



## Desenvolvimento de Hidroxiapatita esférica porosa a partir de gelatina e polímeros biodegradáveis PLGA.

### *Development of Porous Spherical Hydroxyapatite from Gelatin and PLGA Biodegradable Polymers*

FERNANDO SANTOS DE LIMA\*,      LUIS FERNANDO CABEÇA†;

#### RESUMO

A Hidroxiapatita é um biomaterial muito utilizado como enxerto ósseo devido seu alto grau de compatibilidade e osteocondutividade. O presente trabalho tem por objetivo o preparo do encapsulamento de complexo lipossomal, assim como o preparo da síntese da HAp e tornar a junção entre o complexo e a HAp em um composto de liberação controlado. Em relação do complexo, foram realizados três métodos de encapsulamento do ácido zoledrônico no lipossoma, sendo alterados algumas variáveis a fim de avaliar a melhor eficiência. Neste trabalho, a síntese de HAp foi realizada por co-precipitação, no qual o cálcio foi utilizado como precursor. Após as etapas iniciais o pó foi colocado em estufa para completa secagem, assim como realizado um tratamento térmico afim de melhorar as características da HAp cristalina, ao final foi realizado a sinterização. Por meio da análise de difração de raios X pode-se comprovar a formação da fase de hidroxiapatita comparando os picos obtidos com a literatura. Por meio da análise de porosimetria pode-se determinar a o diâmetro dos poros assim como suas características.

**Palavras-chave:** Encapsulamento, HAp, lipossomas, porosimetria, difração de raio x.

#### ABSTRACT

Hydroxyapatite is a biomaterial widely used as a bone graft due to its high degree of compatibility and osteoconductive. The present work aims at preparing the encapsulation of the liposomal complex, as well as preparing the synthesis of HAp and turning the junction between the complex and HAp into a controlled-release compound. Regarding the complex, three methods of encapsulation of zoledronic acid in the liposome were carried out, with some variables being changed to assess the best efficiency. In this work, the synthesis of HAp was performed by co-combination, without which calcium was used as a precursor. After the initial steps, the powder was placed in an oven for complete drying, as well as a thermal treatment to improve the characteristics of the crystalline HAp, in the end a sintering was performed. Through X-ray diffraction analysis, the formation of the hydroxyapatite phase can be verified by comparing the peaks

\* Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil;  
[fernandolima@alunos.utfpr.edu.br](mailto:fernandolima@alunos.utfpr.edu.br)

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina; [luiscabeça@utfpr.edu.br](mailto:luiscabeça@utfpr.edu.br)



obtained with the literature. Through porosimeter analysis it is possible to determine the diameter of the pores as well as their characteristics.

**Keywords:** Encapsulation, HAp, liposomes, porosimeter, x-ray diffraction.

## 1 INTRODUÇÃO

A engenharia de matérias nos últimos anos tem se tornado pioneira na pesquisa de biomateriais com objetivo de substituir tecidos vivos danificados, por tecidos sintéticos ou naturais. Um desses biomateriais é a Hidroxiapatita (HAP)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , que segundo Calasans Maia (2015) é o principal componente mineral do osso e dos dentes, e tem sido amplamente aplicado como um biomaterial devido a sua bioatividade e osteocondutividade bem conhecidas, mesmo que as cerâmicas HAP sejam pouco degradáveis sob condições fisiológicas.

HAP sintetizados embora apresentem similaridades químicas ao tecido ósseo, possui também aspectos estruturais que dificultam a disseminação das células jovens, como exemplo a baixa porosidade. “É preciso que o material enxertado tenha poros interligados para que as células de geração de tecido ósseo, conhecidas como osteoblastos, possam infiltrar no material, consumi-lo e crescer na estrutura como um todo (PARSONS ET AL., 1988).”

HAP porosa também pode ser usada como sistema carreador de fármacos, entretanto, apresenta desvantagens em função da baixa eficiência de encapsulamento e rápida liberação (LU ET AL., 2018; STIGTER ET AL., 2004). Carreadores lipossomas apresentam várias vantagens em relação aos ativos livres devido à bicamada lipídica que impede a rápida absorção pelo organismo, pode controlar a taxa de liberação e o local em que o fármaco deve ser liberado (BATISTA ET AL., 2007; BOERMAN ET AL., 2000).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo preparar HAP ou  $\beta$ -TCP porosa utilizando compostos orgânicos como geradores de poros e acoplar o complexo lipossomas/bifosfonatos nos poros da HAP (RIGO ET AL., 2007).

