

CARACTERIZAÇÃO DO FÁRMACO DE CARBOPLATINA NA MATRIZ BIFÁSICA DE FOSFATO DE CÁCIO GRANULADO MICROPOROSO

Cleomar Copatti¹; N. H. A. Camargo²; Daiara F.S³; E. Gemelli⁴

¹Departamento de Química, ^{2,3,4}Departamento de Engenharia mecânica

Rua: Tenente Antonio João nº1500 ap 102 bloco c Bairro Bom retiro cep 89223-100
joinville S/C Email:copattic@yahoo.com.br

RESUMO

As biocerâmicas bifásicas HA/TCP- β se destacam nas pesquisas em diferentes áreas de aplicações biomédicas, estas biocerâmicas com microestruturas microporosas também se destacam na liberação de medicamentos de forma controlada. O presente trabalho teve como objetivo a elaboração e caracterização do biomaterial bifásico HA/TCP- β , 60%HA/40% TCP- β microporoso carregado com medicamento. O material granulado microporoso foi elaborado pelo processo em moinho atritor, o material obtido passou pelo processo de peneiramento entre as malhas $200\mu\text{m} < d < 500\mu\text{m}$. O material granulado foi Sinterizado a temperatura de $1100^{\circ}\text{C}/2\text{h}$, fornecendo o biomaterial bifásico granulado microporoso. O carregamento do medicamento no biomaterial foi realizado através do método de alto vácuo. Os resultados apresentados estão relacionados ao método elaboração do biomaterial granulado bifásico microporoso. Os resultados obtidos demonstraram que o método de alto vácuo conduziram a incorporação do medicamento carboplatina sobre a superfície e para o interior do biomaterial granulado microporoso.

Palavras Chave: Elaboração, Bifásico, Biomaterial, Microporosidade, Fármaco.

1. INTRODUÇÃO

As biocerâmicas de fosfato de cálcio são amplamente estudadas, e se destacam nas pesquisas como biomateriais de reparação de defeitos e da reconstrução óssea. Também tem se apresentado promissoras, como matrizes na entrega localizadas de medicamentos de forma controlada ⁽¹⁾. Isso se deve pelas características de não tóxica, biocompatibilidade e semelhança cristalográfica com a da apatita do esqueleto humano ^(2,3,4,5), Isto pode gerar melhor reabilitação do paciente, também inibir um número evazivo de cirurgias, que levam a lesões, hematomas e infecções ao paciente ^(6,7). As biocerâmicas de fosfatos de cálcio são visadas pela engenharia de tecidos e de materiais, isto está associado à possibilidade de se produzir biomateriais com arquiteturas microporosas com

propriedades físicas, químicas e mecânicas similares a da estrutura do tecido ósseo⁽⁸⁾. Recentes estudos mostraram evidências que os biomateriais nanoestruturados podem influenciar a atividade celular e contribuir com os processos de reparação e reconstituição do tecido ósseo em estudos in vivo⁽⁹⁾. As biocerâmicas bifásicas de fosfatos de cálcio são destaques nas pesquisas como matrizes armazenadoras de medicamentos, para posterior, serem utilizadas como produtos de liberação de drogas de forma controlada^(10,11,12).

As biocerâmicas de fosfatos de cálcio vêm sendo utilizadas no tratamento de metástase óssea, de osteomielite e de osteoporose conforme se constatou na bibliografia^(13, 14, 15,16). Um sistema de entrega de droga é uma tecnologia que permite que a droga seja liberada no local alvo, não só para reduzir os efeitos colaterais dos medicamentos, mas também para maximizar a ação da droga⁽¹⁷⁾. Vários são os modelos de entrega de drogas: Nanocápsulas baseadas em polímeros⁽¹⁸⁾, nanotubos de carbono^(19,20). Estes veículos de dosagem ou transportador das drogas são submetidos a diferentes condições de ambientes no organismo vivo, a grande preocupação se encontra na dosagem e o período de permanência antes de atingir seu destino e sua liberação localizada⁽²¹⁾. De maneira geral os tratamentos oncológicos com fármacos não são seletivos, estes atingem as células alvo, mas, também podem destruir tecidos ósseos em perfeito estado, durante sua administração seja, oral ou associado ao tecido ósseo.

