

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA
DE MATERIAIS

LUANA PATRICIA BEZERRA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS POROSOS ACOPLADOS A
SISTEMA CARREADORES: ÁCIDO ZOLEDRÔNICO ENCAPSULADO EM
LIPOSSOMAS**

LONDRINA

2022

LUANA PATRICIA BEZERRA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS POROSOS ACOPLADOS A SISTEMA CARREADORES: ÁCIDO ZOLEDRÔNICO ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS

DEVELOPMENT OF POROUS BIOMATERIALS COUPLED TO CARRIER SYSTEMS: ZOLEDRONIC ACID ENCAPSULATED IN LIPOSOMES

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais - PPGCEM, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça
Coorientador: Prof. Dr. Márcio Florian

LONDRINA

2022



4.0 Internacional

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina**



LUANA PATRICIA BEZERRA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS POROSOS ACOPLADOS A SISTEMA CARREADORES: ÁCIDO ZOLEDRÔNICO ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Ciência E Engenharia De Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Materiais Para Aplicação Em Engenharia E Tecnologia.

Data de aprovação: 20 de Agosto de 2022

Dr. Luis Fernando Cabeca, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Andre Luiz Tessaro, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Tania Regina Giraldi, Doutorado - Universidade Federal de Alfenas (Unifal-Mg)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 22/08/2022.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento é a Deus que sempre me sustentou e têm me sustentado até aqui, dando forças nesses momentos de dificuldade que passamos em meio à pandemia.

Agradeço também ao meu futuro esposo Bolívar, que esteve ao meu lado em todos os momentos de incerteza, do qual faço questão de compartilhar todas as minhas vitórias juntamente à minha família;

Aos professores Luís Fernando Cabeça e Márcio Florian pela orientação ao decorrer do trabalho, por todos os conselhos e parceria durante esses anos.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por me proporcionar todo o conhecimento que tem tornado as barreiras muito mais fáceis de se ultrapassar;

Aos colaboradores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná e da Universidade Estadual de Londrina pela atenção e por tornar esse trabalho uma realidade, através do apoio na realização de todas as análises. Em especial a Talita Kato, que nunca mediu esforços para ser apoio em todas as etapas.

RESUMO

SILVA, Luana P. B. **Desenvolvimento de biomateriais porosos acoplados a sistema carreadores: ácido zoledrônico encapsulado em lipossomas**. 2022. 57 p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2022.

A hidroxiapatita (HAP) é um biomaterial cerâmico amplamente utilizado em aplicações relacionadas à enxertia óssea devido as suas propriedades muito similares a do osso. Embora seja um material com notório uso em aplicações de implantes, seu uso é dificultado devido a sua configuração microestrutural, que é de um material pouco poroso, o que acaba dificultando o desenvolvimento e migração das células ósseas, além disso, apresenta também uma degradação lenta. A combinação desse material com outra cerâmica pode gerar uma otimização no produto final. Para isso, a HAP foi combinada com o beta tricálcio-fosfato (BTCP) a fim de agilizar a degradação do biomaterial e aumentar a porosidade do mesmo. Foram estudadas algumas alternativas na otimização da formulação HAP:BTCP para melhoria da porosidade através do uso de materiais de sacrifício (celulose microcristalina). Também foi utilizado ácido zoledrônico (AZ) encapsulado em lipossomas incorporados aos poros da cerâmica com o intuito de melhorar a osteoestimulação celular (osteoblastos e osteoclastos) e, assim, reduzir o tempo da recuperação clínica do paciente. Foi possível otimizar a quantidade de poros presentes na biocerâmica. Os lipossomas obtidos também foram validados através das análises, com a metodologia utilizada foi possível atingir uma eficiência de encapsulação de 32,95% do fármaco. A metodologia utilizada para incorporar a biocerâmica ao complexo lipossoma/AZ apresentou um resultado promissor, com uma porcentagem de sucesso de 57,1% para HAP e 52,8% para o BTCP.

Palavras-chave: hidroxiapatita, beta-tricálcio fosfato, ácido zoledrônico, lipossomas.

ABSTRACT

SILVA, Luana P. B. **Development of porous biomaterials coupled to carrier systems: zoledronic acid encapsulated in liposomes**. 57 p. Master's Dissertation - Postgraduate Program in Materials Science and Engineering, Federal Technological University of Paraná, Londrina, 2022.

Hydroxyapatite (HAP) is a ceramic biomaterial widely used in applications related to bone grafting due to its properties very similar to bone. Although HAP is a material with notorious scientific advances, its application is difficult due to its microstructural configuration, which hinders the development and migration of bone cells, in addition, it also presents a difficult degradability. The combination of this material with other ceramics can generate an optimization in the final product. For this, HAP was combined with beta tricalcium-phosphate (BTCP) in order to speed up the degradation of the biomaterial and increase its porosity. Some alternatives were studied to optimize the HAP:BTCP formulation to improve porosity through the use of sacrificial materials (microcrystalline cellulose). Zoledronic acid encapsulated in liposomes coupled to ceramic pores was also used in order to improve cellular osteostimulation (osteoblasts and osteoclasts) and, thus, reduce the patient's clinical recovery time. To characterize the ceramics, X-ray diffraction, scanning electron microscopy and mercury porosimetry were performed, while zeta potential, dynamic light scattering and percentage of drug encapsulation were performed in liposomal vesicles. The results proved to be promising, since it was possible to optimize the amount of pores present in the bioceramics. The obtained liposomes were also validated through the analyses, with the used methodology it was possible to reach an encapsulation efficiency of 32.95% of the drug. The methodology used to couple the bioceramic to the liposome/AZ complex showed a promising result of 57,1% for HAP and 52,8% for BTCP.

Keywords: hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate, zoledronic acid, liposomes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do BTCP	20
Figura 2. Estrutura cristalina da HAP.....	21
Figura 3. Estrutura química da celulose microcristalina.....	23
Figura 4. Estrutura química do ácido zoledrônico.....	24
Figura 5. Representação unidade de repetição do lipossoma.....	25
Figura 6. Representação esquemática do lipossoma	25
Figura 7. Métodos de purificação de vesículas aplicados para os lipossomas	27
Figura 8. Representação da rampa de aquecimento.....	30
Figura 9. Metodologias de obtenção de lipossomas/AZ	31
Figura 10. Metodologias para a incorporação do complexo lipossomas/AZ nos poros da HAP	33
Figura 11. Difratoograma da amostra de BTCP, em que: (a) difratoograma experimental; (b) difratoograma da literatura	38
Figura 12. Difratoograma de raios X da amostra de HAP, em que: (a) difratoograma experimental; (b) difratoograma da literatura	38
Figura 13. Gráfico de porcentagem cumulativa de intrusão x diâmetro do poro para HAP.	41
Figura 14. Gráfico de porcentagem cumulativa de intrusão x diâmetro do poro para BTCP	42
Figura 15. Resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura no BTCP sem poros (a e c) e com poros (b e d)	44
Figura 16. Comparativo entre o MEV (a) HAP sem poros e (b) HAP porosa	45

Figura 17. Resultados de MEV para (a) HAP porosa, (b) BTCP poroso e (c) mistura de HAP+BTCP 1:1 porosa..... 46

Figura 18 - Curva de calibração 47

Figura 19. Exemplificação dos resultados obtidos para o diâmetro e potencial zeta das partículas em solução para o método B 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista das matérias primas utilizada nos experimentos.....	28
Tabela 2. Lista dos equipamentos utilizados na preparação dos materiais.....	28
Tabela 3. Comparativo entre os resultados obtidos na porosimetria de mercúrio para HAP, HAP porosa, BTCP e BTCP porosa. Em que: (A) Pressão aplicada, (B) Porcentagem de intrusão de mercúrio e (C) Diâmetro de poro	39
Tabela 4. Comparativo entre a porcentagem de poros x tamanho de poros.....	43
Tabela 5. Resultados da eficiência de encapsulação para os diferentes métodos de obtenção dos lipossomas.	47
Tabela 6. Análise de diâmetro hidrodinâmico médio (D), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE) das vesículas lipossomais para o método B	48
Tabela 7. Dados obtidos através da análise das diferentes metodologias aplicadas para a incorporação entre a cerâmica e o complexo lipossomas/AZ.....	50
Tabela 8. Eficiência na incorporação de lipossoma nas diferentes cerâmicas testadas a partir da metodologia 4.....	50

LISTA DE SÍMBOLOS

AZ	Ácido Zoledrônico
BTCP	Beta – Tricálcio Fosfato
CM	Celulose Microcristalina
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DRX	Difração de Raios X
HAP	Hidroxiapatita
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
UV-Vis	Espectrofotometria de Luz Visível
SPC	Fosfatidilcolina de Soja

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 JUSTIFICATIVA	16
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
4.1 BIOCERÂMICA.....	17
4.2 B-TRICÁLCIO FOSFATO	19
4.3 HIDROXIAPATITA	21
4.4 CELULOSE MICROCRISTALINA.....	22
4.5 ÁCIDO ZOLEDRÔNICO	24
4.6 LIPOSSOMAS.....	25
5 MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 <i>MATERIAIS</i>	28
5.2 <i>MÉTODOS</i>	29
5.2.1 Síntese do B-tricálcio fosfato poroso	29
5.2.2 Síntese da hidroxiapatita porosa	29
5.2.3 Preparação da HAP:BTCP	30
5.2.4 Preparação das vesículas lipossomais e encapsulamento de AZ	30
5.2.5 Incorporação do AZ livre na HAP porosa	32
5.2.6 Encapsulação das vesículas lipossomais/AZ nas cerâmica porosa (HAP ou BTCP).....	32
5.3 <i>CARACTERIZAÇÕES</i>	34
5.3.1 Difração de raios X (DRX)	34

5.3.2 Porosimetria de Mercúrio.....	34
5.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	34
5.3.4 Espectroscopia UV-Visível	35
5.3.5 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta.....	35
5.3.6 Espectroscopia UV-Visível para quantificação de lipossoma/AZ incorporada à cerâmica	36
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.1 DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DAS BIOCERÂMICAS COM E SEM TRATAMENTO	37
6.2 DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DAS VESÍCULAS LIPOSSOMAIS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO	46
6.3 INCORPORAÇÃO DAS VESÍCULAS LIPOSSOMAIS/AZ NAS CERÂMICAS POROSAS	49
CONCLUSÃO	53

1 INTRODUÇÃO

O notório avanço da expectativa de vida humana leva os pesquisadores a desenvolver maneiras de melhorar a vida e o bem-estar das pessoas. O desenvolvimento de novos medicamentos, novas técnicas reparadoras, e novos materiais proporcionam uma vida melhor e mais confortável.

Dentro da área de desenvolvimento de novos materiais, os biomateriais apresentam um papel crucial, pois são altamente resistentes, relativamente fáceis de ser sintetizados, são biocompatíveis, entre outros (PIRES, 2015).

As biocerâmicas a base de fosfato de cálcio são extensamente estudadas pois além de apresentar as propriedades supracitadas, também são muito similares aos tecidos ósseos encontrados no corpo humano, apresentam alta biocompatibilidade, na maioria das vezes não apresentam reações adversas; apresentam biodegradabilidade, osteocondutividade, que possibilita a colonização celular, crescimento ósseo e a vascularização sanguínea (FROES, 2019; KAWACHI, 2000)..

Materiais a base de hidroxiapatita (HAP) vem sendo aplicados há muito tempo com a justificativa da sua síntese relativamente simples e seus excelentes resultados com relação à biocompatibilidade. Outro material similar é o beta tricálcio-fosfato (BTCP), que também possui ótimas características biológicas, assim como a HAP, mas com uma degradação mais acelerada quando comparamos os dois materiais. A combinação das biocerâmicas busca otimização do enxerto combinando as duas propriedades: maior biocompatibilidade e uma degradabilidade mais acelerada (SOSSA, et al., 2018).

Os enxertos a base de fosfato de cálcio possuem propriedades como osteoestimulação, osteoindução e osteocondução. Biocerâmicas com estruturas em forma de *scaffolds* (arcabouço) apresentam bons resultados quando utilizadas como enxerto ósseo, pois servem de suporte para a formação do novo tecido (LIU, 2004 apud OLIVEIRA, 2010).

Além de todas as melhorias, é possível também aliar fármacos aos enxertos, a fim de estimular o crescimento celular (osteoestimulação). O ácido zoledrônico, medicamento comumente utilizado para tratamento de osteoporose, quando utilizado

em concentrações baixas, pode favorecer a multiplicação de células ósseas, fazendo com que o tempo de recuperação seja reduzido (INJECTION LABEL, 2001). Entretanto, um processo de liberação lenta e contínua do fármaco na região do enxerto pode fornecer melhorias estimulando células de osteoblastos diminuindo o tempo de recuperação. Um bom sistema para liberação controlada de ativos são os lipossomas, capazes de aprisionar o fármaco e liberá-lo de forma controlada no foco do tratamento por meio de um sistema de liberação controlada (*drug delivery*) (NARDOTTO, 2009).

Assim, esse trabalho concentra-se no estudo de diversas composições de hidroxiapatita, beta tricálcio fosfato e a mistura HAP/BTCP (50:50 (m:m)) porosa, acoplada a vesículas lipossomais contendo o fármaco ácido zoledrônico (AZ). Essa formulação inédita pode trazer resultados relevantes, como a diminuição do tempo de cura do paciente. Atualmente os problemas dos enxertos a base de sistemas aloplásticos é o tempo total para o crescimento ósseo e reabsorção do enxerto. Essa nova formulação busca resolver esse problema. Também, espera-se um produto com menor custo pois a síntese desse tipo de material é simples, devido a utilização de equipamentos e reagentes de baixo custo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para enxerto ósseo formado por B-Tricálcio Fosfato, Hidroxiapatita poroso e B-Tricálcio Fosfato/Hidroxiapatita poroso (1:1) com ácido zoledrônico encapsulado em lipossomas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para que o objetivo principal seja atingido serão necessários alguns procedimentos intermediários, conforme descrito:

- Sintetizar por co-precipitação o BTCP;
- Sintetizar por co-precipitação a HAP;
- Utilizar celulose microcristalina para a formação de poros;
- Caracterizar o biomaterial por meio de *DRX* (Difração de Raios X) e MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura);
- Realizar porosimetria de mercúrio;
- Preparar as vesículas lipossomais encapsuladas com o fármaco ácido zoledrônico (AZ).
- Caracterizar os lipossomas em relação ao tamanho, carga e eficiência de encapsulação.
- Unir os biomateriais sintetizados com as vesículas lipossomais.

