

PROPOSTA DE UTILIZAÇÃO DO SISTEMA DE CIMENTO ÓSSEO À BASE DE FOSFATO TRICÁLCICO COMO VEÍCULO DE FÁRMACO

J. C. Colpo⁽¹⁾, E. C. Morais⁽²⁾, M. B. Thürmer⁽¹⁾, W. T. Coelho⁽¹⁾, L. A. Santos⁽¹⁾

⁽¹⁾Engenharia de Materiais, LABIOMAT, UFRGS

⁽²⁾Instituto de Química, UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500. Setor 4, Prédio 74, sala 118. CEP.: 91509-900 Porto Alegre/ RS. e-mail: juliocesarcolpo@gmail.com

RESUMO

*Cimentos ósseos a base de fosfato tricálcico (α -TCP) podem ser utilizados em diversas áreas da saúde (próteses ortopédicas, odontologia, materiais para a reparação e sustentação de tecidos e como sistemas de liberação de drogas). A aplicação de um biomaterial a base de cimento de α -TCP poderá viabilizar tanto a liberação constante de medicamentos quanto apoiar e moldar tecidos musculoesqueléticos danificados até que possam ser regenerados pelo próprio organismo, substituindo o biomaterial. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi desenvolver sistemas de liberação de drogas a partir de cimento de α -TCP adicionado de gentamicina. A fim de investigar a incorporação do antibiótico no material, este foi caracterizado em termos de técnicas espectroscópicas. Os resultados obtidos no estudo *in vitro* demonstram a viabilidade de utilização do sistema proposto como liberação do fármaco, quando comparado com sistemas similares na literatura.*

Palavras-chave: Biomaterial, Cimento de fosfato tricálcico (α -TCP), Sulfato de gentamicina

INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico vem desenvolvendo novos dispositivos, sistemas ou produtos que auxiliam na manutenção da vida, levando em conta, principalmente, sua qualidade.

Neste sentido, os biomateriais compostos, ou de origens sintética ou natural, são de grande interesse à saúde quando capazes de reproduzir algumas propriedades da matéria viva que deixou ou está limitada de exercer sua função; e também quando possam servir como matriz, veículo, suporte ou estimulador para o crescimento de novos tecidos.⁽¹⁾

Alguns autores definem os biomateriais de uma forma mais completa como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias que podem ser

utilizadas de forma transitória ou permanente para melhorar, aumentar ou substituir parcial ou inteiramente, diversos tecidos ou órgãos dos seres vivos.^(1,2,3,4)

Park (1979)⁽⁵⁾ aponta, que os biomateriais podem agir de modo contínuo ou intermitente, entrando em contato com fluidos corpóreos, mesmo que localizados fora do corpo.

Sintéticos ou naturais, todos os biomateriais utilizados em implantes deverão possuir a capacidade de serem bem tolerados pelo organismo hospedeiro. A exceção do material autólogo, todos os outros provocam, em maior ou menor grau, alguma resposta imunológica reacional. Pesquisas buscam desenvolver biomateriais que consigam interagir naturalmente com o organismo hospedeiro, sem desencadear efeitos imuno-histoquímicos.⁽⁶⁾

Sendo assim, é importante o desenvolvimento de pesquisas sobre materiais considerados bioativos e biodegradáveis, pois “além de substituir tecidos traumatizados, estes materiais também podem propiciar a recuperação do tecido danificado através da atuação em metabolismos intra e extracelulares responsáveis pela reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento”.⁽⁷⁾

Tais sistemas também podem ser utilizados como veículos ou transportadores para entrega e liberação de uma substância ou fármaco em um determinado sítio ou órgão do organismo^(8,9) correspondendo ao conceito de materiais inteligentes, ou seja, aqueles que respondem favoravelmente às mudanças de ambiente mantendo suas funções.⁽¹⁰⁾

No contexto da saúde, os biomateriais utilizados como veículos ou sistemas de liberação controlado de fármacos visam, sobretudo, o controle da taxa em que o fármaco deixa o meio. Isso é uma forma muito eficaz de monitorar a concentração de agentes terapêuticos no sangue, bem como um modo de melhorar sua biodisponibilidade.^(11,12) Outras aplicações envolvem o uso de moléculas encapsuladas para técnicas de imagem e diagnóstico.^(13, 14)

