

# BIOCERÂMICA BIFÁSICA COM LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE OSTEOPOROSE.

T. P. Costa\*, M. Jafelicci Jr.\* e R. F. C. Marques\*

\*Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara SP, Brasil

e-mail: taci.costa@yahoo.com.br

**Resumo:** Os fosfatos de cálcio principalmente a hidroxiapatita (HA) e o fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) são biomateriais que vem sendo utilizados como substitutos ósseos visto suas propriedades de osteocondução e biocompatibilidade. Entretanto a diferença na solubilidade destes 2 materiais fez surgir o interesse no uso de biocerâmicas bifásicas HA/ $\beta$ -TCP. Um dos fármacos mais utilizados para tratamento de osteoporose são os bisfosfonatos que contém alta afinidade com os minerais presentes nos ossos. Neste trabalho fosfato de cálcio bifásico HA/ $\beta$ -TCP foi sintetizado e incorporado com um aminobisfosfonato (alendronato) em uma matriz polimérica de F108 (polímero termosensível e biocompatível) por meio do método da dispersão sólida formando um biocompósito para o tratamento de osteoporose. Resultados de microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X indicaram a formação de uma apatita bifásica com porcentagem de HA/ $\beta$ -TCP em 60%/40%. No espectro infravermelho do biocompósito observou-se bandas características do fármaco e da biocerâmica bifásica indicando o sucesso na incorporação destes biomateriais. Na curva de liberação do biocompósito observou-se uma liberação total do fármaco em 70 minutos.

**Palavras-chave:** Fosfato de cálcio bifásico, hidroxiapatita,  $\beta$ -TCP, alendronato.

**Abstract:** Calcium phosphates mainly hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) are biomaterials that have been used as bone substitutes because of their osteoconductive and biocompatibility properties. However the difference in the solubility of these two materials has raised interest in the biphasic bioceramics (HA/ $\beta$ -TCP) application. One of the most used drugs for treating osteoporosis include bisphosphonates that contain high affinity for minerals present in the bones. In this work biphasic calcium phosphate was synthesized and incorporated join with an aminobisphosphonate (alendronate) in a polymer matrix F108 (thermosensitive and biocompatible polymer) through the solid dispersion method to form a biocomposite for the treatment of osteoporosis. Results of scanning electron microscopy and X-ray diffraction indicated the formation of a HA 60% and  $\beta$ -TCP 40% biphasic apatite percentage. In the infrared spectrum of the biocomposite was observed characteristic bands of the drug and biphasic bioceramic indicating the successful incorporation of these biomaterials. In the

release curve of the biocomposite was observed a total release of the drug in 70 minutes.

**Keywords:** biphasic calcium phosphate, hydroxyapatite,  $\beta$ -TCP, alendronate.

## Introdução

Desde a descoberta de sua atividade farmacológica na década de sessenta os bisfosfonatos vêm sendo extensivamente utilizados para tratar doenças relacionadas aos ossos como osteoporose e a doença de Paget [1]. Devido a sua estrutura química os bifosfonatos tem alta afinidade a hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  - mineral principal constituinte dos ossos e dentes), os átomos de oxigênio dos grupos fosfatos quelam os íons cálcio da hidroxiapatita [2]. O efeito farmacológico dos bisfosfonatos está relacionado tanto com a sua ligação a minerais dos ossos, tanto com o seu efeito bioquímico nas células, predominantemente nos osteoclastos (células responsáveis por quebrar ossos por um processo chamado reabsorção óssea) inibindo a calcificação e a reabsorção óssea [1,3,4].

Fosfatos de cálcio (apatitas) são materiais de conhecida aplicação como substitutos ósseos em engenharia de tecido ósseo, devido as suas similaridades ao mineral ósseo e excelente biocompatibilidade. Esses biomateriais podem formar fases distintas as quais, possuem diferentes bioatividades e velocidades de degradação. O comportamento da bioatividade e da degradação, geralmente depende da razão Ca/P e da cristalinidade e pureza da fase [5]. Entre os vários fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita (HA) e o fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) são os mais comumente utilizados neste tipo de aplicação, devido a sua propriedade de osteogênese, e a capacidade de formar fortes ligações com o tecido ósseo do hospedeiro. Em relação a degradação, a solubilidade do  $\beta$ -TCP é muito maior que da HA, por isso advém a ideia do uso de fosfatos de cálcio bifásicos. Exemplificando, com as fases HA e  $\beta$ -TCP, é possível balancear fases mais estáveis e fases mais solúveis e controlar as propriedades de degradação do biomaterial [6].

