PAOLO NEANDRO BONA SOARES

**Avaliação *in vitro* do polímero de mamona associado ao carbonato de cálcio
com gentamicina como dispositivo de liberação de antibióticos**

São Paulo

2012

PAOLO NEANDRO BONA SOARES

**Avaliação *in vitro* do polímero de mamona associado ao carbonato de cálcio
com gentamicina como dispositivo de liberação de antibióticos**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós - Graduação em
Clínica Cirúrgica Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e
zootecnia da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. André Luis do Valle De
Zoppa

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

22/11/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2700
FMVZ

Soares Paulo Neandro Bona

Avaliação *in vitro* do polímero de mamona associado ao carbonato de cálcio com gentamicina como dispositivo de liberação de antibióticos / Paulo Neandro Bona Soares. -- 2012.

57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. André Luis do Valle De Zoppa.

1. Mamona. 2. Equinos. 3. Gentamicina. 4. Fratura. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação in vitro da poliuretana de mamona e da quitosana associadas ao fosfato de cálcio como dispositivos de liberação local de antibióticos no tratamento de fraturas de equinos", protocolado sob o nº 2217/2011, utilizando 20 (vinte) pares de ossos terceiro metacarpianos de equinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. André Luís do Valle de Zoppa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/5/2011.

We certify that the Research "In vitro evaluation of castor oil polyurethane and chitosan associated to calcium phosphate as a device to local antibiotic delivery in the treatment of equine fracture", protocol number 2217/2011, utilizing 20 (twenty) pairs of third metacarpal bone of horses, under the responsibility Prof. Dr. André Luís do Valle de Zoppa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/18/2011.

São Paulo, 19 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOARES, Paolo Neandro Bona

Título: Avaliação *in vitro* do polímero de mamona associado ao carbonato de cálcio com gentamicina como dispositivo de liberação de antibióticos

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós - Graduação em
Clínica Cirúrgica Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho à minha mãe, Susete Bona e à minha avó
Neide Chacon, que sempre torceu e sei que de alguma forma
me assiste e guarda, onde estiver.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus em primeiro lugar por possibilitar tantas coisas boas em minha vida e por poder partilhá-las com pessoas maravilhosas que estão sempre ao meu lado.

À minha mãe Susete Bona por tudo que me faz, sempre tão disposta a ajudar nos momentos de desespero, trazendo paz e tranquilidade mesmo partilhando do mesmo sentimento está pronta a ajudar sempre, zelando e cuidando para eu me tornar a pessoa que sou hoje, desculpe-me pelo tempo tolhido, você é o meu exemplo de força e garra. Ao meu pai Vicente Paulo Soares que mesmo distante sempre esteve torcendo e estimulando meu crescimento.

Agradeço ao meu avô Nelson que me apresentou os cavalos, espécie maravilhosa a qual a cada dia tento me aprimorar e melhorar para continuar sendo um instrumento de Deus, trazendo o bem estar e a cura destes que mostram o quanto somos seres diminutos.

Minha tia Susie e tio Antonio que participaram diretamente na minha criação, às minhas primas Perla e Paloma que sempre foram como irmãs, amo todos vocês.

Minha companheira Carolina Bonomo que não canso de dizer que este passo da minha vida só foi dado graças ao seu auxílio, já que desde o início sempre se mostrou disposta a ajudar e tão compreensiva com meus lampejos de mau humor, não se abatendo e me mantendo forte a cada dia, sendo esta mulher maravilhosa (nunca seremos capazes de descrever em palavras o quanto somos importantes e gratos, um para o outro).

Agradeço ao Professor André Luis do Valle De Zoppa pela confiança e oportunidade que foi me dada, de ser seu orientado, e peço desculpas se algum momento não fui capaz de dar o meu melhor.

Ao professor Márcio Augusto Ferreira o qual devo grande parte do profissional que me tornei, pois sempre depositou confiança e me possibilitou grandes oportunidades, espero que possa sempre estar presente para partilharmos estes momentos.

Meus companheiros de residência Bruna Trentinaro Ibiapina, Tiago Marcelo Oliveira e Gustavo Zanotto, que sempre me ajudaram e serviram de espelho de ótimas pessoas, amigos e profissionais.

Muito obrigado aos professores Luis Claudio Lopes Correia da Silva, Stefano Felipe Hagen, Wilson Roberto Fernandes, Raquel Yvonne Baccarin, Carla Bargi Belli que tanta paciência tiveram durante o período de estágio curricular e residência, e por todos os ensinamentos.

Aos companheiros do Hovet USP Gervasio, Cícero, Henrique e Marcos. Aos companheiros do Jockey Club de São Paulo, Aline, Amauri, Antonio Bastos, Brucutu, Danilo Duarte Maciel, Francisco Soares Pereira, Getúlio, Jéssica, Jorge Oliveira Queiroz (OOO Parrrrcero), Jorginho, José Luiz Pinto Moreira Filho, Luis Renato Oselieiro, Nilton Fabio, Oslandes, Paulo Cezar de Carvalho, Pedro Evandro, Rodrigo Romero Mazzeo, Guillermo Guadalupe Laguna Legorreta, obrigado a todos vocês pela paciência e compreensão.

Faltam-me palavras para agradecer ao Dr. João Heckmaier pelas oportunidades que me foram oferecidas tanto para a conclusão deste projeto quanto para minha vida profissional.

Aos companheiros de pós graduação Guilherme Maia Mulder Van der Graaf, Rodrigo Crispim Moreira, Mariana Selim, Fernanda Nóbrega, Luís Fernando Raap, minha eterna gratidão. Joyce Pinheiro Xavier continue sendo esta pessoa dedicada, obrigado pela compreensão e ajuda, você também foi imprescindível para a realização deste.

Às técnicas do laboratório de Patologia Clínica em especial a Clara Satsuki Mori, Claudia Regina Stricgnolo meu eterno agradecimento, e aos professores responsáveis, professor Benesi e professor Wilson por permitirem a utilização do laboratório.

Obrigado aos colegas da Vansil e Poliquil que possibilitaram o desenvolvimento deste projeto doando materiais indispensáveis para o mesmo.

Agradecimento à FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo) pelo investimento nesta pesquisa.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas,
eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de
caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chico Xavier

RESUMO

SOARES, P. N. B. **Avaliação *in vitro* do polímero de mamona associado ao carbonato de cálcio com gentamicina como dispositivo de liberação de antibióticos**. [*In vitro* evaluation of castor polymer associated with calcium carbonate with gentamicin as a device for release of antibiotics]. 2012. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Na medicina equina, procedimentos cirúrgicos ortopédicos, principalmente os que envolvem fixação de fratura, apresentam um grande índice de infecção e mortalidade. Diferentes métodos de liberação local de antibiótico têm sido utilizados com sucesso na profilaxia e tratamento das infecções musculoesqueléticas. O objetivo da presente investigação foi avaliar a capacidade da poliuretana de mamona como dispositivo de liberação local de antibiótico *in vitro* já que não existem relatos deste polímero para tal finalidade, além de analisar o efeito bactericida da gentamicina liberada pelo polímero. Foram confeccionados 40 corpos de prova de polímero de mamona, divididos igualmente em 4 grupos, sendo um grupo controle, este sem adição de sulfato de gentamicina e três grupos com diferentes concentrações de gentamicina (6, 12 e 24 mg/g de polímero), onde avaliou-se a liberação de gentamicina em solução PBS com pH 7,4 através da espectrofotometria colorimétrica com reação da ninhidrina em diferentes dias (01, 02, 07, 14, 21 e 28). A espectrofotometria colorimétrica com reação da ninhidrina não se mostrou o método de análise adequado para avaliar a liberação a partir deste polímero, porém a poliuretana de mamona mostrou-se efetiva como mecanismo de liberação de gentamicina quando avaliada *in vitro* em culturas de *S. aureus*.

