



Otimização da formulação lipossomas-ácido zoledrônico para uso em enxertia óssea

Optimization of the liposome-zoledronic acid formulation for use in bone grafting

Vinícius Ferreira da Silva Bueno¹, Luciana Prado Maia Andraus², Luis Fernando Cabeça³

RESUMO

A hidroxiapatita é um biomaterial cerâmico amplamente utilizado no ramo de enxertia óssea devido as suas propriedades similares a do osso. Mesmo com suas propriedades vantajosas para a aplicação em implantes, é possível utilizar fármacos como o ácido zoledrônico (AZ) para melhorar a osteoestimulação e acelerar o processo de recuperação óssea. Entretanto o AZ é tóxico para as células em altas concentrações, sendo que o encapsulamento dele por carreadores pode favorecer sua liberação lenta no organismo. Para isso, o AZ foi encapsulado por vesículas lipossomas para promover a liberação controlada do fármaco. Os lipossomas obtidos foram caracterizados de acordo com eficiência no encapsulamento do AZ, apresentando valor de 27,73%. A citotoxicidade dos lipossomas foi averiguada através de testes *in vitro*, revelando a impraticabilidade do uso do ácido zoledrônico em meios celulares, com uma redução de mais de 30% da viabilidade celular.

PALAVRAS-CHAVE: ácido zoledrônico; enxertia óssea; lipossoma.

ABSTRACT

Hydroxyapatite is a ceramic biomaterial widely used in bone grafting due to its bone-like properties. Even with its advantageous properties for application in implants, it is possible to use drugs such as zoledronic acid (AZ) to improve osteostimulation and speed up the bone recovery process. However, AZ is toxic to cells in high concentrations, and its encapsulation by carriers can favor its slow release into the body. To this end, AZ was encapsulated in liposome vesicles to promote the controlled release of the drug. It was possible to obtain liposomes with sufficient characteristics for use in pharmacology. The liposomes obtained were also characterized according to their efficiency in encapsulating AZ, showing a value of 27.73%. The cytotoxicity of the liposomes was ascertained through *in vitro* tests, revealing the impracticality of using zoledronic acid in cell media, with a reduction of more than 30% in cell viability.

KEYWORDS: zoledronic acid; bone grafting; liposomes

INTRODUÇÃO

A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é uma biocerâmica de fosfato de cálcio com alta biocompatibilidade e atóxica (SOSSA et al., 2022). Os enxertos ósseos a base de fosfato de cálcio possuem ótimas propriedades de osteocondução e osteoindução. É possível também aliar fármacos aos enxertos, a fim de estimular o crescimento celular (osteoestimulação) (OLIVEIRA et al., 2010). O ácido zoledrônico, medicamento comumente utilizado para tratamento de doenças ósseas, quando utilizado em concentrações baixas pode favorecer a multiplicação de células ósseas, diminuindo o tempo de recuperação

¹ Graduando do curso de Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: vinicius.2020@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 7504068456278428.

² Docente do Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Odontologia, Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, Campo grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. E-mail: Luciana.maia@kroton.com.br. ID Lattes: 5879261569870153.

³ Docente do Departamento de Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR, Brasil. E-mail: Luiscabeca@utfpr.edu.br. ID Lattes: 2028423293665464.



(SILVA, 2022). Apesar dos benefícios apresentados pelo uso do ácido zoledrônico, o fármaco pode apresentar uma alta toxicidade dependendo da quantidade ministrada. Uma alternativa de realizar essa liberação seria pelo método do *drug delivery* (liberação controlada), sistema que possibilita uma liberação moderada de ativos no local em que seu uso é requisitado (SCHIRALDI et al., 2014). Dentre os sistemas de liberação controlada, os lipossomas destacam-se como carreadores devido sua capacidade de acoplar o fármaco e liberá-lo de forma prolongada (NARDOTTO, 2009).

Considerando as propriedades desempenhadas na recuperação óssea pelo ácido zoledrônico e a capacidade de liberação e encapsulamento dos lipossomas, o presente trabalho visa realizar a síntese de lipossomas e sua caracterização; encapsulamento do ácido zoledrônico nos lipossomas; e avaliar a toxicidade do sistema formado a partir de testes *in vitro* de citotoxicidade.

MÉTODOS E MATERIAIS

PREPARAÇÃO DAS VESÍCULAS LIPOSSOMAIS E ENCAPSULAMENTO DE AZ

Foi preparada uma solução estoque de ácido zoledrônico (AZ) em tampão fosfato (0,05 mM) pH 7,4 e 1 mM. Para aumentar solubilidade do AZ foi adicionado 0,5 mL de NaOH (0,1M) (FARDIN et al., 2010).

