foi verificado inibição do crescimento tumoral, indicando que o sistema pode ser útil no tratamento de tumores malignos. Iafisco *et al.* (2009) também estudaram a utilização de dispositivos à base de HAp para administração de fármacos específicos ao tratamento de tumor ósseo após implante local obtendo resultados promissores.

3.2 Nanocarreadores e Liberação Controlada de Fármacos

Os sistemas de liberação controlada de fármacos, também denominados como "*drug delivery systems*" têm como objetivo regular a liberação do fármaco mantendo a faixa terapêutica desejada a partir da administração de uma única dose e por período de tempo predeterminado (SAFARI; ZARNEGAR, 2014). Estes sistemas são altamente promissores devido aos problemas relacionados à administração convencional de fármacos, os quais necessitam de repetidas doses, ocasionando picos máximos de concentração na corrente sanguínea, e posteriormente, o seu declínio. Desta forma, o

organismo fica exposto a quantidades que podem ser tóxicas, quando atingem níveis acima do requerido, ou ainda, ineficazes quando nos períodos em que os valores estão abaixo da faixa terapêutica, como observado na Figura 3 (GRAHAM, 1978).

Figura 3-Relação entre o método da terapia convencional (I) e a terapia através de sistemas de liberação controlada (II).



Adaptado de Graham, (1978).

As diversas formas tradicionais de administração de drogas, sendo estas, oral, nasal, transdérmica e endovenosas (VIEIRA; GAMARRA, 2016), resultam em variações nos níveis plasmáticos, gerando necessidade de altas doses e baixa biodisponibilidade. Por outro lado, sistemas capazes de transportar (carrear) o fármaco até o local a ser tratado oferecem inúmeros benefícios como:

- Maior tempo de circulação da droga devido ao seu prolongamento no organismo;

- Menores quantidades da droga e consequentemente, menor toxicidade da dosagem, devido ao seu direcionamento específico no corpo;

- Possibilidade de utilização de medicamentos tóxicos a partir da sua administração segura ao local predeterminado;

- Maior proteção das células e tecidos sadios dos efeitos colaterais graves, devido à entrega segura de medicamentos tóxicos (MUDSHINGE *et al*., 2011).

Diante do exposto, a nanotecnologia tem contribuído cada vez mais para o desenvolvimento e aprimoramento de nanocarreadores, os quais se apresentam em

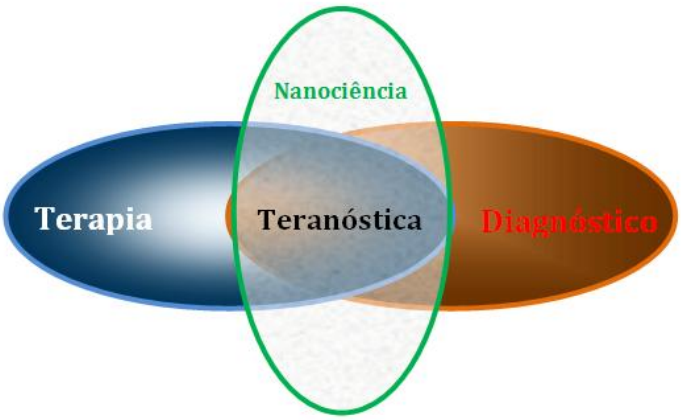
diversas formas e tamanhos, além de terem em sua composição diferentes tipos de materiais (MUDSHINGE *et al*., 2011). Estes sistemas possuem mecanismos de liberação do fármaco característicos para cada modelo. Em geral, um nanocarreador bem sucedido deve considerar o mecanismo de biodegradação do suporte, bem como, a taxa de liberação da droga, sendo esta dependente de fatores como: solubilidade da droga; dessorção do fármaco adsorvido na superfície do nanocarreador; difusão do fármaco através da matriz, erosão ou degradação do suporte, bem como, biocompatibilidade com o organismo visando a não toxicidade do material constituinte do nanocarreador (MUDSHINGE *et al*., 2011 e SINGH; LILLARD, 2012).

Diversas pesquisas têm projetado nanoestruturas cada vez mais avançadas para esta aplicação, algumas destas são: lipossomas, dendrímeros, micelas poliméricas, pontos quânticos e nanotubos de carbono, no entanto, de um modo geral, diversos fatores dificultam a aplicação das NPs na medicina, como por exemplo, alto custo por grama do produto, sínteses com rendimento muito baixo, estabilidade das NPs, além dos possíveis efeitos colaterais e questões de toxicidade dos materiais (QUARTA *et al*., 2019).

3.3 Teranóstica: Terapia e Diagnóstico

Como discutido até aqui, diversos sistemas nanocarreadores de fármacos têm sido desenvolvidos e continuam sendo aprimorados a partir de intensas pesquisas na área da nanotecnologia. Os avanços referentes aos nanocarreadores estão diretamente ligados aos elevados índices de ocorrências de câncer e grande mortalidade causada por essa doença (OMS, 2018). Com base nisso, a nanociência tem direcionado esforços para minimizar ou mesmo solucionar os efeitos adversos gerados por esta enfermidade (MOUSA; BARALI, 2011). Deste modo, surge a Teranóstica, palavra que combina terapia e diagnóstico de forma simultânea, em um mesmo sistema carreador, como mostra o esquema apresentado na Figura 4.

Figura 4-Esquema mostrando o interligamento entre a terapia e diagnóstico proporcionado pela nanociência, resultando na teranóstica.



Adaptado de Fan *et al*., (2014).

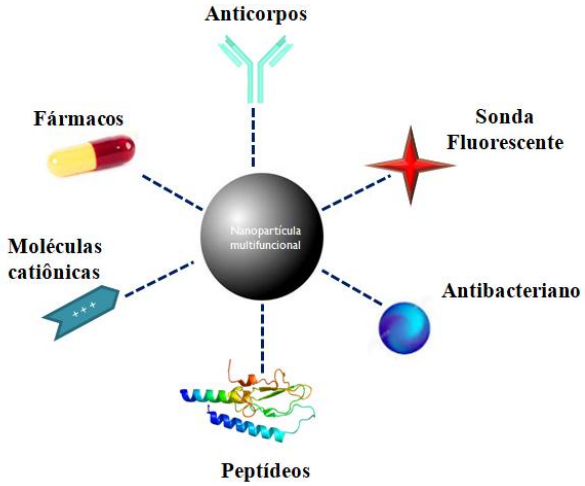
Sistemas formados por nanopartículas (NPs) representam um dos meios promissores para a veiculação de antineoplásicos. O emprego de nanocarreadores gera redução dos efeitos colaterais provocados pela quimioterapia em função dos danos nas células normais causados pela utilização do fármaco livre. Também pode proteger o medicamento até o local do tumor, melhorar sua taxa de internalização, biodisponibilidade e eficácia terapêutica (DAN SOM; KIM, 2017; SRIVASTAV *et al*., 2019).

Por outro lado, técnicas de imagens não invasivas podem auxiliar na observação de tumores e no acompanhamento de mecanismos referentes à proliferação e invasão de neoplasias. O imageamento óptico baseia-se no emprego de sondas fluorescentes usando radiação não ionizante e tem apresentado imagens de alta eficiência em estudos oncológicos com modelos de animais (MARTELLI *et al*., 2016). Deste modo, um sistema de veiculação de fármacos com propriedades luminescentes pode ser denominado de sistema teranóstico. O termo “teranóstico” é definido como um material capaz de vetorizar agentes terapêuticos e agentes de diagnóstico de forma simultânea. A utilização destes sistemas promete facilitar a visualização de tumores e tecidos doentes, melhorar seu monitoramento e acertar doses de antineoplásicos que sejam ideais ao tratamento (KELKAR; REINEKE, 2011).

Na Figura 5 é mostrada a representação geral de uma NP multifuncional com superfície que pode ser modificada por diversas moléculas (peptídeos, moléculas catiônicas e anticorpos) utilizadas para vetorização e liberação do fármaco no alvo

específico, além de apresentar a função de sonda fluorescente para acompanhamento por imagem e conter um agente antibacteriano para atuar contra infecções.

Figura 5- Esquema representando uma nanopartícula multifuncionalizada com perspectiva de aplicação na nanomedicina teranóstica.



Fonte: A autora, 2020.

O diagnóstico gerado a partir de NPs teranósticas, permite a localização da doença, o seu estágio de desenvolvimento e ainda, a resposta da terapia utilizada (JOKERST; GAMBHIR, 2011). Um sistema teranóstico ideal deve apresentar as seguintes características:

- Acúmulo rápido e seletivo no tumor;
- Fornece dados bioquímicos e morfológicos da região afetada;
- Eficiência na terapia;
- Biodegradável com subprodutos não tóxicos para o organismo.

Um sistema capaz de englobar todas as propriedades referidas acima irá permitir avaliar e adequar o tratamento às necessidades de cada doente, tornando a terapia personalizada. Tal perspectiva instiga o constante desenvolvimento de nanocarreadores com funções teranósticas (JANIB; MOSES; MACKAY, 2010). Além disso, técnicas tradicionais de imagem como: Raios X, Tomografia computadorizada, Ressonância magnética, entre outras, apresentam limitações relacionadas à insuficiente sensibilidade, baixa penetração do sinal através dos tecidos e baixa resolução espacial. No entanto, estas técnicas podem ser bem aproveitadas na imagem diagnóstica, quando se utilizam as sondas de imagem molecular, isto é, as NPs teranósticas. Estes fatores reforçam a

importância de estudos para sucessivos avanços dos sistemas multifuncionais (JOKERST; GAMBHIR, 2011).

Diferentes tipos de sistemas teranósticos estão sendo constantemente estudados, principalmente para aplicações no tratamento do câncer. Os nanosistemas descritos (item 3.2) possuem evidências que os classificam como bons transportadores de fármaco, e, portanto, as pesquisas recentes buscam sua reformulação incorporando agentes de imagem ou de contraste, que possibilitam a visualização instantânea de tecidos específicos, pois aumentam a relação sinal-ruído em relação aos tecidos vizinhos (JANIB; MOSES; MACKAY 2010).

Candidatos promissores a NPs teranósticas constituídas por diversos materiais e com diferentes vias de ação na vetorização da droga e geração de imagem são apresentados:

NPs de óxido de ferro - São nanocristais constituídos de magnetita ou hematita. Possuem excelentes propriedades magnéticas e biocompatibilidade intrínseca, que as tornam interessantes em aplicações biológicas, podendo ser utilizadas na forma de sondas de contraste para ressonância magnética, bem como, transportadores de agentes terapêuticos (XIE; LEE; CHEN, 2010). A detecção de células cancerígenas pode ser realizada a partir do aumento do contraste de imagem de ressonância magnética a partir da utilização destas NPs. Assim, NPs de óxido de ferro estão sendo estudadas para terapia e aumento de contraste em tumores cerebrais, visando diagnósticos mais rápidos e eficientes, pois atualmente o tratamento para este tipo de neoplasia consiste na remoção cirúrgica do tumor, radioterapia e quimioterapia, isto se deve à ineficácia no diagnóstico, não resultando em bons prognósticos (RICHAR *et al*., 2016; HADJIPANAYIS; MACHAIDZE; KALUZOVA, 2010).

Pontos quânticos – São formados por materiais semicondutores com forma de nanocristais, apresentando excelentes propriedades de interesse na área da teranóstica, como: bom suporte para agentes terapêuticos e direcionadores, além de um extenso espectro de absorção, emissão de espectros estreitos e estáveis e fotoestabilidade (XIE; LEE; CHEN, 2010).

Os pontos quânticos estão sendo avaliados em diversas pesquisas para sua utilização na teranóstica do câncer. Em trabalho realizado empregando pontos quânticos revestidos com polímero e funcionalizados com peptídeo foi verificado a obtenção de um nanosensor eficiente na teranóstica de glioma cerebral a partir de testes *in vitro* e *in vivo*, o sistema desenvolvido foi capaz de cruzar a barreira hematoencefálica e atingir o

alvo do tumor (HUANG *et al*., 2017). Em outra pesquisa, micelas poliméricas carregadas com pontos quânticos foram inseridas em animais com câncer de mama, onde foi possível observar a partir de imagens em tempo real, uma rápida distribuição das NPs *in vivo* por todo o corpo, incluindo o tumor, além de alta atividade antitumoral e toxicidade seletiva (NURUNNABI *et al*., 2010).

NPs de ouro (AuNPs) – Possuem variadas formas, como hastes, cubos, esferas fios e gaiolas. O tamanho e forma destas NPs exercem grande influência sobre suas excelentes características ópticas e eletrônicas ajustáveis, que tornam estes nanosistemas ideais como sondas de imagem (XIE; LEE; CHEN, 2010). Com base nestas propriedades, nanopartículas de ouro têm sido investigadas intensivamente para aplicações na teranóstica do câncer. Diversos trabalhos apresentam resultados promissores nesta área. Como por exemplo, um sistema teranóstico foi obtido a partir de AuNPs conjugadas com polietilenoglicol e o anticorpo (cetuximabe), exibindo excelente habilidade de direcionamento para tumores e um forte potencial de imagem simultânea e ablação fototérmica de células de câncer epitelial (CHOI *et al*., 2012). Em outra pesquisa, AuNPs conjugadas com anticorpo monoclonal (anti-EGFR) foram avaliadas in vitro utilizando células epiteliais orais malignas e não malignas. Neste caso, um diagnóstico eficiente de células cancerígenas foi obtido, sendo possível visualizar de forma distinta as células malignas e não malignas, permitindo a aplicação da terapia fototérmica seletiva de maneira simultânea, ocasionando a destruição específica das células cancerígenas (HUANG *et al*., 2006).

Nanotubos de carbono - Como já citado, os nanotubos de carbono possuem grande potencial como carreadores de fármacos devido suas propriedades intrínsecas, como alta capacidade de carregamento de drogas e possibilidade de ancoragem de outras NPs, como óxido de ferro e AuPNs, tornando este sistema de elevada importância na área da teranóstica. No entanto, fatores referentes a não biodegradabilidade e não conhecimento da ação dos seus resíduos no organismo são fatores limitantes para seu uso clínico (XIE; LEE; CHEN, 2010). Estudos têm buscado avaliar as vantagens e desvantagens dos nanotubos na teranóstica, como exemplo, um trabalho realizado empregando NPs de óxido de ferro conjugadas a nanotubos de carbono, modificados com biopolímeros, foi capaz de transportar com sucesso pequenos fragmentos de RNA para células tumorais, além de possibilitar o seu rastreamento (WANG *et al*., 2015). Nanotubos de carbono de parede simples revestidos com polietilenoglicol, funcionalizados com fosfolipídio e ligados a peptídeos apresentaram

alta acumulação em tumor presente em camundongos, sendo sua biodistribuição acompanhada por tomografia por emissão de pósitrons *in vivo*. Neste trabalho, não foi observada toxicidade do sistema durante o período de monitoramento (LIU *et al*., 2007).

NPs de sílica – Sua síntese possibilita a formação de um material mesoporoso com controle no tamanho dos poros. A nanoestrutura obtida apresenta alta área de superfície com muitos espaços vazios, fazendo desta, um excelente suporte para o carregamento de fármacos. As NPs de sílica não apresentam funções próprias de imagem, no entanto, são suportes adequados para incorporação de agentes tanto terapêuticos, como de imagiologia, como pontos quânticos, NPs de ouro e NPs de óxido de ferro, despertando seu interesse para aplicações na teranóstica do câncer (XIE; LEE; CHEN, 2010). Em estudo realizado com células-tronco, NPs de sílica mesoporosa demonstraram liberação controlada a partir da sua biodegradação dentro das células no período de um mês isto pôde ser observado a partir de imagens geradas por ultrassom e ressonância magnética. Uma limitação verificada para este sistema refere-se ao constante fornecimento do sinal de imagem, independentemente das células estarem vivas ou mortas (KEMPEN *et al*., 2015). Em outra pesquisa, um sistema multifuncional a base de sílica, utilizando corante fluorescente e um peptídeo conjugado, possibilitou entrega da droga a um tumor de câncer de próstata, bem como, a visualização de sua biodistribuição *in vivo* usando tomografia computadorizada. O ponto negativo do sistema consistiu no seu rápido reconhecimento e remoção da circulação por células do sistema reticuloendotelial, necessitando assim, de maiores estudos para o seu aprimoramento (WANG *et al*., 2015).

Diante do exposto, se observa claramente que existe uma constante busca pelo desenvolvimento e aprimoramento de NPs produzidas por diversos materiais com foco em aplicações na teranóstica, buscando prioritariamente o melhoramento do tratamento e minimização de mortes devido ao câncer. Deste modo, além das características das NPs apresentadas, as técnicas disponíveis para a geração de imagens *in vivo* destas também são de elevada importância para o seu emprego adequado e eficiente no diagnóstico, pois estas técnicas possuem vantagens e desvantagens relativas a cada caso, podendo ser uma ferramenta poderosa para caracterização de processos dentro de organismos vivos quando associadas com as sondas moleculares ou agentes de contraste (JANIB; MOSES; MACKAY, 2010). As principais técnicas atualmente empregadas são: Ressonância magnética (RM); Tomografia computadorizada (TC); Tomografia por

emissão de pósitron (PET); Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT); Ultrassom (US); Imagem óptica (IO).

Na sequencia são descritas resumidamente as características de cada uma destas técnicas, apresentando seus pontos de interesse para formação de uma imagem apropriada.

Ressonância magnética (RM) – A imagem gerada por esta técnica se deve ao alinhamento de dipolos magnéticos quando submetidos a um campo magnético. Diferentes ambientes proporcionam diferentes tempos de relaxamento dos dipolos, resultando em tipos diversos de sinais de RM, assim, agentes de contraste são utilizados para reduzir parâmetros de relaxamento melhorando a diferenciação entre os tecidos, podendo destacar anormalidades. Esta técnica possui vantagens como boa resolução espacial e geração simultânea de informações fisiológicas e anatômicas. Como ponto negativo, possui baixa sensibilidade em relação a outras técnicas, necessitando que grandes quantidades de sonda molecular sejam mantidas no tumor. Um agente de contraste normalmente empregado é o gadolínio, no entanto, a utilização de altas doses, e sua lenta excreção e toxicidade devido à acumulação de longo prazo são fatores preocupantes (JANIB; MOSES; MACKAY 2010).

Tomografia computadorizada (TC) – Esta não consiste em uma técnica de imagem molecular, no entanto, produz informações anatômicas complementares. Na TC a imagem é resultado da absorção de raios X que incidem sobre o corpo, os quais são absorvidos de forma diferente para cada tipo de tecido, permitindo sua distinção. Para que esta técnica tenha capacidade de gerar imagens moleculares, sondas específicas deverão ser iodadas, além disso, o acúmulo de elevadas quantidades in situ seriam necessárias para possibilitar a diferenciação do sinal de raios X (JANIB; MOSES; MACKAY, 2010; OLIVEIRA *et al*., 2006).

Tomografia por emissão de pósitron (PET) e Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) - Ambas as técnicas combinam a medicina nuclear com a tomografia computadorizada. Para emissão do sinal, são administrados radiofármacos no paciente, para que estes passem a emitir a radiação (raios γ de alta energia) necessária a formação de imagens. O princípio físico da técnica consiste na utilização de um radionuclídeo (núcleo instável) que decai para um núcleo mais estável emitindo radiação α, β^- e β^+ e γ. Na técnica PET, um próton (p) do núcleo é convertido

em um nêutron (n) liberando ao mesmo tempo um pósitron (β^+) e um neutrino (υ), equação 1.

$$p = n + \beta^+ + \upsilon \qquad (1)$$

A interação dos pósitrons do radionuclídeo com os elétrons existentes na matéria originam fótons γ com energia de 511 keV, estes são utilizados na geração de imagens. Na técnica SPECT são utilizados radiofármacos que possuem em sua composição radionuclídeos emissores de radiação γ, equação 2.

$$_{Z}{}^{A}X \rightarrow {}^{A}{}_{Z}X + \gamma \qquad (2)$$

Comparativamente, a técnica por PET possui sensibilidade dez vezes maior que o SPECT, no entanto, SPECT permite imagem simultânea de múltiplos radionuclídeos, além de ter meia vida mais longa (JANIB; MOSES; MACKAY, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Ultrassom (US) – Consiste em uma técnica rápida, segura e de baixo custo, onde a imagem é gerada a partir de ondas sonoras de alta frequência emitida por meio de um transdutor colocado sobre a pele, estas são refletidas de volta dos órgãos internos para formação de imagens em tempo real. Apresenta desvantagens como baixo contraste e pouca resolução (JANIB, MOSES; MACKAY, 2010).

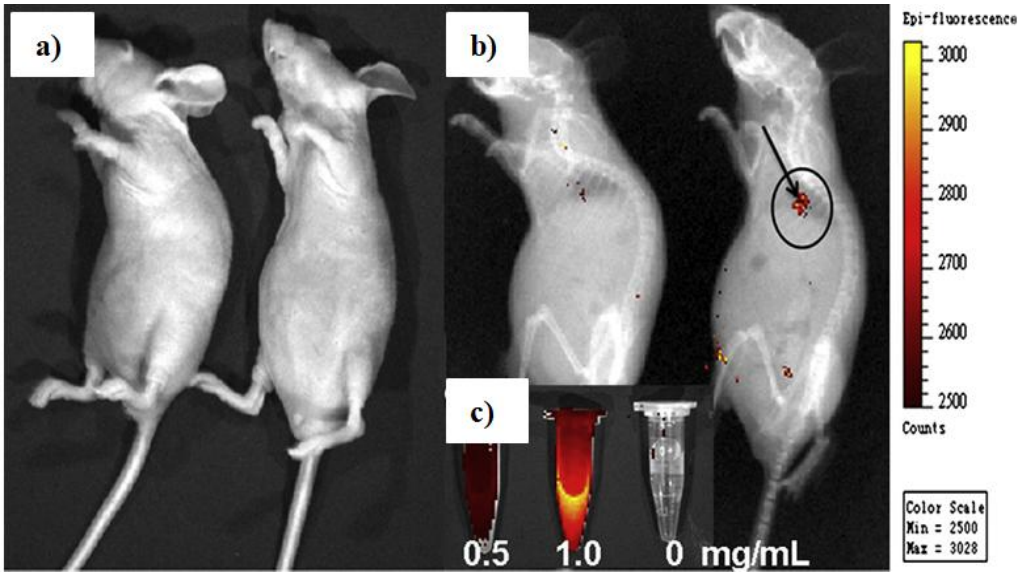
Imagem óptica (IO) – Utiliza fótons emitidos a partir de sondas luminescentes, sendo a imagem óptica gerada a partir de radiações não ionizantes. O sinal obtido pode ser regulado em resposta a ocorrências biológicas (HEFFERN; MATOSZIUK; MEADE, 2014). A imagem de fluorescência em camundongos é rápida e de baixo custo. De forma geral, se radiação eletromagnética com determinado comprimento de onda de excitação incidir (na faixa de luz visível de 395-600 nm) sobre a espécie, esta, emite luz resultante que é coletada por câmeras ultrassensíveis para formação de imagens. Células tumorais podem ser observadas por esta técnica utilizando-se marcadores fluorescentes (WEISSLEDER, 2002).

A técnica possui alta sensibilidade necessitando de pequenas quantidades de sonda para detecção do sinal e formação de imagens de alto contraste e resolução

celular e subcelular. Por outro lado, a baixa penetração e autofluorescência dos tecidos não alvos, bem como, absorção de luz por proteínas são fatores limitantes (HEFFERN; MATOSZIUK; MEADE, 2014). No entanto, é de conhecimento que sistemas biológicos são altamente transparentes para a luz de infravermelho próximo (NIR), na faixa de 700 a 1100 nm (KAM *et al*., 2005). Assim, imagens no NRI proporcionam autofluorescência reduzida, diminuição na dispersão de fótons pelo tecido, além de ser possível maior profundidade de penetração, tornando a técnica mais apropriada para sistemas vivos (JANIB, MOSES; MACKAY, 2010).

Uma representação do emprego da teranóstica utilizando técnica de imagem óptica para acompanhamento de medicamentos administrados ou materiais implantados no corpo é mostrada na Figura 6. Nesta apresenta-se uma imagem de fotoluminescência *in vivo* de ratos após injeção subcutânea de nanocarreador dopado com íons luminescentes. Comparando-se as Figuras 6-a e 6-b observa-se a eficácia do material como sonda na realização de exames e obtenção de diagnósticos.

Figura 6- Imagem de fotoluminescência *in vivo* de ratos após injeção subcutânea de nanocarreador, a) sem e b) com Eu^{3+}/Gd^{3+}; c) Imagens de emissão fotoluminescente para nanobastões Eu^{3+}/Gd^{3+} em diferentes concentrações. O comprimento de onda de excitação foi de 430 nm.



(CHEN *et al*., 2011).

3.4 Hidroxiapatita e Sistemas Nanocarreadores

3.4.1 Hidroxiapatita

O mineral apatita, $Ca_5(PO_4)_3(F,OH,Cl)$, é o fosfato natural mais abundante da Terra. Sua estrutura química comporta muitas substituições, entre cátions e ânions, praticamente metade da tabela periódica pode ser incorporada ao seu arranjo atômico, sendo esta, uma das propriedades mais interessantes das apatitas (HUGHES; RAKOVAN, 2002). Em sistemas biológicos, a variedade de apatita denominada hidroxiapatita (HAp), $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, consiste no principal componente mineral de ossos e dentes (PAN; FLEET, 2002). Por apresentar alta semelhança química e cristalográfica com a estrutura óssea, a HAp sintética é considerada uma substância bioativa, pois se liga fortemente ao tecido ósseo hospedeiro, além de ser um material biocompatível, osteocondutor e atóxico (MURUGAN; KAMAKRISHNA, 2005).

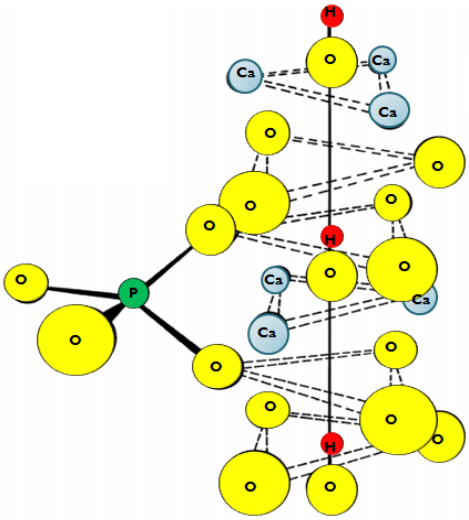
A HAp é considerada um biomaterial e, portanto, de acordo com Mirtchi et al. (1989) pode ser definida como uma substância de origem natural ou sintética que é utilizada no reparo ou substituição de tecidos ou órgãos do corpo. Outras definições para algumas das propriedades apresentadas pela HAp são dadas por Hench e Wilson, (1993):

- Bioatividade – O material promove a ligação química entre o implante e a região do organismo onde foi implantado. Esta ocorrência deve-se à similaridade química do material com os tecidos ósseos;
- Biocompatibilidade – Trata-se de um material seguro para ser inserido dentro do corpo humano, pois é bem tolerado e não apresenta resposta inflamatória. No caso de degradação do material, este não deve resultar em substâncias danosas ao organismo;
- Biorreabsorção – Caracteriza-se pela ocorrência de degradação, solubilização ou fagocitose do material pelo organismo. Essa propriedade permite com que o material do implante possa ser reaproveitado pelo organismo na reconstituição de um novo osso.

Em relação a sua estrutura cristalina, a HAp cristaliza-se no sistema hexagonal com grupo espacial P63/m e parâmetros de rede a = b = 9,43 Å e c = 6,88 Å. Sua célula unitária é formada por dez íons cálcio, os quais ocupam duas posições cristalográficas distintas, denominadas sítios I e II. Para o sítio (I) quatro íons Ca^{2+} se encontram alinhados em colunas e localizam-se em volta de seis átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros dos grupos PO_4^{3-}. O sítio (II) reúne os outros seis íons Ca^{2+} formando dois triângulos equiláteros perpendiculares à direção c da estrutura. Os grupos hidroxilas (OH) se localizam de forma desordenada acima e abaixo dos triângulos

formados pelos íons cálcio (HUGHES; RAKOVAN, 2002; ELLIOTT; DOWKER, 2002). A Figura 7 mostra o arranjo estrutural dos átomos cálcio, fósforo, hidrogênio e oxigênio ao longo de um dos eixos da célula da HAp.

Figura 7-Arranjo estrutural dos íons em torno do eixo c da HAp.



Adaptado de Elliott e Dowker, (2002).

A estrutura do cristal da apatita permite uma grande quantidade de substituições de cátions e ânions, além da formação de vacâncias e soluções. Cátions metálicos dos elementos K, Na, Mn, Ni, Cu, Zn, Sr, Ba, Pb, Cd, Y, podem substituir o Ca^{2+}, enquanto alguns ânions como AsO_4^{3-}, SO_4^{2-}, CO_3^{2-} e SiO_4^{4-} podem substituir o PO_4^{3-} (HUGHES; RAKOVAN, 2002**;** ELLIOTT; DOWKER, 2002). As trocas iônicas na estrutura das apatitas podem resultar na alteração de suas propriedades, como morfologia, parâmetros de rede, cristalinidade e solubilidade (CAZALBOU *et al*., 2005).

As apatitas biológicas, isto é, o mineral constituinte dos ossos e dentes trata-se de uma forma impura da HAp, sua composição apresenta uma porcentagem de CO_3^{2-} e H_2O. Portanto, as apatitas sintéticas carbonatadas são formadas quando grupos CO_3^{2-} substituem OH^- ou PO_4^{3-}, obtendo-se, por exemplo, $Ca_{10}(PO_4)_6(CO_3,OH)_2$ ou $Ca_{10-x}Na_x(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x(OH)_2$. A HAp estequiométrica possui razão molar Ca/P = 1,66, semelhantemente a razão encontrada nos ossos (1,6 a 1,7), (ELLIOTT; DOWKER, 2002). Por outro lado, muitos outros fosfatos de cálcio de interesse biológico (Tabela 1) com razão molar variando de 0,5 a 2,0, também podem ser obtidos empregando método da precipitação e utilizando fontes de cálcio e fósforo.

Tabela 1- Fosfatos de cálcio com relevância na área biológica.

Nome	**Fórmula Química**	**Observação**	**Razão molar Ca/P**
Fosfato de octacálcio (OCP)	$Ca_8H_2(PO_4)_6.5H_2O$	Também conhecido como fosfato de cálcio pentahidratado	1,33
Mono-hidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$CaHPO_4.2H_2O$	Fase mineral denominada brushita	1,00
Mono-hidrogeno fosfato de cálcio anidro (DCPA)	$CaHPO_4$	Fase mineral denominada monetita	1,00
Fosfato tetracálcio (TeCP)	$Ca_4(PO_4)_2O$	Denominado também como tetrafosfato de cálcio	2,00
Fosfato tricálcio (TCP)	$Ca_3(PO_4)_2$	Apresenta três fases polimórficas	1,50
Hidroxiapatita (HAp)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	Pode ser estequiométrica ou não	1,66
Apatita carbonatada (ACP)	$Ca_{10}(PO_4)_6CO_3$	Pode ocorrer substituição dos íons PO_4^{3-} por CO_3^{2-}	1,66
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$Ca_2P_2O_7$	Apresenta três fases polimórficas	1,00

Adaptado de Ambrosio *et al*., (1991).

Apesar da existência de grande variedade de cerâmicas à base de fosfatos de cálcio com importância na área médica, a HAp é a mais estudada devido à sua similaridade química e cristalográfica com o tecido ósseo. A HAp apresenta propriedades como bioatividade e osteocondutividade, as quais consistem na capacidade do material formar ligações químicas com os ossos, ocasionando uma melhor adesão do implante, bem como, acelerando o crescimento de um novo osso ao seu redor. Estas características são extremamente atraentes para aplicação da HAp na área médica. Além disso, diferentemente de outros fosfatos de cálcio, a HAp é termodinamicamente estável em pH fisiológico e não possui toxicidade local ou sistêmica (LOPES; OLIVEIRA; STEVES, 2015).

A estabilidade da HAp sintética em meio fisiológico proporciona baixa taxa de degradação desta cerâmica e isto dificulta sua reabsorção pelo organismo, apresentando-se como um fator limitante para aplicações que necessitam de boa degradabilidade do material. No entanto, a adição de uma segunda fase à HAp, como por exemplo, fosfato tricálcio (β-TCP) ou carbonato de cálcio ($CaCO_3$), propiciam um aumento na sua taxa de degradação. Do mesmo modo, a incorporação de grupos CO_3^{2-} resulta em um aumento de solubilidade da HAp. Os íons CO_3^{2-} podem ser inseridos na estrutura da

HAp por substituição de OH^- ou PO_4^{3-}, no entanto, o carbonato substitui de forma predominante os íons fosfato, pois isto ocorre a baixas temperaturas (50-100 ºC), enquanto para os sítios OH^- temperaturas mais elevadas são necessárias. A hidroxiapatita carbonatada é mais suscetível a dissolução devido às interações do $CaCO_3$ serem mais fracas que as do $CaPO_4^-$, além disso, substituições iônicas podem resultar no crescimento de cristais com desordem atômica e redes tensionadas, provocando estado de energia elevado e maior solubilidade (OWEN; DARD; LARJAVA, 2017).

A menor estabilidade da estrutura cristalina da fase β-TCP comparada a HAp, resulta em uma maior taxa de degradação desta cerâmica, assim, muitos estudos referentes a cerâmicas bifásicas podem ser vistos na literatura (OWEN; DARD; LARJAVA, 2017). Ogose *et al.* (2004) observaram que após incorporação da HAp em osso humano, nenhuma biodegradação foi detectada, enquanto implantes de β-TCP foram parcialmente absorvidos e substituídos por um novo osso, considerando os mesmos parâmetros no estudo. ROLDAN *et al.* (2010) avaliaram a formação óssea e degradação de cerâmicas bifásicas de HAp/β-TCP. Os testes *in vivo* mostraram a degradação do implante e crescimento ósseo através do suporte cerâmico.

Assim, biocerâmicas de HAp com partículas nanométricas, baixa cristalinidade e substituições iônicas (Na, Mg, K, F, Cl e CO_3^{2-}) apresentam fatores determinantes para uma boa solubilidade do material, bem como, propriedades de interesse para aplicação na área médica (LIN; CHANG, 2015).

A HAp pode ser produzida por diferentes rotas de síntese, como, reações no estado sólido, sol-gel, reações hidrotérmicas e via úmida. Neste trabalho o método escolhido foi o via úmida empregando método da precipitação. Este apresenta procedimento simples, permitindo a formação de material homogêneo e com composição estequiométrica bem definida. A técnica também possui baixo custo e boa reprodutibilidade. A síntese ocorre pelo preparo de duas soluções homogêneas de sais dos íons precursores da HAp, respectivamente, cálcio e fósforo. A mistura das soluções extrapola o produto de solubilidade de uma das espécies ocasionando a formação de um precipitado que posteriormente é separado da solução por meio da filtração (OLIVEIRA *et al*., 2010).