Palavras-chave: Mamona. Equinos. Gentamicina. Fratura

ABSTRACT

SOARES, P. N. B. ***In vitro* evaluation of castor polymer associated with calcium carbonate with gentamicin as a device for release of antibiotics.** [Avaliação *in vitro* do polímero de mamona associado ao carbonato de cálcio com gentamicina como dispositivo de liberação de antibióticos]. 2012. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In equine medicine, orthopedic procedures, especially those involving fracture fixation, presented a high rate of infection and mortality. Different methods of local release of antibiotics have been used successfully for prophylaxis and treatment of orthopaedic infections. The objective of this research was to evaluate the ability of castor oil polyurethane as a controlled release local antibiotic *in vitro* since there are no reports of this polymer for this purpose and the bactericidal effect of gentamicin released. Were prepared 40 samples of castor oil polymer, divided equally into four groups, one control group, without this addition of gentamicin sulfate and three groups with different concentrations of gentamicin (6, 12 and 24 mg / g of polymer) that was evaluated the release of gentamycin in PBS at pH 7.4 by spectrophotometry colorimetric reaction with ninhydrin in different days (01, 02, 07, 14, 21 and 28). The spectrophotometry colorimetric reaction with ninhydrin did not prove to be an appropriate method of analysis for assessing the release from this polymer, but the castor oil polyurethane proved to be an effective as a mechanism for release of gentamicin when evaluated *in vitro* in cultures of *S. aureus*

Keywords: castor oil. Gentamicin. Equine. Fracture.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos valores médios (mcg) de gentamicina liberada por cada grupo (Controle, 6, 12 e 24mg) ao longo do tempo (Dia).....	39
Tabela 2 – Descrição dos valores médios (mcg) de gentamicina liberada por cada Grupo (6, 12 e 24mg) ao longo do tempo (Dia), extraindo as médias do grupo controle cada dia.....	39
Tabela 3 – Resultados de ANOVA dos efeitos fixos para os Modelos 3 e 4.....	42
Tabela 4 - Comparações dos modelos estatísticos.....	44
Tabela 5 – Estimativas pontuais e intervalares dos parâmetros do Modelo 4.....	45
Tabela 6 – Avaliação da concentração inibitória mínima de cada amostra durante o tempo, onde (+) refere-se a não efetividade da (CIM).....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Representação gráfica dos valores médios (mcg) verificados de gentamicina liberada em cada grupo ao longo do tempo (Dia).....	40
Gráfico 2 - Perfil das unidades amostrais por dia.....	41
Gráfico 3 - Resíduos padronizados por valores ajustados para o Modelo 3.....	43
Gráfico 4 - Resíduos padronizados por valores ajustados para o Modelo 4.....	43
Gráfico 5. Médias (micrograma) e intervalos de confiança de 95% estimados pelo Modelo 4.....	46
Gráfico 6 - Normalidade efeitos aleatórios (microgramas)por grupo para o Modelo 4, representando tendência linear entre os pontos.....	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Imagem representativa dos moldes utilizados durante o preparo dos corpos de prova (preenchimento do molde de teflon).....32
- Figura 2 - Molde de teflon fechado sob pressão após preenchimento com o polímero de mamona.....33
- Figura 3 - Corpos de prova imersos em solução PBS.....34
- Figura 4 - Tubos Falcon com corpos de prova imersos em solução PBS em estufa com temperatura controlada.....35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Descrição do Sistema de Cierny – Mader para classificação de osteomielite.....	20
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC – Carbonato de cálcio

g- grama

mg – miligrama

ml – mililitros

PMMA - Polimetilmetacrilato

PMMAIA – Polimetilmetacrilato impregnado com antibióticos

u.a.- unidade amostral

nm - nanometro

mcg – Micrograma

IV - Intravenoso

SC – Subcutâneo

IM – Intramuscular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Osteomielite.....	19
2.1.1 Etiologia / Patogenia.....	21
2.2 Seleção do agente antibiótico.....	22
2.2.1 Aminoglicosídeos.....	23
2.2.1.1 <i>Gentamicina</i>	24
2.3 Antibioticoprofilaxia X Antibioticoterapia.....	25
2.4 Biopolímeros / polímero de mamona.....	27
2.5 Colares impregnados com antibióticos.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Materiais.....	31
3.2 Métodos.....	31
3.2.1 Corpos de Prova.....	31
3.2.2 Teste de eluição.....	33
3.2.3 Espectrofotometria Colorimétrica.....	35
3.2.4 Teste da atividade antimicrobiana.....	36
4 RESULTADOS	38
4.1 Polímero de mamona.....	38
4.2 Liberação do antibiótico.....	38
4.3 Atividade antimicrobiana.....	47
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Na medicina equina, os procedimentos cirúrgicos ortopédicos, principalmente os que envolvem fixação de fratura, apresentam um grande índice de infecção e mortalidade. Diferentes métodos de liberação local de antibiótico têm sido utilizados com sucesso na profilaxia e tratamento das infecções musculoesqueléticas (MCILWRAITH, 2006).

O objetivo do tratamento de infecções ortopédicas em equinos é a erradicação da carga bacteriana, remoção de material estranho, eliminação dos mediadores inflamatórios e dos radicais livres, produzir alívio da dor e reestabelecimento do ambiente normal para promover reparação tecidual (LUGO, 2009). A terapia antimicrobiana deve atingir concentrações acima da concentração inibitória mínima (CIM) em tecidos infectados sem induzir efeitos tóxicos, o que pode ser obtido através da administração sistêmica e local de agentes antibióticos (LUGO, 2009).

As infecções ortopédicas podem ser classificadas da seguinte forma: aquelas em que os ossos estão envolvidos (osteíte ou osteomielite) ou as que envolvem estruturas sinoviais (articulações, bainhas tendíneas, e bursas) (BAXTER, 1996).

Em geral estas infecções podem também ser divididas em três grupos de acordo com a origem da infecção, sendo, as infecções por via hematógena (mais comum em potros), traumática (decorrentes de eventos catastróficos - acidentes) e iatrogênica (causadas após procedimentos clínicos/cirúrgicos) (BAXTER, 1996).

As infecções são sem dúvida, as complicações que causam maior impacto negativo no tratamento de fraturas, e o tratamento das infecções ortopédicas normalmente pode ser frustrante na medicina equina (RICHARDSON, 2008). Quando a terapia é bem sucedida, estão envolvidos fatores como alto custo e sequelas que resultam em alterações morfofuncionais ao paciente (RICHARDSON, 2008).

A escolha da via de administração e tempo da terapia é muito importante nos casos de traumas musculoesqueléticos na espécie equina, principalmente nos casos onde o trauma provoca lesão e exposição do tecido ósseo e/ou articular (ZOPPA, 2012).

O tratamento de infecções ortopédicas na medicina equina evoluiu significativamente durante a última década, por, principalmente, produzir melhor difusão dos agentes antibacterianos no local da lesão, por meio de novos sistemas de administração e liberação local de antibióticos (RICHARDSON, 2008). Estes sistemas têm como vantagens a exposição dos patógenos à altas concentrações do fármaco, diminuição dos efeitos adversos ligados à administração sistêmica, além de representarem uma forma de distribuição elevada de agentes antimicrobianos economicamente viável (RICHARDSON, 2008) .

A procura por novos sistemas de liberação controlada de fármacos tem sido muito relevante para se estabelecer alternativas mais eficientes, que possibilitem administrar agentes antimicrobianos com maior segurança por períodos controlados, atingindo níveis elevados no local desejado, com efeitos colaterais minimizados (GINEBRA; TRAYKOVA; PLANELL, 2006).

Métodos utilizados para fornecer concentrações elevadas de agentes antimicrobianos no local para terapia ou profilaxia das infecções sinoviais e ósseas incluem perfusão regional quando nos membros locomotores, além do polimetilmetacrilato (PMMA) ou dos polímeros biodegradáveis impregnados com antibióticos implantados no local da lesão ou em regiões adjacentes. Estes métodos podem ser utilizados para tratar infecções sinoviais, porém, eles tem se mostrado mais eficientes no tratamento ou prevenção da osteomielite associada com fraturas expostas ou na utilização implantes ósseos em cavalos (BAXTER, 1996).

O PMMA tem sido utilizado por anos e continua sendo uma ótima opção para assegurar e oferecer elevados níveis de antibiótico no foco desejado, além de ser uma alternativa muito estudada e ter sua biocompatibilidade conhecida juntamente com o perfil de eluição de diversos fármacos já traçado, além de facilidade de preparo e esterilização (RICHARDSON, 2008).

A gentamicina é um dos mais comuns antibióticos e pode ser incorporado a diferentes tipos de cimentos ósseos acrílicos por apresentar um amplo espectro de ação e ser termo estável, resistente à altas temperaturas, processo que ocorre na cura de diferentes polímeros (HILL et al., 1997). A gentamicina em pó é comercialmente disponível no Brasil a um baixo custo, e a sua forma de adição ao PMMA no momento do uso pode ser uma forma de reduzir custos e facilitar o acesso a este método terapêutico (AZI et al., 2008).