A incorporação de medicamentos em biomateriais implantáveis apresenta a vantagem de liberar a droga diretamente no sítio desejado e em concentrações pré-determinadas, mantendo o índice terapêutico estável durante um período conveniente, ou seja, o fármaco é liberado de acordo com o índice de degradação do biomaterial, resolvendo assim, os possíveis inconvenientes advindos dos sistemas convencionais de administração de medicamentos.⁽¹⁵⁾

Algumas doenças precisam de um tratamento contínuo durante períodos de

tempo variáveis e necessitam de constância na manutenção do índice terapêutico do medicamento no organismo,^(8,16,17) a exemplo da prevenção de infecções nos pós-operatórios, quando do implante de um biomaterial em um sítio do organismo.^(18,19,20)

Uma alternativa tecnológica para o controle de infecções, especialmente à profilaxia da osteomielite,⁽²¹⁾ foi a utilização de antibióticos conjugados ao polimetilmetacrilato.^(22,23) Assim, alcançando os níveis séricos e concentrações necessárias de antibiótico na ferida e baixa toxicidade sistêmica.⁽²⁴⁾

Entre os antibióticos mais utilizados para aplicação local está o Sulfato de Gentamicina (SG),⁽²⁵⁾ cuja eficiência do método tem sido relatado com sucesso no tratamentos profiláticos pós-cirúrgicos.^(26,27,28,29)

O objetivo deste estudo foi desenvolver e testar a viabilidade de sistemas de liberação de drogas a partir de Cimentos ósseos baseado em fosfato tricálcico (α -TCP) adicionado de gentamicina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foram elaborados 10 corpos de prova cilíndricos pelo processo convencional para a produção de cimento de α -TCP⁽³⁰⁾, isto é, mistura de componentes em proporções pré-definidas, agregando a este processo o fármaco teste (sulfato de gentamicina). Para a constituição dos corpos de prova (Figura 1) utilizou-se 6g de cimento de α -TCP e 70mg de Sulfato de Gentamicina (SG).⁽²⁵⁾ Os corpos de prova foram moldados em formas de aço inoxidável.

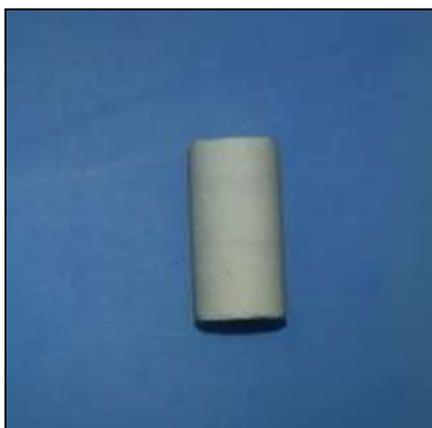


Figura 1. Corpo de prova a base de α -TCP e SG

Após a moldagem, os corpos de prova foram submetidos a secagem em estufa à 37°C por 72 horas. Em seguida, iniciou-se o ensaio *in vitro* com o objetivo de testar a hipótese verdadeira:

- Hipótese verdadeira (teste): Os corpos de prova de cimento de α -TCP

constituídos com sulfato de gentamicina liberam o fármaco em solução fisiológica;

- Hipótese Nula: Os corpos de prova de cimento de α -TCP constituídos com sulfato de gentamicina não liberam o fármaco em solução fisiológica.

Para testar as hipóteses os corpos de prova, separadamente, foram imersos em 6ml de solução tampão (pH 7,2) e acondicionados em tubos de ensaios devidamente identificados. Foram suspensos por uma espiral siliconada a fim de não tocar no fundo do tubo e potencialmente dificultar a liberação do fármaco. Os tubos foram vedados com tampas plásticas (Figura 2) e colocados em estufa à 37°C.⁽³¹⁾



Figura 2. Corpos de prova imersos em solução – início dos testes *in vitro*.

A liberação da droga foi monitorada durante 32 dias a 37°C. As soluções de 6 ml foram retiradas dos frascos em períodos de tempo pré-determinados: 24 horas, 48 horas e 720 horas.

