OTIMIZAÇÃO NA OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS DE PLA/nHAP PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A. A. Becaro¹, C. R. Sciena², J. D. Malafatti³, E. C. Paris⁴, L. H. C. Mattoso⁴ ¹Pós Doutoranda, EMBRAPA Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970,São Carlos, SP, Brasil. ²Doutoranda, Universidade Federal de São Carlos – Departamento de Química,

 ²Doutoranda, Universidade Federal de Sao Carlos – Departamento de Química, Rodovia Washington Luiz, s/n, km235, 13565905, São Carlos, SP, Brasil.
³Mestrando, Universidade Federal de São Carlos – Departamento de Química, Rodovia Washington Luiz, s/n, km235, 13565905, São Carlos, SP, Brasil.
⁴EMBRAPA Instrumentação - Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio - LNNA, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970,São Carlos, SP, Brasil.

E-mail: elaine.paris@embrapa.br;

RESUMO

A hidroxiapatita (HAP) pertence à família das apatitas de cálcio. Em forma nanométricas (nHAP) podem ser utilizadas como carreador de drogas. O objetivo foi aperfeiçoar nanofibras de PLA com inserção de nHAP para serem utilizadas na liberação de fármacos. nHAP foram obtidas pelo método de coprecipitação e caracterizada pelas técnicas de DRX e MET. As fibras de PLA (10%) e 5% de nHAP foram obtidas na distância de 6 cm e vazão de 0,1, 0,3 e 0,5 mL h⁻¹, e caracterizadas por MEV. As nHAP tinham fase única com formato de bastonete, ponta arredonda e diâmetros de 10 a 20 nm. As fibras obtidas a partir do PLA puro apresentaram-se mais porosas do que na presença de HAP. Os diâmetros variaram de 0.2 a 2.4 μ m. Dentre as fibras obtidas a que apresentou melhor resultado foi à vazão 0,3 mL h⁻¹.

Palavras-chaves: hidroxiapatita, PLA, nanofibras, fármacos.

INTRODUÇÃO

O material biocerâmico hidroxiapatita (HAP) é um material da família das apatitas de cálcio $Ca_{10}(PO_4)_6X_2$, com X = OH, CI, F ou Br, e pode ser encontrada na natureza nas formas hexagonais e monoclínicas^(1,2). A HAP, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, é o principal constituinte de ossos e dentes⁽³⁾. A HAP possui a incomum propriedade de possuir sítios ácidos, representados pelos cátions Ca^{2+} , e sítios básicos, representados pelos cátions Ca^{2+} , e sítios básicos,

nanométricas, podem ser utilizadas como um carreador para a entrega de drogas e outros agentes terapêuticos, pois aumenta a biodisponibilidade, terapêutica, a eficiência e segurança por ser um material semelhante aos encontrados no organismo humano⁽⁵⁾. Os sistemas de transporte têm como função disponibilizar o princípio ativo ao organismo após a administração. Atualmente os sistemas de liberação controlada de fármaco têm preenchido vários requisitos, como o a redução de toxicidade sistêmica⁽⁶⁾ o direcionamento específico ao local alvo⁽⁷⁾, a estabilização e a otimização do seu metabolismo⁽⁸⁾, para evidenciar o potencial terapêutico de princípios ativos. Entretanto, há vários outros desafios associados à liberação específica do princípio ativo ao local alvo como a seleção do polímero utilizado na preparação do sistema de liberação, a fim de ultrapassar barreiras químicas e biológicas do organismo.

A escolha do polímero a ser utilizado no sistema está relacionada à natureza química do princípio ativo. Para a preparação de sistemas poliméricos de liberação controlada pode-se empregar tanto a polímeros naturais⁽⁹⁾, sintéticos⁽¹⁰⁾ ou semi-sintéticos⁽¹¹⁾. Dependendo da aplicação terapêutica podem ser requeridos polímeros biodegradáveis que apresentam vantagens já que não necessitam serem removidos cirurgicamente após o término da liberação do princípio ativo no organismo, além de fornecer a liberação diretamente na circulação sistêmica e podem ser o polímero e o princípio ativo, combinados de diferentes maneiras fornecendo o melhor sistema para a aplicação desejada⁽¹²⁾.

