

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DO ANESTÉSICO ROPIVACAÍNA PELO SISTEMA POLOXAMER – FOSFATO DE CÁLCIO

K.C.Kai1*, D. Calipo1*, D. R. Araújo1* e J. Marchi1*

1* Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André (SP),
Brasil

karen.kai@ufabc.edu.br; juliana.marchi@ufabc.edu.br

Resumo: Foi avaliado o perfil de liberação do anestésico ropivacaína (RVC) pelo sistema poloxamer 407 (PL) - fosfatos de cálcio (FCs), este desenvolvido para o carregamento e liberação controlada local da RVC para reduzir a dor do pós-operatório, associada com a regeneração óssea propiciada pelos FCs. FCs (HAp, TCP e HAp-TCP) foram sintetizados via úmida, envelhecidos, filtrados, lavados, liofilizados e calcinados (800°C/1-3h). A morfologia e as fases cristalinas dos pós foram avaliadas por MEV e DRX, respectivamente. A temperatura de transição sol-gel foi obtida pelo ensaio do tubo invertido. O perfil de dissolução das formulações e a liberação de RVC foram avaliados pelo método gravimétrico e ensaio de liberação livre de membrana *in vitro*, respectivamente. A adição dos FCs diminuiu a taxa de dissolução do PL e a taxa de liberação da RVC. As formulações mostraram-se adequadas utilização como sistemas de liberação controlada de fármacos.

Palavras-chave: Liberação controlada de fármaco, Poloxamer, Fosfatos de cálcio, Ropivacaína.

Abstract: *It was evaluated the ropivacaine (RVC) release profile by poloxamer 407 (PL) - calcium phosphate (FCs) system. The system were developed for the carrier and local release of RVC to reduce of postoperative pain, associated with bone regeneration provided by FCs. FCs (HAp, TCP and HAp-TCP) were synthesized by wet route, aged, filtered, washed, lyophilized and calcined (800°C/1-3h). SEM and XRD evaluated morphology and crystalline phases of powders, respectively. Sol-gel transition temperature was obtained by inverted test tube. Dissolution profile of systems and RVC release were evaluated by gravimetric method and *in vitro* free-membrane release assay, respectively. The addition of FCs decreased the rate of PL dissolution and the rate of RVC release. Formulations showed suitable properties for use as drug delivery system.*

Keywords: *Drug delivery, Poloxamer, Calcium phosphate, Ropivacaine.*

Introdução

A ropivacaína (RVC) é um anestésico local de baixa toxicidade sistêmica [1] [2], que favorece o bloqueio sensorial, sendo um dos motivos da aplicação na anestesia epidural e no alívio da dor pós-operatória [3].

Comparada a bupivacaína, apresenta menor cardiotoxicidade e duração semelhante [1]. Visando prolongar a duração da ação e liberação controlada da RVC, neste trabalho foi proposto um sistema de liberação composto por poloxamer 407 (PL) e fosfatos de cálcio (FCs) para aplicação em pós-operatório de fraturas. O PL é um copolímero não-iônico anfifílico em blocos PEO-b-PPO-b-PEO (poli(óxido de etileno-b-óxido de propileno-b-óxido de etileno)) [4] [5]. Comporta-se como líquido viscoso a 25°C e gel semi-sólido a 37°C, devido à formação de micelas [6]. O PL é biocompatível e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico como sistema carreador de fármacos e para engenharia tecidual [7] [8]. FCs são utilizados para regeneração e substituição de tecidos ósseos [9], devido a sua osteocondutividade, biocompatibilidade [10], e similaridade química e estrutura cristalina com as fases minerais do tecido ósseo [11] [12]. Os mais estudados são: fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - TCP), hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp) e compostos bifásicos (BCPs), estes compostos de HAp e TCP em diferentes razões, com a finalidade de otimizar as propriedades de estabilidade química da HAp e da bioabsorção do TCP, controlando-se a taxa de dissolução.

Neste trabalho, os sistemas compostos por PL, FCs e RVC foram caracterizados fisicamente e quanto ao perfil de degradação das formulações e liberação da RVC.

Materiais e métodos

FCs foram sintetizados via úmida a partir de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e H_3PO_4 [13]. As suspensões foram envelhecidas, filtradas e liofilizadas, obtendo-se hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA). Os pós foram calcinados a 800°C por 1h (TCP) e 3h (HAp e HAp:TCP 50:50) e caracterizados por difração de raios-X (DRX, Multiflex, Rigaku), identificando as fases cristalinas pelo banco de dados PDF-ICDD (460905 - CDHA, 090169 - β -TCP, e 090432 - HAp). A morfologia dos pós foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV, JSM-6010LA, JEOL).