Para preparação dos filmes lipídicos, foram utilizados o colesterol e a fosfatidilcolina de soja (SPC) na proporção de 3:7, concentração lipossomal 1mM. Os lipídios previamente preparados em cloroformio foram misturas na proporção (3:7 colesterol: SPC). O cloroformio foi evaporado em temperatura ambiente dando origem ao filme lipídico. O filme foi ressuspenso com 1 mL da solução estoque de AZ 1 mM obtida anteriormente, fornecendo uma mistura lipossomas/AZ 1:1 (1 mM). Os lipossomas multilamelares foram sonificados (QSonica, Q500) no Laboratório multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Londrina (UTFP-LD). Durante o processo de sonicação foi utilizado uma frequência de 20 kHz a 500 W e amplitude de 30%. Foram realizados 10 ciclos de 1 min de agitação com 1 min de descanso sob banho de gelo.

ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS) E POTENCIAL ZETA

As distribuições de tamanho e tamanho médio dos lipossomas encapsulados com ácido zoledrônico foram feitas a partir de alíquotas de 100uL de cada solução lipossomal diluídas em 900uL de tampão fosfato (0,05mM pH 7,4). As medições foram realizadas em um aparelho LITESIZER – 500 (Marca: Anton Paar) na temperatura de 25°C.

Os ensaios para determinação do potencial zeta médio foram realizados a partir de alíquotas de 100uL das soluções lipossomais e 900uL de tampão fosfato (0,05mM pH 7,4) em um aparelho LITESIZER – 500 (Marca: Anton Paar), utilizando a célula de medida Omega cuvette Mat.No.225288 com fator de Henry de 1,5 (aproximação de Smoluchowski), na temperatura de 25°C.

EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO



Para a determinação da eficiência de encapsulamento do fármaco uma solução de lipossomas foi ultrafiltração/ultracentrifugação (Millipore, USA, ME Cut-off 10,000 Da). Uma alíquota de 400uL de amostra foi colocada no filtro e levada para ultracentrifugação (13000 rpm). A quantidade de fármaco que passou do filtro foi quantificada utilizando espectroscopia UV-VIS (UV-VIS LibraS60 (Marca: Biochrom)), usando comprimento de onda de 210 nm. O cálculo de eficiência foi realizado através da equação 1:

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

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

Para obter a quantidade do fármaco encapsulado nos lipossomas foi realizada uma curva de calibração do AZ utilizando diferentes concentrações (0,08 mM – 0,22mM) em solução tampão, utilizando o espectrofotômetro UV-VIS.

TESTES DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

A citotoxicidade foi avaliada pelo método quantitativo colorimétrico brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium] (MTT). Foram utilizadas células osteoblásticas MC3T3-E1 subclone 14 (American Type Culture Collection, VA), cultivadas com meio Alfa-MEM suplementado e mantidas em uma estufa de CO₂ em atmosfera 5% a 37°C. As células foram divididas em 3 grupos experimentais: AZ, Lipossomas (LIPO) e AZ associado a lipossomas (AZ+LIPO); em 1 e 3 dias, testados em diferentes diluições (1:2 a 1:128). Esse ensaio é dependente da redução do MTT, pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis, em formazan, o qual pode ser quantificado por espectrofotometria. Foram preparadas alíquotas de MTT a 5 mg/ml em solução tampão salina de fosfato (PBS; Gibco), procedendo-se em seguida a incubação das culturas primárias (células) com esta solução a 10% em meio de cultura, por 4 horas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Após esse período, a solução de meio de cultura e MTT será removida e adicionado 100 uL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Logo após foi realizada a medida colorimétrica em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 570 nm. O resultado foi expresso como porcentagem de viabilidade relativa ao controle negativo, utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{viabilidade relativa} = \left(\frac{(\text{DOT} - \text{DOB})}{(\text{DOC} - \text{DOB})} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde DO = densidade óptica; T = tratamento; B = branco e C = controle.

Para os grupos serem considerados citotóxicos, a redução da viabilidade celular deve ser maior que 30%.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

a) Espalhamento dinâmico de luz (dls) e potencial zeta

Os resultados para o tamanho de partícula, potencial zeta e PDI encontram-se expostos no quadro 1.