A partir das características ótimas da HAp e dos diversos métodos de síntese disponíveis para sua fabricação, é possível verificar um grande número de pesquisas que objetivam a utilização da HAp pura ou na forma de compósitos para as mais diversas

aplicações. A maioria dos trabalhos refere-se ao seu emprego na área de implantes ósseos, recobrimento de próteses metálicas e enxertos (SCHLIEPHAKE; NEUKAN, 1991; BELLUCCI *et al*., 2013; FAIG-MARTÍA; GIL-MURB, 2008; KUMAR; VINITHA; FATHIMA, 2013). No entanto, nos últimos anos, a HAp tem despertado interesse na área de entrega de fármacos como nanocarreadores, pois além das suas propriedades como biomaterial, a HAp também possui alta capacidade para adsorção de moléculas, tornando-a capaz de atuar como suporte para fármacos (LOPES; OLIVEIRA; STEVES, 2015). Junto a isso, a dissolução da HAp também é dependente do pH do meio, a qual é favorecida em pH ácido. Esta característica apresenta elevado interesse em aplicações ligadas ao câncer, pois em tecidos normais o pH é de aproximadamente 7,4, enquanto em tumores sólidos o pH verificado é em torno de 5,0, isto pode permitir com que o fármaco incorporado a matriz de HAp seja liberado preferencialmente na região do tumor (LIN; CHANG, 2015).

3.4.2 Hidroxiapatita como Nanocarreador de Fármacos

Muitos estudos vêm sendo realizados no intuito de se avaliar o potencial da HAp como nanocarreador para fármacos, bem como, entender a sua cinética de liberação em meio fisiológico, isto porque além da biocompatibilidade e não toxicidade desta biocerâmica, a HAp pode ser funcionalizada devido a facilidade de incorporação de diversos íons, possibilitando sua vetorização para locais específicos (HUGHES; RAKOVAN, 2002). A matriz de HAp também é capaz de adsorver substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo uma característica de grande importância para sua aplicação como veículo de fármacos, dado os diversos tipos de composições químicas existentes (SRIVASTAV *et al*., 2019).

Alguns trabalhos ainda relatam sobre a maior especificidade da HAp para células neoplásicas preferencialmente a células sadias (LIESKE; NORRIS; TOBACK, 1997; HAN *et. al*., 2014; HAN *et al*., 2012), esta observação torna o material de grande interesse para aplicações em sistemas de vetorização de medicamentos para o câncer, tendo em vista as complicações resultantes da quimioterapia convencional.

A especificidade relatada é atribuída a maior atração eletrostática entre os sítios positivos dos cristais de HAp com a elevada carga negativa de superfície em células cancerosas. A carga superficial negativa em células neoplásicas trata-se de uma particularidade destas que não é observada em células normais. Isto ocorre porque células cancerígenas metabolizam a glicose ($C_6H_{12}O$) de uma forma diferente das

células sadias, resultando na formação de elevado nível de lactato ($C_3H_5O_3^-$) (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; SHI; 2017). Estudo com 22 linhagens celulares de câncer confirmou a relação direta entre secreção de lactato e a carga elétrica destas. Assim, a presença de lactato e a carga elétrica negativa de superfície tornaram-se uma característica universal e específica para células neoplásicas (SHI, 2017).

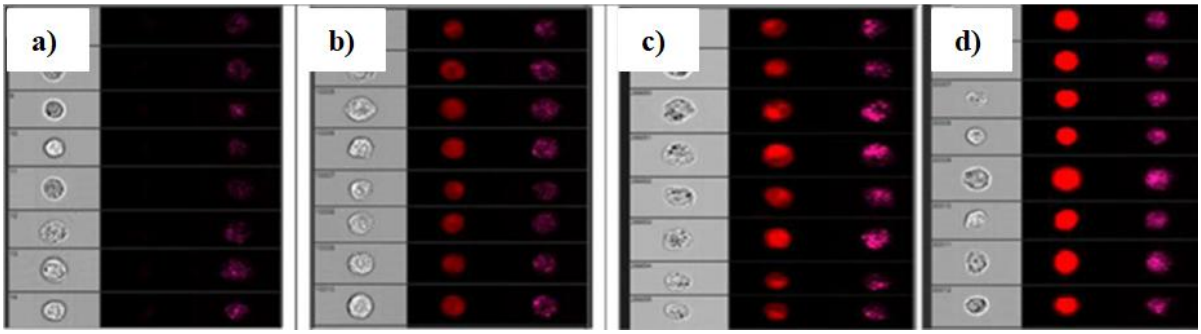
De acordo com Haider *et al*. (2017) muitos estudos sobre a interação entre cristais de HAp e proteínas podem ser explicados a partir da sua composição e sítios de ligação. Neste caso, a HAp apresenta dois sítios de ligação, denominados sítio "C" (Ca^{2+}) e sítio "P' (PO_4^{3-}) (HAN *et al*., 2012; HAIDER *et al*., 2017), quando a HAp é suspensa em água adquire carga positiva devido a exposição dos sítios "C'' e consequente liberação de íons OH^- da superfície do cristal. Com a liberação dos íons OH^-, íons Ca^{2+} carregados positivamente interagem com a superfície negativa de proteínas (HAIDER *et al*., 2017). A interação da HAp com células epiteliais renais foi constatada por Lieske; Norris e Toback, (1997) neste trabalho, foi verificado que os cristais de HAp se comportam como superfícies carregadas positivamente e se ligam aos sítios aniônicos das células. Han *et al*. (2012) estudaram a hemocompatibilidade da HAp e confirmaram a existência de interações eletrostáticas entre os grupos negativos presentes na superfície das hemácias e os locais de ligação carregados positivamente nos cristais da HAp. Corroborando com os dados mencionados, resultados da pesquisa de Han *et al*. (2014) demonstraram que NPs de HAp foram capazes de inibir a proliferação celular de células tumorais humanas *in vitro* e *in vivo*, além disso, a morte celular foi de 65% para células cancerosas e menor que 30% para células sadias. Os autores atribuem tal efeito a maior especificidade da HAp para as células cancerosas além disso, uma maior taxa de endocitose provocou maior internalização dos cristais do biomaterial nas células neoplásicas em relação as células sadias.

Em função das características descritas, a HAp se apresenta como um suporte para fármacos de elevado interesse científico, mais especificamente para antineoplásicos. No trabalho realizado por Kunieda *et al*. (1993), a HAp foi utilizada como suporte para a substância anticancerígena doxorrubicina (DOX), sendo esta incorporada à matriz pelo método da adsorção. Experimentos *in vitro* indicaram liberação lenta e constante do medicamento. Geuli *et al*. (2017), sintetizaram NPs de HAp carregadas com os antibióticos sulfato de gentamicina e ciprofloxacina e as depositaram eletroforeticamente sobre um substrato de titânio. Foi verificada boa bioatividade do material e os perfis de liberação dos revestimentos indicaram liberação prolongada. Em

estudo feito por Santos *et al*. (2009), grânulos de HAp de tamanho micro foram produzidos para suporte do fármaco antineoplásico 5-Fluorouracil (5-FU) e como modelo de regeneração óssea. Os grânulos apresentaram rápida taxa de liberação do 5-FU em solução tampão à 37ºC. Aghaei *et al*. (2014), produziram um nanocompósito de HAp com sílica mesoporosa e o fármaco ibuprofeno absorvido. O sistema apresentou potencial para aplicações biomédicas, sendo a taxa de liberação da droga maior para o compósito em relação à sílica mesoporosa pura. Yoon *et al*. (2015), estudaram a incorporação do 5-FU por adsorção à superfície da HAp. Neste trabalho relata-se sobre a possibilidade de utilização das NPs carregadas com o fármaco para aplicação em células de câncer gástrico e ainda, destacam o potencial do sistema para seu emprego voltado a terapias de doenças ósseas, como, osteomielite e osteossarcoma.

A eficiência de utilização de HAp como suporte para fármacos foi bem representada no trabalho de Srivastav *et al*. (2019) neste, foi observada a maior concentração de DOX internalizado em células quando este foi utilizado em conjunto com nanoesferas ou nanotubos de HAp, como mostra a Figura 8.

Figura 8-Determinação da captação de NPs de HAp por células de osteossarcoma usando imagens de citometria de fluxo. A segunda coluna mostra imagens de fluorescência do fármaco. a) Células de controle, b) Doxorrubicina (DOX), c) Nanoesferas de HAp carregadas com DOX e d) Nanotubos de HAp carregados com DOX.



Adaptado de Srivastav *et al*. (2019).

3.4.3 Hidroxiapatita como Sonda

A incorporação de elementos com propriedades magnéticas e/ou luminescentes à matriz de HAp tem atraído a atenção das pesquisas devido a sua capacidade de diagnóstico por técnicas de imagem molecular (LIN; CHANG, 2015). As propriedades de luminescência são superiores quando comparadas às dos fluoróforos orgânicos

clássicos. Além disso, um material biocompatível e luminescente é um candidato ideal para aplicações clínicas (QUARTA *et al*., 2019).

Muitos trabalhos têm empregado os elementos do grupo dos lantanídeos como: európio, gadolínio, térbio, entre outros, como dopantes da HAp com o objetivo de inserir luminescência nesta e melhorar o seu contraste na obtenção de imagens.

O estudo da luminescência da HAp dopada com íons Eu^{3+} foi realizado por Han *et al*. (2013). Neste foi verificado que a HAp dopada com o lantanídeo apresenta luminescência na região característica do íon, podendo atuar como sonda fluorescente para marcação celular. Chen *et al*. (2011), sintetizaram nanobastões de HAp dopados com Eu^{3+} e Gd^{3+}, os quais devido a sua elevada fotoluminescência são aptos a obtenção de imagens *in vitro* e *in vivo*. O sistema também mostrou elevada capacidade de adsorção de droga e liberação controlada, empregando o fármaco ibuprofeno como modelo. Zhao *et al*. (2016), prepararam HAp dopada com íons Tb^{3+} e funcionalizada com arginina. O material apresentou fase única e foram detectados os principais picos de emissão de fluorescência do térbio. Os autores sugerem aplicação do material como transportador de genes. Um trabalho realizado por Li *et al*. (2008), mostrou a síntese de HAp dopada com térbio, a qual foi incubada com células-tronco mesenquimais de medula óssea de coelho, sendo verificada a luminescência do sistema em meio as células vivas utilizando um microscópio fluorescente. Concluiu-se que o sistema HAp/Tb^{3+} pode ser utilizado como uma sonda biológica estável para pesquisas celulares.

A avaliação da toxicidade dos lantanídeos é de grande importância dada sua aplicação na área médica, e por isso, muitas pesquisas apresentam testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo* para estes, como por exemplo, NPs de HAp dopada com Eu^{3+} e Gd^{3+} obtiveram viabilidade celular $> 80\ \%$ para 100 $\mu g.mL^{-1}$ do material, indicando sua não toxicidade (CHEN *et al*., 2011). No trabalho de Wei *et al*. (2017) foi realizado o estudo da compatibilidade biológica de HAp/Tb^{3+} *in vitro* e *in vivo* e constatou-se que não houve anormalidades histopatológicas nos órgãos, bem como, não se observou toxicidade aguda ou crônica referente a administração do material a curto, intermediário ou a longo prazo.

Diante do exposto, fica claro que a HAp possui elevado interesse no campo das pesquisas com foco em aplicações médicas, e desta forma, constantes estudos visam aprimorar cada vez mais este material, no intuito de se extrair todo o potencial oferecido por esta biocerâmica.

3.5 Íons Lantanídeos

Na tabela periódica, os elementos denominados lantanídeos estão organizados do cério (Ce, Z = 58) ao lutécio (Lu, Z = 71) e consiste em um grupo de elementos químicos que possuem propriedades químicas e físicas muito semelhantes, isto se deve as suas configurações eletrônicas que de forma geral se apresentam como [Xe] $4f^{n}$ $5d^{1}$ $6s^{2}$ com n = 1 (Ce) a 14 (Lu) (BUNZLI, 2006).

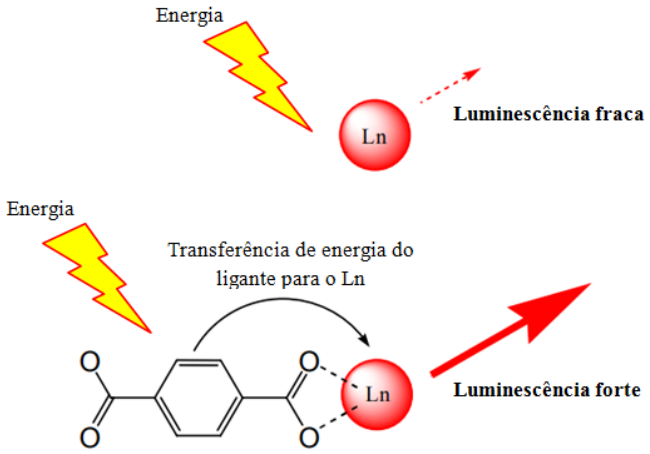
O estado de oxidação termodinamicamente mais estável para os íons lantanídeos é o trivalente (Ln^{3+}), neste caso, os orbitais 4f encontram-se na parte interna do átomo, de modo que se tornam protegidos pelos elétrons dos orbitais 5s e 5p. O comportamento descrito para os orbitais 4f se deve ao fenômeno denominado contração lantanídica, esta se refere a uma diminuição dos raios atômicos e iônicos do La ao Lu, que ocorre a partir da blindagem dos elétrons da camada 4f pelos elétrons das camadas externas 5s e 5p, provocando o aumento da sua carga nuclear efetiva em função do aumento do número atômico, e, consequentemente uma diminuição do raio (COTTON, 2006).

Todos os íons lantanídeos trivalentes são luminescentes, exceto La^{3+} e Lu^{3+}. As linhas de emissão f-f compreendem todo o espectro, desde ultravioleta (Gd^{3+}) até o visível (Pr^{3+}, Sm^{3+}, Eu^{3+}, Tb^{3+}, Dy^{3+}, Tm^{3+}) e também o infravermelho próximo (Pr^{3+}, Nd^{3+}, Ho^{3+}, Er^{3+}, Yb^{3+}) (BUNZLI; ELISEEVA, 2010).

Os íons lantanídeos apresentam baixa absortividade molar, e, portanto, sua excitação direta é ineficiente para emissão de luminescência, assim, matrizes com elevado coeficiente de absorção de luz são utilizadas para que esta transfira a energia ao íon lantanídeo e este por sua vez, emita a luminescência, processo conhecido como "efeito antena", Figura 9 (LEHN, 1990)**.**

A observação do efeito antena ocorreu a partir da detecção do aumento da intensidade luminescente de íons európio quando ligados a compostos orgânicos submetidos à luz ultravioleta (UV), mostrando a ocorrência de um processo de transferência de energia do ligante para o íon lantanídeo. No mesmo estudo também se afirma que a eficiência da transferência de energia do ligante para o íon central depende do tipo de composto que está coordenado ao íon luminescente (WEISSMANN, 1942). Lehn, (1990) propôs que um dispositivo molecular de conversão de luz é formado por dois componentes, sendo estes, uma matriz ou coletor de luz, o qual denominou de antena, e um emissor. Para funcionar, o dispositivo deve operar em três etapas: absorção de energia, transferência e emissão.

Figura 9-Excitação direta do íon lantanídeo com baixa luminescência e excitação por meio do ligante (Efeito antena).

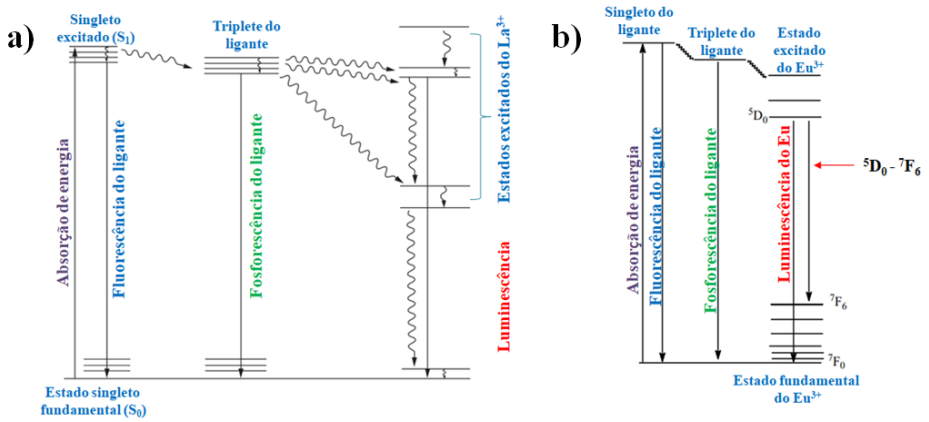


Adaptado de Li, (2006).

Nos dispositivos conversores de luz, uma transferência de energia intramolecular ocorre por absorção de radiação na região do UV pelo ligante, transmissão para o íon lantanídeo e posterior emissão de luz na região do visível. Para que este mecanismo ocorra em complexos de lantanídeos, os níveis do estado tripleto do ligante devem estar localizados acima do nível emissor do íon lantanídeo (NIYAMA *et al*., 2005).

Um esquema mostrado na Figura 10-a apresenta os principais processos fotofísicos envolvendo mecanismo de transferência de energia intramolecular em compostos com íons lantanídeos incorporados à sua estrutura.

Figura 10- a) Luminescência em complexos de lantanídeos e b) Algumas transições envolvidas na luminescência do íon Eu^{3+}.



Adaptado de Cotton, (2006).

De acordo com a Figura 10-a, o processo de luminescência ocorre a partir das seguintes etapas:

- A absorção de energia na região do ultravioleta pelos ligantes promove um elétron do estado singleto fundamental (S_0) para um estado singleto excitado (S_1);

- O estado (S_1) pode retornar ao estado fundamental (S_0) diretamente gerando a fluorescência do ligante;

- Se o elétron no estado (S_1) assume um caminho em direção a um estado triplete do ligante, a fosforescência é observada;

- O estado triplete pode retornar para o estado (S_0) emitindo fosforescência ou, alternativamente, transfere energia de forma não radiativa para um estado excitado de um íon Ln^{3+}.

- Os íons Ln^{3+} no estado excitado emitem fluorescência envolvendo transições f-f. Isto ocorre a partir do decaimento para o estado excitado de mais baixa energia. Um exemplo pode ser observado para as bandas de emissão do Eu^{3+}, onde as transições eletrônicas entre os estados excitados acontecem do estado excitado de menor energia ($^5D_0$) para um dos estados fundamentais ^7F_J (J=0,1,2,3,4,5 e 6), como mostra a Figura 10-b, (COTTON, 2006).

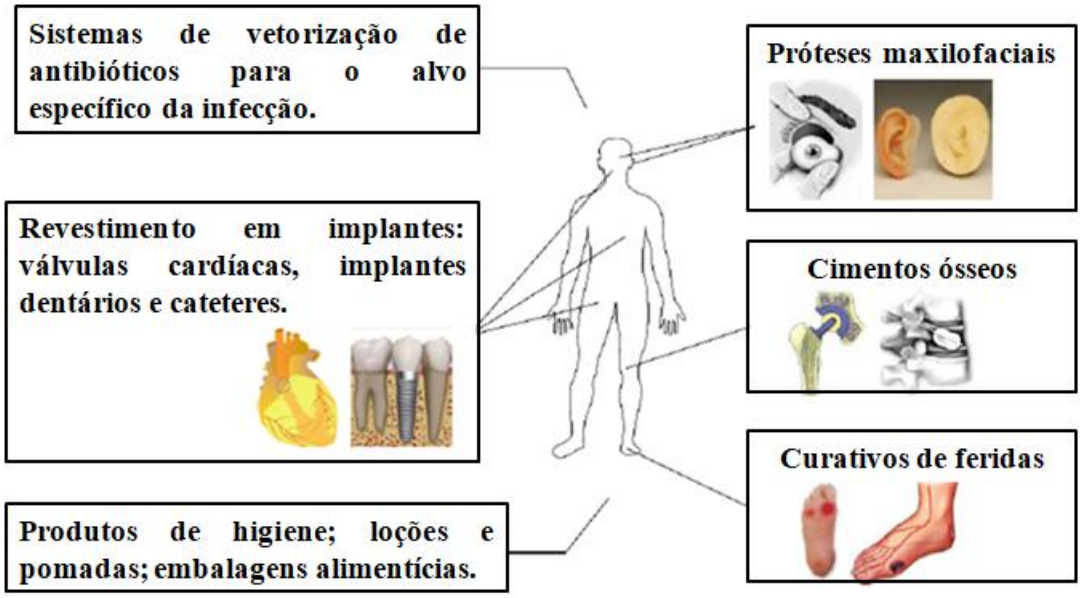
3.6 Óxido de Zinco e Atividade Antibacteriana

A infecção de sítios cirúrgicos, principalmente em cirurgias ortopédicas, trata-se de um grave problema e apresenta dificuldades de cura quando se utiliza tratamento com antibióticos (SONG *et al*. 2013). Em casos de doenças como o câncer ósseo, por exemplo, cirurgias de remoção do tumor resultam em defeitos que necessitam da inserção de próteses ou enxertos, e neste caso, um alto risco de infecção bacteriana é observado podendo resultar no agravamento da situação do paciente (INSTITUTO ONCOGUIA, 2018).

As doenças infecciosas são tratadas com antibióticos, estes são compostos químicos naturais ou sintéticos que possuem a capacidade de inibir a multiplicação de bactérias ou mesmo causar a sua morte (GUIMARÃES; MOMESSO e PUPO, 2010). No entanto, um mecanismo de resistência bacteriana a estas substâncias tem se desenvolvido em função de diferentes fatores como o uso excessivo dos antimicrobianos, administração inadequada e a falta de conhecimento sobre a problemática (VENTOLA, 2015; DAVIES; DAVIES, 2010).

Os nanomateriais têm surgido como uma solução ao problema da resistência bacteriana, pois muitas pesquisas confirmam a atividade bactericida de NPs de metais e de óxidos de metais, como por exemplo, Ag, Au, Zn, Cu, Ti, Mg, Ni e Ce (HEMEG, 2017). Os nanomateriais antibacterianos já são utilizados em aplicações como: revestimento de implantes médicos, curativos, cimentos ósseos, materiais dentários, cremes, loções e pomadas (HUH; KWON, 2011; WANG; HU; SHAO, 2017). Alguns exemplos podem ser observados na Figura 11.

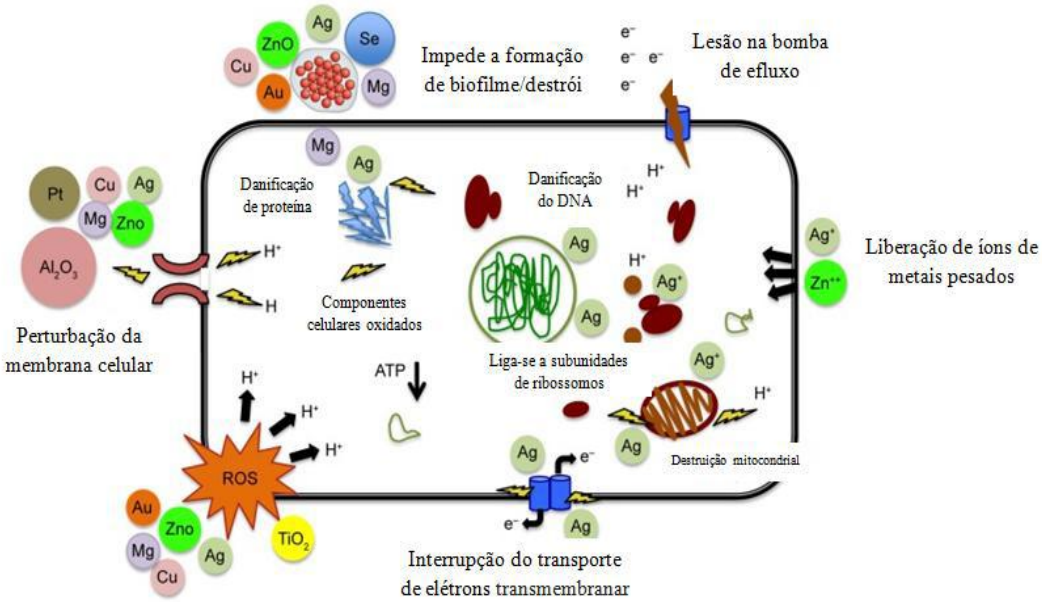
Figura 11-Exemplos das diversas aplicações para os nanomateriais antibacterianos.



Adaptado de Wang; Hu e Shao, 2017.

As NPs apresentam diversos modos de ação antimicrobiana que se resumem em três formas básicas: Indução de estresse oxidativo; liberação de íons metálicos e mecanismos não oxidativos podendo ocorrer de maneira simultânea, inibindo o desenvolvimento de resistência bacteriana (WANG; HU; SHAO, 2017). Na Figura 12 são mostrados alguns dos prováveis mecanismos capazes de provocar o efeito bactericida das NPs, como por exemplo, danificação de proteínas e formação de radicais livres.

Figura 12- Possíveis mecanismos da ação de NPs metálicas na destruição de bactérias



(HEMEG, 2017).

Dentre as várias NPs de metais e óxidos metálicos estudados como material antibacteriano, o óxido de zinco (ZnO), óxido metálico nanocristalino inorgânico, tem se destacado devido a vantagens como: alta durabilidade, menor toxicidade, alta seletividade e resistência ao calor. O ZnO quando utilizado na escala nanométrica exibe mecanismos tóxicos que afetam a célula bacteriana devido a sua interação com a superfície ou interior da mesma (SIRELKHATIM *et al*. 2015). Padmavathy; Vijayaraghavan, (2008), verificaram que a atividade bactericida de NPs de ZnO apresenta maior eficiência em função da diminuição do tamanho das partículas.

O ZnO contém um dos elementos minerais essenciais ao ser humano, o zinco (Zn), e por isso é empregado como aditivo alimentar (ESPITIA; OTONI; SOARES, 2016). Além disso, muitos estudos afirmam que as NPs de ZnO não possuem efeito tóxico para as células humanas (SIRELKHATIM *et al*. 2015). Desse modo, o ZnO é reconhecido pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América como um material seguro, e por isso, tem sido utilizado em aplicações que objetivam a conservação de alimentos pela sua incorporação em embalagens, proporcionando ação antimicrobiana contra diversos patógenos transmitidos por alimentos (ESPITIA; OTONI; SOARES, 2016; SIRELKHATIM *et al*. 2015).

O efeito antibacteriano das NPs de ZnO já foi confirmado contra espécies de bactérias gram positivas e gram negativas, como por exemplo, *Escherichia coli*,

Salmonella, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Campylobacter jejuni*, as quais são responsáveis pela transmissão de doenças por meio de alimentos (XIE *et al*. 2011). O mecanismo de ação tóxica do ZnO nas bactérias ainda não possui explicações claras e de um modo geral, se sugere a destruição da parede bacteriana, liberação de íons metálicos e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SIRELKHATIM *et al*. 2015).

Na literatura, diversos trabalhos relatam estudos sobre a incorporação do Zn e ZnO na HAp, isto porque além das propriedades antibacterianas, o Zn possui efeito estimulador no metabolismo ósseo e sua carência pode resultar em alterações esqueléticas. O Zn também melhora a formação e mineralização do osso e estimula a produção de colágeno (ZHAO *et al*., 2013). Martínez *et al*. (2015) desenvolveram um suporte de HAp a partir de osso bovino e ZnO e afirmaram que o material apresenta capacidade osteocondutora, antimicrobiana e maior eficiência em processos de reparos ósseos. Ofudje *et al*. (2019) sintetizaram HAp com incorporação de 5 a 20 % em mol de Zn em sua estrutura e constataram o efeito antibacteriano do material, além disso, as zonas de inibição foram maiores em função da maior concentração de Zn. Zhao *et al*. (2013) mostraram que um revestimento de HAp/Zn depositado eletroquimicamente tem potencial para melhorar a integração óssea com a superfície de implante, analisando o contato osso-implante por até 8 semanas. Ohtsu; Kakuchi e Ohtsuki, (2017) realizaram a modificação superficial de implantes de titânio empregando revestimento de HAp/ZnO e comprovaram a eficácia antibacteriana do material, além de melhor atividade osteogênica.

Portanto, observa-se que a união da biocerâmica HAp com o ZnO apresenta elevado potencial para aplicações médicas, e assim, constantes estudos têm buscado cada vez mais o aprimoramento e conhecimento das suas propriedades.

3.7 Fármacos Antineoplásicos

Diversos fármacos são empregados no tratamento do câncer, estes, como relatado anteriormente, são responsáveis por efeitos colaterais resultantes da sua falta de especificidade para o local do tumor, deste modo, o estudo da vetorização desses medicamentos é de elevada importância (MOUSA; BARALI, 2011). Um dos fármacos mais empregados no tratamento do câncer é o 5-Fluorouracil, substância hidrofílica, possui alto potencial tóxico para o corpo humano, e, portanto, apresenta grande

necessidade de aperfeiçoamento na sua forma de utilização (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Por outro lado, o fármaco natural curcumina, substância hidrofóbica, tem despertado a atenção de pesquisadores por não ser tóxica para seres humanos, além disso, testes confirmam a sua atividade antitumoral para células cancerígenas. O ponto negativo é atribuído a sua baixa biodisponibilidade e rápido metabolismo que dificultam o seu uso e apontam a necessidade de aprimoramentos (PHILLIPS *et al*., 2013).

Um pouco das características das substâncias antineoplásicas, 5-Fluorouracil e curcumina são apresentadas com mais detalhes a seguir.

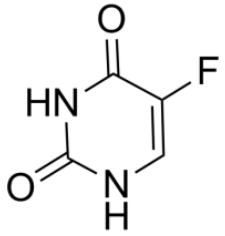
3.7.1 5-Fluorouracil (5-FU)

O 5-Fluorouracil é um análogo das pirimidinas. Esta classe de substâncias possui a capacidade de impedir a síntese dos ácidos nucleicos, assim, o 5-FU age inibindo a função e processamento do RNA, bem como, impede a síntese da enzima timidilato sintetase, responsável pela síntese de nucleotídeos. Diversas doenças têm sido tratadas empregando-se os fármacos desse grupo, como: câncer, psoríase e infecções ocasionadas por fungos e vírus contendo DNA (GILMAN, 2005).

O fármaco 5-FU é caracterizado como antineoplásico, possui fórmula molecular $C_4H_3FN_2O_2$, 5-Fluoro-2,4 (1H, 3H) – pirimidina, com massa molar igual a 130,1 $g.mol^{-1}$. Apresenta-se como um pó cristalino branco que se decompõe a 282 ºC é solúvel em água (12,2 $g.L^{-1}$) e ligeiramente solúvel em etanol. A estrutura molecular do 5-FU é mostrada na Figura 13 (WILLIMANS; WILLIAMS, 1981).

Há mais de 40 anos, o 5-FU tem sido usado no tratamento do câncer. Nas últimas duas décadas uma melhor compreensão do seu mecanismo de ação tem possibilitado o desenvolvimento de estratégias que viabilizam o aumento da sua atividade anticancerígena (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Figura 13-Estrutura química do 5-FU.



(WILLIMANS; WILLIAMS, 1981).

A atividade antineoplásica envolve a conversão do 5-FU em outras substâncias com efeito terapêutico como a 5-flúor-2'-desoxiuridina-5'-fosfato (FdUMP). A interação entre FdUMP com a enzima timidilato sintetase induz a eliminação da timidina trifosfato (TTP), um constituinte necessário do DNA.

O 5-FU também age incorporando-se ao DNA e ao RNA, neste caso, os substratos acumulados da reação bloqueada da timidilato sintetase, incorporam-se ao DNA no lugar do TTP que sofreu eliminação fisiológica. Este processo pode provocar a quebra dos filamentos do DNA, pois este exige a presença do TTP. A incorporação do 5-FU ao RNA também provoca toxicidade devido aos efeitos relacionados ao processamento e as funções do RNA (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; GILMAN, 2005).

O 5-FU pode ser encontrado comercialmente com os nomes: Adrucil®, Efudex®, fluoroplex®, entre outros (WILLIMANS; WILLIAMS, 1981). A droga é administrada por via intravenosa, intramuscular, subcutânea, respiratória e tópica, pois quando ingerido o 5-FU é absorvido de forma imprevisível e incompleta. Se aplicado por via intravenosa, o fármaco apresenta concentração plasmática de 0,1 a 1,0 mmol, além de rápida eliminação com meia vida de 10 a 20 min. Devido a sua rápida depuração, o 5-FU é administrado em altas doses. A posologia semanal pode chegar a 750 $mg.m^{-2}$ isolado ou 500-600 $mg.m^{-2}$ combinado com leocovorina, por período de 6 a 8 semanas. A infusão contínua por até 21 dias também é empregada com doses de 300 mg/m^2/dia (GILMAN, 2005).

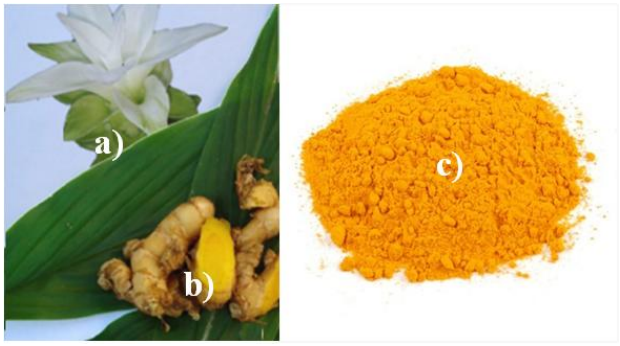
A presença do 5-FU no organismo, bem como a utilização de elevadas doses desta droga ocasionam efeitos colaterais graves, como, anorexia e náuseas, além de estomatite e diarréia. Pacientes que recebem doses contínuas do 5-FU ou combinado com leocovorina podem apresentar ulcerações na mucosa de todo trato gastrointestinal, podendo resultar em diarréia fulminante, choque e morte. Também são verificados sintomas como, queda de cabelo, dermatite e toxicidade cardíaca (GILMAN, 2005). Assim, constata-se a necessidade de aprimoramento do mecanismo de entrega do 5-FU ao alvo, no intuito de se alcançar o nível terapêutico empregando menor dose, de modo que os efeitos adversos também possam ser reduzidos.