Os sistemas carreadores foram obtidos pela solubilização do PL em tampão HEPES 20 mM e NaCl 154 mM (pH 7,4), em banho de gelo e agitação constante (concentração final de 20%). RVC foi solubilizada em etanol absoluto, adicionada nos FCs e o

etanol evaporado a ar. Os sistemas PL-FCs e PL-FCs-RVC foram obtidos pela adição dos FCs e dos FCs-RVC aos hidrogéis (Tabela 1).

Tabela 1: Formulações compostas por PL, FCs e/ou RVC.

Formulações	Composição
PL	Poloxamer 407 (PL)
PR	PL + Ropivacaína (RVC)
PH	PL + Hidroxiapatita (HAp)
PT	PL + Fosfato tricálcico (TCP)
PHT	PL + HAp-TCP + RVC
PHR	PL + HAp + RVC
PTR	PL + TCP + RVC
PHTR	PL + HAp-TCP + RVC

A temperatura de transição sol-gel foi determinada pelo método de inversão de tubos [14], em triplicata, com as formulações, incubando-os em banho (0°C, 20 min). A temperatura foi aumentada até 60°C; a cada 2°C as amostras foram analisadas visualmente e classificadas em: líquida (inversão completa da amostra no sentido da gravidade), líquido-viscosa ou *soft-gel* (parte da amostra permanece no fundo do tubo) e semi-sólida ou *hard-gel* (a amostra permanece completamente no fundo do tubo).

Para avaliar a influência da adição dos FCs e RVC na taxa de dissolução do PL e liberação da RVC, os géis ficaram em contato direto com o meio de liberação sem a utilização de membranas [15]. Foi adicionado ~1,0g das formulações em microtubos pré-pesados. Após pesagem dos microtubos com as formulações, as composições foram mantidas em banho (37°C, 12h), adicionado HEPES/NaCl (pH 7,4, 37°C). Após cada período experimental (1-12 h), o sobrenadante foi retirado, os microtubos novamente pesados, o tampão reposto. A porcentagem de dissolução foi quantificada por gravimetria (Equação 1) (PAM - peso da amostra, PER - peso do recipiente, To - tempo no início do experimento, Tx - tempo de intervalo da análise). A liberação da RVC foi avaliada a partir do sobrenadante do ensaio de dissolução, sendo a RVC quantificada por espectrofotometria UV-VIS (263 nm).

$$D(\%) = \frac{(PAM_{To} - PER_{To}) - (PAM_{Tx} - PER_{Tx})}{(PAM_{To} - PER_{To})} \times 100 \quad (1)$$

Resultados

A partir da análise por DRX dos pós de FCs (Figura 1a) identificou-se a fase β -TCP para a amostra TCP e a fase HAp para a amostra HAp. Observou-se as duas fases para a amostra HAp-TCP. As micrografias dos pós (Figuras 1b-d) indicam que todas as composições apresentam-se na forma de aglomerados, constituídos de partículas em escala nanométrica.

As temperaturas de transição sol-gel das formulações estão apresentadas na Tabela 2. Todas as formulações apresentaram processos de gelificação. PL

com RVC apresentou fase gel na faixa de 32-56°C. Avaliando apenas a adição de FCs, as formulações apresentaram comportamento gel de 20°C a 60°C (PH e PHT), e de 22°C a 60°C (PT). Avaliando a adição de RVC e FCs em conjunto, PHR apresentou fase gel de 18-60°C, PTR de 20-60°C e PHTR de 18-60°C. Por outro lado, o PL sem FCs e/ou RVC mostrou comportamento gel de 32°C a 54°C.