Quadro 1: Tamanho, potencial zeta e IPD de diferentes formulações lipossomas

MOLARIDAD E LIPOSSOMA (MMOL/L)	MOLARIDADE ÁCIDO ZOEDRÔNICO (MMOL/L)	TAMANHO (NM)	IPD (%)	POTENCIAL ZETA (MV)
--------------------------------	--------------------------------------	--------------	---------	---------------------



1mM	0 (lipossoma livre)	221,80 ± 18,8	27,4 ± 0,47	-27,97 ± 0,24
1mM	0,1	256,57 ± 5,89	25,40 ± 1,07	-14,47 ± 0,11
1mM	0,25	345,40 ± 23,00	26,37 ± 1,56	-25,03 ± 0,71
1mM	0,5	377,17 ± 13,49	29,33 ± 1,18	-26,30 ± 0,2
1mM	0,75	285,57 ± 44,69	22,83 ± 2,76	-18,00 ± 1,07

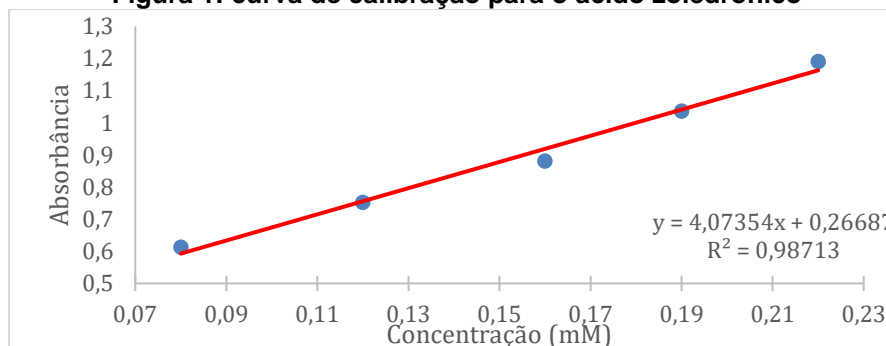
Fonte: Elaborado pelos autores (2023)

Conforme os dados exibidos no quadro 1, nota-se que o tamanho médio dos lipossomas com o ácido zoledrônico é maior que o lipossoma livre. Entretanto, não existe uma proporcionalidade entre a molaridades de AZ e o tamanho das vesículas produzidas nesse trabalho, apresentando diferentes valores de tamanho médio em diferentes molaridades. Os índices de polidispersividade revelam que as soluções das vesículas lipossomas apresentam homogeneidade, tendo em vista que os IPD se encontram na faixa entre 20 a 35%, valor inferior aos 50% indicadores de heterogeneidade (RODRIGUES, 2017).

b) Eficiência de Encapsulamento.

Para a análise de eficiência de encapsulamento (EE%), foi feita uma curva de calibração do ácido zoledrônico. A Figura 1 apresenta a curva obtida mantendo o comprimento de onda fixo em 210 nm.

Figura 1: curva de calibração para o ácido zoledrônico



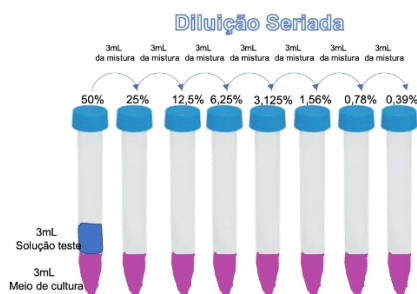
Fonte: Elaborado pelos autores (2023)

Após a ultracentrifugação do lipossoma, o filtrado (AZ livre) foi levado para a análise de UV-VIS. Sua quantificação foi realizada utilizando a curva de calibração. A eficiência de encapsulamento obtida para análise em triplicata foi de 27,73±2,00 %.

c) Testes de citotoxicidade *in vitro*

Para as análises de citotoxicidade, foi utilizado o método colorimétrico brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT), um método quantitativo utilizado para avaliar citotoxicidade, proliferação e ativação de células viáveis com precisão. Foram preparadas soluções de AZ livre (0,1 μM); lipossomas livres (0,5mM) e lipossomas agregados com AZ (100μM). Essas soluções foram submetidas ao processo de diluição seriada ilustrado na figura 2.

