

## ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA: AVALIAÇÃO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS EM SISTEMAS DE CIMENTO ALFA FOSFATO TRICÁLCICO

J. C. Colpo<sup>(1;2)</sup>; C. Pigatto<sup>(1)</sup>; M. P. P. Lucena<sup>(1)</sup>; C. F. Escobar<sup>(1)</sup>; T. Delbrücke<sup>(1)</sup>; D. H. Piva<sup>(1)</sup>; J. Jurado<sup>(1)</sup>; V. C. Sousa<sup>(1)</sup>; L. A. Santos<sup>(1)</sup>.

(1) Engenharia de Materiais, LABIOMAT, UFRGS

(2) Agência Nacional de Vigilância Sanitária

<sup>(1)</sup> Av. Bento Gonçalves, 9500. Setor 4, Prédio 74, sala 118. CEP.: 91509-900 Porto Alegre/ RS. e-mail: [juliocesarcolpo@gmail.com](mailto:juliocesarcolpo@gmail.com)

### RESUMO

*Cimentos ósseos a base de fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP) podem ser utilizados em diversas áreas da saúde, inclusive como sistemas de liberação de fármacos. A aplicação de um biomaterial a base de cimento de  $\alpha$ -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 ao mesmo tempo que mantém os índices de fármacos estáveis no sítio desejado do organismo. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi desenvolver sistemas de liberação de drogas a partir de cimento de  $\alpha$ -TCP adicionado de sulfato de gentamicina e avaliar a liberação do fármaco por meio da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica. Os resultados obtidos no estudo *in vitro* validaram a técnica proposta como método para avaliação da liberação controlada de fármacos carregados em sistemas à base de  $\alpha$ -TCP.*

Palavras-chave: Cimento de fosfato tricálcico; Sulfato de gentamicina; Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

### INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico permite o desenvolvimento de novos dispositivos, sistemas ou produtos que auxiliam na manutenção da vida e sua qualidade. Este avanço tem possibilitado não somente que pesquisadores desenvolvam diversos biomateriais, como também a busca e implementação de melhorias nesses biomateriais, a exemplo de estudos envolvendo os cimentos alfa-fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP) que objetivam ampliar sua aplicação em saúde.<sup>(1,2,3)</sup>

Os sistemas a base de cimento  $\alpha$ -TCP compõem o grupo dos biomateriais cerâmicos, os quais são de grande interesse à saúde, pois além de sua estrutura inorgânica ser similar ao osso, são biocompatíveis<sup>(4,5,6)</sup> e têm a possibilidade de reproduzir algumas propriedades da matéria viva que deixou ou está limitada de

exercer sua função, além de servirem como matriz, veículo, suporte ou estimulador para o crescimento de novos tecidos,<sup>(7)</sup> atendendo ao que dispõem MIRTCHI et al (1989)<sup>(8)</sup> e Koker et al (2011)<sup>(9)</sup> quando descrevem os biomateriais e sua importância à saúde.<sup>(8,9)</sup>

No contexto da saúde, os biomateriais utilizados como sistemas de liberação controlada de fármacos visam, sobretudo, o controle da taxa em que o fármaco deixa o meio. Isto é uma forma muito eficaz de monitorar a concentração de agentes terapêuticos no sangue, auxiliando a melhorar sua biodisponibilidade.<sup>(10,11)</sup>

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, sendo o fármaco liberado de acordo com o índice de degradação do biomaterial, resolvendo assim, os possíveis inconvenientes advindos dos sistemas convencionais de administração de medicamentos.<sup>(11)</sup>

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,<sup>(11,12,13)</sup> a exemplo de cimentos ósseos ou outros biomateriais associados a fármacos usados em cirurgias ortopédicas para a prevenção de infecções nos pós-operatórios.<sup>(14,15,16)</sup>

Contudo, estudos envolvendo os cimentos  $\alpha$ -TCP como sistema para liberação de fármacos ainda são pouco encontrados, apesar deste apresentar um potencial elevado de utilização para liberação de fármacos, principalmente no sistema esquelético, sendo as aplicações mais imediatas em pacientes com osteomielite, câncer ósseo, osteoporose ou prevenção de infecções nos pós-operatórios, quando do implante de um biomaterial em um sítio do organismo.<sup>(4,14,15,16)</sup>

Desta forma, além do desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos a base de cimento  $\alpha$ -TCP é importante o desenvolvimento de metodologias para avaliação desta liberação, contribuindo para melhor conhecimento de utilização destes biomateriais.