Este trabalho teve como objetivo a elaboração de um biomaterial granulado microporoso bifásico de fosfato de cálcio, para posterior incorporação e caracterização do fármaco carboplatina na microporosidade e sobre a superfície do biomaterial bifásico de fosfato de cálcio 60%HA/40%TCP-β. O trabalho de incorporação foi realizado com o uso de 70mg de fármacos carboplatina, através do método de alto vácuo. Este método permite a fixação do fármaco sobre a superfície de grãos e para o interior do biomaterial granulado microporoso. Os estudos de caracterização foram realizados com o uso de diferentes técnicas. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para caracterização da morfologia e da microestrutura do biomaterial granulado. Também serviu de apoio para identificação do fármaco depois de sua incorporação no biomaterial granulado bifásico. A fluorescência de raios X serviu de apoio na identificação dos elementos químicos presentes do biomaterial bifásico antes e depois do carregamento com o fármaco. Por fim se serviu da técnica de espectroscopia de infravermelho Raman para

identificação das bandas vibracionais dos grupamentos PO_4 e Pt , NH_3 .

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O pó bifásico de fosfato de cálcio foi fornecido pelo Grupo de Biomateriais de UDESC-Joinville, este foi obtido pelo método via úmida conforme descrito por (Cleomar 2012) ^(13,22). A elaboração do biomaterial bifásico microporoso se realizou com ajuda de um moinho atritor de Alta energia marca NETZSCH, esferas de zircônia com diâmetro de 2,00mm e água destilada. O processo em moinho atritor foi realizado com uma concentração sólido/líquido de 50%/50% em volume. O processo de moagem em moinho atritor foi realizado com uma rotação do eixo de moagem de 540rpm e mantido sob agitação por um período de uma hora, conforme descrito por ⁽²³⁾. A suspensão coloidal recuperada do moinho atritor, passou pela secagem em evaporador rotativo, fornecendo os pós nanoestruturados bifásico HA/TCP- β aglomerados, estes passaram pelo processo de classificação por peneiras passando pela malha # 500 mesh e sendo recuperado o material granulado acumulado na peneira de malha # 200 mesh. O material granulado obtido foi submetido à sinterização a temperatura de 1100°C/2h, fornecendo os biomaterial bifásico granulado microporoso.

A carboplatina 450mg foi adquirida da Tevacarbo, este fármaco foi incorporado ao biomaterial bifásico granulado microporoso na concentração de 70mg/g de biomaterial bifásico. O método de alto vácuo foi utilizado para incorporação do medicamento ao biomaterial. Este é um processo físico que inibe a modificação das características físicas e químicas do medicamento e do biomaterial ⁽¹³⁾.

Os estudos de caracterização morfológica e microestrutural foram realizados em um microscópio eletrônico de varredura, marca Jeol, modelo jsm6701f, através do sistema de elétrons secundários (SE). Estes estudos foram realizados sobre o pó de Carboplatina e do biomaterial bifásico granulado microporoso. A técnica de microscopia eletrônica de varredura e EDX foi utilizada na identificação dos elementos química presentes no biomaterial bifásico e biomaterial carregado com o fármaco. A técnica de infravermelho Raman permitiu a identificação das bandas vibracionais do fármaco e do biomaterial bifásico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos da caracterização morfológica e microestrutural, sobre o biomateriais granulado bifásico microporoso, revelou em suas micrografias a morfologia dos grânulos com formas irregulares se apresentando com tamanhos entre $200\mu\text{m} < d < 500\mu\text{m}$, conforme pode ser observado sobre a figura 1a. Outra observação foi à microestrutura microporosa interconectada do biomaterial granulado como mostrado pela figura 1b.

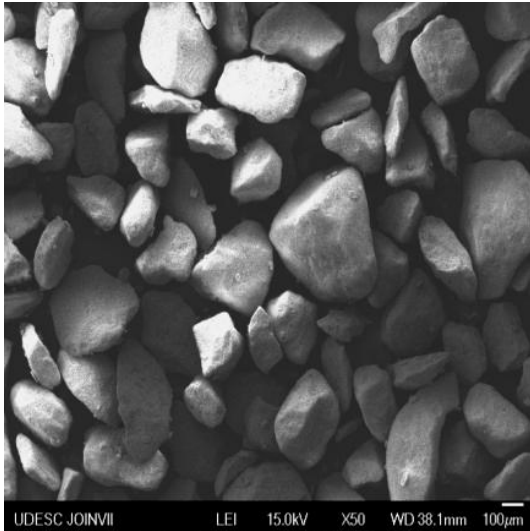


Figura 1a. Morfologia do biomaterial granulado Bifásico HA/TCP- β

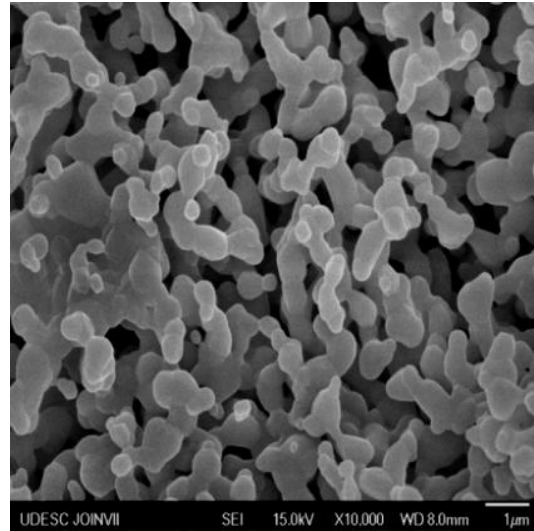


Figura 1b. Microestrutura do biomaterial granulado Bifásico HA/TCP- β .