3 JUSTIFICATIVA

O grande fomento por pesquisas na área dos biomateriais está associado ao desenvolvimento humano, para que seja possível, cada vez mais, obter materiais com propriedades mais adequadas com o menor custo e, conseqüentemente, que estejam disponíveis para a maior quantidade de pessoas.

Esses biomateriais possibilitam a enxertia, pois é uma alternativa mais barata e menos invasiva quando comparada a enxertia heterogênea e a autógena, respectivamente. Além disso, a utilização de biocerâmica tem disponibilidade ilimitada e pode ser produzida comercialmente com considerável facilidade.

O desenvolvimento de uma metodologia que auxilie no surgimento de poros na HAP e no BTCP possibilita a otimização na interação entre o enxerto e o osso, fazendo com que a propriedade de osteocondução seja favorecida através da formação de arcabouços com interconectividade.

A utilização do fármaco ácido zoledrônico agrega o propósito de estimular a osteoindução, isso porque ele é responsável por fazer com que as células de reabsorção (osteoclastos) fiquem em atividade reduzida, enquanto que as células de multiplicação cresçam mais rapidamente.

Aliando as duas características, é possível se obter um material inédito com as propriedades mais favoráveis: um material com excelente biocompatibilidade que favoreça mais rapidamente a recuperação do paciente, diminuindo assim, o tempo de recuperação.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 BIOCERÂMICA

A ciência e a engenharia de materiais tem como missão trazer praticidade e benefícios em diversos campos de atuação. O principal objetivo dos pesquisadores ligados à essas áreas é o de entender e conseguir alcançar as propriedades requeridas para determinada aplicação. Dentre os materiais pesquisados, eles podem ser divididos em três grandes grupos: metais, cerâmicos e polímeros. Essa divisão é determinada pelas diferentes estruturas e composição dos materiais (CALLISTER, 2008).

Dentre os estudos mais importantes nas diferentes áreas de materiais estão àqueles relacionados à área médica, são denominados biomateriais. Segundo Pires (2015), eles podem ser aplicados em dispositivos biomédicos, materiais implantáveis, dispositivos para liberação de fármacos, órgãos artificiais, curativos, etc.

As biocerâmicas tem elevada importância nessa vertente, já que elas podem favorecer o crescimento celular quando utilizadas na regeneração de partes do corpo humano. Geralmente são obtidas através de processos que garantem uma alta porosidade, a fim de proporcionar maior interação entre as células ósseas e a prótese ou enxerto (HE, 2018).

Para o seu uso na área de enxertia, as cerâmicas devem apresentar algumas propriedades importantes, tais como: a biocompatibilidade, que garante a especificidade em função da aplicação; a biodegradabilidade, para que haja a sua absorção pelo organismo; e a osteocondutividade, que possibilita a colonização celular, crescimento dos ossos e a vascularização sanguínea (FROES, 2019; KAWACHI, 2000).

Os enxertos são utilizados em casos de perda óssea, a fim de proporcionar um crescimento ósseo, e começaram a ser aplicados em meados de 1894 com a utilização de gesso. Posteriormente muitos estudos foram realizados na área, proporcionando um grande avanço para que, na década de 70, fossem descobertas as propriedades biocompatíveis da alumina densa para esse tipo de aplicação.

Destacam-se também entre as biocerâmicas o dióxido de titânio, a zircônia, os fosfatos de cálcio e as vitrocerâmicas para uso em enxertia e implantes (KAWACHI, 2000).

A enxertia pode ser dividida em três diferentes classes, de acordo com a natureza do material a ser enxertado. São eles: autógenos, alógenos e xenógenos. Os enxertos autógenos são retirados do próprio paciente, por isso, apresentam excelentes características de aceitação pelo organismo e uma ótima osteoindução, já que o material utilizado é genético: o problema nesse caso se dá pela limitação do tamanho da prótese. Os enxertos alógenos são extraídos de outro paciente, e mesmo tendo características do osso humano, não apresentam tanta eficácia, pois a carga genética é diferente e faz com que parte da propriedade de osteoindução seja perdida. Já os xenógenos, são enxertos obtidos por outra espécie, e a grande problemática nesse caso é a possibilidade da rejeição e a chance do paciente contrair patologias (PRECHEUR, 2007; RODOLFO, 2017).

Como solução para essa problemática foram desenvolvidos os materiais aloplásticos. Eles são de origem sintética e são produzidos industrialmente. Esses materiais devem apresentar, de forma fundamental, características próximas aos materiais biológicos que estão sendo substituídos. A principal vantagem é o menor risco de infecções e transmissão de doenças além da maior disponibilidade de material. Como os materiais de origem biológica, as biocerâmicas sintéticas apresentam características similares aos tecidos ósseos por apresentarem estrutura semelhante ao componente mineral encontrado nos ossos. Devem ser biocompatíveis e não proporcionam resposta imunológica por não apresentarem proteínas em sua composição (ABUKAWA et al., 2006), resultando em menor risco de rejeição pelo organismo (BURG; PORTER; KELLAM, 2000). As limitações são a baixa resistência a esforços mecânicos e a natureza porosa, que nesse caso eleva o risco de fraturas (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006).

Segundo Precheur (2007), para que uma cerâmica atenda bem as necessidades do paciente, ela deve possuir alguns fenômenos ortogênicos, tais como a osteoestimulação, que se caracteriza pela formação de um novo osso a partir de materiais derivados do próprio enxerto; osteoindução, que é a promoção da migração

de células formadoras de tecido ósseo, ou seja, células mesenquimais osteoprogenitoras em osteoblastos (promovendo o aumento das células de osteoblastos no local); e osteocondução, capacidade de atuar como ambiente para infiltração de osteoblastos (arcabouço).

Estudos apontam que biocerâmicas em *scaffolds* (arcabouço) apresentam bons resultados quando utilizadas como enxerto ósseo. Esses materiais apresentam biodegradabilidade, propriedades bioativas e estrutura porosa em três dimensões, que serve de suporte para a formação do novo tecido (LIU, 2004 apud OLIVEIRA, 2010). Com o intuito de estimular a migração, diferenciação e a proliferação do tecido, sua estrutura tridimensional deve ser semelhante aos meios físicos e químicos existentes no tecido saudável (VUNJAK-NOVAKOVIC; 2006; TAYLOR,2009).

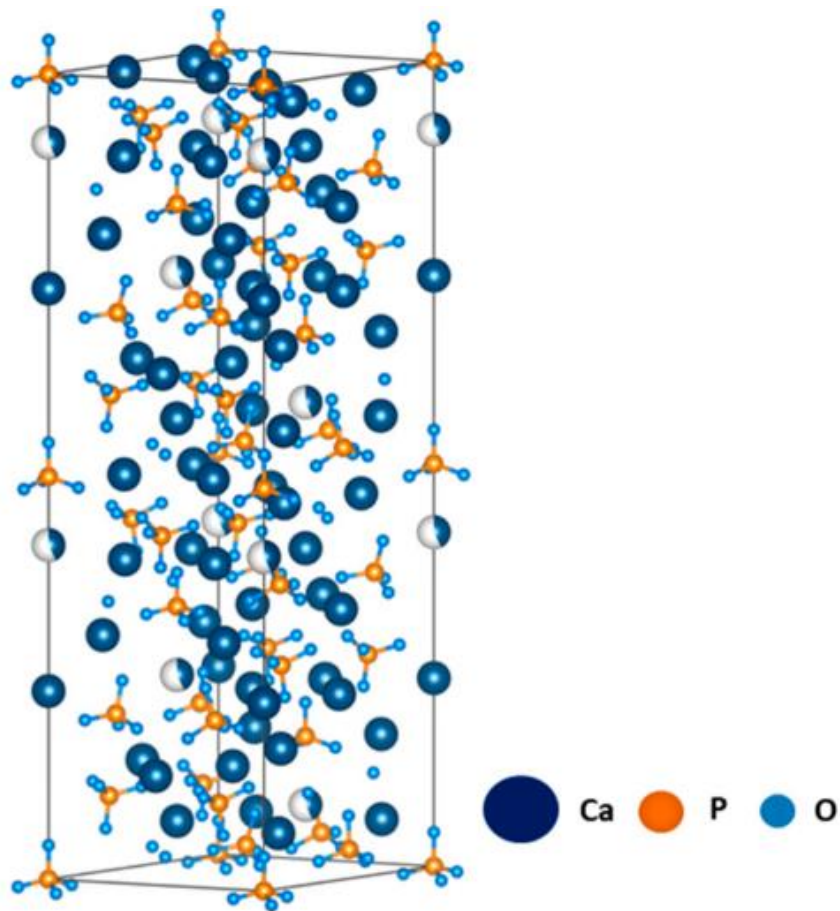
Segundo Habib (s.d.), para ser um bom substituto ósseo, o material tipo *scaffold* deve apresentar estrutura macroporosa da ordem de 50-500 μm , além de uma boa comunicação entre os poros, o que propicia boa nutrição celular e crescimento dos tecidos. A interconexão entre os poros desempenha papel fundamental no processo, permitindo adequada migração e proliferação das células ósseas, condição básica para o crescimento dos tecidos. Além do fornecimento de nutrientes, a vascularização permite a atividade das células ósseas e sua migração para o sítio de implantação (MASTROGIACOMO et al., 2006). A porosidade é uma característica dos materiais cerâmicos e está diretamente ligada ao tipo de processamento que foi submetida.

4.2 B-TRICÁLCIO FOSFATO

Dentre os principais materiais utilizados para esse fim, destaca-se o B-Tricálcio Fosfato (BTCP) (Figura 1), que pode ser produzido de maneira relativamente simples e é capaz de obter resultados significativos. Esse material pode ser aplicado na regeneração óssea na forma de pasta, pó, microesfera ou *scaffold*. Na forma de pó, o material apresenta carência de macroporos e proporciona um limitado crescimento celular. Na forma de *scaffold* convencional tem mostrado comportamento muito frágil, dificultando o corte em formatos irregulares para se encaixar em determinados sítios danificados. Assim, a forma de microesferas porosas é a que pode desempenhar

melhor propriedade em termos de resistência e proporcionar crescimento celular.

Figura 1. Estrutura do *BTCP*

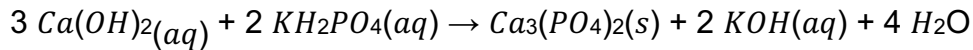


Fonte: Adaptado de Laskus, et al., 2017.

A síntese do *BTCP* pode ser realizada pelo método úmido de co-precipitação, que, é citado por Chaair et al. (2017) como o mais frequentemente utilizado. A síntese por co-precipitação consiste em reagir uma fonte de fósforo com uma fonte de cálcio em um pH controlado (CHAAIR et al., 2017).

Objetiva-se, assim como nas conclusões de Chaair (et al., 2017) obter o β -*TCP* de apatita pura com uma relação $Ca/P = 1,5$, onde o pó sintetizado tenha sido transformado em *BTCP* puro após a calcinação feita a $900^{\circ}C$.

A partir desta síntese é possível descrever a estequiometria da reação de sintetização do *BTCP*, conforme abaixo (CHAAIR et al., 2017):

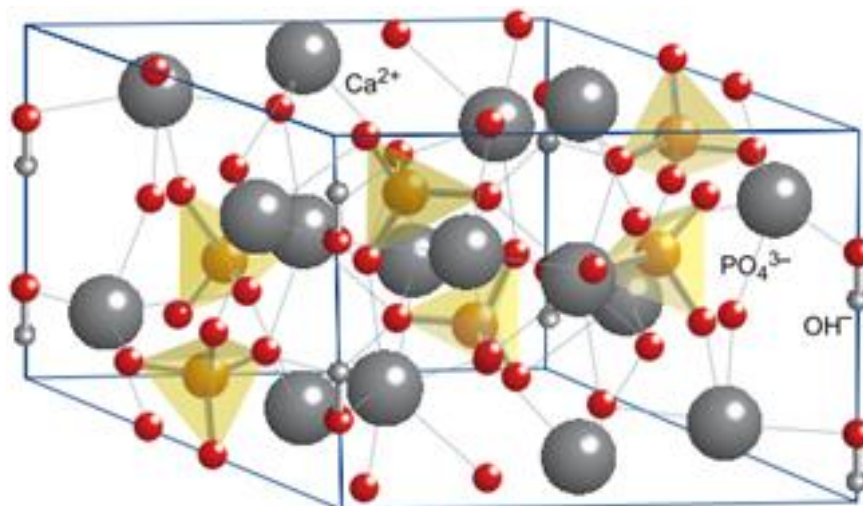


4.3 HIDROXIAPATITA

Outro material a base de fosfato de cálcio muito utilizado para enxertia óssea, é a hidroxiapatita (HAP). A HAP é uma biocerâmica amplamente conhecida devido aos seus benefícios relacionados a uma estrutura muito similar em morfologia e composição às estruturas ósseas presentes no corpo humano (SOSSA, et al., 2018). Apresenta, assim como o *BTCP*, propriedades interessantes para a enxertia óssea, tais como a sua bioatividade, biocompatibilidade e estabilidade química elevada (SARI, 2021).

Segundo Sari (2021), é possível obter esse tipo de material por diversos métodos, sendo eles: síntese por sol gel, precipitação de solução aquosa hidrotérmica e reações no estado sólido. O método mais comumente usado devido sua eficiência e ausência da necessidade do uso de solventes orgânicos é o método de síntese por precipitação via úmida, que é também um meio viável industrialmente. Esse tipo de síntese consiste em gotejar lentamente uma fonte de fosfato em uma fonte de cálcio estequiometricamente controlada na faixa de pH adequada para a formação da *HAP* (9,5-12) (SATAD-SHOJAI, et al., 2013). A estrutura obtida por meio desse processo pode ser visualizada na Figura 2.

Figura 2. Estrutura cristalina da HAP



Fonte: Weller; et al., 2018.

Mesmo com a síntese e os precursores muito similares, as duas cerâmicas (BTCP e HAP) apresentam uma diferença básica relacionada com a proporção entre Ca/P, sendo que para a HAP esse valor é de 1,67 e para o BTCP é de 1,5. Esse valor se torna altamente importante quando analisada a microestrutura, pois essa diferença é capaz de obter duas microestruturas totalmente diferentes, o que faz com que as propriedades delas sejam distintas.

Apesar de ser amplamente difundida dentre os biomateriais, a HAP apresenta uma característica que dificulta o seu uso, relacionada a baixa solubilidade, fazendo com que a sua degradação “*in vivo*” seja mais demorada do que quando comparada, por exemplo, com o BTCP. Já a BTCP possui uma desvantagem quando comparada à HAP, que é o da biocompatibilidade. Uma solução pertinente dos pesquisadores consiste em utilizar matrizes que possuam as melhores características dos materiais, ou seja: adequar misturas de BTCP/hidroxiapatita a fim de obter melhores condições de crescimento ósseo aliado com uma velocidade de degradação satisfatória (PAVINATO, 2012).