## 2 MÉTODO E MATERIAIS

### 2.1 Preparo do Complexo – Lipossoma/Ácido Zoledrônico

O método utilizado para a preparação do lipossoma foi por filme lipídico (HAERI et al., 2013). Foi utilizado os seguintes componentes: fosfatidilcolina de soja (SPC), colesterol, para realizar a formação do lipossoma na proporção de 7:3 em clorofórmio. Os componentes foram adicionados em um frasco juntamente com o bifosfanato ácido zoledrônico (1 mM) e deixando secar em temperatura ambiente. Após a formação do filme lipídico (1 mM) esse foi hidratado com solução tampão fosfato pH 7,5 (0,05 mM) contendo o fármaco ácido zoledrônico (1 mM). A solução foi extrusada em um mini extrusor Avanti Polar com membrana de policarbonato de 400nm.

Após o preparo do complexo, foram utilizados três métodos para o encapsulamento do AZ para melhora do efeito de encapsulação.

- Método A: seguiu a metodologia de (Caraglia, 2013) e (Marra, 2012), no qual após a reidratação o complexo com solução tampão de AZ, foi levado ao vórtex (Agitador Tipo Vortex



Multifuncional) com o objetivo de agitar as moléculas e homogeneizar toda solução, por 1 minuto, em seguida foi levado ao processador ultrassônico por 30 minutos.

- Método B: foi ajustado apenas o período de agitação do vórtex por 5 minutos, mantendo o tempo de ultrassom conforme o método A.
- Método C: forma seguidos os procedimentos do método A, porém foram adicionados 4 ciclos de congelamento e descongelamento, no qual a temperatura variou de -50°C à uma temperatura ambiente de 25°C.

## 2.2 Encapsulamento

Uma alíquota de 0,8 mL da amostra extrudada foi transferida para uma unidade de filtro e foi submetida a uma ultracentrifugação (filtro Millipore, USA, ME Cut-off 10,000Da). O cálculo de eficiência foi realizado através da Equação 1:

$$\%AZ \text{ encapsulada} = (C_i - C_x) / C_i \times 100 \quad (1)$$

Em que  $C_i$  e  $C_x$  representam, respectivamente, as concentrações iniciais e a analisada. Para quantificar a concentração de AZ na solução analisada foi utilizado à técnica de espectrofotometria de UV. Foi feito uma curva de calibração prévia do AZ variando a concentração 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,16; 0,18; 0,20 mM.

## 2.3 Síntese da Hidroxiapatita com Óleo

Foi utilizado o método por co-precipitação consiste em simples etapas: adiciona-se 200 ml água destilada em óxido de cálcio (2,79 g) como precursor de cálcio. Em seguida uma solução de fosfato de potássio (4,06 g) foi preparada em 10 ml de água e gotejado lentamente na solução de cálcio sob agitação. Após a síntese, a solução contendo a hidroxiapatita obtida foi seca em estufa. O pó sintetizado foi submetido a tratamento térmico para obtenção de HAP cristalina.

Para o preparo da HAP porosa tem-se a dispersão de 3 mg de HAp em 50 mL de água sob agitação. Em um segundo recipiente, é feito uma solução (100 mL) de ácido cítrico 27g, e PEG 18g, enquanto em um terceiro recipiente e feito uma mistura de água e gelatina 1g à 40°C por 1 hora em banho maria.

Os três recipientes são misturados e agitados até a total homogeneização da solução. Em seguida, essa solução é vertida em óleo (50 mL) e agitada levemente. Para obter a cerâmica, essa mistura é lavada com etanol e acetona e então filtrada em papel de filtro. O material sólido retido no papel de filtro passa por um processo de secagem em estufa à 60°C por um dia. Em seguida, o material foi sinterizado.

## 3 RESULTADOS

Os resultados da Tabela 1 referem-se à eficiência de encapsulamento do AZ em lipossomas.