A figura 2a mostra a morfologia do medicamento Carboplatina, onde se constata a presença de finos bastões com formas retangulares, indicando a carga do medicamento (manitol) e a morfologia de pequenos cristais dispersos e aglomerados indicando ser a morfologia da carboplatina. Já a figura 2b ilustra a microestrutura do biomaterial bifásico sem carregamento do fármaco, pode se observar uma microestrutura microporosa, formada por finos grãos. As figuras 2c e 2d mostram a microestrutura do biomaterial bifásico com o carregamento de 70mg de fármaco. Observa-se sobre as micrografias, indicado pelas setas, em cor preta, a presença de uma nova morfologia na interface de grãos do biomaterial bifásico (Fig. 2c) e também no interior da microporosidade do biomaterial (Fig. 2d), indicando que a incorporação do fármaco ao biomaterial pelo método de alto vácuo foi bem sucedido.

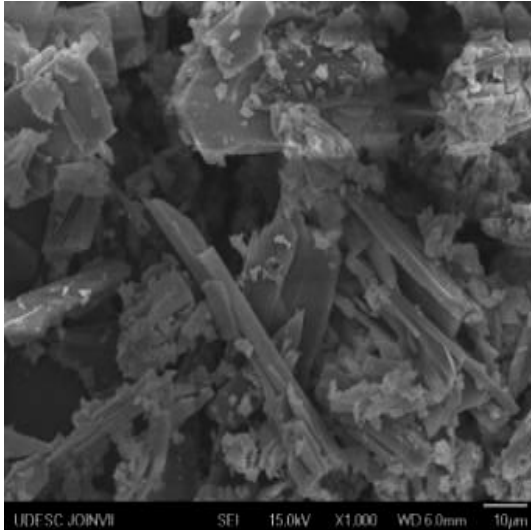


Figura 2a. Micrografia mostrando a morfologia do fármaco

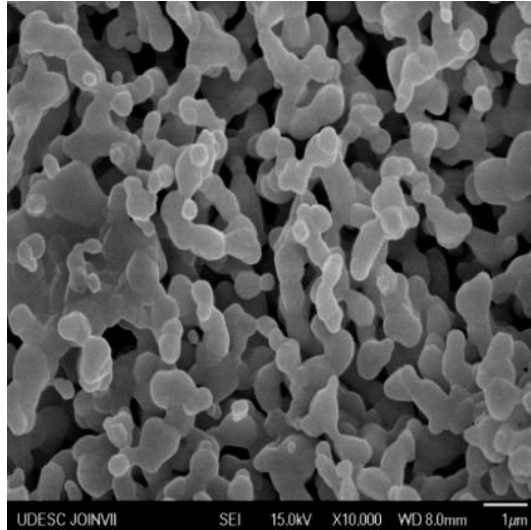


Figura 2b. Microestrutura do biomaterial granulado.