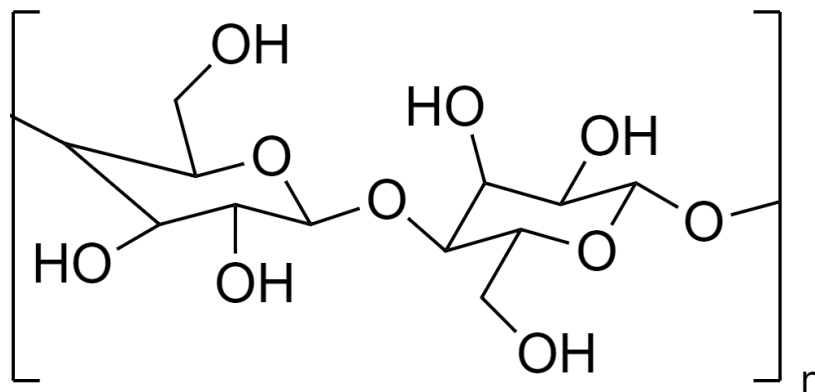
4.4 CELULOSE MICROCRISTALINA

Como já citado anteriormente, outra característica de grande valia ao obter materiais para substituição óssea, é a porosidade adequada, sendo ela de tamanho controlado e com uma boa intercomunicação. Naturalmente, através dos processos convencionais de síntese das biocerâmicas, dificilmente obtêm-se as características ideais. Para isso, faz-se necessário o uso de técnicas específicas para a geração dos poros. Dentre elas, destacam-se as técnicas com utilização de materiais de sacrifício “*in-situ*”, que consistem em adicionar uma fonte de material orgânico na fase de preparação da cerâmica; essa fonte atua como formadores de poros, pois quando a cerâmica é levada à calcinação, o material orgânico é volatilizado e gera poros no local que estava preenchido anteriormente (CARVALHO, CHINELATTO, 2021).

Por meio de estudo anterior no grupo de pesquisa do laboratório (Lab Biomol), foi possível concluir que dentre os possíveis formadores de poros e com diferentes proporções, o que melhor atendeu às expectativas foi a celulose microcristalina (CM) (FREITAS, 2020).

A celulose microcristalina é um composto obtido a partir da polpa de madeira refinada, e, segundo Toller (2005), é um material com alta versatilidade, com aplicações nas mais diversas áreas, atuando como lubrificante, adsorvente, aglutinante, diluente, etc. A celulose microcristalina tem características de biocompatibilidade, estabilidade química, acessível, fácil obtenção e boa resistência mecânica. Uma representação da estrutura da celulose pode ser encontrada na Figura 3.

Figura 3. Estrutura química da celulose microcristalina



Fonte: Autoria própria.

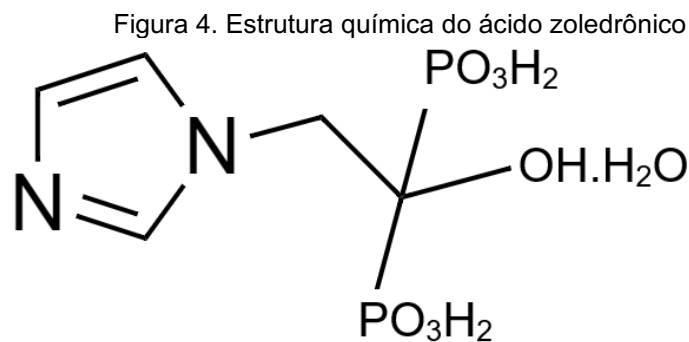
Esse material apresenta bons resultados na aplicação como material de sacrifício porque, ao ser degradado, não deixa resíduos que podem ser prejudiciais ao enxerto. Esse tipo de material possui morfologias diversificadas, fazendo com que surjam poros com diferentes interconexões, otimizando o processo da geração de sítios favoráveis ao desenvolvimento ósseo (FU et al., 2018).

O tamanho do poro gerado na microesfera do biomaterial pode ajudar na condução das células de crescimento ósseo para o interior do enxerto, o que somando assim no contato entre célula/substrato suficiente para gerar o crescimento ósseo. No entanto, ainda assim, para o paciente, o tempo de geração, crescimento ósseo e absorção é um tempo exaustivo e grande, pois podem ser gerados diversos incômodos/dores e uma maior propensão infecciosa (devido ao tempo de cura). A partir dessa problemática o estudo volta-se aos compostos capazes de ativar as células de crescimento e diminuir o tempo de recuperação do paciente (FREITAS, 2020).

4.5 ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

O osso é um material altamente complexo com atividade contínua entre diversas células, tais como os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos são células de alta atividade responsáveis por produzir a matriz óssea, composta por colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanas. Os osteócitos são osteoblastos maduros que passam a ocupar o interior das lacunas e tem importante papel na manutenção da matriz óssea; já os osteoclastos são responsáveis por regenerar o tecido (SILVA, 2015). O desequilíbrio no funcionamento dessas células podem gerar diversas doenças, tais como a osteoporose, em que há uma deficiência na quantidade de osteoblastos. Muitos fármacos são utilizadas para amenizar esses efeitos.

O ácido zoledrônico é um fármaco que possui resultados observados no tratamento de osteoporose, quando o indivíduo possui deficiência na renovação celular dos ossos, isso porque ele atua como um inibidor da reabsorção óssea através do bloqueio da atividade osteoclástica, células que são responsáveis por remodelar o osso (INJECTION LABEL, 2001). Uma representação da sua estrutura química é ilustrada na Figura 4.



Fonte: Autoria própria.

Com todos os benefícios conhecidos do fármaco, ele ainda assim pode apresentar um alto fator de toxicidade dependendo da quantidade utilizada (RÄKEL, 2011). O ideal é que esse fármaco seja sempre reabastecido com constante liberação controlada. Um dos métodos encontrados para solucionar essa barreira é o uso de *drug delivery* (liberação controlada), em que é possível, através do uso de um carreador, liberar o fármaco de forma controlada no local que necessita da operação (SCHIRALDI, 2014).

4.6 LIPOSSOMAS

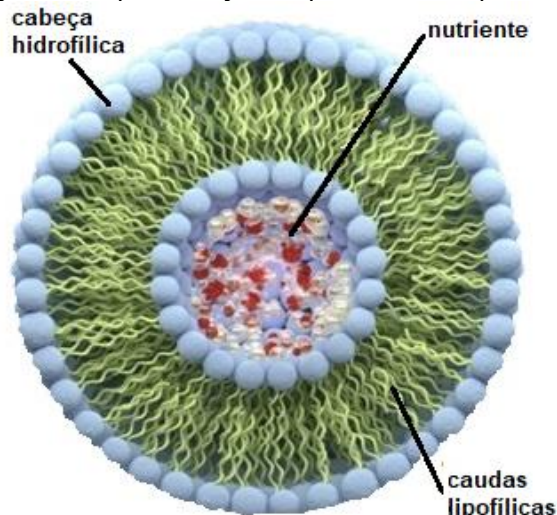
Os lipossomas são, atualmente, uma das formas mais atraentes para esse fim, onde é possível encapsular diversos tipos de substâncias que são liberadas de maneira controlada para o meio. Esse tipo de carreador é formado por vesículas que “contém uma ou mais bicamadas dispostas concentricamente em torno de um compartimento aquoso” (BATISTA, 2007). Lipossomas são formados com a utilização de fosfolípidos, esteróis e um antioxidante, e as principais formulações são obtidas através do uso de fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiélna, que possuem, geralmente, uma excelente estabilização em diversos meios (NARDOTTO, 2009). Uma representação da unidade repetitiva e uma esquematização da vesícula lipossomal estão dispostas nas Figura 5 e 6, respectivamente.

Figura 5. Representação unidade de repetição do lipossoma



Fonte: Adaptado de DRESCHER, 2020.

Figura 6. Representação esquemática do lipossoma



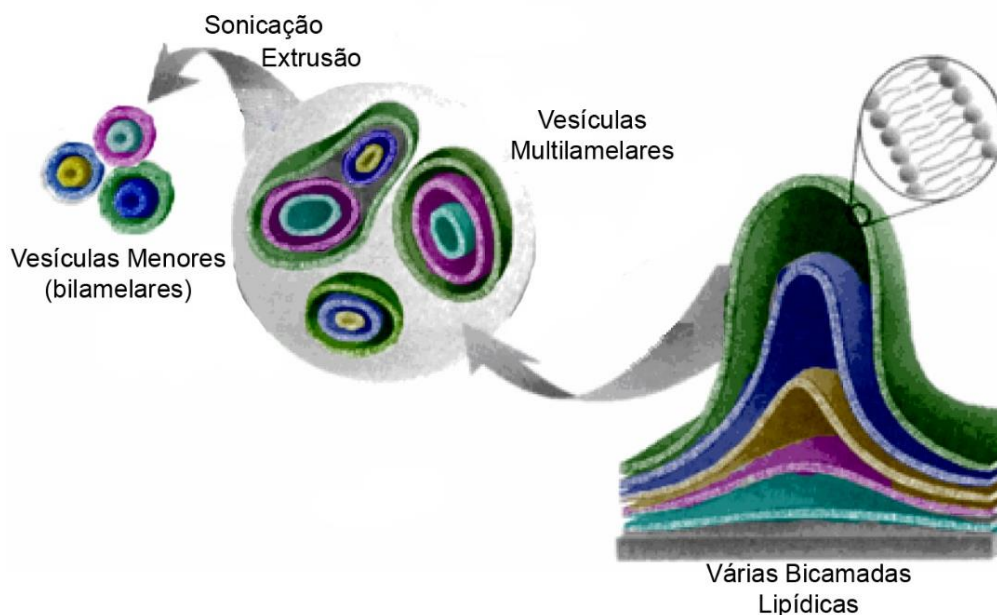
Fonte: Adaptado de Nutritional Outlook <<https://www.nutritionaloutlook.com/view/liposomes-and-nutraceuticals-crushing-bioavailability-barriers>>.

Os lipossomas podem ser divididos em algumas classificações distintas, tais como: lipossomas convencionais (são os lipossomas tradicionais, constituídos somente por fosfolípidos); lipossomas terapêuticos (lipossomas com moléculas de imagem para marcação); lipossomas ligantes de direcionamento (lipossomas com moléculas ligadas a superfície da vesícula para dar direcionamento ao alvo específico, como anticorpos) e lipossomas estabilizados estericamente (lipossomas com polietilenoglicol ligado a superfície da vesícula) (ALAVI, 2017). A diferença entre eles se dá, basicamente, pelos precursores utilizados para formar a bicamada, reagentes utilizados para alterar o comportamento/estabilidade da superfície (melhorar a interação), e aditivos que possibilitam a melhor visualização do prosseguimento do estudo de liberação.

A síntese das vesículas lipossomais pode ser obtida por diversas maneiras, tais como evaporação de fase reversa, injeção de solvente e formação de filme seco. (NEW, 1990).

Os lipossomas são obtidos na forma de vesículas grandes (multilamelares) que são então submetidas a processos como: sonicação, extrusão em membranas de policarbonato de tamanho controlado e banho de ultrassom para obtenção de vesículas menores, contendo menos camadas. Essa redução do tamanho das vesículas formadas procura garantir uma dispersão adequada para a posterior aplicação do material (SOUSA, 2007). A Figura 7 contempla uma simplificação sobre os métodos aplicados na redução de tamanho dos lipossomas.

Figura 7. Métodos de purificação de vesículas aplicados para os lipossomas



Fonte: Adaptado de SOUSA, 2007.

Assim, a encapsulação adequadas do complexo lipossomas/AZ nos poros da biocerâmica HAP ou BTCP ou HAP/BTCP, pode fornecer uma formulação com características melhoradas para o crescimento ósseo. A idéia é estimular a osteocondução através do poros interligados gerados pelo material de sacrifício. Melhorando a osteoindução através do uso do complexo lipossomas/AZ encapsulado nos poros da biocerâmica.

Continuamente o estudo desses materiais tem buscado otimizar a regeneração óssea através da possibilidade de “imitar” a nanoestrutura da apatita óssea natural, projetando diferentes tipos de topografias (LI, et al. 2020). Pesquisadores têm buscado entender a influência do tamanho de grão na efetividade do desenvolvimento ósseo nas estruturas *scaffolds* (JUNIOR, et al. 2021; FREITAS, 2020).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados no presente trabalho e as metodologias são apresentados nos tópicos abaixo.

5.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados para o estudo e os seus fabricantes são listados na Tabela 1. Todos os materiais utilizados não passaram por nenhum tipo de purificação prévia.

Tabela 1. Lista das matérias primas utilizada nos experimentos

Matéria prima	Fabricante
Celulose Microcristalina	Mingtai
Fosfato de potássio monobásico PA	Cinética Reagentes & Soluções
Óxido de Cálcio PA	Biotec Reagentes Analíticos
Colesterol	Sigma Life Science
Fosfatidilcolina de Soja	Lipoid
Ácido Zoledrônico	Sigma-Aldrich
Clorofórmio PA	Synth
Hidróxido de Sódio 0,1M	Synth

Fonte: Autoria própria

Os equipamentos necessários para a síntese dos materiais e caracterização foram utilizados no diversos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná e laboratórios da Universidade Estadual de Londrina, e são descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Lista dos equipamentos utilizados na preparação dos materiais

Equipamento	Marca
Agitador Magnético	Fisatom 752A-UTFPR
Forno	Nabertherm LHT 02/17 LB Speedf
Ultrassom	Schuster
Vortex	Global Trade Technology
Extrusora	Avanti Polar Lipids, Inc.
Membrana de PC	GVS
Espectrofotômetro UV-Vis	Libra Biochromem
Centrífuga	Eppendorf MiniSpin
Analizador de Partícula	LITESIZER 500
Microscópio Eletrônico de Varredura	FEI Quanta 200
DRX	Bruker D2 Phaser
Porosímetro de Mercúrio	Micromeritics <i>Autopore IV</i>

Fonte: Autoria Própria.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Síntese do B-tricálcio fosfato poroso

A BTCP foi sintetizada pelo método úmido de co-precipitação (ARCOS, 2014), com uma razão estequiométrica de Ca/P de 1,5.