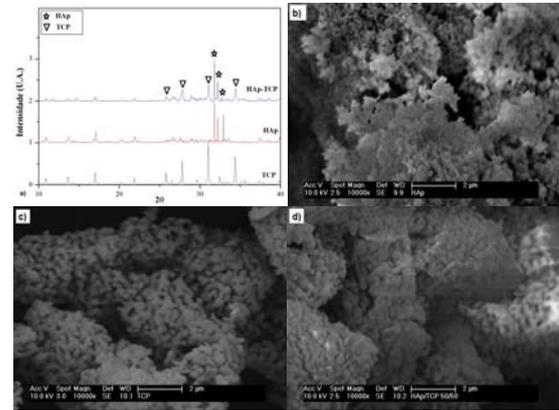


Figura 1: Difratoograma (a); MEVs dos pós de FCs: (b) HAp; (c) TCP; (d) HAp-TCP

Tabela 2: Temperatura de transição sol-gel por tubo invertido de PL com FCs e/ou RVC: L (líquido), S (líquido-viscoso) e H (semi-sólido)

Formulações	Temperatura (°C)									
	0-14	1-6	1-8	2-0	2-2	2-4	26-30	32-54	56	58-60
PL	L	L	L	L	L	L	S	H	S	S
PR	L	L	L	L	L	L	S	H	H	S
PH	L	L	S	H	H	H	H	H	H	H
PT	L	L	L	S	H	H	H	H	H	H
PHT	L	L	S	H	H	H	H	H	H	H
PHR	L	S	H	H	H	H	H	H	H	H
PTR	L	L	S	H	H	H	H	H	H	H
PHTR	L	S	H	H	H	H	H	H	H	H

Os resultados de dissolução *in vitro* são apresentados pela Figura 2. O PL sem aditivos apresentou degradação parcial no período avaliado (12h) de ~40%. A adição de RVC reduziu a dissolução (~22%), comportamento que ocorreu para todas as outras formulações. O perfil de liberação da RVC é apresentado nas Figuras 3a e 3b. O modelo utilizado (Higuchi) representa a liberação do fármaco a partir de matrizes semi-sólidas, na qual o fármaco está completamente dissolvido no veículo. Os resultados de liberação da RVC (Figura 3a) mostram que nas primeiras horas ocorre grande liberação da RVC em todas as formulações. Com exceção da amostra PTR, todas as amostras apresentam queda na liberação da RVC na 2ª.h de experimento. A amostra PR, a partir de 4h de experimento, apresenta aumento na liberação

da RVC. Por outro lado, PHR mostrou queda constante na liberação até a 6^a.h experimental. Todas as amostras apresentam aumento na RVC liberada no final do experimento, sendo que as amostras PR e PTR foram as que mais liberaram RVC. Em relação aos resultados obtidos da liberação da RVC em porcentagem acumulada (Figura 3b), observa-se que há uma grande diferença entre a amostra PR e as amostras contendo FCs e RVC. A amostra PR foi a que apresentou maior liberação total da RVC após 12h de experimento.

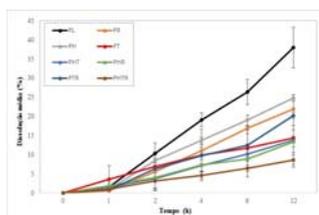


Figura 2: Dissolução média (%) em função do tempo das formulações compostas de PL, RVC e/ou FCs.

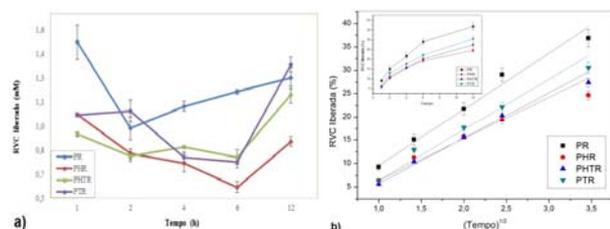


Figura 3: a) RVC liberada das formulações compostas de PL, RVC e FCs em função do tempo. b) Perfil de liberação da RVC em % acumulada em função do tempo (em detalhe: Liberação da RVC em % acumulada em função da raiz quadrada do tempo).

Discussão

Os sistemas de liberação prolongada de fármaco apresentam várias vantagens quando comparadas com os sistemas tradicionais: prolongamento da ação do fármaco, redução dos efeitos colaterais e da frequência de administração, melhor adesão do paciente e entrega do fármaco mais eficaz [5]. Neste trabalho, foi avaliado o perfil de liberação da RVC do PL, com o objetivo de obter uma liberação controlada do RVC e prolongar o tempo de permanência do fármaco no local da injeção. No caso de cirurgias envolvendo fraturas, a RVC pode ser injetada incorporada em FCs e em PL, este formando gel *in situ*. Os FCs apresentam composição química e estrutura cristalina similares a dos ossos e dentes, biocompatibilidade e osteocondução, tornando-os adequados para aplicações na ortopedia e na odontologia.