As amostras foram constituídas pelos 6ml de solução contidos nos tubos de ensaio e coletadas por meio de seringas, identificadas conforme as amostras. Com exceção da coleta final, o volume da amostra removida foi substituído pela mesma solução tampão, de modo a manter o volume de solução nos tubos de ensaio.

O processo de liberação foi analisado por meio de um espectrofotômetro UV-visível (UV-VIS) Varian Cary 100.⁽³²⁾

Para a análise estrutural utilizou-se um acessório de Espectroscopia de Reflectância Difusa (DRS) equipado com porta-amostra, dotado de uma janela de quartzo. Os espectros foram registrados a temperatura ambiente em um espectrofotômetro UV-visível Varian Cary 100, acumulando 32 varreduras na faixa de 200 a 800 nm.⁽³²⁾

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise estrutural

A fim de analisar a incorporação do fármaco, o cimento (α -TCP) contendo gentamicina foi caracterizado por meio da técnica de DRS, onde a radiação incide sobre a amostra, excitando os elétrons. Uma vez excitados, essas partículas migram para níveis de mais elevada energia, realizando transições eletrônicas.

A Figura 3 apresenta o espectro de DRS do cimento com gentamicina. De acordo com o espectro, observa-se a banda de máxima absorção do antibiótico, centrada em aproximadamente 275 nm, correspondente às transições $n \rightarrow \sigma^*$ do par eletrônico isolado dos átomos de nitrogênio.⁽³²⁾ Desta forma, indicando a incorporação da gentamicina no cimento de α -TCP.

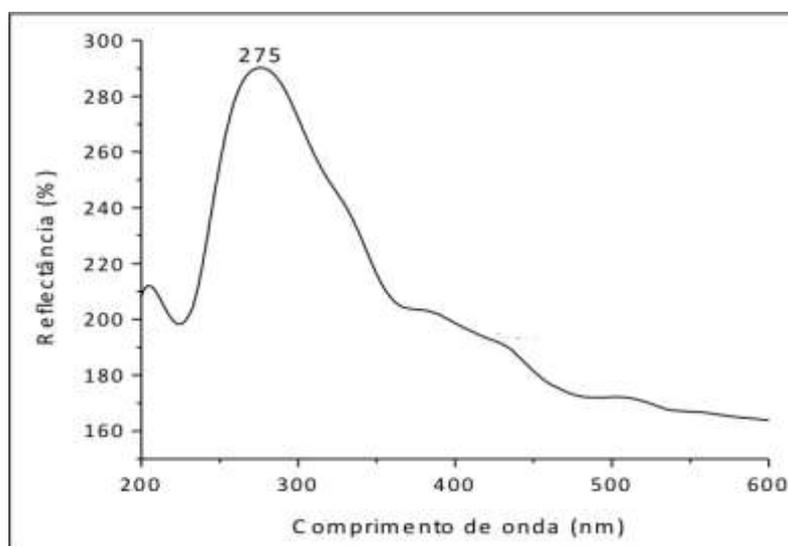


Figura 3. Espectro de DRS de cimento de α -TCP com gentamicina.

Estudo de liberação do fármaco

O comprimento de onda encontrado na solução tampão contendo o SG, por espectroscopia UV-VIS, foi de 246nm ($\lambda=246\text{nm}$).

O perfil de liberação da gentamicina em solução tampão é representado na Figura 4, onde é possível observar o perfil médio de liberação do fármaco, entre os 10 corpos de prova testados, em dias pré-determinados.

Faz-se importante salientar que nas primeiras 24h (dia 1) e 48h (dia 2), a amostra (6ml), após os testes espectroscópicos, foi eliminada. Nova solução tampão foi repostada em cada tubo de ensaio com os devidos corpos de prova e somente removidas após 30 dias a partir da análise do dia 2 (48h). Os resultados

destas análises estão representados na Figura 4.