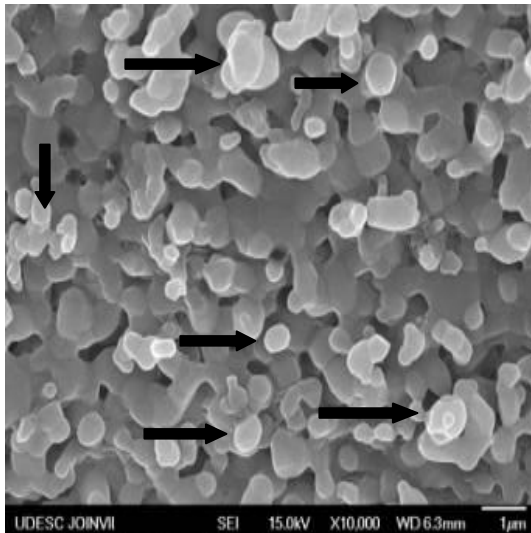


Figura 2c. Presença do Fármaco na superfície do biomaterial granulado

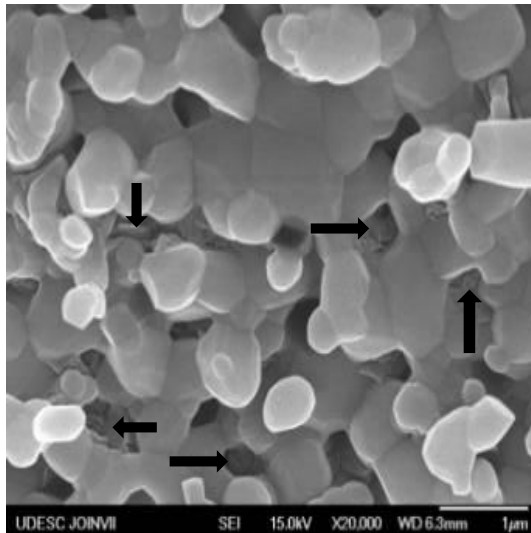


Figura 2d. Presença do Fármaco nos contornos de grãos e interior da microporosidade do biomaterial

A figura 3 apresenta a micrografia obtida do estudo de análise química por EDX, sobre regiões específicas da microestrutura do biomaterial granulado, com incorporação de 70 mg de fármaco. Foram marcados três pontos de análises, representados por; ponto 1, ponto 2 e ponto 3, sobre a microestrutura do biomaterial granulado, conforme ilustrado na figura 3. O resultado da análise química no ponto 1, obtida sobre o grão de fosfato de cálcio, evidenciou em seu espectrograma de EDX representado pela figura 4, os picos característicos do P, Ca, O e C, a presença do elemento C pode estar associado a fita de carbono utilizada para fixação do biomaterial para análise. O resultado obtido para este ponto de análise

(ponto 1), confirma a presença do fosfato de cálcio. As figuras 5 mostra o resultado da análise química por EDX sobre o ponto 2, este está localizado na borda de um grão com a borda de um poro, o interesse foi verificar a possibilidade do fármaco estar também depositado na microporosidade do biomaterial. Observando o espectrograma representado pela figura 5, constata-se a presença dos elementos seguintes: Ca e P e a Pt (Platina), indicando a presença da platina, também para o interior da microporosidade do biomaterial. Isto mostra que o método de alto vácuo se mostrou eficiente, na fixação de fármaco na superfície e para o interior da microporosidade do biomaterial.

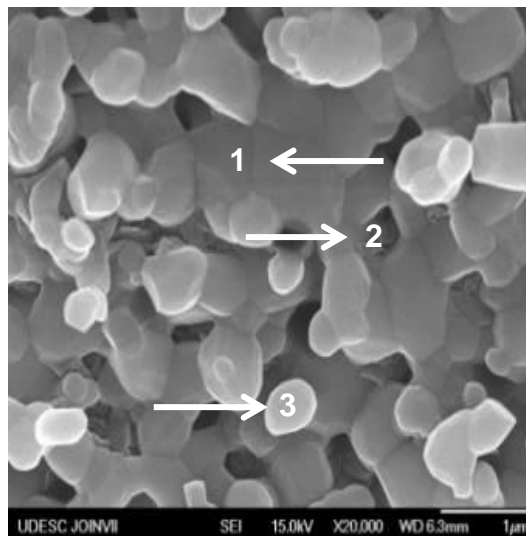


Figura 3. Micrografia representando os pontos de análise químicas por EDX

A figura 6 mostra o espectrograma de EDX obtido no ponto 3, o resultado mostra em seu espectro os elementos seguintes: Ca, P e também a Pt (Platina), isto indica que o cristal analisado representa possivelmente a Pt (Platina) do fármaco. Este resultado permite dizer que o método de alto vácuo, possibilitou a incorporação do fármaco tanto na superfície do biomaterial granulado como para o interior de sua microestrutura microporosa.