3.7.2 Curcumina

A curcumina é o principal componente retirado dos rizomas da *Cúrcuma longa*, planta natural da Índia (Figura 14). Ela pode ser encontrada na forma de cápsulas,

pomadas e cremes para diversos tipos de aplicações medicinais, no entanto, o principal uso da curcumina em todo o mundo é na culinária (SUETH-SANTIAGO *et al*., 2015).

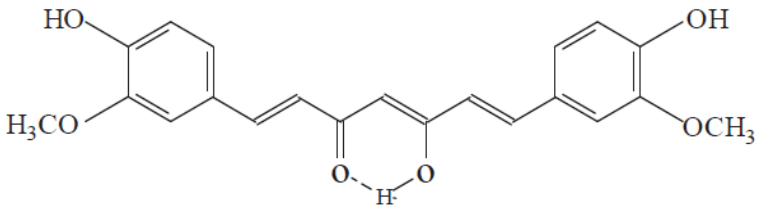
Figura 14- a) Planta da espécie *Cúrcuma longa*, b) Rizomas da cúrcuma e c) Curcumina.



Adaptado de Sueth-Santiago *et al*. (2015).

A curcumina é uma molécula simétrica, possui fórmula química $C_{21}H_{20}O_6$ e massa molar igual a 368,38 $g.mol^{-1}$. O nome IUPAC da curcumina é [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona]. É uma molécula hidrofóbica, quase insolúvel em água e facilmente solúvel em solventes polares como metanol, etanol, acetonitrila, clorofórmio e acetato de etila (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009). A estrutura química da curcumina é apresentada na Figura 15.

Figura 15- Estrutura química da curcumina.



(VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

A curcumina exibe atividade terapêutica contra diversas doenças e por isso, tem despertado o interesse para o desenvolvimento de muitas pesquisas. Os principais mecanismos de ação da curcumina são atribuídos as suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, além disso, ações antimicrobianas e anticancerígenas já foram comprovadas (HEWLINGS; KALMAM, 2017).

A atividade anticancerígena da curcumina é atribuída a sua capacidade de inibir a proliferação celular e induzir a parada do ciclo celular para uma grande variedade de

linhagens de células tumorais. Isto ocorre a partir da interferência em fatores de transcrição e expressão, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e outros elementos de sinalização celular que são importantes para o crescimento e progressão do câncer (AGGARWAL; KUMAR, 2003; ALLEGRA *et al*., 2017).

Estudos *in vitro* mostraram o potencial antiproliferativo da curcumina em vários trabalhos, como por exemplo, Zheng *et al*. (2004) testaram os efeitos da curcumina em vias específicas do ciclo celular e na sobrevivência de células de melanoma e verificaram que a mesma interrompeu o crescimento celular e induziu a apoptose das células de melanoma humano. Liu *et al.* (2011) avaliaram a atividade antitumoral da curcumina contra células cancerígenas da próstata e confirmaram que a porcentagem de células apoptóticas foi expressivamente maior do que no grupo controle, atribuindo os resultados a inibição seletiva de atividades das vias de sinalização nas células provocada pela curcumina. Zong *et al*. (2012) trataram células do carcinoma epitelial mamário com curcumina e observaram que o seu efeito de inibição é dependente da dose utilizada, além disso, constatou-se que a capacidade de adesão e invasão das células foi fortemente reduzida quando tratada com diferentes concentrações de curcumina.

Infelizmente, apesar dos diversos pontos positivos da curcumina, sua baixa biodisponibilidade consiste em um fator limitante. Testes clínicos mostraram que a curcumina é segura para humanos, mesmo quando utilizada em altas doses (12 g/dia), porém, sua má absorção, rápido metabolismo e rápida eliminação sistêmica provocam baixos níveis plasmáticos e teciduais (ANAND *et al*., 2007). Assim, estudos mais recentes buscam por soluções que melhorem a biodisponibilidade da curcumina, como por exemplo, a utilização de nanocarreadores que incluem NPs, microesferas, nanoemulsões, dispersões etc., neste caso, muitos bons resultados já podem ser observados para a melhoria da biodisponibilidade, porém, fatores de estabilidade e direcionamento ainda requerem pesquisas mais detalhadas (KUMAR *et al*., 2010).

De forma geral, um sistema que possa ser utilizado como suporte capaz de vetorizar um fármaco até o local da doença, poderá minimizar questões como, por exemplo, a alta toxicidade do 5-FU a partir da redução das doses empregadas, bem como, aumentar a biodisponibilidade de substâncias como a curcumina que é dificultada por sua rápida metabolização e eliminação. A HAp por se tratar de um componente natural do corpo e pelas ótimas características apresentadas, pode ser considerada um material ideal para esta aplicação.

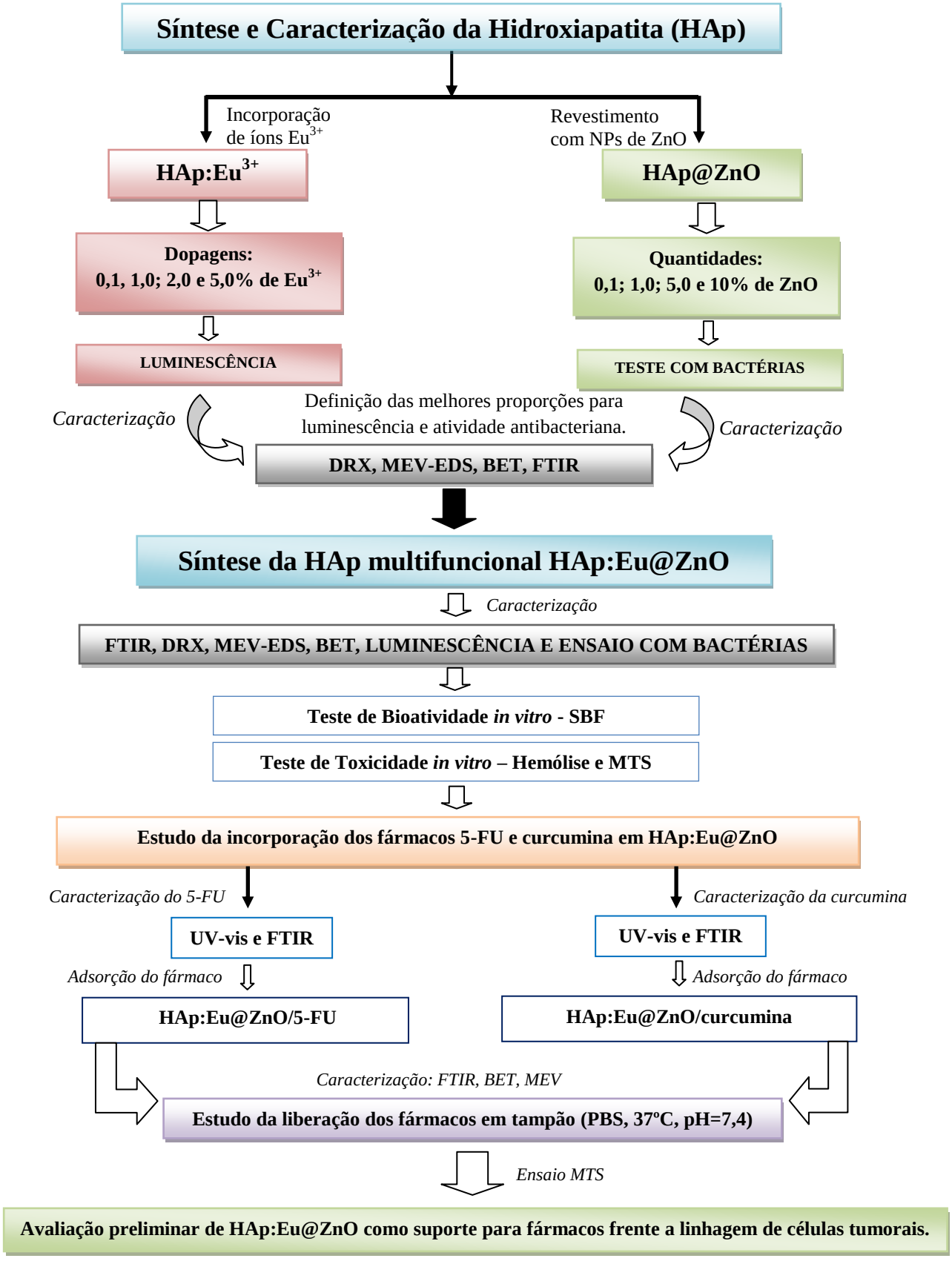
4 METODOLOGIA

Os trabalhos experimentais foram desenvolvidos em diferentes laboratórios da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. As sínteses foram realizadas no Instituto de Pesquisa em Ciência dos Materiais no Laboratório de Caracterização de Materiais Estratégicos – LACAME e Laboratório de Química Geral - Campus Juazeiro/BA; As pastilhas dos diversos materiais utilizados nos ensaios com bactérias foram preparadas no Laboratório de Engenharia Mecânica - Campus Juazeiro/BA; Os ensaios para estudo da atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Microbiologia - Campus Ciências Agrárias Petrolina/PE; Os testes *in vitro* com células e ensaios de hemólise foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental – LOEX – Campus Petrolina/PE.

Uma visão geral de todas as etapas experimentais empregadas no desenvolvimento do material multifuncional está apresentada no fluxograma da Figura 16. Sendo estas:

- Síntese e caracterização de nanopartículas de HAp;
- Síntese da HAp dopada com diferentes concentrações de íons Eu^{3+};
- Síntese de NPs de HAp revestidas com ZnO
- Ensaios antibacterianos para HAp revestida com diferentes concentrações de ZnO;
- Síntese da HAp multifuncional (HAp:Eu@ZnO);
- Testes de bioatividade *in vitro* para HAp e HAp multifuncional;
- Testes de toxicidade *in vitro* – Hemólise e Células de S-180 de camundongos;
- Estudo da incorporação de dois diferentes fármacos ao sistema multifuncional;
- Estudo da cinética de liberação dos fármacos em tampão (PBS, 37ºC, pH=7,4);
- Teste do sistema multifuncional como suporte para fármacos antineoplásicos com células tumorais de camundongos (S-180).

Figura 16- Fluxograma com resumo de todas as etapas de síntese e caracterização dos materiais.



4.1 Síntese de nanopartículas de HAp

O procedimento experimental adotado para a síntese da HAp foi o método da precipitação. Neste caso, a síntese foi adaptada a partir da referência (KOUTSOPOULOS, 2002). Para a produção do pó biocerâmico foram utilizados como reagentes de partida o gesso (Sulfato de Cálcio Hemihidratado, $CaSO_4.½H_2O$) pureza de 80 a 95%, fornecido pela Indústria Gesso Mineral Ltda., Fosfato de Amônio Dibásico, $(NH_4)_2HPO_4$, (98%, Vetec) e Hidróxido de Amônio, NH_4OH, (P.A., Êxodo Científica). A reação de síntese foi realizada a partir de uma mistura de reagentes fontes de cálcio e fósforo, mantendo uma razão molar entre estes de 1,66 Ca/P., A equação química (3) representa a reação de formação da HAp:

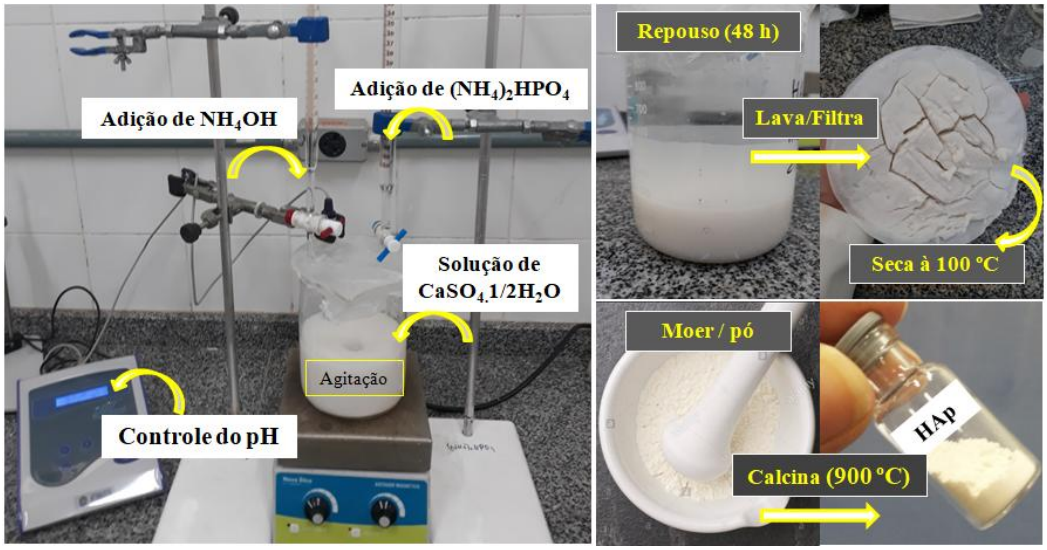
$$10\ CaSO_4\ ½\ H_2O + 6\ (NH_4)_2HPO_4 + 8\ NH_4OH \rightarrow \mathbf{Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2} + 10\ (NH_4)_2SO_4 + 11\ H_2O \quad (3)$$

Hidroxiapatita

A reação iniciou-se com a solução de sulfato de cálcio hemihidratado 0,1 $mol.L^{-1}$, que permaneceu sob agitação mecânica durante toda a etapa de síntese. O pH inicial da solução foi igual a 6,0, este valor foi elevado para a faixa de 10 e mantido por meio de adições sucessivas de solução de hidróxido amônio 3,0 $mol.L^{-1}$. Na sequencia, a solução de fosfato de amônio dibásico 0,06 $mol.L^{-1}$ foi adicionada a uma velocidade de incorporação de 20 $mL.min^{-1}$, até que se completasse o volume final desejado. Durante todo o processo o pH foi controlado com sucessivas adições da solução de hidróxido de amônio.

Ao término das adições dos reagentes, o sistema permaneceu sob agitação por período de 1 h, visando à homogeneização completa da mistura. Logo após o sistema foi posto em repouso por 48 h para a sedimentação do componente mais denso. Posteriormente, o material produzido foi filtrado a vácuo e lavado com água deionizada até pH neutro, este foi submetido a secagem em estufa à temperatura de 100ºC por período de 24 h. Usando almofariz e pistilo, o material seco foi transformado em um pó fino, e em seguida, levado à mufla para calcinação à 900ºC por 2h, empregando-se uma taxa de aquecimento de $10ºC.min^{-1}$. O material produzido, bem como o arranjo experimental utilizado podem ser vistos na Figura 17.

Figura 17-Arranjo experimental da síntese e etapas envolvidas na produção da hidroxiapatita.



Fonte: A autora, 2020.

4.2 Síntese da HAp dopada com íons Eu^{3+}

Para dopagem da HAp com íons Eu^{3+} foi utilizado o cloreto de európio produzido a partir do seu óxido, sintetizado de acordo com o seguinte processo:

Inicialmente 1,0 mmol do óxido de európio, (Eu_2O_3, 99,99% Aldrich) foi pesado e adicionado a 10 mL de água deionizada. A esta mistura foi acrescentado ácido clorídrico (HCl,Vetec P.A.), concentrado em excesso, (5,0 mL). O sistema foi mantido sob agitação e aquecimento (100-150ºC) até que a água e o excesso de HCl evaporassem. Na sequencia, mais água deionizada (10 mL) foi adicionada e o pH medido. Este processo de lavagem foi repetido (5x) até que o pH atingisse o valor entre 5,0 e 6,0. Em seguida, deixou-se a água evaporar e o sal obtido foi colocado no dessecador com sílica até secagem. A formação do cloreto é representada pela equação 4.

$$Eu_2O_3(s) + 6\,HCl(aq) + 3H_2O \xrightarrow{\Delta} 2\,EuCl_3.6H_2O(s) \qquad (4)$$

Após obtenção do cloreto de európio, o processo de síntese do pó biocerâmico de HAp dopado com íon luminescente seguiu a metodologia empregada na preparação da HAp pura, descrita no item 4.1. A incorporação do íon Eu^{3+} foi feita adicionando o cloreto de európio durante o momento de agitação da solução de sulfato de cálcio hemihidratado. Diferentes proporções (0,1; 1,0; 2,0 e 5,0 %) foram adicionadas para estudo da melhor intensidade luminescente obtida sem alteração das propriedades da

matriz. Os valores da dopagem foram calculados em relação ao cálcio da HAp, mantendo a relação estequiométrica Ca+Eu/P=1,66.

A melhor concentração de dopagem da HAp com íons Eu^{3+} foi determinada a partir da intensidade dos picos de luminescência e da difração de raios X, e a partir da definição deste parâmetro, o material [$Ca_{10-x}Eu_x(PO_4)_6(OH)_2$] seguiu para etapa de incorporação de NPs com atividade antimicrobiana.

4.3 Síntese de NPs de HAp revestidas com ZnO

Inicialmente, NPs de ZnO foram sintetizadas a partir de uma reação de precipitação entre solução de nitrato de zinco hexahidratado [$Zn(NO_3)_2.6H_2O$] (98%, Synth) a 0,2 $mol.L^{-1}$ e solução de hidróxido de potássio (KOH) (99%, Synth) a 0,4 $mol.L^{-1}$. A suspensão obtida foi centrifugada (4000 rpm/20 min.) e o precipitado lavado 3 vezes com água deionizada. Na sequencia as NPs foram calcinadas a 500 ºC por 3h (5,0 ºC. min^{-1}) de acordo com metodologia utilizada por Ghorbani, *et al*., 2015. A reação de formação do ZnO é representada pela equação 5.

$$Zn(NO_3)_2.6H_2O(aq) + 2\ KOH(aq) \rightarrow ZnO(aq) + 2\ KNO_3(aq) + 7\ H_2O \quad (5)$$

Com as NPs de ZnO sintetizadas, seguiu-se a etapa de funcionalização da HAp a partir de adaptações de metodologia descrita na literatura (MARTÍNEZ *et al*., 2015). Neste processo, uma suspensão de NPs de ZnO foi preparada utilizando-se 10 mL de água deionizada e 5,0 mL de Glicerina ($C_3H_8O_3$) (Proquímios P.A) para se obter um meio viscoso capaz de limitar a sedimentação das partículas. As NPs foram adicionadas ao meio sob agitação magnética (100 rpm) e aquecimento (90 ºC) até completa dispersão, sendo estudadas diferentes quantidades de ZnO (0,1; 1,0; 5,0 e 10,0% em relação a massa de HAp). Na sequência, 0,5 g de grânulos de HAp (não calcinada) foram adicionados ao meio, mantendo-o sob agitação por 10 min. Posteriormente o material foi seco em estufa por 2 h/100 ºC e depois calcinado à 900 ºC por 3 h (10 ºC. min^{-1}), resultando em HAp@ZnO na forma de um pó.

4.4 Ensaio antibacteriano para HAp@ZnO

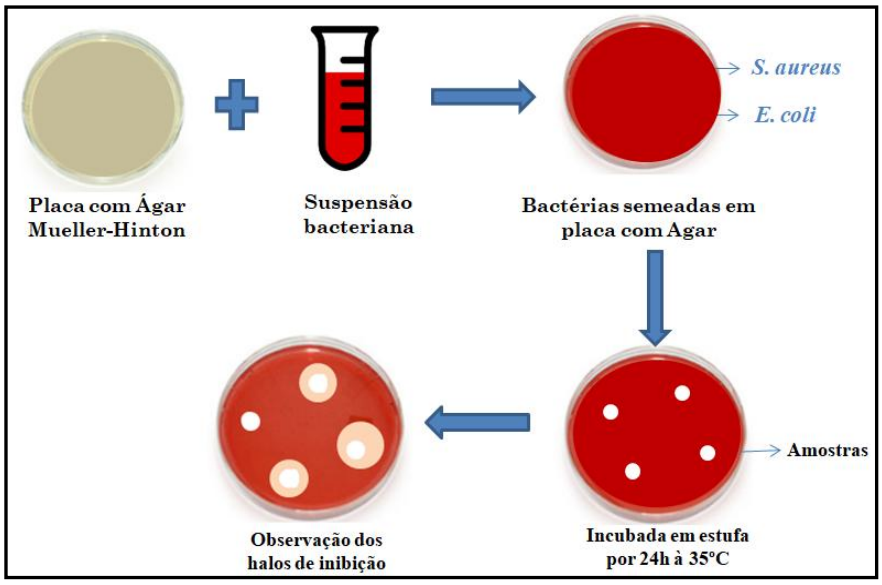
Nesta análise foi utilizado o ensaio de difusão em Ágar. Este experimento consiste de um método qualitativo, onde se observa o efeito causado por uma determinada

substância frente a microrganismos a partir da formação de halos de inibição do crescimento bacteriano (OSTROSKY *et al*., 2008).

Os testes foram realizados usando dois tipos de bactérias, as gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (*S. aureus*) e gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25992, (*E. coli*). Para realização do ensaio, culturas bacterianas (solução estoque) foram cultivadas em Ágar nutritivo a 4 ºC, sendo posteriormente selecionadas colônias isoladas para formação de turbidez de 0,5 na escala McFarland (SÁ et al., 2011). O plaqueamento foi realizado empregando 10 µL de solução resultante, onde as bactérias foram inoculadas em placas de 150 mm contendo Agar Muller-Hinton para o crescimento de microrganismos. Na sequência, pastilhas (50 mg e 6,0 mm de diâmetro) das diferentes amostras (HAp@0,1%ZnO; HAp@1,0%ZnO; HAp@5,0%ZnO e HAp@10%ZnO) foram depositadas assepticamente sobre as superfícies das placas. As placas resultantes foram incubadas a 35 °C durante 24h, e após este período foram observados os halos de inibição de crescimento formados em torno de cada amostra, sendo estes registrados por meio de imagens fotográficas. A Figura 18 mostra um esquema com as etapas experimentais utilizadas.

Ao final deste teste, foram definidas as melhores porcentagens dos dopantes para síntese do biomaterial multifuncional HAp:Eu@ZnO.

Figura 18- Resumo das etapas experimentais do ensaio antibacteriano.



Fonte: A autora, 2020.

4.5 Síntese da HAp dopada com íons Eu^{3+} e revestidas com ZnO

O material multifuncional foi produzido com base nos resultados obtidos nas etapas anteriores (Tópicos 4.1 a 4.4). A metodologia de síntese da HAp pura foi utilizada como base, sendo adicionado 5,0% em massa de cloreto de európio durante etapa de agitação do sulfato de cálcio. Após etapas de repouso e secagem do pó de HAp:Eu^{3+} em estufa, o material foi adicionado à uma solução de NPs de ZnO para recobrimento da superfície com 10% deste em relação a massa de HAp:Eu^{3+} (procedimento semelhante ao descrito no tópico 4.3). Em seguida a amostra foi seca em estufa por 2 h/100 ºC, triturada para formação de um pó e depois calcinada a 900 ºC por 3h ($10^{o}C.min^{-1}$), resultando em HAp:5%Eu^{3+}@10%ZnO ou [$Ca_{10-x}Eu_x(PO_4)_6(OH)_2$@ZnO]. Além das diversas caracterizações: DRX, FTIR, BET, MEV-EDS, fotoluminescência e avaliação da toxicidade por ensaio de hemólise e células *in vitro* por MTS foram realizadas empregando o material em pó, pastilhas (50 mg e 6,0 mm diâmetro) do sistema HAp:Eu@ZnO também foram preparadas para ensaios de bioatividade (Tópico 4.6) e testes com bactérias gram-positivas e gram-negativas (Tópico 4.4).

4.6 Teste de Bioatividade *in vitro* da HAp e HAp:Eu@ZnO

O ensaio de bioatividade foi realizado empregando-se a metodologia proposta por Kokubo e Takadama (2006). Este ensaio trata-se de um experimento *in vitro* no qual os materiais estudados são expostos por determinado período de tempo a um meio simulado, neste caso, utilizou-se a solução de SBF (*Simulated Body Fluid)*. A solução de fluidos corporais simulados foi preparada com concentração iônica similar a concentração de íons presentes no plasma sanguíneo, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2- Concentrações iônicas do plasma e SBF.

	Concentração de íons (mM)	
Íon	**Plasma sanguíneo**	**SBF**
Na^+	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5
Cl^-	103,0	147,8
HCO_3^-	27,0	4,20
HPO_4^{2-}	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5

(KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

Para a preparação da solução de SBF foram utilizados reagentes de grau analítico da Vetec Química. Os reagentes e as quantidades para o preparo de 1000 mL de solução, bem como, a ordem de adição destes estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3-Reagentes para o preparo de 1000 mL de SBF.

Ordem	Reagente	Quantidade
1	NaCl	8,035 g
2	$NaHCO_3$	0,355 g
3	KCl	0,225 g
4	$K_2HPO_4.3H_2O$	0,231 g
5	$MgCl_2.6H_2O$	0,311 g
6	HCl – 1,0 $mol.L^{-1}$	39 mL
7	$CaCl_2$	0,292 g
8	Na_2SO_4	0,072 g
9	$(HOCH_2)_3CNH_2$	6,118 g
10	HCl – 1,0 $mol.L^{-1}$	0-5,0 mL

(KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

A capacidade de formação de apatita sobre o material é verificada a partir da imersão de corpos de prova na solução de SBF, deste modo, pastilhas de HAp e HAp:Eu@ZnO foram preparadas separadamente utilizando 50 mg da amostra adicionada a um molde de aço com 6 mm de diâmetro, ao qual foi aplicada força de 9800,65 Pa/m^2 para a compactação do pó e obtenção do corpo de prova. O volume mínimo de SBF utilizado no teste é calculado de acordo com a equação 6:

$$V_{SBF} = S_a/10 \qquad (6)$$

Onde:

- V_{SBF} : volume do SBF (mL)
- S_a: área de superfície da amostra (mm^2)

Neste ensaio, um volume igual a aproximadamente 3 vezes o valor mínimo recomendado foi utilizado para cada amostra. Os testes foram realizados por diferentes períodos de tempo (0 a 21 dias) e as amostras foram mantidas sob agitação constante e temperatura fixa igual a 37 ° C. Durante todo o teste, as soluções foram renovadas a cada 3 dias e ao término de cada período de tempo, as amostras foram lavadas com água deionizada e secas em estufa a 40 ºC, sendo posteriormente armazenadas para caracterização.

4.7 Citotoxicidade *in vitro*: Hemocompatibilidade

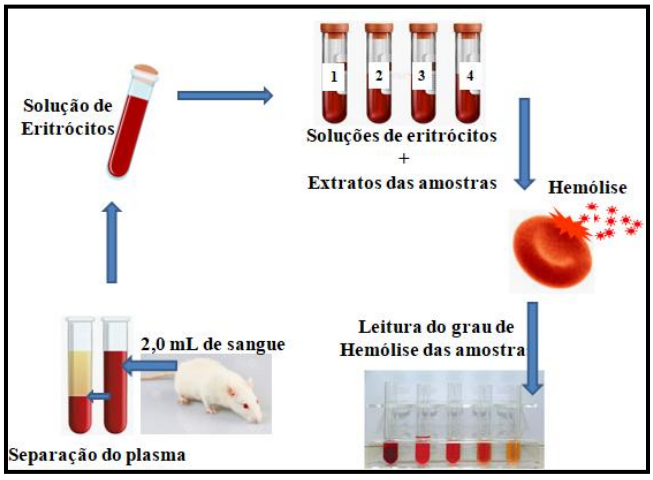
O estudo da hemocompatibilidade consiste em um teste preliminar para avaliação da biocompatibilidade do material. Neste experimento, HAp pura e HAp:Eu@ZnO foram testadas em diferentes concentrações (100, 500 e 1000 $\mu g.mL^{-1}$). As soluções das amostras estudadas foram preparadas utilizando soro fisiológico (Needs) como solvente.

Para investigar a atividade hemolítica, 2,0 mL de sangue foram coletados por punção cardíaca de camundongo Swiss, anestesiado com Cetamina (150 mg/Kg) e Xilazina (15 mg/Kg). O sangue obtido foi misturado imediatamente a um anticoagulante (Solução de EDTA, Doles) e posteriormente, solubilizado em 10 mL de soro fisiológico, sendo centrifugado por 4 min a 3.000 rpm para remoção do plasma. Na sequência, uma solução de eritrócitos a 1,0% foi preparada utilizando soro fisiológico. Para cada 1,0 mL dessa solução adicionou-se 1,0 mL da solução estudada, em triplicata. Os tubos contendo as misturas foram agitados a 100 rpm por 1,0 h e depois, centrifugados durante 4,0 min a 3.000 rpm. A quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante foi quantificada espectrofotometricamente em λ= 540 nm e os cálculos do grau de hemólise foram realizados pela Equação 7. Os controles, positivo e negativo foram preparados por solução Triton-100 (Sigma-Aldrich) a 0,1% e soro fisiológico respectivamente. Na Figura 19 é apresentado um resumo da metodologia utilizada.

Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIVASF).

$$\%\ Hemólise = \frac{Absorb.\ da\ amostra - Absorb.\ do\ controle\ negativo}{Absorb.\ do\ controle\ positivo - Absorb.\ do\ controle\ negativo} \qquad (7)$$

Figura 19- Resumo das etapas do experimento de hemólise.



Fonte: A autora, 2020.

4.8 Estudos da incorporação e cinética de liberação dos fármacos 5-FU e Curcumina em HAp:Eu@ZnO

4.8.1 Carregamento da curcumina e do 5-Fluorouracil

Soluções de curcumina (≥ 99,5%, Sigma-Aldrich) com água/etanol (4:1) e 5-FU (≥ 99,0%, Sigma-Aldrich) com água deionizada foram preparadas separadamente com concentração 100 $\mu g.mL^{-1}$. Para cada 100 mL dessas soluções adicionou-se 1,0 g do biomaterial em estudo (HAp:Eu@ZnO) sob agitação contínua a 20 ºC por 72 h para a curcumina e 24 h para o 5-FU, tempo máximo para estabilidade na leitura da absorção dos fármacos no sobrenadante. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas por 10 min a 4.000 rpm e uma alíquota dos respectivos sobrenadantes foi retirada para leitura da absorção empregando comprimento de onda máximo (λmáx.) para a curcumina (425 nm) e para o 5-FU (240 nm). Os precipitados obtidos foram secos em estufa a 50 ºC por 24 h.

A quantidade de fármaco incorporada ao material foi calculada a partir da curva padrão (concentração x absorbância) obtida previamente para a curcumina e para o 5-FU e utilizando a concentração inicial das soluções (100 $\mu g.mL^{-1}$) para o cálculo da porcentagem. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

Para avaliação da eficiência de incorporação (EI) do 5-FU, 5,0 mg da amostra (HAp:Eu@ZnO/5-FU) foi digerida em 5,0 mL de HCl 1,0 $mol.L^{-1}$ e então, mediu-se sua absorbância no Ultravioleta-Visível **(**UV-vis) a 240 nm. Para a curcumina, a amostra (HAp:Eu@ZnO/Curcumina) foi solubilizada em 5,0 mL de álcool etílico absoluto e a medida da absorbância no UV-vis foi em 425 nm. Com os valores obtidos calculou-se a quantidade do fármaco presente nas amostras, e então, estes foram aplicados à equação 8:

$$EI(\%) = \frac{\text{Massa do fármaco medida após solubilização}}{\text{Massa utilizada no experimento}} \text{ x } 100\% \qquad (8)$$

4.8.2 Cinética de liberação dos fármacos in vitro

Amostras de HAp:Eu@ZnO/5-FU e HAp:Eu@ZnO/Curcumina (200 mg) foram adicionadas separadamente à 50 mL de solução tampão fosfato salina (PBS), 0,13 mM, pH 7,4 a 37 ºC. Estas permaneceram sob agitação magnética por diferentes períodos de tempo, iniciando com 120 e 240 min e depois 24 a 336 horas (14 dias). As suspensões

foram centrifugadas a 4000 rpm para cada intervalo de tempo estudado e 3,0 mL do sobrenadante foram coletados para quantificação do fármaco liberado a partir de leituras da absorbância no UV-Vis empregando $\lambda máx._{(5\text{-}FU)}$= 240 nm e $\lambda máx._{(Curcumina)}$= 425 nm. Após cada tempo de medida, o sobrenadante foi descartado e 50 mL de uma nova solução PBS foram adicionados. Todas as medidas foram realizadas em triplicada.

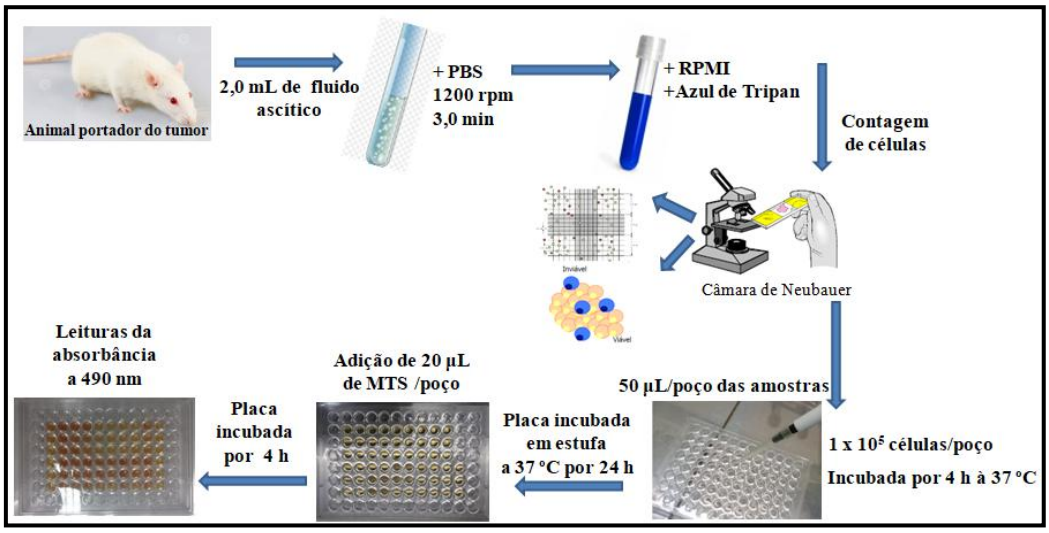
4.9 Ensaio MTS para avaliação da citotoxicidade em células

4.9.1 Toxicidade da HAp e HAp:Eu@ZnO

Para o ensaio de citotoxicidade, extratos das amostras de HAp pura e HAp:Eu@ZnO foram preparados a partir da suspensão do pó em PBS para duas diferentes concentrações (50 e 100 $\mu g.mL^{-1}$) por período de 24 h sob agitação.