Analisando bancos de dados de periódicos encontram-se estudos que utilizam a técnica de EIS para avaliar mudanças na microestrutura de cimentos (tamanho das partículas, tempo de pega),<sup>(21,22,23)</sup> caracterização de efeitos por adição de aditivos em sua formulação, bem como sua exploração como uma técnica não destrutiva. Contudo, o uso da técnica para avaliação e mensuração de sistemas de

liberação a base de cimento  $\alpha$ -TCP, até o presente momento, não foi encontrado em base de dados de periódicos.<sup>(24)</sup>

O objetivo deste estudo foi desenvolver sistemas de liberação partir de cimento  $\alpha$ -TCP adicionado de fármacos e testar essa liberação por meio de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS).

## MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a liberação do fármaco pelo cimento  $\alpha$ -TCP foram elaborados 4 corpos de prova cilíndricos, por meio do processo convencional para a produção de cimento  $\alpha$ -TCP,<sup>(25)</sup> por meio da mistura de componentes em proporções pré-definidas, agregando a este processo o fármaco teste (SG). Para a constituição dos corpos de prova (Figura 1) utilizou-se 5g de cimento  $\alpha$ -TCP e 50mg de SG.<sup>(17)</sup> Os corpos de prova foram moldados em formas de aço inoxidável.



Figura 1. Corpo de prova à base de cimento  $\alpha$ -TCP e sulfato de gentamicina

Após a moldagem, os corpos de prova foram submetidos à secagem em estufa à 37°C por 72 horas.

Em seguida, iniciou-se o ensaio *in vitro*, onde os corpos de prova, separadamente, foram imersos em 100ml do eletrólito, constituído por solução tampão fosfato (pH 7), e acondicionados em frascos de erlenmeyer 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 frascos foram vedados com tampas plásticas e colocados sob agitação lenta e constante à 37°C.<sup>(26)</sup> (Figura 2)



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

A liberação do fármaco foi monitorado nas primeiras 24 horas e após 72 horas de imersão no eletrólito à 37°C. As amostras foram constituídas pelos 100ml de solução contidos nos frascos.

O processo de liberação foi analisado por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS). As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas no intervalo de frequências de 100kHz a 10mHz. A amplitude de tensão aplicada foi de 10mV a partir do potencial de circuito aberto do sistema. No experimento foram utilizados eletrodos de platina. O eletrólito líquido foi constituído por Solução Tampão Fosfato (pH 7,0). Os dados foram obtidos com o equipamento AUTOLAB PGSTAT e com o auxílio do software FRA.0,1-100 MHz.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Fármaco teste

O sulfato de gentamicina,<sup>(17)</sup> é um dos antibióticos mais utilizados para aplicação local cuja a eficiência do método tem sido relatado com sucesso no tratamentos profiláticos pós-cirúrgicos.<sup>(18,19,20,27)</sup>

### Estudo de liberação do fármaco

No estudo realizado com o corpo de prova ( $\alpha$ -TCP + SG) é possível observar a diferença existente entre o tempo inicial e final em que o corpo de prova permaneceu mergulhado no eletrólito (Branco). (Figura 3)