Este estudo teve como objetivo analisar *in vitro* as características da eluição da gentamicina adicionada ao polímero derivado da mamona junto com o carbonato de cálcio através da espectrofotometria colorimétrica com reação da ninhidrina em diferentes concentrações, ou seja, avaliar se a poliuretana funciona como mecanismo de liberação de antibióticos. Além de se avaliar as propriedades bactericidas do antibiótico liberado pelo polímero em culturas de *S. aureus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Osteomielite

Osteomielite é a definição para a infecção no tecido ósseo. A origem da palavra é *osteon* (osso) e *myelo* (medula), em combinação com o termo *ite* (inflamação) para definir o estado clínico quando o osso é infectado por microorganismos. (LAZZARINI; MADER; CALHOUN, 2004).

Nos últimos 30 anos, a patogênese da doença foi quase esclarecida, e muitos fatores que explicam a persistência das infecções foram identificados. Um grande número de agentes antimicrobianos, com diferentes espectros de ação contra patógenos e diferentes farmacocinéticas e farmacodinâmicas, tem sido utilizados para tratar esta afecção (LAZZARINI; MADER; CALHOUN, 2004).

Os termos osteíte e osteomielite são usados para descrever a inflamação no tecido ósseo, mais especificamente no periósteo, canais de Volkmann, conjuntos harvesianos e por contiguidade o canal medular. Mais precisamente osteíte é a infecção do tecido ósseo que não atinge a região medular ou a placa de crescimento, por outro lado, a osteomielite é definida como a infecção que atinge a região medular ou a placa de crescimento (ORSINI, 1990). A osteomielite é reconhecida na medicina equina por produzir alta morbidade e mortalidade, ocorrendo principalmente após feridas perfurante ou lacerações, fraturas expostas ou subsequente à procedimentos cirúrgicos ortopédicos, principalmente àqueles que envolvem a fixação de fraturas, (casos de fixação interna em resultado a fraturas expostas ou após a fixação interna de fraturas fechadas) (MOORE et al., 1992).

Vários sistemas de classificação para osteomielite estão descritos por diferentes autores. A osteomielite pode ser classificada de acordo com o tempo de duração da doença, em aguda ou crônica, e de acordo com a origem da infecção. Um método utilizado na medicina humana é o sistema conhecido como Cierny - Mader (Quadro 1), inclui quatro estágios anatômicos: Estágio 1, ou medular, onde a infecção esta

limitada ao canal medular do osso (ex. infecção via hematógena); Estágio 2 ou superficial, onde o sítio de infecção é a cortical óssea e esta comumente originada pela inoculação direta ou proveniente de um foco por contiguidade; Estágio 3, ou localizado, quando a osteomielite envolve ambas regiões, ou seja, cortical e medular do osso, porém neste estágio o osso se mantém estável, pois o processo infeccioso não envolve o diâmetro total do osso; Estágio 4, ou difuso, neste estágio a espessura completa do osso esta envolvida, com perda de estabilidade. Com este sistema o paciente com osteomielite é classificado em hospedeiro A, B, ou C, onde o hospedeiro A não está comprometido por nenhum fator sistêmico ou local ou qualquer outro fator que o comprometa; o hospedeiro B foi comprometido por um fator; e o hospedeiro C esta severamente comprometido e o tratamento radical é necessário com um risco-benefício inaceitável. Embora a definição para hospedeiro C pareça muito subjetiva, esta classificação parece ser muito valorosa e tem sido utilizada na prática clínica e em muitos estudos com antibióticos e tratamentos cirúrgicos (LAZZARINI; MADER; CALHOUN, 2004).

Quadro 1 – Descrição do Sistema de Cierny – Mader para classificação de osteomielite

Classificação	Descrição
Tipo Anatômico	
Estágio 1	Osteomielite Medular
Estágio 2	Osteomielite Superficial
Estágio 3	Osteomielite Localizada
Estágio 4	Osteomielite Difusa
Classe fisiológica	
Hospedeiro A	
Hospedeiro B	
Bs	Comprometimento Sistêmico
Bl	Comprometimento Local
Bls	Comp. Sistêmico e Local
Hospedeiro C	Tratamento pior do que a doença

Fonte: LAZZARINI, L; MADER, T. M.; CALHOUN, J. H. (2004)

2.1.1 Etiologia / Patogenia

Com maior frequência as infecções originam-se de ferimentos penetrantes ou fraturas expostas, mas também podem ter origem hematógena. Traumatismos e o uso de materiais de implantes ortopédicos aumentam a probabilidade de infecção óssea (WOODARD, 2000).

Stafilococos e *Streptococos* são as bactérias aeróbicas mais frequentemente causadoras de infecção hematógena; entretanto, microorganismos menos patogênicos com *E.Coli* ou *Fusobacterium necrophorum* podem ser oportunistas, causando osteomielite aguda. A *Salmonella* ssp. é comumente isolada em potros. A osteomielite de origem hematógena é observada com mais frequência em animais jovens (WOODARD, 2000).

Múltiplos organismos usualmente são isolados do osso infectado com resultado de inoculação direta ou por foco de infecção contíguo. O *Staphylococcus aureus* se mantém como o patógeno mais comumente isolado. Bacilos gram-negativos e organismos anaeróbicos são, da mesma forma, frequentemente isolado (LAZZARINI; MADER; CALHOUN, 2004).

Certas bactérias, como o *S.aureus* e *P.aeruginosa*, contém proteínas de superfície ligadoras da fibronectina, com capacidade de interagir com o colágeno, ou podem conter sítios ligantes que se fixam a sialoproteína óssea. A aderência estimula os organismos a exsudar um glicocálice, que se torna progressivamente mais denso. Essa biopelícula sepulta o microorganismo, funcionando como barreira contra antibióticos e mecanismos de defesa do hospedeiro. As toxinas bacterianas e a isquemia levam à necrose óssea, podendo coalescer formando uma zona avascularizada, permitindo um maior crescimento bacteriano (WOODARD, 2000).

Os resultados obtidos por Snyder; Pascoe e Hirsh (1987) indicam que, embora os estafilococos sejam isolados a partir de casos ortopédicos nos equinos, os organismos mais comuns são membros da família *Enterobacteriaceae*, e seguidos de perto por organismos estreptococais, semelhante ao que foi observado

por Schneider et al. (1992), a predileção por organismos gram-negativos foi referida ao ambiente em que estes animais habitam, particularmente por contaminação do solo por fezes.

Já Scheneider et al. (1992) em um estudo retrospectivo também mostraram que o grupo mais comum isolado foi da família *Enterobacteriaceae*, seguidos do grupo de *Streptococcus* não beta-hemolítico, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Streptococcus* beta-hemolítico e *Staphylococcus* coagulase negativa.

2.2 Seleção do agente antibacteriano

A sobrevivência bacteriana num hospedeiro depende de sua virulência, imunocompetência do hospedeiro e fatores que podem diminuir a eficácia das defesas do hospedeiro, ou fatores que favoreçam o crescimento bacteriano (presença de coágulos sanguíneos, tecido necrótico, bolsas de fluido ou material estranho). Para que a terapia antimicrobiana seja bem sucedida, medidas que favoreçam e melhorem as defesas do hospedeiro devem ser tomadas, como por exemplo a redução da concentração bacteriana. Quando as defesas do hospedeiro estiverem comprometidas diretamente ou por fatores trazidos pelo ferimento, o tratamento cirúrgico associado a drenagem, debridamento e retirada de corpos estranhos, favorecem o restabelecimento tecidual da região acometida (MOORE et al., 1992; FOSSUM, 2007).

A seleção do agente antimicrobiano é uma decisão importante no tratamento de equinos com infecção musculoesquelética. Inicialmente a terapia antibacteriana é instituída antes dos resultados dos exames de cultura e antibiograma, portanto, o conhecimento das bactérias mais comumente associadas com a infecção equina musculoesqueléticas e seus prováveis padrões de suscetibilidade é necessário para selecionar o antibiótico que terá melhor atuação sobre o tecido contaminado (MOORE et al., 1992).

Muitos fatores afetam a seleção do agente antimicrobiano, incluindo custo, facilidade de administração, a via de infecção e a local da infecção (MOORE et al., 1992).