O ensaio MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] iniciou-se a partir da retirada de 2,0 mL de fluido ascítico da cavidade peritoneal de camundongo Swiss portador de sarcoma 180 (S-180), este foi lavado com PBS e centrifugado a 1200 rpm durante 3,0 min. O sobrenadante foi descartado e em seguida, adicionou-se 5,0 mL do meio de cultura RPMI 1640 com HEPES (Cultilab) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Laborclin). Para contagem celular foi empregado o método de exclusão do Azul de Tripan (Dinâmica®) e Câmara de Neubauer (K5-0111, Olen) acoplado ao Microscópio (Motic Série B1). Na sequência, as células sarcoma 180 foram semeadas em microplacas de 96 poços (1×10^5 células/poço) e incubadas por 4 h à 37 ºC. Decorrido o tempo, foram adicionados 50 µL/poço dos extratos previamente preparados, em triplicata. Como controle positivo foi usado o 5-FU e como controle negativo o PBS. A placa foi homogeneizada no Biomixer (TS-2000A VDRL Shaker) e posteriormente, incubada em estufa a 37 ºC por 24 h. Após 24 h de incubação com cada extrato, foi adicionado a cada poço 20 µL de MTS reagent- CellTiter 96 ®Aqueous One Solution Proliferation Assay (Promega) e após 4 h de incubação à 37 ºC, realizou-se leituras da absorbância a 490 nm utilizando uma leitora de microplacas (modelo TP-Reader, Thermo Plate). A viabilidade celular foi calculada usando o controle negativo para comparação (100% de viabilidade). A Figura 20 mostra um esquema com resumo das etapas experimentais.

Figura 20-Esquema mostrando etapas do experimento de citotoxicidade com células de sarcoma 180 de camundongo.



Fonte: A autora, 2020.

4.9.2 Efeito dos fármacos carregados em HAp:Eu@ZnO sobre células cancerígenas

Para avaliar a atividade antineoplásica dos fármacos quando incorporados a HAp multifuncional, comparado ao seu efeito quando livre em solução, empregou-se o mesmo procedimento descrito em 4.9.1 (Ensaio MTS). Neste caso, extratos das amostras de 5-FU, curcumina, HAp:Eu@ZnO/5-FU e HAp:Eu@ZnO/curcumina foram preparados a partir da suspensão de cada uma destas em PBS para duas diferentes concentrações (50 e 100 $\mu g.mL^{-1}$) por período de 24 h sob agitação.

4.10 Técnicas de Caracterização

4.10.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos utilizando o equipamento FTIR, Modelo: Spectrum Two, no intervalo de números de onda de 4000-400 cm^{-1}. As amostras foram preparadas em forma de pastilhas de KBr empregando prensagem mecânica. Todas as medidas de FTIR foram obtidas no IF - Sertão Pernambucano.

4.10.2 Difração de Raios X (DRX)

Análise das fases cristalinas presentes foi feita por difração de raios X (DRX), com o equipamento Difract ACT série 1000 (Siemens), utilizando a linha kα do cobre (λ= 1,54056 Å) a 40 kV e 40 mA. O intervalo de 2θ foi de 10º a 60º, com um passo de

0,02º e tempo de integração de 1s por ponto. As fases foram identificadas com os dados dos arquivos das fichas de referências ICSD, empregando o software X'Pert HighScore Plus versão 2.0a. As medidas foram realizadas pelo Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE.

4.10.3 Análise de BET (Brunauer-Emmett-Teller)

Medidas de adsorção/dessorção de N_2 foi medida usando um Micromeritics ASAP 2420. A área de superfície específica foi determinada pelo Brunauer-Emmett-Teller (BET) e o volume dos poros foi obtido a partir do método t-plot. As medidas foram realizadas pelo Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE.

4.10.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A avaliação morfológica foi feita em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), modelo Vega3 TESCAN, acoplado a um micro analisador EDS (espectroscopia de dispersão de energia por raios X), empregado na identificação dos elementos presentes no material. As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro (processo de metalização) no intuito de aumentar a condutividade em sua superfície. As medidas foram obtidas no Instituto de Pesquisa em Ciência dos Materiais – UNIVASF.

4.10.5 Espectroscopia de absorção no Ultravioleta-Visível (UV-vis)

As medidas de absorção da região UV-Vis foram feitas em equipamento Espectrofotômetro Ultravioleta, modelo IL-592 utilizando cubetas de quartzo e amostra em fase líquida. A faixa de absorção analisada foi de 200 a 600 nm, durante a realização das leituras foi considerada a subtração do valor referente ao solvente, isto é, se obteve o branco para cada medida. As medidas foram obtidas no Instituto de Pesquisa em Ciência dos Materiais da UNIVASF.

4.10.6 Espectroscopia de Luminescência

Medidas de excitação e emissão das amostras dopadas foram realizadas em um espectrofluorímetro Jobin-Yvon Ramanor U-1000 com duplo monocromador. Para excitação foi utilizado um monocromador Jobin-Yvon modelo H-10, usando uma lâmpada de Xe-Hg (150W). As análises foram realizadas para amostras sólidas depositadas em fitas de carbono. As medidas foram obtidas no Departamento de Química da UFPE.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

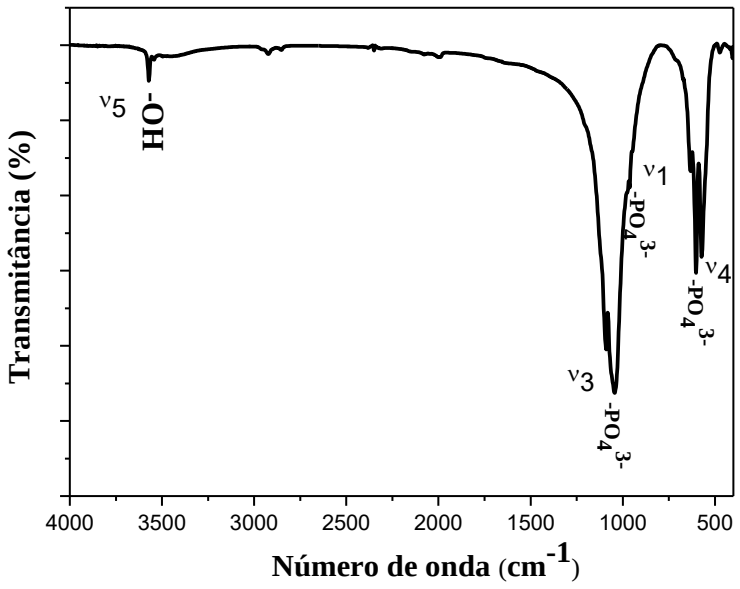
Nesta etapa serão discutidos os resultados referentes às diversas caracterizações dos materiais produzidos, sendo estes: HAp pura, HAp:Eu^{3+}, HAp@ZnO, HAp:Eu@ZnO, HAp:Eu@ZnO/5-FU e HAp:Eu@ZnO/curcumina. Todas as amostras se apresentam na forma de um pó cristalino.

5.1 Nanopartículas de HAp

5.1.1 Caracterização química e física

A HAp sintetizada foi inicialmente caracterizada a partir da análise dos seus grupos funcionais obtidos pelo espectro de FTIR da amostra, visto na Figura 21. Bandas de absorção típicas do material com vibrações em 569 e 609 cm^{-1} são atribuídas a ν_4 deformação O-P-O em PO_4^{3-} ou ν_4 deformação O-P-O em HPO_4^{2-} ; 954 a 956 cm^{-1} para ν_1 estiramento simétrico PO_4^{3-}; 1032 a 1100 cm^{-1} para ν_3 estiramento assimétrico de PO_4^{3-} ou ν_6 estiramento PO_3 em HPO_4^{2-}; uma banda bastante característica para HAp em 3580 cm^{-1} é atribuída a ν_5 estiramento O-H de hidroxila. A presença de hidroxilas na estrutura da HAp indica que esta biocerâmica possui pontos de ligação propícios para incorporação de moléculas de fármacos, desta forma, o material apresenta uma propriedade importante para seu uso como nanocarreador de medicamentos (YANG *et al.*, 2008).

Figura 21- Espectro de FTIR para HAp pura calcinada à 900 ºC.



A Tabela 2 apresenta o resumo das principais bandas de absorção para a HAp e seus respectivos grupos funcionais.

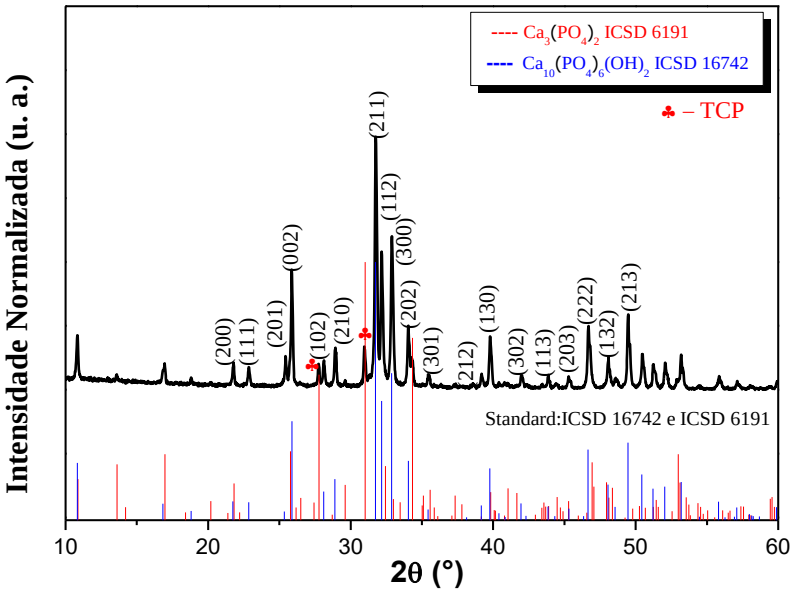
Tabela 4-Principais bandas de absorção para HAp e seus respectivos grupos funcionais.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuições
3580	ν_5 estiramento OH de hidroxila
3400	ν_5 estiramento OH de H_2O
1645	deformação H-O-H de H_2O
1128	ν_6 estiramento PO_3 em HPO_4^{2-}
1100, 1093 e 1047	ν_3 estiramento assimétrico de PO_4^{3-} ou ν_6 estiramento PO_3 em HPO_4^{2-}
965	ν_1 estiramento simétrico PO_4^{3-}
616, 581	ν_4 deformação O-P-O em PO_4^{3-} ou ν_4 deformação O-P-O em HPO_4^{2-}

(OLIVEIRA *et al*., 2010).

A estrutura cristalina do material foi avaliada a partir do seu difratograma apresentado na Figura 22. Neste, foi possível confirmar HAp como fase predominante, onde os principais picos de difração foram atribuídos a HAp hexagonal, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, com grupo espacial P63/m, compatível com o padrão ICSD 16742.

Figura 22- Difratograma de raios X da HAp pura calcinada à 900ºC.

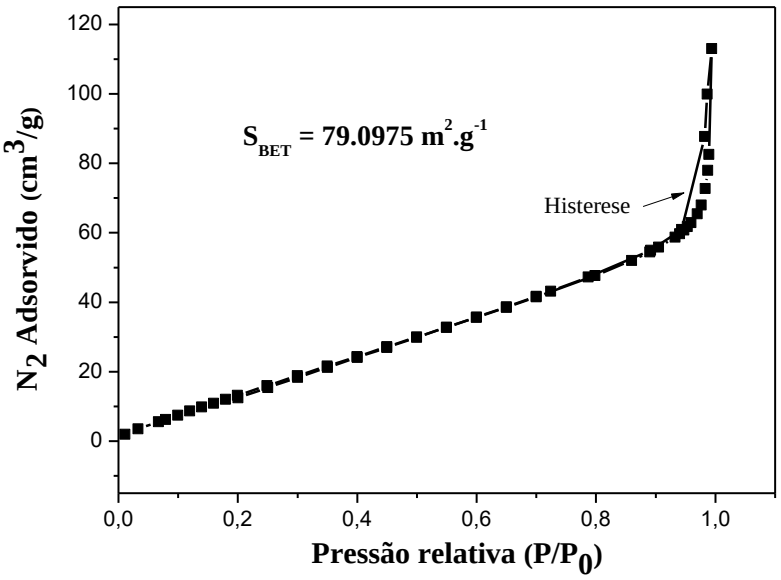


Uma fase secundária foi também detectada em 2θ = 31,0º identificada como Tricálcio Fosfato (TCP), $Ca_3(PO_4)_2$, pertencente ao sistema cristalino romboédrico e ao

grupo espacial R3c, de acordo com o padrão ICSD 6191. O TCP está geralmente presente no material, no entanto, esta fase também é considerada um biomaterial e resulta da decomposição térmica da HAp (AZEVEDO *et al*., 2015).

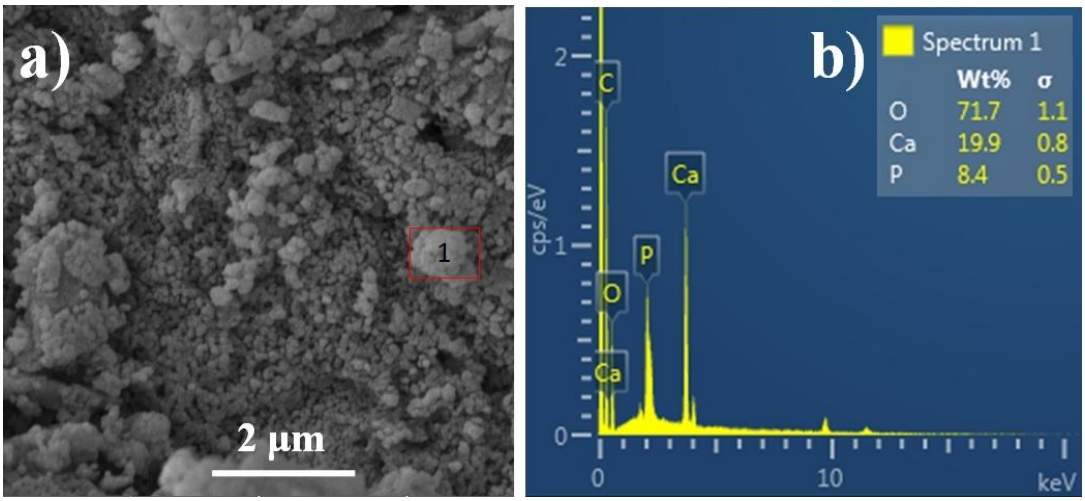
A isoterma de adsorção/dessorção mostrada na Figura 23, indica que a HAp produzida neste trabalho é mesoporosa. De acordo com a IUPAC, a curva observada pode ser identificada como isoterma do tipo IV, pois apresenta histerese no ponto onde as curvas de adsorção e dessorção não são coincidentes, caracterizando o material como mesoporoso, isto é, possui poros com diâmetro entre 2 e 50 nm (SING *et al*; 1985). Sua área superficial foi igual à S_{BET} = 79,09 $m^2.g^{-1}$ e o diâmetro de poro (D_P) igual a 6,8 nm, corroborando com a classificação da IUPAC. Vallet-Regi *et al*. (2008) afirmam que a área superficial e o diâmetro de poro consistem de fatores decisivos para a adsorção e liberação de fármacos em biocerâmicas, pois o tamanho do poro determina o tamanho da molécula que poderá ser adsorvida. Diâmetros de poros com razão poro/fármaco > 1,0 são suficientes para permitir a incorporação do fármaco (VALLET-REGI; BALAS; ARCOS, 2007). As moléculas dos fármacos possuem em geral tamanhos próximos a 1,0 nm, como por exemplo, alendronato (0,83 nm), ibuprofeno (1,01 nm) (FERNANDES; CORREIA, 2015), 5-FU (0,81 nm) (JI *et al*; 2015) e doxorrubicina (1,5 nm) (BILALES *et al*., 2016). Deste modo, o tamanho de poro apresentado pela HAp é compatível para a sua aplicação como suporte de fármacos.

Figura 23-Isoterma de adsorção e dessorção de nitrogênio e área de superfície BET da HAp.



A morfologia da HAp pode ser observada na micrografia apresentada na Figura 24-a, nesta, é possível verificar aglomerados de partículas nanométricas com formas arredondadas e distribuição uniforme. O espectro de EDS correspondente, Figura 24-b, mostra os principais elementos químicos característicos da composição química da HAp pura: cálcio (Ca), fósforo (P) e oxigênio (O), não sendo observada a presença de impurezas.

Figura 24– a) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para HAp pura e b) Espectro de energia dispersiva correspondente a área pontual da amostra.



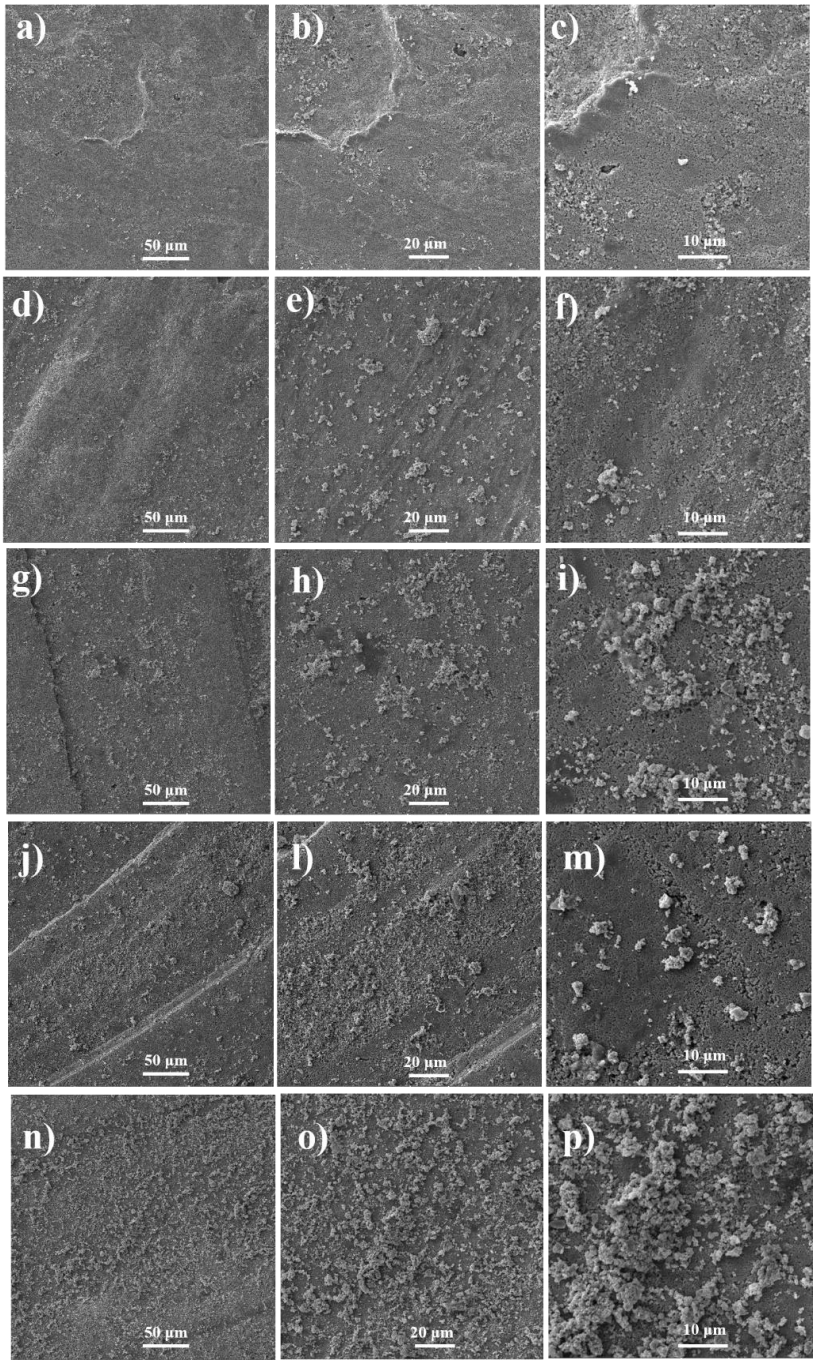
5.1.2 Bioatividade in vitro

Quando um material é desenvolvido com o propósito de uso médico, como por exemplo, odontológico, ortopédico ou suporte para fármacos, como no caso da HAp, é extremamente importante conhecer a resposta do organismo quando em contato com o mesmo. Neste trabalho, a HAp foi avaliada quanto a sua natureza bioativa, propriedade já bastante consolidada para esta biocerâmica (MURUGAN; KAMAKRISHNA, 2005; LOPES; OLIVEIRA; STEVES, 2015; GEULI *et al*., 2017). A análise do material utilizando uma solução simuladora dos fluidos corpóreos (SBF) a 37 ºC e pH = 7,4 foi realizada para posterior comparação com a bioatividade da HAp multifuncional.

Na Figura 25 são mostradas micrografias para diferentes tempos de imersão de pastilhas de HAp em SBF. As Figuras 25-a a 25-c correspondem a imagens da superfície das pastilhas de HAp para 0 dia de imersão. A formação de uma camada de

apatita é observada a partir de 3 dias do contato da amostra com o SBF, Figuras 25-d a 25-f.

Figura 25– Micrografias da superfície de pastilhas de HAp após diferentes tempos de imersão em SBF a 37 ºC e pH = 7,4: a) , b) e c) 0 dia; d), e) e f) 3 dias; g), h) e i) 7 dias; j), l) e m) 14 dias; n), o) e p) 21 dias.



Na Figura 25-e é possível visualizar com clareza a deposição de cristais de apatita sobre a superfície da pastilha. O aumento da precipitação ocorre em função do maior

tempo de contato das amostras com a solução, como verificado nas Figuras 25-g a 25-i (7 dias), Figuras 25-j a 25-m (14 dias) e Figuras 25-n a 25-p (21 dias), nestas últimas, a superfície da amostra já se encontra quase completamente coberta pela camada de apatita. Este resultado indica que a HAp sintetizada é bioativa, pois de acordo com Hench (1998), um material bioativo é aquele que provoca uma resposta biológica específica, e deste modo, gera a formação de ligação entre os tecidos e o material.

O mecanismo de formação da camada de apatita sobre a superfície de um material bioativo ocorre a partir de fenômenos espontâneos de dissolução e precipitação, onde íons constituintes da amostra interagem com o meio fisiológico (HENCH, 1998; KOKUBO; TAKADAMA, 2006). Para a HAp, íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} são liberados para a solução e provocam a supersaturação do meio causando a precipitação de cristais de apatita carbonatada ou apatita biológica, devido a incorporação de íons carbonato (CO_3^{2-}) presentes no SBF.

Os resultados observados neste trabalho corroboram com diversos estudos encontrados na literatura, os quais avaliaram a bioatividade de materiais a partir de testes *in vitro* com o SBF e comprovaram seus resultados quando realizados testes *in vivo*. Por exemplo, Ohtsuk; Kushitan e Kokubo (1991) estudaram a bioatividade de uma vitrocerâmica e comprovaram a formação de apatita carbonatada sobre sua superfície quando em contato com o SBF. Também detectaram a formação da mesma camada de apatita na interface entre osso e vitrocerâmica num teste *in vivo*. Kawai et al., (2004) utilizaram a imersão de filmes de poliamida em solução SBF para que sua superfície fosse revestida com camada de apatita, esta foi formada a partir de 1 dia de contato para algumas amostras. Ma; Guo (2019) desenvolveram um compósito de polímero/HAp e testaram sua bioatividade por imersão em SBF, verificando a formação de apatita em sua superfície após 7 dias. O ensaio *in vivo* indicou eficiência de osseointegração em torno do compósito.

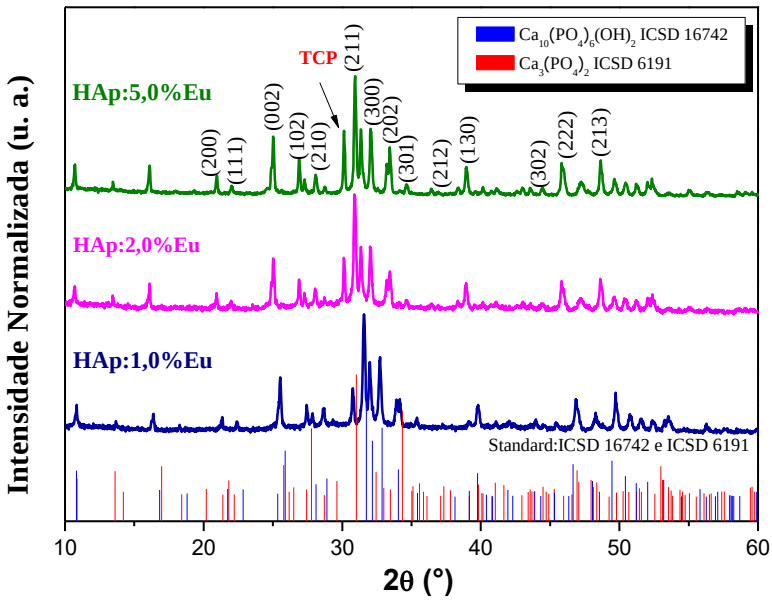
Com base no exposto e de acordo com Kokubo e Takadama (2006) a análise da bioatividade de diversos materiais utilizando a solução de SBF é extremamente útil e demonstra similaridade com os testes *in vivo*, portanto, esta metodologia reduz o número de animais empregados em estudos *in vivo* e antecipa o tempo para a obtenção de resultados.

5.2 HAp dopada com íons Eu^{3+}

5.2.1 Caracterização química e física

A análise da estrutura cristalina do material após dopagem é de suma importância para verificação de possíveis alterações na mesma, deste modo, difratogramas de raios X mostrados na Figura 26, foram obtidos para amostras de HAp dopada com diferentes concentrações de íons Eu^{3+}, nestes foram observados os principais picos cristalinos atribuídos a HAp hexagonal como fase majoritária, compatíveis com o padrão ICSD 16742. Poucas alterações foram verificadas em função da incorporação dos íons Eu^{3+} no material. Comparando-se os difratogramas é possível observar um pequeno aumento na intensidade do pico 2θ = 31,0º em relação ao pico mais intenso para a HAp, verificado em função da maior concentração do dopante, este pico caracteriza a presença da fase TCP, $Ca_3(PO_4)_2$, que como já relatado, é geralmente formada devido a decomposição da HAp a elevadas temperaturas ou a oscilações no pH durante a síntese (AZEVEDO *et al.*, 2015; YANG; WANG, 1998).

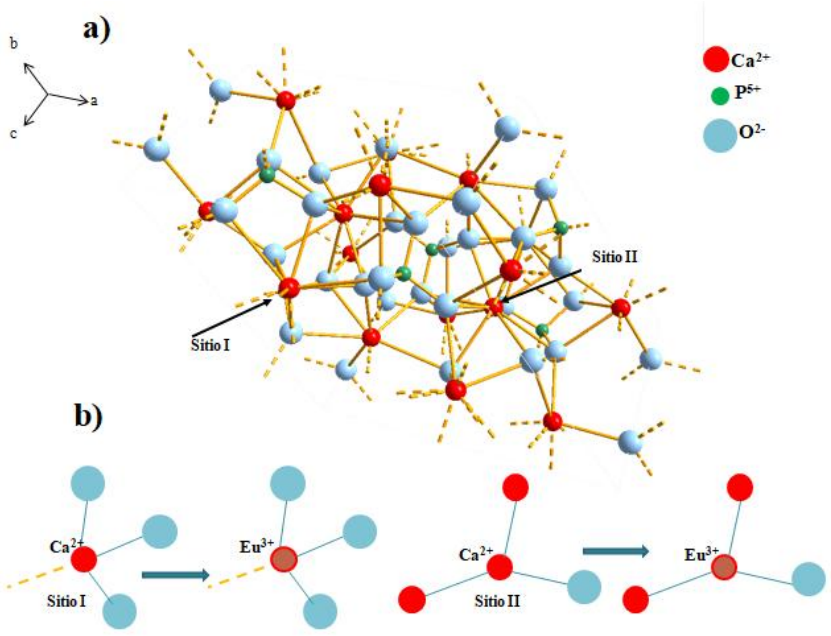
Figura 26 - Difratogramas de raios X do pó para HAp dopada com diferentes concentrações de íons Eu^{3+} e padrões das fichas de referências ICSD 16742 (HAp) e ICSD 6191 (TCP).



Por outro lado, considerando que todas as sínteses foram realizadas empregando os mesmos parâmetros, sugere-se que a incorporação dos íons Eu^{3+} na matriz tenha contribuído para a formação da fase secundária. Isso pode estar relacionado à introdução dos íons Eu^{3+} na rede da matriz que ocorre por substituição dos íons Ca^{2+} em

dois diferentes sítios cristalográficos da célula unitária, tornando-se $Ca_{10-x}Eu_x(PO_4)_6(OH)_2$ (CIOBANU *et al*., 2012; GRAEVE *et al*., 2010 e MARTIN *et al*., 1999), como mostra a Figura 27. O mecanismo de compensação de cargas pela substituição do Ca^{2+} (r = 0,106 nm) por Eu^{3+} (r = 0,098 nm), além do tratamento térmico podem resultar na desestabilização da estrutura e formação de pequenas quantidades da fase TCP. Estes dados estão de acordo com os resultados de Ciobanu *et al*. (2012) e Han *et al*. (2013), os quais observaram que a dopagem da HAp com íons Eu^{3+} inibem a sua cristalização em função da concentração do dopante. Han *et al*. (2013) também identificaram picos de DRX que foram atribuídos a fase TCP, detectados quando incorporado 4% de Eu^{3+} na HAp. Vale ressaltar que a presença de uma segunda fase na HAp provoca um aumento na sua taxa de degradação, podendo se tratar de uma característica importante dado o tipo de aplicação da biocerâmica (LIN; CHANG, 2015).

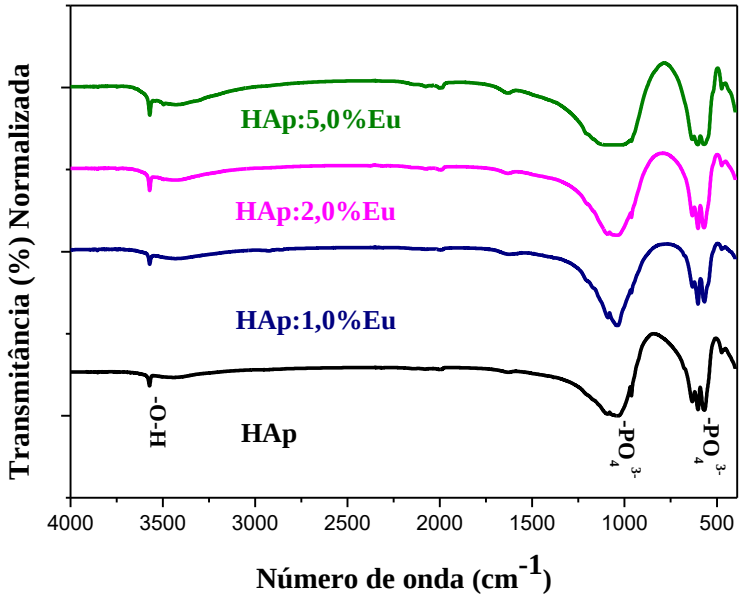
Figura 27- a) Representação dos dois diferentes sítios catiônicos ocupados pelos íons Ca^{2+} na hidroxiapatita e b) Substituição de íons Ca^{2+} por Eu^{3+} nos respectivos sítios do Ca^{2+}. Célula cristalina da HAp obtida com o software X'Pert High Score Plus versão 2.0a. Fonte: Autoria própria.



Para complementar a caracterização das amostras por DRX e confirmar a identidade do material, bem como, avaliar possíveis alterações na absorção dos seus

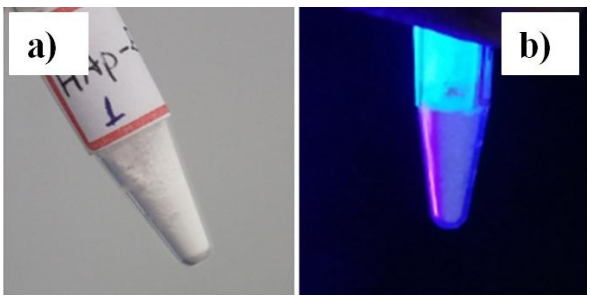
grupos funcionais, espectros de FTIR foram obtidos. Estes são apresentados na Figura 28 para a HAp dopada com 1,0; 2,0 e 5,0% em massa de íons Eu^{3+}. Os grupos funcionais observados são semelhantes aos grupos característicos da HAp pura e nenhuma alteração das bandas de absorção foi verificada em função da incorporação dos íons európio, como esperado. As bandas de absorção e seus respectivos grupos funcionais estão de acordo com a Tabela 4, mostrada no tópico 5.1 (pag.67), estes consistem basicamente de estiramentos de grupos $-PO_4^{3-}$ e O-H de hidroxilas.

Figura 28-Espectros de FTIR para a matriz de HAp comparada ao material dopado com diferentes concentrações de íons Eu^{3+}.



A luminescência de uma amostra de HAp dopada com 2,0 % de íons Eu^{3+} (Ca-Eu/P= 1,66), sob uma lâmpada UV pode ser observada na Figura 29 e caracterização espectroscópica através dos espectros de excitação e emissão dos materiais produzidos é mostrada na Figura 30.

Figura 29- Amostra de HAp dopada com 2,0% de íons Eu^{3+}: a) Sem excitação e b) Sob lâmpada UV.



Picos de emissão dos íons Eu^{3+} em diferentes concentrações na matriz foram observados. Para isso, obteve-se inicialmente o espectro de excitação de HAp:Eu^{3+} a partir do monitoramento da emissão em 612 nm ($^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$), Figura 30-a. Posteriormente, as diversas amostras foram excitadas utilizando o $\lambda_{máx}$ em 395 nm para aquisição dos seus espectros de emissão mostrados na Figura 30-b. Nestes, foram identificadas as transições f-f características do íon Eu^{3+} em: 573 nm ($^5D_0 \rightarrow F_0$), 589 a 597 nm ($^5D_0 \rightarrow F_1$), 612 e 616 nm ($^5D_0 \rightarrow F_2$), 652 nm ($^5D_0 \rightarrow F_3$) e 698 nm ($^5D_0 \rightarrow F_4$).