A classe de polímeros poliésteres alifáticos é uma das mais estudadas para a preparação de sistemas poliméricos de transporte de princípios ativos e podem ser representados por pelos poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) e seus copolímeros (PLGA), além de diferentes poliésteres alifáticos, como os poli (α -hidroxiácidos), os poli (β -hidroxiácidos) e a poli (α -caprolactona)⁽¹³⁾. O mais importante poliéster alifático é o PLA (poli(ácido lático)) é um poliéster alifático, biocompatível e biodegradável⁽¹⁴⁾ que pode ser obtido por fermentação bacteriana a partir da glicose extraída do milho . Por degradação origina ácido láctico, metabólito natural do corpo humano sendo, portanto, vantajoso o seu uso uma vez que sua eliminação se dá por vias naturais⁽¹⁵⁾.

O PLA é um material termoplástico, o que permite ser utilizado em diversas áreas: médicas⁽¹⁶⁾, embalagens de alimentos⁽¹⁷⁾, vestuários⁽¹⁷⁾ e farmacêutica⁽¹⁸⁾, pois é de fácil processamento e possui propriedade única que favorecem a sua

2788

utilização. A literatura demonstra que o recobrimento de nanopartículas com polímeros auxilia na obtenção de sistemas de liberação prolongada. Em um estudo desenvolvido por Kim e colaboradores⁽¹⁹⁾ foi desenvolvido um sistema de liberação de vancomicina a partir de HAP revestida com PCL e como resultado foi observado uma liberação de forma altamente prolongada, em comparação com a liberação da droga diretamente adsorvida em HA puro. Segundo Loca e colaboradores⁽²⁰⁾, realizaram estudo de liberação de gentamicina utilizando um sistema de HAP obtendo como resultado 12h de liberação. No entanto ao utilizarem revestimentos de biopolímeros os resultados mostraram uma diminuição na taxa de liberação de gentamicina por 70h para PLC, 20h para PLA e 50h para PVA.

MATERIAIS E MÉTODOS

OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA

Para a síntese da hidroxiapatita (HAP) por meio de cooprecipitação por via úmida foram utilizados Nitrato de Cálcio Tetra-Hidratado (Ca(NO₃)₂.4H₂O), Fosfato de Amônio Bibásico ((NH₄)₂HPO₄) e Hidróxido de Amônio (NH₄OH) Sigma-Aldrich[®] sendo as soluções preparadas com água deionizada. Para a síntese com rendimento de aproximadamente 1 g do produto foi feita uma solução contendo 3,07g de Ca(NO₃)₂.4H₂O em 300 mL de água deionizada. Após completa solubilização, essa solução foi transferida para um balão de 3 bocas e pH ajustado para 11 com adição de hidróxido de amônio (NH₄OH). Em seguida, borbulhou-se nessa solução nitrogênio (N₂), para garantir uma atmosfera inerte dentro do balão e eliminar os gases solubilizados presentes. Concomitantemente, a solução de (NH₄)₂HPO₄ foi preparada utilizando 0,79g do reagente em 40 mL de água deionizada. Após completa dissolução, essa solução foi transferida para uma bureta sendo gotejada lentamente sob agitação constante e à temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado formado foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e lavado com água deionizada até atingir o pH neutro. Então, o produto foi ressuspenso em etanol e seco a 50ºC em estufa com circulação ar.

Caracterização das Nanopartículas de HAP Coprecipitada.