O antibiótico ideal para ser incorporado no PMMA tende a ser bactericida, ter amplo espectro de atividade, ser efetivo em baixas concentrações, ser altamente hidrossolúvel, com eluição rápida e sustentada, possuir baixa toxicidade tecidual e causando poucas reações alérgicas; ter apresentação em pó, termo estável às temperaturas até 100°C, em casos de se utilizar ferramentas que atinjam altas temperaturas de polimerização como o PMMA; provoque alterações mecânicas mínimas e forneça baixos níveis séricos e altas concentrações locais, ou seja, adjacente ao osso, tecidos moles e feridas (POPHAM et al., 1991).

Os antibióticos foram classificados como altamente eficaz, eficaz e ineficaz apenas para fins de comparação e para fornecer algumas diretrizes gerais para a seleção. Este esquema de classificação baseia-se nos dados *in vitro* de susceptibilidade ao invés de resolução clínica de infecção (MOORE et al., 1992).

A terapia antibacteriana pode ser profilática ou terapêutica. Antibioticoprofilaxia só deve ser usada quando indicado pela natureza da infecção ou quando de uma infecção catastrófica, a seleção de antibióticos profiláticos deverão basear-se na flora bacteriana comum do tecido alvo (FOSSUM, 2007). Esta deve ser considerada como uma conduta onde o antibiótico escolhido não deve ser administrado por mais de 24- 72 horas pós procedimento cirúrgico (ZOPPA, 2012).

2.2.1 Aminoglicosídeos

Todo aminoglicosídeo é um antibiótico bactericida com ação concentração dependente, com baixa capacidade de penetração nos fagócitos (DOWLING, 2010).

Os aminoglicosídeos também interrompem a síntese de proteínas, mas se ligam de forma irreversível aos ribossomos bacterianos. Eles são efetivos contra

bactérias gram-negativas e gram-positivas, incluindo *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*, e tem efeito sinérgico com antibióticos beta-lactâmicos. Os anaeróbios são resistentes aos aminoglicosídeos, porque lhes falta receptor necessário para o transporte para a célula bacteriana. Aminoglicosídeos são polares e portanto lípidios insolúveis, o que significa que têm distribuição limitada nos fluidos extracelulares e cerebroespinal. No entanto, para a distribuição de fluidos da cavidade pleural, óssea, articulações e peritoneal é bom. Nenhum dos aminoglicosídeos são bem absorvidos por via oral. Eles são dependentes da concentração, em vez de dependente do tempo, o que significa que podem ser administrados em doses maiores com intervalos maiores, de forma que mantenha sua eficácia, reduzindo a toxicidade renal (FOSSUM, 2007).

2.2.1.1 Gentamicina

O sulfato de gentamicina é uma mistura de três agentes antibacterianos obtidos da cultura de *Micromonospora purpurea*. Com preparações para uso parenteral ou tópico, não pode ser utilizada na forma oral pois sua absorção pelo trato gastrointestinal é muito baixa, no entanto possui espectro de ação semelhante aos outros aminoglicosídeos (DOWLING, 2010).

A gentamicina é um dos aminoglicosídeos mais efetivos, sendo em sua maior parte contra bastonetes anaeróbicos gram-negativos, incluindo várias cepas de *P.aurigenosa*, algumas bactérias Gram-positivas e contra *Mycoplasma* spp. Em geral, é mais efetiva contra estreptococos quando comparada à amicacina. Não possui nenhuma ação contra bactérias anaeróbicas ou bactérias aeróbicas em condições de anaerobiose (DOWLING, 2010).

Frequentemente administrada por via, IV, SC, IM, por injeção intra-articular e pela infusão intravenosa ou intraóssea (DOWLING, 2010).

Sua utilização é possível com esferas de PMMA impregnadas no tratamento de infecções ósseas e articulares, uma vez que resultam em liberação lenta de

gentamicina no local da infecção e, desse modo, evitam efeitos colaterais (DOWLING, 2010).

Seldes et al. (2005) relataram a adição de 480 mg de gentamicina líquida, no entanto, promoveu um efeito prejudicial sobre as propriedades biomecânicas do cimento ósseo. A maior parte de gentamicina foi liberada de forma rápida nas amostras, dentro das primeiras 24 horas, sendo esta liberação efetiva e mantendo a atividade bactericida.

A difusão de gentamicina a partir de cimentos ósseos acrílicos foi testada *in vitro* por Hill et al. (1977), onde a atividade da mesma inibiu organismos gram positivos e gram negativos por 22 e 11 dias respectivamente. Sugerindo que esta destruição de organismos nos tecidos seria mais efetiva pela via tópica quando comparada à via sistêmica, no mesmo experimento os autores relataram que a gentamicina apresentou maior efeito bactericida e por um período mais prolongado.

2.3 Antibioticoprofilaxia X Antibioticoterapia

O debridamento cirúrgico continua a sendo o método mais efetivo de controle da infecção ortopédica, porém muitas modalidades farmacológicas têm sido desenvolvidas para erradicar a contaminação bacteriana das fraturas expostas, para juntamente potencializar o efeito de controle bacteriano sobre o foco de fratura. Estas modalidades incluem profilaxia antimicrobiana pré operatória, irrigação intra operatória com soluções antimicrobianas, cimento ósseo e PMMA impregnado com antibióticos (PMMAIA) (HENRY et al., 1991).

A perfusão regional endovenosa, intraóssea e o PMMAIA, são exemplos de ferramentas utilizadas para produzir difusão local destes fármacos (RICHARDSON, 2008).

Cavalos que desenvolvem uma infecção após reparo cirúrgico da fratura geralmente apresentam crescimento bacteriano misto identificado em culturas realizadas da ferida, exsudato e de tecidos mais profundos (SNYDER, 1987).

O tempo prolongado de procedimento cirúrgico, a presença de implantes ortopédicos, a formação de seroma, os danos relacionados aos tecidos moles e a fixação interna aumentam o risco de infecção após o reparo da fratura. Uma vez que a infecção ocorre, torna-se difícil atingir o sucesso na cura e tratamento com os implantes presentemente disponíveis no cavalo, e combinações de antibióticos de amplo espectro são recomendadas. O uso profilático de agentes antimicrobianos para os procedimentos ortopédicos é frequentemente diferente da recomendada para rotina de procedimentos eletivos (SCHNEIDER et al., 1992).

O uso profilático de antibióticos em pacientes cirúrgicos resultou em maior cuidado com a assepsia cirúrgica promovendo, por outro lado também, desenvolvimento de resistência bacteriana. Esta resistência bacteriana se deve principalmente à procedimentos cirúrgicos extensos, hospitalização prolongada, uso inadequado de antibióticos, aumento da sobrevida de pacientes geriátricos e uso de fármacos imunossupressores (FOSSUM, 2007).

A seleção do antibiótico como medida terapêutica deve ser baseada nos resultados de cultura e antibiograma (susceptibilidade), porém na maioria das vezes isto não é possível, e a terapia é baseada na flora que se espera que esteja presente, seguida de mudança, quando necessário, baseado na resposta clínica ou após cultura e sensibilidade do agente (FOSSUM, 2007). A escolha inadequada, além de inefetividade do antibiótico, pode ocasionar alta morbidade ou mortalidade por intoxicação ou resistência bacteriana (FOSSUM, 2007).

O uso sistêmico de gentamicina e a associação de sulfonamida + trimetopim comumente são utilizados no tratamento de equinos com infecções musculoesqueléticas (MOORE et al.,1992). Em estudo apresentado por Moore et al. (1992), ambas foram intermediárias na sua eficácia contra as bactérias em geral,e ainda a gentamicina foi altamente eficaz contra *Actinobacillus* além de se apresentar bastante eficaz contra uma vasta gama de bactérias (70-80% de enterobactérias,

Staphylococcus e isolados de *Pseudomonas*). Em combinação com a penicilina G, a gentamicina é um antibiótico eficaz e pode ser útil; para a profilaxia de processos de rotina cirúrgicos ortopédicos de rotina.

O uso parenteral de antibióticos para infecções ósseas agudas, infecções de tecidos moles, e osteomielites tende a resultar em altas concentrações séricas do agente associando complicações alérgicas, nefrotoxicidade e ototoxicidade. Por outro lado, a liberação local de antibiótico na ferida, a partir de cimentos ósseos impregnados de antibióticos ou PMMAIA tem se mostrado eficaz, não produzindo efeitos adversos ou resultando em concentrações sistêmicas de significado clínico (HENRY et al., 1991).