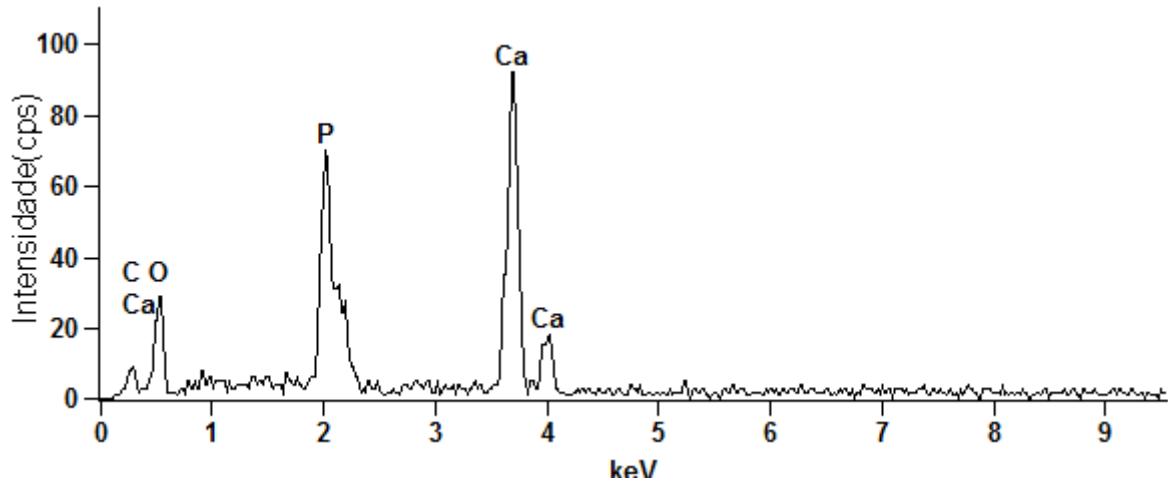


Figura 4. Espectrograma de EDX obtido no ponto 1

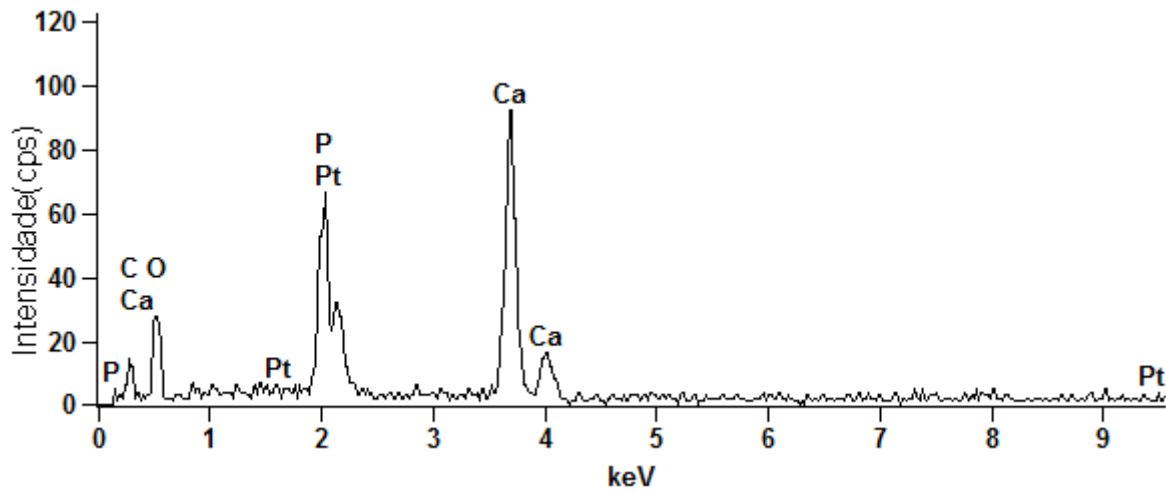


Figura 5. Espectrograma de EDX obtido no ponto 2

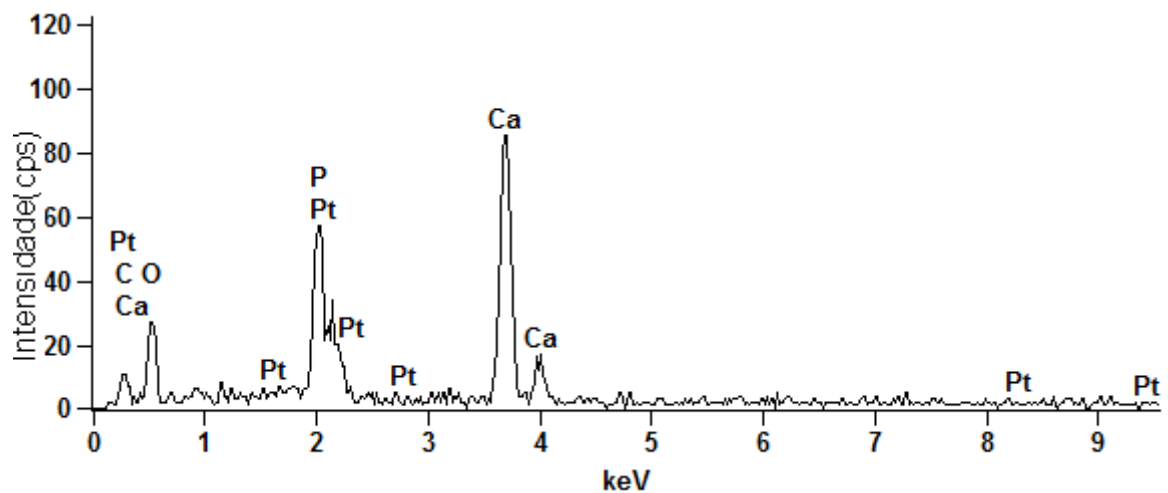


Figura 6. Espectrograma de EDX obtido no ponto 3

A figura 7 apresenta o resultado da análise obtida por infravermelho Raman, sobre o fármaco puro, observa-se no espectrograma as bandas vibracionais características do grupamento NH_3 e Pt⁽²⁴⁾, Já figura 8 apresenta o resultado obtido sobre o biomaterial bifásico puro, constata-se no espectrograma as bandas vibracionais características de fosfatos de cálcio, observando claramente as bandas