Conforme já esperado, os tratamentos térmicos aos quais TCP (800°C/1h) e HAp (800°C/3h) foram submetidos mostraram-se suficientes para a completa transformação de fase CDHA→β-TCP e CDHA→HAp, respectivamente, o que pode ser concluído pela presença apenas da fase β-TCP na amostra TCP e da fase HAp na

amostra HAp [13] [16] [17]. A amostra HAp-TCP apresentou picos característicos das fases cristalinas HAp e β-TCP. BCP é obtido quando CDHA é calcinado a temperaturas acima de 700°C quando preparado em razão Ca/P menor do que 1,67 [18]. As micrografias dos pós calcinados de FCs mostram que as partículas apresentam-se em escala nanométrica, com tendência a se aglomerarem, o que possivelmente deve-se a interação eletrostática entre as partículas.

A temperatura de gelação das formulações foi avaliada pelo experimento de tubo invertido, o qual permite determinar a temperatura de transição sol-gel visualmente. A termogelificação é um fenômeno reversível, ou seja, quando a temperatura é diminuída para abaixo da temperatura de transição sol-gel, o polímero volta para a fase sol, e acima dessa temperatura torna-se semi-sólido (gel). O aumento da temperatura acima da CMC (concentração micelar crítica) leva ao deslocamento do equilíbrio dos unímeros para a formação de micelas esféricas com núcleos densos, o que reduz o número de unímeros não associados em solução. A micelização deve-se a desidratação dos blocos de OP hidrofóbicos, levando à fase gel. A gelificação é atribuída ao empacotamento ordenado das micelas na forma hexagonal [4] [19] [20] [21]. Os resultados sugerem que a adição dos FCs acelerou o processo de gelificação. Os FCs em solução aquosa liberam íons Ca^{2+} para a solução, estes podendo interagir com as porções PPO, ocasionando envelhecimento destas e alterando a temperatura de transição sol-gel do PL [22]. Estes materiais mostram-se adequados para a aplicação proposta neste trabalho, podendo ser aplicados na forma líquida em temperatura próxima a ambiente, permitindo que seja injetado no local de tratamento. Além disso, apresenta-se na forma gel na temperatura corpórea.

O modelo livre de membrana escolhido para a obtenção da taxa de dissolução do poloxamer envolve a absorção de água pelo polímero e, subsequentemente, a dissolução do gel e difusão do fármaco [20]. Os resultados de dissolução mostram os FCs e a RVC diminuíram a taxa de dissolução após 12h de experimento. A RVC, por exemplo, reduziu para 1/2 a taxa de dissolução do PL. Os FCs reduziram para ~1/3 a taxa de dissolução, quando se compara com a do PL. A adição de FCs em PL são conhecidos por diminuir a taxa de dissolução dos polímeros aos quais são incorporados [23]. Interações intermoleculares de aditivos com PL podem levar a variações de parâmetros termodinâmicos, ocasionando a diminuição da dissolução [24]. Por ser mais solúvel, esperava-se que as formulações com TCP apresentassem maior taxa de dissolução do que as amostras com HAp e HAp-TCP (menos solúveis). Possivelmente TCP libera maior quantidade de Ca^{2+} , estes interagindo com os grupos PO do PL e alterando a hidrofobicidade deste pela maior interação intermolecular entre as cadeias de carbono do PL, diminuindo a taxa de dissolução das formulações.

Os resultados de liberação da RVC mostraram que todas as amostras apresentaram o mesmo perfil de

liberação, mas as taxas são diferentes. PTR e PR mostraram as maiores liberações finais do fármaco, o que está de acordo com os dados de dissolução, uma vez que estas formulações estão entre as que apresentaram as maiores taxas de dissolução. Apesar de a amostra PHR ter apresentado a 2ª. maior taxa de dissolução (a maior foi PL), foi a que apresentou menor liberação acumulada da RVC, o que pode ser atribuído ao fato da RVC estar incorporado na HAp, podendo resultar numa liberação mais lenta da RVC. PHTR apresentou liberação intermediária da RVC, ficando entre as amostras PTR e PHR, o que possivelmente deve-se a cerâmica incorporada nesta amostra (HAp-TCP), a princípio, apresentar taxa de dissolução intermediária entre as cerâmicas estudadas.