2.4 Biopolímeros / polímero de mamona

Biopolímeros são polímeros para uso biológico, que têm sido intensamente estudados nas últimas décadas. Os mais conhecidos e extensivamente empregados são, dentre outros, o PMMA, o polietileno e as borrachas de silicone, que permitiram o desenvolvimento de uma larga variedade de implantes ou peças para uso em diferentes procedimentos cirúrgicos (IGNÁCIO et al., 1997).

Um novo polímero derivado do óleo de mamona, extraído das sementes de mamona (*Ricinus communis*, da classe Dicotiledôneas, da Ordem das Geraneá, Família Euforbiáceas), foi desenvolvido. O óleo de mamona é na realidade um poliéster, formado por três moléculas do ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-oléico, ou C1803), cada uma com um grupo hidroxila no carbono 12, propício para polimerização por meio de ligações uretana. Os grupos hidroxila do ácido ricinoléico reagem com os grupos isocianato (HNCO) do pré-polímero difenilmetandiisocianato (DPMDC) para formar poliuretanas, cujas propriedades químicas e físicas incluem fácil processabilidade, flexibilidade de formulação, baixa temperatura de polimerização, ausência de emissão de gases tóxicos e versatilidade de resistência estrutural, além do baixo custo, vantagens estas que induziram ao estudo de sua aplicabilidade médica (IGNÁCIO et al., 1997).

Um material biocompatível não deve interar-se negativamente com os sistemas de defesa do hospedeiro, não apresentando toxicidade ou causando qualquer reação inflamatória nos tecidos vizinhos; não produzir hemólise ou destruição das células sanguíneas e não liberar radicais nocivos que possam afetar outros órgãos (IGNÁCIO et al., 1997).

A poliuretana derivada do óleo de mamona apresenta uma fórmula molecular que tem mostrado certa compatibilidade com os tecidos vivos, apresentando aspectos físico químicos favoráveis, descritos anteriormente (IGNÁCIO et al., 1997). Este material pode ser preparado com diferentes consistências, com a facilidade de simplesmente variar os componentes no momento do preparo. Por exemplo, o material pode ser preparado tanto com consistência elástica, (característica semelhante à da borracha de silicone), ou rígida como cimento acrílico.

No experimento conduzido por Ignácio et al. (1997) o carbonato de cálcio (CC) foi adicionado aos componentes no preparo do polímero para conferir porosidade e tornar o implante visível ao raio X (IGNÁCIO et al., 1997). Neste mesmo experimento não foram observados sinais que indicariam rejeição do hospedeiro como por exemplo a presença de reações granulomatosas ou sinais de reabsorção, ao mesmo passo que neoformação óssea nos poros também não foi observada.

Fujiu; Ogino (1984) referiram a função carbonato de cálcio em uso em associação com o polímero, que seria a de fornecer íons cálcio, o que facilitaria a troca iônica na interface osso-resina, com incremento do mecanismo de deposição de cálcio na matriz colágena nas várias fases do processo de reparação óssea facilitando a ligação polímero osso .

Ohara et al., (1995) estudaram a biocompatibilidade da poliuretana implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos, onde observou-se a ausência de infecção, reações inflamatórias e alterações em órgãos como rins, fígado e baço, porém foi observada reação fibrosa ao redor do implante, do tipo pseudo-encistamento sem características de formação granulomatosa.

CHERICE (1994) apud In IGNÁCIO (1999), constatou que a poliuretana de mamona pode ser utilizada na forma pura ou em associação com o carbonato de cálcio, apresentando uma reação exotérmica pequena (42-45 C) e, em contato com o meio líquido, há aumento de volume por reação primária com a água.

As poliuretanas constituem produtos alternativos viáveis de polióis e pré-polímeros, sintetizados a partir de moléculas derivadas de ácidos graxos vegetais, apresentando as seguintes vantagens (IGNÁCIO, 1999):

- processabilidade: resultam de operações simples e com produtos facilmente encontrados em derivados de óleos vegetais e derivados petroquímicos;
- flexibilidade de formulação: capacidade de combinação com outros tipos de resinas;
- versatilidade de temperatura de cura e controle de pico exotérmico na transição líquido gel: a ligação uretana pode ser submetida à cura em temperatura ambiente ou com elevação da temperatura;
- processo de endurecimento ser acelerado por catalisadores tipo aminas ou organometálicos de estanho, mercúrio, cobre ou cromo;
- excelentes propriedades estruturais: ligações químicas características de isocianatos com polióis;
- ausência de emissão de vapores irritantes ou tóxicos: a cura é não poluente

2.5 Colares impregnados com antibióticos

O uso do PMMAIA no sítio de infecções promove a liberação de em altas concentrações locais de antibióticos e em humanos passou a ser usado e estudado a partir dos anos 70 por Buchholz e Engelbrecht promovendo uma liberação local controlada, para tratamento ou prevenção da infecção (ELSON et al., 1977)

O conceito do uso do PMMAIA é baseado no princípio de determinado antibiótico ser liberado a partir do cimento ao longo do tempo, atingindo concentração antibacteriana ao longo do tempo (WEISMAN; OLMSTEAD; KOWLASKI, 2000).

O PMMA tem sido utilizado por anos e continua sendo uma ótima opção para assegurar e oferecer elevados níveis de antibiótico no foco desejado, além de ser bem estudado e ter sua biocompatibilidade conhecida juntamente com o perfil de eluição de diversas drogas já traçado, apresenta fácil preparo e esterilização (RICHARDSON, 2008).

As pérolas de cimento impregnados com antibióticos, são fabricadas sobre um fio de aço cirúrgico, e elas têm características de eluição bimodal. Assim, fornecem concentrações de antibióticos no local desejado, que ultrapassam as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para patógenos comumente isolados em infecções ortopédicas. O uso destes métodos se mostra eficaz no controle da osteomielite crônica e infecções musculoesqueléticas agudas. Em comparação com a terapia antibiótica sistêmica, a incidência de reações nefrotóxicas, ototóxicas, e hipersensibilidade é significativamente menor (HENRY et al., 1991).

Os colares liberam 5% do antibiótico nas primeiras 24 horas. E podem manter a liberação diminuindo progressivamente até apresentar níveis não detectáveis após semanas ou meses (HENRY et al, 1991).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Para confecção dos corpos de prova foram utilizados pré polímero, poliol e carbonato de cálcio da Poliquil®.

Utilizou-se sulfato de gentamicina 64% Lote 091215549 cedida gentilmente pela Vansil®, no preparo dos corpos de prova com antibiótico. As soluções PBS pH 7.4, e o preparo do reagente ninhidrina 1.25%, utilizadas nas análises espectrofotométricas foram preparadas de acordo com o método descrito por Frutos et al. (2000). A ninhidrina reagente utilizada foi a ACS, 1,2,3 – Indantrione 2-2 – Dihydroxy – 1,3 – indanedione, adquirida junto a Sigma – Aldrich®.

Para avaliação espectrofotométrica utilizou-se um Espectrofotometro Digital CELM ® 225 D, o qual se mostrou compatível para realização do procedimentos.

3.2 Métodos

3.2.1 Corpos de Prova

Foram confeccionados 40 corpos de prova cilíndricos com 12mm de altura e 6mm de diâmetro, divididos em 4 grupos, a saber: Grupo controle, 6mg, 12mg e 24mg de gentamicina por grama de material. Para a confecção do corpo de prova foi desenvolvido um molde em teflon com as dimensões descritas anteriormente o que possibilitou a padronização dos corpos de prova. Estes eram compostos por um pré-polímero derivado de isocianato, um poliol poliéster derivado do óleo de mamona e carbonato de cálcio, onde a relação de mistura foi de 1:0,65 de pré-polímero : poliol e 50% do peso total da mistura de carbonato de cálcio para o grupo controle. Nos grupos com antibiótico foram adicionadas concentrações diferentes de sulfato de gentamicina (6mg, 12mg e 24mg de gentamicina por grama de material).

