

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

FELIPE FERREIRA LOPES

**LIPOSSOMA REVESTIDO COM HIDROXIAPATITA PARA O
CARREAMENTO DE FÁRMACOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA

2019

FELIPE FERREIRA LOPES

**LIPOSSOMA REVESTIDO COM HIDROXIAPATITA PARA O
CARREAMENTO DE FÁRMACOS**

Dissertação de Mestrado apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Florian

LONDRINA

2019

TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação e o seu respectivo Produto Educacional estão licenciados sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

L8641 Lopes, Felipe Ferreira

Lipossoma revestido com hidroxapatita para o carreamento de fármacos /
Felipe Ferreira Lopes. - Londrina : [s.n.], 2019.
61f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Florian

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.
Londrina, 2019.

Bibliografia: f. 57-60.

1. Lipossomas. 2. Hidroxapatita. 3. Medicamentos - Formas de dosagem.
I. Cabeça, Luis Fernando, orient. II. Florian, Márcio, coorient. III. Universidade
Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais. V. Título.

CDD: 620.11

Ficha catalográfica elaborada por Cristina Benedeti Guilhem - CRB: 9/911



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina
Programa De Pós-Graduação Em Ciência E
Engenharia De Materiais



TERMO DE APROVAÇÃO

LIPOSSOMA REVESTIDO COM HIDROXIAPATITA PARA O CARREAMENTO DE FÁRMACOS

Por

FELIPE FERREIRA LOPES

Dissertação apresentada no dia 03 de setembro de 2019 ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **APROVADO**.

Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça

(UTFPR - Programa De Pós-Graduação Em Ciência E Engenharia De Materiais – PPGCEM)
Orientador

Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer

(UEL - Departamento de Bioquímica e Biotecnologia)

Prof. Dr. Renato Márcio Ribeira Viana

(UTFPR - Programa De Pós-Graduação Em Ciência E Engenharia De Materiais – PPGCEM)

Obs.: A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais.

RESUMO

FERREIRA LOPES, Felipe. **Lipossoma revestido com hidroxiapatita para carregamento de fármacos**. 2019. 61p. Dissertação de Mestrado do Curso de Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2019.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema lipossomal revestido por hidroxiapatita, que encapsulasse pontos quânticos e carregasse moléculas de fármaco (cloridrato de bupivacaína), dando origem a um sistema de lipossomas teranósticos. De acordo com a literatura, sistemas como este apresentam como vantagens em relação aos convencionais: maior controle da taxa de liberação de fármaco, maior furtividade (recobrimento de hidroxiapatita) e possibilidade de monitoramento de sua distribuição *in vivo* (pontos quânticos). Os lipossomas foram preparados por meio da técnica de injeção, e o revestimento foi obtido pela rota de síntese por co-precipitação de precursores fosfato e cálcio. O aumento do diâmetro das partículas lipossomais e a diminuição do potencial zeta entre as amostras parecem corroborar com a hipótese de que houve a formação de uma camada de revestimento. Sendo que os resultados das técnicas de difração de raios X e espectroscopia no infravermelho apontam que o revestimento formado apresenta predominantemente a presença da fase hidroxiapatita. Análises de fotoluminescência comprovaram a presença do ponto quântico CdSe encapsulado em lipossomas, já o encapsulamento do cloridrato de bupivacaína pelos lipossomas foi comprovado pela técnica de ressonância magnética nuclear. Além destes ensaios também foi calculada a eficiência de encapsulamento do anestésico local cloridrato de bupivacaína e o perfil de liberação do fármaco.

Palavras-chave: sistemas lipossomais; lipossomas revestidos por hidroxiapatita; sistemas de carregamento de fármacos.

ABSTRACT

FERREIRA LOPES, Felipe. **Lipossoma revestido com hidroxiapatita para carregamento de fármacos**. 2019. 61p. Dissertação de Mestrado do Curso de Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2019.

The objective of this work was the development of a hydroxyapatite-coated liposomal system that encapsulated quantum dots and carried drug molecules (bupivacaine hydrochloride) to form a teragnostic liposome system. According to the literature, systems like this one have advantages over conventional ones: greater control of the drug release rate, are stealthier (hydroxyapatite coating) and raise the possibility of monitoring its distribution in vivo (quantum dots). Liposomes were prepared by injection technique, and the synthesis route by co-precipitation of phosphate and calcium precursors obtained the. The increase in the diameter of the liposome particles and the decrease in zeta potential in comparison between samples seems to corroborate the hypothesis that a coating layer was formed. The results of the X-ray diffraction and infrared spectroscopy techniques indicate that the formed coating presents predominantly the presence of the hydroxyapatite phase. Photoluminescence tests confirmed the presence of the liposome-encapsulated quantum dot CdSe, whereas the encapsulation of bupivacaine hydrochloride by the liposomes was confirmed by the nuclear magnetic resonance technique. In addition to these assays, the encapsulation efficiency of the local anesthetic bupivacaine hydrochloride and the drug release profile were also calculated.

Key Words: liposomal systems; hydroxyapatite-coated liposomes; drug delivery systems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação de lipossoma a partir da hidratação de um filme lipídico, em que a bicamada lipídica se envolve na forma de vesícula a fim de evitar interações desfavoráveis entre a porção hidrofóbica dos fosfolípidios e a fase aquosa.....	17
Figura 2 – Representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas de liberação controlada. (A) Lipossomas convencionais – Lipossomas são compostos por bicamadas lipídicas que podem ser compostos por fosfolípidios neutros, catiônicos ou aniônicos e colesterol, que encapsulam o núcleo aquosos. Ambas as bicamadas lipídicas e o espaço aquoso pode incorporar espécies hidrofílicas ou hidrofóbicas (B) Lipossomas furtivos com PEG – Características e comportamentos lipossomais <i>in vivo</i> podem ser modificados pela adição de um revestimento polimérico hidrofílico, Polietilenoglicol (PEG), para a superfície lipossomal para conferir estabilidade estérica (C) Lipossomas com ligantes de direcionamento – Lipossomas podem ser usados para o direcionamento específico pelo acoplamento de ligantes na sua superfície ou no fim de cadeia de PEG (D) Lipossomas teranósticos – Um sistema único que consistem de nanopartículas, elementos de direcionamento, agente de imagem e componente terapêutico.....	18
Figura 3 - Sal de sódio 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-[fosfo- <i>rac</i> -(1-glicerol)] (DOPGNa)...	20
Figura 4 - Fosfatidilcolina de soja (SPC)	20
Figura 5 – Vista explodida de uma extrusora utilizada com lipossomas	21
Figura 6 – Estrutura química do cloridrato de bupivacaína	22
Figura 7 – Estados de spins eletrônicos das moléculas. (a) o estado fundamental. No nível energético mais baixo, estado fundamental, os spins encontram-se sempre emparelhados. (b) e (c) estados excitados. Em (b) os spins mantêm suas orientações iniciais, as moléculas em um estado singleto excitado. Em (c) um dos spins mudam de orientação, a molécula se encontra em um estado tripleto excitado.....	24
Figura 8 - Amostra de ponto quântico CdSe em clorofórmio iluminada por um feixe de comprimento de onda de 410nm.....	24
Figura 8 – (a) Projeção de uma célula unitária de hidroxiapatita no plano (001); (b) projeção mostrando o arranjo de octaedros [Ca(1)O ₆] na estrutura da HAP; (c) projeção mostrando a sequência de octaedros [Ca(1)O ₆] e tetraedros [PO ₄] na estrutura da HAP e (d) projeção mostrando a sequência de octaedros [Ca(1)O ₆] e [Ca(2)O ₆], e também tetraedros [PO ₄] nessa estrutura de HAP.....	27
Figura 10 – Esquema representando a obtenção dos sistemas lipossomas.....	31
Figura 11 - Sistema de extrusão utilizado	32
Figura 12 – Equipamento utilizado para o ensaio de fotoluminescência.....	37
Figura 13 – Montagem do sistema para o ensaio de liberação.....	38
Figura 14 -Espectro de RMN de 1H (D ₂ O/ referência H ₂ O residual em 4,7 ppm) de BUP [10 mM]......	39
Figura 15 - Espectro de RMN de 1H (D ₂ O/ referência H ₂ O residual em 4,7 ppm) da amostra LBUP [10 mM].	40
Figura 16 - Espectro de RMN de 1H (D ₂ O/ referência H ₂ O residual em 4,7 ppm) da amostra LBPQ [10 mM]......	40
Figura 17 - Espectro de RMN de 1H (D ₂ O/ referência H ₂ O residual em 4,7 ppm) de BUP, LBUP e LBPQ [10 mM].	41

Para mensurar a eficiência de encapsulação da bupivacaína nos lipossomas primeiro foram definidos os comprimentos de onda de máxima absorção da BUP na região do UV (Figura 18A). A absorbância máxima do BUP no espectro ocorreu em comprimento de onda de $\lambda=263$ nm. Em seguida, foi obtida uma curva de calibração da BUP variando a concentração entre 0,5 e 3,5 mM (Figura 18B)	42
Figura 19 – Modelos de incorporação dos pontos quânticos dos sistemas híbridos de carregamento de fármacos. (a) PQs encapsulados entre a bicamada lipídica, (b) PQs ligados a superfície do lipossomas e (c) PQs encapsulados no interior da vesícula.	44
Figura 20– Comparação entre os picos do difratograma da HAP sintetizada e dos bancos de referências de HAP e fosfato dicálcico dihidrato	45
Figura 21 - Espectro de infravermelho da hidroxiapatita	46
Figura 22 – Espectrocopia de infravermelho das amostras: A) LBPQ, B) HAP e C) LHAP	48
Figura 23 - Espectrocopia de infravermelho das amostras LBPQ, HAP e LHAP A) representados em cascata e B) ampliação na região de interesse	49
Figura 24 – Espectro de fotoluminescência	53
Figura 25- Curvas de percentual de cloridrato de bupivacaína (BUP) liberada acumulado ao longo do tempo para dois sistemas: A) células de Franz e B) membrana de diálise	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de 1 mL das amostras de complexos lipossomais analisadas	33
Tabela 2 - Atribuição e deslocamento químico dos ¹ H da BUP, LBUP e LBPQ [10 mM], e a comparação dos deslocamentos LBUP/BUP e LBPQ/BUP	41
Tabela 3 – Os valores de concentrações de fármaco em solução (mM) e percentual de cloridrato de bupivacaína encapsulada no lipossoma (%) correspondentes ao pico em 263 nm no espectro de absorção UV/Vis	44
Tabela 4–Valores médios encontrados no ensaio de espalhamento dinâmico de luz do diâmetro médio das partículas em nm e do índice de polidispersividade das amostras.....	50
Tabela 5 - Valores de Potencial Zeta (ζ) determinados para os lipossomas formados por DOPG-Na, SPC e DOPG-Na:SPC(1:1) a 25°C.....	51
Tabela 6 – Valores de Potencial Zeta (ζ) determinados para as amostras LBPQ e LHAP a 25°C.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BUP- Cloridrato de Bupivacaína

CdSe – Seleneto de Cádmiio

DLS – Espalhamento dinâmico de luz do inglês *dynamic light scattering*

DOPG-NA – sal de sódio 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] do inglês *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-(phospho-rac-(1-glycerol)) sodium salt*

FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier do inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy*

HAP – Hidroxiapatita

LBPQ – Lipossomas com cloridrato de bupivacaína e ponto quântico encapsulados

LBUP – Lipossomas com cloridrato de bupivacaína encapsulado

LHAP – Lipossomas revestidos por hidroxiapatita

LIP – Lipossomas tendo como lipídios DOPG-Na e SPC

PDI – Índice de polidispersividade do inglês *polydispersity index*

RMN – Ressonância magnética nuclear

SPC – Fosfatidilcolina de soja

UV/Vis – Ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.2 JUSTIFICATIVA E RESULTADOS ESPERADOS	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 LIPOSSOMAS	17
3.2 CLORIDRATO DE BUPIVACAÍNA	22
3.3 PONTOS QUÂNTICOS	23
3.4 HIDROXIAPATITA.....	25
3.5 SISTEMAS HÍBRIDOS LIPOSSOMAS/HAP/PQ.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 MATERIAIS E MATERIAIS	30
4.2 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS LIPOSSOMAS.....	30
4.2.1 Extrusão dos complexos lipossomais	31
4.2.2 Síntese de Hidroxiapatita na superfície lipossomal.....	32
4.2.3 Outras formulações analisadas.....	32
4.3 SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA	33
4.4 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS - X.....	34
4.5 ANÁLISE DE INFRAVERMELHO	34
4.6 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ E POTENCIAL ZETA.....	34
4.7 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DO FÁRMACO	35
4.8 ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	36
4.9 ANÁLISE DE FOTOLUMINESCÊNCIA.....	36
4.10 ENSAIO DE LIBERAÇÃO	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1 ANÁLISE DE RMN DA BUP E DOS COMPLEXOS LBUP E LBPQ.....	39
5.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DE CLORIDRATO DE BUPIVACAÍNA 42	
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA (HAP).....	45
5.4 CARACTERIZAÇÃO DO REVESTIMENTO DE HAP NO LIPOSSOMAS (LHAP).	46
5.4.1 - Espectroscopia de Infravermelho	47
5.4.2 – Espalhamento dinâmico de luz	49
5.5 POTENCIAL ZETA.....	51
5.6 ANÁLISE DE FOTOLUMINESCÊNCIA.....	52
5.7 ENSAIO DE LIBERAÇÃO	54
6. CONCLUSÃO.....	56

REFERÊNCIAS.....	57
------------------	----

1 INTRODUÇÃO

As formas mais comuns para administração de medicamentos são por via oral ou venosa. Independentemente do método utilizado, é importante que a administração desses fármacos atenda às necessidades dos pacientes em concentrações mínimas e ótimas nos locais de ação pelo maior tempo possível (KRAJEWSKI et al., 2000). Uma alternativa para alcançar esses quesitos é a encapsulação do fármaco em um sistema de transporte (macroestrutura) e sua liberação controlada – sistema de liberação de fármaco controlada (DANA EI et al., 2018).

Um dos primeiros e mais aplicados sistemas de liberação é o lipossoma, uma vesícula lipídica compostas moléculas lipídicas/fosfolipídicas anfifílicas, sendo capaz de encapsular fármacos e outros componentes bioativos sejam eles hidrofílicos, hidrofóbicos ou anfifílicos (DANA EI et al., 2018; PABST et al., 2014).

A encapsulação de compostos dentro de lipossomas os protege de ativação antecipada, degradação ou diluição na corrente sanguínea (SERCOMBE et al., 2015). Entretanto, lipossomas convencionais são suspensões aquosas que apresentam algumas desvantagens como baixa estabilidade cinética em suspensão, após freeze-drying e estocagem, e a captura pelo sistema fagocitária do organismo (opsoninas) podem interferir negativamente no uso do sistema (DE FREITAS et al., 2019a)

Para amenizar esses problemas algumas estratégias foram realizadas entre elas a modificação da superfície lipossomal com um revestimento, que age na prevenção do processo de agregação e também pode diminuir o reconhecimento dos lipossomas pelo sistema de defesa do organismo dando origem aos chamados “lipossomas furtivos” (DE FREITAS et al., 2019b; SERCOMBE et al., 2015).

Exemplos de recobrimento dos lipossomas podem ser encontrados na literatura utilizando fosfatos de cálcio (SCHMIDT; OSTAFIN, 2002), carbonato básico de ítrio (BELLINO; REGAZZONI, 2009), polietilenoglicol (DE FREITAS et al., 2019a) ou hidroxiapatita (HAP) (XU; TANAKA; CZERNUSZKA, 2007) para a formação de sistemas híbridos de carreamento de fármacos. Nestes sistemas, o recobrimento tem por função não só aumentar a furtividade do complexo lipossomal, aumentando o tempo de liberação do fármaco, mas também promover o direcionamento para suas regiões de atuação e também aumentar do tempo de liberação do fármaco (SERCOMBE et al., 2015).

Sistemas híbridos lipossomas/HAP podem apresentar propriedades únicas para o carregamento de fármacos relacionados aos tratamentos dentários ou ósseos. Isso se deve pelo fato do recobrimento de HAP apresentar uma composição semelhante à do próprio tecido conferindo-lhes uma maior biocompatibilidade e também por ser biodegradável (FIHRI et al., 2017).

Esses sistemas lipossomais podem, ainda, serem modificados para o monitoramento do carregamento de um fármaco a partir de seu encapsulamento com a incorporação de um agente de bioimagem (WANG; CHAO, 2017). Pontos quânticos (PQ) são nanocristais semicondutores fluorescentes que são comumente empregados como marcadores em sistemas de liberação controlada (BATALLA et al., 2015).

Nesse sentido, o presente trabalho tem como foco principal o uso de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] para o recobrimento de sistemas lipossomais para o carregamento e liberação de medicamentos (MOHAMMAD; OTHMAN; YEE-YEOH, 2014). Nesse caso, propõe-se que a hidroxiapatita seja obtida a partir da síntese por co-precipitação de seus precursores sobre a superfície de lipossomas carregados negativamente, ou seja, uma reação *in situ* de co-precipitação na superfície lipossomal.