A composição química dos FCS influenciou nas propriedades físico-químicas do PL, sobretudo em relação às porcentagens de cálcio na composição química, devido aos mecanismos de interação que este átomo tem com a estrutura dos PL. No geral, a adição dos FCs diminuiu a taxa de dissolução do PL e a taxa de liberação da RVC. As formulações desenvolvidas para este trabalho mostraram-se adequadas para serem utilizadas como sistemas de liberação controlada de fármacos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Federal do ABC (UFABC), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro; CCTM/IPEN (laboratórios de Insumos e Microscopia) e UFABC pela infraestrutura; a doutoranda Alessandra C. S. Akkari (UFABC) pelo auxílio.

Referências

- [1] McLure HA, Rubin AP. Review of local anaesthetic agents. *Minerva Anesthesiol.* 2005; 71: 59-74.
- [2] Bruton LL, Chabner BA, Knollman B. *Bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman.* 12 ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2012.
- [3] Zhai Y, Yang X, Zhao L, Wang Z, Zhai G. Lipid nanocapsules for transdermal delivery of ropivacaine: in vitro and in vivo evaluation. *Intern. J. of Pharm.* 2014; 471: 103-111.
- [4] Jeong B, Kim SW, Bae Y H. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2002; 54: 37-51.
- [5] Ricci, E.J, Lunardi, L.O, Nanclares D.M.A, Marchetti, J.M. "Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels". *Intern. J. of Pharmaceutics.* 288, 235-244, 2005.
- [6] Ruel-Gariépy E, Leroux J-C. In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. *European J. of Pharm. and Biopharm.* 2004; 58: 409-426.
- [7] Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J. Contr. Rel.* 2002; 82: 189-212.
- [8] Weinand C, Pomerantseva I, Neville CM, Gupta R, Weinberg E, Madisch I, Shapiro F, Abukawa H, Troulis MJ, Vacanti JP. Hydrogel- β -TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone.* 2006; 38: 555-563.
- [9] Groot K. Clinical applications of calcium phosphate biomaterials: a review. *Ceram. Intern.* 1993; 19: 363-366.
- [10] Vallet-Regí M, González-Calbet JM. Calcium phosphate as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry.* 2004; 32: 1-31.
- [11] LeGeros RZ. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, in *Monographs in Oral Science*, vol 15, Howard M. Myers (Ed.), Karger, 1991
- [12] Hench LL, Wilson J. *An introduction to bioceramics.* Advanced Series in Ceramics. World Scientific, USA, 1998.
- [13] Marchi J, Dantas ACS, Greil P, Bressiani JC, Bressiani AHA, Müller FA. Influence of Mg-substitution on the physicochemical properties of calcium phosphate powders. *Mater. Res. Bulletin.* 2007; 42: 1040-1050.
- [14] Sharma PK, Reilly MJ, Bhatia SK, Sakhitab N, Archambault JD, Bhatia SR. Effect of pharmaceuticals on thermoreversible gelation of PEO-PPO-PEO copolymers. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2008; 63: 229-235.
- [15] Liu Y, Zhu YY, Wei G, Lu WY. Effect of carrageenan on poloxamer-based in situ gel for vaginal use: Improved in vitro and in vivo sustained-release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009; 37:306-312.
- [16] Kannan S, Ventura JM, Ferreira JMF. Aqueous precipitation method for the formation of Mg- stabilized β -tricalcium phosphate: an x-ray diffraction study. *Ceram. Int.* 2007; 33: 637-641.
- [17] Cacciotti I, Bianco A. High thermally stable Mg-substituted tricalcium phosphate via precipitation. *Ceram. Intern.* 2011; 37: 127-137.
- [18] Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate ceramics. *J. of Materials Sci.: Materials in Medicine.* 2003; 14: 195-200.
- [19] Zhang Y, Lam YM. Poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide)-g-poly(vinyl pyrrolidone): synthesis and characterization. *J. Colloid Interface Sci.* 2005; 285: 80-85.
- [20] Dumortier G, Grossiord JL, Agnelly F, Chaumeil JCA. Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharm. Res.* 2006; 23 (12): 2709-2728.
- [21] Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2006; 9: 339-358.
- [22] Pandit, N.K, Wang, D. "Salt effects on the diffusion and the release rate of propranolol from poloxamers 407 gels". *Intern. J. of Pharm.* 1989; 167: 183-189.
- [23] Lai P-L, Tsai-Yu CL, Hong D-W, Yang, S-R, Chen W-J, Chu M. Development of bioactive thermosensitive polymer-ceramic composite as bone substitute. *Chem. Eng. Sci.* 2013; 89: 133-141.
- [24] Alexandridis P, Hatton TA. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. and Eng. Aspects.* 1995; 96: 1-46.