Em um béquer adicionou-se 4,38 g de fosfato de potássio monobásico em 200 mL de água, que foi misturado em agitador magnético por 10 minutos. À essa solução e à solução de HAP, adicionou-se também 5,00 g de celulose microcristalina (CM) para atuar como formador de poros. A CM foi adicionada nesse momento pois gera maior quantidade de poros intragranulares, interferindo diretamente na síntese da biocerâmica. Em seguida, foi preparada a solução de hidróxido de cálcio, contendo 2,71 g de óxido de cálcio diluído em 200 mL de água.

A solução de hidróxido de cálcio foi gotejada lentamente à solução de fosfato de potássio sob agitação. Após a síntese, a solução contendo a BTCP obtida foi filtrada e seca em estufa por 24 h a 60°C.

O pó sintetizado foi submetido a tratamento térmico no forno de forma a se obter o BTCP cristalino conforme o ciclo de aquecimento que pode ser observado na Figura 8. O material foi aquecido a uma taxa de 1°C/min até que atingisse 800°C, posteriormente, se manteve uma taxa de 5°C/min até 1100°C, temperatura em que a amostra se manteve em isoterma por 1 h.

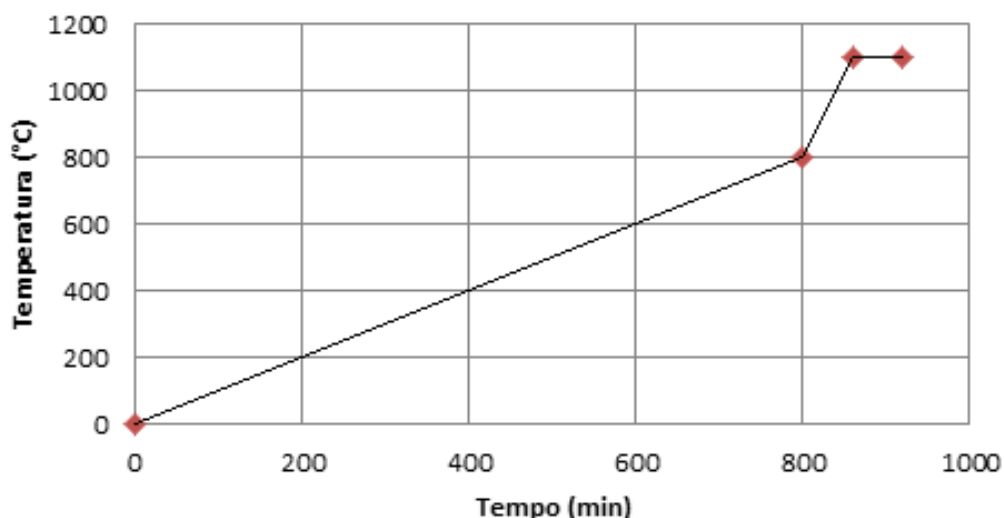
5.2.2 Síntese da hidroxiapatita porosa

Similar à técnica de obtenção de BTCP, a hidroxiapatita foi obtida utilizando os mesmos precursores, entretanto em razão Ca/P 1,67. Primeiramente, em um béquer, pesou-se 2,79 g de CaO e 5,01 g de CM que foram posteriormente dissolvidos em 200 mL de água destilada com o auxílio de agitador magnético. Em outro béquer, foi pesado 4,06 g de KH_2PO_4 que foi dissolvido em 200 mL de água usando o ultrassom.

A solução de KH_2PO_4 foi gotejada à solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ lentamente com o auxílio de uma bureta. Depois da completa reação, foi desligada a agitação e aguardou-se a decantação do pó.

O pó foi filtrado e levado à estufa por 24 h a 60°C para a completa secagem do material. Depois de seco, o pó foi submetido a tratamento térmico no forno. Do mesmo modo da BTCP, descrito na Figura 8.

Figura 8. Representação da rampa de aquecimento



Fonte: Autoria própria.

5.2.3 Preparação da HAP:BTCP

Para a preparação da mistura dos materiais cerâmicos, foi pesado cada uma das cerâmicas na proporção de 1:1, ou seja, foram pesados 10 mg de HAP e 10 mg de BTCP, que foram misturados mecanicamente em um recipiente de vidro esterilizado e armazenados para posterior utilização.

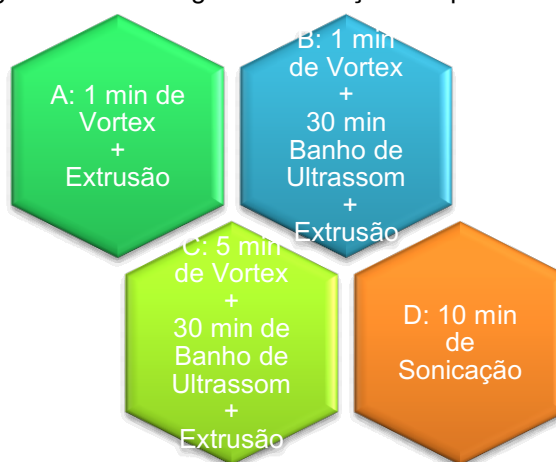
5.2.4 Preparação das vesículas lipossomas e encapsulamento de AZ

Foi preparada uma solução estoque de ácido zoledrônico (AZ) em tampão fosfato (0,05 mM, pH 7,4) na concentração de 1 mM utilizando o Vortex por 2 minutos. Para isso, em um béquer foi pesado 0,0029 g de AZ e foi adicionado 500 µL de hidróxido de sódio 0,1 M (NaOH), a fim de melhorar a solubilidade do fármaco (NOVARTIS FARMA, s.d.), e, após a completa solubilização, adicionou-se 9,5 ml de solução tampão para a posterior utilização nos lipossomas. O tampão foi utilizado para simular um ambiente próximo às condições de pH do sangue.

Para a preparação das soluções estoques de lipídeos em clorofórmio, foi utilizada uma concentração de 65 mM para a solução de SPC (fosfatidilcolina de soja) e 10 mM para colesterol. Esses lipídeos foram escolhidos afim de gerar lipossomas estáveis.

Os lipossomas foram preparados a partir de filmes lipídicos (LOMBARDO, 2022). Para a preparação do filme lipídico quantidades de SPC e colesterol na proporção 7:3 foram misturados. O clorofórmio foi evaporado em temperatura ambiente dando origem ao filme lipídico. O filme foi ressuspendido com 1 mL da solução estoque de AZ 1 mM obtida anteriormente, fornecendo uma mistura lipossomas/AZ 1:1 (1 mM). Algumas metodologias de preparação dos lipossomas/AZ foram utilizadas e estão esquematizadas na Figura 9. O banho de ultrassom diz respeito à uma intensidade inferior quando comparada à sonicação, já que nesse caso a ponteira do equipamento atinge diretamente o material.

Figura 9. Metodologias de obtenção de lipossomas/AZ



Fonte: Autoria própria.

No método A, a solução lipossomas/AZ foi levada ao vortex por 1 min, e após, sujeita à extrusão, com 26 ciclos de passagem pela membrana de polycarbonato de 0,4 μm com o auxílio de uma mini extrusora.

No método B, a solução lipossomas/AZ foi levada ao vortex por 1 min e submetida ao banho de ultrassom por 30 minutos a 25°C e, assim como no método anterior, submetida à extrusão. O método C foi realizado de maneira similar ao método B, variando apenas o tempo em que a amostra foi submetida ao vortex (5 min).

O método D a solução lipossomas/AZ foi levada a sonicação com 100% de amplitude com 1 min de funcionamento e 1 min de descanso em banho de gelo pelo tempo

total de 20 min.

5.2.5 Incorporação do AZ livre na HAP porosa

Inicialmente se preparou uma suspensão de HAP contendo 40 mg em 1 mL de água destilada com 1 mL de AZ (1 mM). A mistura foi agitada por 20 h em agitador magnético. Outro experimento também foi realizado submetendo a mistura ao banho de ultrassom por 30 min, após 20h de agitação.

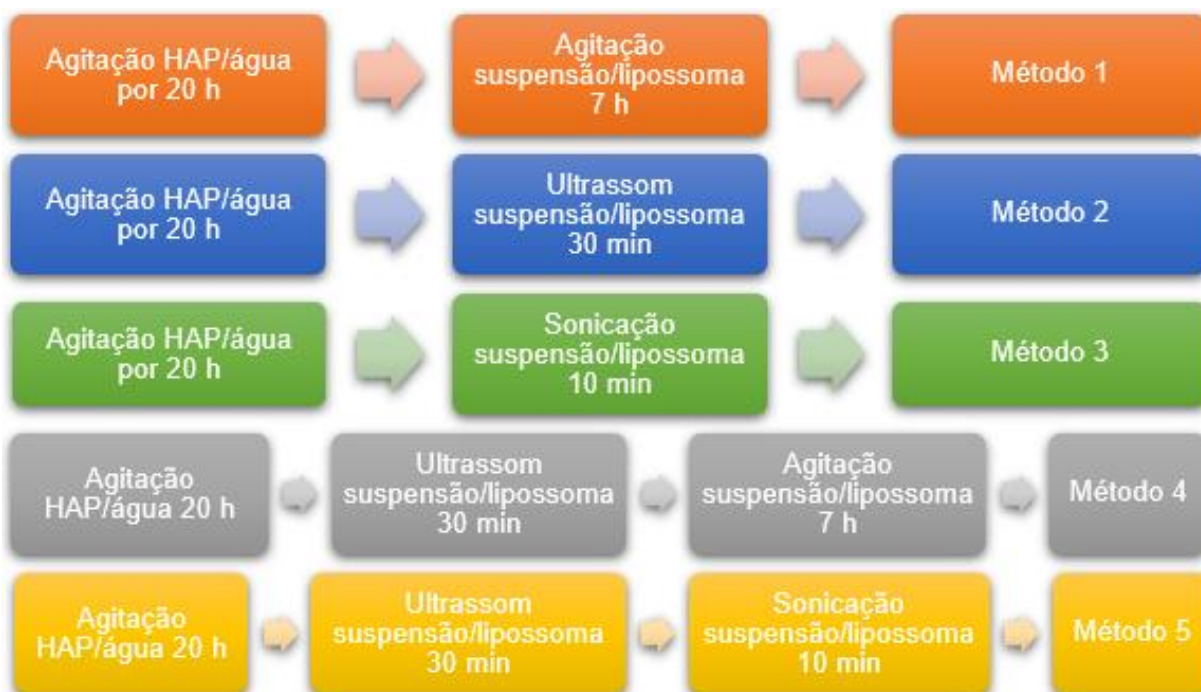
5.2.6 Encapsulação das vesículas lipossomais/AZ na cerâmica porosa (HAP ou BTCP).

Após a síntese dos materiais precursores (cerâmica porosa e lipossomas), diferentes metodologias foram realizadas para o encapsulamento do complexo Lipossomas/AZ nos poros da HAP. A metodologia que apresentou melhor resultado foi testada posteriormente com BTCP e HAP/BTCP (1:1).

Para realização dos testes foi utilizada uma suspensão de 40 mg/mL de cerâmica e complexo lipossoma/AZ (1 mM:1 mM). Em todos os testes, a proporção de suspensão cerâmica/lipossoma foi de 2:1 (mL:mL).

A Figura 10 exibe as metodologias utilizadas para o encapsulamento do complexo lipossomas/AZ nos poros da HAP.

Figura 10. Metodologias para incorporação do complexo lipossomas/AZ nos poros da HAP



Fonte: Autoria própria

Em todos os métodos testados, inicialmente foi preparada uma suspensão de HAP contendo 40 mg de cerâmica em 1 ml de água destilada que foi agitada por 20 h em agitador magnético. Após, adicionou-se à suspensão, 0,5 mL do complexo lipossoma/AZ 1 mM. No método 1, a suspensão foi misturada com o lipossoma através da utilização de um agitador magnético por 7 h.

O método 2 a suspensão de HAP com lipossoma foi submetida ao banho de ultrassom por 30 min.

No método 3, a suspensão de HAP com lipossoma foi submetida à sonicação por 10 minutos. Os métodos 4 e 5 seguiram de forma similar, entretanto realizados de maneira combinada. No método 4, a HAP em água foi agitada por 20 h, a suspensão de HAP foi misturada com Lipossomas/AZ, e, após, foi levada para o banho de ultrassom e agitação por 7h. No método 5, a suspensão foi levada ao banho de ultrassom e sonicada por 10 min (Figura 10).

5.3 CARACTERIZAÇÕES

5.3.1 Difração de raios X (DRX)

Para a realização do ensaio de avaliação da estrutura cristalina obtida para as biocerâmicas, foi utilizado o método de difração de raios x nas seguintes configurações: fonte de radiação de cobre, com o parâmetro 2θ graus variando de 20° a 80° , velocidade de $0,03^\circ/s$ e fenda (*slit*) de 0,2 mm.

5.3.2 Porosimetria de Mercúrio

No ensaio de porosimetria de mercúrio, um líquido não molhante (mercúrio) é forçado a adentrar as estruturas porosas através da aplicação de pressão. Com um controle rigoroso, é possível determinar o volume introduzido/pressão aplicada e, assim, determinar o tamanho de poros da estrutura, que é inversamente proporcional a pressão necessária para introduzir o mercúrio (MICROMERITICS, s.d.).

A porosimetria de mercúrio foi realizada nas amostras com um penetrômetro modelo 16 para inserção do mercúrio nos poros. Dentre os parâmetros do penetrômetro utilizado, a constante de penetração utilizada foi de $22,065 \mu\text{L/pF}$, o volume do tubo capilar (*stem*) de 1,1900 mL, o volume penetrado de 3,8970 mL, a massa penetrada de 60,0390 g, e a pressão máxima utilizada de 4,6800 psi.

Já os parâmetros utilizados em relação ao mercúrio introduzido foi, durante o período de baixa pressão, a pressão de evacuação de $50 \mu\text{mHg}$ durante 5 minutos, com pressão de preenchimento de 0,52 psi, e tempo de equilíbrio de 300 segundos. Já durante o período de alta pressão, o tempo de equilíbrio foi 300 segundos.

5.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura para possibilitar a visualização da morfologia do pó sintetizado, para isso, foi necessária a realização de deposição de uma camada de ouro por *sputtering*, passo necessário para análise de materiais não condutores.

5.3.4 Espectroscopia UV-Visível

A eficiência de encapsulação do AZ em lipossomas foi determinada utilizando a técnica de UV/Vis nas amostras após ultrafiltração/ultracentrifugação (Millipore, USA, ME Cut-off 10,000Da). Uma quantidade de 400 µL da amostra foi colocada no filtro e levada para ultracentrifugação (13000 rpm). A quantidade de fármaco que passou através do filtro foi quantificada utilizando espectrofotometria de UV com comprimento de onda de 210 nm. O cálculo de eficiência foi realizado através da Equação 1:

$$\% \text{ Fármaco}_{\text{encapsulado}} = \frac{(C_i - C_x)}{C_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que C_i e C_x representam, respectivamente, as concentrações iniciais e a analisada.