O preparo dos corpos de prova foi realizado em temperatura ambiente após pesagem de cada composto, polímero, pré-polímero, o carbonato de cálcio e a gentamicina (nos grupos em que era adicionada). Estes foram misturados manualmente até formar uma mistura homogênea por aproximadamente 10 minutos, após esta etapa, a mistura foi aplicada através de seringas no molde (Figura 1), tendo o excedente retirado com auxílio de uma espátula. O molde então foi fechado sob pressão (Figura 2) e levado à estufa com temperatura controlada (37° C) por 3 horas para cura do material.

Figura 1 – Imagem representativa dos moldes utilizados durante o preparo dos corpos de prova (preenchimento do molde de teflon)

Fonte: SOARES, P. N. B. (2012)

Figura 2 – Molde de teflon fechado sob pressão após preenchimento com polímero de mamona

Fonte: SOARES, P. N. B. (2012)

3.2.2 Teste de eluição

Os dez corpos de prova de cada grupo foram pesados, medidos, separados e numerados de #01 a #10 , e então acondicionados individualmente e autoclavados. Após o processo de esterilização, os corpos de prova foram distribuídos em tubos Falcon estéreis de 15 ml e imersos em 10 ml de solução salina tamponada com fosfato - PBS (pH 7,4) (Figura 3). O experimento foi conduzido em estufa com temperatura controlada (37 °C) (Figura 4), protegido da luz e a cada 24 horas foram realizadas as trocas das soluções de cada tubo, armazenando as dos dias 01, 02, 07, 14, 21 e 28 a -22°C para serem avaliadas posteriormente através do método de

espectrofotometria colorimétrica pela reação da ninhidrina, sendo cada amostra avaliada em duplicata.

Todos os corpos de prova foram medidos e pesados para determinação da quantidade total de gentamicina em cada um, antes de serem imersos na solução PBS.

Figura 3 – Corpos de prova imersos em solução PBS

Fonte: SOARES, P. N. B. (2012)

Figura 4 – Tubos Falcon com corpos de prova imersos em solução PBS em estufa com temperatura controlada

Fonte: SOARES, P. N. B. (2012)

3.2.3 Espectrofotometria colorimétrica:

Um procedimento colorimétrico foi descrito por Fruttos et al., 2000 para a quantificação de gentamicina. O método baseava-se na reação da ninhidrina com aminas primárias e secundárias presentes na gentamicina, reação esta que produz uma coloração púrpura. Os efeitos de vários fatores como pH, concentração e tempo de reação da ninhidrina foram investigados no referido estudo, para otimizar a método de ensaio. Utilizando o método descrito, a absorbância das soluções de gentamicina no comprimento de onda de 400nm tinham uma relação linear com a concentração de gentamicina variando de 30 a 120mcg/ml. O ensaio colorimétrico da gentamicina relatado é de valor prático pois é reprodutível, sensível, simples extremamente barato.

Foram preparados soluções padrão com diferentes concentrações de gentamicina (30, 60, 90 e 120mcg) para avaliar a linearidade e validação do teste. Alíquotas de 2,5ml de cada amostras foram pipetadas e colocadas em tubos de ensaio devidamente identificados e separados em duplicatas. Após este procedimento, 0,75µl de ninhidrina a 1,25% foi misturado às amostras e colocadas em banho quente a 95°C por 15 minutos e degelo rápido logo após. A avaliação espectrofotométrica foi realizada com comprimento de onda de 400nm, método descrito por Fruttos et al. (2000). Foram obtidos valores de absorbância que foram transformados em valores de concentração de gentamicina através da Lei de Beer e Lambert, também descrita por Fruttos et al. (2000).

3.2.4 Teste da atividade antimicrobiana

Foi retirada uma alíquota de 0,2ml em duplicata, coletadas dos tubos dos corpos #09 e #10 de cada grupo descrito anteriormente.

Os testes quantitativos foram baseados na determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) segundo os parâmetros CLSI (2009). A cepa *S.aureus* ATCC 25922, cultivada em caldo Miller Hilton foi dosada em 10^8 ufc/ml – 0,5Mcfarland através da espectrofotometria, sendo confirmadas pela microdiluição do caldo 1:10, feita oito vezes, todas as diluições tiveram 100µl cultivados em placas de petri com Agar Miller Hilton para contagem de colônias. Após contagem para confirmação da turbidez do caldo Miller Hilton, diluindo sua concentração para 10^7 ufc/ml.

Em placas de Elisa, foram adicionadas 50µl de caldo Miller Hilton em cada poço a ser utilizado. Em seguida, as soluções de PBS divididas nos grupos de acordo com suas concentrações iniciais de gentamicina - Controle (sem gentamicina), 6, 12 e 24mg tiveram 50µl adicionados aos mesmos poços. Então 5µl do inóculo foi adicionado e a mistura homogeneizada. A amostra foi mantida a 37°C durante 24 horas.

A análise da turbidez em cada poço indica os resultados positivos, sendo que os poços negativos têm concentração maior que a CIM, e foram diluídos para quantificação das bactérias e análise da Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Os negativos sofreram microdiluições de 1:10 seriadas, adicionando 50µl do conteúdo do poço a um eppendorf com 450µl de caldo Miller Hilton, assim sucessivamente. A seguir 100µl de cada microtubo foram colocadas em placas com Ágar Manitol e mantidos em estufa a 37°C durante 24 horas. As placas tiveram as unidades formadoras de colônia contadas para identificar a CBM.

4. RESULTADOS

4.1 Polímero de mamona

Os materiais utilizados (pré polímero, poliol, carbonato de cálcio, gentamicina), tanto para confecção como para a análise (ninhidrina), mostram-se eficazes para os objetivos propostos, visto que todos os corpos confeccionados se apresentaram dentro do mesmo padrão de consistência, como era previsto, ou seja, nenhum corpo de prova dissolveu-se na solução padrão utilizada para a avaliação de liberação da gentamicina, todos mantiveram suas características morfológicas durante todo o período de experimentação (avaliação macroscópica).

4.2 Liberação do antibiótico

Os grupos descritos a seguir são Controle, 6mg, 12mg, 24mg, e cada conjunto corpo de prova/ solução PBS será denominado unidade amostral (u.a.).

Para avaliar a quantidade liberada de gentamicina de cada grupo, cada unidade amostral foi avaliada no primeiro e segundo dias e depois a cada semana (7, 14, 21 e 28 dias). Em cada dia a unidade amostral (u.a.) foi medida em duplicata, assim, cada u.a. totalizou 12 medições.

Foram avaliadas 40 u.a. divididas igualmente nos quatro grupos. A tabela 1 apresenta média e desvio-padrão observados por *grupo* e *dia*. Para a análise descritiva dos dados e testes básicos, utilizou os métodos recomendados por Magalhães e Lima (2000).

Tabela 1 - Descrição dos valores médios (mcg) de gentamicina liberada por cada grupo (Controle, 6, 12, 24mg) ao longo do tempo (Dia)

Dia	Controle		6mg		12mg		24mg	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
1	3,47	1,43	4,61	1,54	6,89	2,05	9,08	1,63
2	4,96	1,44	7,21	2,84	8,05	3,46	8,29	3,19
7	6,92	2,51	7,31	0,89	7,80	1,13	8,01	0,86
14	8,46	0,51	8,65	0,83	9,24	0,42	9,31	0,47
21	8,08	0,92	8,62	1,09	9,50	0,68	10,18	0,59
28	6,24	0,41	6,92	1,30	7,49	1,09	7,50	1,43

Verificou-se que o reagente selecionado, a ninhidrina, apresentou interação com aminas presentes no polímero, não somente com as aminas presentes na gentamicina, assim, para retirar matematicamente o efeito destas outras aminas sobre o grupo analisado, optou-se por trabalhar com a diferença de cada observação para a média do *grupo Controle* em seu respectivo dia. Essa nova medida criada, foi utilizada como variável resposta, imaginando que assim mede-se apenas o efeito do fármaco, denomina-se *Diferença* e a tabela 2 e o gráfico 1 apresentam suas médias e desvios entre os grupos.