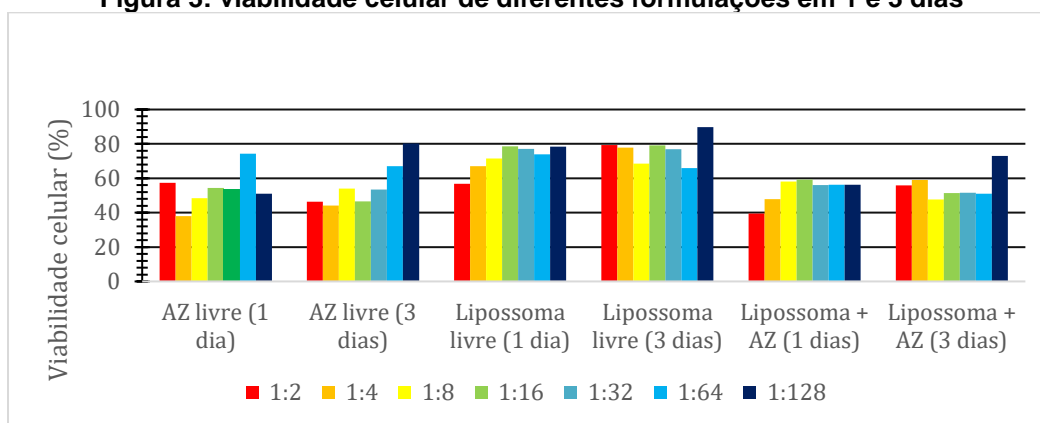
Figura 2: processo de diluição seriada



Fonte: Doutora Luciana Prado Maia Andraus (2023)

Posteriormente, as alíquotas foram submetidas ao MTT, analisando sua viabilidade celular nos períodos de 1 e 3 dias, resultados elucidados na figura 3.

Figura 3: viabilidade celular de diferentes formulações em 1 e 3 dias



Fonte: Elaborado pelos autores com base em dados obtidos pela professora Doutora Luciana Prado Maia Andraus (2023)

Observando os resultados apresentados na figura 3, nota-se que há uma redução significativa (maior que 30%) da viabilidade celular em 1 e 3 dias para as soluções de AZ livre em praticamente todas as concentrações, indicando a citotoxicidade do AZ. Em contrapartida, analisando os valores da viabilidade celular nos apresentados pelos lipossomas livres nos mesmos períodos, constata-se que os resultados apresentam valores superiores a 70% para a maioria das formulações, indicando a biocompatibilidade das vesículas com as células. Nas alíquotas compostas por lipossomas + AZ, evidencia-se a grande redução da viabilidade celular das vesículas com AZ, tanto no período de 1 dia quanto no de 3 dias, tornando notória a citotoxicidade dos lipossomas/AZ.

CONCLUSÕES

A metodologia aplicada para a síntese dos lipossomas com ácido zoledrônico foi satisfatória, tendo em vista que os resultados apresentados de distribuição de tamanho, estabilidade e eficiência de encapsulamento são coerentes com os requisitos necessários para a aplicação deles no âmbito farmacêutico. Entretanto, os testes de citotoxicidade *in vitro* revelam a impraticabilidade do uso do fármaco carregado pelas vesículas, visto que a redução da viabilidade celular dos meios testados foi maior que 30% para a maioria das formulações.



Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

Agradecimentos

Ao laboratório Multiusuário da UTFPR campus Londrina, a professora Doutora Luciana Prado Maia Andraus (UNIDERP, Campo grande – MS).

REFERÊNCIAS

FARDIN, Angélica Cristiane. et al. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innov. Implant J., Biomater. Esthet. (Online)**. Vol. 5, n. 3, p.48-52, 2010. Disponível em: <http://revodonto.bvsalud.org/pdf/ij/v5n3/a10v5n3.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2022.

NARDOTTO, Glauco Henrique Balthazar. **Desenvolvimento de lipossomas deformáveis para administração Transdérmica de remifentanil**. 2009. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

OLIVEIRA, Luciana Soares de Andrade Freitas. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 37, 18 nov. 2010. Universidade Federal da Bahia. <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v9i1.4730>.

RODRIGUES, Beatriz Vilaranda. **Desenvolvimento e Caracterização de Complexos Polímero-Lipossoma para Sistemas Inteligentes de Liberação Controlada**. 2017. Tese (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2017.

SCHIRALDI, Chiara. et al. Nanoparticles for the delivery of zoledronic acid to prostate cancer cells: a comparative analysis through time lapse video-microscopy technique. **Cancer Biology & Therapy**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 1524-1532, 2 nov. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/15384047.2014.955989>.

SILVA, Luana Patricia Bezerra. **Desenvolvimento de biomateriais porosos acoplados a sistemas carreadores: ácido zoledrônico encapsulado em lipossomas**. 2022. Tese (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Londrina, 2022.

SOSSA, Paola Andrea Forero. et al. Comparative study between natural and synthetic Hydroxyapatite: structural, morphological and bioactivity properties. **Revista Matéria**. vol. 23, n.4, p.327-345, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rmat/a/fxb4qw6n4JHbD5Zz677qQBL/?lang=en>. Acesso em: 12 nov. 2022.