Tabela 1 - Eficiência de encapsulamento.

Método	Percentual de encapsulamento (%)	Percentual de encapsulamento (%)	Percentual de encapsulamento (%)	Valor Médio (%)
A	4,78	6,82	10,86	7,48
B	26,51	25,73	25,31	25,85
C	15,20	15,22	10,42	13,04

Fonte: Autoria própria (2021).



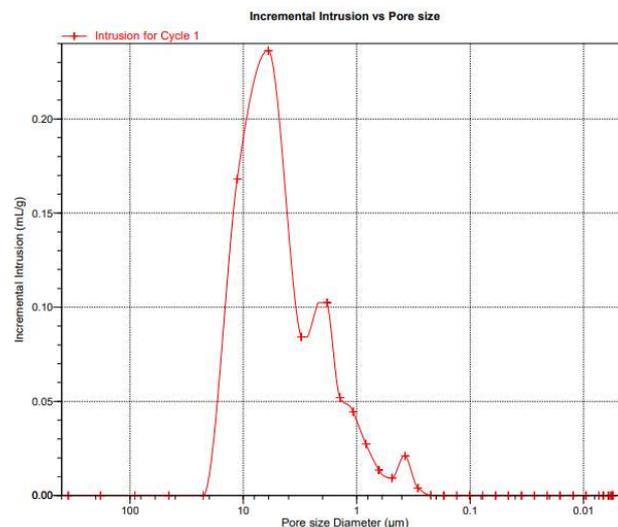
É possível analisar que o método B apresenta uma maior eficiência de encapsulamento do AZ no lipossoma, isso mostra que o vórtex influencia no resultado, uma vez que dentre estes métodos houve apenas a variação da agitação e homogeneização do complexo.

Após estes resultados, foi realizado o método C a fim de verificar se a temperatura poderia influenciar na eficiência de encapsulamento. O processo de congelamento e descongelamento diminuiu o percentual de encapsulamento.

Para analisar a características dos poros do material, testes de porosimetria de mercúrio foram realizados. Podemos considerar neste experimento que pressões até 15 psia são pressões de inclusão de mercúrio baixas (poros intergranulares). Na amostra de HAP com óleo, temos que 22,03% de mercúrio utilizado no teste foi introduzido na amostra em pressões de até 15,98 psia. Pode-se considerar a pressão de 15,98 baixa, uma vez que houve apenas os preenchimentos de poros na superfície, com diâmetro de poro de 11,32  $\mu\text{m}$ .

A partir da curva de tamanho de diâmetro de poro em função do incremento de intrusão de mercúrio apresentada na Fig. (1), pode-se verificar que a maior quantidade de mercúrio inserido no material está na região de poros de diâmetro de 6,0349  $\mu\text{m}$  obtidas com uma pressão de 29,97 psia, ou seja, a maioria dos poros encontrados a essa pressão são poros dentro do grão (poros interconectados), vale ressaltar que neste pico temos que a quantidade de mercúrio preenchido foi de 30,98%.

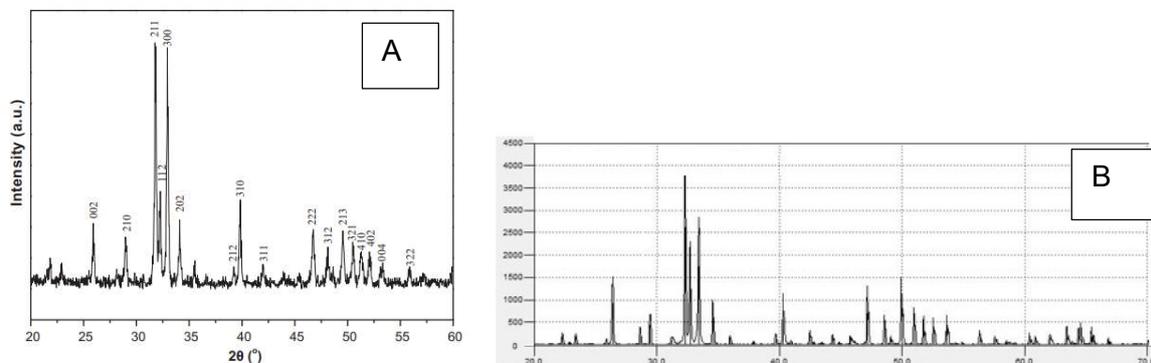
**Figura 1 -Curva de tamanho de diâmetro de poro em função do incremento de intrusão de mercúrio.**



**Fonte: Laboratório de Física Nuclear Aplicada UEL**

Pode-se observar através da Fig. 2A que apresenta DRX da hidroxiapatita pura, sendo obtida pela ICDD, deste modo é possível analisar se os picos da síntese de HAP com óleo são compatíveis com os picos da literatura.