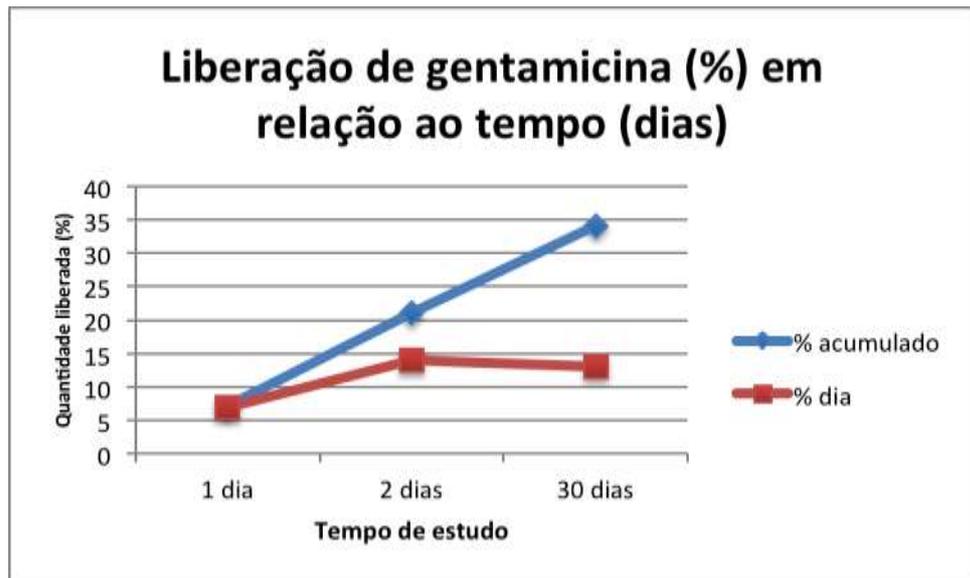


Figura 4. Liberação do SG em solução tampão.

É possível observar que entre o início e o final do estudo ocorreu a liberação média de 34% do fármaco (Figura 4, linha azul). Já a linha vermelha representada na Figura 4, mostra que em média 7% do fármaco contido em cada corpo de prova foi dispersado na solução após 24 horas de teste, com uma liberação mais intensa até 48 horas (média de 14%), diferente dos estudos de Azi et al (2010)⁽²⁵⁾ e Padilla (2001)⁽³⁰⁾, cuja maior liberação se deu nas primeiras 24h. Ao final dos 30 dias, foi possível identificar presença média de 13% do fármaco entre as soluções com as amostras, sugerindo que os corpos de prova a base de cimento de α -TCP continuam liberando o fármaco, concordando com os resultados de Padilla (2001)⁽³¹⁾.

Os corpos de prova a base de cimento de α -TCP serviram como sistema de reservatório, onde a droga foi incorporada e funcionou como regulador para a liberação controlada do fármaco, confirmando a hipótese teste. Desta forma, correspondendo ao conceito de material inteligente, a exemplo de outros sistemas onde a droga é dispersa na sua matriz e liberada de acordo com sua degradação.^(33,34)

Os corpos de prova permitiram a liberação do medicamento, representando a difusão do fármaco pelo material. Tal comportamento é de interesse, uma vez que a liberação do medicamento pelo biomaterial, além de sua degradação completa, é desejável para sistemas implantáveis de liberação de drogas, apontando para a possibilidade de utilização do cimento de α -TCP como um sistema de liberação continuada de fármaco e colaborando com a manutenção do índice terapêutico no

organismo.^(8,16,17)

Por esta razão, existe a possibilidade de desenvolver um sistema de liberação de drogas a base de cimento de α -TCP que possa, ao mesmo tempo, degradar-se e ser absorvido pelo organismo.

CONCLUSÕES

O cimento de α -TCP utilizado funcionou tanto como um sistema reservatório, uma vez que o fármaco foi incorporado em sua estrutura, quanto como regulador da velocidade de liberação da droga. Os resultados mostraram a possibilidade de utilização do cimento de α -TCP como veículo para um sistema controlado de liberação de fármacos.

A aplicação de um biomaterial a base de cimento de α -TCP potencialmente poderá viabilizar a liberação controlada de gentamicina e degradar-se. Esta característica faz com que este material se torne uma tecnologia interessante para aplicações no campo da bioengenharia, a exemplo de outros materiais já estudados.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas: Camila Escobar, Caroline Pigatto, Denírio Marques, Douglas Marques, Fabiano Brites, Juliana Fernandes e Rafaela Vieira.