Para isso serão utilizados como precursores o sal de sódio 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (DOPG-Na) e fosfatidilcolina de soja (SPC). O DOPG-Na apresenta carga negativa, que resulta em lipossomas com carga negativa em sua superfície. Isso possibilita a deposição de íons cálcio na superfície lipossomal e conseqüentemente síntese de hidroxiapatita pela co-precipitação de seus precursores.

O sistema lipossomal proposto recoberto com hidroxiapatita encapsula o anestésico local cloridrato de bupivacaína (BUP), e o ponto quântico seleneto de cádmio (CdSe), como agente de imagem. Espera-se assim a obtenção de um sistema lipossoma teranóstico, ou seja, um sistema carreador de fármaco que contenha também um marcador para seu monitoramento.

1.2 JUSTIFICATIVA E RESULTADOS ESPERADOS

Sistemas de liberação de fármacos podem controlar tanto a taxa de liberação do fármaco quanto o local do corpo em que será liberado. Destes sistemas, os lipossomais multifuncionais apresentam diversas vantagens quando comparamos com sistemas convencionais em que o fármaco está livre. Pode-se citar: maior eficiência terapêutica com liberação progressiva e controlada do fármaco, diminuição da toxicidade, maior tempo de permanência na circulação, estabilização do ativo, administração segura (sem reações inflamatórias locais), menor número de doses, direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas e possibilidade de encapsulamento tanto de espécies hidrofílicas quanto hidrofóbicas (HUA; WU, 2013; YANG et al., 2013; ZUCKER et al., 2009).

Nesse sentido, sistemas lipossomais têm sido extensivamente estudados e modificados em busca do melhoramento de sua precisão e controle da liberação de fármacos. Dentre as configurações possíveis, um sistema lipossomal revestido por hidroxiapatita (HAP) e contendo pontos quânticos (PQs) de CdSe encapsulados conforme o proposto por esse trabalho apresentaria este tipo de potencial.

O revestimento de HAP pode mascarar o sistema lipossomal multifuncional do sistema de defesa do organismo (SCHMIDT et al., 2004) e proporcionar um melhor controle da liberação durante a circulação sistêmica (XU; TANAKA; CZERNUSZKA, 2007). Além disso, a presença dos PQs tornaria possível o monitoramento da distribuição do sistema lipossomal no organismo (BATALLA et al., 2015; QU et al., 2017; WANG; CHAO, 2017). A novidade do presente trabalho é a junção do recobrimento com HAP e a presença dos PQs fornecendo um novo sistema lipossomal teranóstico.

Lipossomas teranósticos são sistemas que consistem da partícula lipossomal, um componente de bioimagem, um elemento de direcionamento e um componente terapêutico (SERCOMBE et al., 2015). O sistema proposto pelo trabalho é um sistema lipossomal teranóstico formado a partir de uma combinação dos lipídios DOPG-Na e SPC em proporções iguais, além da formação de uma camada de HAP pelo recobrimento da superfície de vesículas lipossomais carregadas negativamente pela síntese por co-precipitação.

É importante ressaltar que não foram encontradas ocorrências de sistemas híbridos Lipossomas/HAP/PQ na pesquisa bibliográfica para este trabalho. Desta forma, espera-se que seja possível a obtenção de um sistema de carreamento de fármacos inovador cuja identificação da formação de uma camada de HAP na superfície do lipossoma ocorra através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.

Espera-se também que camada de HAP altere o perfil de liberação da BUP com uma liberação mais prolongada e que o encapsulamento de PQs nesse sistema lipossomal multifuncional de HAP mantenha as propriedades do CdSe como marcador.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de um sistema lipossomal teranóstico com um revestido de hidroxiapatita como elemento de direcionamento, encapsulando o ponto quântico CdSe como agente de bioimagem e cloridrato de bupivacaína (BUP) como agente terapêutico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo principal será necessário:

- Preparar estruturas lipossomais utilizando lipídeos de fosfatidilcolina de soja (SPC) e sal de sódio 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (DOPG-Na);
- Preparar o complexo de inclusão entre lipossomas, fármaco cloridrato de bupivacaína e o ponto quântico CdSe;
- Preparar do sistema híbrido lipossomas revestido com a hidroxiapatita (LHAP).
- Caracterizar o sistema quanto ao seu tamanho de partícula, potencial zeta, eficácia do encapsulamento, Uv/vis e fotoluminescência;
- Comparar o comportamento das amostras revestida e não revestida com a hidroxiapatita (LHAP e LBPO) quanto a liberação do fármaco encapsulado.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LIPOSSOMAS

Lipossomas são pequenas vesículas compostas por um núcleo aquoso rodeado por uma ou mais camadas de lipídios (geralmente compostos por fosfolipídios naturais ou derivados deles) cujo alinhamento em vesículas de bicamadas ocorre a fim de minimizar as interações desfavoráveis entre a fase aquosa e as longas cadeias carbônicas (Figura 1) (MUFAMADI et al., 2011).

Essas vesículas podem ser constituídos por uma bicamada de lipídios simples (vesículas unilamelares) ou múltiplas bicamadas (vesículas multilamelares) (OLSON et al., 1979). Assim, os lipossomas são considerados estruturas supramoleculares (lipídeos ligados por ligação não covalentes) e são eficientes transportadores de biomoléculas hidrofóbicas e anfifílicas (PAPAHADJOPOULOS, 1995).

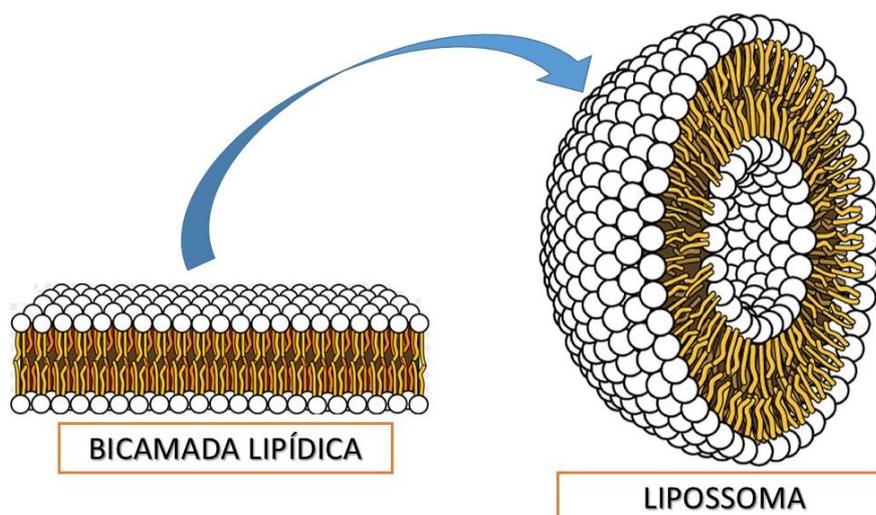


Figura 1 – Formação de lipossoma a partir da hidratação de um filme lipídico, em que a bicamada lipídica se envolve na forma de vesícula a fim de evitar interações desfavoráveis entre a porção hidrofóbica dos fosfolipídios e a fase aquosa.

Autor: LIPOLIFE (2017) (adaptado)

De forma geral, podem-se classificar lipossomas em quatro categorias distintas: lipossomas convencionais (Figura 2A), lipossomas estabilizados estericamente (Figura 2B), lipossomas com ligantes de direcionamento (Figura 2C) e lipossomas teranósticos (Figura 1D) (SERCOMBE et al., 2015).

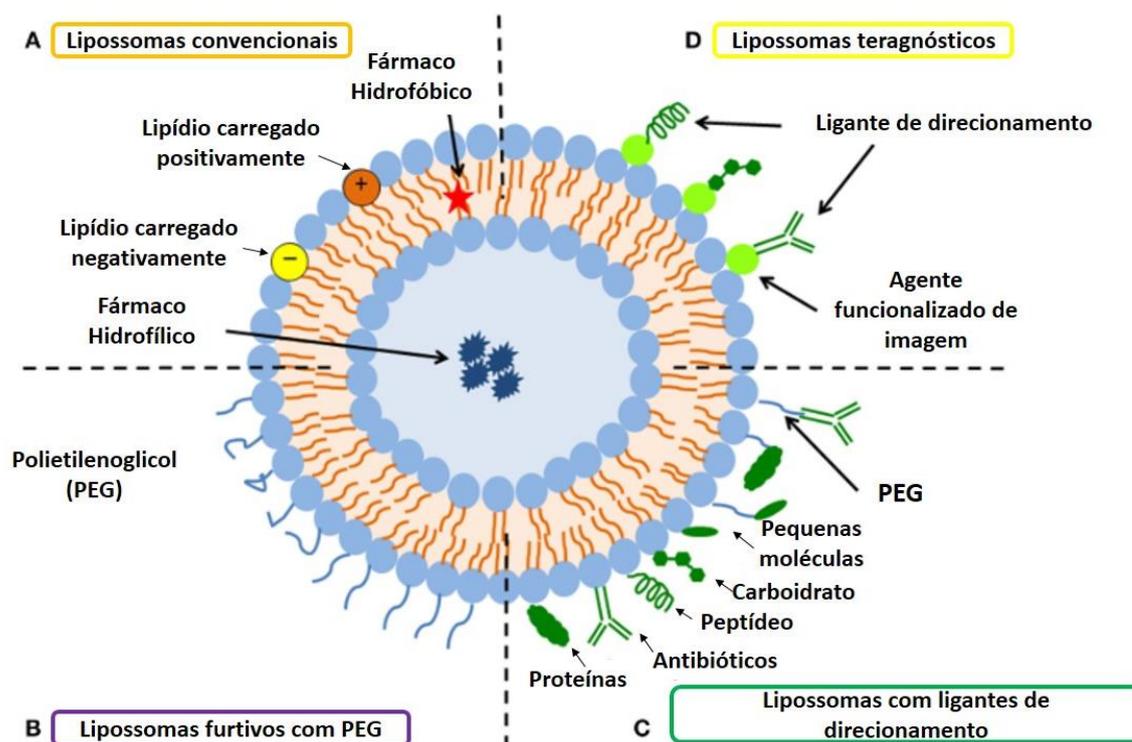


Figura 2 – Representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas de liberação controlada. (A) **Lipossomas convencionais** – Lipossomas são compostos por bicamadas lipídicas que podem ser compostos por fosfolipídios neutros, catiônicos ou aniônicos e colesterol, que encapsulam o núcleo aquoso. Ambas as bicamadas lipídicas e o espaço aquoso pode incorporar espécies hidrofílicas ou hidrofóbicas (B) **Lipossomas furtivos com PEG** – Características e comportamentos lipossomais *in vivo* podem ser modificados pela adição de um revestimento polimérico hidrofílico, Polietilenoglicol (PEG), para a superfície lipossomal para conferir estabilidade estérica (C) **Lipossomas com ligantes de direcionamento** – Lipossomas podem ser usados para o direcionamento específico pelo acoplamento de ligantes na sua superfície ou no fim de cadeia de PEG (D) **Lipossomas teranósticos** – Um sistema único que consistem de nanopartículas, elementos de direcionamento, agente de imagem e componente terapêutico.

Fonte: (SERCOMBE et al., 2015) adaptado

Lipossomas convencionais (Figura 2A) se baseiam na tecnologia das primeiras gerações cuja formulação consiste em, basicamente fosfolipídios e colesterol. Este último é útil na redução da velocidade de liberação do fármaco quando comparado com formulações que contém apenas uma combinação de fosfolipídios (SERCOMBE et al., 2015).

Esse tipo de carreador de fármacos reduz a toxicidade *in vivo*, através de alterações na farmacocinética entretanto, apresenta problemas como instabilidade no plasma sanguíneo e baixo tempo de meia vida de circulação (WEISSIG, 2017). Pesquisas com intuito de reduzir a captura dos lipossomas convencionais pelo sistema fagocitário foram iniciadas no final da década de 90 dando origem aos lipossomas ligados à polímeros (WANG; CHAO, 2017).

A nova geração de lipossomas estabilizada estericamente por polímeros ligados a superfície foi introduzido sendo o polietilenoglicol (PEG) (Figura 2B) o mais utilizado. Lipossomas PEG-lados são capazes de produzir uma barreira estérica diminuindo a possibilidade de ser reconhecido pelo sistema de defesa – recebendo assim o nome de lipossoma furtivo (SERCOMBE et al., 2015).

Com isso tem-se um aumento do tempo de circulação do complexo lipossomal, além de uma maior estabilidade na corrente (ALLEN; CULLIS, 2013). O recobrimento de complexos lipossomais com PEG dificulta não só a interação com as células de defesa, mas também com as células dos alvos de deposição do fármaco.

Diferentemente dos lipossomas furtivos, lipossomas com agentes de direcionamento são formulados com diferentes tipos de espécies de direcionamento, como: antibióticos, peptídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos, polissacarídeos, fatores de crescimento e ácido fólico (Figura 2C) (MUFAMADI et al., 2011). Esses agentes podem aumentar a concentração de acumulação de fármacos nas células ou tecidos alvos.

Lipossomas teranósticos apresentam como principal diferencial a capacidade de carregarem consigo agentes de imagem (Figura 2D) além dos agentes terapêuticos ou de direcionamento (TIAN et al., 2011). A principal vantagem desse modelo de complexo lipossomal é a possibilidade de se acompanhar a distribuição do mesmo nos tecidos ou órgãos de estudo.

Pode-se concluir que modificações na formulação de complexos lipossomais resultam em alterações de suas propriedades como: eficiência de encapsulamento, controle da taxa de liberação do fármaco encapsulado, direcionamento do sistema ao sítio de atuação, furtividade dos sistemas *in vivo* e mapeamento dos sistemas *in vivo*.

Consequentemente, estas alterações de propriedades resultam em alterações farmacocinéticas: o tempo de trânsito na circulação sanguínea e o metabolismo de drogas encapsuladas.

Desde a metade da década passada, diversas formulações farmacológicas comerciais utilizando lipossomas como carreadores foram sendo disponibilizadas para o tratamento do câncer, doenças infecciosas, parasitárias e inflamatórias, liberação de antígenos como adjuvante imunológico e em terapia genética (ALLEN; CULLIS, 2013; HUA; WU, 2013; MUFAMADI et al., 2011; NII; ISHII, 2005; XU; TANAKA; CZERNUSZKA, 2007). Recentemente, sistemas lipossomais revestidos por

HAP também vem sendo estudados para futuras aplicações farmacológicas (XU; TANAKA; CZERNUSZKA, 2007).

O presente trabalho irá abordar uma formulação de dois fosfolípidios: sal de sódio 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (DOPG-Na) (Figura 3) e fosfatidilcolina de soja (SPC) (Figura 4). O complexo lipossomal resultante servirá como superfície para a síntese de hidroxiapatita.

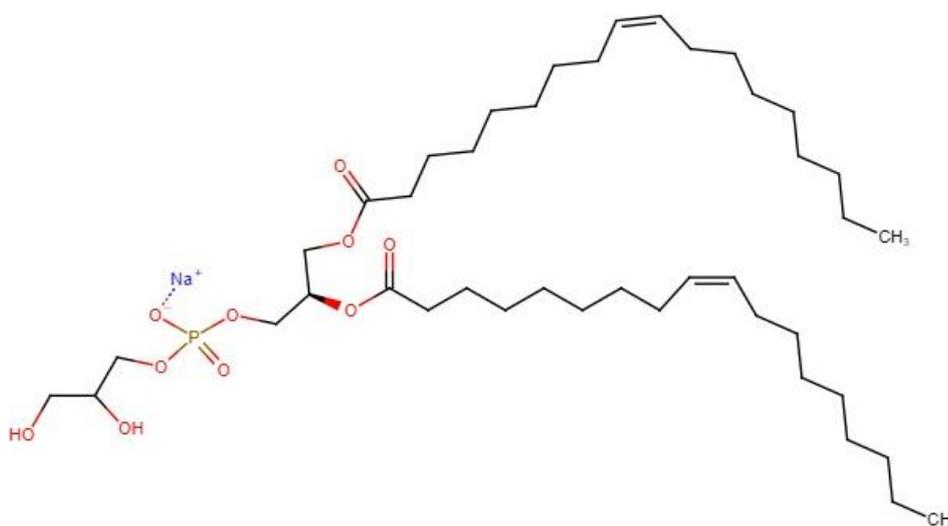


Figura 3 - Sal de sódio 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (DOPGNa)
Fonte: Autoria própria

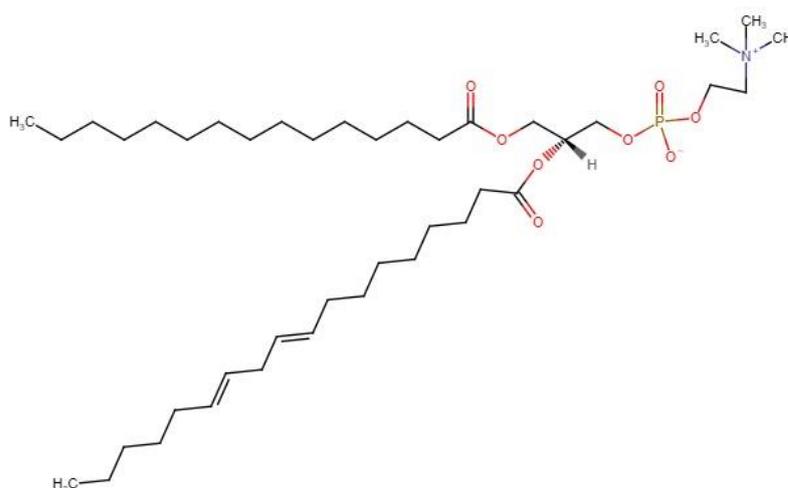


Figura 4 - Fosfatidilcolina de soja (SPC)
Fonte: Autoria própria

O DOPG-Na (Figura 3) é um fosfolípido de carga negativa em solução aquosa, enquanto o SPC (Figura 4) é neutro. Optou-se por não trabalhar apenas com DOPG-Na por uma questão de custo, sendo então utilizada uma formulação do complexo lipossomal uma proporção 1:1 de SPC e DOPG-Na. Esperava-se, assim, que mesmo com essa mistura fosse possível a obtenção um lipossoma carregado negativamente.