O uso de matrizes poliméricas biocompatíveis pode ser um dos métodos de incorporar fármacos e outros biomateriais para o uso em liberação controlada. Os blocos de copolímeros formados por óxido de polietileno (PEO) e óxido de polipropileno (PPO) conhecidos comercialmente por Pluronic<sup>®</sup> (BASF) são

surfactantes não iônicos, termosensíveis, com boa compatibilidade celular (aprovado pelo *US FDA* e *EMEA*) e que podem ser encontrados em um amplo espectro de pesos moleculares e diferentes razões entre os seus monômeros PEO/PPO [7].

Atualmente, com o incremento da expectativa de vida da população, sobre tudo feminina, os casos de osteoporoses têm aumentado significativamente e o desenvolvimento de biocompósitos com agentes antiosteoporóticos se torna desejável. Pessoas com osteoporose possuem baixa capacidade osteogenerativa quando enxertos são aplicados. Desta forma, desenvolver um enxerto capaz de liberar bifosfonato nos primeiros dias da regeneração óssea irá inibir os osteoclastos, favorecendo a ação de osteoblastos. Assim, enxertos ósseos modificados com polímeros para liberação controlada de bifosfonato pode ser uma excelente opção em tratamentos de pessoas com osteoporose.

Neste trabalho fosfato de cálcio bifásico (HA/ $\beta$ -TCP) foi preparado por meio do método sol-gel, e incorporado juntamente com o fármaco alendronato ( $C_4H_{12}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$  - aminobisfosfonato) em uma matriz polimérica de PEO-PPO (F-108) utilizando o método da dispersão sólida para uso em liberação controlada.

## Materiais e métodos

A síntese do fosfato de cálcio bifásico foi realizada por meio do método sol-gel [8]. Sendo assim uma mistura de 2,2 mol/L de  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  e 7,6mL de etanol foi adicionada em um balão e deixada sob agitação, então lentamente foi adicionado mais 1,7 mol/L de trimetilfosfato. A solução final foi mantida em banho de óleo a 80°C por 24h. Depois o sol obtido foi aquecido até a eliminação do etanol e a formação de um pó branco, este foi secado a 100°C por 12h e depois calcinado a 700°C por 2h.

Para a preparação da matriz polimérica com alendronato e fosfato de cálcio foi utilizado o método de dispersão sólida. As massas de *Pluronic*<sup>®</sup> F-108, fosfato de cálcio e alendronato utilizadas foram de aproximadamente 5:1:0,5 respectivamente. Em um béquer foi adicionado o F-108 e este aquecido em banho maria sob agitação magnética até que todo o material fundisse, então foi adicionado o fosfato de cálcio e o alendronato e a mistura foi mantida nas mesmas condições por mais 30 minutos. A mistura então foi desgaseificada em um dessecador a vácuo e secada a temperatura ambiente.

As amostras em pó foram analisadas por difração de raios X utilizando um difratômetro modelo Rigaku Rint 2000 operando com tamanho de passo de 0,02° e tempo por passo de 3s no intervalo de 4° a 80°. Para a análise de espectroscopia na região do infravermelho as amostras foram diluídas em KBr na proporção de 10:1 e foram analisadas em um espectrometro FTIR Vertex 70 (Bruker, Alemanha) usando o acessório EasiDiff (Pike Technology) de reflectância difusa em uma faixa

espectral de 4000 a 400  $cm^{-1}$  com resolução de 4  $cm^{-1}$ . As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em um microscópio JEOL modelo JSM-7500F e as amostras em pó depositadas sobre um porta amostra de alumínio e recobertas com ouro. A curva de liberação foi realizada em água a  $37 \pm 0,5^\circ C$ , para a determinação da quantidade de fármaco foi utilizado um método potenciométrico adaptado de Moreno AH [9].

## Resultados

A Figura 1 ilustra a comparação dos difratogramas de raios X da amostra de fosfato de cálcio FC01 e os padrões de HA e  $\beta$ -TCP obtidos no banco de dados de estrutura cristalina JCPDS-74-565 e JCPDS-70-2065 respectivamente. Observa-se no difratograma da amostra picos característicos da fase hidroxiapatita e da fase  $\beta$ -TCP, indicando a formação do material bifásico HA/ $\beta$ -TCP que era esperado. Na amostra FC01 também foi realizada análise de microscopia eletrônica de varredura, ilustrada na Figura 2.