Difração De Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X foram obtidos no equipamento Shimadzu®, modelo LabX XRD-6000, utilizando radiação Cu-K α de λ = 1 1,5406Å, nas condições de análise de θ -2 θ com 2 θ variando de 0 a 80° e velocidade de varredura contínua de 1°min⁻¹.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Na microscopia eletrônica de transmissão o feixe de elétrons atravessa a amostra, diferentemente da MEV-FEG, assim é criada a imagem do tipo campo claro (*Bright Field*). Já os elétrons refratados pela amostra após a sua interação com a mesma dão origem às imagens do tipo campo escuro (*Dark Field*). As análises foram feitas a partir de um microscópio FEI TECNAI G² F20 HRTEM localizado na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE/DEMA).

Obtenção de Nanofibras

O aparelho de eletrofiação é constituído de uma fonte de alta tensão (Glassman Higth voltage modelo PSC60P02.0-22), um sistema de injeção constituído de uma bomba de ejeção (KVS, modelo 100) acoplado a uma seringa de vidro (Fluran HCA F-5500-A, Ismcatec). O PLA foi obtido comercialmente da empresa XXX. Foi utilizado solvente clorofórmio e acetona (3:1), tempo de agitação de 21horas, overnight em agitador magnético. As variações das condições de eletrofiação estão resumidas na Tabela 1. A folha de papel alumínio foi utilizada como coletor em todos os casos.

Amostra	PLA %	HAP	Voltagem (kv)	Vazão (mL⁄h)	Distância (cm)
1	10	5%	40,0	0,1	6
2	10	5%	40,0	0,3	6
4	10	5%	40,0	0,5	6

Tabela1. Condições de eletrofiação empregadas para obtenção de nanofibras.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): Caracterização Das Nanofibras

As amostras foram fixadas no porta-amostras com uma fina camada de tinta de prata para dar contato elétrico e, em seguida, foram recobertas com ouro. Para esta analise contou-se com um microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6510.

RESULTADOS

<u>DRX</u>

A Fig 1. de mostra o DRX da amostra de hidroxiapatita coprecipitada. Segunda a ficha cristalográfica *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS) de número 01-089-4405, é possível observar os picos característicos da estrutura hexagonal da hidroxiapatita na amostra estudada, não sendo observados picos referentes a fases secundárias, indicando a pureza do material. Observa-se baixa cristalinidade na amostra de hidroxiapatita podendo ser verificado mais claramente a partir dos picos (211), (300), (202) e (203 até o 004) pela baixa iintensidade relativa.



Fig. 1. Espectros FT-IR obtidos para a amostra de HAP coprecipitada.

<u> MET</u>

As imagens de TEM de nanopartículas de hidroxiapatita pura obtidas pelo método de coprecipitação e hidrotermal estão apresentadas na Fig 2. As figuras confirmar a formação de um pó nanocristalino. As partículas são uniformes e as suas dimensões variam entre 10 e 20nm devido à aglomeração para a HAP-Cop. As amostras apresentaram o formato de bastonete.

Fig 2. Imagens obtidas por MET das amostras HAP-COP (coprecipitada) e HAP-HIDRO (hidrotermal).



MEV das Nanofibras de PLA puro e com HAP

Na Fig 3. esta representada as nanofibras de PLA puro e com HAP coprecipitada. Pode-se notar que não houve grandes alterações na morfologia das nanofibras com a mudança no volume de vazão de 0,3mL/h para 0,5mL/h como pode ser visto pelas imagens a, a1, b e b1. Os diâmetros das fibras foram de 0.2 a 2.4 nm. Observa-se nas imagens (a2 e a3) e (b2 e b3) que independente da vazão utilizada há uma perda na porosidade das fibras quando na presença de 5% de HAP. No entanto, a estrutura de superfície das nanofibras teve uma pequena vairação aparente após a adição do HAp.



Fig 3. Microscopias das condições de eletrofiação empregadas para obtenção de nanofibras.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que dentre as fibras obtidas a que apresentou melhor resultado foi à vazão 0,3 mL h⁻¹, podendo ser utilizada para a incorporação de fármacos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao MCTI/SISNANO, CNPq (Proc. 150528/2015-9), CAPES e Embrapa pelo suporte financeiro da pesquisa.