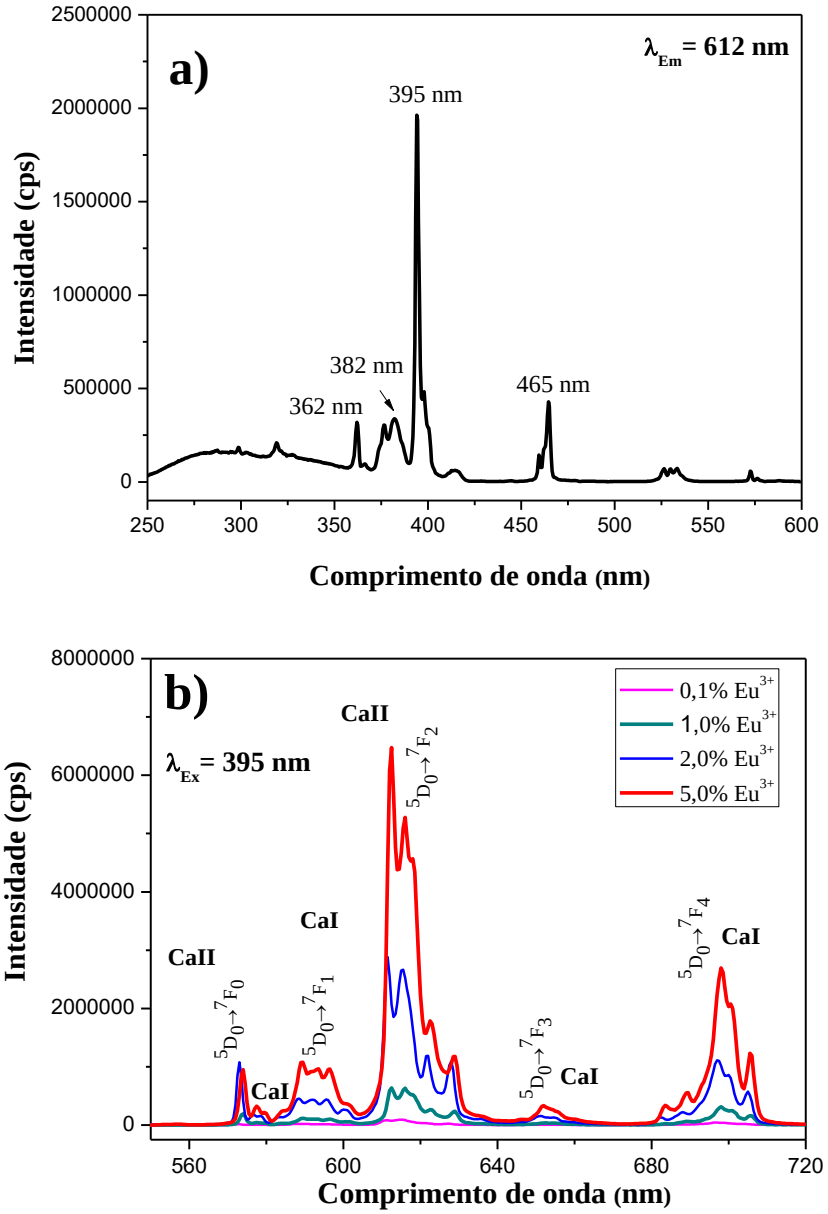
De acordo com a análise dos espectros, observa-se maior intensidade dos picos de emissão em função da maior concentração de íons Eu^{3+}, neste caso, 0,1% não apresentou emissão apreciável, enquanto 5,0% geraram picos de alta intensidade luminescente. Esta verificação é comum e corrobora com o trabalho de Fneich *et al*. (2018) que verificaram uma maior intensidade de picos de emissão em função da concentração crescente (0,2 a 1,0 % mol) de íons Eu^{3+} em vidros a base de SiO_2. Chen *et al*. (2014), também observaram maior intensidade dos picos de emissão em NPs de HAp:Eu^{3+}/Fe^{3+} com o aumento da concentração de 0 a 10 % mol de íons Eu^{3+}.

Diferentes sítios de simetria para os íons Eu^{3+} no material também foram verificados, corroborando com os resultados de DRX (Figura 26) que confirmam a presença de mais de uma fase no material e, consequentemente, ambientes químicos distintos. A presença dos íons Eu^{3+} em diferentes sítios também pode ser explicada pela existência de dois sítios de íons Ca^{2+} na estrutura cristalina da HAp, denominados CaI e CaII (Figura 27). De acordo com Martin *et al*. (1999), os íons Eu^{3+} ocupam preferencialmente o sítio CaI da HAp, isto se deve ao melhor posicionamento para compensação de cargas entre os íons, no entanto, o processo de calcinação da amostra fornece energia térmica para o sistema induzindo a difusão dos íons Eu^{3+} do sítio CaI para o sítio CaII a partir de 400 ºC. A ocupação de mais de um sítio de simetria por íons lantanídeos pode ser observada em diversos sistemas descritos na literatura. Gupta et al. (2015) estudaram a estrutura local e simetria em torno de íons lantanídeos em Sr_2SiO_4 e verificaram que íons Eu^{3+} ocupam dois diferentes sítios na matriz hospedeira. Ciobanu, Popa e Predoi (2016) observaram a partir do espectro de emissão de íons Ce^{3+} que estes estavam presentes em dois sítios de simetria distintos na HAp. Camargo *et al*. (2000) utilizaram íons Er^{3+} como dopantes em Gd_2SiO_5 para investigação dos seus dois sítios cristalográficos a partir da luminescência do material.

Os resultados estão de acordo com o mecanismo de migração dos íons pela rede da matriz, pois as amostras foram calcinadas a 900 ºC e as emissões verificadas nos

espectros de emissão são referentes à presença dos íons Eu^{3+} simultaneamente nos dois diferentes sítios. As linhas características de emissão observadas nos espectros mostram o potencial de utilização do material em aplicações ligadas ao seu monitoramento pela luminescência.

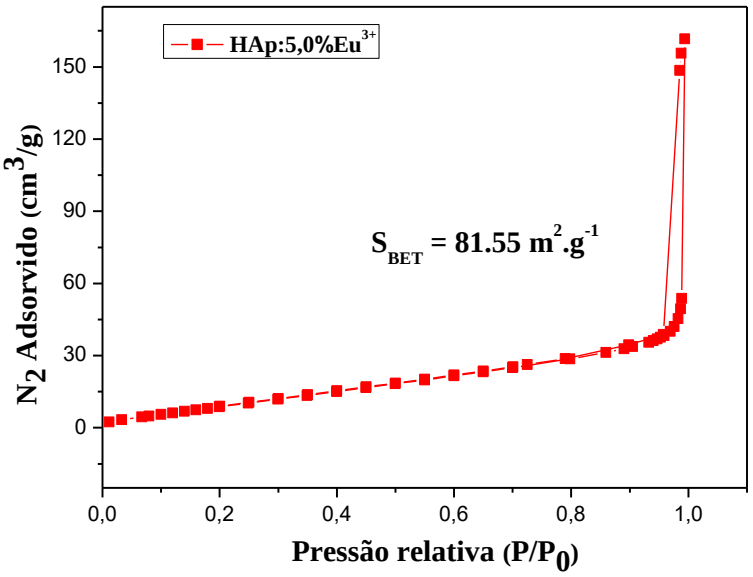
Figura 30- a) Espectro de excitação e b) espectros de emissão da HAp dopada com diferentes concentrações de íons Eu^{3+} (0,1; 1,0; 2,0 e 5,0%).



Com base na maior intensidade luminescente observada e na preservação da estrutura cristalina da matriz, definiu-se HAp dopada com 5,0 % de íons Eu^{3+} como a melhor amostra para aplicação em etapas posteriores. Assim, esta foi também

caracterizada quanto a sua área de superfície BET. Na Figura 31 é mostrada a isoterma de adsorção/dessorção do tipo IV, material mesoporoso, análogo à HAp pura.

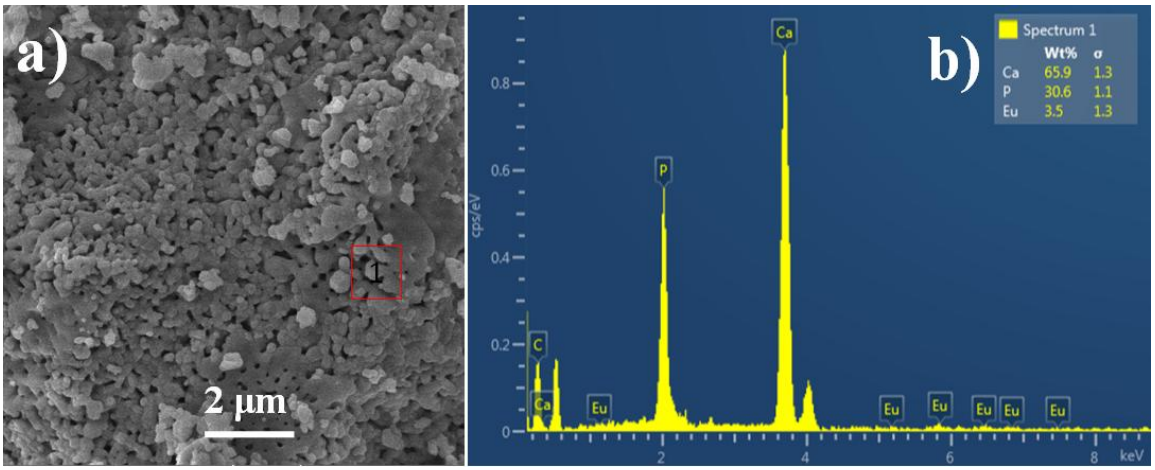
Figura 31- Isoterma de adsorção e dessorção de nitrogênio e área de superfície BET para HAp:5,0%Eu^{3+}.



De acordo com análise de S_{BET}, confirma-se que a incorporação dos íons Eu^{3+} não afetou a área superficial do material apresentando valores próximos. O S_{BET} = 79,09 $m^2.g^{-1}$ para a HAp pura e S_{BET} = 81,55 $m^2.g^{-1}$ para HAp:5,0%Eu^{3+}. O resultado observado é compatível com o trabalho de Yang *et al*. (2008) que sintetizaram nanobastões de HAp dopados com Eu^{3+} e obtiveram área superficial, S_{BET} = 57,9 $m^2.g^{-1}$ para os nanobastões sem dopante e S_{BET} = 54,8 $m^2.g^{-1}$ para nanobastões de HAp dopados. Os valores obtidos foram muito próximos e os autores concluíram que a dopagem não provocou alteração comparada ao material puro. Destaca-se também que a amostra HAp:5,0%Eu^{3+} sintetizada neste trabalho apresentou área superficial superior ao valor obtido para os referidos nanobastões indicando potencial para incorporação de maior quantidade de fármaco.

A morfologia da amostra HAp:5,0%Eu^{3+} foi observada a partir de imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura. Na micrografia apresentada na Figura 32-a verifica-se que o material possui morfologia semelhante a da HAp pura (Figura 24-a), neste caso, aglomerados de partículas nanométricas (≈ 100-150 nm) com formas, aproximadamente, arredondadas podem ser visualizados.

Figura 32- a) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura e b) Espectro de energia dispersiva para amostra HAp:5,0%Eu^{3+}.



Na morfologia de HAp:5,0%Eu^{3+} também se observa em alguns pontos a ocorrência de difusão de massa em partículas, provocando aumento no seu tamanho e alteração em sua forma devido ao crescimento de grãos. Este processo pode ser atribuído ao tratamento térmico de calcinação da amostra e também foi verificado no trabalho de Azevedo *et al*. (2015) que estudaram a influência da temperatura de sinterização sob pós de HAp. Landi *et al*. (2000) observaram a densificação de pós de HAp devido ao crescimento de grãos por difusão do limite de grão em função da temperatura de sinterização. A análise da amostra também foi feita por EDS, Figura 32-b, que confirmou a presença do európio, além do cálcio e fósforo característicos da HAp.

5.3 HAp revestida com NPs de ZnO (HAp@ZnO)

5.3.1 Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana de HAp@ZnO foi avaliada para amostras com diferentes concentrações e testadas para duas bactérias distintas, uma gram positiva (*S. aureus*) e outra gram negativa (*E. coli*). Na Figura 33 são mostradas algumas imagens fotográficas tiradas após período de incubação dos materiais e na Tabela 5 estão identificadas as respectivas amostras. A formação de halos de inibição em torno das pastilhas é o indicativo para a ação antiproliferativa das bactérias (NCCLS/CLSI, 2003). Neste caso, a HAp pura funciona como um controle negativo para este ensaio, uma vez que, não se espera nenhum efeito antibacteriano da mesma. Esta observação

pode ser confirmada nas Figuras 33-a e 33-b, onde não são visualizados halos de inibição para as pastilhas de HAp.

Figura 33- Placas com amostras de HAp e HAp dopada (Eu^{3+}, ZnO, curcumina) após incubação a 35 ºC/24h e seus halos de inibição, com: a) *Staphylococcus aureus*, b) e c) *Escherichia coli*.

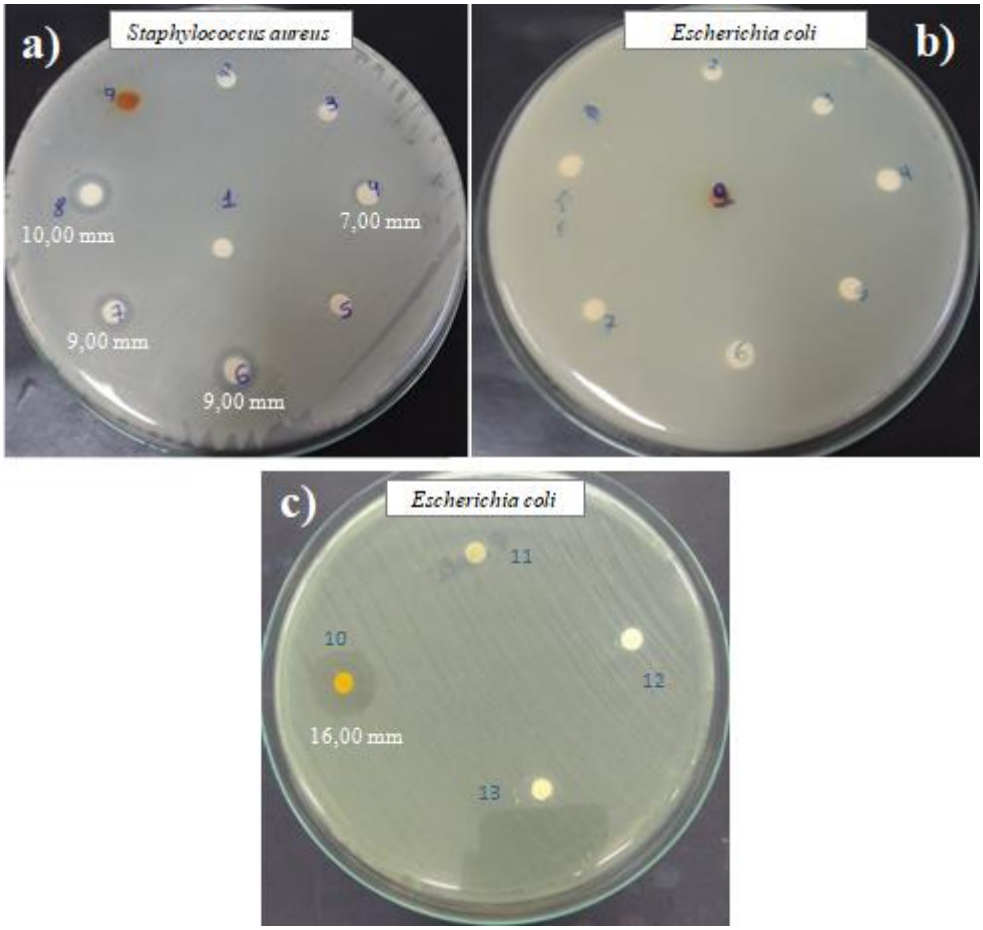


Tabela 5-Identificação de amostras e formação de halos de inibição em bactérias.

Amostra	**Identificação**	**AtividadeAntibacteriana**	
		Staphylococcus aureus	***Escherichia coli***
1	HAp	Não	Não
2	HAp:5,0%Eu^{3+}	Não	Não
3	HAp@0,1%ZnO	Não	Não
4,12	HAp@1,0%ZnO	**Sim**	**Não**
5	HAp:5,0%ZnO*	**Não**	**Não**
6,7,11	HAp@5,0%ZnO	**Sim**	**Não**
8,13	HAp:5,0%Eu@5,0%ZnO	Sim	Não
9	HAp/20%curc	Não	Não
10	HAp@10%ZnO/curc	-	**Sim**

*ZnO adicionado durante a síntese da HAp.

Os diversos materiais utilizados neste trabalho foram testados quanto a sua atividade antibacteriana, deste modo, o efeito dos íons Eu^{3+} na HAp também foi

observado, podendo-se constatar que a adição de 5,0 % do dopante não provocou inibição de nenhuma das bactérias estudadas. A curcumina utilizada como um dos fármacos modelos neste estudo indicou resultado negativo para ambas as bactérias quando adsorvida na HAp, Figuras 33-a e 33-b.

A atividade antibacteriana de HAp@ZnO foi positiva para concentrações a partir de 1,0 % para *S. aureus*, no entanto, mesmo com a adição de 5,0 % de ZnO na amostra, o resultado para a bactéria *E. coli* foi negativo. Testes da HAp com 5,0 % de Eu^{3+} e 5,0 % de ZnO também apresentaram resultados semelhantes, Figuras 33-a e 33-b, Tabela 5. Isto pode ser explicado com base na maior complexidade da parede bacteriana de bactérias gram negativas comparadas as gram positivas (MOREIRA; CARVALHO; FROTA, 2015). Os resultados obtidos são consistentes com a literatura. Mohor *et al*. (2018) constataram maior resistência para a bactéria *E. coli* comparada a *S. aureus* quando testadas amostras com as mesmas concentrações de ZnO. Padmavathy e Vijayaraghavan, (2008), observaram atividade crescente para o ZnO em função da sua maior concentração e do menor tamanho de partícula para *E. coli*, neste caso, halos de inibição de 31,0 ± 0,10 mm foram obtidos para partículas com 12 nm e halos com 22,0 ± 0,30 mm para partículas com 2,0 μm, demonstrando potencial antibacteriano mais efetivo para NPs. Assim, diante dos resultados obtidos neste estudo, amostras com maior concentração de ZnO foram testadas para a bactéria *E. coli*. Na Figura 33-c confirma-se que adições de 1,0 e 5,0 % de ZnO não possuem efeito sobre a bactéria, no entanto, no ensaio feito com 10,0 % de ZnO e 10,0 % de curcumina, um halo de inibição bastante expressivo foi formado (16,00 ± 0,80 mm). Neste caso, a adição de até 20,0 % de curcumina (amostra 9 na Tabela 5) não indicou atividade antibacteriana, sendo o efeito observado atribuído ao aumento da concentração do ZnO.

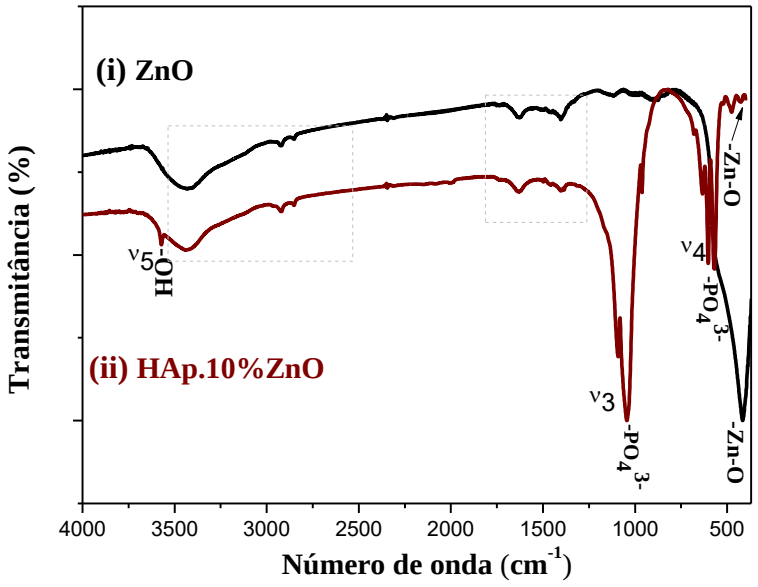
De um modo geral, dentro das concentrações estudadas, conclui-se que 1,0 % de ZnO adicionado a HAp é o valor mínimo para a bactéria *S.aureus* e 10,0 % é o valor mínimo para inibição da *E. coli*, considerando a metodologia utilizada neste trabalho. Destaca-se ainda que o ZnO apresenta atividade antibacteriana contra outros tipos de bactérias, como a *Klebsiella pneumoniae*, neste caso, no trabalho de Wilson; Narayanan e Wilson, (2012) foram testadas NPs de ZnO contra as bactérias: *S. aureus*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* e a ação antimicrobiana em função da maior concentração de NPs de ZnO foi comprovada. A menor sensibilidade para as bactérias gram negativas foi observada. Os autores compararam os dados obtidos com resultados para

antibióticos convencionais e afirmaram que as NPs de ZnO são agentes antibacterianos promissores.

5.3.2 Caracterização química e física

A partir dos resultados obtidos nos ensaios com bactérias, a amostra com melhor resposta a atividade antibacteriana (HAp@10%ZnO) seguiu para outras caracterizações. Na Figura 34 (ii) é apresentado o espectro de FTIR para o material. Neste se observam as bandas de absorção características da HAp, de acordo com a Tabela 4 (pag. 67), e também a presença de bandas de baixa intensidade correspondentes ao ZnO, estas podem ser comparadas ao espectro do ZnO igualmente mostrado na Figura 34 (i), onde a banda de absorção típica de Zn-O é notada em 429 cm^{-1}. Bandas de baixa intensidade foram detectadas em 1392, 1623, 2921 e 3431 cm^{-1} em ambos os espectros e correspondem aos grupos OH e C=O, geralmente presentes devido à umidade e CO_2 do ar (BECHERI *et al*., 2008).

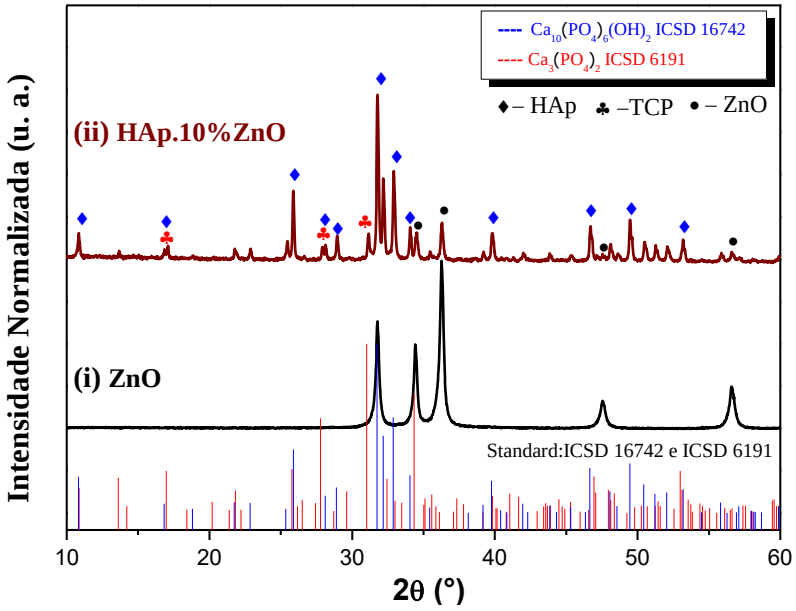
Figura 34- Espectros de FTIR: (i) ZnO e (ii) HAp@10%ZnO



A análise do material por DRX, mostrado na Figura 35, indica HAp hexagonal com grupo espacial $P6_3/m$ como fase majoritária, em acordo com o padrão ICSD 16742, além de um pico de baixa intensidade atribuído a uma pequena fração da fase secundária TCP, ICSD 6191, como igualmente verificado no material puro (Figura 22).

A presença do ZnO na superfície das partículas de HAp foi confirmada pelos picos: 2θ = 34,55º (002); 36,37º (101); 47,45º (102) e 56,62º (110), atribuídos a fase hexagonal do ZnO de acordo com o padrão ICSD 57450 (GUSATTI *et al*, 2010) e compatíveis com picos observados no difratograma do ZnO puro. Quando o ZnO está presente na rede da matriz, alterações são geralmente verificadas em seu difratograma. Miyaji; Kono e Suyama, (2005) observaram a partir de análise de DRX que diferentes concentrações de ZnO quando incorporadas a estrutura cristalina da HAp causaram a diminuição dos parâmetros de rede da matriz e atribuíram este efeito ao menor raio dos íons Zn^{2+} (r = 0,074 nm) que substituem os íons Ca^{2+} (r = 0,106 nm) na rede. Deste modo, os autores sugerem que os íons Zn^{2+} estão dispersos de forma homogênea na estrutura da HAp e por isso, não se observam picos atribuídos a fase do ZnO no difratograma do material.

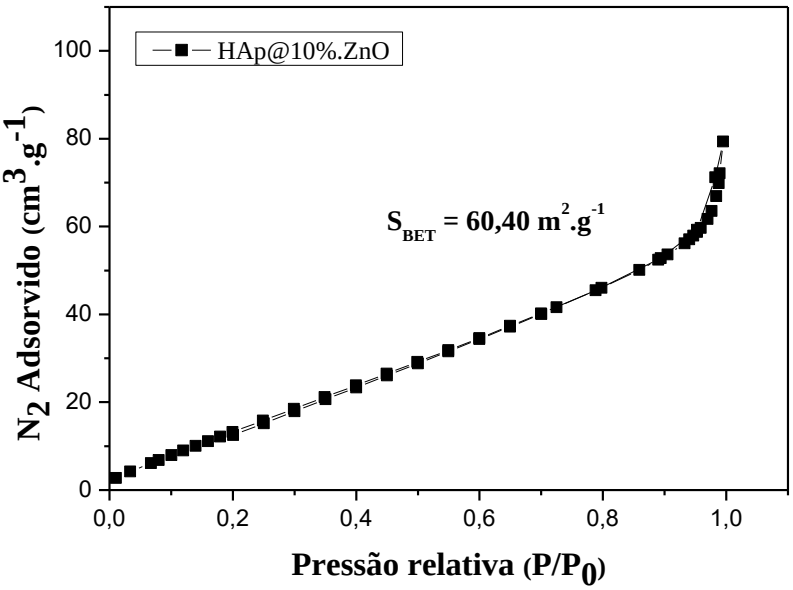
Figura 35- Difratogramas de raios X: (i) ZnO e (ii) HAp@10%ZnO.



Diferentemente da incorporação de íons Eu^{3+} na estrutura da HAp que não causou alteração na sua área superficial específica, o revestimento com NPs de ZnO sobre as partículas de HAp indicou redução, passando de S_{BET} = 79,09 $m^2.g^{-1}$ (HAp pura) para S_{BET} = 60,40 $m^2.g^{-1}$ (HAp@10%ZnO), Figura 36. Este resultado corrobora com as afirmações de Moldovan *et al*. (2015) que em seus estudos avaliaram a influencia do ZnO no comportamento de sinterização de cerâmicas bifásicas de HAp/TCP. De acordo com os autores, a presença do ZnO favorece a sinterização do material, resultando na necessidade de temperaturas inferiores a habitual para o processo, e deste modo, a

difusão dos grãos ocorre formando partículas de maior tamanho. Jin *et al*. (2010) também afirmaram que na temperatura de 1100 ºC se observa o estágio inicial da sinterização de biocerâmicas, enquanto para 1000 ºC ainda se verificam as características do pó inicial, no entanto, a sinterização de biocerâmicas é facilitada em função da maior concentração de ZnO. Assim, a partir da literatura e com base no resultado de S_{BET} obtido, pode-se afirmar que no caso da amostra HAp@10%ZnO calcinada a 900 ºC, a presença do ZnO pode ter sido responsável por causar a ocorrência do processo inicial de sinterização do material, a partir do tratamento térmico empregado para calcinação da amostra, justificando deste modo, a redução da sua área superficial específica quando comparada a matriz pura.

Figura 36- Isoterma de adsorção e dessorção de nitrogênio e área de superfície BET para HAp@10%ZnO.

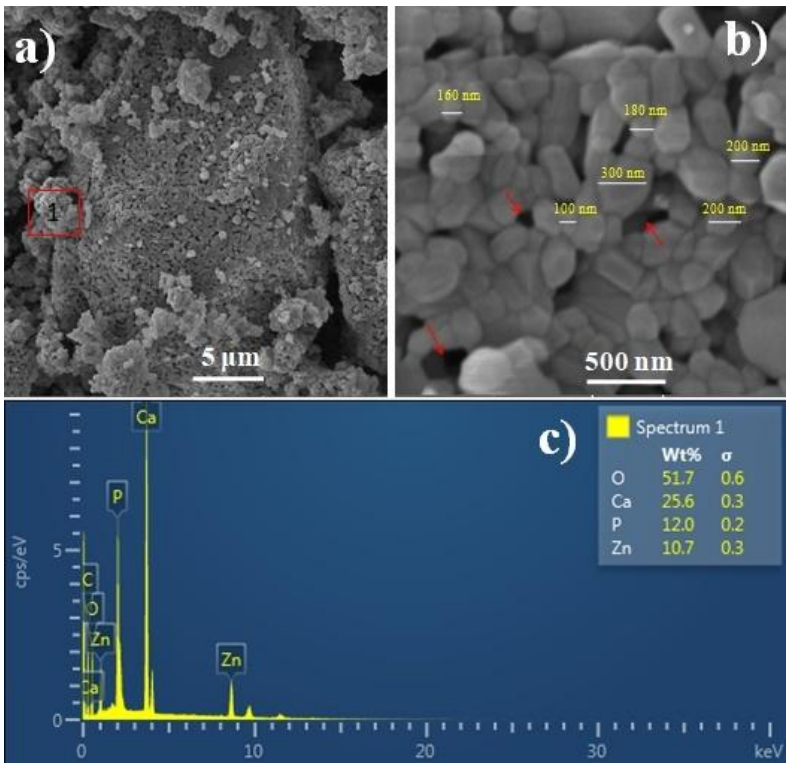


A morfologia do material mostrada nas Figuras 37-a e 37-b apresentam partículas com tamanhos que variam de 100 a 300 nm com formas arredondadas e alongadas. As partículas maiores, bem como, os aglomerados observados podem ser atribuídas ao início do processo de sinterização da amostra (difusão de massa entre partículas), confirmando a análise feita para o resultado de S_{BET}.

Na micrografia da Figura 37-b também é possível verificar a presença de diversos poros no material. O emprego das NPs de ZnO como revestimento sobre partículas de HAp ocorreu de forma homogênea, pois não se observam diferenças nas superfícies das partículas. O espectro de EDS da amostra, Figura 37-c, apresenta os principais

elementos químicos que compõem o material: cálcio (Ca), fósforo (P), oxigênio (O) e zinco (Zn).

Figura 37– a) e b) Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para HAp@10%ZnO e c) Espectro de energia dispersiva correspondente a área pontual da amostra (Região 1 da Figura 37-a).



5.4 Hidroxiapatita multifuncional (HAp:Eu@ZnO)

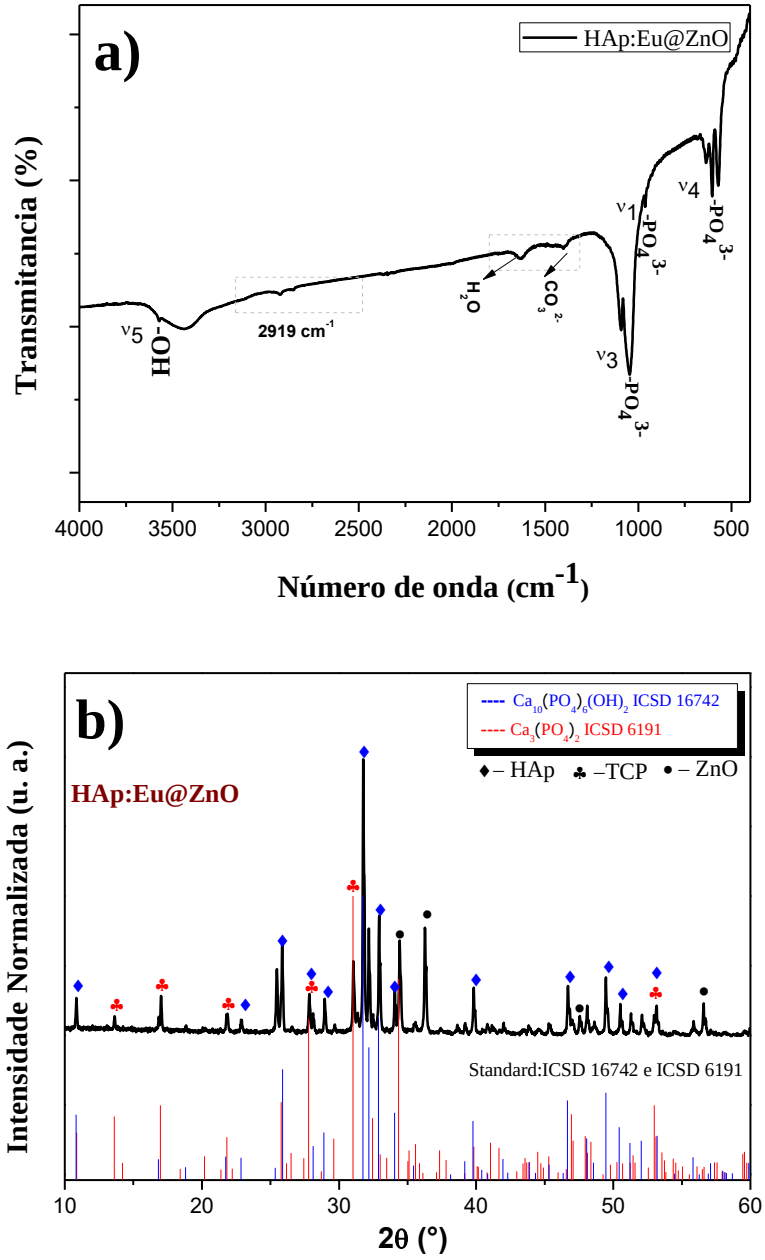
Após avaliar as características dos materiais: HAp pura, HAp:Eu^{3+} e HAp@ZnO de forma individual, foram definidos os melhores parâmetros para produção da HAp multifuncional, neste caso, a caracterização da HAp dopada com 5,0% de íons Eu^{3+} e revestida com 10 % de NPs de ZnO é apresenta a seguir.

5.4.1 Caracterização química e física

Analisando-se o espectro de FTIR para HAp:Eu@ZnO, mostrado na Figura 38-a, verifica-se que o mesmo é bastante semelhante ao espectro da matriz (Figura 22) com bandas intensas típicas de grupos fosfatos (PO_4^{3-}) e pequenas vibrações características de água (H_2O) e íons carbonato (CO_3^{2-}), estas são geralmente observadas no espectro do ZnO (Figura 33-a), e portanto, são atribuídas a sua presença no material. A Figura 38-b

mostra o difratograma da HAp multifuncional onde é possível confirmar a substituição dos íons Eu^{3+} nos sítios dos íons Ca^{2+} na estrutura da HAp, pois nenhuma fase atribuída ao európio foi identificada. Além disso, a incorporação destes íons não provocou alterações estruturais na matriz e os picos observados foram característicos de HAp hexagonal como fase majoritária, estando de acordo com o padrão ICSD 16742.