Para preparar a vesícula lipossomal existem diversos métodos aplicáveis: hidratação de filmes lipídicos seguida por extrusão, injeção de solução etílica e sonicação (DE FREITAS et al., 2019b). Sendo o método de injeção normalmente utilizado quando se tem a presença de moléculas insolúveis para serem encapsuladas. A técnica de extrusão pode ser aplicada para a obtenção de um tamanho de lipossomas desejado, cujo tamanho médio seria próximo do poro da membrana de polycarbonato usada durante a extrusão.

Um sistema de extrusão de lipossomas apresenta uma configuração como a apresentada na Figura 5, onde após cada passagem da solução tem-se a aproximação do tamanho dos lipossomas com as dimensões da abertura de poro da membrana.

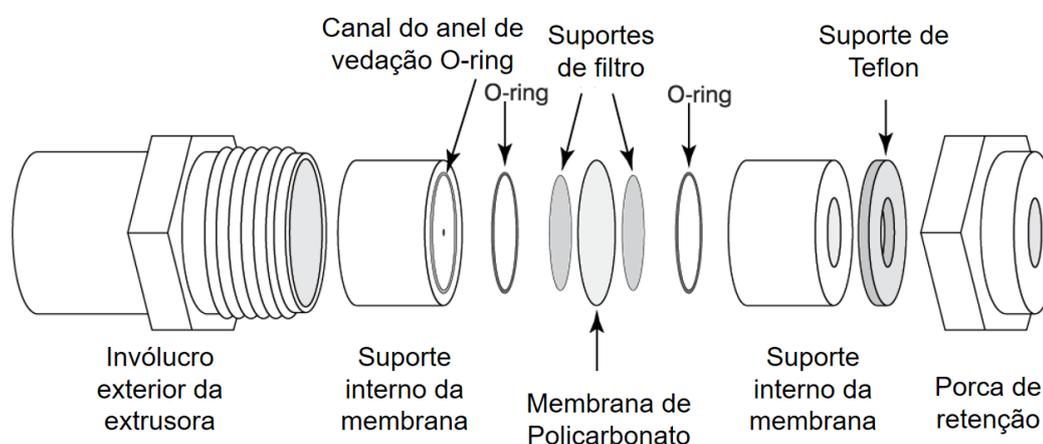


Figura 5 – Vista explodida de uma extrusora utilizada com lipossomas
Autor: (AVANTI, [2019?])

No presente trabalho foi utilizado o método de injeção etanólica e o uso de extrusão com membrana de 400 nm de tamanho de poro.

3.2 CLORIDRATO DE BUPIVACAÍNA

O cloridrato de bupivacaína (Figura 6) é um anestésico local do tipo amida e que é usado principalmente em intervenções cirúrgicas dentárias e cuja administração é comumente realizada por via venosa na forma de uma solução contendo também um vasoconstritor como a epinefrina (JUG et al., 2010). O mecanismo de ação desse anestésico se baseia na obstrução de íons sódio através da membrana dos nervos para dentro das células, prevenindo, assim a geração de uma ação potencial tendo como possíveis efeitos colaterais: tontura, visão turva, braquicardia e arritmia (TATENO et al., 2010).

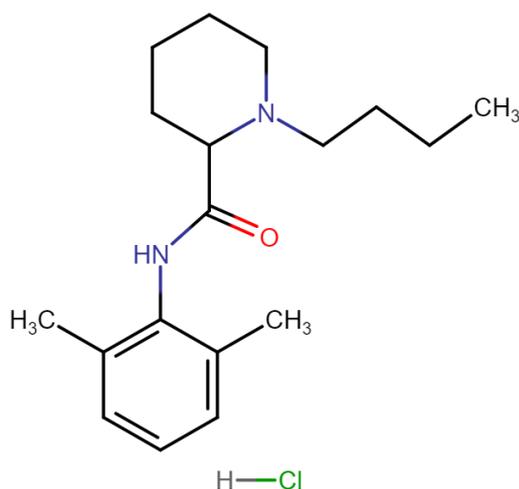


Figura 6 – Estrutura química do cloridrato de bupivacaína
Fonte: Autoria própria

O interesse principal do trabalho é o desenvolvimento do sistema híbrido lipossomas hidroxiapatita carreando ponto quântico CdSe podendo ter sido escolhido como fármaco de aplicação desde um medicamento para tratamento de câncer, um antibiótico ou mesmo um anestésico.

O cloridrato de bupivacaína (BUP) foi escolhido para o trabalho devido à sua disponibilidade e a existência de estudos de liberação controlada envolvendo este fármaco (BALOCCO et al., 2018; BERGESE et al., 2012; LAMBRECHTS et al., 2013).

3.3 PONTOS QUÂNTICOS

Pontos quânticos (PQs) podem ser considerados como sendo partículas pequenas – da ordem de 1 a 10 nm de diâmetro – de material semicondutor, que devido a suas pequenas dimensões apresenta propriedades distintas daquelas observadas em um semicondutor maciço (WANG; CHAO, 2017).

Em semicondutores maciços (*bulk*), um par elétron-buraco é tipicamente ligado dentro de um comprimento característico, conhecido como raio do éxciton de Bohr (MAITI; BHATTACHARYYA, 2013). Se houver o confinamento do par eletrônico nas três dimensões do semicondutor, tem-se, então um confinamento quântico (WANG; CHAO, 2017).

A principal propriedade estudada dos PQs é sua fotoluminescência. Fotoluminescência é um termo amplo que abrange, dentre outros, dois fenômenos: fosforescência e fluorescência (SKOOG; CROUCH; HOLLER, 2006). A fosforescência implica uma mudança de spin eletrônico, com isso, o tempo de vida deste fenômeno é muito superior ao da fluorescência (que não apresenta mudança de spin) (PERKOWITZ, 2012).

A mudança ou não na orientação de spin eletrônico ocorre quando um par eletrônico da espécie química é excitado a partir de seu estado fundamental (Figura 7a) para um nível de maior energia (Figura 8b) ou (Figura 7c). Singleto, no caso da fluorescência, em que não há mudança de orientação dos spins e tripleto, no caso da fosforescência, em que há mudança de orientação dos spins (SKOOG; CROUCH; HOLLER, 2006).

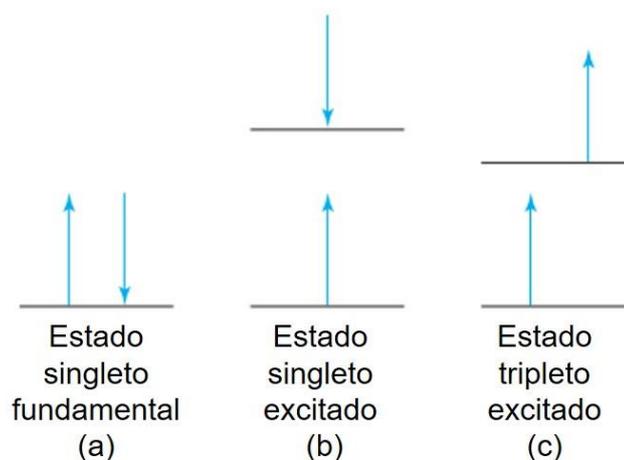
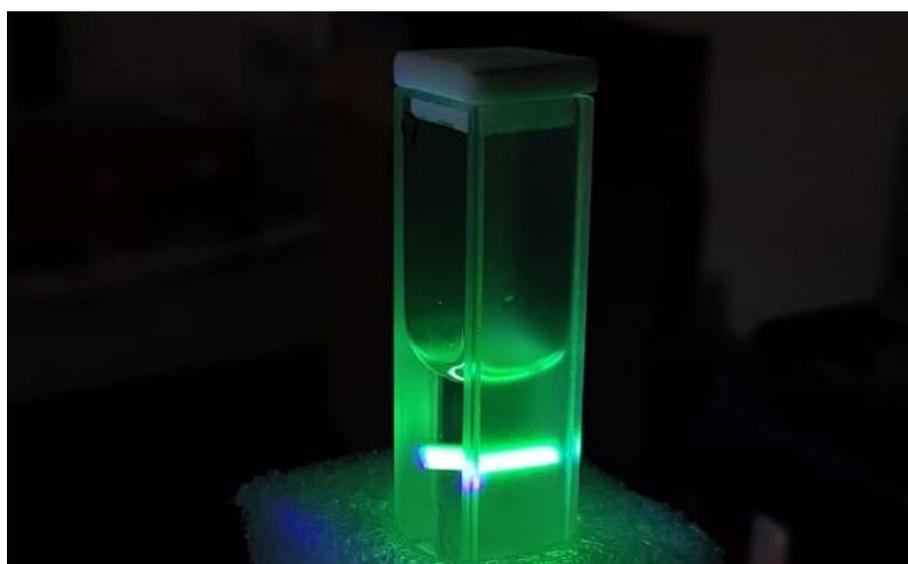


Figura 7 – Estados de spins eletrônicos das moléculas. (a) o estado fundamental. No nível energético mais baixo, estado fundamental, os spins encontram-se sempre emparelhados. (b) e (c) estados excitados. Em (b) os spins mantêm suas orientações iniciais, as moléculas em um estado singlete excitado. Em (c) um dos spins mudam de orientação, a molécula se encontra em um estado tripleto excitado. Autor: (SKOOG; CROUCH; HOLLER, 2006)

A fotoluminescência de um PQ pode ser medida em um ensaio que consiste em um feixe de luz passando através de um monocromador atingindo a amostra em uma cubeta, haverá a interação com a amostra e o feixe emissor passará pelo monocromador atingindo o detector (ZHANG, 2009). A Figura 8 apresenta uma solução contendo PQs após ser iluminada por um feixe de luz.



**Figura 8 - Amostra de ponto quântico CdSe em clorofórmio iluminada por um feixe de comprimento de onda de 410nm
Fonte: Autoria Própria**

Medidas de intensidade de fotoluminescência permitem a determinação quantitativa de uma variedade de espécies orgânicas e inorgânicas. Uma das principais vantagens de métodos de luminescência é sua sensibilidade, com a detecção de limites que são comumente de três ordens de magnitude menores que aqueles encontrados na espectroscopia de absorção (SKOOG; CROUCH; HOLLER, 2006).

As propriedades condutivas de um PQ podem ser modificadas pela alteração de tamanho e forma de cristais individuais (WANG; CHAO, 2017). Quanto maior o tamanho do cristal, mais largo é o espaçamento entre a banda de valência e de condução (*band gap*) e conseqüentemente maior a diferença de energia (MAITI; BHATTACHARYYA, 2013). Com isso mais energia é necessária para excitar o PQ e maior a energia liberada quando o mesmo retorna ao seu estado inicial.

PQs tem apresentado propriedades promissoras para uma ampla variedade de aplicações biomédicas, em que competem com pigmentos orgânicos e proteínas fluorescentes, especialmente: marcação de células *in vivo*, bioimagem e detecção (WEN et al., 2012). Em comparação com pigmentos orgânicos e proteínas fluorescentes, os PQs apresentam como principais vantagens: emissão dependente de tamanho e composição, alto coeficiente de absorção óptica, um espectro de absorção amplo, espectro de emissão curta e alta fotossensibilidade (BATALLA et al., 2015)

Devido à tais propriedades tem-se estudado o encapsulamento de PQs por lipossomas para o mapeamento de tais sistemas *in vivo* (BATALLA et al., 2015; BERA et al., 2010; WANG; CHAO, 2017; WEN et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

3.4 HIDROXIAPATITA

Biocerâmicas podem ser definidas como sendo um tipo de biomaterial de origem cerâmica desenvolvidas para atuação em organismos vivos como implantes, carreadores de fármacos ou estruturas de suporte para a regeneração de tecidos (MOHAMMAD; OTHMAN; YEE-YEOH, 2014). Em geral, dependendo da resposta dos tecidos de atuação, os biomateriais podem ser classificados como sendo: bioinertes, bioativos ou bioreabsorvíveis (MOHAMMAD; OTHMAN; YEE-YEOH, 2014).

Biocerâmicas inertes como a zircônia ou alumina, podem ser descritas como um tipo de material que possuem pouca ou quase nenhuma interação com os tecidos vizinhos a sua região de implante (MOHAMMAD; OTHMAN; YEE-YEOH, 2014).

Biocerâmicas bioreabsorvíveis podem ser descritas como sendo materiais que irão se dissolver após a sua implantação ou serem gradualmente substituídas pelos tecidos naturais (MOHAMMAD; OTHMAN; YEE-YEOH, 2014). O fosfato tricálcico (TCP), o carbonato de cálcio e o óxido de cálcio são exemplos deste tipo de biomaterial.

As cerâmicas bioativas são aquelas que interagem e formam uma forte interface com o tecido em que foram implantadas. Exemplos comuns deste tipo de material são: a hidroxiapatita (HAP) e o beta fosfato tricálcico (β -TCP) (MOHAMMAD; OTHMAN; YEE-YEOH, 2014).

A hidroxiapatita devido à sua composição semelhante ao tecido ósseo em termos de composição, alta biocompatibilidade e boa bioatividade vem sendo extensivamente pesquisada (AL-JAMAL; KOSTARELOS, 2011; COLILLA; MANZANO; VALLET-RAGÍ, 2008; KAMALANATHAN et al., 2014; MIŠKOVIĆ-STANKOVIĆ et al., 2015; NII; ISHII, 2005; SANOSH et al., 2009; STOCH et al., 2000).

A rede cristalina da HAP estequiométrica pode ser descrita como um arranjo compacto de grupos $(\text{PO}_4)^{-3}$, onde íon P^{5+} ocupa o centro dos tetraedros e cujos vértices são ocupados por quatro átomos de oxigênio (FIHRI et al., 2017). Cada tetraedro é compartilhado por uma coluna e delimita dois canais não conectados (Figura 9).

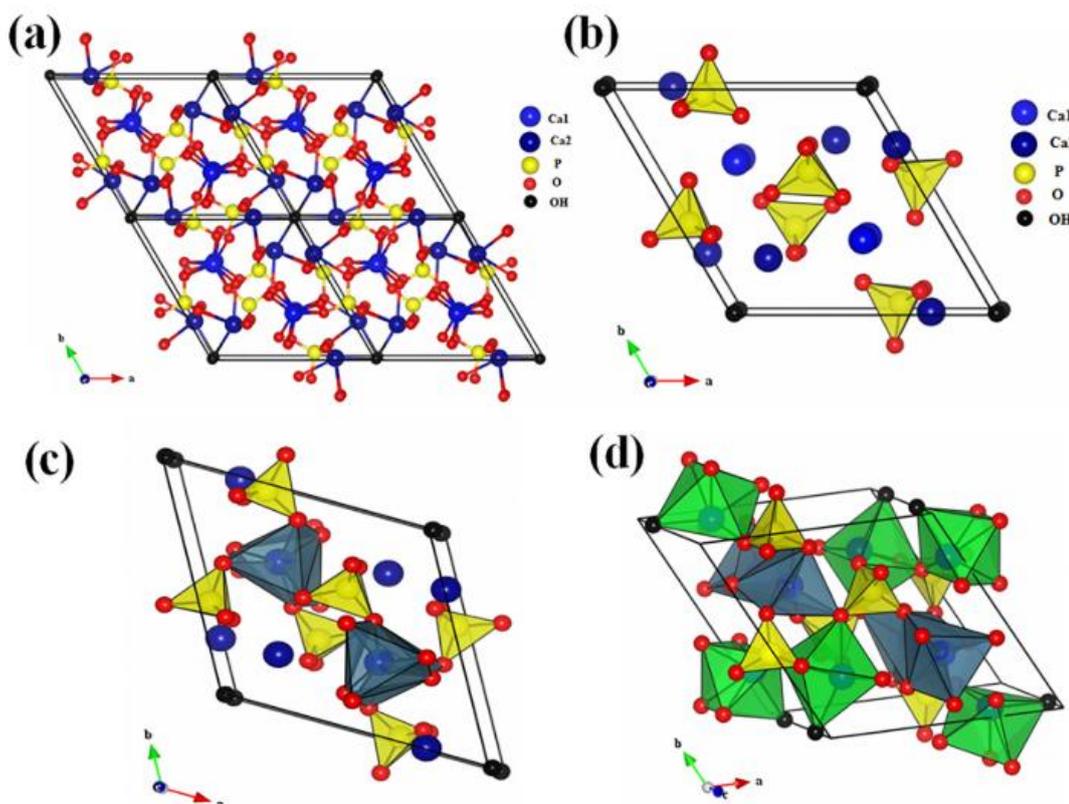


Figura 9 – (a) Projeção de uma célula unitária de hidroxiapatita no plano (001); (b) projeção mostrando o arranjo de octaedros [Ca(1)O₆] na estrutura da HAP; (c) projeção mostrando a sequência de octaedros [Ca(1)O₆] e tetraedros [PO₄] na estrutura da HAP e (d) projeção mostrando a sequência de octaedros [Ca(1)O₆] e [Ca(2)O₆], e também tetraedros [PO₄] nessa estrutura de HAP

Autoria:(FIHRI et al., 2017)

O primeiro canal é rodeado por íons Ca^{2+} , denominados Ca(1), que se encontram em coordenação com os átomos de oxigênio do tetraedro $(\text{PO}_4)^{3-}$ resultando na formação de um poliedro (Figura 9a) (FIHRI et al., 2017). O segundo canal contém seis outros íons Ca^{2+} , conhecidos como Ca(2) e que se encontram coordenados com seis átomos de oxigênio do tetraedro e uma hidroxila (OH^-) (Figura 9b) (FIHRI et al., 2017).