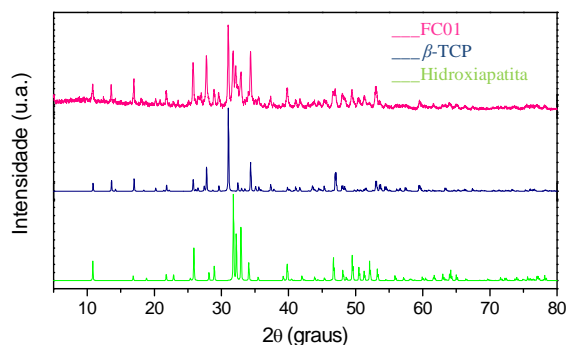


Figura 1: Difratograma de raios X da amostra FC01 e dos padrões da fase HA e da fase  $\beta$ -TCP.

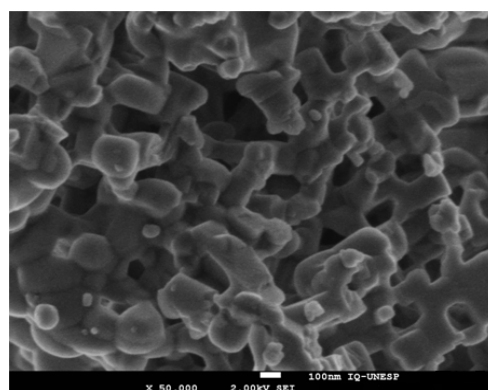


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura da amostra FC01.

Na etapa seguinte o biocompósito composto pela matriz F108, pela apatita bifásica HA/ $\beta$ -TCP (FC) e pelo fármaco alendronato (AL) nomeado de F108FCAL e os materiais puros (FC e AL) além de uma amostra contendo apenas a matriz polimérica e a apatita bifásica

(F108FC) foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho. Na Figura 3 as principais bandas características do fármaco e do fosfato de cálcio bifásico foram demarcadas em áreas hachuradas, sendo destacada a faixa entre 1500 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Observa-se no espectro da amostra F108FCAL, a presença das bandas do AL e do FC além das bandas características do polímero.

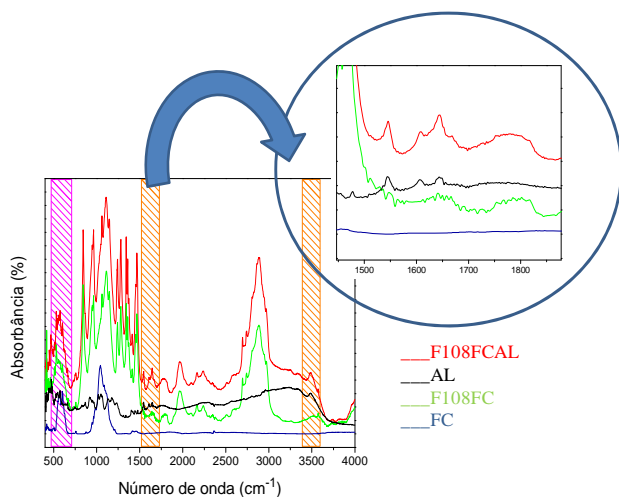


Figura 3: Espectros na região do infravermelho das amostras F108FCAL, AL, F108FC e FC. As regiões demarcadas entre 450 - 700, 1500 - 1700 e 3300 e 3600  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às regiões das bandas de absorção características dos grupos  $\text{PO}_3$  (O-P-O),  $\text{NH}_2$  (N-H) e  $\text{NH}_2$  (N-H).

A Figura 4 ilustra a curva de liberação da amostra F108FCAL. Mais de 80% do fármaco presente na amostra foi liberado nos primeiros 20 minutos chegando a 100% em 70 minutos.

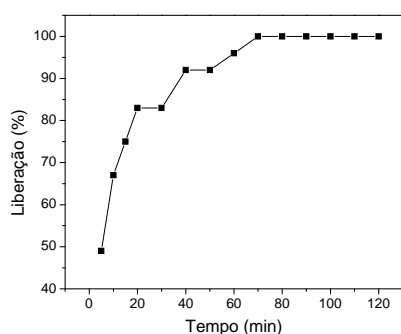


Figura 4: Curva de liberação da amostra F108FCAL.

## Discussão

A caracterização da biocerâmica FC01 por difratometria de raios X (Figura 1) revelou a formação de um material bifásico HA/ $\beta$ -TCP. Observam-se na amostra picos característicos da fase HA (25,9; 32,9 e 31,8°  $2\theta$ ) e picos característicos da fase  $\beta$ -TCP (27,8; 31,0 e 34,2°  $2\theta$ ). Na micrografia da amostra FC01

(Figura 2) observam-se aglomerados, onde não é possível diferenciar as duas fases e nem determinar tamanhos de cristalitos. De acordo com Dorozhkin SV [6] esse resultado é característico de apatitas bifásicas com 60% de HA e 40% de  $\beta$ -TCP.