Para obter a quantidade de fármaco encapsulado na vesícula lipossomal foi realizada uma curva de calibração do AZ utilizando diferentes concentrações (0,08-0,22mM) em solução tampão (Espectrofotômetro UV/Vis).

5.3.5 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta

O espalhamento dinâmico de luz (do inglês *dynamic light scattering* - DLS) é uma técnica que permite a determinação do tamanho médio das partículas e a distribuição do tamanho dessas partículas em dispersão. (HALLETT, 1994).

A distribuição de tamanho dos lipossomas presentes nas amostras foi medida a partir alíquotas de 600 µL de concentrações 1 mM em um aparelho LITESIZER 500 – Anton Paar).

O estudo do potencial zeta do material é de extrema importância para a determinação da estabilidade da suspensão analisada, isso porque ele representa a magnitude de atração/repulsão entre as cargas das partículas e as cargas do meio em que elas estão dispersas. O ensaio foi realizado diluindo a amostra em solução tampão, foi utilizada a célula de medida Omega cuvette Mat.No. 225288 com o fator de Henry de 1,5 (Smoluchowski).

5.3.6 Espectroscopia UV-Visível para quantificação de lipossoma/AZ incorporada à cerâmica

Para a determinação da quantidade de lipossoma/AZ adsorvida, primeiramente, o complexo contendo cerâmica, lipossoma/AZ foi submetido a uma centrifugação por 10 min (8000 rpm), fazendo com que a cerâmica fosse depositada no fundo do *ependorf* (HENGST, 2007). A solução sobrenadante foi submetida à ultracentrifugação em um filtro de maneira similar à citada (item 5.3.4), que possibilitou o cálculo da eficiência de encapsulação. Isso porque utilizou-se a curva de calibração para posterior comparação entre a solução obtida após incorporação x solução contendo apenas AZ com a utilização da técnica de análise por UV-Vis.

A Equação 2 representa o método utilizado para quantificar a porcentagem de sucesso na incorporação do complexo.

$$\% \text{ Complexo adsorvido} = \frac{(C_i - C_x)}{C_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que C_i e C_x representam, respectivamente, as concentrações iniciais (curva de calibração) e a analisada (obtida através de ultracentrifugação do complexo contendo cerâmica/lipossoma/AZ).

O efeito de encapsulação entre a cerâmica e AZ, foi realizado submetendo a uma centrifugação por 10 min (8000 rpm), fazendo com que a cerâmica fosse depositada no fundo do *ependorf*. O sobrenadante (AZ) foi então quantificado utilizando a técnica de espectrofotometria de UV-Vis.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DAS BIOCERÂMICAS COM E SEM TRATAMENTO

Para o desenvolvimento da formulação HAP, BTCP e HAP/BTCP 50:50 carregando as vesículas lipossomais com AZ encapsulado foi necessário melhorar a porosidade das cerâmicas. Esse processo de melhoria não só contribui para a encapsulação das vesículas lipossomais, como também serve de arcabouço (*scaffolds*) para o crescimento celular.

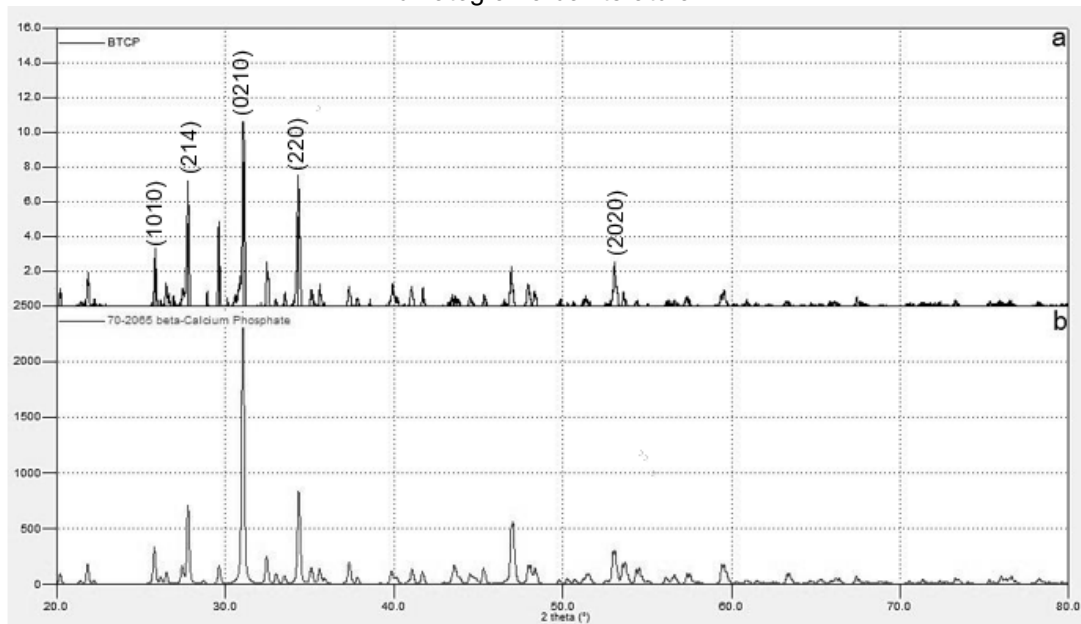
O primeiro passo foi a síntese de cada cerâmica. Durante o processo de síntese foi realizado a mistura *in situ* da celulose microcristalina (CM) como material de sacrifício na HAP e na BTCP.

O material cerâmico obtido foi seco em estufa e levado para o forno, que objetivou aumentar o grau de cristalinidade. Além disso, o tratamento térmico da amostra promoveu a decomposição do material orgânico (CM) que foi misturado *in situ* para promover a formação dos poros.

Após sinterização foi realizada a caracterização da BTCP e HAP. O primeiro teste foi a análise por difração de raios X. Nas Figuras 11 e 12 estão os difratogramas que se referem ao BTCP e a HAP e os seus respectivos padrões encontrados na literatura.

Com as análises feitas nos difratogramas obtidos, foi possível perceber que o método de síntese escolhido para obtenção de ambas cerâmicas foi eficiente. A Figura 11 mostra os picos cristalinos da BTCP, onde se observa que os picos da BTCP sintetizada (Figura 11a) foram muito similares aos encontrados na ficha cristalográfica do BTCP.

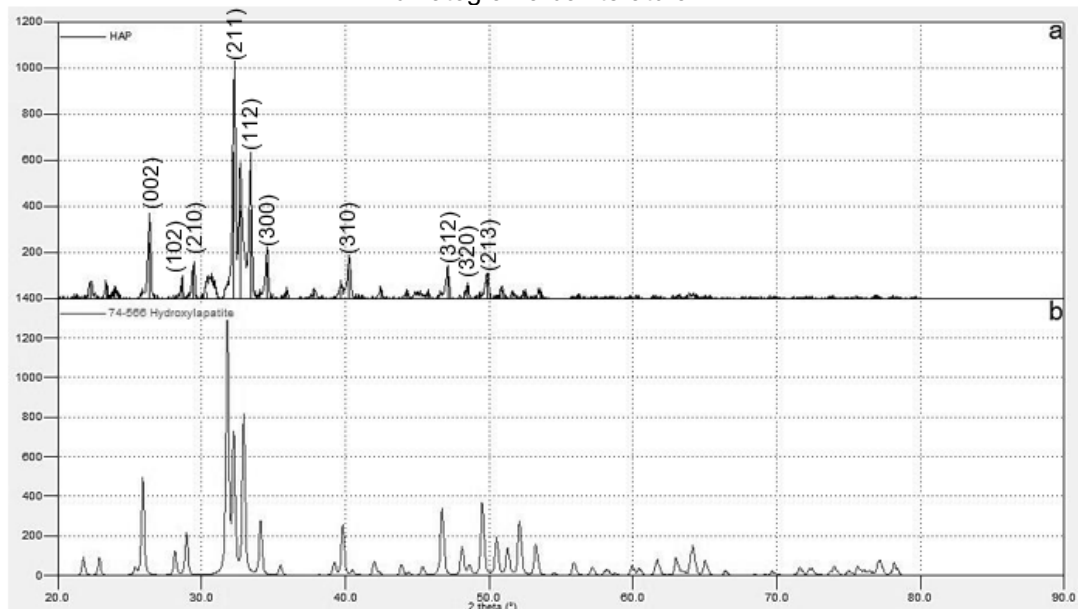
Figura 11. Difratoograma de raios X da amostra de BTCP, em que: (a) difratoograma experimental; (b) difratoograma da literatura



Fonte: Autoria própria.

Assim como no difratoograma do BTCP, os picos da HAP obtida através da metodologia utilizada foram comparados à ficha cristalográfica da HAP e também apresentou alta pureza e picos bem definidos (Figura 12a).

Figura 12. Difratoograma de raios X da amostra de HAP, em que: (a) difratoograma experimental; (b) difratoograma da literatura



Fonte: Autoria própria.

Após ter obtido os materiais com as fases cristalinas desejadas, as amostras foram caracterizadas utilizando a técnica de porosimetria de mercúrio para quantificação dos poros obtidos. Foram analisadas quatro amostras: BTCP sem formador de poros, BTCP poroso, HAP sem formador de poros e HAP. Uma importante comparação entre os materiais analisados está disposta na Tabela 3.

Tabela 3. Comparativo entre os resultados obtidos na porosimetria de mercúrio para HAP, HAP porosa, BTCP e BTCP porosa. Em que: (A) Pressão aplicada, (B) Porcentagem de intrusão de mercúrio e (C) Diâmetro de poro

HAP			BTCP			BTCP Poroso			HAP Porosa		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0,5	0,0	349,6	0,0	0,0	349,8	0,5	0,0	349,3	0,5	0,0	349,6
1,0	2,3	181,8	1,0	4,0	182,1	1,0	6,1	177,9	1,0	2,9	186,2
2,0	10,2	91,3	2,0	10,8	90,7	2,0	21,7	89,8	2,0	16,1	90,8
4,0	17,0	45,4	4,0	15,5	45,5	4,0	33,3	45,4	4,0	25,4	45,4
8,0	26,1	22,6	8,0	23,3	22,7	8,0	45,3	22,7	8,0	36,4	22,7
16,0	68,2	11,3	16,0	53,2	11,3	16,0	55,9	11,3	16,0	50,6	11,3
30,0	84,0	6,0	30,0	84,8	6,0	30,0	67,0	6,0	30,0	82,5	6,0
58,9	90,1	3,1	58,5	93,3	3,1	58,4	75,3	3,1	58,5	89,1	3,1
98,9	94,0	1,8	98,7	97,3	1,8	98,3	87,6	1,8	98,8	94,2	1,8
128,1	95,5	1,4	128,6	98,7	1,4	129,4	91,7	1,4	128,2	95,8	1,4
168,1	96,6	1,1	168,4	99,5	1,1	168,1	94,6	1,1	168,4	96,8	1,1
217,1	97,5	0,8	217,9	99,8	0,8	218,0	96,5	0,8	217,1	97,3	0,8
283,6	98,2	0,6	283,1	100,0	0,6	283,1	98,0	0,6	283,6	97,7	0,6
368,9	98,7	0,5	369,7	100,0	0,5	368,7	99,0	0,5	369,2	98,0	0,5
479,6	99,1	0,4	480,7	100,0	0,4	481,0	99,5	0,4	480,3	98,6	0,4
627,5	99,5	0,3	626,3	100,0	0,3	626,9	99,8	0,3	627,7	99,5	0,3
813,4	99,7	0,2	813,3	100,0	0,2	813,7	99,9	0,2	812,6	99,9	0,2
1058,4	99,9	0,2	1058,4	100,0	0,2	1057,8	100,0	0,2	1058,0	99,9	0,2
1375,6	99,9	0,1	1376,9	100,0	0,1	1376,4	100,0	0,1	1376,0	99,9	0,1
1789,9	100,0	0,1	1791,0	100,0	0,1	1791,0	100,0	0,1	1789,9	100,0	0,1

Fonte: Autoria própria.

Analisando os dados da Tabela 3 é possível inferir que o material que mais se aproxima das condições ideais (com poros interligados, tamanhos variados) para esse tipo de aplicação é a HAP, pois é necessária uma pressão de 1789,86 psia (maior pressão dentre o comparativo) para que o mercúrio seja completamente intruído nos poros do material, ou seja, ele possui os menores valores absolutos de diâmetro do poro. A HAP porosa e não porosa apresentaram valores similares no que tange à respeito da quantidade de poros menores, porém, foi obtido um valor mais distribuído dentre essa faixa, indicando que a CM fez diferença na distribuição de tamanhos menores do material, e podem ser vistos nas Figuras 13 e 14.