A HAP é um composto de fosfato de cálcio que pode ser não-estequiométrico ou estequiométrico e cuja razão molar Ca/P varia entre 1,5 a 1,67. A preparação de HAP não-estequiométrica pode ser racionalizada pelo fato de que a perda de íons Ca^{2+} e o consequente desbalanceamento de cargas é corrigido pela introdução de íons H^+ e a ausência de íons OH^- (FIHRI et al., 2017).

A síntese ocorre a partir da reação de co-precipitação de um precursor de íons cálcio (óxido de cálcio) e outro de íons fosfato (fosfato monopotássico) (FIHRI et al., 2017). Ambos os precursores são dissolvidos em água destilada, havendo no caso do

óxido de cálcio a sua transformação em hidróxido de cálcio. A reação a partir da qual ocorre a formação da HAP por meio desta rota é a que segue:



Essa cerâmica é encontrada naturalmente, em sua forma não-estequiométrica nos ossos de mamíferos, cascas de ovos e conchas de moluscos (KAMALANATHAN et al., 2014). A HAP derivada destas fontes apresenta traços de íons de ferro, magnésio, silício e flúor de impurezas incorporados no interior de sua estrutura (KAMALANATHAN et al., 2014).

Revestimentos, grânulos, partículas e enxertos de HAP tem sido investigados quanto o seu potencial como carreador de fármacos (MATSUMOTO et al., 2004; STIGTER et al., 2004; XU; TANAKA; CZERNUSZKA, 2007). Todavia, existem algumas desvantagens em sua aplicação como carreador de fármacos como baixa eficiência de encapsulamento, principalmente de antibióticos solúveis em água e picos de alta concentração durante o início da liberação (STIGTER et al., 2004; YAMAMURA; IWATA; YOTSUYANAGI, 1992).

3.5 SISTEMAS HÍBRIDOS LIPOSSOMAS/HAP/PQ

Conforme visto no item 3.3, lipossomas podem ser modificados para o monitoramento do carregamento de fármacos até sua região de atuação. Uma forma comum de realizar o mapeamento da distribuição de lipossomas *in vivo* é a incorporação de pigmentos ou proteínas fluorescentes em suas estruturas (WEN et al., 2012). Estes, entretanto, são fotoinstáveis e apresentam pouco brilho.

Os PQs tem como principais obstáculos a sua aplicação: serem altamente hidrofóbicos e insolúveis em água, além de apresentarem elementos tóxicos em sua composição (o Cádmio do CdSe utilizado no presente trabalho, por exemplo) (TAHARA et al., 2013), entretanto ambos podem ser contornados com o desenvolvimento de sistemas híbridos que envolvam lipossomas e PQ para o carregamento de fármacos.

Nestes sistemas os PQ devido à sua hidrofobicidade seriam aprisionados entre a bicamada lipídica ao passo que fármacos também hidrofóbicos seriam encapsulados (permanecendo no interior da cavidade lipossomal até sua liberação).

Conforme mostrado na (Figura 2, pág.18), sistemas lipossomais além de poderem apresentar agentes de imagem podem também ser modificados superficialmente. Dentre as possibilidades de modificação encontram-se a incorporação de polímeros ou revestimentos cerâmicos (CHU; LIU, 2005).

A hidroxiapatita é um tipo de material cerâmico que pode ser um revestimento que confere a sistemas lipossomais maior biocompatibilidade, proteção dos sistemas lipossomais na corrente sanguínea, além de proporcionar uma superfície capaz de reconhecimento químico e enganar o sistema retículo endotelial (SCHMIDT et al., 2004; SCHMIDT; OSTAFIN, 2002).

A incorporação da HAP na vesícula de lipossoma dará origem a um sistema híbrido (Figura 2C e Figura 2D, pág.20) através de uma reação de formação *in situ*. A síntese da hidroxiapatita na superfície lipossomal foi realizada a partir da técnica de co-precipitação.

Durante o processo de co-precipitação haverá a competição de duas reações, a síntese de HAP na camada lipossomal e a reação entre os íons cálcio e fosfato em solução. Foi seguida então, a metodologia proposta por SCHMIDT et al. (2004) para a formação de uma camada de íons cálcio capazes de recobrir a superfície lipossomal a partir da adição de solução lipossomal em solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Após a formação dos íons cálcios na superfície negativa do lipossoma íons fosfatos são adicionados a solução e assim a reação de formação da HAP ocorre preferivelmente na superfície lipossomal recoberta por Ca^{2+} .

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E MATERIAIS

Os principais materiais utilizados para a realização do trabalho foram: Lipídios de fosfatidilcolina de soja (SPC) e dioleoilfosfatidilglicerol de sódio (DOPG-Na) (adquiridos da Lipoid GmbH); clorofórmio (marca Synth); cloridrato de bupivacaína cedido pela Profa. Dra. Eneida de Paula do departamento de Bioquímica da Unicamp; Óxido de cálcio cedido pelo Prof. Dr. Márcio Florian do departamento de Engenharia de Materiais da UTFPR-LD; Fosfato de potássio monobásico (marca Cinética); álcool etílico absoluto (marca Synth); Membrana de diálise (marca Vake); hidróxido de amônio (marca Neon) e o ponto quântico de CdSe foi cedido pelo prof. Dr. Sidney Alves Lourenço do departamento de física da UTFPR-Londrina.

4.2 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS LIPOSSOMAIS

A obtenção do sistema lipossomal carreador de fármaco revestido por HAP envolveu uma série de procedimentos, apresentados na Figura 10, e detalhados ao longo do escopo deste texto.

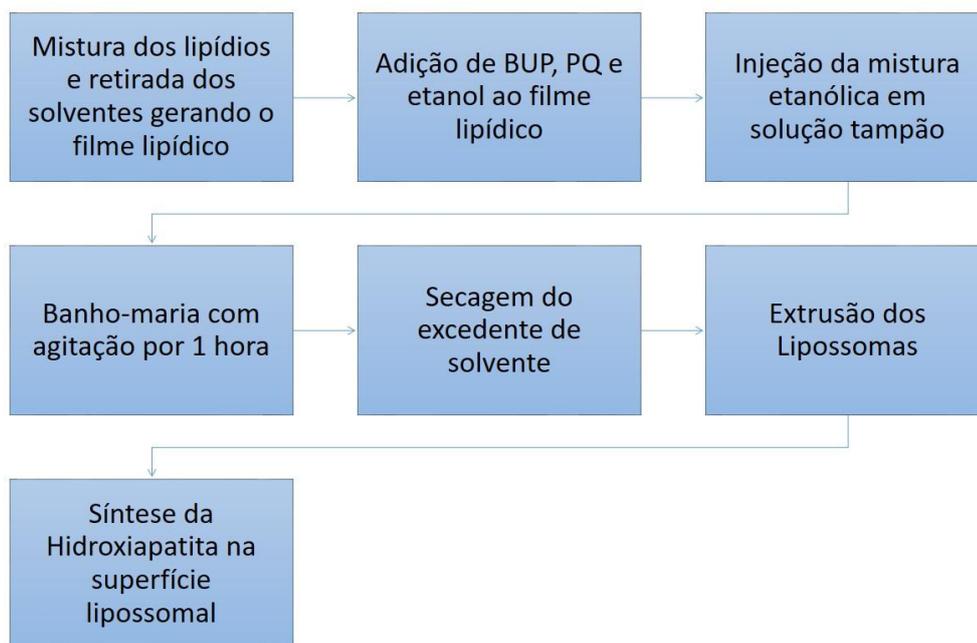


Figura 10 – Esquema representando a obtenção dos sistemas lipossomas
Fonte: Autoria própria

Os lipossomas foram preparados a partir de soluções lipídicas de fosfatidilcolina de soja (SPC) e dioleoilfosfatidilglicerol de sódio (DOPG-Na) em uma razão molar de 1:1 (10 mM) dando origem a um filme lipídico após a evaporação do solvente (clorofórmio) conforme é descrito por Hua e Wu (2013).

Ao filme lipídico foram adicionados 10 mM de cloridrato de bupivacaína (BUP), 80 μ M de CdSe, 100 μ L de clorofórmio e 300 μ L de etanol. Esta solução etílica foi injetada em um balão de fundo redondo contendo 1,5 mL solução tampão com pH de 7,4 (fosfato 2 mM). A solução foi mantida sob agitação em banho maria (temperatura de aproximadamente 50°C), durante 1 hora. O excesso de solvente foi rotaevaporado em aproximadamente 50°C e 80 rpm dando origem as vesículas multilamelares grandes.

4.2.1 Extrusão dos complexos lipossomais

A fim de obter-se uma maior regularidade de tamanho de lipossomas, as amostras foram submetidas ao processo de extrusão. Para realizar a extrusão foi utilizado um sistema extrusor Avanti Polar Lipids® (Figura 11), equipado com

membrana de policarbonato, com poros de 400 de diâmetro. Foram realizados 13 ciclos de extrusão, até obtenção dos lipossomas com tamanho homogêneo.



Figura 11 - Sistema de extrusão utilizado
Fonte: Autoria própria

4.2.2 Síntese de Hidroxiapatita na superfície lipossomal

Para a formação do revestimento de HAP sobre a superfície do lipossoma, uma solução de 1mL de lipossomas (10 mM) previamente extrusada foi adicionada em 20mL de solução de hidróxido de cálcio (0,738 mg) (SCHMIDT et al. 2004). O sistema foi mantido por agitação por 24 horas para garantir a formação da camada de cálcio sobre os lipossomas. Uma alíquota de 200 μ L de uma solução de fosfato de potássio monobásico (0,813 mg) foi manualmente injetada na solução lipossomas com camada de Ca^{+2} a cada um minuto – totalizando 10 mL de solução fosfato adicionada.

O pH do meio foi monitorado com auxílio de um pHmêtro de bancada e se manteve em torno de 10,8 durante todo o tempo de reação. A manutenção do pH nesse valor foi possível devido à adição de hidróxido de amônio quando percebido um aumento na acidez do meio. Por fim, o excesso de solvente foi eliminado com o uso do rotaevaporador.

4.2.3 Outras formulações analisadas

Diferentes formulações foram preparadas contendo lipossomas vazios ou “ocos” (LIP), amostras contendo complexo lipossoma/BUP (LBUP), lipossoma/PQ (LPQ) e lipossoma/BUP/PQ (LBPQ) para comparação de resultados com a amostra

que apresentam complexo lipossoma/BUP/PQ/HAP (LHAP). A composição destas amostras se encontra descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição de 1 mL das amostras de complexos lipossomais analisadas

Amostra	Concentração de Lipossoma (mM)	Concentração de Cloridrato de Bupivacaína (mM)	Concentração de pontos quânticos CdSe (μM)	Presença de Hidroxiapatita
LIP	10	-	-	Não
LBUP	10	10	-	Não
LPQ	10	-	80	Não
LBPQ	10	10	80	Não
LHAP	10	10	80	Sim
HAP	0	0	0	sim

Fonte: Autoria própria

A preparação das amostras seguiu, em sua maioria, o procedimento esquematizado na Figura 10 (pág.31) até a etapa de extrusão. Somente a amostra LIP foi preparada diferentemente, obtida pela reidratação do filme lipídico com a solução tampão.

4.3 SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA

Para a síntese da amostra contendo somente hidroxiapatita partiu-se de 0,995M de óxido de cálcio dissolvido em 20 mL de água destilada agitada por 24h. Com auxílio de uma micropipeta foi introduzido lentamente 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 0,995 M (10 mL) de KH_2PO_4 na solução contendo o hidróxido de cálcio (produto da transformação do óxido de cálcio em água) (FIHRI et al., 2017). O pH do meio foi monitorado ao longo do ensaio com pHmetro sendo que o valor aferido se manteve em 10,4 com o gotejamento de uma solução de hidróxido de amônio P.A quando da diminuição do valor de pH.

A suspensão foi deixada em descanso por um período de 24 horas e em seguida filtrada. O material retido no filtro foi seco em uma estufa Sterilifer®, à 80°C por 2 dias resultando em um aglomerado branco de pouca coesão. Este foi cominuído

em um conjunto de almofariz e pistilo (ambos de porcelana) obtendo-se assim um pó branco e fino ao olho nu.

4.4 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X.

Para comprovar que a síntese da HAP forneceu o produto desejado uma alíquota deste pó foi prensando no formato de uma pastilha e levado para análise de difratometria de raios X (Bruker modelo D2:Phaser) no laboratório multiusuário da UTFPR Londrina. A análise foi feita com 2θ entre 20 a 80° com passo de 0,01°.

4.5 ANÁLISE DE INFRAVERMELHO

Para comprovar que a fase de HAP livre ou depositada no lipossoma foi realizada também a análise espectrométrica de refletância no infravermelho em uma faixa de comprimento de onda de 450 a 4000 cm^{-1} . Alíquotas do pó das amostras de LBPQ, HAP e LHAP foram levadas para o aparelho da PerkinELMER© modelo Spectrum II, com o acoplamento do módulo de ATR, alocado no laboratório B004 do departamento de engenharia de materiais (DAEMA) da UTFPR campus Londrina.

4.6 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ E POTENCIAL ZETA

O espalhamento dinâmico de luz (do inglês *dynamic light scattering* ou DLS) é uma técnica não invasiva, que permite a mensuração do tamanho médio e distribuição do tamanho médio de partículas em dispersão. Como o nome sugere a técnica se baseia no espalhamento da radiação incidente nas partículas. De maneira simplificada, pode-se entender que o movimento browniano das partículas em suspensão faz com que a luz incidente de um laser seja espalhada com diferentes intensidades dependendo do tamanho da partícula em que incide (HALLETT, 1994). A partir do estudo da variação de intensidade, é possível, usando a relação Stokes-

Einstein obter a velocidade do movimento browniano e assim, o tamanho da partícula (HALLETT, 1994).

A distribuição de tamanho dos lipossomas presentes nas amostras LBUP, LBPQ e LHAP foi medida a partir alíquotas de 600 μ L de concentrações 1 mM (LIP e LBUP) e 10 mM (LBPQ e LHAP) em um aparelho Zetasizer NanoPlus (NanoPlus Particle Size Analyzer) no Departamento de Química da Universidade de Maringá (UEM).

O potencial Zeta (Z) é o potencial entre uma partícula e o meio (líquido) onde se encontra dispersa, podendo desta forma ser utilizado para estimar a carga de superfície dessas partículas (KRSTIĆ et al., 2018). O potencial Zeta é um indicador da estabilidade de uma suspensão, em que valores positivos maiores que +30 mV e negativos menores -30 mV que indicam uma boa estabilidade e que não haverá coalescência entre as partículas (KRSTIĆ et al., 2018).

Análises foram realizadas do potencial zeta e do índice de polidispersividade das amostras LIP e LBUP (1 mM), LBPQ e LHAP (10 mM) em um aparelho Zetasizer NanoPlus (NanoPlus Particle Size Analyzer). Para o teste de potencial zeta amostras foram diluídas (4 μ L da formulação para 996 μ L de água deionizada) e feitas em triplicata, na temperatura de 25°C (Franz-Montan et al., 2013; 2015).

4.7 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DO FÁRMACO

A medida do conteúdo de BUP encapsulado nos sistemas LBUP e LBPQ foi executada utilizando um espectrofotômetro UV/Vis – Modelo: Libra Biochromem comprimento de onda fixo de 263 nm. Primeiramente uma curva de calibração da BUP foi realizada usando soluções padrões com concentração variando entre de 0,5 a 3 mM.

A eficiência de BUP encapsulada nas amostras lipossomais LBUP e LBPQ foi determinada utilizando a técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação (Millipore, USA, ME Cut-off 10,000Da). Uma quantidade de 2 mL da amostra LBUP e LBPQ foi colocada em uma unidade de filtro e submetida a uma ultracentrifugação. A quantidade que passou através do filtro (BUP livre) foi quantificada utilizando

espectrofotometria de UV à 263 nm. O cálculo de eficiência foi realizado através da Equação 1:

$$\%BUP_{encapsulada} = \frac{(C_i - C_x)}{C_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

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

4.8 ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As amostras de BuP, LBUP e LBPQ foram preparadas com solvente deuterados (D_2O) e foram levadas para análise de RMN (Bruker 400 MHz para frequência de hidrogênio). Alíquotas de 600 μ L foram levadas ao espectrômetro de ressonância em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro. Os experimentos foram conduzidos em 25 °C usando-se como referência o pico do deutério residual (4,70ppm) utilizado como trava do campo e ajuste da homogeneidade do campo magnético. Os processamentos dos experimentos foram realizados com software padrão top spin.