7. REFERÊNCIAS

(1) Giraldi, T.R.; Santos, G.V.F.; Mendonça, V.R.; Caue, R.; Weber, I.T. **11**(1–6), 2011.

(2) Takahashi, H.; Yashima, M.; Kakihana, M.; Yoshimura, M. *Thermochim. Acta*. **371**(1-2): 53, 2001.

(3) Elliott, J.C.; Mackie, P.E.; Young, R.A. Science. 180(4090): 1055, 1973.

(4) Turhani, D.; Cvikl, B.; Watzinger, E.; Weissenbock, M.; Yerit, K.; Thurnher, D.; Lauer, G.; Ewers, R. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **63**(6): 793, 2005.

(5)Han, Y.; Wang, X.; Li, S. J. Nanoparticle Research 11 1235–1240, (2009)

(6) Kang, J.W.; Davaa, E.; Kim, Y.T.; Park, J.S. J. Drug Target. 18, (2010).

(7) Naczynski, D.J.; Andelman, T.; Pal, D.; Chen, S.; Riman, R.E.; Roth, C.M.; Moghe, P.V. *Small.* **2**, (2010).

(8) Zhang, P.; Chen, L.; Zhang, Z.; Lin, L.; Li, Y. J. Nanosci. Nanotechnol. 10, (2010).

(9) Jose, S.; Prema, M.T.; Chacko, A.J.; Thomas, A.C.; Souto, E.B. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, (2010).

(10) Cun, D.; Foged, C.; Yang, M.; Frokjaer, S.; Nielsen, H.M. Int. J. Pharm. 5, (2010).

(11) Chan, A.W.; Neufeld, R.J. Biomaterials 34, (2010).

(12) Brannon Peppas, L. Int. J. Pharm. 116, (1995).

(13) Cameron, D.J.; Shaver M. P. Chem. Soc. Rev. (2010).

(14) Pang, X.A., et al. *Biotechnology Journal* **5** (11): p. 1125-1136, (2010).

(15) Liu, J.W.; Zhao, Q.; Wan, C.X. Space Med. Med. Eng. 14, (2001).

(16) Sabir, M.I.; X.X. Xu; L. Li. *Journal of Materials Science* **44**(21): p. 5713-5724, (2009).

(17) Auras, R.; B. Harte; S. Selke. *Macromolecular Bioscience* **4**(9): p. 835-864, (2004).

(18) Stevanovic, M.; D. Uskokovic. Current Nanoscience, 5(1): p. 1-14, (2009).

(19) Kim, H.W.; Knowles, J.C.; Kim, H-Ee. JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE **16** p. 189 – 195, (2005).

(20) Loca, D.; Locs, J.; Salma, K.; Gulbis, J.; Salma, I.; Berzina-Cimdina, L. *Materials Science and Engineering* **18**, (2011).

OPTIMIZATION IN OBTAINING PLA NANOFIBERS/nHAP FOR PHARMACEUTICALS RELEASE

ABSTRACT

Hydroxyapatite (HAP) belongs to the family of calcium apatites. In nanometric form (nHAP) can be used as a drug carrier. The objective was to improve PLA nanofibers with nHAP insert for use in drug delivery. nHAP were obtained by coprecipitation method and characterized by XRD and TEM techniques. PLA fibers (10%) and 5%

nHAP were obtained at a distance of 6 cm and flow rate of 0.1, 0.3 and 0.5 ml h⁻¹, and characterized by SEM. The nHAP were single phase with rod shape, rounded tip and from 10 to 20 nm in diameter. The fibers obtained from pure PLA had to be more porous than in the presence of HAP. The diameters ranged from 0.2 to 2.4 micrometers. Among the fibers obtained that showed the best result was to flow 0.3 ml h⁻¹.

Key-words: hydroxyapatite, PLA, nanofibers, drugs.