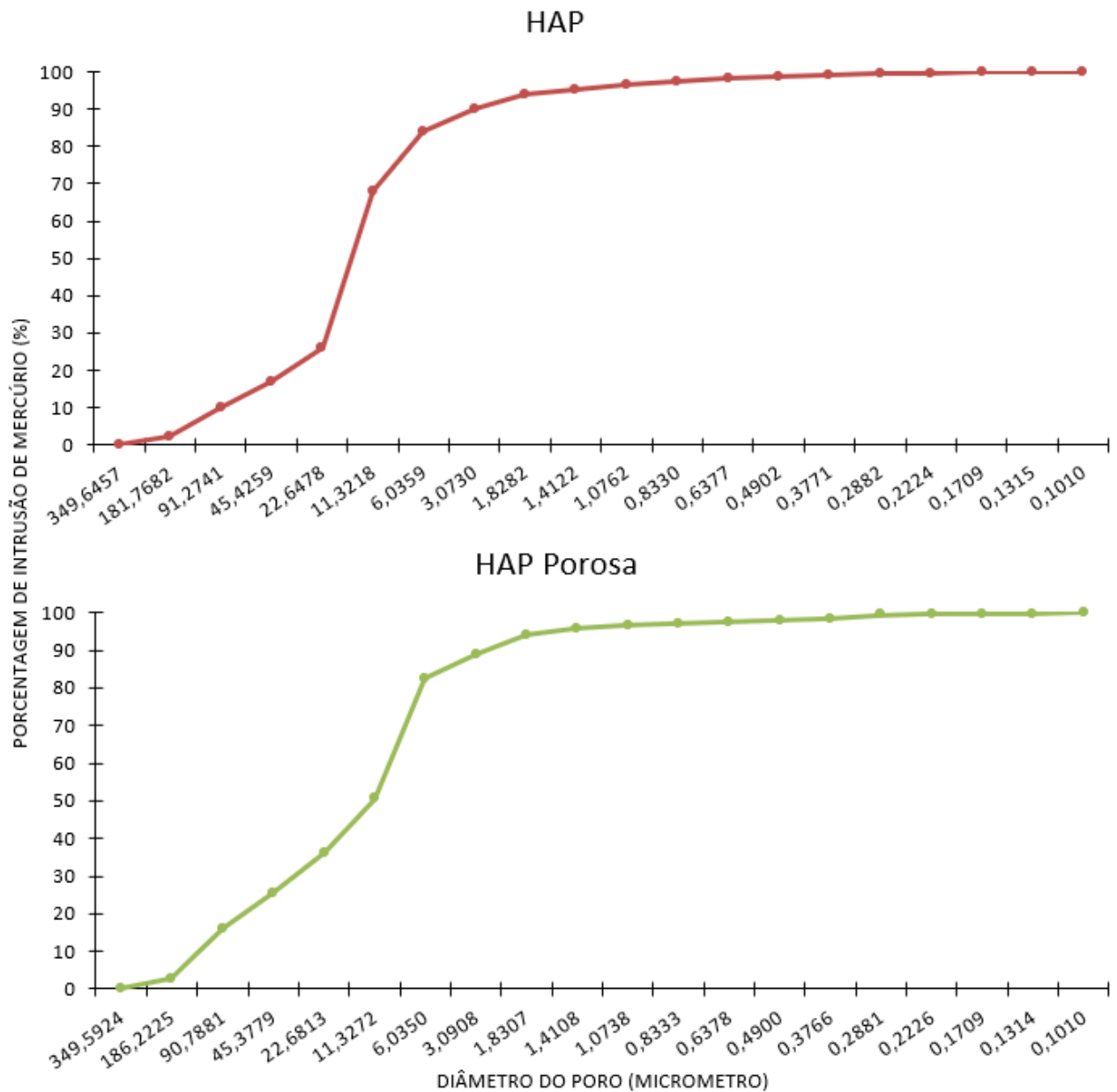
Na Tabela 3, é possível perceber também a importância da celulose microcristalina

no processo de síntese dos materiais para o surgimento de poros, já que, no material sintetizado sem CM, todos os poros são atingidos com a pressão de 283,12 psi, enquanto que no BTCP sintetizado utilizando o material de sacrifício (CM), nessa mesma pressão, ainda restam aproximadamente 2% de poros que não “receberam” o mercúrio intruído.

Esse tipo de porosidade detectada em altas pressões são comumente chamadas de “porosidade intragranular”, que é de extrema importância para que haja uma intercomunicação entre os grãos do material, acelerando o processo de recuperação óssea.

Analisando os resultados do gráfico de porcentagem de intrusão cumulativa pelo diâmetro do poro (Figura 13) para HAP não porosa, é possível inferir que aproximadamente 10% dos poros são maiores que 100 μm , 60% se encontram na faixa de 10-100 μm , 27% estão na faixa de 10-1 μm , e apenas 3% dos poros são menores que 1 μm . Já para a HAP porosa, conclui-se que cerca de 15% dos poros encontrados no material são maiores que 100 μm , 40% se encontram na faixa de 10-100 μm , 42% estão na faixa de 10-1 μm , e apenas 3% dos poros são menores que 1 μm . Ou seja, um comparativo dentre as duas biocerâmicas é possível perceber que a CM gerou um impacto com relação à distribuição do tamanho de poros, em que, na HAP porosa tem-se uma distribuição mais uniforme dentre toda a faixa de tamanhos de poros.

Figura 13. Gráfico de porcentagem cumulativa de intrusão x diâmetro do poro para HAP



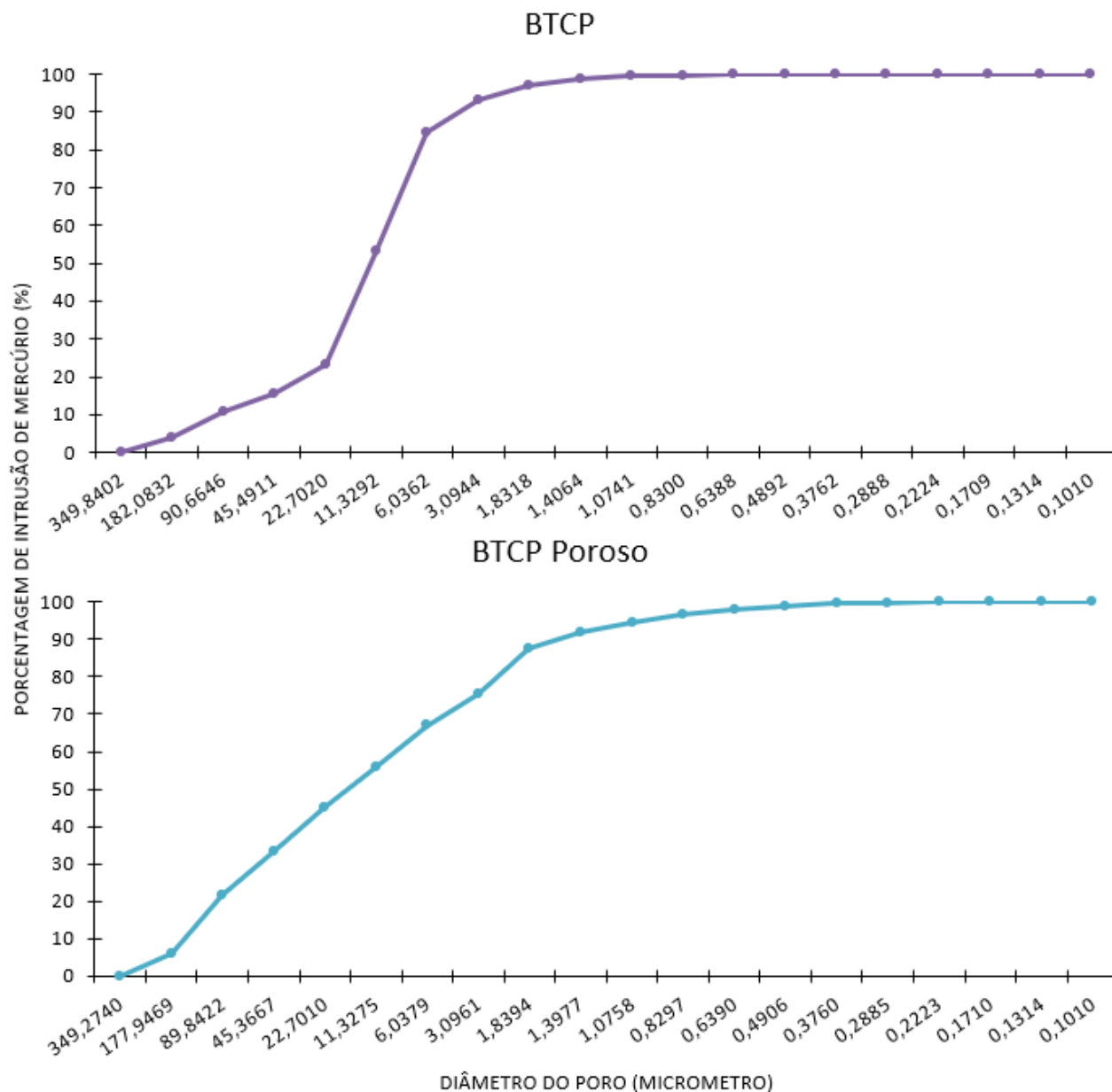
Fonte: Autoria própria.

Quanto ao perfil da curva do BTCP não poroso, observado na Figura 14, é encontrado um padrão similar à HAP não porosa, com 9% dos poros maiores do que 100 µm, 59% na faixa de 100-10 µm, 31% com diâmetros entre 10-1 µm, e 1% com diâmetros menores que 1 µm.

Nos resultados obtidos do BTCP Poroso, observa-se um perfil de poros maiores quando comparado a HAP Porosa, isso porque, aproximadamente 20% dos poros se

encontram com diâmetros maiores que 100 μm , 38% na faixa de 100-10 μm , 37% com diâmetros variando entre 10-1 μm , e 5% com diâmetros menores que 1 μm .

Figura 14. Gráfico de porcentagem cumulativa de intrusão x diâmetro do poro para BTCP



Fonte: Autoria própria

Com os resultados observados da porosimetria de mercúrio, é possível afirmar também que, embora o BTCP poroso possua maior quantidade de poros menores que 1 μm , a HAP porosa possui os menores diâmetros de poros encontrados no comparativo

entre os diferentes materiais. A Tabela 4 reúne os dados de porcentagem de porosidade em cada faixa de diâmetro de poros para comparação.

Tabela 4. Comparativo entre a porcentagem de poros x tamanho de poros

Diâmetro dos Poros	HAP (%)	HAP Porosa (%)	BTCP (%)	BTCP Poroso (%)
>100 μm	10	15	9	20
10-100 μm	60	40	59	38
10-1 μm	27	42	31	37
<1 μm	3	3	1	5

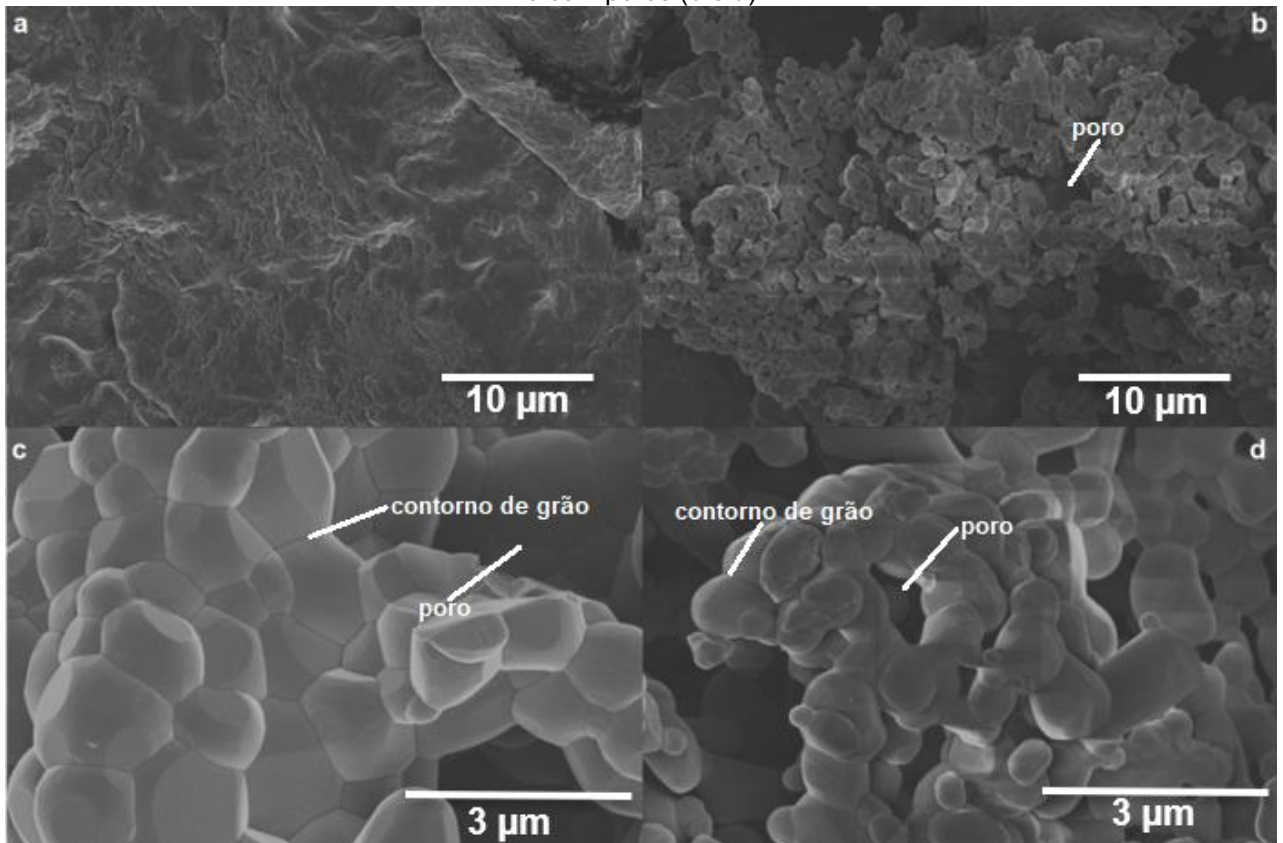
Fonte: Autoria própria

A CM se mostrou mais impactante na cerâmica contendo o BTCP, já que, a diferença de valores em cada faixa de diâmetro entre os materiais porosos e não porosos foi maior quando comparada à HAP. Em ambos os materiais, com a adição de CM houve uma mudança brusca com relação a distribuição dos poros, sendo que, o aditivo permitiu um melhor arranjo entre os tamanhos, o que pode possibilitar uma melhor vascularização no sistema e recuperação óssea mais rápida.

As amostras foram caracterizadas por MEV para verificação de sua morfologia. Foram feitos 3 comparativos: o primeiro diz respeito ao BTCP com e sem CM. O segundo a comparação entre HAP com e sem CM. Nessa comparação, é possível observar as diferenças que o material de sacrifício pode proporcionar à estrutura cristalina. No terceiro comparativo, tem-se a HAP e BTCP porosos e a mistura entre esses dois materiais.

A Figura 15 ilustra as imagens do BTCP poroso e não poroso. Em ambas ampliações, é possível perceber claramente a diferença entre os dois materiais, em que, nas Figuras 15 a e c onde não foi adicionado o material orgânico (sem formadores de poros), os grãos se encontram totalmente ligados e com ausência de poros. Analisando a Figura 15 b e d (com formador de poros), é possível notar que há uma grande quantidade de poros intergranulares, representando que a técnica de formação de poros via material de sacrifício é eficaz.