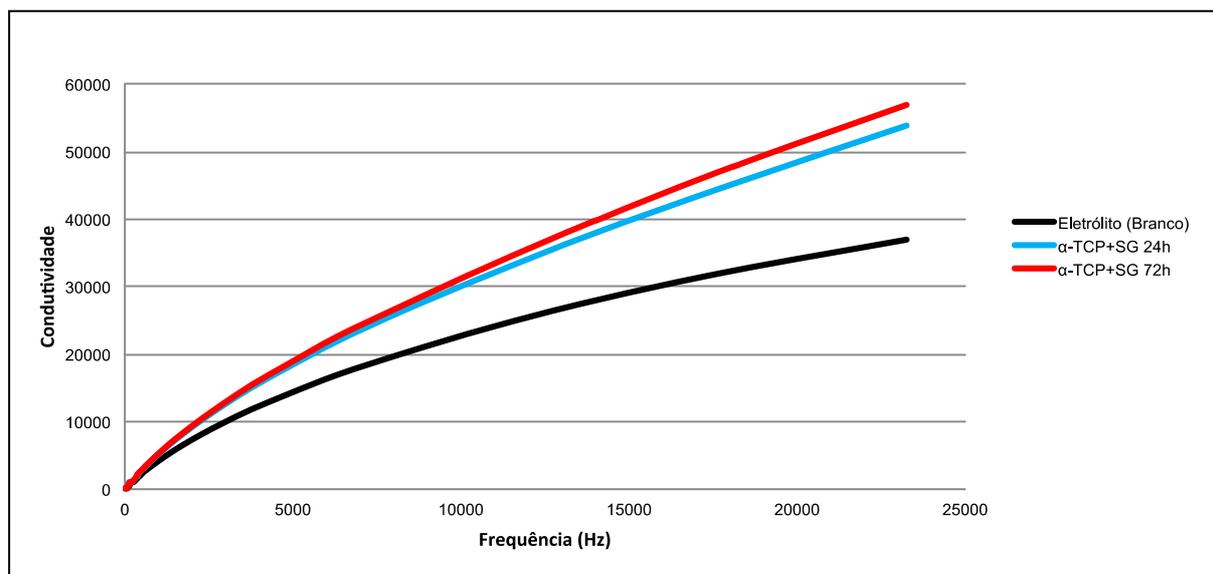


Figura 3. Análise comparativa entre as soluções contendo o fármaco (SG) e o eletrólito (branco). A linha preta representa o eletrólito (Branco), a vermelha representa a solução onde o corpo de prova permaneceu 72h em solução e a linha azul 24h. É possível observar o aumento da condutividade nas soluções onde o corpo de prova continha o fármaco (SG) em relação ao Branco e os diferentes tempos de coleta.

As análises aqui identificadas mostram a diferença da condutividade em relação à frequência comparada ao eletrólito (Branco) e entre as diferentes concentrações do fármaco, indicando que o aumento da concentração também aumenta a condutividade no meio estudado. O que pode ser explicado pelo aumento da disponibilidade iônica na solução.

O método proposto permitiu inferir que ocorreu aumento da concentração do fármaco teste na solução tampão, portanto a liberação do fármaco,<sup>(21,22,23,24)</sup> representando a difusão deste através do corpo de prova. Este comportamento é de interesse, uma vez que a liberação do medicamento pelo biomaterial é desejável para sistemas implantáveis de liberação de fármacos, apontando para a viabilidade de utilização do método para tal avaliação.

O cimento  $\alpha$ -TCP utilizado funcionou como um sistema reservatório, uma vez que o fármaco foi incorporado em sua estrutura, e também como regulador da liberação do fármaco.

## CONCLUSÕES

Os resultados validam o método proposto, pois há diferença na condutividade entre as soluções com corpo de prova a 24h, 72 horas e o eletrólito (Branco). Isto

permite validar a possibilidade de desenvolver um modelo utilizando o EIS para avaliar liberação de fármacos por sistemas a base de cimento  $\alpha$ -TCP.

## AGRADECIMENTOS

Ao LACOR/UFRGS;

Ao laboratório Cristália pela doação dos insumos farmacêuticos.