vibracionais do grupamento PO_4 ⁽²⁵⁾. A figura 9 apresenta o espectrograma obtido sobre o biomaterial com 70mg do fármaco na matriz bifásica, não sendo possível efetuar um comparativo entre as bandas característica do fármaco NH_3 entre 3000 e 3500 cm^{-1} , Pt entre 500 e 545 cm^{-1} , C=O 1400 e 1750 cm^{-1} , C-H 2800 a 2975 cm^{-1} , C-C 830 e 986 cm^{-1} ⁽²⁵⁾ e do biomaterial PO_4 entre 1080 cm^{-1} , 1018 cm^{-1} , 594 cm^{-1} , 567 cm^{-1} .

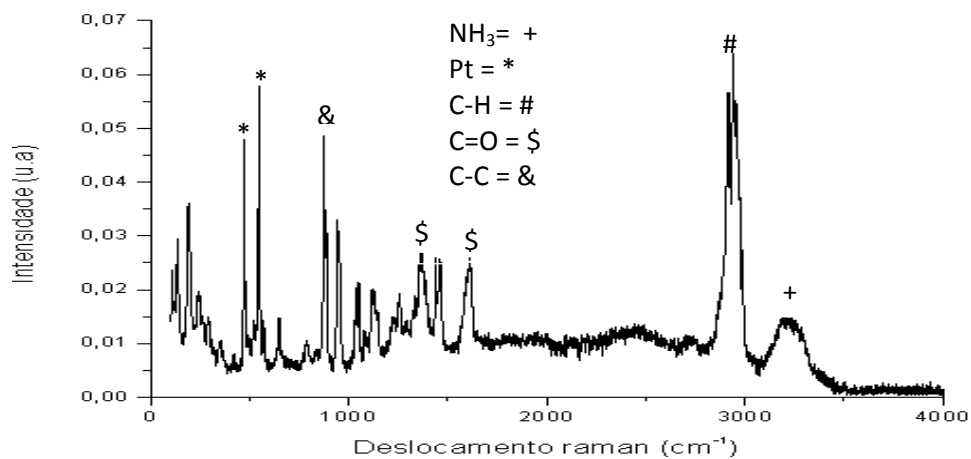


Figura 7. Espectro Raman obtido sobre o fármaco de carboplatina.

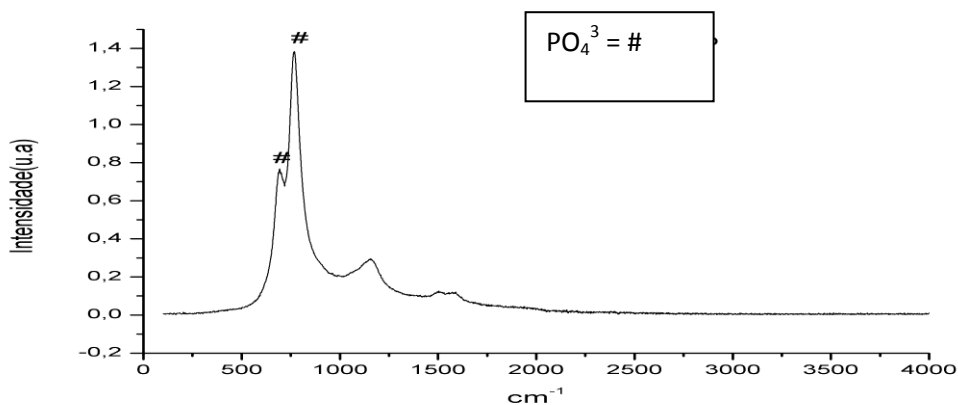


Figura 8. Espectro Raman obtido sobre o biomaterial bifásico.