Aos laboratórios Cristália e Multilab pela doação dos insumos farmacêuticos.

REFERÊNCIAS

1. WILLIAM, D.F. Definitions in biomaterials. Elsevier, New York (1987).
2. PARK, J.B. Biomaterials Science and Engineering. Plenum Press, New York, 1984.
3. SANTOS, L.A.; OLIVEIRA, L.C.; RIGO, E.C.S.; CARRODÉGUAS, R.G.; BOSCHI, A.O. Influence of Polymeric Additives on the Mechanical Properties of α -Tricalcium Phosphate Cement. Bone (New York), Elsevier, v. 25, n.2, p. 99S-102S, 1999.
4. MORAES, P.C.; PADILHA FILHO, J.G.; CANOLA, J.C.; SANTOS, L.A.; MACORIS, D.G.; ALESSI, A.C.; CASTRO, M.B.; DÓRIA NETO, F.A. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. Acta Cir. Bras., São Paulo, v. 19, n. 4, ago. 2004.
5. PARK, J. B. Biomaterials: an introduction. New York: Plenum Press; 1979.
6. FRANÇA, V.P.; FIGUEIREDO, A.R.P.; VASCONCELOS, C.; ORÉFICE, R.L. Estudo comparativo experimental de compósito bioativo de matriz polimérica para aplicação em cirurgia plástica ocular na substituição tecidual. Arq. Bras.

- Oftalmol., jul./ago. 2005, vol.68, n.4, p.425-431.
7. PEREIRA, A.P.V.; VASCONCELOS, W.L.; ORÉFICE, R.L. Novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos bioativos. *Polímeros: ciência e tecnologia*, out./dez. 1999, vol.9, no.4, p.104-109.
 8. JOSUE, A.; LARANJEIRA, M.C.M.; FAVERE, V.T.; KIMURA, I.Y.; PEDROSA, R.C. Controlled release of eosin impregnated in microspheres of chitosan/poly(acrylic acid) copolymer. *Polímeros* 2000;10:116-21.
 9. SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: a bala mágica acertou? *Quím. Nova*, nov./dez. 2002, vol.25, n.6b, p.1181-1185.
 10. UHRIG, R.E.; TSOUKALAS, L.H. *Fuzzy and Neural Approaches in Engineering*. John Wiley & Sons, New York, USA, 1997.
 11. KOKER, S.; COCK, L.J.; RIVERA-GIL, P.; PARK, W.J.; VELTY, R.A.; VERVAET, C.; REMONA, J.P.; GROOTENB, J.; GEEST, B.G. Polymeric multilayer capsules delivering biotherapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011, 63: 748–761.
 12. CIRIMINNA, R.; SCIORTINO, M.; ALONZO, G.; SCHRIJVER, A.; PAGLIARO, M. From molecules to systems: sol-gel microencapsulation in silica-based materials. *Chemical Reviews* 02/2011; 111(2):765-89.
 13. CHOI, K. Y.; JEON, E.J.; YOON, H.Y.; LEE, B.S.; NA, J.H.; MIN, K.H.; KIM, S.Y.; MYUNG, S.J.; LEE, S.; CHEN, X.; KWON, I.C.; CHOI, K.; JEONG, S.Y.; KIM, K.; PARK, J.H. Theranostic nanoparticles based on PEGylated hyaluronic acid for the diagnosis, therapy and monitoring of colon cancer. *Biomaterials* 33: 6186-6193, 2012.
 14. LEE, D. J.; PARK, G.Y.; OH, K.T.; OH, N.M.; KWANG, D.S.; YOUN, Y.S.; OH, Y.T.; PARK, J.W.; LEE, E.S. Multifunctional poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles for luminescence/magnetic resonance imaging and photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics* 434: 257-263, 2012.
 15. OGAWA, C.A; PLEPIS, A.M.G. Liberação in vitro de cloridrato de ciprofloxacina em compósitos hidroxiapatita: colágeno. *Polímeros* 2002;12:115-22.
 16. KONG, G.; ANYARAMBHATLA, G.; PETROS, W.P.; BRAUN, R.D.; COLVIN, O.M.; NEEDHAM, D.; DEWHIRST, M.W. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release. *Cancer Res.* 2000;60:695-7.
 17. FOLKMAN, J. How the field of controlled-release technology began, and its central role in the development of angiogenesis research. *Biomaterials* 1990;11:615
 18. STENGEL, D.; BAUWENS, K.; SEHOULI, J.; EKKEMKAMP, A.; PORZOLT, F. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. *Lancet.* 2001;1:175-88.
 19. LAZZARINI, L.; MADER, J.T.; CALHOUN, J. H. Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:2305-18.
 20. GRISTINA, A.G.; COSTERTON, J.W. Bacterial adherence to biomaterials and