Figura 15. Resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura no BTCP sem poros (a e c) e com poros (b e d)

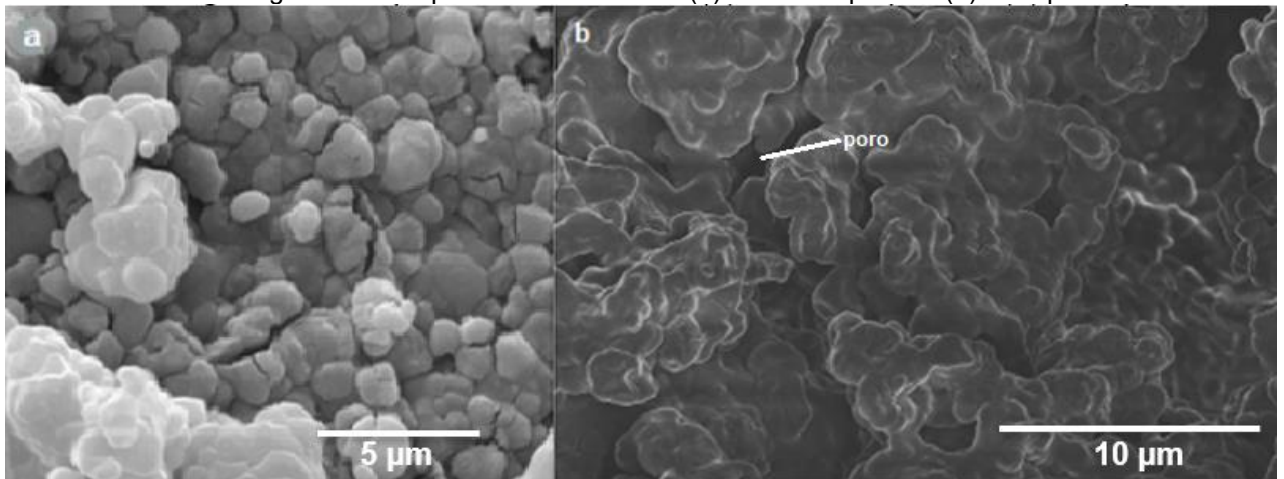


Fonte: Autoria própria.

É possível inferir também que a utilização do material de sacrifício CM altera em partes a morfologia dos grãos, que ficam levemente mais arredondados e menores, que pode facilitar a migração óssea devido ao aumento de superfície de contato, alterando também as propriedades mecânicas do material. Nesse caso, o material de sacrifício serve como uma barreira para o crescimento dos grãos na cerâmica, fazendo com que os materiais que tenham esse aditivo, apresentem menor tamanho de grão.

Para o MEV da HAP sem e com poros (Figura 16), observa-se que a CM altera drasticamente a morfologia do material, pois no caso da HAP sem poros (Figura 16 a) tem-se os grãos mais bem definidos, enquanto que na Figura 16 b, os grãos estão menos diferenciáveis. É possível observar em ambos os casos os poros, sendo mais facilmente visualizados na HAP porosa.

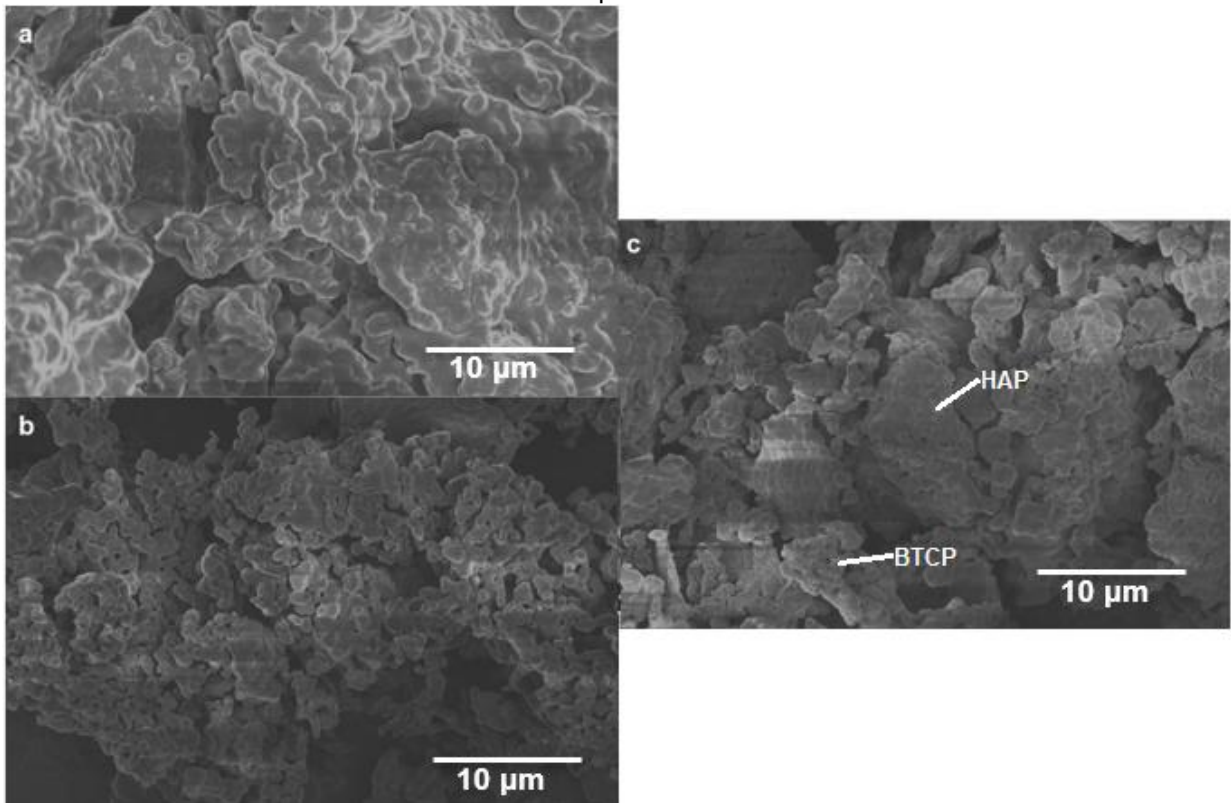
Figura 16. Comparativo entre o MEV (a) HAP sem poros e (b) HAP porosa



Fonte: Autoria própria

Os resultados de MEV comparativo entre a HAP e o BTCP porosos são apresentados na Figura 17 e corroboram com a diferença observada na análise de porosimetria de mercúrio. Na Figura 17 (a) (HAP porosa), são observados grãos com divisões menos aparentes e menor quantidade de porosidade entre os grãos, que é diferente do observado na Figura 17 (b) (BTCP poroso), onde os grãos estão com contornos bem definidos e com maior quantidade e tamanho de poros.

Figura 17. Resultados de MEV para (a) HAP porosa, (b) BTCP poroso e (c) mistura de HAP+BTCP 1:1 porosa



Fonte: Autoria própria.

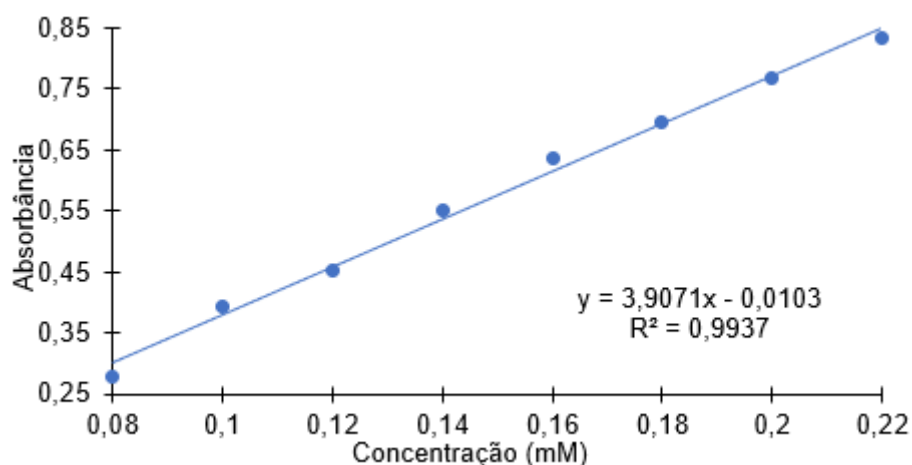
A Figura 17 (c) representa a mistura entre a HAP e BTCP, onde tem-se o balanço entre as duas estruturas, com partes mais definidas e com maior porosidade, e partes menos definidas com menos porosidade intergranular.

6.2 DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DAS VESÍCULAS LIPOSSOMAIS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

Após a caracterização dos materiais cerâmicos, foi realizado o desenvolvimento e caracterização dos lipossomas. Primeiro, verificou-se as melhores metodologias com relação à eficiência de encapsulação do fármaco. Após, foram feitas as análises que dizem respeito ao tamanho, potencial zeta e polidispersividade das vesículas lipossomais.

Para realizar a análise de eficiência de encapsulação (EE%), foi feita uma curva de calibração do ácido zoledrônico. A Figura 18 representa a curva de calibração obtida no comprimento de onda fixo de 210 nm, faixa em que o AZ apresenta bandas bem definidas. (MAYERHÖFER, 2020).

Figura 18. Curva de calibração



Fonte: Autoria própria.

A porcentagem de encapsulação foi determinada através da análise por espectroscopia UV-Vis após ultracentrifugação do lipossoma: utilizando um filtro que permite somente a passagem do AZ na forma livre. O filtrado é AZ livre levado para análise de UV-vis e sua concentração foi determinada utilizando a curva de calibração.

Os resultados obtidos para as diferentes metodologias de síntese dos lipossomas são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados da eficiência de encapsulação para os diferentes métodos de obtenção dos lipossomas

Método	A	B	C	D
Eficiência de Encapsulação (%)	18,17 ± 2,635	32,95 ± 4,808	4,78 ± 1,574	34,11 ± 3,495

Fonte: Autoria própria.

Para obter solubilizar o ácido zoledrônico, esse foi dissolvido em uma solução básica (0,1 M de NaOH) 10% em vol. Ativos com caráter hidrofílico apresentam retenção lipossomal no interior aquoso da vesícula e esse encapsulamento pode ser dificultoso.

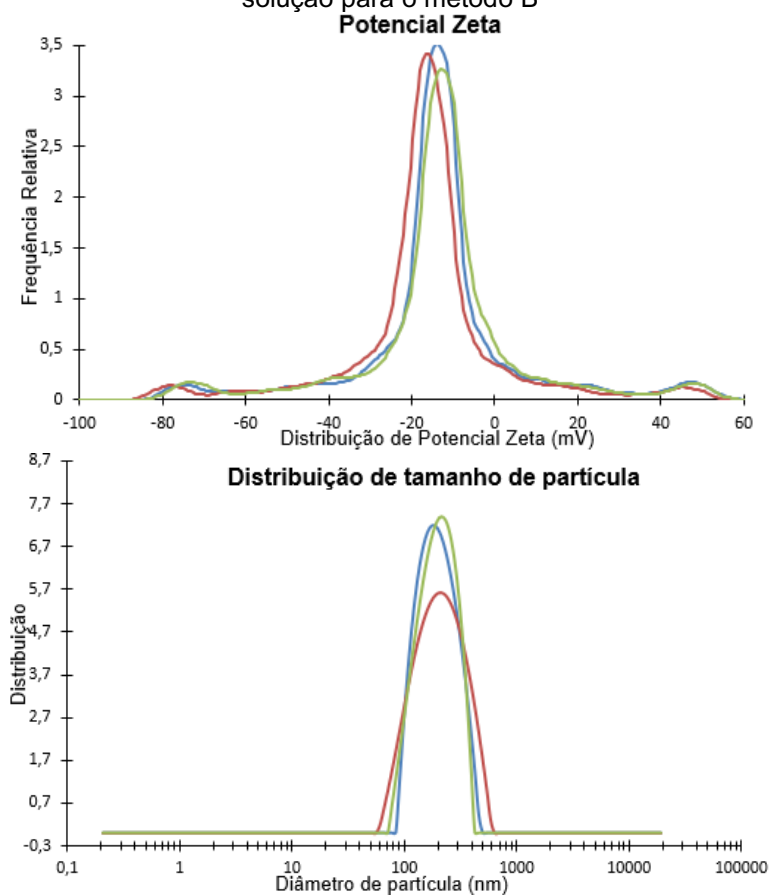
Os melhores resultados com relação à eficiência de encapsulação do AZ nos lipossomas foram para os métodos B e D. No método B foi utilizado, além da agitação em vortex, 30 min de banho de ultrassom. Para a método D foi utilizado sonicação. No processo de sonicação, a energia descarregada é maior, o que ocasiona a reconstituição dos lipossomas em vesículas de tamanhos menores, contendo maior carga do ativo encapsulado, isso porque esse processo resulta na quebra e reconstituição do lipossoma,

que se divide múltiplas vezes.

As análises subsequentes foram realizadas somente em amostras sintetizadas a partir do método B em função da maior acessibilidade na obtenção das amostras no laboratório de pesquisa, embora o método D apresente maior facilidade de preparo.

A Figura 19 e a Tabela 6 apresentam os resultados obtidos das análises de tamanho da vesícula lipossomal, potencial zeta e índice de polidispersividade dos lipossomas sintetizados a partir do método B (1 min de vortex + 30 min de banho de ultrassom + extrusão).

Figura 19. Exemplificação dos resultados obtidos para o diâmetro e potencial zeta das partículas em solução para o método B



Fonte: Autoria própria.

Tabela 6. Análise de diâmetro hidrodinâmico médio (D), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE) das vesículas lipossomais para o método B.

D (nm)	IPD (%)	PZ (mV)	EE (%)
195,02 ± 3,656	22,8 ± 0,87	-14,4 ± 0,22	32,95 ± 4,808

Fonte: Autoria própria.

Através do ensaio de espalhamento de luz dinâmico (DLS), foi possível obter um resultado adequado para prosseguir na incorporação com a biocerâmica, visto que, o diâmetro médio obtido foi de 195,02 nm, indicando que o lipossoma é capaz de adentrar na maior parte dos poros encontrados nos materiais hospedeiros.

O índice de polidispersão é responsável por determinar a qualidade das vesículas formadas, pois, por meio desse valor, é possível verificar a distribuição homogênea. O valor de 22,8% é considerado adequado ao estudo sugerido, já que o índice ideal deve estar abaixo de 30% para obter uma distribuição adequada (RODRIGUES, 2017).

O potencial zeta indica a estabilidade da solução. O valor encontrado para os lipossomas foi de acordo com o esperado, sendo que, quanto maior o valor absoluto, mais estável é a mistura, indicando que a probabilidade de agregação é baixa. O resultado de -14,4 mV é considerado adequado e mostra que a solução é estável e com carga predominantemente negativa (PATTNI, 2015).

A eficiência de encapsulação obtida pelo método de síntese dos lipossomas se mostrou adequada ao que é encontrado na literatura (ZHAO, 2018; CAI, 2017), ou seja, o método apresenta alta repetibilidade com resultados satisfatórios para a aplicação requerida. Ao projetar a concentração a ser utilizada é de extrema importância que a porcentagem de encapsulação seja conhecida, pois esse dado representa, de forma prática, a quantidade que efetivamente estará atuando no biomaterial.