4.9 ANÁLISE DE FOTOLUMINESCÊNCIA

A fim de confirmar a manutenção da fluorescência dos pontos quânticos após seu encapsulamento na bicamada lipídica, foi realizada a técnica de fotoluminescência, que consiste na excitação da amostra por meio de um *laser* de comprimento de onda de 410 nm, com uma angulação de aproximadamente 30°. Após a interação do feixe com a amostra, tem-se um feixe resultante passando através de um sistema de lentes até o leitor no espectrofotômetro.

Para esse ensaio foi preparada uma amostra PQ, LBPQ e LHAP nas concentrações: 80 μ M, 10 mM e 10 mM, respectivamente. A técnica foi realizada no Laboratório do DFMNano da UTFPR – Londrina (Figura 12).

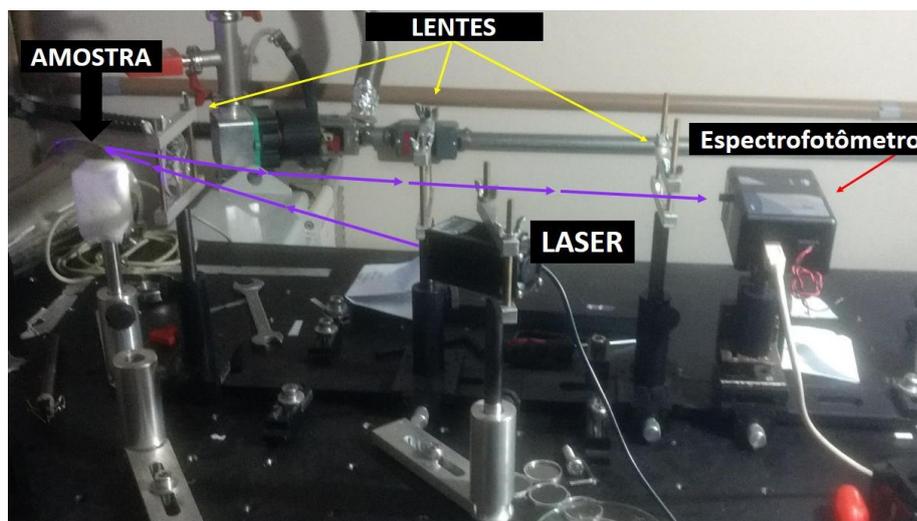


Figura 12 – Equipamento utilizado para o ensaio de fotoluminescência
Fonte: Autoria própria

4.10 ENSAIO DE LIBERAÇÃO

Uma variedade de métodos podem ser utilizadas para observar o comportamento de liberação de um fármaco *in vitro* como: saco de diálise, diálise reversa, microdiálise e células de Franz (BHARDWAJ; BURGESS, 2010). Nesse experimento foram montados dois sistemas para o ensaio de liberação para analisar o perfil de liberação das amostras LBPQ e LHAP.

O primeiro ensaio foi realizado com células de Franz que é compostos por dois sistemas o doador e o receptor. O volume do recipiente receptor é de 15 mL e é totalmente preenchido por solução tampão. O recipiente doador continha 1 mL de solução lipossomas de LBPQ e LHAP (10 mM de BUP em cada amostra) sobre agitação e temperatura de 25° C. A membrana de celulose (Spectrapore®, 1000 Da ou 1,3 nm de tamanho de poros para exclusão molecular) separa esses dois compartimentos.

O segundo sistema foi montado envolvendo membrana de diálise conforme representado na Figura 13.

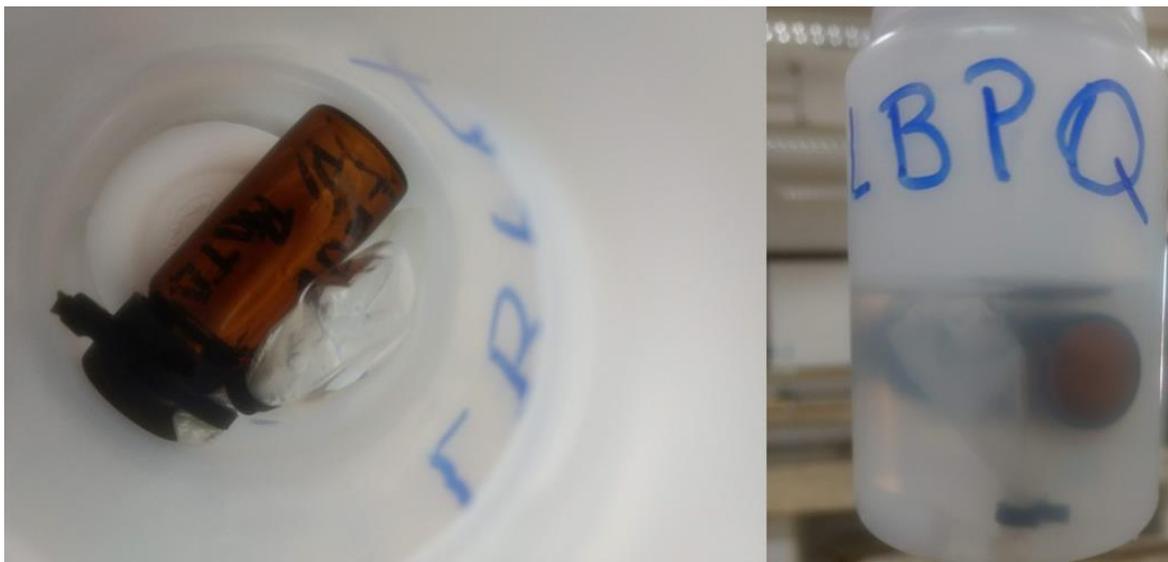


Figura 13 – Montagem do sistema para o ensaio de liberação
Fonte: Autoria própria

Na Figura 13 o saco de diálise encontra-se amarrado ao frasco para amostra contendo água (peso). O peso estava presente para que o suporte não flutuasse até a superfície. Sendo o suporte necessário para que a barra magnética não se agitasse batendo no saco de diálise.

Em ambos os testes alíquotas da amostra foram retiradas (1 mL na célula de Franz com subsequente substituição do volume retirado com solução tampão e 2 mL para o teste de diálise com retorno da alíquota). Os tempos de retirada das alíquotas foram: 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 12; 22; 32; 50 horas e analisados com UV-Vis em 263 nm.

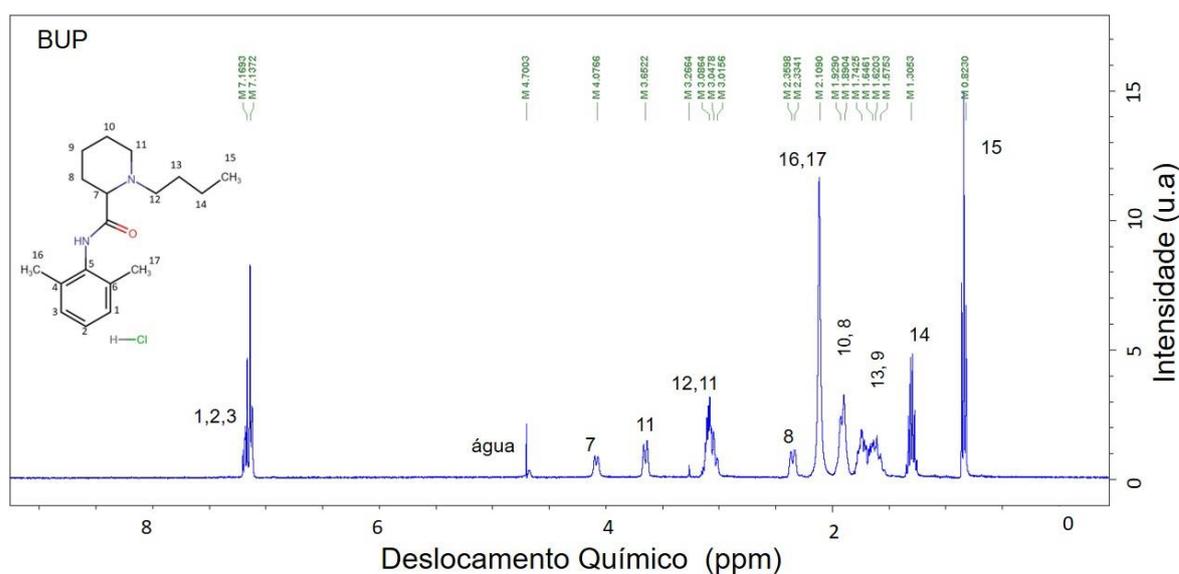
As medidas de absorção foram convertidas para porcentagem de fármaco liberados em função do tempo. Os testes foram realizados para dois sistemas o LBUP e o LHAP em pH 7,4.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para demonstrar que ocorreu a formação do complexo de inclusão entre as vesículas lipossomais, o anestésico local bupivacaína e o ponto quântico CdSe realizou análises de ressonância magnética nuclear RMN de ^1H . A caracterização desse complexo é fundamental para realizar a deposição do hidroxiapatita sobre a superfície do lipossoma.

5.1 ANALISE DE RMN DA BUP E DOS COMPLEXOS LBUP E LBPQ

A primeira evidência observada para a formação de um complexo é a variação do deslocamento químico no espectro de RMN de ^1H . Assim, a caracterização da formação do complexo de inclusão foi iniciada por meio de experimentos de RMN ^1H para as moléculas de BUP na forma livre (Figura 14), BUP encapsulada em lipossomas (LBUP) (Figura 15) e BUP encapsulada em lipossomas e na presença de CdSe (LBPQ) (Figura 16).



Fonte: Autoria própria.

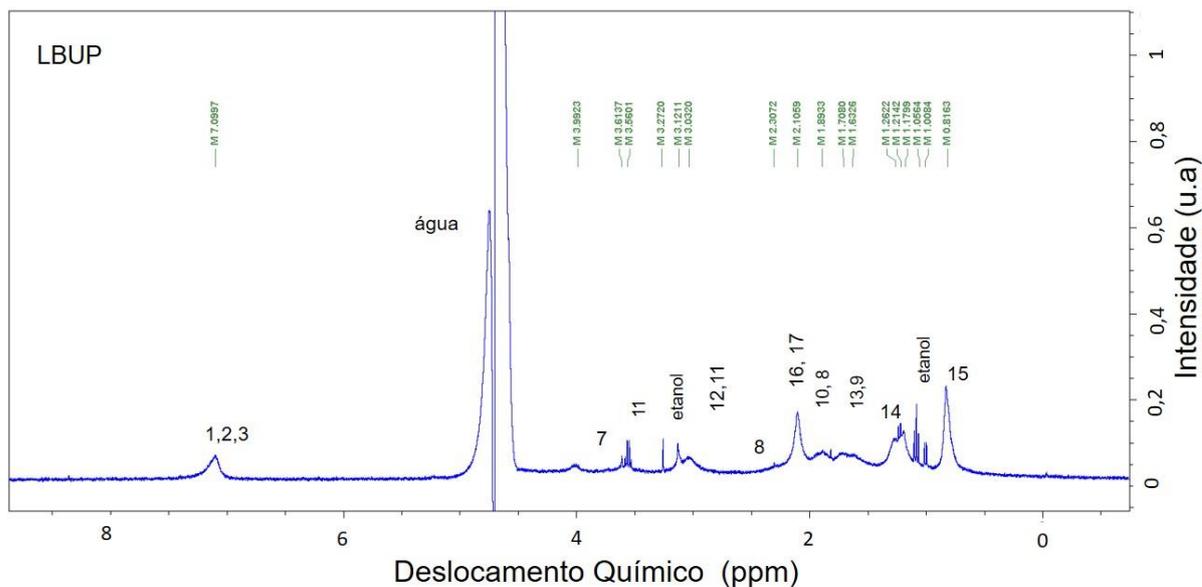


Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) da amostra LBUP [10 mM].

Fonte: Autoria própria

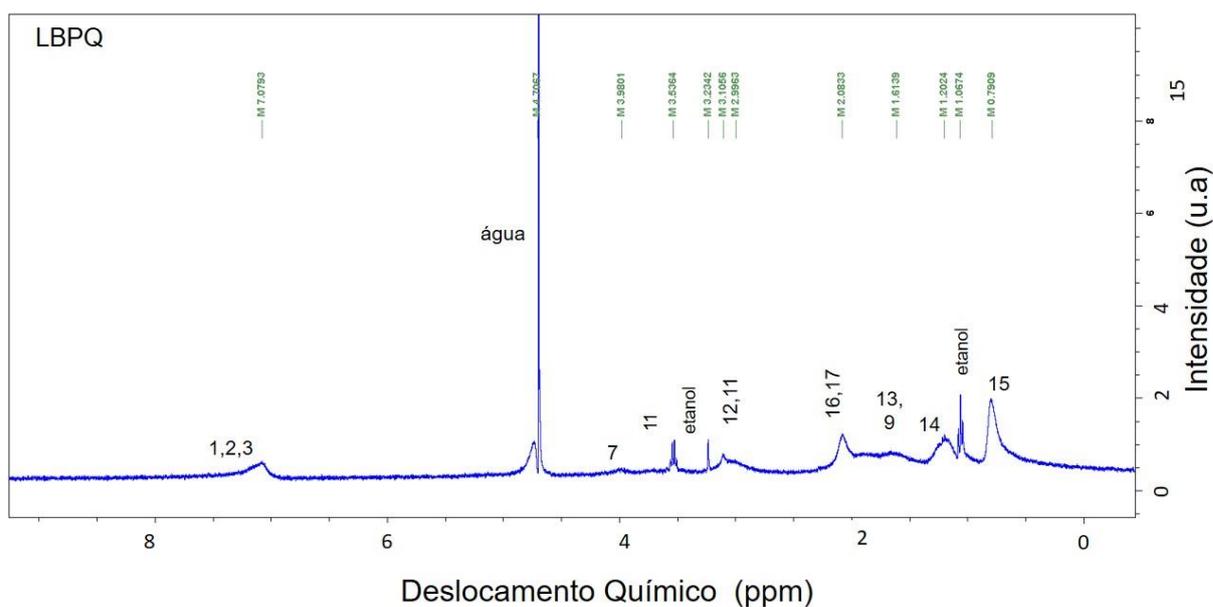


Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) da amostra LBPQ [10 mM].

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise do espectro de hidrogênio da bupivacaína (Figura 14), complexo bupivacaína em lipossomas (Figura 15) e bupivacaína-lipossomas-CdSe (Figura 16), nota-se que houve mudanças no deslocamento dos hidrogênios da BUP. A confirmação desse deslocamento é possível na Figura 17 em que há a junção dos espectros das três figuras.

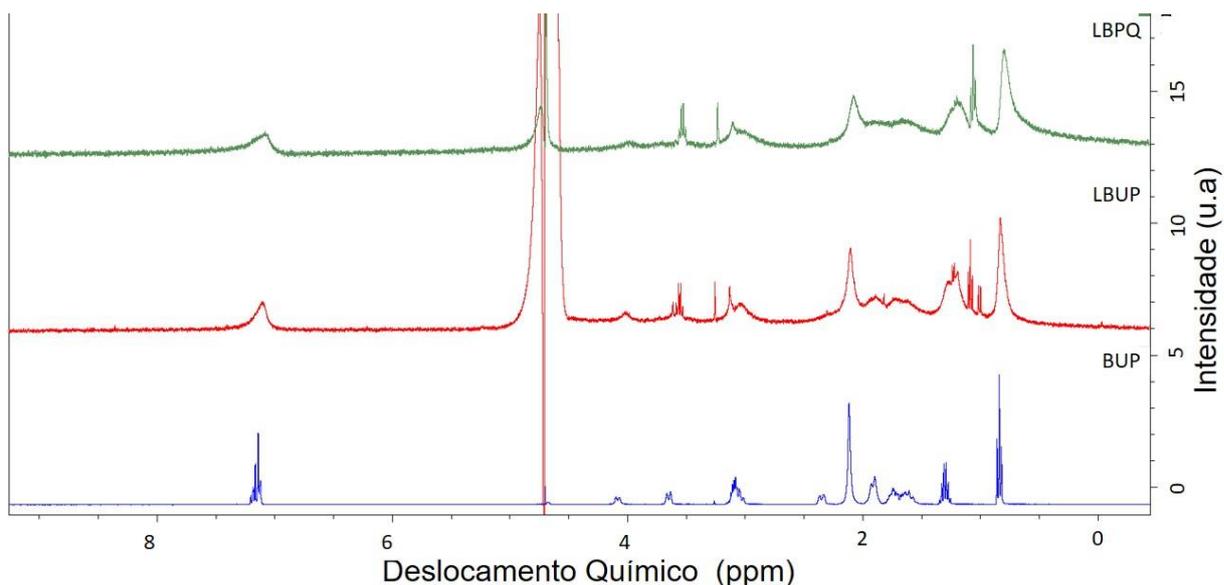


Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) de BUP, LBUP e LBPQ [10 mM].