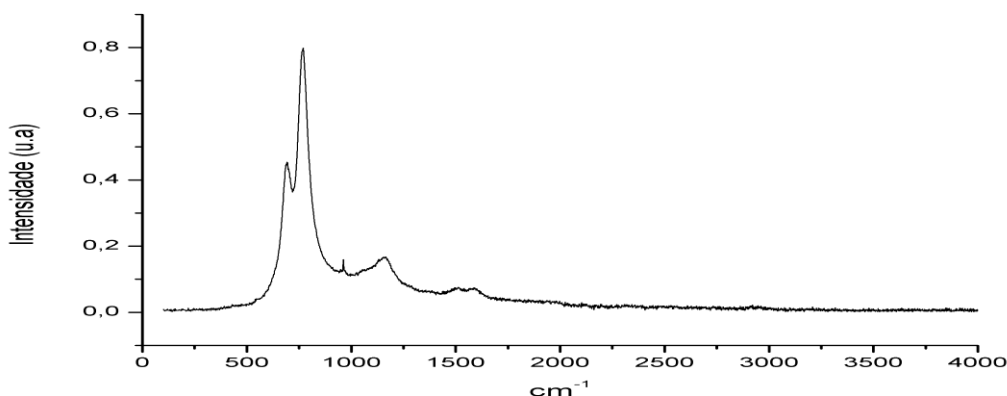


Figura 9. Espectro obtido por Raman sobre a matriz bifásica com e 70mg de carboplatina.

4. CONCLUSÃO

O método de alto vácuo se mostrou eficiente na incorporação do fármaco tanto na superfície de grãos quanto no interior da microporosidade do biomaterial bifásico. As imagens obtidas com a microscopia eletrônica de varredura revelaram a presença do fármaco na superfície dos grãos e na microporosidade do biomaterial. O infravermelho Raman se mostrou eficiente na identificação das bandas NH_3 entre 3000 e 3500 cm^{-1} , Pt entre 500 e 545 cm^{-1} , C=O 1400 e 1750 cm^{-1} , C-H 2800 a 2975 cm^{-1} , C-C 830 e 986 cm^{-1} , presentes no fármaco puro e também as bandas PO_4 entre 1080 cm^{-1} , 1018 cm^{-1} , 594 cm^{-1} , 567 cm^{-1} presentes no biomaterial puro, a pequena quantidade de fármaco presente na matriz bifásica após a incorporação não foi suficiente para ser detectado por esta técnica, conforme apresentou a figura 5, também pelo fármaco não ser um composto puro de carboplatina e apresentar em sua composição manitol os grupos OH^- , NH_3 , C=O, C, PO, Ca, C-H_(n) e Pt podem ter gerado sobreposição de bandas dificultando sua identificação. A técnica de incorporação a vácuo mostrou-se promissora por não apresentar modificações das estruturas tanto do biomaterial bifásico como também do fármaco, outro ponto relevante deste método está associado a ser simples e de baixo custo, sendo facilmente adaptado para uma linha de produção em nível industrial.

REFERÊNCIAS

- [1] Sunita Prem Victor Æ T. S. Sampath Kumar J Mater BCP ceramic microspheres as drug delivery carriers: synthesis, characterisation and doxycycline release Sci:

- Mater Med (2008) 19:283–290 <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-006-0044-7>
- [2] Camargo, N. H. A. ; Lima, Sarah Amin de ; Souza, J. C. P. ; Aguiar, Juliana Francine de ; Gemelli, Enori ; Meier, M. M. ; Cardoso ; Mittelstädt . Synthesis and Characterization of Nanostructured Ceramic Powders of Calcium Phosphate and Hydroxyapatite for Dental Applications. Key Engineering Materials, v. 398, p. 619-622, 2009.
- [3] Hassna R.R. Ramay, M. Zhang Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering Biomaterials 25 (2004) 5171–5180 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.023>.
- [4] Shahram Ghanaati, Mike Barbeck, Carina Orth, Ines willershausen, Benjamin w. Thimm, Christane Hoffmann, Angela Rasic, Robet A. Sader, Ronald E. Unger, Fabian Peters, C. James Kirkpatrick; Influence of b-tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. Acta Biomaterialia, nº 6, p. 4476-4487, 2010.
- [5] Sergey V. Dorozhkin Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates Acta Biomaterialia 8 (2012) 963–9776 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.003>.
- [6] B. Palazzo, T. M.C. Sidotia, N. Roveria, A. Tampierib, M. Sandrib, L. Bertolazzic, F. Galbuserac, G. Dubinic, P. Venac , R. Controc Materials Science and Engineering: C Volume 25, Issue 2, 28 April 2005, Pages 207–213
- [7] Shahram Ghanaati Mike Barbeck Carina Orth ,Ines Willershausen b, Benjamin W. Thimm c,Christiane Hoffmann , Angela Rasic, Robert A. Sader, Ronald E. Unger, Fabian Peters,C. James Kirkpatrick Influence of b-tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo Acta Biomater. 2010 Dec;6(12):4476-87. Epub 2010 Jul 23.
- [8] Shahram Ghanaati, Mike Barbeck, Carina Orth, Ines Willershausen, enjamin W. Thimm,Christiane Hoffmann, Angela Rasic, Robert A. Sader, Ronald E. Unger, Fabian Peters D. James Kirkpatrick Influence of b-tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo: Acta Biomaterialia 6 (2010) 4476–4487 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.006>
- [9] E.S. Thian, J. Huang, Z. Ahmad, M.J. Edirisinghe, S.N. Jayasinghe, D.C. Ireland, R.A. Brooks, N. Rushton, S.M. Best, W. Bonfield. Influence of nanohydroxyapatite patterns deposited by electrohydrodynamic spraying on osteoblast response Journal of Biomedical Materials Research Part A Volume 85A, Issue 1, pages 188–194, April 2008.
- [10] Maria-Pau Ginebra , Cristina Canal , Montserrat Espanol , David Pastorino , Edgar B. Montufar , Calcium phosphate cements as drug delivery materials Advanced Drug Delivery Reviews 64 (2012) 1090–1110 <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.008>
- [11] M.P. Ginebra, T. Traykova, J.A. Planell, Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review: Journal of Controlled Release 113 (2006) 102–110 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.007>
- [12] ARAR, H.H. and BAJPAI, P.K. (1992). Insulin Delivery by Zinc Calcium Phosphate Ceramics, Biomed. Sci. Instrum., 28: 173–178 PMID:1643223
- [13] Cleomar Copatti; Daiara F.S; P Correa; N. H. A. Camargo; Elaboração e caracterização de biomaterial nanoestruturado granuloso bifásico ha/tcp-β para