Tabela 2 - Descrição dos valores médios (mcg) de gentamicina liberada por cada grupo ao longo do tempo (Dia), extraído as médias do grupo controle de cada dia

Dia	6mg		12mg		24mg	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
1	1,14	1,54	3,42	2,05	5,61	1,63
2	2,25	2,84	3,10	3,46	3,33	3,19
7	0,39	0,89	0,88	1,13	1,09	0,86
14	0,19	0,83	0,78	0,42	0,85	0,47
21	0,54	1,09	1,42	0,68	2,10	0,59
28	0,68	1,30	1,26	1,09	1,26	1,43

Gráfico 1. Representação gráfica dos valores médios (microgramas) verificados de gentamicina liberada em cada grupo ao longo do tempo (Dia)

Deve-se destacar da tabela 1 e do gráfico 1, acima, o comportamento errático da *Diferença* no segundo dia. Os desvios padrão em todos os grupos são mais elevados no segundo dia, fato também percebido no gráfico 2, que apresenta a distribuição de cada u.a. ao longo do tempo por grupo. A identificação da variável é de 1 a 10 para cada *grupo*. Note que para esse fim, utilizamos apenas 30 u.a. já que o *grupo Controle* foi utilizado como padrão para que as diferenças fossem calculadas.

Esta peculiaridade da variação foi responsável pela complicação dos ajustes dos modelos que seguem. Foram avaliados 4 modelos onde o que se mostrou mais adequado foi o modelo 4. A variável *Diferença* foi ajustada segundo modelos lineares mistos (aleatórios e fixos) seguindo propostas do livro Pinheiro e Bates (2000). Alguns valores verificados apresentaram-se negativos, e para a análise estatística estes valores foram mantidos (e não excluídos ou considerados nulos, como poderiam ser considerados, já que não existe liberação negativa) pois esses efeitos negativos foram úteis para estimar a erro de medida.

Gráfico 2 - Perfil das unidades amostrais por dia, mostrando que o padrão não é linear

Do gráfico 2, tem-se a impressão que não há diferença entre a variação do erro de medida (no mesma u.a. e dia) ao longo do tempo ou por grupo. E podemos assumir também que o efeito da *Diferença* segundo o tempo não é linear. É aparentemente quadrático.

O primeiro modelo ajustado foi um modelo simples, que foi um modelo de regressão linear sem correlação, acreditando-se que cada grupo fosse independente e que tinham efeito quadrático com interação dos grupos, ou seja, que cada grupo apresentava seu efeito quadrático, porém este modelo foi ajustado com um erro muito grande, normalidade e variância apresentavam-se sem distribuição normal. Esse modelo não leva em consideração a correlação entre os dados e verificou-se que as suposições de variância constante entre os grupos e dias, e normalidade dos resíduos não se sustentavam. Porém, pode confirmar a suposição do efeito de interação do *grupo* com os *dias* e do efeito quadrático no tempo.

Então se ajustou um segundo modelo, dessa vez inserindo um efeito aleatório no intercepto para cada unidade amostral. Esse efeito significa que a despeito do efeito do *grupo* no início do experimento, existe um erro de medida relativo à u.a.

Esse modelo ainda leva em consideração que a variância é constante ao longo dos dias, com este modelo foi possível corrigir a normalidade, mas a variância não foi possível.

Assim partiu-se para um modelo com a estrutura de variância e covariância. Definiu-se que a variância seria diferente para cada tempo observado e que as medidas numa mesma u.a. estariam correlacionadas ao longo do tempo de forma autorregressiva, isto é, a correlação entre os tempos é maior quanto mais perto eles estiverem. As correlações do tempo 1 e 28, por exemplo são mais fracas do que as do tempo 1 com o tempo 2.

Porém, esse modelo não convergiu. Os parâmetros estimados não apresentaram estimativas consistentes e portanto tivemos que separar o modelo em 2 e testar qual se adequava melhor aos dados. O Modelo 3 leva em consideração apenas que a correlação entre as observações e o Modelo 4 apenas a variância, assumindo que os dados ao longo do tempo sejam não correlacionados. A tabela 3 apresenta a Análise de Variância para os efeitos fixos dos dois modelos. Em ambos mantemos os efeitos fixos de interação entre *grupo* e *dia*.

Tabela 3 – Resultados de ANOVA dos efeitos fixos para os Modelos 3 e 4

Fator	Modelo 3		Modelo 4	
	valor F	valor p	valor F	valor p
Intercepto	102,6642	<,0001	78,11874	<,0001
Dia	26,55038	<,0001	3,08547	0,0799
Dia²	30,44689	<,0001	91,10557	<,0001
Grupo	7,57253	0,0025	7,76024	0,0022
Dia:Grupo	3,04138	0,0491	0,7875	0,4559
Dia ² :Grupo	0,95068	0,3876	5,40466	0,0049

Os gráficos 3 e 4 apresentam os resíduos padronizados dos Modelos 3 e 4 pelos valores ajustados. Note que no Modelo 3 o problema da variância se mantém, já o Modelo 4 corrige esse desvio. A perda desse modelo, porém, é a correlação

entre as u.a. que de certa forma está sendo levada em consideração pelo efeito aleatório do *intercepto*.

Gráfico 3 - Resíduos padronizados por valores ajustados para o Modelo 3

Gráfico 4 - Resíduos padronizados por valores ajustados para o Modelo 4

Uma última comparação entre os modelos é feita através da ANOVA e de critérios de Akaike (AIC) e BIC, como mostramos na tabela 4.

Tabela 4 - Comparações dos modelos estatísticos

Modelo	graus de liberdade	AIC	BIC	logLik	Test	Razão de verossimilhança	valor p
2	11	1466,9	1509,4	722,5	-		
3	12	1384,8	1431,1	680,4	2 vs 3	84,2	<,0001
4	16	1313,2	1375,0	640,6	3 vs 4	79,5	<,0001

O número de graus de liberdade refere-se ao número de parâmetros ajustados, que são levados em consideração nos critérios de ajuste. Os testes da razão de verossimilhança indicam que há uma melhora do ajuste dos Modelo 3 em relação ao 2, e do 4 em relação ao 3.

A tabela 5 apresenta as estimativas dos parâmetros do Modelo 4. Estão apresentados na tabela os desvios padrão estimados para o efeito aleatório e entre os grupos, as estimativas dos coeficientes fixos e as ponderações do erro padrão dos resíduos por dia.

O grupo referência para o efeito fixo é o *grupo 6mg*, o que significa que podemos interpretar os coeficientes do grupo como incremento da média inicial para cada grupo observado. E o intercepto é a estimativa da média da *Diferença* para o *grupo 6mg* no dia 1. Para o dia 2, multiplicou-se o incremento dos coeficientes dos grupos, e assim por diante nos dias subsequentes.

Os parâmetros quadráticos e lineares do *Dia* para o *grupo 12mg* não foram significativos, o que indica que esses grupos possuem diferença significativa no início do estudo (valor p para Grupo 12 mg = 0,02), mas não possuem efeitos diferentes ao longo do tempo. Os grupos 6 mg e 12 mg, apresentam comportamento semelhante (o incremento de um grupo para o outro não foi significativo), o que não acontece quando comparados os grupos 6 mg e 24 mg, sendo que este último apresenta um efeito quadrático mais acentuado.

Após o dia 7 todos os grupos apresentam diminuição de pelo menos 50% da variância observada no primeiro dia, tendo que a variância maior é proporcional ao valor da média, é esperado que ela diminua ao longo do tempo (Tabela 4).

No dia 2 houve uma variância acentuada, o que poderia superestimar a média, porem na modelagem dos grupos verificou-se que o efeito foi muito pequeno o que demonstra que na verdade no dia 2 a dispersão é maior em torno da média estimada, podendo-se afirmar que a variância é maior no dia referido.

Estimou-se que os desvios segundo os “erros de medida” foram maiores do que os erros aleatórios inerentes à u.a. (2,14 contra 0,46).

Tabela 5 - Estimativas pontuais e intervalares dos parâmetros do Modelo 4

Efeitos fixos	Estimado	Intervalo de conf. (95%)		valor p
		Inf	Sup	
Intercepto	1,38	0,57	2,19	0,00
Dia	-0,15	-0,24	-0,06	0,00
Dia ²	0,0047	0,0019	0,0075	0,00
Grupo (12 mg)	1,46	0,27	2,66	0,02
Grupo (24 mg)	2,69	1,50	3,88	0,00
Dia:Grupo (12 mg)	-0,10	-0,23	0,03	0,13
Dia:Grupo (24 mg)	-0,23	-0,36	-0,10	0,00
Dia²:Grupo (12 mg)	0,0029	-0,0011	0,0068	0,15
Dia ² :Grupo (24 mg)	0,0066	0,0026	0,0106	0,00
Efeito aleatório	Estimado	Intervalo de conf. (95%)		
		Inf	Sup	
Desvio padrão	0,46	0,32	0,65	
Erro padrão (<i>within</i>)	Estimado	Intervalo de conf. (95%)		
		Inf	Sup	
σ^2	2,14	1,69	2,71	
Coeficientes multiplicadores da variância por <i>Dia</i>	Estimado	Intervalo de conf. (95%)		
		Inf	Sup	
2	1,44	1,08	1,93	
7	0,57	0,40	0,81	
14	0,18	0,12	0,26	
21	0,43	0,30	0,63	
28	0,63	0,44	0,91	

Através da análise do modelo 4 pode-se interpretar os efeitos dos *grupos* ao longo do tempo segundo as estimativas das médias com seus respectivos intervalos de confiança de 95%, como apresentados no gráfico 5.