Fonte: Autoria Própria

A Tabela 2 apresenta então o comparativo entre os deslocamentos químicos de ^1H identificados na amostra BUP e seus equivalentes nas amostras LBUP e LBPQ.

Tabela 2 - Atribuição e deslocamento químico dos ^1H da BUP, LBUP e LBPQ [10 mM], e a comparação dos deslocamentos LBUP/BUP e LBPQ/BUP

Identificação dos ^1H	BUP	LBUP	LBUP/BUP	LBPQ	LBPQ/BUP
	$\delta \text{ } ^1\text{H}(\text{ppm})$	$\delta \text{ } ^1\text{H}(\text{ppm})$	$\Delta\delta \text{ } ^1\text{H}(\text{ppm})$	$\delta \text{ } ^1\text{H}(\text{ppm})$	$\Delta\delta \text{ } ^1\text{H}(\text{ppm})$
15	0,82	0,82	0,01	0,79	0,03
14	1,31	1,06	0,25	1,20	0,10
8, 10	1,89	1,89	0,00	1,61	0,28
9, 13	1,74	1,71	0,03	-	-
16,17	2,11	2,11	0,00	2,08	0,03
8	2,33	2,31	0,03	-	-
11, 12	3,09	3,12	-0,03	3,11	-0,02
11	3,65	3,61	0,04	3,54	0,12
7	4,08	3,99	0,08	3,98	0,10
1, 2, 3	7,14	7,10	0,04	7,08	0,06

Fonte: Autoria própria

Observa-se na Tabela 2 que houve uma variação no deslocamento químico mais evidente nos H14, H11, H7 e H aromáticos (1,2 e 3) da BUP quando encapsulada no lipossoma. A mesma variação foi observada no complexo LBUPQ incluindo agora os H8, H10. Essa alta variação no deslocamento (valores de $\Delta\delta$ de 0,25 e 0,28) indica que houve evidências de encapsulação da molécula de BUP no complexo lipossomal principalmente na presença de pontos quânticos. Esses dados também sugerem que as partículas CdSe podem estar inseridas na camada lipossomal.

Outra característica que evidencia a formação de complexo é o alargamento do sinal dos hidrogênios da BUP quando encapsuladas nos lipossomas. Esse alargamento é devido à diminuição do tempo de relaxação T2 para macroestruturas e como a BUP está encapsulada passaria a possuir um tempo menor T2 e alargamento do sinal. Assim, pode se concluir com base nos deslocamentos dos hidrogênios da BUP e alargamento dos sinais que ocorreu uma grande mudança no ambiente química dos hidrogênios e isso poderia ser explicado devido à complexação da BUP no lipossoma.

5.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DE CLORIDRATO DE BUPIVACAÍNA

Para mensurar a eficiência de encapsulação da bupivacaína nos lipossomas primeiro foram definidos os comprimentos de onda de máxima absorção da BUP na região do UV (Figura 18A). A absorbância máxima do BUP no espectro ocorreu em comprimento de onda de $\lambda=263$ nm. Em seguida, foi obtida uma curva de calibração da BUP variando a concentração entre 0,5 e 3,5 mM (Figura 18B)

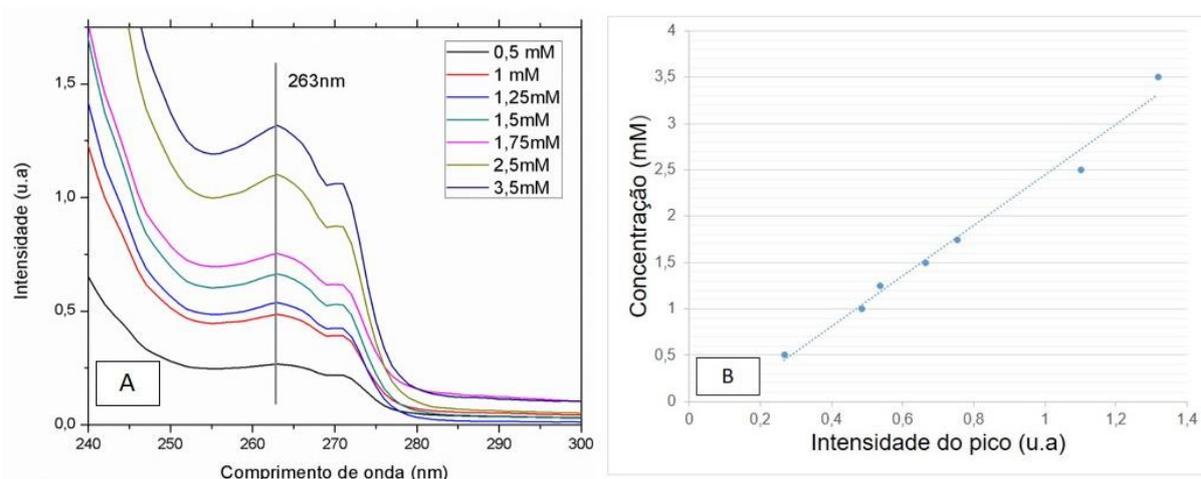


Figura 18– (a) Espectro de absorção da BUP, (b) Curva de intensidade do pico pela concentração da solução

Fonte: Autoria própria

O coeficiente de correlação linear (R^2) foi de 0,9844. Esse valor de coeficiente implica que o modelo utilizado é capaz de explicar 98,44% dos pontos plotados. Aplicando-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi obtida a Equação 2 que representa a relação linear entre a intensidade dos picos característicos de BUP no espectro de absorção e as respectivas concentrações das soluções.

$$y=2,732x - 0,2867 \quad (\text{Eq. 2})$$

Nessa Equação (y) se refere a concentração de BUP e (x) a intensidade da absorbância no comprimento de onda 263 nm no espectro de absorção no UV/Vis.

Para o cálculo de porcentagem de encapsulação da BUP no lipossoma, amostras LBUP e LBPQ foram preparadas e submetidas à ultracentrifugação em um filtro como descrito em materiais e métodos. O filtrado (BUP livre) foi levado para um equipamento de UV visível e a eficiência de encapsulamento da BUP pode ser calculada por meio da Equação 2.

A Tabela 3 apresenta os valores obtidos de porcentagem de encapsulação e nota-se que houve um aumento no percentual de encapsulamento na presença do ponto quântico.

Tabela 3 – Os valores de concentrações de fármaco em solução (mM) e percentual de cloridrato de bupivacaína encapsulada no lipossoma (%) correspondentes ao pico em 263 nm no espectro de absorção UV/Vis

Amostra	C_x (mM)	%BUP encapsulada (%)
LBUP	3,415±0,270	81,84±0,89
LBPQ	1,016±0,005	89,01±0,04

Fonte: Autoria própria

A porcentagem de encapsulação de BUP nos lipossomas foi um pouco superior na presença do ponto quântico (89%). Isso pode ser explicado em função da localização dos pontos quânticos na vesícula lipossal. Na Figura 19 são apresentadas as formas como pode ocorrer a incorporação dos PQs nos modelos de carregamento híbridos (WANG; CHAO, 2017): (a) inseridos no espaçamento entre as camadas lipídicas, (b) ligados à superfície lipossomal e (c) encapsulados no interior da vesícula lipossomal.

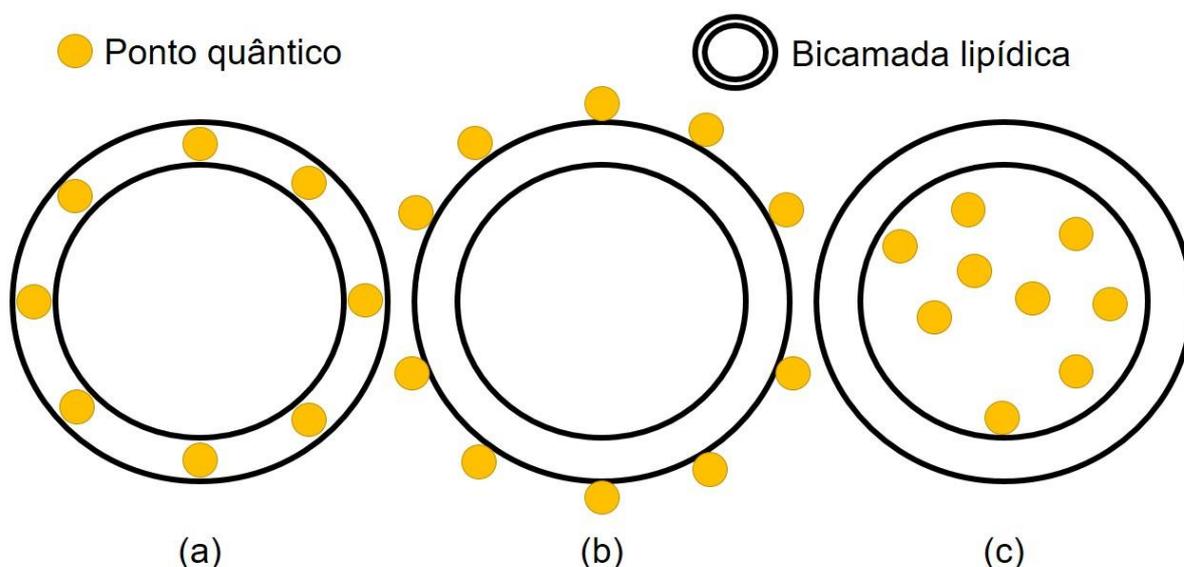


Figura 19 – Modelos de incorporação dos pontos quânticos dos sistemas híbridos de carregamento de fármacos. (a) PQs encapsulados entre a bicamada lipídica, (b) PQs ligados a superfície do lipossomas e (c) PQs encapsulados no interior da vesícula.

Fonte: Autoria própria

Supõe-se baseado na natureza do PQ utilizado (CdSe não modificado), que os mesmos tenham sido encapsulados entre a bicamada lipídica conforme apresentado na Figura 19 A. Isso pois os modelos representados por Figura 19 B e C são referentes a complexos lipossomais envolvendo PQ modificados para serem hidrofílicos. A posição dos PQ entre as camadas lipossomais podem deformá-las

(WANG; CHAO, 2017) de forma a aumentar a porcentagem de encapsulação do fármaco.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA (HAP).

Caracterizado o complexo de inclusão LBUP e LBPQ em termos de formação e porcentagem de encapsulação, o próximo passo foi a formação da camada de hidroxiapatita sobre a superfície do lipossoma. Entretanto, antes de realizar esse procedimento é importante verificar se a síntese de HAP realmente está sintetizando a fase esperada. Assim, após a síntese da HAP ter ocorrido o material foi seco e caracterizado utilizando as técnicas de difração de raios-x. Os picos encontrados a partir do difratograma são apresentados Figura 20.

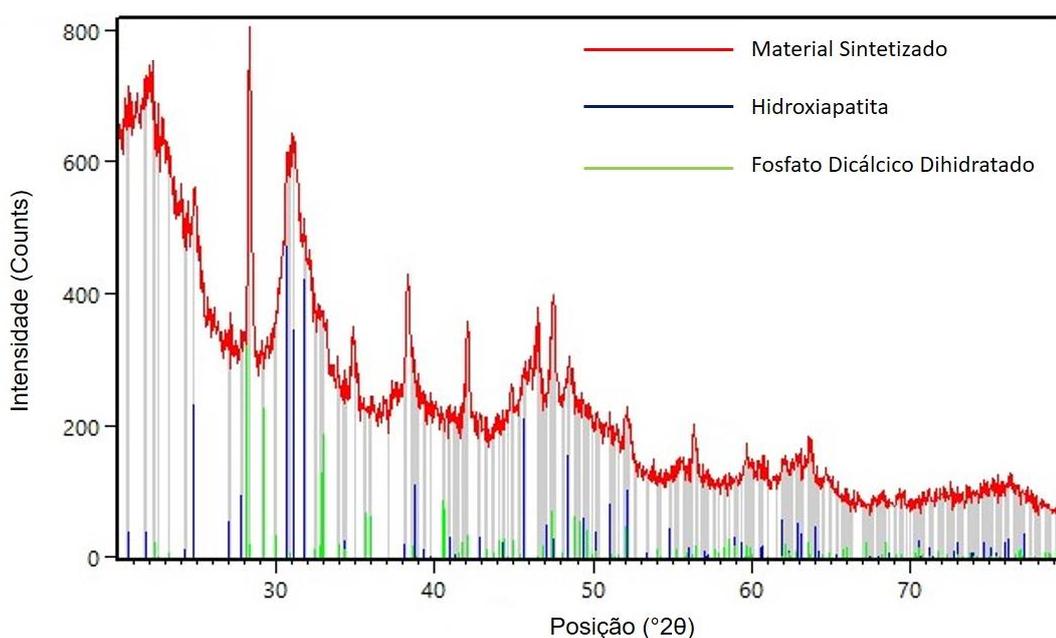


Figura 20– Comparação entre os picos do difratograma da HAP sintetizada e dos bancos de referências de HAP e fosfato dicálcico dihidrato
Fonte: Autoria própria

Com base nas informações apresentadas pela na Figura 20, pode-se inferir que a HAP não foi sintetizada totalmente pura, pois é possível identificar fase de fosfato dicálcico dihidratado.

Para confirmar que a fase da HAP sintetizada foi realizada experimento de infravermelho (Figura 21)

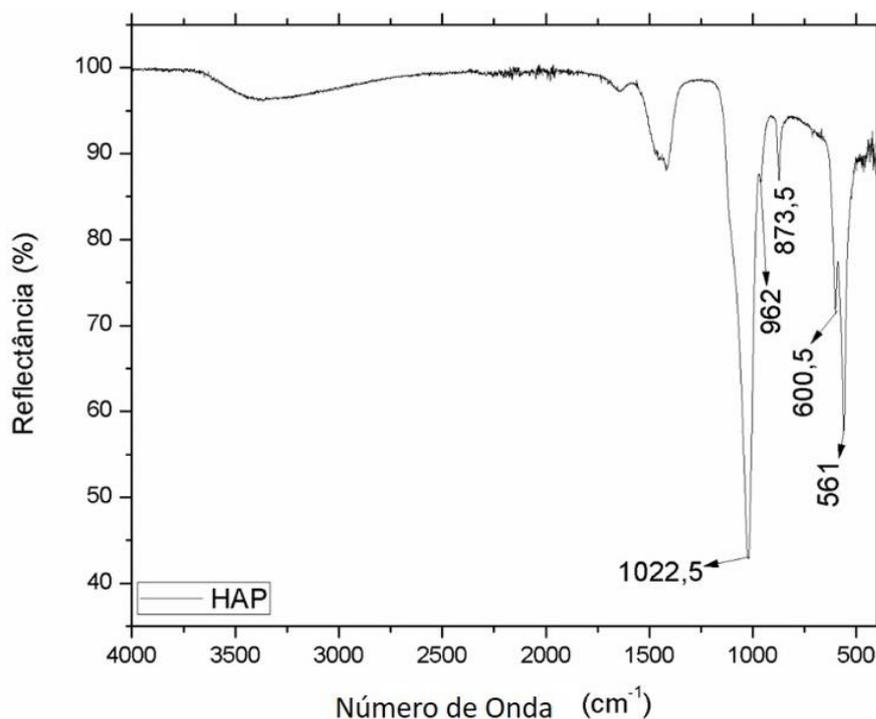


Figura 21 - Espectro de infravermelho da hidroxiapatita
Fonte: Autoria Própria

Na Figura 21 é possível observar alguns valores de absorvância característicos da hidroxiapatita. Tem-se picos vales em 600,5 e 561 cm^{-1} , que são atribuídos a deformação angular de P-O dos grupos fosfatos (MIŠKOVIĆ-STANKOVIĆ et al., 2015). Pode-se observar ainda um sinal em 873 cm^{-1} que é atribuído ao íon HPO_4^{2-} , a presença deste elemento é um sinal de HAP não-estequiométrica. Os picos 1022,5 e 962 cm^{-1} correspondem as ligações O-P-O dos íons fosfatos (MIŠKOVIĆ-STANKOVIĆ et al., 2015). As bandas entre 3650 a 3300 cm^{-1} são atribuídas aos modos vibracionais e de estiramento dos grupamentos OH^- da estrutura cristalina da HAP, mas também podem ser referentes à água absorvida. Assim, é possível confirmar que o fosfato sintetizado apresenta a fase de HAP.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO REVESTIMENTO DE HAP NO LIPOSSOMAS (LHAP).

Para realizar o processo de síntese da HAP sobre a superfície de lipossomas primeiro foi preparada uma solução lipossomal contendo o fármaco BUP e o ponto quântico CdSe. À essa solução foi adicionada uma quantidade de óxido de cálcio

como precursor de íons cálcio. Essa mistura foi deixada sob agitação por 24 hs para garantir que os íons cálcios positivos se depositassem sobre a superfície negativa da vesícula lipossomal, formando assim uma camada de íons cálcios sobre os lipossomas(SCHMIDT et al. 2004).

Em seguida, foi gotejado lentamente uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,5 mM para que os íons fosfatos reagissem com a camada de íons cálcio e formassem uma camada de hidroxiapatita sobre a superfície do lipossoma. Para caracterizar esse revestimento foram realizados testes de infravermelho, tamanho de vesícula e potencial zeta.