Figura 38– a) Espectro de FTIR e b) Difratograma de raios X para HAp multifuncional.

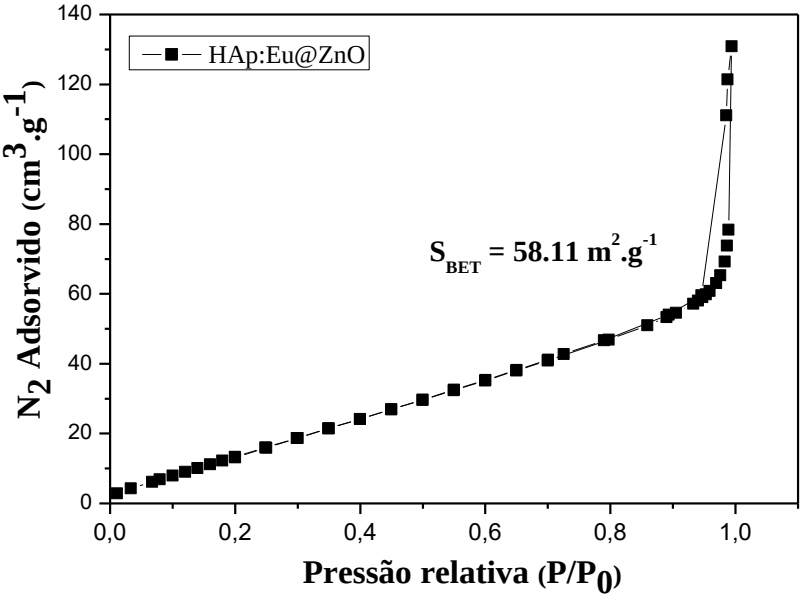


Na análise de DRX (Figura 38) também foram detectados picos típicos da fase hexagonal do ZnO compatível com o padrão ICSD 57450, comprovando a presença deste na superfície das partículas. A fase TCP consiste em um fosfato que também é

bastante estudado para aplicações biomédicas e geralmente se forma durante o processamento da HAp, isto pode ocorrer devido a uma possível desestabilização da rede durante a troca de íons Ca^{2+} por Eu^{3+} ou pelo tratamento térmico empregado, como discutido no tópico 5.2.

A análise da área superficial específica do material, Figura 39, indica que não houve maiores alterações desta em função da combinação de íons Eu^{3+} na rede da HAp com a adição de NPs de ZnO em sua superfície. De acordo com a IUPAC, pode-se afirmar que a HAp multifuncional é consistente com a classificação de material mesoporoso (poros de 2 a 50 nm), pois sua isoterma é do tipo IV com presença de histerese (SING *et al*; 1985) e deste modo, o material é apto a ser utilizado como suporte para fármacos, pois como já discutido, muitos fármacos possuem moléculas com tamanhos próximos a 1,0 nm (FERNANDES; CORREIA, 2015) e Vallet-Regi; Balas e Arcos, (2007) afirmaram que diâmetros de poros com razão poro/fármaco > 1,0 são suficientes para comportar o fármaco. O valor de S_{BET} = 58,11 $m^2.g^{-1}$ para HAp:Eu@ZnO foi inferior ao obtido para a matriz (S_{BET} = 79,09 $m^2.g^{-1}$) ou para HAp:Eu^{3+} (S_{BET} = 81,55 $m^2.g^{-1}$), no entanto, o resultado se assemelha ao apresentado por HAp@ZnO (S_{BET} = 60,40 $m^2.g^{-1}$), confirmando que o recobrimento da HAp com NPs de ZnO afetou a área superficial, porém, não alterou sua característica de material mesoporoso.

Figura 39- Isoterma de adsorção e dessorção de nitrogênio e área de superfície BET para HAp:Eu@ZnO.



Corroborando com o resultado de S_{BET}, as micrografias obtidas para a amostra, Figura 40-a e 40-b, apresentam difusão de massa entre partículas (indicadas pelas setas) em algumas regiões do material, e por isso, sua área superficial é consequentemente reduzida. Além disso, também se observam nas micrografias partículas nanométricas com formas arredondadas, semelhantes ao que foi visto na micrografia da matriz (Figura 25). Neste caso, concluí-se que a adição de NPs de ZnO sobre a superfície de HAp:Eu provoca a ocorrência do processo inicial de sinterização das partículas, como também foi observado nas amostras de HAp@ZnO. Afirma-se ser apenas um primeiro estágio de sinterização, pois muitas partículas com morfologia típica da matriz foram conservadas, bem como, grande porosidade no material.

O espectro de EDS mostrado na Figura 40-c, indica a presença do Zn que também foi detectado no difratograma do material como fase do ZnO e o Eu que não foi detectado nas análises anteriores. O restante dos picos identificados é atribuído aos elementos característicos da matriz (Ca, P e O). Ainda utilizando o espectro de energia dispersiva acoplado ao microscópio eletrônico, foi realizado o mapeamento da distribuição simultânea dos elementos a partir da varredura da amostra, apresentado na Figura 41. Nesta análise é possível observar a distribuição uniforme de todos os elementos que compõem o sistema multifuncional a base de HAp, indicando o sucesso na síntese do material.

Figura 40– a) e b) Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para HAp:Eu@ZnO e c) Espectro de energia dispersiva correspondente a varredura da amostra.

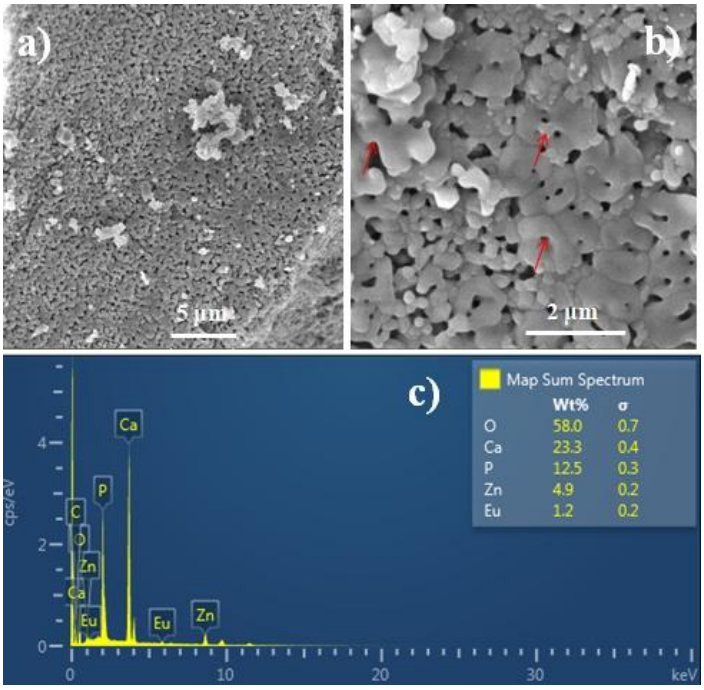
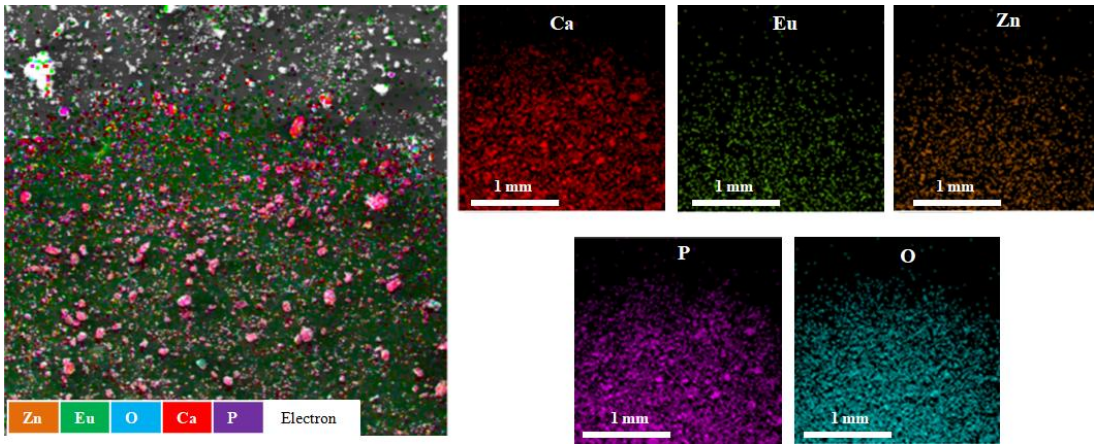


Figura 41– Imagem do mapeamento da distribuição simultânea dos elementos baseados na varredura da amostra HAp:Eu@ZnO obtida a partir da análise de EDS.



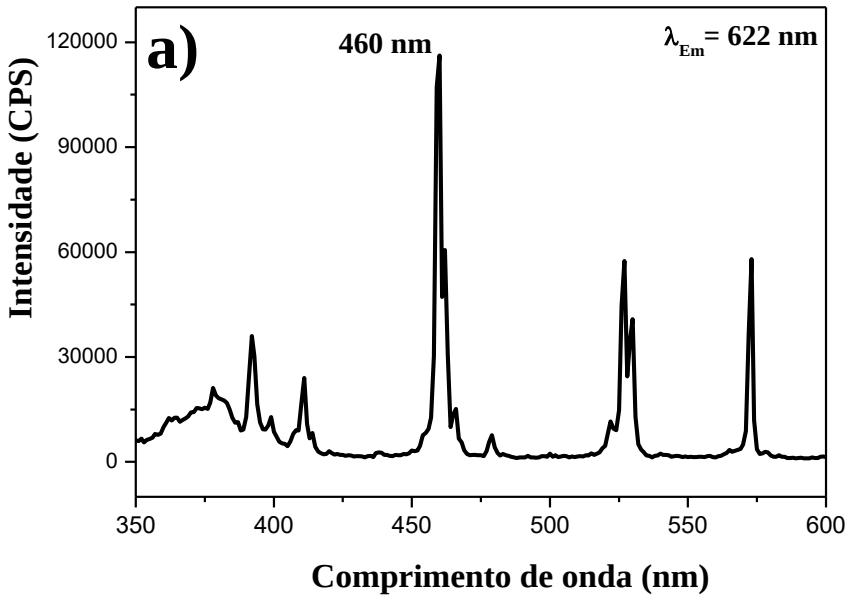
A caracterização espectroscópica de HAp:Eu@ZnO é apresentada na Figura 42. Inicialmente o espectro de excitação do material foi adquirido a partir do monitoramento da emissão em 622 nm ($^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$), obtendo-se o $\lambda_{máx}$= 460 nm, Figura 42-a. Posteriormente, a amostra foi excitada ($\lambda_{máx}$ em 460 nm) para aquisição do seu espectro de emissão mostrado na Figura 42-b. Neste, observam-se picos intensos referentes a transições f-f típicas dos íons Eu^{3+} em: 573 nm ($^5D_0 \rightarrow F_0$), 600 nm ($^5D_0 \rightarrow F_1$), 622 e 628 nm ($^5D_0 \rightarrow F_2$), 655 nm ($^5D_0 \rightarrow F_3$) e 700 nm ($^5D_0 \rightarrow F_4$), confirmando assim, a luminescência da HAp multifuncional. No entanto, deve-se destacar que diferentemente do observado para os espectros de emissão das amostras HAp:Eu^{3+} (Figura 30-b), o espectro de emissão de HAp:Eu@ZnO indicou uma anomalia verificada para a transição $^5D_0 \rightarrow F_0$ que apresentou alta intensidade e foi superior a intensidade da transição $^5D_0 \rightarrow F_2$, sugerindo deste modo que a presença do ZnO na superfície das partículas de HAp:Eu influenciaram no seu espectro.

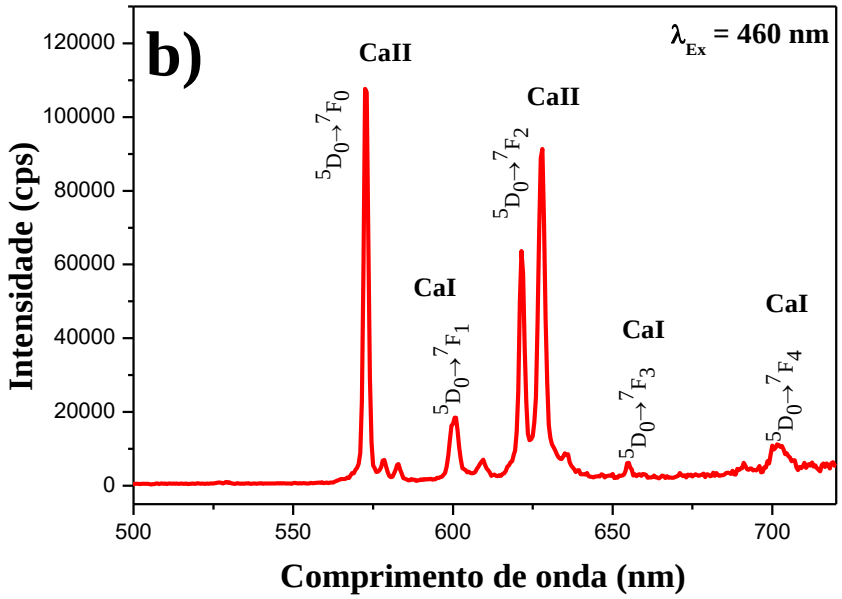
Como é de conhecimento, a transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ é proibida de acordo com a teoria de Judd-Ofelt, no entanto, a ocorrência desta é explicada pela perturbação do campo do cristal e mistura das funções de onda dos subníveis de diferentes níveis J, mesmo assim, as intensidades obtidas para transições $^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ (J = 0, 3, 5) são geralmente muito baixas (BINNEMANS, 2015), o que não foi visto no espectro da HAp multifuncional. Por outro lado, a transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ com intensidade alta incomum já foi observada para alguns complexos como: Sr_2TiO_4:Eu^{3+} (BLASSE, 1975) e $La_2Si_2O_7$:Eu (PIRIOU *et al*., 1997). No caso das apatitas, esta verificação é ainda mais evidente, como por exemplo, Karbowiak e Hubert, (2000) analisaram o espectro de emissão de fluoroapatita

dopada com európio, Eu^{3+}:$Ca_5(PO_4)_3F$ e constaram intensidade da transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ superior a $^5D_0 \rightarrow F_2$, atribuindo o efeito a compensação de cargas e anisotropia do cristal. El Ouenzerfi *et al*. (1999) estudaram a luminescência de uma apatita de estrôncio dopada com európio, $Sr_5(PO_4)_3OH:Eu^{3+}$ e afirmaram que o dopante ocupa três posições cristalográficas na matriz, denominadas A1, A2 e B, neste caso, A1 e A2 pertencem a mesma distribuição com transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ bastante intensa, enquanto B indicou intensidade relativamente baixa. Assim como na HAp de cálcio, a HAp de estrôncio possui dois sítios catiônicos, Sr (I) e Sr (II), deste modo, os autores verificaram que as posições A1 e A2 foram atribuídas ao Sr (II).

A explicação de tal efeito envolve a compensação de cargas necessária na substituição dos íons Eu^{3+} nas apatitas, como por exemplo: $OH^- + Sr^{2+} \rightarrow Eu^{3+} + O^{2-}$. Com base nisso, verifica-se que os íons Eu^{3+} ocupam preferencialmente a vizinhança de um oxigênio livre substituindo o íon OH^-. De acordo com a geometria dos átomos na matriz, a posição de Sr (II) (simetria C_4) possui localização preferencial para os íons Eu^{3+}, enquanto o sítio Sr (I) (simetria C_3) apresenta longa distância dos íons O^{2-}, e, portanto, são minimamente ocupados (KARBOWIAK; HUBERT, 2000; EL OUENZERFI *et al*., 1999). Além disso, de acordo com Ternare *et al*. (1999) a presença de um campo cristalino assimétrico pode causar a mistura de estados $^7F_1$ e $^7F_2$ pela teoria da perturbação de segunda ordem, e com isso, promover significativamente a transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$.

Figura 42– a) Espectro de excitação e b) emissão para HAp multifuncional.





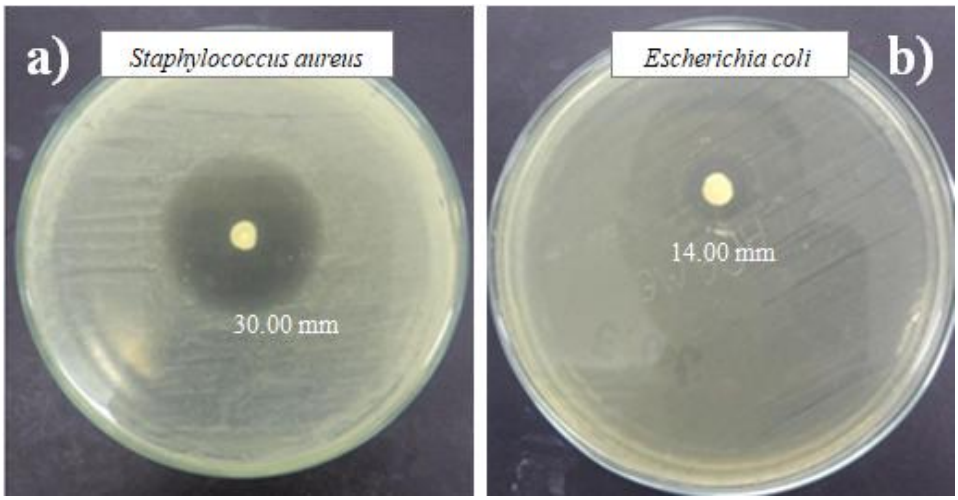
Diante do exposto, confirma-se que HAp:Eu@ZnO apresenta luminescência com transições características das apatitas dopadas com íons Eu^{3+}, no entanto, a maior intensidade notada para a transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ não foi observada para HAp:Eu^{3+} (Figura 30-b) sugerindo a presença das NPs de ZnO influenciando tanto na compensação de cargas pela presença de mais íons O^{2-}, como na perturbação de estados pela assimetria do cristal.

5.4.2 Atividade antibacteriana

A ação antibacteriana do ZnO quando presente na superfície da HAp foi observada nos ensaios discutidos no tópico 5.3 (pag.78), onde a formação de halos de inibição ocorreu para a bactéria gram positiva (*S. aureus*) para amostras HAp@1,0%ZnO e gram negativas (*E. coli*) em torno das amostras HAp@10%ZnO. Com base nestes resultados e na Figura 43, confirma-se a atividade antibacteriana para HAp:Eu@ZnO. Na Figura 43-a é apresentada uma fotografia que demonstra a formação de um halo de inibição (30,00 ± 1,02 mm) em torno de uma pastilha da HAp multifuncional para a bactéria *S. aureus*, este resultado foi esperado, pois no ensaio anterior a bactéria foi inibida com o mínimo de 1,0 % de ZnO na amostra, enquanto para este a concentração de ZnO foi 10 vezes maior. Na Figura 43-b, o halo de inibição foi bem menor (14,00 ± 0,92 mm) para *E. coli*, no entanto, consistente para ocorrência de atividade antiproliferativa das bactérias, estando de acordo com o padrão de testes de

sensibilidade à antimicrobianos por disco difusão (NCCLS/CLSI, 2003). Como já relatado, a maior resistência da bactéria *E. coli* é explicada pela maior complexidade da sua parede celular quando comparada a *S. aureus* (MOREIRA; CARVALHO; FROTA, 2015).

Figura 43- Placas com amostras de HAp:Eu@ZnO após incubação a 35 ºC/24h com: *S. aureus* e b) *E. coli* e medidas dos halos de inibição.



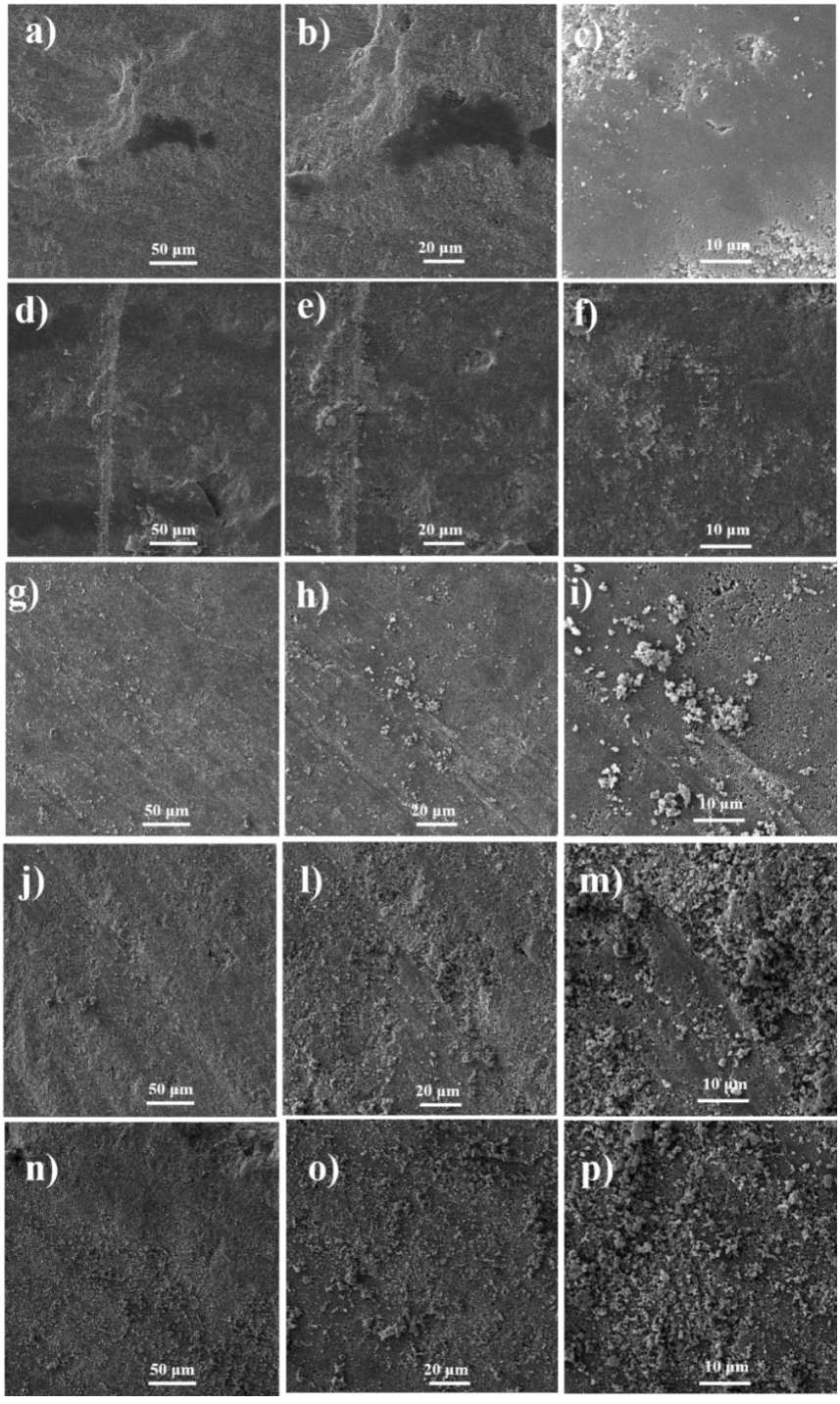
5.4.3 Bioatividade in vitro

A Figura 44 apresenta as micrografias da superfície de pastilhas da HAp multifuncional após diferentes tempos de contato com a solução SBF.

Comparado este resultado com o obtido para as pastilhas de HAp pura em SBF (Figura 25) verifica-se que o material preservou sua propriedade de bioatividade, e deste modo, se pode afirmar que a incorporação de íons Eu^{3+} e o revestimento com NPs de ZnO não afetaram as características da matriz.

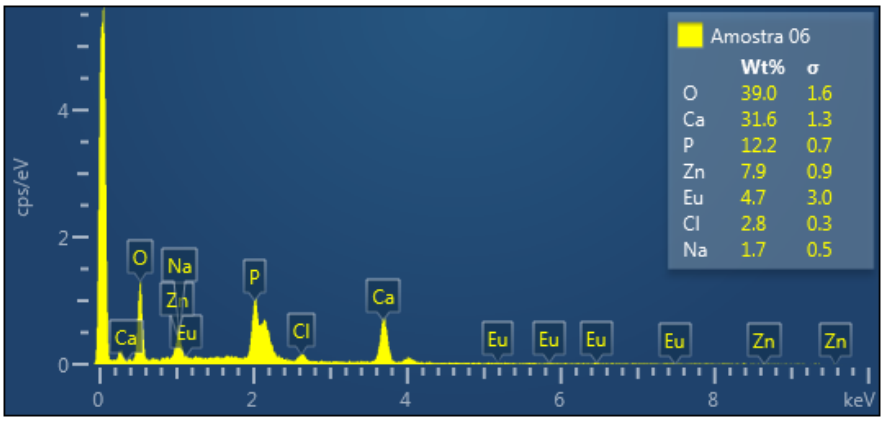
A formação de apatita sobre a superfície de HAp:Eu@ZnO foi mais evidente após 7 dias de contato com o SBF, Figuras 44-g a 44-i, no entanto, a precipitação dos cristais aumentou em função do maior tempo de imersão, como notado na Figura 44-p, semelhantemente ao observado para a matriz. Sabe-se que os íons Zn^{2+} estimulam o crescimento ósseo, e, portanto, quando presente em um material contribui para sua bioatividade (YAMAGUCHI, 1998). Seo *et al*. (2010), realizaram diversos estudos in vitro e comprovaram que o Zn aumenta a proliferação de células ósseas. Assim, a presença do ZnO na superfície de partículas HAp:Eu, além de agregar propriedade antibacteriana, também pode aumentar a sua bioatividade.

Figura 44– a) Micrografias da superfície de pastilhas de HAp:Eu@ZnO após diferentes tempos de imersão em SBF a 37 ºC e pH = 7,4: a) , b) e c) 0 dia; d), e) e f) 3 dias; g), h) e i) 7 dias; j), l) e m) 14 dias; n), o) e p) 21 dias.



Na Figura 45 é apresentado o espectro de EDS para uma das amostras imersas em SBF, onde se observam além dos elementos químicos característicos da HAp multifuncional (Ca, P, O, Zn e Eu), também alguns dos elementos que compõem o SBF, como Cl e Na.

Figura 45– Espectro de EDS para varredura da superfície de HAp:Eu@ZnO após 21 dias de contato com solução SBF.

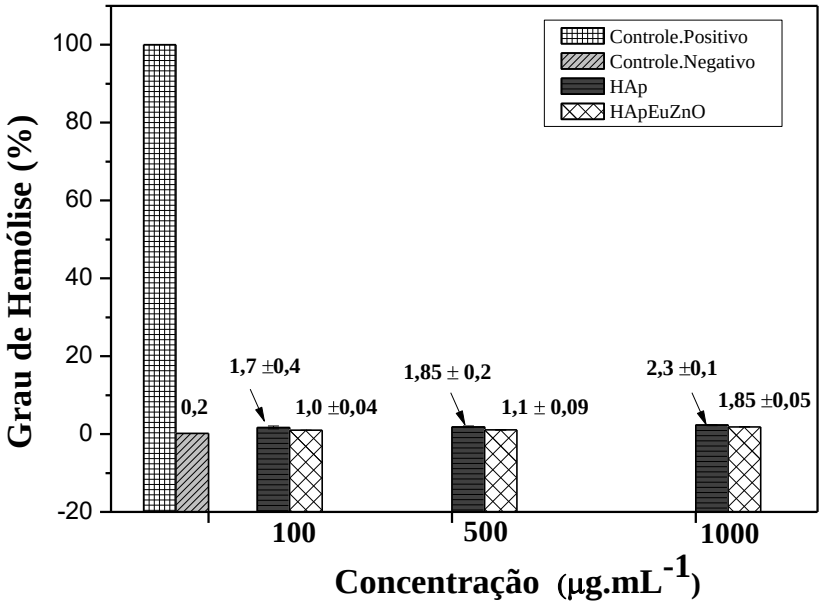


5.4.4 Hemocompatibilidade in vitro

O ensaio de hemólise é extremamente importante para se avaliar a interação de um biomaterial com o sangue, por isso, a HAp multifuncional e HAp pura foram analisadas pelos seus graus de hemólise *in vitro* apresentados na Figura 46. A partir dos resultados obtidos, verifica-se que os valores de hemólise foram crescentes em função da maior concentração das soluções estudadas e variaram de 1,0 a 1,85 % para HAp:Eu@ZnO e 1,7 a 2,3 % para HAp. Deste modo, com base na classificação da ASTM 756 (*American Society for Testing and Materials Designation*) para grau de hemólise: < 2,0 % não hemolítico; 2,0 a 5,0 % levemente hemolítico e > 5,0 % hemolítico (PRIYADARSHINI; ANJANEYULU; VIJAYALAKSHMI, 2017). Portanto, comprova-se que HAp dopada com 5,0 % de Eu^{3+} e 10 % de NPs de ZnO sobre sua superfície trata-se de um material hemocompatível nas concentrações testadas, além disso, os seus valores foram inferiores a HAp pura, indicando que os dopantes não afetaram a compatibilidade do material. O estudo da hemocompatibilidade da HAp pura e dopada com diversos íons pode ser encontrado na literatura. Tank *et al*. (2014) testaram HAp dopada com diferentes concentrações de Zn (2,0; 5,0 e 10,0 %) utilizando sangue humano e obtiveram grau de hemólise inferior a 2,0 %, os autores afirmam que o material é seguro para aplicações *in vivo*. Bandgar *et al*. (2017) estudaram a hemocompatibilidade de HAp e HAp dopada com íons Cr^{3+} e observaram grau de hemólise 1,0 % para HAp pura e 1,8 a 4,6 % para HAp dopada com porcentagens crescentes de cromo. De acordo com os autores, a HAp é altamente segura

quando em contato com o sangue, enquanto o material dopado com cromo apresenta toxicidade crescente em função da sua maior concentração.

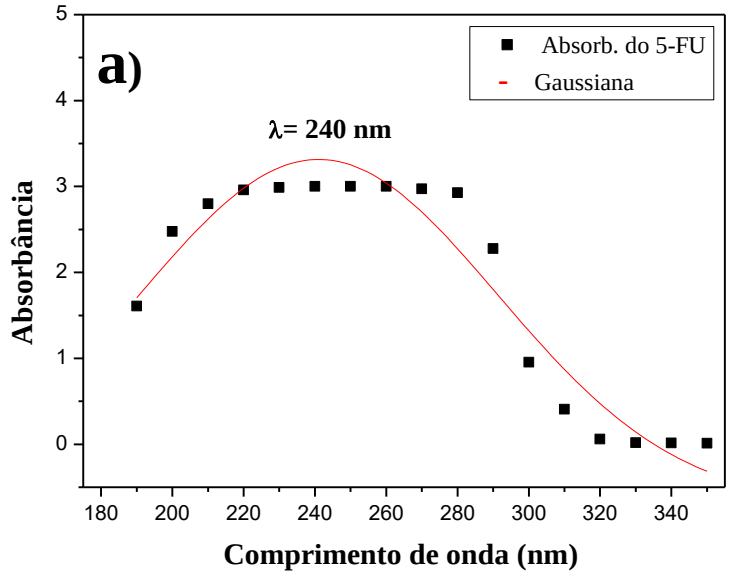
Figura 46– Hemocompatibilidade *in vitro* para HAp e HAp:Eu@ZnO.

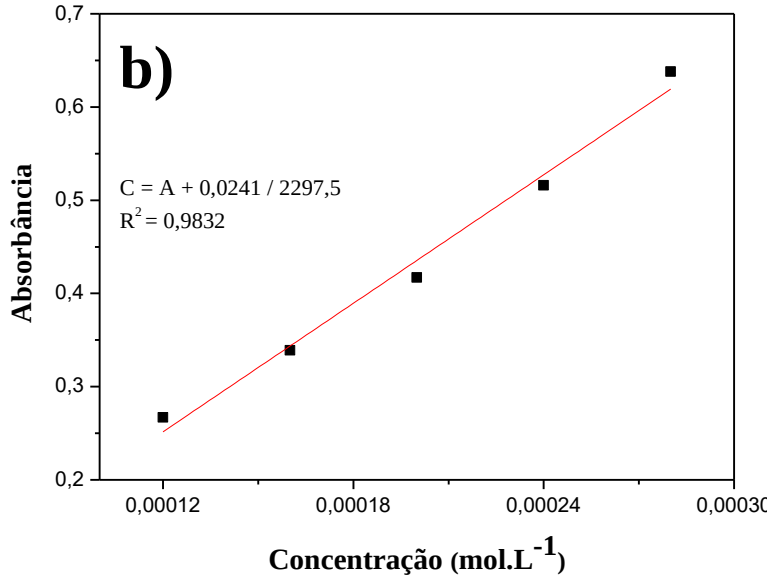


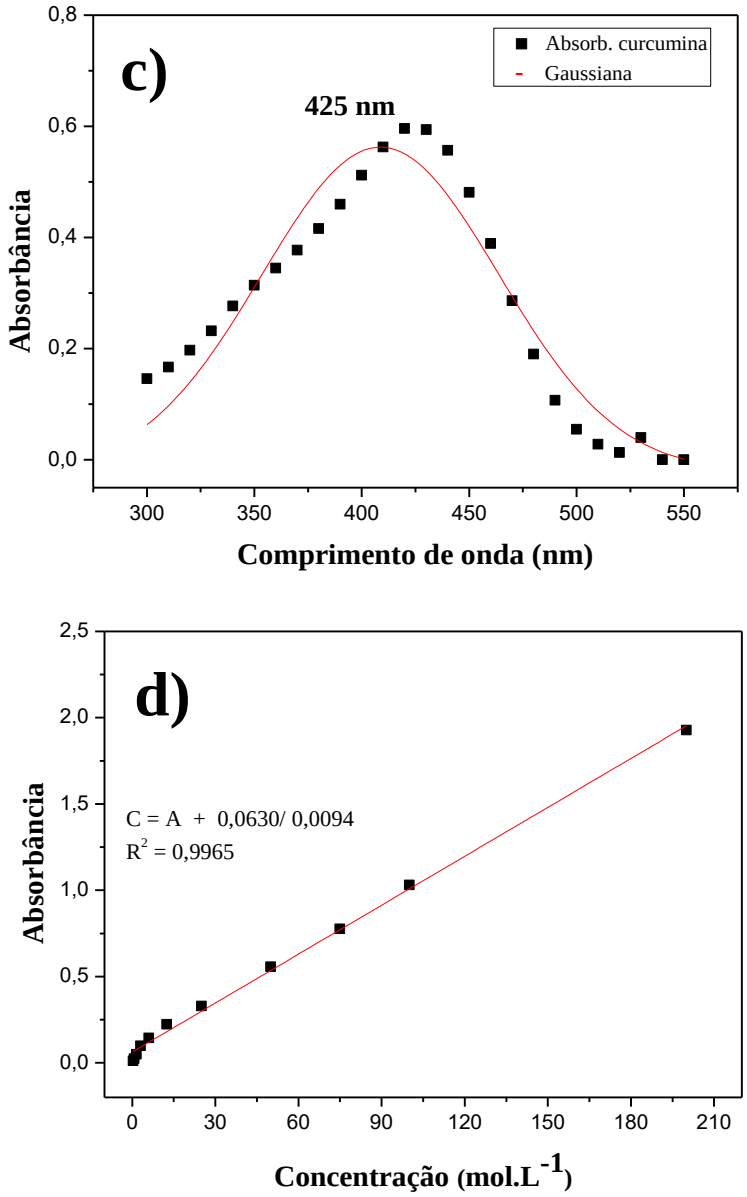
5.4.5 Análise química, estrutural e cinética de liberação dos fármacos adsorvidos em HAp:Eu@ZnO

Após análise estrutural, antibacteriana e avaliação da bioatividade e hemocompatibilidade do material, o potencial da HAp multifuncional como nanocarreador foi estudado a partir da incorporação de dois diferentes fármacos, o 5-FU e a curcumina. Para isso, inicialmente foram obtidos os espectros de absorção para o 5-FU (Figura 47-a) após varredura de 190 a 350 nm, resultando em comprimento de onda máximo ($\lambda_{máx}$) igual a 240 nm e para a curcumina (Figura 47-c) após varredura de 300 a 550 nm, apresentando $\lambda_{máx}$ = 425 nm. Para a quantificação dos fármacos incorporados a HAp:Eu@ZnO e no estudo da liberação destes em solução, curvas de calibração para 5-FU (Figura 47-b) e curcumina (Figura 47-d) foram construídas a partir de diluições das soluções e medidas no $\lambda_{máx}$.