No espectro na região do infravermelho da amostra F108FCAL (Figura 3), observam-se bandas de absorção características do grupo fosfato correspondentes à área hachurada em rosa na faixa entre 450-750  $\text{cm}^{-1}$  (deformação angular O-P-O) [10,11], grupo este presente tanto na apatita bifásica quanto no alendronato. As faixas hachuradas em laranja apresentam bandas características do grupo amina entre 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$  (deformação angular N-H) e entre 3300-3600  $\text{cm}^{-1}$  (deformação axial da ligação N-H) [12], grupo presente apenas no alendronato. Além de bandas provenientes das cadeias carbônicas (deformações C-H, 1200-1500  $\text{cm}^{-1}$  e 2880  $\text{cm}^{-1}$ ) e do éter esta última apenas do polímero (1000 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) [13]. A presença das bandas em destaque comprova a incorporação tanto da apatita quanto do fármaco na matriz polimérica. Inclusive na faixa ampliada observa-se que a amostra preparada apenas com F108 e FC não apresenta a banda característica da amina que pode ser, entretanto observada na amostra F108FCAL e no fármaco puro AL.

Na curva de liberação obtida para a amostra F108FCAL observou-se uma liberação total do fármaco em 70 minutos. O experimento foi realizado em um meio aquoso, o qual apresenta características diferentes do meio biológico ao qual se pretende aplicar esse biocompósito. Salienta-se que quando aplicado no corpo humano, espera-se uma difusão mais lenta uma vez que o meio com sangue e osso será mais viscoso e podendo o sangue estar coagulado, retendo o fármaco por mais tempo na região desejada. Estudos de difusão do fármaco serão realizados em diferentes pH e temperaturas para prever o comportamento do biocompósito em organismos vivos. Sabendo-se que o bisfosfonato e o *Pluronic*<sup>®</sup> utilizado são hidrofílicos, espera-se aumentar o tempo de retenção do fármaco através do uso de *Pluronic*<sup>®</sup> com diferentes graus de hidrofobicidade.

## Conclusão

Utilizando o método sol-gel foi possível obter uma apatita bifásica HA/ $\beta$ -TCP (60%/40%) a qual foi incorporada em uma matriz polimérica de F108 junto com alendronato. Resultados de espectroscopia na região do infravermelho mostraram o sucesso na incorporação dos materiais na matriz. A curva de liberação do biocompósito mostrou uma liberação eficaz do fármaco com total liberação completa depois de 70 minutos.

## Agradecimentos

Capes, Cnpq, Fapesp, Procell.

**Referências**

- [1] Giger EV, Castagner B, Leroux J-C. Biomedical applications of bisphosphonates. *Journal of Controlled Release*, 2013, 167(2): 175-188.
- [2] Russell R, Watts N, Ebetino F, Rogers M. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos International*. 2008, 19(6):733–759.
- [3] Francis MD, Graham R, Russell G, Fleisch H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathologic al calcification in vivo. *Science*. 1969, 165(3899):1264– 1266.
- [4] Fleisch H, Russell RGG, Marion DF. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science*. 1969, 165(3899): 262 –1264.
- [5] Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. *Acta Biomaterialia*. 2012, 8(4):1401-1421.
- [6] Dorozhkin SV. Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomaterialia* 2012, 8(3):963-977.
- [7] Alvarez-Lorenzo C, Sosnik A, Concheiro A. PEO-PPO block copolymers for passive micellar targeting and overcoming multidrug resistance in cancer therapy. *Current Drug Targets*. 2011, 12(8):1112-1130.
- [8] Wang D. et. al. Fabrication of superparamagnetic hydroxyapatite with highly ordered three-dimensional pores. *Journal of Materials Science*. 2009, 44(15):4020–4025.
- [9] Moreno AH, Pezza HR, Pezza L. Potentiometric determination of alendronate in pharmaceutical formulations. *Chemia analityczna*. 2004, 49:351-357.
- [10] Hench L L, Best S. *Ceramics, glasses, and glass-ceramics*. Em: B. D.Ratner et al., editor. *Biomaterial science: an introduction to materials in medicine*. Amsterdam: Elsevier; 2004. p.153-170.
- [11] Wu HC. et. al. A novel biomagnetic nanoparticle based on hydroxyapatite. *Nanotechnology*. 2007, 18(16):165601/1-165601/9.
- [12] Lin-Vlein D. et al. *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*. New York: Academic Press; 1991.
- [13] Silverstein R M; Webster FX. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC; 2000.