**Figura 2 – A) Padrão de DRX de hidroxiapatita (Ca / P = 1,67) [ICDD PDF 24-33]. B) DRX da síntese de HAp com óleo.**



Fonte: A-The International Centre for Diffraction Data. B- Autorial própria (2021).

De acordo com a Figura (2B), a síntese de HAp obteve um resultado satisfatório. Quando comparado a amostra produzida com a literatura, os picos de DRX são compatíveis.

#### 4 CONCLUSÃO

Através dos dados obtidos experimentalmente e das discussões abordadas foi possível concluir:

- A eficiência de encapsulamento apresentou o melhor resultado quando o tempo de agitação foi de 1 minuto.
- A temperatura influencia negativamente na eficiência de encapsulamento do complexo.
- Pode-se observar que o maior incremento de mercúrio foi obtido nos poros com diâmetro de 6,0349  $\mu\text{m}$ .
- Através das imagens obtidas pelo DRX da HAp com óleo estão de acordo com as obtidas pela literatura.

Ensaio para a análise das amostras não pode ser realizado devido ao cenário atual causado pela pandemia de COVID-19, como é o caso do MEV. Assim como não foi possível a realização da síntese de HAp com PLGA devido à dificuldade da compra do polímero PLGA, causado pela pandemia.

#### REFERÊNCIAS.

BATISTA, C. et al. **Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2007, vol. 43, n. 2.

BOERMAN, O. C. et al. **Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging.** Prog. Lipid Res., v. 39, p. 461-475, 2000.

CALASANS, M. D; MELO, B. P; ALVES, A.T.N; **Cytocompatibility and biocompatibility of nanostructured carbonated hydroxyapatite spheres for bone repair.** Journal Applied Oral Science, 2015, 23(6):599-608.



CARAGLIA, M. et al. **Stealth Liposomes Encapsulating Zoledronic Acid: A New Opportunity to Treat Neuropathic Pain.** *Molecular Pharmaceutics Journal* – American Chemical Society, 2013, 10:1111–1118.

HAERI, A.; SADEGHIAN, S.; RABBANI, S.; ANVARI, M.S.; LAVASANIFAR, A.; AMINI, M.; SIMIN, D. **Sirolimus-loaded stealth colloidal systems attenuate neointimal hyperplasia after balloon injury: A comparison of phospholipid micelles and liposomes.** *S. International Journal of Pharmaceutics*, v. 455, p. 320–330, 2013.

LU, Y. et al. High-activity chitosan/nano hydroxyapatite/zoledronic acid scaffolds for simultaneous tumor inhibition, bone repair and infection eradication. **Materials Science and Engineering C**, v. 82, p. 225–233, 2018.

MARRA, M. et al. **New self-assembly nanoparticles and stealth liposomes for the delivery of zoledronic acid: a comparative study.** *Biotechnology Advances Journal* – ELSEVIER, 2012, 302-309.

Novaes-Jr AB; Souza SLS; Barros RRM; Pereira KKY; Iezzi G; Piatelli A. **Influence of Implant Surfaces on Osseointegration.** *Brazilian Dental Journal*, 2010, 21(6): 471-481.

PARSONS, J. R. et al. **Significance of the Porosity and Physical Chemistry of Calcium Phosphate Ceramics Biodegradation-Bioresorption.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 523, n. 1, p. 268–271, 1988.

RIGO, E. C. S, et al. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação.** *Revista.Dental Press Periodontia Implantol.*, v. 1, n. 3, p. 39-50, 2007.

STIGTER, M. et al. **Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy.** *Journal of Controlled Release*, v. 99, n.1, p. 127-137, 2004.