6.3 INCORPORAÇÃO DAS VESÍCULAS LIPOSSOMAS/AZ OU AZ NAS CERÂMICAS POROSAS

O primeiro experimento para determinar a eficiência de encapsulação (EE) foi realizada entre o AZ e a cerâmica HAP. Os testes indicaram que menos de 3% de composto AZ permaneceram nos poros da HAP.

O segundo teste de EE foi realizado entre o complexo lipossomas/AZ e a cerâmica porosa. A suspensão foi primeiramente centrifugada para separar a cerâmica (HAP). O sobrenadante contendo lipossoma/AZ foi ultracentrifugada, e o seu sobrenadante foi analisado no UV-Vis após passar pelo filtro. O resultado indicou a parte do fármaco que se encontrava livre, sem estar encapsulado ou impregnado na cerâmica.

Os resultados dos experimentos referentes à incorporação entre a biocerâmica (HAP) e as vesículas lipossomais contendo o ácido zoledrônico produzidos através do método B são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Dados obtidos através da análise das diferentes metodologias aplicadas para a incorporação entre a cerâmica e o complexo lipossomas/AZ.

Método	1	2	3	4	5
Eficiência de Incorporação (%)	33,40	46,92	35,09	54,64	49,33

Fonte: Autoria própria.

Dentre os resultados obtidos para os diferentes métodos aplicados, foi possível perceber que o método que apresentou maior porcentagem de incorporação foi o 4 e o 5. Na primeira delas, foram utilizadas a agitação, banho de ultrassom e agitação novamente. Na segunda, foram realizadas a agitação, sonicação e agitação. Ou seja, ficou claro que, com a combinação dos vários meios de incorporação, é possível obter uma porcentagem maior de sucesso.

Através da determinação do melhor método encontrado para a incorporação, a metodologia foi testada para os diferentes tipos de materiais estudados no presente trabalho: HAP porosa, BTCP poroso e a combinação 1:1 desses materiais.

Os resultados da pesquisa realizada utilizando o método 4 estão contidos na Tabela 8.

Tabela 8. Eficiência na incorporação de lipossoma nas diferentes cerâmicas testadas a partir da metodologia 4.

Cerâmica	HAP	BTCP	HAP/BTCP
Eficiência de Incorporação (%)	57,1	52,8	0

Fonte: Autoria própria.

Testando os materiais separadamente, foi possível concluir que a metodologia satisfaz o resultado esperado, com certa similaridade entre os diferentes materiais. No entanto, a utilização da mesma metodologia na mistura cerâmicas se apresentou ineficaz no quesito de apresentar bons sítios para incorporação do complexo lipossomas/AZ.

CONCLUSÃO

A metodologia aplicada na síntese das cerâmicas foi satisfatória, pois os picos cristalográficos obtidos nas análises por DRX se mostraram similares às fichas dos materiais catalogados. A utilização da CM possibilitou a formação de porosidade com o seu uso como material de sacrifício, sendo uma diferença notável quando comparado o material sem adição/com adição. Os resultados indicaram uma melhor distribuição entre os tamanhos de poros na faixa de $>100-1\ \mu\text{m}$ na BTCP e HAP, as quais foram confirmadas pelos testes de porosimetria de mercúrio. Além disso, a CM possibilitou um aumento considerável na quantidade de poros $<1\ \mu\text{m}$ no BTCP.

Análises de MEV corroboraram com os testes de porosimetria de mercúrio, indicando que houve uma significativa diferença na porosidade dentre os materiais que foram adicionados de CM e os que estavam sem nenhum material de sacrifício.

Para o desenvolvimento das vesículas lipossomais encapsulando o ácido zoledrônico, o método que forneceu melhor resultado em termos de eficiência de encapsulação foi o uso de 1 minuto de voltex com 30 minutos de banho de ultrassom seguido da extrusão ou o método de sonicação. O método utilizando banho de ultrassom foi o adotado para prosseguir com os demais testes, visto sua acessibilidade de preparo no laboratório de estudo utilizado e pelo resultado satisfatório que foi obtido seguindo essa metodologia.

Para melhor caracterização das vesículas lipossomais foi determinado o tamanho médio das vesículas (195 nm) bem como o índice de polidispersão (22,8 %), indicando que o tamanho das vesículas estão adequados para a incorporação nos poros da cerâmica. O índice de polidispersão está dentro dos parâmetros indicando uma amostra homogênea em termos de tamanho das vesículas.

A união entre a cerâmica e os lipossomas foi considerada adequada para o teste proposto, com um resultado de acurácia na incorporação de 57,1% para HAP e 52,8% para o BTCP. O método que forneceu o melhor resultado foi o banho de ultrassom seguido de agitação. A mistura dos materiais (HAP:BTCP) apresentou uma reação contrária ao esperado, fazendo com que o fármaco fosse totalmente espelho e não gerando nenhuma incorporação significativa para o estudo. Acredita-se que esse resultado pode ter sido

obtido em razão da interação entre o fluido/biocerâmica, pois, quando as duas são misturadas há uma facilidade notável na decantação do material, fazendo com que não fosse possível obter uma mistura homogênea no processo de preparo.

Testes de crescimento ósseo *in vivo* estão sendo realizados na Universidade Estadual de Londrina por meio do estudo da reação da aplicação do biomaterial em camundongos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUKAWA, H. et al. The Engineering Of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A review of Biomaterials for Scaffolds and Implant Coatings. **Dent. Clin. N. Am.**, v. 50, p. 205-216, 2006.

ALAVI, M.; KARIMI, N.; SAFAEI, M. Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems. **Adv Pharm Bull**, v.1, pp. 3-9, 2017.

ASKELAND, D. R.; PLULÉ, P. **Ciência e Engenharia dos Materiais**. São Paulo: Cengage Learning, 584 p, 2008.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. de; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 2, 2007.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.21, p.2347-2359, 2000.

CAI, X. J. Anti-angiogenic and anti-tumor effects of metronomic use of novel liposomal zoledronic acid depletes tumor-associated macrophages in triple negative breast cancer. **Oncotarget**, v.8, 2017.

CALLISTER, J. W.D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 7ª edição. LTC editora, 2008, 704 pp.

CARVALHO, G. A. de; CHINELATTO, A. S. A. Obtenção de cerâmicas de alumina com porosidade graduada processadas pela técnica de colagem de barbotina e *freeze casting*. **Cerâmica**, 2021.

CHAAIR, H.; LABJAR, H.; BRITEL, O. 2017. **Synthesis of a-tricalcium phosphate. Morphologie**, 101(334), 120–124. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286011517300528>>. Acesso em: 16 abril 2020.

CHENG, L. et. al. Osteinduction of calcium phosphate biomaterials in small animals. **Materials Science & Engineering**, v. 33, pp. 1254-1260, 2013.

COLE, D. R.; ANOVITZ L. M. Characterization and Analysis of Porosity and Pore Structures. **Reviews in Mineralogy & Geochemistry**. v. 80, p. 61-164, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/283890640_Characterization_and_Analysis_of_Porosity_and_Pore_Structures>. Acesso em: 14 abril 2020.

COSTA B.D.; MORAES A.N.; CAMARGO N.H.; OLESKOVICZ N.; GAVA A.; DALLABRIDA A.L.; REGALIN D.; LIMA M.P.A. 2015. **Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos**. Pesquisa

Veterinária Brasileira 35(2):177-187. Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v35n2/0100-736X-pvb-35-02-00177.pdf>>. Acesso em: 12 abril 2020.

DRESCHER, S.; HOOGEVEST, P. V. The Phospholipid Research Center: Pesquisa atual em fosfolipídios e seu uso na administração de medicamentos. **Farmacêutica**, v.12, 2020.

FREITAS, L. A. de. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita porosa com propriedades osteoativas**. 2020. 58p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia dos Materiais – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2020.

FROES, F. et. al. **Titanium for Consumer Applications**. Elsevier, 2019.

FU, L. H. et al. Sonochemical synthesis of cellulose/hydroxyapatite nanocomposites and their application in protein adsorption. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, pp. 1-12, 2018.

GOMES, D. S.; et al. A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine. **Cerâmica**, 2019.

HABIB, F. et al. **Development and Characterization of Porous Hydroxyapatite Scaffold by Using Polymeric Sponge Method**. v. 4531, pp. 1–7, [s.d.].

HE, F. et al. Porous calcium phosphate composite bioceramic beads. **Ceramics International**, v. 44, pp. 13430-13433, 2018.

HENGST, V.; et al. Bone targeting potencial of bisphosphanate-targeted liposomes. Preparation, characterization and hydroxyapatite binding in vitro. **Science Direct**, v. 331, pp. 224-227, 2007.

JUNIOR, J. M. O. Physical characterization of biphasic bioceramic materials with different granulation sizes and their influence on bone repair and inflammation in rat calvaria. **Scientific Reports**, v.11, 2021.

Kawachi, et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n°4, 2000.

LASKUS, A.; KOLMAS, J. Ionic Substitutions in Non-Apatitic Calcium Phosphates. **Int. J. Mol. Sci**, 2017, v.18.

LE, H. et. al. Mechanical property and biocompatibility of co-precipitated nano hydroxyapatite-gelatine composites. **Journal of Advanced Ceramics**, v.4, n°3, pp. 237-243.

LI, X. et al. Design of hydroxyapatite bioceramic with micro-/nano-topographies to

regulate the osteogenic activities of bone morphogenetic protein-2 and bone marrow stromal cells. **Nanoscale**, v. 13, 2020.

LOMBARDO, D.; KISELEV, M. A. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. **Pharmaceutics**, 14, 543, 2022.

MAYERHÖFER, T. G.; PAHLOW, S.; POPP, J. The Bouguer-Beer-Lambert law: Shining light on the obscure. **ChemPhysChem**, 2020.

MICROMERITICS. **Mercury Intrusion Porosimetry Theory**, s.d. Fonte: <https://www.micromeritics.com/Repository/Files/Mercury_Porosemitry_Theory_poster_.pdf>. Acesso em: nov de 2021.

MOBASHERPOUR, I.; RASTGOO, M. J.; RAZAVI, M.; SALAHI, E. Sintering Behavior and interfacial toughness of HAp/TCP Coatings on HAp/Tinacomposite. **Materials and Energy Research Center (MERC)**, 2007. Disponível em: <<https://www.ias.ac.in/public/Volumes/boms/forthcoming/BOMS-D-18-00091.pdf>>. Acesso em: 01 maio 2020.

NARDOTTO, G. H. B. **Desenvolvimento de lipossomas deformáveis para administração transdérmica de remifentanil**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2009.

NEW, R.R.C. Preparation of sterile liposomes. **Liposomes - a Practical Approach**. Oxford: IRL Press, 1990, p. 103.

NOVARTIS PHARMA, **Zometa**. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2001/21223lbl.pdf>. Acesso em nov de 2021.

OLIVEIRA, L. S. de A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/1560/1/3503.pdf>>. Acesso em: 01 maio 2020.

OLIVEIRA, S. M.; et al. Engineering Endochondral Bone: In Vivo Studies. **Tissue Eng. Part A**, v. 15, n. 3, p. 635-643, 2009.

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chemical Reviews**, v. 19, 2015.

PAVINATO, V. P. **ESTUDO DA SOLUBILIDADE DE APATITAS EM MEIOS DE INTERESSE BIOLÓGICO**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

- PIRES, A. L. R. et. al. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**. v. 38, nº7, pp. 957-971, São Paulo, 2015.
- PRECHEUR, H. V. Bone graft materials. **Dent. Clin. North Am.** Philadelphia, v. 51, n. 3, p. 729-746, 2007.
- RÄKEL, A.; BOUCHER, A.; STE-MARIE, L-G. Role of zoledronic acid in the prevention and treatment of osteoporosis. **Clinical Interventions in Aging**, v. 20, pps. 89-99, 2011.
- RODOLFO, L. M. et. al. Substitutos ósseos alógenos e xenógenos comparados ao enxerto autógeno: reações biológicas. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, vol. 33, nº1, 2017.
- RODRIGUES, B. V. **Desenvolvimento e Caracterização de Complexos Polímero-Lipossoma para Sistemas Inteligentes de Liberação Controlada**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2017.
- ROGERO, S. O., et. al. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6, nº3, pp. 317-320, 2003.
- SADAT-SHOJAI, M.; et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures. **Elsevier**, 2013.
- SARI, M.; et al. Bioceramic hydroxyapatite-based scaffold with a porous structure using honeycomb as a natural polymeric Porogen for bone tissue engineering. **Biomaterials Research**, 2021.
- SASAKI, K; SUZUKI, O.; TAKAHASHI, N. **Interface Oral Health Science 2014: Innovative research on biosis-abiosis intelligent interface**. Springer Open, 2015.
- SCHIRALDI, C; et. al. Nanoparticles for the delivery of zoledronic acid to prostate cancer cells: a comparative analysis throught time lapse video-microscopy technique. **Cancer Biology & Therapy**, 15:11, pps. 1524-1532, 2014.
- SILVA, R. F.; et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, 2015.
- SOARES, M. V. R. **Biomateriais utilizados na prática odontológica: uma revisão de literatura**. 2015. 27 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015. Disponível em: <<http://www.uel.br/graduacao/odontologia/portal/pages/arquivos/TCC2015/MURILO%20VILA%20REAL%20SOARES.pdf>>. Acesso em: 16 abril 2020.
- SOSSA, P., et al. Comparative study between natural and synthetic Hydroxyapatite: structural, morphological and bioactivity properties. **Matéria (Rio de Janeiro)**, 2018.
- SOUSA, I. C. S C. **Interação da Enrofloxacina com modelos biomembranares:**

Influência das suas propriedades físico-químicas. Dissertação. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007.

TIWARI, G.; et al. Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, 2012.

TOLLER, A. B.; SCHMIDT, C. A. EXCIPIENTES À BASE DE CELULOSE E LACTOSE PARA COMPRESSÃO DIRETA. **Disciplinarum Scientia**, 2005.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D. L. Tissue Engineering: The Next Generation. **Tissue Eng.**, v. 12, n. 12, p. 3261-3263, 2006.

WAN, D.C.; NACAMULI, R.P.; LONGAKER, M.T. Craniofacial Bone Tissue Engineering. **Dent. Clin. North Am.**, v.50, n.2, p.175-190, 2006.

WELLER, M. et al. **Inorganic Chemistry**. Oxford, 7° ed, 2018.

ZAO, Q. H. Preparation of Zoledronate liposome and its impact on apoptosis of Kupffer cells in rat liver. **Ácta Cirúrgica Brasileira**, v.33, 2018.