## REFERÊNCIAS

1. SANTOS, L. A. Oliveira, L. C.; Rigo, E. C.; Carrodeguas, R. G.; Boschi, A. O.; De Arruda, A. C. Influence of polymeric additives on the mechanical properties of  $\alpha$ -tricalcium phosphate cement. *Bone* 1999;25(2):99-102.
2. SANTOS, LA. Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio para Uso na Área Médico-Odontológica. 2002, 247p. Tese (Doutorado em Materiais e Processo de Fabricação). Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
3. THÜRMER, M. B.; DIEHL, C. E.; SANTOS, L. A. Desenvolvimento de cimento ósseo compósito baseado em alfa-fosfato tricálcico e hidrogéis. XXIII Congresso Brasileiro em Engenharia Biomédica; Porto de Galinhas, PE, 2012.
4. MORAES, P. C. Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado no rádio de coelhos. 2002, 77p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária). Curso de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2002.
5. DÓREA NETO, F. A. Avaliação do cimento de alfa-fosfato tricálcico em artrodeses tarsocrurais experimentais em cães. 2002, 83p. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, 2007.
6. ABUKAWA, H.; PAPADAKI, M.; ABULIKEMU, M.; JEREMY, L.; VACANTI, J.; KABAN, L. B.; TROULIS, M. J. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. *Dental Clinics of North America* 2006;50(2):205-16, VIII.
7. OLIVEIRA, S. M.; MIJARES, D. Q.; TUMER, G.; AMARAL, I. F.; BARBOSA, M. A.; TEIXEIRA, C. C. Engineering endochondral bone: in vivo studies. *Tissue Engineering. Part A, New York*, v.15, n.3, p.635-643, 2009.
8. MIRTCHI, A. A.; LEMAITRE, J.; TERAQ, N. Calcium phosphate cements: study of the B-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate system. *Biomaterials, New York*, n 10, p. 475-480, 1989.
9. 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.
10. 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.
11. OGAWA, C.A.; PLEPIS, A.M.G. Liberação in vitro de cloridrato de ciprofloxacina em compósitos hidroxiapatita: colágeno. *Polímeros* 2002;12:115-22.
  12. 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.
  13. FOLKMAN, J. How the field of controlled-release technology began, and its central role in the development of angiogenesis research. *Biomaterials* 1990;11:615
  14. STENGEL, D.; BAUWENS, K.; SEHOULI, J.; EKKEKAMP, A.; PORZOLT, F. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. *Lancet.* 2001;1:175-88.
  15. LAZZARINI, L.; MADER, J.T.; CALHOUN, J. H. Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:2305-18.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. LIU, C.; SHAO, H.; CHEN, F.; ZHENG, H. Effects of the granularity of raw materials on the hydration and hardening process of calcium phosphate cement (2003) *Biomaterials*, 24 (23) , pp. 4103-4113.
  22. HOEPFNER, T.P.; CASE, E.D. The porosity dependence of the dielectric constant for sintered hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 2002;60:643–50.
  23. BESSIÈRE, J.; KHAYAR, M.; ETAHIRI, A. Impedance studies of the adsorption of hydrophobic and hydrophilic species on mineral pulps. *Anal Chim Acta* 1995;305:265–8.
  24. DESPAS, C.; SCHNITZLER, V.; JANVIER, P. *et al.* High-frequency impedance measurement as a relevant tool for monitoring the apatitic cement

setting reaction, *Acta Biomaterialia*, Available online 25 October 2013, ISSN 1742-7061, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.019>.

25. 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.
26. 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. *Biimecánica*, 9 (1), 2001, pp. 45-48.
27. 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.

## TITLE

Electrochemical Impedance Spectroscopy: evaluation of drug delivery system of Alfa tricalcium phosphate cement

## ABSTRACT

*Tricalcium phosphate cement ( $\alpha$ -TCP) can be used in various fields of health, including as drug delivery systems. The application of a biomaterial based on  $\alpha$ -TCP could enable both the constant drug delivery as support and shape damaged musculoskeletal tissues until which can be regenerated by the organism itself, replacing the biomaterial, while maintaining stable levels of the drug in the organism. The aim of this study was to evaluate the release of gentamicin sulfate using the technique of electrochemical impedance spectroscopy in drug delivery systems of  $\alpha$ -TCP cement. The results obtained in vitro study validated the proposed methodology for assessment of controlled drug delivery systems on the basis of  $\alpha$ -TCP.*

Key-words: Biomaterial, Cement Tricalcium Phosphate ( $\alpha$ -TCP), Gentamicin Sulfate, Electrochemical Impedance Spectroscopy.