5.4.1 - Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho pode ser utilizada em combinação com outras técnicas para a identificação de espécies químicas. O presente trabalho procurou combinar esta técnica com a difração de raios-X para a identificação do revestimento do complexo lipossomal. O espectro de infravermelho da HAP pura (Figura 22B) já foi discutido no item 6.3.

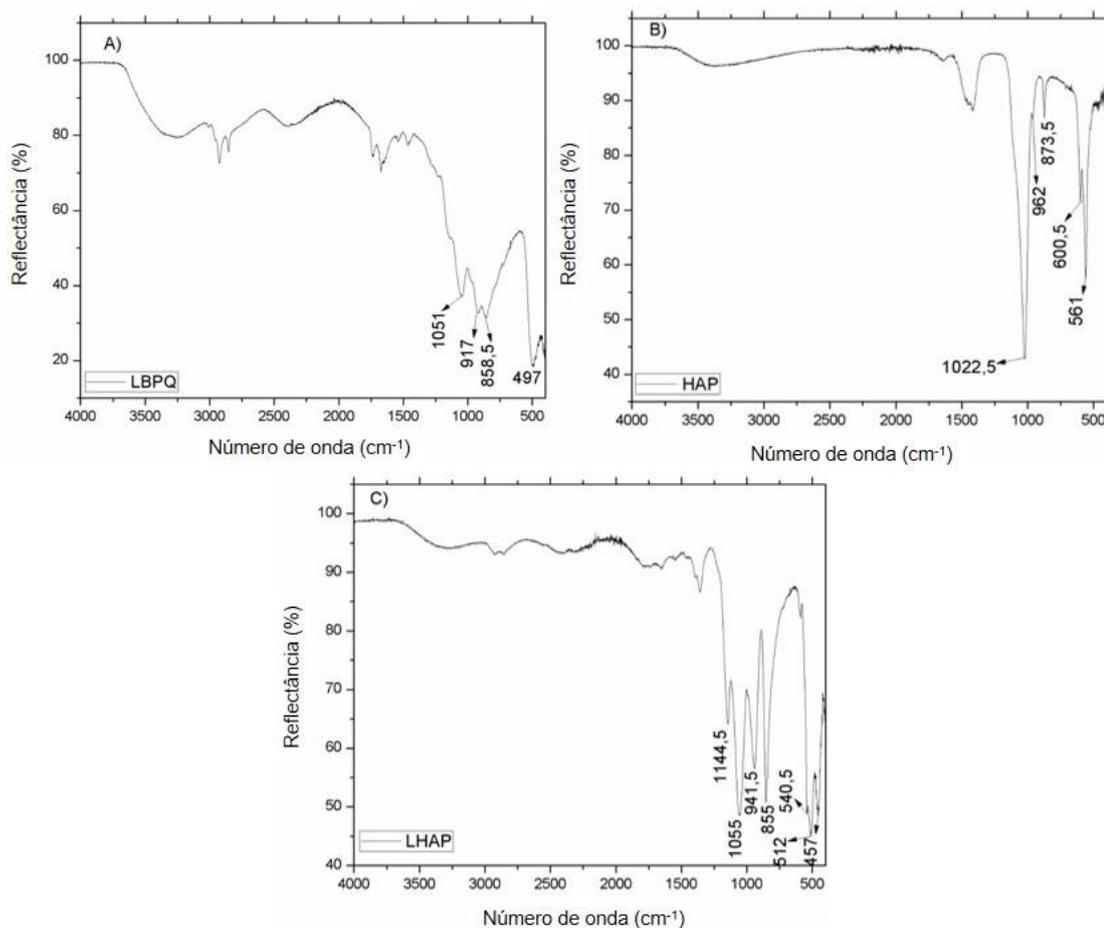


Figura 22 – Espectroscopia de infravermelho das amostras: A) LBPQ, B) HAP e C) LHAP
Fonte: Autoria própria

As refletâncias apresentadas na Figura 22A são referentes a amostra LBPQ sendo que o pico em 1051 cm^{-1} é característico de sais de fosfolipídios, como é o caso do DOPG-Na, sendo relativo a ligação P-O-Na (ABRAMSON; NORTON; KATZMAN, 1965). Os vales em 917 e $858,5\text{ cm}^{-1}$ parecem estar relacionados com as ligações O-P-O dos grupamentos fosfatos dos precursores lipídicos (ABRAMSON; NORTON; KATZMAN, 1965; MIŠKOVIĆ-STANKOVIĆ et al., 2015).

O espectro representado na Figura 22C corresponde a amostra LHAP, um sistema lipossomal encapsulando CdSe (ponto quântico) e com o fármaco cloridrato de bupivocaína.

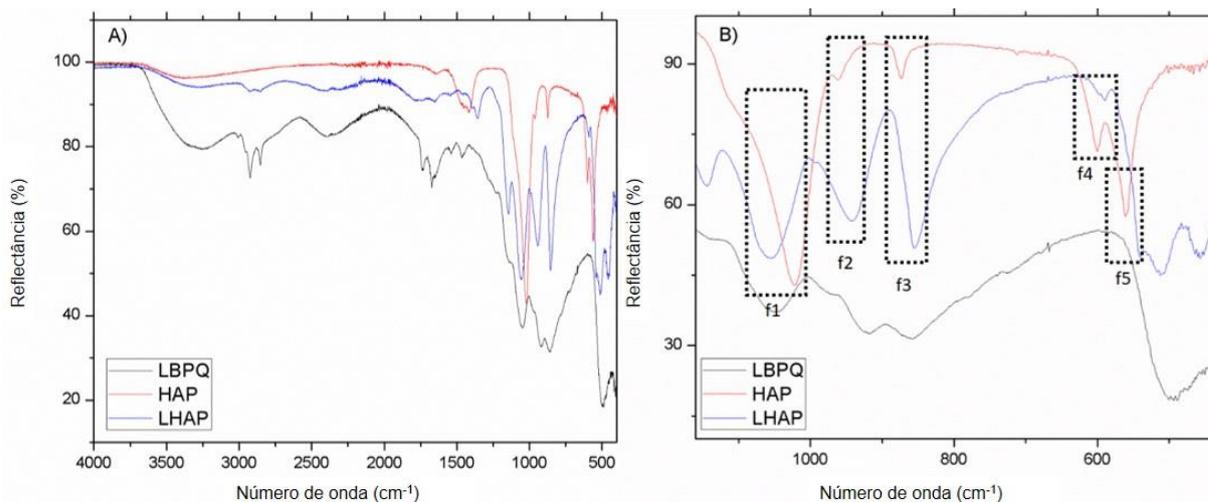


Figura 23 - Espectroscopia de infravermelho das amostras LBPQ, HAP e LHAP A) representados em cascata e B) ampliação na região de interesse
Fonte: Autoria própria

A Figura 23 B apresenta cinco bandas de absorção (f1 a f5) que foram identificáveis tanto nas amostras HAP quanto LHAP. Destes, f1, f2 e f3 também são identificados na amostra LBPQ e se referem as ligações O-P-O presente tanto nos fosfolipídios de lipossomas quanto no grupo fosfato da hidroxiapatita. Os demais, fenômenos f4 e f5 são identificados como as ligações P-O de grupamento fosfato da HAP somente nas amostras HAP e LHAP.

Com isso é possível afirmar que a amostra LHAP apresenta hidroxiapatita em sua composição. Esses pontos sofrem um deslocamento, no caso de f4 de 600 para 593 cm^{-1} , comparando-se HAP e LHAP, respectivamente. E no caso de f5 de 561 para 540,5 cm^{-1} . Tais deslocamentos podem estar relacionados a diferenças de concentrações de hidroxiapatita entre as amostras HAP e LHAP (SKOOG; CROUCH; HOLLER, 2006).

Para confirmar realmente que ocorreu a formação de uma camada de HAP na superfície lipossomal foram realizados os ensaios de espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta.

5.4.2– Espalhamento dinâmico de luz

A maioria das aplicações envolvendo lipossomas, como o carreamento de fármacos, exige uma distribuição de tamanhos de partícula estreita e estabilidade

dimensional (WINTERHALTER; LASIC, 1993). Sabe-se que uma mesma formulação de lipídios pode dar origem a lipossomas com uma variedade grande de características morfológicas.

Conforme apresentado anteriormente, os lipossomas nesse trabalho foram obtidos através da injeção de misturas lipídicas em solução tampão. Esta técnica gera vesículas com uma ampla distribuição de tamanho de partícula. Por isso, foi realizada a extrusão dos sistemas lipossomais através de membranas de policarbonato, para que haja uma maior homogeneidade de tamanho de partícula.

Todavia, sabe-se que o tamanho médio de um lipossoma pode sofrer alterações morfológicas após a aplicação de técnicas de preparação de amostra, neste caso a síntese de HAP na superfície lipossomal. Com o intuito de caracterizar o tamanho de partícula através do ensaio de espalhamento dinâmico de luz, cujo resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4–Valores médios encontrados no ensaio de espalhamento dinâmico de luz do diâmetro médio das partículas em nm e do índice de polidispersividade das amostras.

Amostra	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersividade (PDI)
LIP	184,7±1,0	0,132±0,022
LBUP	183,2±1,9	0,097±0,022
LBPQ	170,5±12,0	0,143±0,006
LHAP	396,7±32,7	0,390±0,071

Fonte: Autoria própria

Os dados apresentados na Tabela 4 apontam que não há uma redução significativa do diâmetro médio dos lipossomas da amostra LBPQ em comparação com as lipossomas da amostra LBUP. Essa tendência também foi observada por Tahara et al (2013) e por Wen et al(2012), ambos trabalharam com PQs hidrofóbicos não modificados.

As amostras LIP, LBUP e LBPQ apresentaram baixos valores de PDI, todos menores que 0,150. Isso indica que os lipossomas, nessas três amostras, apresentam uma maior uniformidade de tamanho e boa estabilidade dimensional. A amostra LHAP foi a que apresentou o maior diâmetro médio de partícula e um PDI dentro do aceitável, permitindo levantar a hipótese de que houve efetivamente uma deposição de HAP na superfície lipossomal.

5.5 POTENCIAL ZETA

A estabilidade de sistemas em suspensão aquosa, como as amostras lipossomais analisadas no presente trabalho, no tocante a agregação e variação da carga superficial pode ser inferida a partir do valor do potencial zeta das partículas.

O primeiro experimento realizado foi para determinar se a proporção de lipídios precursores apresentaria carga negativa. Foram comparados os valores de potencial zeta dos lipossomas formados por DOPG-Na, SPC e com lipossomas formados pelos dois lipídios (DOPG-Na e SPC) em uma mistura de razão 1:1 (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de Potencial Zeta (ζ) determinados para os lipossomas formados por DOPG-Na, SPC e DOPG-Na:SPC(1:1) a 25°C

Potencial Zeta - ζ (mV)			
Análise	Lipossomas DOPG-Na	Lipossomas SPC	Lipossomas DOPG-Na:SPC
1	-42,6	-22,2	-45,2
2	-44,7	-22,4	-44,3
3	-46,3	-22,2	-44,3
Média	-44,5±1,3	-22,3±0,1	-44,6±0,4

Fonte: Autoria Própria

Pode-se observar que o lipossoma formado somente por SPC em solução adquiriu um potencial de $-22,3\pm 0,1$ mV, quase metade do apresentado pelos fosfolipídeos de DOPG-Na de $-44,5\pm 1,3$ mV. O que era esperado, pois este último fosfolipídio já é carregado negativamente.

Com a incorporação do SPC no lipossoma DOPG-Na não foi observada uma redução no potencial observado pela amostra LIP ($-44,6\pm 0,4$ mV) cuja formulação consiste em uma proporção 1:1 dos fosfolipídios. Era importante que houvesse a manutenção da carga negativa na superfície lipossomal para que ocorresse a síntese da hidroxiapatita em sua superfície. Portanto, o valor encontrado foi considerado aceitável para a formação de lipossomas revestidos por hidroxiapatita. Assim, as amostras de lipossomas foram realizadas com a mistura 1:1 de DOPG-Na:SPC.

Uma segunda medida de potencial zeta foi realizada para amostras de LBPQ e LHAP. A Tabela 6 apresenta os valores de potencial zeta relacionados com o pico de maior intensidade de cada medida das amostras LBPQ e LHAP.

Tabela 6 – Valores de Potencial Zeta (ζ) determinados para as amostras LBPQ e LHAP a 25°C.

Potencial Zeta - ζ (mV)		
	LHAP	LBPQ
Média	-7,05±6,77	-45,83±14,35

Fonte: A autoria própria

É possível identificar que houve uma redução no valor de potencial zeta para os lipossomas após a encapsulação do fármaco BUP e do PQ (-44,6 lipossomas livre para -7,05 e -45,83 para amostras de LHAP e LBPQ respectivamente), estando de acordo com a literatura (XU; TANAKA; CZERNUSZKA, 2007). Observa-se também na Tabela 6 que houve uma diminuição do potencial zeta para a amostra de LHAP.

Essa redução é condizente com os resultados apresentados por Xu e seus colaboradores e permite, somada ao aumento de diâmetro observado, afirmar que houve a formação de um revestimento de HAP sobre o complexo lipossomal. Vale ressaltar, que tais autores trabalharam com a metodologia proposta por Schmidt et al (2004) de formação de múltiplas camadas de revestimento cerâmico, de forma que ambos apresentaram partículas com maior diâmetro e menor potencial zeta. No caso do presente trabalho foi realizada a deposição de somente uma camada de HAP sobre o lipossoma, logo os resultados apresentados são muito positivos.

5.6 ANÁLISE DE FOTOLUMINESCÊNCIA

Para demonstrar que as nanopartículas de ponto quântico CdSe estão presentes na amostra de lipossoma revestida com hidroxiapatita foram realizados teste de fotoluminescência. Assim, uma amostra contendo somente o ponto quântico (CdSe) em clorofórmio (80 μ M) apresentou três picos de emissão: o primeiro em 444 nm, o segundo em 463 nm e o terceiro em 486 nm (referente a nanopartícula CdSe) (Figura 24). Esses sinais encontrados no CdSe podem estar relacionados à estados de defeitos do nanocristal ou da superfície.

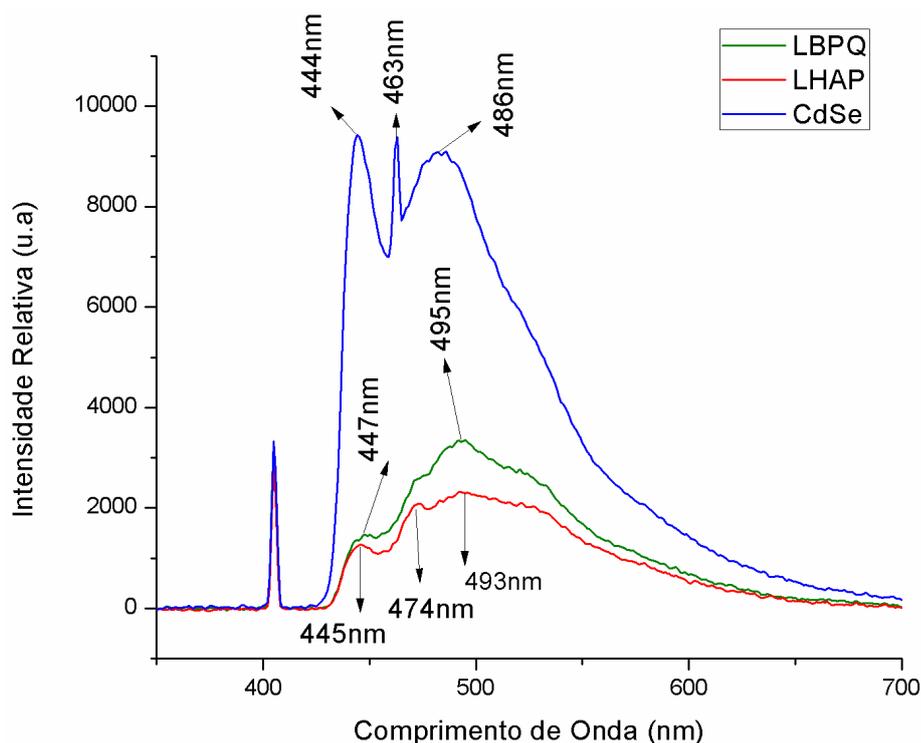


Figura 24 – Espectro de fotoluminescência

Fonte: Autoria própria

As amostras LBPQ e LHAP também foram analisadas por fotoluminescência para verificar a presença dos pontos quânticos de CdSe após seu encapsulamento no lipossoma. A amostra LBPQ apresenta o pico de emissão de seus PQs em 495 nm. A amostra LHAP apresenta também o pico de CdSe em seu espectro de emissão em 493 nm. Observa-se, dessa forma, todos os sinais da nanopartícula de CdSe na forma livre, justificando sua presença da nanopartícula no complexo lipossomal. Também se observa uma diferença de intensidade onde o sinal de maior intensidade foi de CdSe livre, LBPQ e por fim LHAP, isso ocorre pois, quando as nanopartículas estão encapsuladas há uma diminuição da intensidade relacionada com um ambiente menos propício a emissão.