Figura 47– Espectros de absorção com $\lambda_{máx}$: a) 5-FU e c) Curcumina e Curvas de calibração de uma solução: b) 5-FU a 240 nm e d) Curcumina a 425 nm





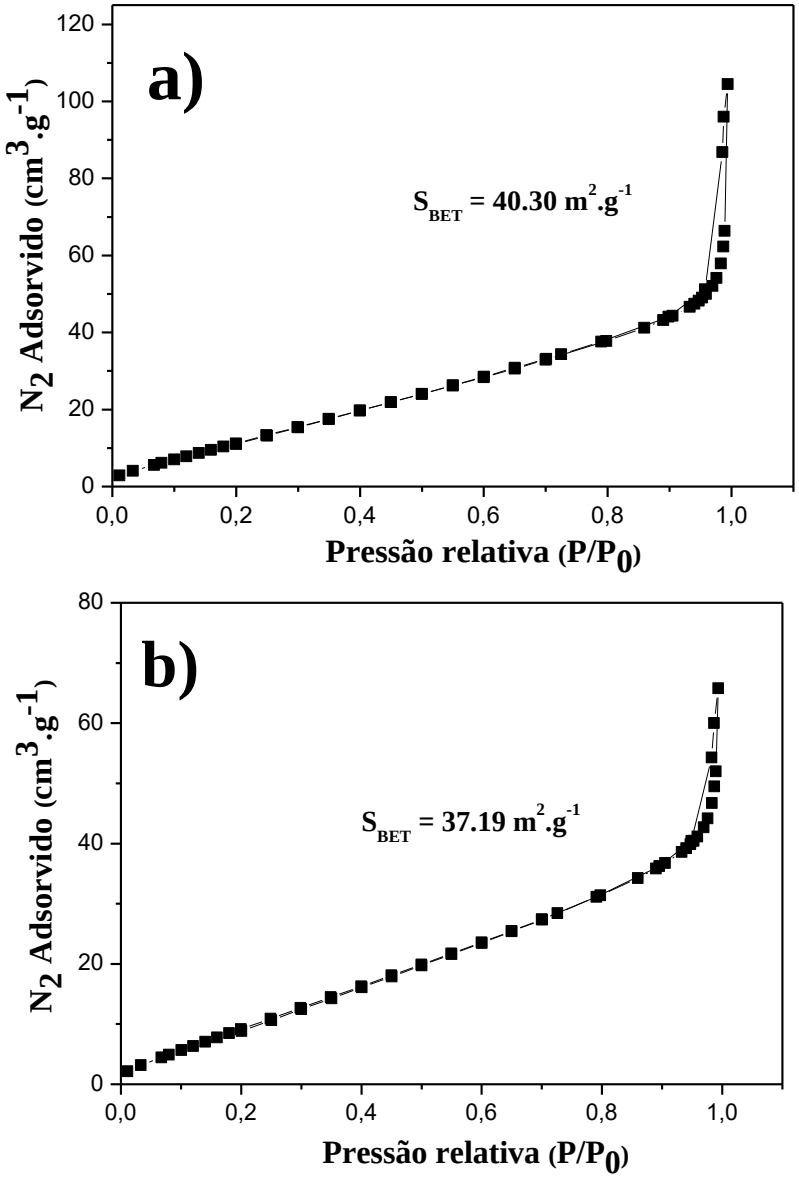


Empregando a equação 8 (pag. 62) e os dados obtidos na Figura 47, as medidas da incorporação dos fármacos ao nanocarreador indicaram que 43,0 ± 3,6% do 5-FU e 84,0 ± 4,0 % da curcumina foram adsorvidos na HAp multifuncional. Estes podem ser considerados bons resultados quando comparados a outros sistemas a base de HAp como, por exemplo, no trabalho de Lin; Li e Ooi, (2012), microesferas formadas por HAp/polímero apresentaram eficiência de encapsulamento de 38.3 % de 5-FU, enquanto na pesquisa de Xidaki *et al*. (2018), apenas 30 % de curcumina foi incorporada a cerâmicas bifásicas de HAp/TCP.

Os resultados obtidos a partir das isotermas de adsorção do sistema contendo os fármacos, 5-FU (Figura 48-a) e curcumina (Figura 48-b) também confirmam a

incorporação destes no material, constatando-se redução de S_{BET} de 58,11 $m^2.g^{-1}$ (HAp:Eu@ZnO, Figura 39) para 40,30 $m^2.g^{-1}$ (HAp:Eu@ZnO/5-FU) e 37,19 $m^2.g^{-1}$ (HAp:Eu@ZnO/curcumina). Observa-se também que uma redução maior para S_{BET} foi verificada para amostra com curcumina, corroborando com a maior quantidade incorporada dessa substância em comparação com o 5-FU.

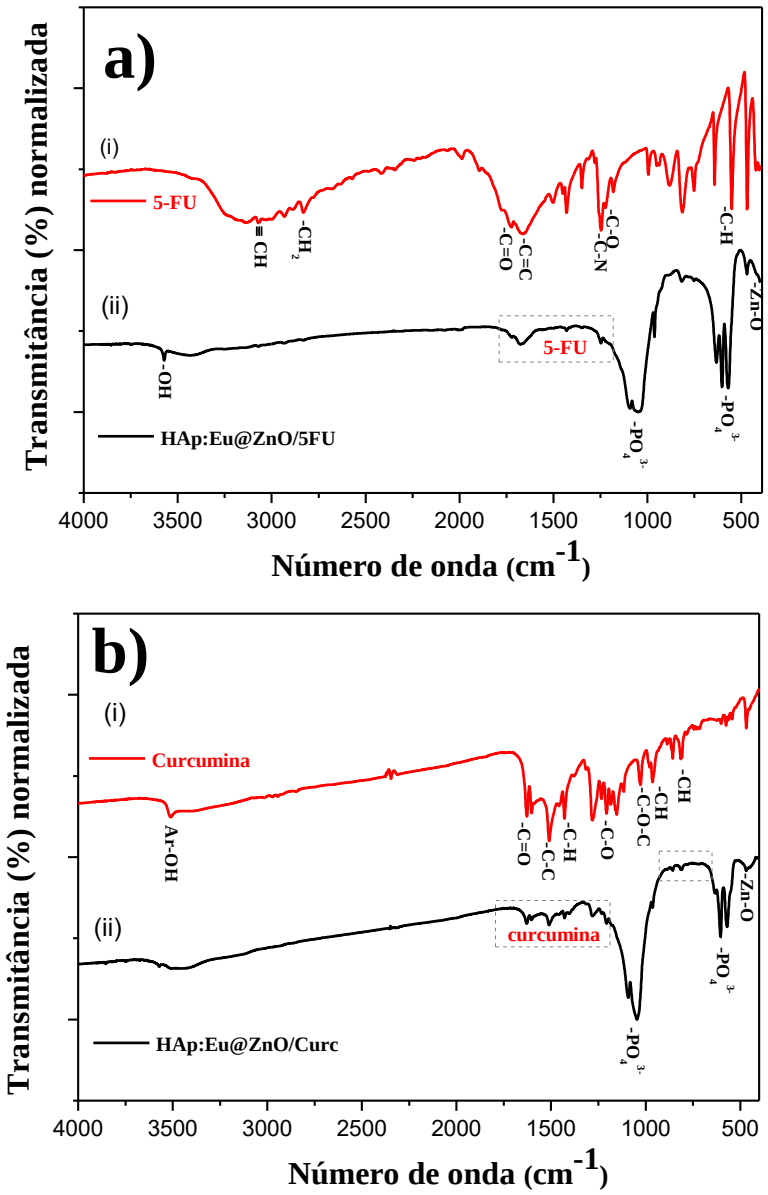
Figura 48– Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio e área de superfície BET: a) HAp:Eu@ZnO/5-FU e b) HAp:Eu@ZnO/curcumina.



Os espectros de FTIR para HAp multifuncional carregada com os fármacos são mostrados na Figura 49. Nestes são observadas as bandas características da HAp e ZnO discutidas no tópico 5.3 (pag. 78), além das absorções atribuídas aos respectivos

fármacos 5-FU (Figura 49-a) e curcumina (Figura 49-b), as quais são correspondentes as bandas apresentadas pelos seus espectros da substância pura.

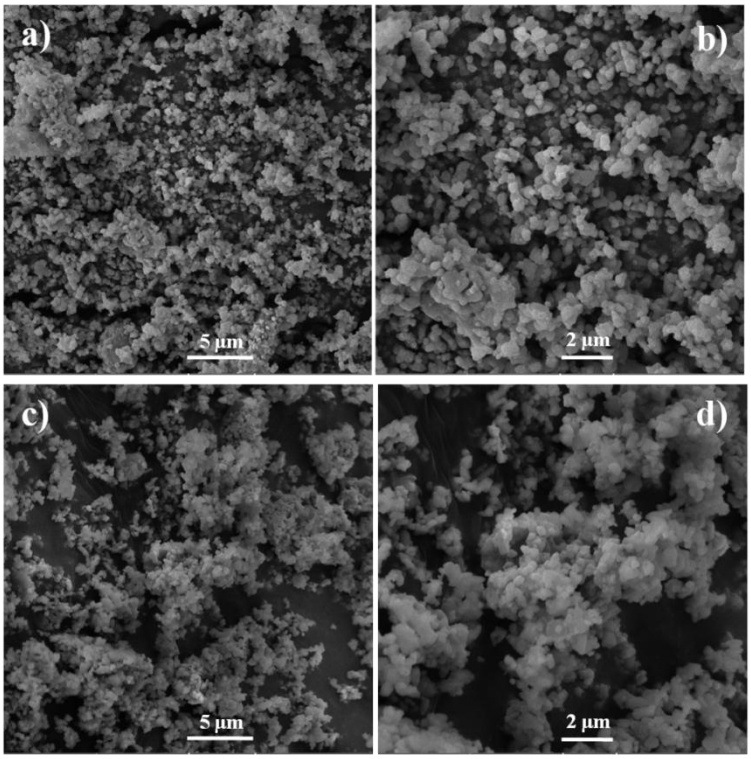
Figura 49– Espectros de FTIR: a) (i) 5-FU, (ii) HAp:Eu@ZnO/5-FU e b) (i) Curcumina, (ii) HAp:Eu@ZnO/curcumina.



A morfologia da HAp:Eu@ZnO carregada com os fármacos também foi avaliada, como visto na Figura 48. De acordo com as micrografias obtidas, nenhuma alteração morfológica foi detectada nas amostras HAp:Eu@ZnO/5-FU (Figuras 48-a e 48-b) e HAp:Eu@ZnO/curcumina (Figuras 48-c e 48-d). No entanto, uma maior dispersão das partículas parece ter ocorrido após incorporação dos fármacos, podendo-se atribuir tal efeito ao longo período de agitação do pó da HAp multifuncional nas respectivas

soluções dos fármacos estudados durante a etapa experimental do carregamento destes. Além disso, com base nas imagens, é possível concluir que o início do processo de sinterização discutido no tópico 5.4.1 (Figura 40) deve ter ocorrido apenas em regiões superficiais de alguns aglomerados do material, dado que após agitação deste em solução, as partículas se apresentam dispersas e não se verifica processo de difusão.

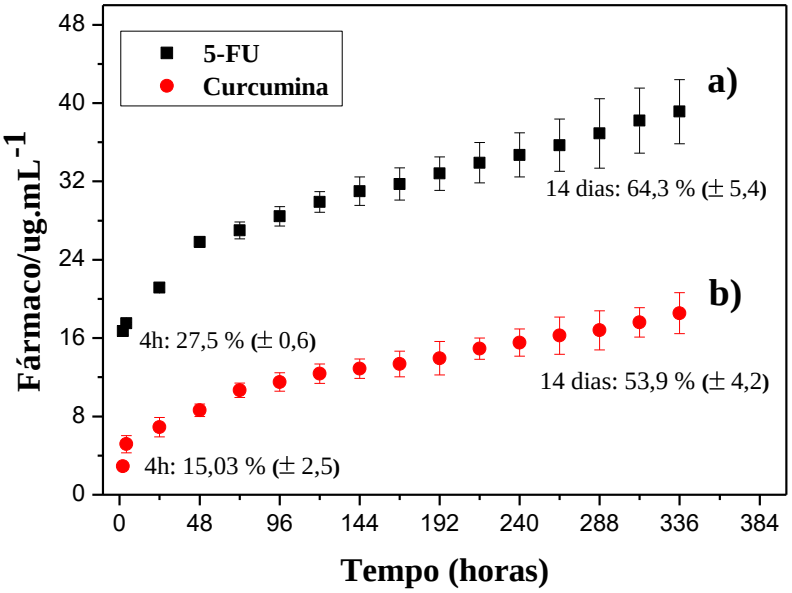
Figura 50– Micrografias da HAp multifuncional carregada com fármacos: a) e b) HAp:Eu@ZnO/5-FU; c) e d) HAp:Eu@ZnO/curcumina.



A cinética de liberação dos fármacos foi estudada colocando-se amostras de HAp:Eu@ZnO/5-FU e HAp:Eu@ZnO/curcumina em tampão PBS (pH 7,4 a 37 ºC) sob agitação e coletando alíquotas da solução em diferentes períodos de tempo. Na Figura 51 são apresentados os perfis de liberação, onde se observa para ambos os casos, que as substâncias foram rapidamente liberadas no meio nas primeiras 4,0 h: 27,5 ± 0,6 % para 5-FU e 15,03 ± 2,5 % para a curcumina. Posteriormente, a dessorção dos fármacos se tornou mais lenta, com liberação cumulativa de 64,3 ± 5,4 % do 5-FU e 53,9 ± 4,2 % da curcumina, após 14 dias de medidas. De acordo com Xidaki *et al*. (2018), aproximadamente 50 % da curcumina incorporada ao suporte HAp/TCP foi liberada em PBS após 48 h. Por outro lado, microesferas de HAp/polímero mostraram uma rápida liberação do 5-FU em PBS nas primeiras 4 h e posteriormente, prolongou-se por 35

dias, dados observados na pesquisa de Lin; Li e Ooi, (2012). Neste trabalho, com base nos dados de incorporação e liberação, verifica-se que a curcumina possui tempo de dessorção inferior ao do 5-FU, ocorrência que pode ser atribuída a sua característica hidrofóbica que dificulta sua solubilização no meio aquoso (LEE; LOO; ROHANIZADEH, 2019).

Figura 51–Liberação dos fármacos adsorvidos ao biomaterial multifuncional em PBS: a) HAp:Eu@ZnO/5-FU e b) HAp:Eu@ZnO/curcumina.

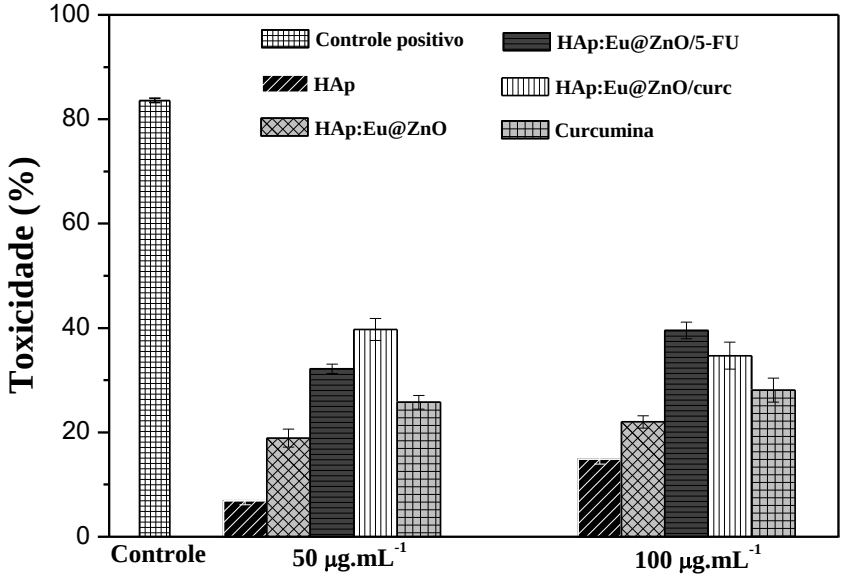


5.4.6 Toxicidade e eficiência como suporte para fármacos antineoplásicos frente à células do sarcoma 180

No ensaio *in vitro* com células (S-180), inicialmente avaliou-se o efeito citotóxico da HAp multifuncional comparando-a com a HAp pura. Na Figura 52 estão apresentados os valores referentes à toxicidade das amostras (HAp pura e HAp multifuncional) para duas concentrações distintas, após período de incubação de 24 h. De modo geral, as concentrações testadas mostraram resultados muito próximos, indicando apenas um pequeno aumento da morte celular em função da maior concentração. Para HAp pura a toxicidade foi de 6,89-14,86 %, isto é, obteve-se viabilidade celular maior que 85,0 %, enquanto para HAp:Eu@ZnO, a morte celular variou de 18,95-22,00 %, e portanto, apresentou até 78,0 % de células viáveis para a maior concentração testada. Comparando os resultados, observa-se um pequeno aumento da toxicidade da HAp após incorporação dos dopantes, no entanto, o material

mantém-se na classificação de não citotóxico, pois de acordo com a norma ISO 10993-5:2009(E) (STANDARD, 2009), apenas substâncias com valores de toxicidade maiores que 30 % são consideradas citotóxicas, neste caso, os materiais podem ser classificados como não tóxicos nas concentrações avaliadas. Os dados obtidos estão de acordo com diversos estudos relatados na literatura, como por exemplo, Liu e Sun, (2014) estudaram a toxicidade de NPs de HAp utilizando o ensaio MTS e observaram viabilidade celular maior que 80,0 % para concentração 100 $\mu g.mL^{-1}$ e próximo de 60,0 % para 400 $\mu g.mL^{-1}$, indicando aumento da toxicidade em função da maior quantidade de NPs. Iafisco *et al*. (2013) também realizaram ensaio *in vitro* e obtiveram valor próximo a 80,0 % de células viáveis para concentração 90 $\mu g.mL^{-1}$ de HAp. No caso de HAp dopada, Al-Kattan *et al*. (2012) testaram a toxicidade de NPs coloidais de HAp dopada com 2,0 % de íons Eu^{3+} e verificaram viabilidade celular maior que 80,0 % para concentrações de até 1000 $\mu g.mL^{-1}$.

Figura 52– Toxicidade da HAp pura e HAp multifuncional, incubadas por 24 h com células do sarcoma 180 de camundongos. Citotoxicidade para concentrações similares de 5-FU (Controle positivo) e Curcumina livre em solução, além de HAp:Eu@ZnO carregada com os respectivos fármacos, analisadas nas mesmas condições a partir de ensaio MTS.



O teste empregando células tumorais também avaliou o potencial da HAp:Eu@ZnO como nanocarreador quando carregado separadamente com os antineoplásicos 5-FU e curcumina, e então, os resultados foram comparados aos respectivos fármacos em sua forma livre em solução nas mesmas concentrações. Na

Figura 52 pode-se observar que o 5-FU quando incorporado a HAp:Eu@ZnO reduziu a sobrevivência das células neoplásicas apresentando 32,0-39,0 % de morte celular. Este valor é inferior quando comparado ao 5-FU livre (controle positivo), que causou 84,0% de apoptose, e, portanto, apresentou maior ação citotóxica. O fato observado pode ser explicado com base no maior tempo para internalização da HAp multifuncional nas células, efeito que ocorre por endocitose (SHI *et al*., 2017) e também, porque o 5-FU quando incorporado ao suporte de HAp apresentou liberação lenta após as primeiras 4 h, como discutido no estudo da liberação mostrado na Figura 51. Deste modo, a dose de 5-FU após 24 h de ensaio *in vitro* foi menor que a concentração do fármaco livre, justificando o resultado obtido.

A menor taxa de morte das células tumorais empregando o nanocarreador no período avaliado pode ser compensada pelo prolongamento do tempo de circulação do fármaco, resultando em uma maior biodisponibilidade deste no organismo (MAZZOR *et al*., 2012; IAFISCO *et al*., 2013). Isto é importante porque o 5-FU, assim como outros fármacos antineoplásicos são empregados na terapia de diversos tipos de cânceres e sua administração convencional (intravenosa) é responsável por efeitos tóxicos graves devido a sua rápida metabolização, que resulta em baixos níveis do fármaco, e consequentemente, apenas uma pequena quantidade atinge o local de interesse, levando a utilização de repetidas doses do medicamento (OLUKMAN; SANLI; SOLAK, 2012; TSENG *et al*., 2015).

A liberação mais lenta do 5-FU proporcionada por HAp:Eu@ZnO, pode reduzir a toxicidade do 5-FU para células sadias e melhorar a especificidade deste para as células doentes, pois no estudo realizado por Han *et al*. (2014), foi verificado a partir de experimentos *in vitro* e *in vivo* que NPs de HAp apresentaram maior especificidade para internalização em células cancerígenas. Neste caso, as NPs foram capazes de inibir 65 % de células neoplásicas e menos de 30 % de células sadias.

O maior direcionamento das NPs de HAp para células tumorais deve-se ao maior número de grupos com carga negativa presentes em sua superfície, quando comparada as células sadias (SHI, 2017; HAN *et al*., 2014). Deste modo, interações eletrostáticas entre os sítios de ligação positivos na superfície da HAp com a carga negativa na membrana celular resultam neste fenômeno de especificidade (HAN *et al*., 2014).

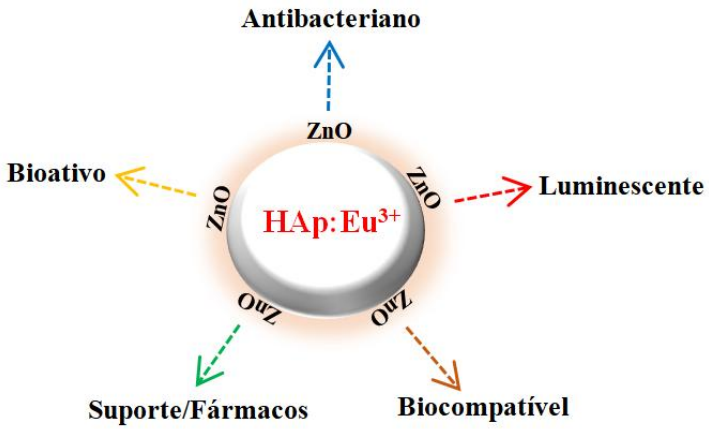
Diferentemente do que se observou para o 5-FU, o resultado referente ao efeito antineoplásico da curcumina frente a células S-180 indicou maior eficiência do fármaco quando incorporado a HAp multifuncional. Neste contexto, a morte de células tumorais

foi de 34,7-39,7 %, enquanto para a curcumina livre em solução variou de 25,7-28,1 %, dados mostrados na Figura 52. A curcumina possui alta hidrofobicidade, e, portanto, baixa solubilidade em meio aquoso, além disso, pode ser rapidamente eliminada pelo corpo, resultando em uma biodisponibilidade reduzida (ANAND *et al*., 2007). Assim sendo, verifica-se que a incorporação da curcumina em HAp:Eu@ZnO possibilitou maior internalização do fármaco nas células tumorais, quando comparado a curcumina livre. Sua ação de liberação prolongada pelo nanocarreador pode melhorar a biodisponibilidade e absorção do fármaco, como também verificado para o 5-FU. De acordo com estudos de Calmon *et al*. (2018), testes *in vitro* empregando até 7000 $\mu g.mL^{-1}$ de curcumina na forma livre não geraram efeito tóxico sobre células cancerígenas e obtiveram morte celular menor que 20 %, por outro lado, a utilização de um sistema de nanoemulsão gerou alta internalização da curcumina nas células, apresentando 95 % de eficiência na apoptose celular quando combinado a terapia fotodinâmica. Portanto, fica claro que a utilização de suportes carreadores para antineoplásicos pode representar grande eficiência na terapia do câncer.

5.4.7 Esquema representativo de HAp:Eu@ZnO

Após análise das caracterizações química e estrutural, avaliação da bioatividade, atividade antibacteriana, estudo da incorporação e liberação de fármacos, bem como, realização de ensaios biológicos *in vitro*, propõe-se que o material desenvolvido neste trabalho pode ser representado pela Figura 53.

Figura 53– Partícula de HAp multifuncional: HAp:Eu@ZnO.



5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que um sistema multifuncional com características de biocompatibilidade e potencial para utilização na teranóstica foi sintetizado com sucesso neste trabalho. Além disso, verificou-se que 5,0 % de íons Eu^{3+} produziram luminescência sem alterações nas propriedades estruturais da matriz de HAp. A atividade antibacteriana indicou efeito mais contundente quando partículas de HAp:Eu^{3+} foram revestidas com 10,0 % de nanopartículas de óxido de zinco. A bioatividade do material foi comprovada a partir de ensaios com solução simuladora dos fluidos corporais (SBF) que demonstraram a formação de apatita sobre sua superfície para diferentes tempos de estudo a 37 ºC e pH = 7,4. Testes de hemólise utilizando hemácias de camundongo demonstraram que HAp:Eu@ZnO pode ser classificado como hemocompatível, apresentando grau de hemólise < 2,0 %, e portanto, não possui toxicidade para células sanguíneas. Ensaios de toxicidade utilizando células S-180 indicaram 81,05 e 78,0 % de viabilidade celular, respectivamente para as concentrações 50 e 100 $\mu g.mL^{-1}$, qualificando o material como não citotóxico.

A incorporação de dois antineoplásicos modelos ao nanocarreador mostrou a capacidade de utilização deste como suporte, onde 43,0 ± 3,6 % do 5-FU e 84,0 ± 4,0 % da curcumina foram adsorvidos na HAp multifuncional, além disso, o estudo da liberação dos fármacos em meio simulado mostrou rápida liberação inicial, seguida de liberação lenta e gradual por até 14 dias de análise.

A partir de ensaios *in vitro* utilizando células cancerígenas foi observado o potencial de aplicação de HAp:Eu@ZnO na vetorização de antineoplásicos. Para o 5-FU, uma menor internalização celular foi observada e após 24 h de ensaio obteve-se 61,0 % de células viáveis, diferentemente do 5-FU livre em solução que apresentou 16,0 % de viabilidade celular. Em contrapartida, a maior especificidade da HAp para células tumorais e o prolongamento na liberação do fármaco pode resultar em maior biodisponibilidade e direcionamento. A curcumina apresentou maior potencial para a morte de células neoplásicas quando incorporada a HAp:Eu@ZnO, visto que o mesmo facilita sua internalização celular, dificultada por características hidrofóbicas quando livre em solução, neste caso, a viabilidade celular foi 60,30 % para a curcumina utilizada em conjunto com o suporte de HAp e 71,9 % para a curcumina livre em solução, indicando assim, uma maior eficiência na morte das células tumorais.

6 PERSPECTIVAS

» Avaliar o comportamento da HAp multifuncional *in vivo* introduzindo-a em animais por meio intravenoso e também como enxerto ósseo;

» Testar a HAp com outras concentrações de ZnO e avaliar seu efeito para diferentes bactérias;

» Estudar a resistência mecânica do material a partir da confecção de blocos em 3D;

» Avaliar a degradação do suporte (HAp multifuncional) em meio fisiológico e para diferentes pHs;

» Estudar a incorporação do ácido fólico na HAp multifuncional e avaliar sua ação como vetorizador específico para células tumorais.

» Realizar estudos sistemáticos *in vivo* empregando HAp multifuncional como nanocarreador de fármaco antineoplásico para células tumorais;

» Testar novas metodologias de incorporação de fármacos à HAp, objetivando seu maior carregamento na matriz;

» Desenvolver rotas de síntese para produção de HAp multifuncional na forma de esferas ocas, agulhas e nanotubos e posteriormente, avaliar o seu desempenho como suportes para fármacos;

REFERÊNCIAS

AABME. Tecnologias inovadoras ajudam na detecção precoce do câncer. Disponível em: <https://aabme.asme.org/posts/breakthroughs-in-imaging-and-biomarker-technology-to-aid-in-early-detection-of-cancer>. Acesso em Dezembro de 2019.

ACCESS, O. We are IntechOpen , the world's leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. **Long-Haul Travel Motivation by International Tourist to Penang**, v. i, n. tourism, p. 13, 2018.

AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Res**, v. 23, n 1A, p. 363-398, 2003.

AGHAEI, H.; NOURBAKHSH, A. A.; KARBASI, S.; JAVADKALBASI, R.; RAFIENIA, M.; NOURBAKHSH, N.; BONAKDAR, S.; MACKENZIE, K. J. D. Investigation on bioactivity and cytotoxicity of mesoporous nano-composite MCM-48/hydroxyapatite for ibuprofen drug delivery. **Ceramics International**, v. 40, n. 5, p. 7355–7362, 2014.

AL-KATTAN, A. SOPHIE, G.; CEDRIC, C.; HELENE, T.; PASCAL, D.; JEANNETTE, D.; VERONIQUE, S.;JULIE, B.; BERNARD, P.; JOSE, B.; CHRISTOPHE, D. Biomimetic nanocrystalline apatites: Emerging perspectives in cancer diagnosis and treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 1, p. 26–36, 2012.

ALLEGRA, A.; INNAO, V.; RUSSO, S.; GERACE, D.; ALONCI, A.; MUSOLINO, C. Anticancer Activity of Curcumin and Its Analogues: Preclinical and Clinical Studies. **Cancer Investigation**, v. 35, n. 1, p. 1–22, 2017.

ALVAREZ, K.; FUKUDA, M.; YAMAMOTO, O. Titanium implants after alkali heating treatment with a [Zn(OH)4]2- complex: analysis of interfacial bond strength using push-out tests. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 12, n. SUPPL. 1, p. 114–125, 2010.

AMBROSIO, L.; PELUSO, G.; PROGETTAZIONE, J. N. Caratterizzazione chimico-fisica e biologica dei Biomateriali. In: VII Congresso Nazionale di Chirurgia Maxillo-facciale, Monduzzi editore, v. 3, p. 951-957, 1991.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B.; Bioavailability of curcumin: Problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 2007.

ANDRONESCU, E.; FICAI, M.; VOICU, G.; FICAI, D.; MAGANU, M.; FICAI, A. Synthesis and characterization of collagen/hydroxyapatite: Magnetite composite material for bone cancer treatment. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 7, p. 2237–2242, 2010.

AZEVEDO, A. G. DE S.; STRECKER, K.; GORGULHO, H. F. Efeito da temperatura em processos de sinterização de pós de hidroxiapatita. **Cerâmica**, v. 61, n. 357, p. 52–59, 2015.

BANDGAR, S. S.; YADAV, H. M.; SHIRGUPPIKAR, S. S.; SHINDE, M. A.; SHEJAWAL, R. V.; KOLEKAR, T. V.; BAMANE, S. R. Enhanced hemolytic biocompatibility of hydroxyapatite by chromium (Cr3+) doping in hydroxyapatite nanoparticles synthesized by solution combustion method. **Journal of the Korean Ceramic Society**, v. 54, n. 2, p. 158–166, 2017.

BECHERI, A.; DURR, M.; NOSTRO, P. L.; BAGLIONE, P. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: Application to textiles as UV-absorbers. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 4, p. 679–689, 2008.

BELIZÁRIO, J. E. Oncologia. **Ciência Hoje**, v.31, n. 184, 2002.

BELLUCCI, D.; SOLA, A.; GAZZARRI, M.; CHIELLINI, F.; CANNILLO, V. A new hydroxyapatite-based biocomposite for bone replacement. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1091–1101, 2013.

BILALIS, P.; TZIVELEKA, L. A.; VARLAS, S.; IATROU, H. pH-Sensitive Nanogates Based on Poly (L-Histidine) for Controlled. **Polymer Chemistry**, n.7, 2016.

BINNEMANS, K. Interpretation of europium(III) spectra. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 295, p. 1–45, 2015.

BLASSE, G. Distortions in the Sr2TiO4 and Sr3Ti2O7 structures and their spectroscopic detection. **Chemical Physics Letters**, v. 33, n. 3, p. 616–618, 1975.

BUIJS, J. T.; PLUIJM, G. V. D. Osteotropic cancers: From primary tumor to bone. **Cancer Letters**, v. 273, p. 177–193, 2009.

BUNZLI, J.-C. Benefiting from the Unique Properties of Lanthanide Ions. **Accounts of Chemical Research**, v. 39, n. 1, p. 53–61, 2006.

BUNZLI, J.-C. G.; ELISEEVA, S. V. Basics of Lanthanide Photophysics. In: **Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects**. Springer Ser Fluoresc, p. 1–46. 2011.

CALMON, M.; DE MATOS, R. P. A.; AMANTINO, C. F.; VILLA, L. L.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; RAHAL, P. Effect of curcumin-nanoemulsion associated with photodynamic therapy in HPV-16 E6 positive vulvar carcinoma cell lines. **Clinical Cancer Research**, v. 2018, p. 55–55, 2018.