- aplicações no tratamento da estrutura óssea In: 20 cebcimat, 2012, Joinville. Ceramics, 2012. p. 30. Disponível em: <http://www.cbecimat.com.br/trabalhos-completos-cbecimat.php>
- [14] Solen Josse, Corine Fauchoux, A. Soueidan, Gaël Grimandi, Dominique Massiot 1, Bruno Alonso, Pascal Janvier, Samia Laïb, Paul Pilet, Olivier Gauthier, Guy Daculsi, Jérôme Guicheux, Bruno Bujoli 2, Jean-Michel Bouler: Novel biomaterials for bisphosphonate delivery. *Biomaterials* **26** (2005) 2073-2080 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.019>
- [15] B. Busse , B. Jobke , M. Hahn , M. Priemel , M. Niecke, S. Seitz , J. Zustin , J. Semler f, M. Amling: Effects of strontium ranelate administration on bisphosphonate-altered hydroxyapatite: Matrix incorporation of strontium is accompanied by changes in mineralization and microstructure *Acta Biomaterialia* **6** (2010) 4513–4521 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.019>
- [16] Nelson H. A. Camargo, Sarah A. de Lima, Enori Gemelli; Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite/TiO_{2n} Nanocomposites for Bone Tissue Regeneration, *American Journal of Biomedical Engineering*, p. 41-47, 2012
- [17] M. D'Este , D. Eglin: Hydrogels in calcium phosphate moldable and injectable bone substitutes: Sticky excipients or advanced 3-D carriers? *Acta Biomaterialia* **9** (2013) 5421–5430 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.022>
- [18] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari. Polymer-based nanocapsules for drug delivery: *International Journal of Pharmaceutics* **385** (2010) 113–142 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
- [19] Alberto Bianco, Kostas Kostarelou and Maurizio Prato. Applications of carbon nanotubes in drug delivery: *www.sciencedirect.com Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, **9**:674–679
- [20] HL Wamocha, HE Misak, Z Song, HY Chu, YY Chen, R Asmatulu, S-Y Yang and JC Ho Cytotoxicity of release products from magnetic nanocomposites in targeted drug delivery: *J Biomater Appl* **2013** **27**: 661 originally published online 9 November 2011
- [21] David R. Friend. Colon-specific drug delivery: *Advanced Drug Delivery Reviews*, **7** (1991) 149-199-1991 Elsevier Science Publishers B.V. / 0169-409X/91/\$03.50
- [22] Dalmônico, G. M. L., Síntese e caracterização de fosfato de cálcio e de hidroxiapatita: elaboração de composições bifásicas HA/TCP-β para aplicações biomédicas. Dissertação de mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville-SC, P. 95, 2011
- [23] DE Lima, S.; Souza, J.; Camargo, N.; Pupio, F.; Santos, R.; Gemelli, E. Síntese e Caracterização de Pós Nanoestruturados de Hidroxiapatita. 5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais - COLAQB'2008, Ouro Preto - MG. v. 1. p. 1-6, 2008
- [24] Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry: Kazuo Nakamoto Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2009
- [25] Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part B: Application in coordination, Organometallic, and Bioorganic Chemistry: Kazuo Nakamoto Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2009