- tissue: the significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg Am.* 1985;67:264-73.
21. NELSON, C.L. The current status of material used for depot delivery of drugs. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(427):72-8.
 22. BUCHHOLZ, H.W.; ELSON, R.A.; ENGELBRECHT, E.; LODENKÄMPER, H.; RÖTTGER, J.; SIEGEL, A. Management of deep infection of total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 1981;63:342-53.
 23. KLEMM, K.W. Antibiotic bead chains. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;(295):63-76.
 24. ZALAVRAS, C.; PATZAKIS, M.J.; HOLTOM, P. Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(427):86-93.
 25. AZI, M.L.; KFURI JUNIOR, M.; MARTINEZ, R.; PACCOLA, C.A.J. Cimento ósseo com gentamicina no tratamento da infecção óssea. Estudo da eluição in vitro. *Acta Ortopédica.* 2010; 18(1):31-4.
 26. CALHOUN, J.H.; HENRY, S.L.; ANGER, D.M.; COBOS, J.A.; MADER, J.T. The treatment of infected nonunions with gentamicin- polymethylmethacrylate antibiotic beads. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;(295):23-7.
 27. NELSON, C.L.; EVANS, R.P.; BLAHA, J.D.; CALHOUN, J.; HENRY, S.; PATZAKIS, M.J. A comparison of gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate bead implantation to conventional parenteral antibiotic therapy in infected total hip and knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;(295):96-101.
 28. OSTERMANN, P.A.W.; HENRY, S.L.; SELIGSON, D. The role of local antibiotic therapy in the management of compound fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;(295):102-11.
 29. CHRISTIAN, E.P.; BOSSE, M.J.; ROBB, G. Reconstruction of large diaphyseal defects, without free fibular transfer, in grade-IIIB tibial fractures. *J Bone Joint Surg Am.* 1989;72:427-38.
 30. DRIESSENS, F.C.M.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M.P.; BOLTONG, M.G.; PLANELL, J.A. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. *Anal.Quim. Int. Ed.*, v. 93, p. S38 - S43, 1997.
 31. PADILLA, S.; DEL REAL, R.P.; VALLET-REGÍ, M. Influencia del contenido de OHAP y de gentamicina en la liberación del antibiótico a partir de composites de OHAP/PEMMA. *Biomecánica*, 9 (1), 2001, pp. 45-48.
 32. WILLIAMS, D. H.; FLEMING, I. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry* 5 ed. McGraw-Hill Publishing: London, 1966.
 33. KIMURA, H.; OGURA, Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. *Ophthalmologica* 2001;215:143-55.
 34. DASH, A.K.; CUDWORTH, G.C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1998;40:1-12.

TITLE

A proposal for using a bone cement system based on tricalcium phosphate a pharmacon excipient

ABSTRACT

Bone cement based on tricalcium phosphate (α -TCP) can be used in various fields of health (orthopedic and dental prosthesis, materials for repairing and supporting tissues and as systems to release drugs in the organism). The application of a biomaterial based on α -TCP could enable both the constant release of drugs as support and shape damaged musculoskeletal tissues until which can be regenerated by the organism itself, replacing the biomaterial. In this sense, the aim of this study was to develop drug release systems from α -TCP added with gentamicin. In order to investigate the antibiotic incorporation in the material, this was characterized in terms of spectroscopic techniques. The results obtained in the *in-vitro* study demonstrate the viability of the proposed system for use as drug release, when compared to similar systems in the literature.

Key-words: Biomaterial, Cement tricalcium phosphate cement (α -TCP), gentamicin sulfate