CAMARGO, A. S. S. DE; SIMONETI, J. A.; DAVOLOS, M. R. Investigação de Er^{3+} nos dois sítios cristalográficos de Gd_2SiO_5 através da fotoluminescência resolvida no tempo. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 3–9, 2000.

CAZALBOU, S.; EICHERT, D.; RANZ, X.; DROUET, C.; COMBES, C.; HARMAND, M. F.; REY, C. Ion exchanges in apatites. Effects on composition and properties. **J Mater Sci Mater Med**, v. 16, p. 405–409, 2005.

CHEN, F.; HUANG, P.; ZHUA, YING-JIE; WUA, J.; ZHANG,CHUN-LEI; CUI, DA-XIANG. The photoluminescence, drug delivery and imaging properties of multifunctional Eu^{3+}/Gd^{3+} dual-doped hydroxyapatite nanorods. **Biomaterials**, v. 32, n. 34, p. 9031–9039, 2011.

CHEN, M. H.; YOSHIOKA, T.; IKOMA, T.; HANAGATA, N.; LIN, F. H.; TANAKA, J. Photoluminescence and doping mechanism of theranostic Eu3+/Fe3+ dual-doped hydroxyapatite nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 15, n. 5, 2014.

CHOI, J. YANG, J.; BANG, D.; PARK, J.; SUH, J.; HUH, Y.; HAAM, S. Targetable gold nanorods for epithelial cancer therapy guided by near-IR absorption imaging. **Small**, v. 8, n. 5, p. 746–753, 2012.

CIOBANU, C. S.; ICONARU, S. L.; MASSUYEAU, F.; CONTANTIN, L. V.; COSTESCU, A.; PREDOI, D. Synthesis, Structure, and Luminescent Properties of Europium-Doped Hydroxyapatite Nanocrystalline Powders. Journal of Nanomaterials, p. 1-9, 2012.

CIOBANU, C. S.; POPA, C. L.; PREDOI, D. Cerium-doped hydroxyapatite nanoparticles synthesized by the co-precipitation method. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 81, n. 4, p. 433–446, 2016.

COTTON, S. **Lanthanide and Actinide Chemistry**. John Wiley & Sons, 2006. ISBN 9780470010082.

DAN SON, K.; KIM, Y. J. Anticancer activity of drug-loaded calcium phosphate nanocomposites against human osteosarcoma. **Biomaterials Research**, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2017.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

EL OUENZERFI, R.; ARIGUIB, N. K.; AYED, M. T.; PIRIOU, B. Spectroscopic study of Eu3+ in strontium hydroxyapatite Sr10(PO4)6(OH)2. **Journal of Luminescence**, v. 85, n. 1–3, p. 71–77, 1999.

ELLIOTT, J. C.; WILSON, R. M.; DOWKER, S. E. P. Apatite structures. **Advances in X-ray Analysis**, v. 45, n. c, p. 172–181, 2002.

ESPITIA, P. J. P.; OTONI, C. G.; SOARES, N. F. F. Zinc Oxide Nanoparticles for Food Packaging Applications. In: **Antimicrobial Food Packaging**. Elsevier Inc., 2016. p. 425–431.

FAIG-MARTÍ, J.; GIL-MUR, F. J. Hydroxyapatite coatings in prosthetic joints. **Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (English Edition)**, v. 52, n. 2, p. 113–120, 2008.

FAN, Z.; FU, P. P.; YU, H.; RAY, P. C. Theranostic nanomedicine for cancer detection and treatment. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 3–17, 2014.

FERNANDES, A. J. D.; CORREIA, L. J. H. Fosfatos de cálcio mesoporosos para liberação controlada de fármacos. **Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, v. 1, n. 28, p. 78, 2015.

FNEICH, H.; GAUMER, N.; CHAUSSEDENT, S.; BLANC, W.; MEHDI, A. Europium-Doped Sol-Gel SiO_2-Based Glasses: Effect of the Europium Source and Content, Magnesium Addition and Thermal Treatment on Their Photoluminescence Properties. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 7, p. 1–14, 2018.

GEULI, O.; METOKI, N.; ZADA, T.; RECHES, M.; ELIAZ, N.; MANDLER, D. Synthesis, Coating and Drug-Release of Hydroxyapatite Nanoparticles Loaded with Antibiotics. **Journal of Materials Chemistry B**, p. 1–27, 2017.

GILMAN, A. G. As bases farmacológicas da terapêutica. McGraw-Hill, 2005. ISBN 85-86804-82-2.

GRAEVE, O. A.; KANAKALA, R.; MADADI, A.; WILLIAMS, B. C.; GLASS, K. C. Luminescence variations in hydroxyapatites doped with Eu2+ and Eu3+ ions. **Biomaterials**, v. 31, n. 15, p. 4259–4267, 2010.

GRAHAM, N. B. Polymeric inserts and implants for the controlled release of drugs. **The British Polymer Journal**, v. 10, p. 260–266, 1978.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. da S.; PUPO, M. T. Antibioticos: Importância terapeutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Quim. Nova, v. 33, n.3, p. 667-679, 2010.

GUPTA, S. K.; NIGAM, S.; YADAV, A. K.; MOHOPATRA, M.; JHA, S. N.; MAJUMDER, C.; BHATTACHARYYA, D. An insight into local environment of lanthanide ions in Sr_2SiO_4:Ln (Ln = Sm, Eu and Dy). **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 6531–6539, 2015.

GUSATTI, M.; BARROSO, G. S.; CAMPOS, C. E. M.; SOUZA, D. A. R.; ROSÁRIO, J. A.; LIMA, R. B.; SILVA, L. A.; RIELLA, H. G.; KUHNEN, N. C. Effect of different precursors in the chemical synthesis of ZnO nanocrystals. **Materials Research**, v. 14, n. 2, p. 264–267, 2011.

HADJIPANAYIS, C.; MACHAIDZE, R.; KALUZOV, M.; WANG, L.; SCUETTE, J.; CHEN, H.; WU, X.; MAO, H. EGFRvIII antibody-conjugated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery and targeted therapy of glioblastoma. **Cancer Research**, v. 70, n. 15, p. 6303–6312, 2010.

HAN, Y. LI, S.; CAO, S.; YUAN, L.; WANG, Y.; YIN, Y.; QIU, T.; DAI, H.; WANG, X. Different inhibitory effect and mechanism of hydroxyapatite nanoparticles on normal cells and cancer cells in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–8, 2014.

HAN, Y.; WANG, S.; DAI, H.; LI, S. Synthesis and luminescence of Eu3+ doped hydroxyapatite nanocrystallines: Effects of calcinations and Eu3+ content. **Journal of Luminescence**, v. 135, p. 281–287, 2013.

HAN, Y.; WANG, X.; DAI, H.; LI, S. Nanosize and surface charge effects of hydroxyapatite nanoparticles on red blood cell suspensions. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 4, n. 9, p. 4616–4622, 2012.

HEFFERN, M. C.; MATOSZIUK, L. M.; MEADE, T. J. Lanthanide Probes for Bioresponsive Imaging. **Chem Rev.**, v. 114, n. 8, p. 4496–4539, 2014.

HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. **Science,** v**.** 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2009.

HEJMADI, M. Introduction to cancer biology. Bookboon.com, 2ª ed. 2010. ISBN 978-87-7681-478-6.

HEMEG, H. A. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 8211–8225, 2017.

HENCH, L. L. Feature 1705. **Stress The International Journal on the Biology of Stress**, v. 28, p. 1705–1728, 1998.

HENCH, L. L.; WILSON, J. An Introduction to Bioceramics. **World Scientific**, Singapore, p. 1-24, 1993.

HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 2017.

HIRABAYASHI, H.; FUJISAKI, J. Bone-Specific Drug Delivery Systems Approaches via Chemical Modification of Bone-Seeking Agents. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 15, p. 1319–1330, 2003.

HUANG, N.; CHENG, S.; ZHANG, X.; TIAN, Q.; PI, J.; TANG, J.; HUANG, Q.; WANG, F.; CHEN, J.; XIE, Z.; XU, Z.; CHEN, W.; ZHENG, H.; CHENG, Y. Efficacy of NGR peptide-modified PEGylated quantum dots for crossing the blood–brain barrier and targeted fluorescence imaging of glioma and tumor vasculature. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 83–93, 2017.

HUANG, X.; EL-SAYED, I. H.; QIAN, W.; EL-SAYED, M. A. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 128, n. 6, p. 2115–2120, 2006.

HUGHES, J. M; RAKOVAN, J. The Crystal Structure of Apatite, $Ca_5(PO_4)_3(F,OH,Cl)$. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, v. 48, n.1, p.1-12, 2002.

HUH, A. J.; KWON, Y. J. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, v. 156, n. 2, p. 128–145, 2011.

IAFISCO, M.; LOPEZ, J. M. M.; VARONI, E. M.; TAMPIERI, A.; RIMONDINI, L.; MORALES, J. G.; PRAT, M. Cell surface receptor targeted biomimetic apatite nanocrystals for cancer therapy. **Small**, v. 9, n. 22, p. 3834–3844, 2013.

IAFISCO, M.; PALAZZO, B.; MARCHETTI, M.; MARGIOTTA, N.; OSTUNI, R.; NATILE, G.; MORPURGO, M.; GANDIN, V.; MARZANO, C.; ROVERI, N. Smart delivery of antitumoral platinum complexes from biomimetic hydroxyapatite nanocrystals. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 44, p. 8385–8392, 2009.

ICECURE. Sistema Prosense: Next generation cryoablation technology. Disponível em < https://icecure-medical.com/prosense-system/>. Acesso em Dezembro de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa Incidência de Câncer no Brasil - Biênio 2018-2019**. Rio de Janeiro, 2018. ISBN 9788573183627.

INSTITUTO ONCOGUIA. Tipos de cânceres: Tumores ósseos. Instituto Oncoguia, 2018. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/cancer-home/tumores-osseos/26/142/>. Acesso em Agosto de 2019.

ITOKAZU, M.; KUMAZAWA, S.; WADA, E.; WENYI, Y. Sustained release of adriamycin from implanted hydroxyapatite blocks for the treatment of experimental osteogenic sarcoma in mice. **Cancer Letters**, v. 107, p. 11–19, 1996.

JANEIRO, R. DE; HELENA, M.; OLIVEIRA, R. **Instituto Nacional de Câncer (INCA)**. 2018. ISBN 9788573181876.

JANIB, S. M.; MOSES, A. S.; MACKAY, J. A. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 11, p. 1052–1063, 2010.

JI, Y.; WANG, A.; WU, G.; YIN, H.; LIU, S.; CHEN, B.; LIU, F.; LI, X. Synthesis of different sized and porous hydroxyapatite nanorods without organic modifiers and their 5-fluorouracil release performance. **Materials Science and Engineering C**, v. 57, p. 14–23, 2015.

JIN, H. B.; OKTAR, F. N.; DOROZHKIN, S.; AGATHOPOULOS, S. Sintering behavior and properties of reinforced hydroxyapatite/TCP biphasic bioceramics with ZnO-whiskers. **Journal of Composite Materials**, v. 45, n. 13, p. 1435–1445, 2011.

JOKERST, J. V.; GAMBHIR, S. S. Molecular imaging with theranostic nanoparticles. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 1050–1060, 2011.

KAM, N. W. S.; O’CONNELL, M.; WISDOM, J. A.; DAI, H. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 33, p. 11600–11605, 2005.

KARBOWIAK, M.; HUBERT, S. Site-selective emission spectra of Eu^{3+}:$Ca_5(PO_4)_3F$. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 302, n. 1–2, p. 87–93, 2000.

KAWAI, T.; OHTSUKI, C.; KAMITAKAHARA, M.; MIYAZAKI, T.; TANIHARA, M.; SAKAGUCHI, Y.; KONAGAYA, S. Coating of an apatite layer on polyamide films containing sulfonic groups by a biomimetic process. **Biomaterials**, v. 25, n. 19, p. 4529–4534, 2004.

KELKAR, S. S.; REINEKE, T. M. Theranostics: Combining imaging and therapy. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 1879–1903, 2011.

KEMPEN, P. J.; GREASLEY, S.; PARKER, K. A.; CAMPBELL, J. L.; CHANG, HUAN-YU; JONES, J. R.; GAMBHIR, S. S.; JOKERST, J. V. Theranostic mesoporous silica nanoparticles biodegrade after pro-survival drug delivery and ultrasound/magnetic resonance imaging of stem cells. **Theranostics**, v. 5, n. 6, p. 631–642, 2015.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, 2006.

KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. **Wiley Periodicals, Inc.,** p. 600-612, 2002.

KUMAR, A.; AHUJA, A.; ALI, J.; BABOOTA, S. Conundrum and therapeutic potential of curcumin in drug delivery. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst., v. 27, n. 4, p. 279-312, 2010.

KUMAR, P.; VINITHA, B.; FATHIMA, G. Bone grafts in dentistry. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 125, 2013.

KUNIEDA, K.; SEKI, T.; NAKATANI, S.; WAKABAYASHI, M.; SHIRO, T.; INOUE, K.; SOUGAWA, M.; KIMURA, R.; HARADA, K. Implantation treatment method of slow release anticancer doxorubicin containing hydroxyapatite (DOX-HAP) complex. A basic study of a new treatment for hepatic cancer. **British Journal of Cancer**, v. 67, n. 4, p. 668–673, 1993.

LANDI, E.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; SPRIO, S. Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites. **Journal of the European Ceramic Society**, v.20, p. 2377-2387, 2000.

LEE, W. H.; LOO, C. Y.; ROHANIZADEH, R. Functionalizing the surface of hydroxyapatite drug carrier with carboxylic acid groups to modulate the loading and release of curcumin nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 99, p. 929–939, 2019.

LEHN, J. M. Perspectives in Supramolecular Chemistry-From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-organization. **Angen. Chem. Int. Ed. Engl**. v.29, p. 1304-1319, 1990.

LI, L. LIU, Y.; TAO, J.; ZHANG, M.; PAN, H.; XU, X.; TANG, R. Surface modification of hydroxyapatite nanocrystallite by a small amount of terbium provides a biocompatible fluorescent probe. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 32, p. 12219–12224, 2008.

LI, X.; SOGO, Y.; ITO, A.; MUTSUZAKI, H.; OCHIAI, N.; KOBAYASHI, T.; NAKAMURA, S.; YAMASHITA, **K.** and LEGEROS, R. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2011.

LIESKE, J. C.; NORRIS, R.; TOBACK, F. G. Adhesion of hydroxyapatite crystals to anionic sites on the surface of renal epithelial cells. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 273, n. 2 42-2, 1997.

LIN, K.; CHANG, J. Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications. In: Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications. **Elsevier Ltd**., p. 3–19, 2015.

LIN, Y.; LI, Y.; OOI, C. P. 5-Fluorouracil encapsulated HA/PLGA composite microspheres for cancer therapy. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 10, p. 2453–2460, 2012.

LIU, S.; WANG, Z.; HU, Z.; ZENG, X.; LI, Y.; SU, Y.; ZHANG, C.; YE, Z. Anti-tumor activity of curcumin against androgen-independent prostate cancer cells via inhibition of NF-Kb and AP-1 pathway in vitro. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**., v. 31, n.4, 2011.

LIU, X.; SUN, J. Potential proinflammatory effects of hydroxyapatite nanoparticles on endothelial cells in a monocyte-endothelial cell coculture model. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1261–1273, 2014.

LIU, Y. HE, L.; MUSTAPHA, A.; LI, H.; HU, Z.Q.; LIN, M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1193–1201, 2009.

LIU, Z.; CAI, W.; HE, L.; NAKAYAMA, N.; CHEN, K.; SUN, X.; CHEN, X.; DAI, H. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 1, p. 47–52, 2007.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003.

LOPES, J. R.; OLIVEIRA, J. A. C. DE; ESTEVES, A. DE A. Síntese e caracterização de pós de hidroxiapatita [CA10(PO4)6(OH)2] obtidas a partir do processo Sol-Gel. **Foco**, v. 8, p. 55–72, 2015.

MA, R.; GUO, D. Evaluating the bioactivity of a hydroxyapatite-incorporated polyetheretherketone biocomposite. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2019.

MANZOOR, A. A.; LINDNER, L. H.; LANDON, C. D.; PARK, J. Y.; SIMNICK, A. J.; DREHER, M. R.; DAS, S.; HANNA, G.; PARK, W.; CHILKOTI, G.; KONING, A.; TIMO, L. M.; HAGEN, T.; NEEDHAM, D.; DEWHIRST, M. W. Overcoming limitations in nanoparticle drug delivery: Triggered, intravascular release to improve drug penetration into tumors. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5566–5575, 2012.

MARTELLI, C.; LO DICO, A.; DICEGLIE, C.; LUCIGNANI, G.; OTTOBRINI, L. Optical imaging probes in oncology. **Oncotarget**, v. 7, n. 30, p. 48753–48787, 2016.

MARTIN, P.; CARLOT, G.; CHEVARIER, A., DEN-AUWER, C.; PANCZER, G. Mechanisms involved in thermal diffusion of rare earth elements in apatite. **Journal of Nuclear Materials**, v. 275, n. 3, p. 268–276, 1999.

MARTÍNEZ, C. A.; GILABERTC, U.; GARRIDOD, L.; ROSENBUCHE, M.; OZOLSA, A. Functionalization of Hydroxyapatite Scaffolds with ZnO. **Procedia Materials Science**, v. 9, p. 484–490, 2015.

MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Terras raras: Aplicações industriais e biológicas. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 111–117, 2005.

MIRTCHI, A.; LEMAITRE, J.; MUNTING, E.; Calcium Phosphate Cements: Action of Setting Regulators on the Properties of Tricalcium Phosphate-Monocalcium hosphate Cements. **Biomaterials**, v. 10, p. 634-638, 1989.

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

MOHR, L. C.; CAPELEZZO, A. P.; RIPPEL, T.; TERNUS, R. Z.; DALCATON, F.; FIORI, M. A.; MELLO, J. M. M. Efeito antimicrobiano de nanopartículas de ZnO E TiO2 frente as bactérias S. aureus e E. coli. **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 01–10, 2018.

MOLDOVAN, M.; PRODAN, D.; POPESCU, V.; PREJMEREAN, C. S.; SAPLONTAI, M.; TALU, S.; VASILE, E. Structural and morphological properties of HA-ZnO powders prepared for biomaterials. **Open Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 725–733, 2015.

MOREIRA, J. L. B; CARVALHO, C. B. M; FROTA, C.C. **Visualização bacteriana e colorações**. Impressa Universitária, 2015. ISBN: 978-85-7485-238-6.

MOUSA, S. A.; BHARALI, D. J. Nanotechnology-based detection and targeted therapy in cancer: Nano-bio paradigms and applications. **Cancers**, v. 3, n. 3, p. 2888–2903, 2011.

MUDSHINGE, S. R.; DEORE, A. B.; PATIL, S.; BHALGAT, C. M. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 3, p. 129–141, 2011.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, v. 65, n. 15–16 SPEC. ISS., p. 2385–2406, 2005.

NAZOORI, E. S.; KARIMINIK, A. In vitro evaluation of antibacterial properties of zinc oxide nanoparticles on pathogenic prokaryotes. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 5, n. 4, p. 162–165, 2018.

NCCLS/CLSI. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**. v. 23, n. 1, 2003.

NEACSU, I.; STOICA, A. L.; VASILE; B. S.; ADRONESCU, E. Luminescent Hydroxyapatite Doped with Rare Earth Elements for Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 9, n. 2, p. 239, 2019.

NIYAMA, E.; BRITO, H. F.; CREMONA, M.; TEOTONIO, E. E. S.; REYES, R.; BRITO, G. E. S.; FELINTO, M. C. F. C. Synthesis and spectroscopic behavior of highly luminescent Eu3+ dibenzoylmethanate (DBM) complexes with sulfoxide ligands. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 61, p. 2643–2649, 2005.

NURUNNABI, M.; CHOB, K. J.; CHOI, J. S.; HUHD, K. M.; LEE, YONG-KYU. Targeted near-IR QDs-loaded micelles for cancer therapy and imaging. **Biomaterials**, v. 31, n. 20, p. 5436–5444, 2010.

OFUDJE, E. A.; ADEOGUN, A. I.; IDOWU, M. A.; KAREEM, S. O. Synthesis and characterization of Zn-Doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies. **Heliyon**, v. 5, n. 5, 2019.

OGOSE, A.; HOTTA, T.; KAWASHIMA, H.; KONDO, N.; GU, W.; KAMURA, T.; ENDO, N. Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 72, n. 1, p. 94–101, 2005.

OHTSU, N.; KAKUCHI, Y.; OHTSUKI, T. Antibacterial effect of zinc oxide/hydroxyapatite coatings prepared bychemical solution deposition. **Applied Surface Science,** V. 445, p. 596-600, 2017.

OHTSUKI, C.; KUSHITANI, H.; KOKUBO, T.Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass-ceramic in the body. **Jornal of Biomed. Mater. Res**., v. 25, p.1363-1370, 1991.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

OLIVEIRA, S. V.; CAVALCANTI, S. N.; RABELLO, G. P.; ARAÚJO, E. M.; FOOK, M. V. L. Análise no Infravermelho da Hidroxiapatita. . In: VI Congresso Nacional De Engenharia Mecânica (Conem). Campina Grande, PB: 2010.

OLUKMAN, M.; ŞANLI, O.; SOLAK, E. K. Release of Anticancer Drug 5-Fluorouracil from Different Ionically Crosslinked Alginate Beads. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 03, n. 04, p. 469–479, 2012.

OMS, 2018. Cancer. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em Agosto de 2019.

ONCOGUIA. Tratamentos do câncer. Disponível em < http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamentos/77/50/?>. Acesso em Dezembro de 2019.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; FREITAS, B. R. Divulgação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

OUYANG, L.; HEB, D.; ZHANG, J.; HE, G.; JIANG, B.; WANGA, Q.; CHENA, Z.; PAN, J.; LI, Y.; GUO, L. Selective bone targeting 5-fluorouracil prodrugs: Synthesis and preliminary biological evaluation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 3750–3756, 2011.

OWEN, G. R.; DARD, M.; LARJAVA, H. Hydoxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. Journal **of biomedical materials research B: Applied biomaterials**, v. 00B, 2017.

PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles - An antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 9, n. 3, 2008.

PAN, Y.; FLEET, M. E. Compositions of the Apatite-Group Minerals: Substitution Mechanisms and Controlling Factors. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 48, n. 1, p. 13–49, 2002.

PHILLIPS, J.; MEDLIN, T. M.; SONAVANE, K.; EKSHYYAN, O.; MCLARTY, J.; NATHAN, C. O. Curcumin inhibits UV radiation-induced skin cancer in SKH-1 mice. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)**, v. 148, n. 5, p. 797–803, 2013.

PIRIOU, B.; PLOUET, M. R.; PARMENTIER, J.; FEREY, F.; VILMINOT, S. Evidence of Eu3+-O2- associates by luminescence study of some silicates and aluminosilicates. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 262–263, p. 450–453, 1997.

PRIYADARSHINI, B.; ANJANEYULU, U.; VIJAYALAKSHMI, U. Preparation and characterization of sol-gel derived Ce 4 + doped hydroxyapatite and its in vitro biological evaluations for orthopedic applications. **Materials and Design**, v. 119, p. 446–455, 2017.

QUARTA, A.; PICCIRILLO, C.; MANDRIOTA, G.; DI CORATO, R. Nanoheterostructures (NHS) and their applications in nanomedicine: Focusing on in vivo studies. **Materials**, v. 12, n. 1, p. 1–37, 2019.

RICHARD, S.; SARIC, A.; BOUCHER, M.; SLOMIANNY, C.; GEFFROY, F.; MÉRIAUX, S.; LALATONNE, Y.; PETIT, P. X.; MOTTE, L. Antioxidative Theranostic Iron Oxide Nanoparticles toward Brain Tumors Imaging and ROS Production. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 10, p. 1–29, 2016.

ROLDAN, J. C.; DETSCH, R.; SCHAEFER, S.; CHANG, E.; KELANTAN, M.; WAISS, W.; REICHERT, T. E.; GURTNER, G. C.; DEISINGER, U. Bone formation and degradation of a highly porous biphasic calcium phosphate ceramic in presence of BMP-7, VEGF and mesenchymal stem cells in an ectopic mouse model. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 38, p. 423-430, 2010.

SÁ, M. DA C. A. DE.; PEIXOTO, R. DE M.; KREWER, C. DA C.; ALMEIDA, J. R. G. DA. S.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M. Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 2–3, p. 62–66, 2011.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85–99, 2014.

SANTOS, C.; ROVATH, C.F.; FRANKE, R. P.; ALMEIDA, M. M.; COSTA, M. E. V. Spray-dried hydroxyapatite-5-Fluorouracil granules as a chemotherapeutic delivery system. **Ceramics International**, v. 35, n. 1, p. 509–513, 2009.

SCHLIEPHAKE, H.; NEUKAM, F. W. Bone replacement with porous hydroxyapatite blocks and titanium screw implants: An experimental study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 49, n. 2, p. 151–156, 1991.

SEO, H.-J.; CHO, Y. E.; KIM, T.; SHIN, H.; KWUN, I. Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Nutrition Research and Practice**, v. 4, n. 5, p. 356, 2010.

SHI, D. Cancer Cell Surface Negative Charges: A Bio-Physical Manifestation of the Warburg Effect. **Nano LIFE**, v. 07, n. 03n04, p. 177-181, 2017.

SHI, X.; ZHOU, K.; HUANG, F.; WANG, C. Interaction of hydroxyapatite nanoparticles with endothelial cells: Internalization and inhibition of angiogenesis in vitro through the PI3K/Akt pathway. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 5781–5795, 2017.

SING, K. S. W.; EVERETT, D. H.; HAUL, R. A. W.; MOSCOU, L.; PIEROTTI, R. A.; ROUQUEROL, J.; SIEMIENIEWSKA, T. Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems In: **Pure Appl. Chem**., v. 57, n. 4, p. 603—619, 1985.

SINGH, R.; LILLARD, W. J. J. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Exp. Mol Pathol.**, v. 86, n. 3, p. 215–223, 2012.

SIRELKHATIM, A.; MAHMUD, S.; SEENI, A.; KAUS, N. H. M.; ANN, L. C.; BAKHORI, S. K. M.; HASAN, H.; MOHAMAD, D. Review on zinc oxide

nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Letters**, v. 7, n. 3, p. 219–242, 2015.

SONG, Z.; BORGWARDT, L.; HOIBY, N.; WU, H.;SORESEN, T. S.; BORGWARDT, A. Prosthesis infections after orthopedic joint replacement: the possible role of bacterial biofilms. **Orthopedic Reviews**, v. 5, n. 2, p. 14, 2013.

SRIVASTAV, A. CHANANDANSHIVE, B.; DANDEKAR, P.; HUSHALANI, D.; JAIN., R. Biomimetic Hydroxyapatite a Potential Universal Nanocarrier for Cellular Internalization & Drug Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 36, n. 4, 2019.

STANDARD, I. Biological evaluation of medical devices-16:45:28 MDT No reproduction or networking permitted without license from IHS COPYRIGHT PROTECTED DOCUMENT 16:45:28 MDT No reproduction or networking permitted without license from IHS. 2009.

SUETH-SANTIAGO, V.; SILVA, G. P. M.; RICARDO, D. D.; LIMA, M. E. F. **Quim. Nova**,. v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.

TANK, K. P.; CHUDASAMA, K. S.; THAKER, V. S.; JOSHI, M. J. Pure and zinc doped nano-hydroxyapatite: Synthesis, characterization, antimicrobial and hemolytic studies. **Journal of Crystal Growth**, v. 401, p. 474–479, 2014.

TERNANE, R.; ARIGUIB, N. K.; AYED, M. T.; PIRIOU, B. Luminescent properties of Eu3+ in calcium hydroxyapatite. **Journal of Luminescence**, v. 81, n. 3, p. 165–170, 1999.

TSENG, C.; CHEN, J.; WU, Y.; FANG, H.; LIN, F.; TANG, T. Development of lattice-inserted 5-Fluorouracil-hydroxyapatite nanoparticles as a chemotherapeutic delivery system. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 30, n.4, p. 388–397, 2015.

VALLET-REGÍ, M.; BALAS, F.; ARCOS, D. Drug-Delivery Systems Mesoporous Materials for Drug Delivery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, p. 7548–7558, 2007.

VALLET-REGÍ, M.; BALAS, F.; COLLILA, M.; MANZANO, M. Bone-regenerative bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 163–191, 2008.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: A Peer-Reviewed Journal For Formulary Management**, v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015.
VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. **Einstein**, v. 14, n. 1, p. 99–103, 2016.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 157–166, 2009.

WANG, L. SHI, J.; HAO, Y.; ZHANG, P.; ZHAO, Y.; MENG, D.; LI, D.; CHANG, J.; ZHANG, Z. Magnetic multi-walled carbon nanotubes for tumor theranostics. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1653–1661, 2015.

WANG, L.; HU, C.; SHAO, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1227–1249, 2017.

WEI, Y.; HE, Y.; LI, X.; CHEN, H.; DENG, X. Cellular uptake and delivery-dependent effects of Tb3+ doped hydroxyapatite nanorods. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1–11, 2017.
WEISSLEDER, R. Scaling Down Imaging: Molecular Mapping of Cancer in Mice. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 11–18, 2002.

WEISSMAN, S. I. Intramolecular energy transfer the fluorescence of complexes of Europium. **The Journal of Chemical Physics**, v. 10, n. 4, p. 214–217, 1942.

WILLIAMS, D. G.; WILLIAMS, D. G. Drugs and Poisons. **Renal Disease: An Illustrated Guide**, p. 73–76, 1981.

WILSON, S.; NARAYANAN, P. M.; WILSON, W. S. Synthesis, Characterization , and Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles Against Human Pathogens. **BioNanoSci**., v. 2, p.329–335, 2012.

XIDAKI, D.; PANAGIOTA, A.; DIOMATARI, D.; KAMINARI, E. T.. P.; ALEXIOU, P.; PSYCHARIS, V.; TSILIBARY, E. C.; SILVESTROS, S.; SAGNOU, M. Synthesis of hydroxyapatite, β-Tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate particles to act as local delivery carriers of curcumin: Loading, release and in vitro studies. **Materials**, v. 11, n. 4, 2018.

XIE, J.; LEE, S.; CHEN, X. Nanoparticle-based theranostic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 11, p. 1064–1079, 2010.

XIE, Y.; HE, Y.; IRWIN, P. L.; JIN, T.; SHI, X. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against Campylobacter jejuni. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2325–2331, 2011.

YAMAGUCHI, M. Role of Zinc in Bone Formation and Bone Resorption. **The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine,** v. 11, p. 119–135, 1998.

YANG, P. QUAN, Z.; LI, C.; KANG, X.; LIAN, H.; LIN, J. Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier. **Biomaterials**, v. 29, n. 32, p. 4341–4347, 2008.

YANG, X.; WANG, Z. Synthesis of biphasic ceramics of hydroxyapatite and b-tricalcium phosphate with controlled phase content and porosity. J. Mater. Chem., v. 8 (10), p. 2233–2237, 1998.

YOON, J.; KIM, D.; SIREGAR A.; LEE, B. Y.; KWON, KI-YOUNG; BYUN, JUNE-HO; WOO, D. K. 5-Fluorouracil-coated hydroxyapatite nanoparticles as anticancer drug delivery carriers. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 36, n. 2, p. 445–446, 2015.

ZHAO, S. F.; DONG, S. F.; JIANG, W. J.; HE, Q. H.; WANG, F. M.; YANG, X. X.; LI, G. Effects of zinc-substituted nano-hydroxyapatite coatings on bone integration

with implant surfaces. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 14, n. 6, p. 518–525, 2013.

ZHAO, YAN-ZHONG; YANG, M.; ZHANG, HAI-BIN, ZHU J.; ZHOU, KE-CHAO. Characterization of terbium-doped nano-hydroxyapatite and surface modification. **Journal of Central South University**, v. 23, n. 7, p. 1548–1555, 2016.

ZHENG, M.; EKMEKCIOGLU, S.; WALCH, E. T.; TANG, C. H.; GRIMM, E. A. Inhibition of nuclear factor-kappaB and nitric oxide by curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells. Melanoma Res., v. 14, n. 3, p. 165-171, 2004.

ZONG, H.; WANG, F., FAN, Q.X.; WANG, L. X. Curcumin inhibits metastatic progression of breast cancer cell through suppression of urokinase-type plasminogen activator by NF-kappa B signaling pathways. Mol. Biol. Rep., v. 39, n. 4, p. 4803 – 4808, 2012.

APÊNDICE A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos publicados:

● BARBOSA, A. A.; JÚNIOR, S. A.; FERRAZ, A. V. Study of a luminescent and antibacterial biomaterial based on hydroxyapatite as support for an antineoplastic drug. **Journal of Materials Research**, v. 34, n. 11, p. 1922–1930, 2019.

● BARBOSA, A. A.; JÚNIOR, S. A.; DANTAS, A. C. S.; FERRAZ, A. V. Chemical conversion of a solid body of the composite gypsum/polyhydroxybutyrate in hydroxyapatite/polyhydroxybutyrate. **Cerâmica**, v. 65, p. 335–339, 2019.

Artigo submetido:

● BARBOSA, A. A.; JÚNIOR, S. A.; OLIVEIRA, R. A. P; FERRAZ, A. V. Structural and photophysical properties of lanthanides ions doped hydroxyapatite.
(Submetido à Revista Matéria/UFRJ em junho/2019).

Artigo em preparação:

● Nanocarreador Multifuncional de Hidroxiapatita com Potencial de Aplicação na Teranóstica do Câncer.

Resumos Apresentados em Congressos:

1-BARBOSA, A. A.; JÚNIOR, S. A.; FERRAZ, A. V. Síntese química do compósito hidroxiapatita/óxido de zinco para produção de biomaterial com propriedade antimicrobiana. (I-Condequi/2019).

2-BARBOSA, A. A.; JÚNIOR, S. A.; FERRAZ, A. V. Incorporation of Antineoplasic Drug to the Hydroxyapatite Matrix and Study of its Release in Saline Phosphate Buffer. (SBPMat/2018).

3-BARBOSA, A. A.; JÚNIOR, S. A.; FERRAZ, A. V. Development of Material with Multifunctional Properties based on Hydroxyapatite for Application in the Theranostic of Bone Cancer. . (SBPMat/2018).

4-BARBOSA, A. A.; JÚNIOR, S. A.; FERRAZ, A. V. Nanocarrier of Europium Doped Hydroxyapatite for Applications in te Theranostic of Cancer Skin. (SBPMat/2017).

5-BARBOSA, A. A.; FERRAZ, A. V.; JÚNIOR, S. A. Síntese e Caracterização de Hidroxiapatita Dopada com Cério. (I Ccmat-Univasf/2016).