Diferentemente do encapsulamento de espécies cromóforas dentro do lipossoma, o encapsulamento dos PQs entre as camadas fosfolipídicas causa uma aproximação das nanopartículas, ativando assim o processo de transferência de energia não radiativa entre eles (GERALDO, 2008). Logo, com a maior perda de energia, diminui-se a probabilidade do elétron decair de um estado excitado para o estado fundamental o que é refletido na diminuição da intensidade de fluorescência (GERALDO, 2008).

Outro fator observado na Figura 24 é o deslocamento dos picos de emissão de ambas amostras para a direita após o encapsulamento do ponto quântico. Uma explicação para esse comportamento é a mudança de solvente de clorofórmio para uma solução aquosa tampão (JIN et al., 2017). Naturalmente, as interações entre solvente e PQ podem modificar as propriedades elétricas e ópticas do CdSe. Assim, a fotoluminescência é afetada pela modificação da estrutura elétrica pelo meio (JIN et al., 2017).

5.7 ENSAIO DE LIBERAÇÃO

A literatura aponta que a formação de revestimentos como HAP alteram o perfil de liberação de complexos lipossomais (SCHMIDT et al., 2004; SCHMIDT; OSTAFIN, 2002; XU; CZERNUSZKA, 2008; XU; TANAKA; CZERNUSZKA, 2007). Para verificar a influência do revestimento de HAP em complexos lipossomais foram realizados ensaios de liberação de cloridrato de bupivacaína. A Figura 25 mostra os gráficos para os dois testes utilizados para os ensaios de liberação: Figura 25A utilizando a célula de Franz e Figura 25B utilizando o saco de diálise.

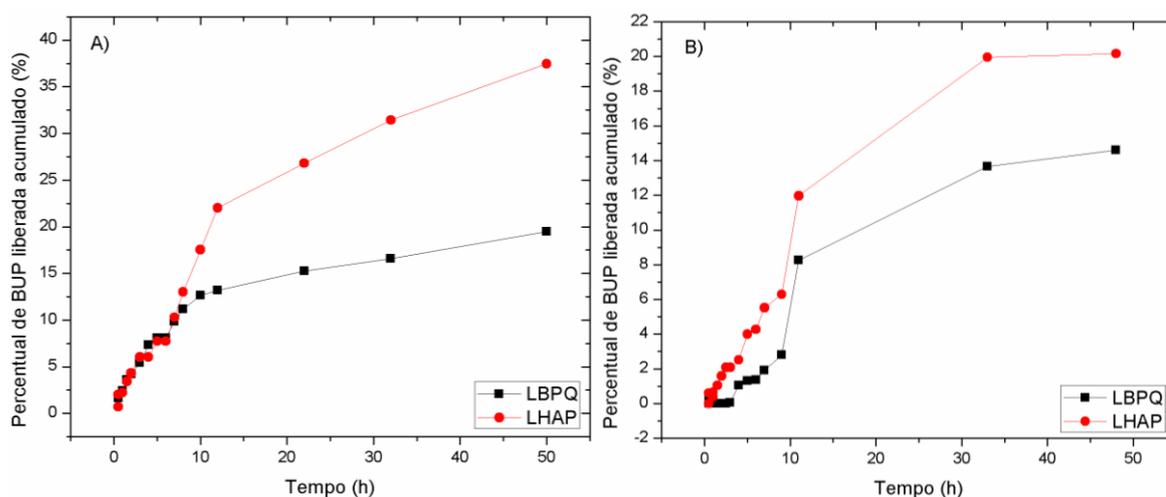


Figura 25- Curvas de percentual de cloridrato de bupivacaína (BUP) liberada acumulado ao longo do tempo para dois sistemas: A) células de Franz e B) membrana de diálise
Fonte: Autoria Própria

Ambos os métodos de análise forneceram curvas semelhantes, entretanto pode-se observar que utilizando Franz tem-se uma maior intensidade de liberação

com 19,47% de liberação da BUP do complexo LBPQ e 37,45 % da BUP para o complexo LHAP. No caso do saco de diálise tem-se 13,8% para LBPQ e 20% para HAP. Todos os testes foram realizados para tempo de liberação de 50 horas.

Em ambos os métodos foi observado que ocorre uma liberação mais lenta da BUP quando encapsulado em LBPQ em relação a amostra LHAP. Entretanto, tem-se uma maior quantidade de liberação da BUP no complexo LHAP, o que o classifica como um melhor veículo de liberação controlada. Entretanto, ainda se tem uma baixa porcentagem de liberação no processo que pode ser explicado por saturação do sistema receptor com BUP ou amostra presa na membrana.

Nos dois sistemas de liberação ambas as amostras apresentaram duas rampas de liberação. A primeira durante as primeiras 10 horas, após tem-se uma mudança de angulação na rampa de liberação.

O resultado difere daqueles apresentados por Xu, Tanaka e Czernuszka (2007) que também trabalhou com complexos lipossomais revestidos por hidroxiapatita. Nesses testes houve o menor percentual de liberação da BUP no sistema LHAP comparada ao sistema LBUP. Entretanto, Xu e colaboradores trabalharam com formulação de múltiplas deposições de HAP sobre o lipossomas. A ausência na literatura sobre de sistemas teranósticos revestidos por uma deposição de HAP torna difícil afirmar com certeza que o número de deposições de HAP está diretamente ligada com o perfil de liberação de fármaco

6 . CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho apontam que foi possível obter-se um sistema lipossomal revestido por HAP. A variação do deslocamento químico no espectro de RMN de ^1H das amostras LBUP e LBPQ quando comparados com a amostra BUP e o alargamento dos picos dos espectros dessas mesmas amostras confirmam o encapsulamento do fármaco pelo complexo lipossomal.

Confirmada a formação do complexo lipossomal, mediu-se o percentual de cloridrato de bupivocaína encapsulada. Os valores observados apontam um maior encapsulamento na presença de CdSe. Isso se deu devido a deformações de volume dos lipossomas causadas pelo encapsulamento de PQs entre a bicamada lipídica.

A confirmação do revestimento se respalda no aumento do diâmetro médio de partícula e a redução nos valores de potencial zeta quando a amostra LHAP foi comparada com a amostra LBUP no ensaio de espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta, respectivamente. A natureza deste revestimento foi comprovada como sendo HAP a partir de uma combinação das técnicas de difração de raios X e espectroscopia no infravermelho.

Com a confirmação de obtenção do sistema híbrido lipossoma/HAP/CdSe partiu-se para a caracterização de suas características quanto a fotoluminescência e liberação do fármaco encapsulado.

Os resultados do ensaio de fotoluminescência confirmam o encapsulamento de PQs e a manutenção de suas propriedades ópticas. Enquanto o ensaio de liberação aponta para a liberação de um maior percentual de fármaco pela amostra LHAP quando comparada com LBPQ, sendo a primeira, por esta razão, mais interessante para aplicação.

Conclui-se que o presente projeto conseguiu atingir o objetivo principal de obtenção de um sistema híbrido lipossoma/ HAP/ CdSe para o carreamento de fármacos. Como sugestão para trabalhos futuros propõe-se o estudo da relação entre o número de deposições de HAP na superfície lipossomal e o perfil de liberação

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, M. B.; NORTON, W. T.; KATZMAN, R. Study of Ionic Structures in Phospholipids by Infrared Spectra. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 240, n. 6, p. 2389–2395, 1965.
- AL-JAMAL, W. T.; KOSTARELOS, K. Liposomes: From a clinically established drug delivery system to a nanoparticle platform for theranostic nanomedicine. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 1094–1104, 2011.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 36–48, 2013.
- ARANTES, L. M. et al. Proparacaine complexation with β -cyclodextrin and p-sulfonic acid calix[6]arene, as evaluated by varied $^1\text{H-NMR}$ approaches. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 757–763, 2009.
- BALOCCO, A. L. et al. Extended release bupivacaine formulations for postoperative analgesia: an update. **Current opinion in anaesthesiology**, v. 31, n. 5, p. 636–642, 2018.
- BATALLA, J. et al. Encapsulation efficiency of CdSe/ZnS quantum dots by liposomes determined by thermal lens microscopy. **Biomedical Optics Express**, v. 6, n. 10, p. 3898, 2015.
- BELLINO, M. G.; REGAZZONI, A. E. Coating liposomes with yttrium basic carbonate: Making hybrid nanocapsules. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 333, n. 2, p. 812–815, 2009.
- BERA, D. et al. Quantum dots and their multimodal applications: A review. **Materials**, v. 3, n. 4, p. 2260–2345, 2010.
- BERGESE, S. D. et al. Efficacy profile of liposome bupivacaine, a novel formulation of bupivacaine for postsurgical analgesia. **Journal of Pain Research**, v. 5, p. 107–116, 2012.
- BHARDWAJ, U.; BURGESS, D. J. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, n. 1–2, p. 287–294, 2010.
- BOERMAN, O. C. et al. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. **Progress in Lipid Research**, v. 39, n. 5, p. 461–475, 2000.
- CABEÇA, L. F. et al. Liposome-prilocaine interaction mapping evaluated through STD NMR and molecular dynamics simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 8, p. 2365–2370, 2009.
- CHU, M.; LIU, G. Preparation and characterization of hydroxyapatite/liposome core-shell nanocomposites. **Nanotechnology**, v. 16, n. 8, p. 1208–1212, 2005.
- COLILLA, M.; MANZANO, M.; VALLET-RAGÍ, M. Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 4, p. 403–414, 2008.
- DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.
- DE FREITAS, C. F. et al. PEG-coated vesicles from Pluronic/lipid mixtures for the carrying of photoactive erythrosine derivatives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, n. November 2018, p. 530–544, 2019a.
- DE FREITAS, C. F. et al. Rapid formation of Small Unilamellar Vesicles (SUV) through low-frequency sonication: An innovative approach. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. June, p. 837–844, 2019b.
- FIHRI, A. et al. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in

- heterogeneous catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 347, p. 48–76, 2017.
- GERALDO, V. P. N. **Filmes Nanoestruturados Contendo Lipossomas para Liberação controlada do Ibuprofeno**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.
- GHEISARI, H.; KARAMIAN, E.; ABDELLAHI, M. A novel hydroxyapatite – Hardystonite nanocomposite ceramic A novel hydroxyapatite – Hardystonite nanocomposite ceramic. **Ceramics International**, v. 41, n. 4, p. 5967–5975, 2015.
- HALLETT, F. R. Particle size analysis by dynamic light scattering. **Food Research International**, v. 27, n. 2, p. 195–198, 1994.
- HUA, S.; WU, S. Y. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4 NOV, n. November, p. 1–7, 2013.
- HUO, R. et al. Assessment of techniques for DOSY NMR data processing. **Analytica Chimica Acta**, v. 490, p. 231–251, 2003.
- JIN, H. et al. Effects of Direct Solvent-Quantum Dot Interaction on the Optical Properties of Colloidal Monolayer WS₂ Quantum Dots. **Nano Letters**, v. 17, n. 12, p. 7471–7477, 2017.
- JUG, M. et al. Preparation and solid-state characterization of bupivacaine hydrochloride cyclodextrin complexes aimed for buccal delivery. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 1, p. 9–18, 2010.
- KAMALANATHAN, P. et al. Synthesis and sintering of hydroxyapatite derived from eggshells as a calcium precursor. **Ceramics International**, v. 40, n. PB, p. 16349–16359, 2014.
- KORB, J. P. et al. Relation and Correlation between NMR Relaxation Times, Diffusion Coefficients, and Viscosity of Heavy Crude Oils. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 43, p. 24439–24446, 2015.
- KRAJEWSKI, A. et al. Porous ceramic bodies for drug delivery.pdf. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, p. 763–771, 2000.
- KRSTIĆ, M. et al. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) and self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) as lipid nanocarriers for improving dissolution rate and bioavailability of poorly soluble drugs. In: **Lipid Nanocarriers for Drug Targeting**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 473–508.
- LAMBRECHTS, M. et al. Liposomal extended-release bupivacaine for postsurgical analgesia. **Patient Preference and Adherence**, v. 7, p. 885–890, 2013.
- MAITI, A.; BHATTACHARYYA, S. Review: Quantum Dots and Application in Medical Science. **International Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 3, n. 2, p. 37–42, 2013.
- MATSUMOTO, T. et al. Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3807–3812, 2004.
- MIŠKOVIĆ-STANKOVIĆ, V. et al. Graphene based biomedical composite coatings produced by electrophoretic deposition on titanium. **Eurasian Chemico-Technological Journal**, v. 17, n. March 2016, p. 3–15, 2015.
- MOHAMMAD, N. F.; OTHMAN, R.; YEE-YEOH, F. Nanoporous hydroxyapatite preparation method for drug delivery. **Reviews on Advanced Materials Science**, v. 38, n. 2, p. 138–147, 2014.
- MUFAMADI, M. S. et al. A Review on Composite Liposomal Technologies for Specialized Drug Delivery. **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, p. 1–19, 2011.
- NII, T.; ISHII, F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, n. 1, p. 198–205, 2005.
- OLSON, F. et al. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **BBA - Biomembranes**, v. 557, n. 1, p. 9–23,

1979.

PABST, G. et al. **Liposomes, Lipid Bilayers and Model Membranes: From Basic Research to Application**. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press, 2014.

PAPAHADJOPOULOS, D. **Stealth Liposomes**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995.

PEIXOTO DE OLIVEIRA, V. C. DOS S. et al. Uso da RMN de baixa resolução na avaliação da dinâmica molecular do *Origanum vulgare*. **Quimica Nova**, v. XY, n. 00, p. 1–5, 2015.

PERKOWITZ, S. **Optical Characterization of Semiconductors: Infrared, Raman, and Photoluminescence Spectroscopy**. 1. ed. San Diego: Academic Press Inc., 2012.

QU, W. et al. Design of multifunctional liposome-quantum dot hybrid nanocarriers and their biomedical application. **Journal of Drug Targeting**, v. 25, n. 8, p. 661–672, 2017.

SANOSH, K. P. et al. Utilization of biowaste eggshells to synthesize nanocrystalline hydroxyapatite powders. **Materials Letters**, v. 63, n. 24–25, p. 2100–2102, 2009.

SCHMIDT, H. T. et al. Assembly of Aqueous-Cored Calcium Phosphate Nanoparticles for Drug Delivery. **Chem. Mater.**, v. 16, n. 19, p. 4942–4947, 2004.

SCHMIDT, H. T.; OSTAFIN, A. E. Liposome directed growth of calcium phosphate nanoshells. **Advanced Materials**, v. 14, n. 7, p. 532–535, 2002.

SERCOMBE, L. et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 1–13, 2015.

SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; HOLLER, F. J. **Instrumental Analysis Principles**. 7. ed. Boston: Cengage Learning, 2006.

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.

STOCH, A. et al. FTIR absorption-reflection study of biomimetic growth of phosphates on titanium implants. **Journal of Molecular Structure**, v. 555, n. 1–3, p. 375–382, 2000.

TAHARA, K. et al. Quantum Dot-Loaded Liposomes to Evaluate the Behavior of Drug Carriers after Oral Administration. **Journal of Pharmaceutics**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

TATENO, F. et al. Bupivacaine-induced chemical meningitis. **Journal of Neurology**, v. 257, n. 8, p. 1327–1329, 2010.

TIAN, B. et al. Doxorubicin-loaded lipid-quantum dot hybrids: Surface topography and release properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 2, p. 443–447, 2011.

WANG, Q.; CHAO, Y. Multifunctional quantum dots and liposome complexes in drug delivery. **Journal of Biomedical Research**, v. 32, n. 2, p. 91–106, 2017.

WEISSIG, V. Liposomes: Methodes and Protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 1522, p. 1–15, 2017.

WEN, C. J. et al. Theranostic liposomes loaded with quantum dots and apomorphine for brain targeting and bioimaging. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. June 2014, p. 1599–1611, 2012.

WINTERHALTER, M.; LASIC, D. D. Liposome stability and formation: Experimental parameters and theories on the size distribution. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 64, n. 1–3, p. 35–43, 1993.

XU, Q.; CZERNUSZKA, J. T. Controlled release of amoxicillin from hydroxyapatite-coated poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 127, n. 2, p. 146–153, 2008.

XU, Q.; TANAKA, Y.; CZERNUSZKA, J. T. Encapsulation and release of a hydrophobic drug from hydroxyapatite coated liposomes. **Biomaterials**, v. 28, n. 16, p. 2687–2694,

2007.

YAMAMURA, K.; IWATA, H.; YOTSUYANAGI, T. Synthesis of antibiotic-loaded hydroxyapatite beads and in vitro drug release testing. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 26, n. 8, p. 1053–1064, 1992.

YANG, S. B. et al. Preparation and characterization of nanoliposomes entrapping medium-chain fatty acids and vitamin C by lyophilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 19763–19773, 2013.

ZHANG, J. Z. **Optical properties and spectroscopy of nanomaterials**. 1. ed. Singapura: World Scientific Publishing Company, 2009.

ZHANG, L. W. et al. Cisplatin and quantum dots encapsulated in liposomes as multifunctional nanocarriers for theranostic use in brain and skin. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 7, 2012.

ZUCKER, D. et al. Liposome drugs' loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. **Journal of Controlled Release**, v. 139, n. 1, p. 73–80, 2009.