Enfim, pode-se inferir que há uma diminuição significativa nos primeiros dias para os *grupos* 12mg e 24mg, que tendem a se anular a médio prazo e o *grupo* 24mg volta a apresentar valores mais altos em média nos últimos dias de experimento.

O gráfico 5 mostra o padrão de eluição da gentamicina com concentrações mais altas obtidas no dia 1, seguido de uma queda constante e abrupta do dia 2 ao dia 7. Ocorreu então uma diminuição lenta do dia 7 para o dia 14, e um discreto aumento da concentração após o dia 21, este aumento mais acentuado no grupo 24 mg.

Gráfico 5. Médias e intervalos de confiança de 95% estimados pelo Modelo 4

No gráfico 6 observa-se a normalidade do efeito aleatório, onde espera-se que para o grupo haja uma tendência linear entre os pontos.

Gráfico 6. Normalidade dos efeitos aleatórios por grupo para o Modelo 4, representando uma tendência linear entre os pontos

4.3. Atividade antimicrobiana

O teste de CIM mostrou-se efetivo, com crescimento bacteriano positivo na análise referente as amostras do grupo Controle. O grupo 6mg inibiu o crescimento nos dias 1 e 2 somente; o grupo 12mg inibiu o crescimento nos dias 1, 2 e 7; e no grupo 24mg não ocorreu crescimento bacteriano nos dias 1, 2, 7, e 14 (Tabela 6). Nos momentos em que CIM se apresentou resultados negativos, não ocorreram resultados positivos para CBM.

De acordo com a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), a concentração para a CIM em culturas de *S.aureus* ATCC25923 em ágar Miller Hilton, varia de 0,12 a 1mcg.

Tabela 6 – Avaliação da concentração inibitória mínima de cada amostra durante o tempo, onde (+) refere-se a não efetividade da (CIM)

	<i>Dia 1</i>		<i>Dia 2</i>		<i>Dia 7</i>		<i>Dia 14</i>		<i>Dia 21</i>		<i>Dia 28</i>		<i>Controle Positivo</i>	
Amostras	#9	#10	#9	#10	#9	#10	#9	#10	#9	#10	#9	#10	#9	#10
Branco	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
06mg	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12mg	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
24mg	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

5 DISCUSSÃO

A busca por ferramentas de liberação local de antibióticos para o tratamento de infecções ortopédicas se faz necessária, pois estas infecções representam grande parte das causas de insucesso durante o período de tratamento do paciente ortopédico.

Na maioria das vezes, as infecções musculoesqueléticas principalmente àquelas acompanhadas de um déficit vascular importante, sabidamente tem seu tratamento dificultado, já que mesmo sem grandes problemas vasculares a concentração de agentes antimicrobianos é baixa no local da lesão, através da administração sistêmica destes agentes. Este problema pode ser corrigido com a utilização dos mecanismos de liberação local de antibióticos, que podem promover concentrações 20 vezes maior do que a atingida através da terapia antimicrobiana sistêmica, e reduz drasticamente os efeitos adversos.

De acordo com os resultados apresentados, a poliuretana de mamona apresenta características favoráveis para seu uso como agente de liberação de antibiótico. O polímero derivado do óleo de mamona, ou óleo de rícino, extraído de suas sementes, apresenta propriedades químicas e físicas que incluem fácil processabilidade, flexibilidade de formulação, baixa temperatura de polimerização, ausência de emissão de gases tóxicos e versatilidade de resistência estrutural, além de baixo custo, vantagens que induziram ao estudo de sua aplicabilidade como material para implantação em tecidos vivos, particularmente o osso, uma vez testada sua biocompatibilidade (IGNÁCIO et al, 1997).

O PMMA, há muito utilizado como cimento para fixação de próteses e outros implantes ósseos, pode produzir calor excessivo e liberar gases tóxicos no momento da cura, além de poder produzir necrose tissular e fenômenos tromboembólicos (IGNÁCIO et al, 1997), estas desvantagens não foram relacionadas na literatura atual a poliuretana de mamona.

A avaliação da liberação de gentamicina por meio da espectrofotometria colorimétrica com reação da ninhidrina não foi específica para aminas presentes na

gentamicina, o que não foi totalmente favorável ao analisar a liberação do referido antibiótico no presente experimento, pelo o fato de o reagente possivelmente interagir com aminas inespecíficas presentes no polímero (pré-polímero, poliol, carbonato de cálcio), não foi possível quantificar a liberação exata através deste método, sendo necessárias correções matemáticas, para estimar se houve ou não liberação de gentamicina durante o período de avaliação.

Para os experimentos com material biológico não fracionado, a falta de especificidade do método colorimétrico com reação da ninhidrina, apresenta a desvantagem de este reagente não ser específico para diferentes grupos de aminoácidos (MOORE, 1948), comprovando as observações anteriores, já que o polímero de mamona se trata de um composto de origem biológica, e assim, podemos afirmar que as aminas presentes no polímero interagiram com o reagente.

Outro fato que também comprova esta observação é que o grupo Controle apresentou reação com a ninhidrina durante a análise espectrofotométrica (os valores de absorbância não foram zero). Além disso, a avaliação em culturas de *S. Aureus* do grupo Controle não inibiu o crescimento bacteriano em nenhum dia, ao contrário do observado nos outros grupos.

O ensaio colorimétrico com gentamicina relatado é de valor prático, pois é reproduzível, sensível, simples extremamente barato (FRUTTOS et al., 2000), porém deve ser levado em consideração durante a escolha do método que não existam aminas sendo liberadas pelo material escolhido como veículo de liberação.

De acordo com a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), a concentração para a CIM em culturas de *S. Aureus* ATCC25923 em ágar Miller Hilton, varia de 0,12 a 1mcg, portanto nos dias em que a CIM controlou o crescimento bacteriano o valor liberado encontrava-se dentro destes valores.

A gentamicina foi o antibiótico escolhido pois apresenta características adequadas descritas por Popham et al. (1991), como amplo espectro de ação, altamente hidro solúvel, efetivo em baixas concentrações, apresentação na forma de sulfato e não interfere bruscamente na qualidade do cimento ósseo, ser bactericida,

causar poucos efeitos adversos nos tecidos adjacentes ao local de implantação e estabilidade térmica (temperaturas acima de 100°C) este último sem muita interferência já que o polímero derivado da mamona não atinge altas temperaturas em seu processo de cura.

O fato de a gentamicina possuir apresentação em forma de pó foi facilitador para sua escolha, pelo fato de a poliuretana de mamona não permitir nenhum componente líquido no momento do preparo. Esta característica foi descrita por CHERICE (1994) *apud* In (IGNÁCIO, 1999), a poliuretana de mamona quando em contato com o meio líquido, apresenta aumento de volume por reação primária com a água.

O mecanismo pelo qual os antibióticos são liberados a partir das matrizes poliméricas ainda não são bem conhecidos (TORRADO et al., 2001). Muitos fatores afetam diretamente a liberação de antibióticos, como por exemplo o tipo e a porosidade do cimento, área e superfície que o polímero abrange, o volume de fluido ao redor do polímero e as propriedades de difusão de cada antibiótico (HENRY et al., 1991). Acredita-se que o antibiótico difunda-se através do cimento (ELSON et al., 1977).

No presente experimento os corpos de prova apresentavam porosidade reduzida, superfície regular, imersos em grande volume de fluido, características estas que podem interferir de maneira positiva ou negativa na eluição do antibiótico *in vitro*. Testes *in vivo* são necessários para avaliar o comportamento da poliuretana de mamona associada ao carbonato de cálcio e a gentamicina.

A quantidade de antibiótico colocada no cimento ósseo é diretamente proporcional a quantidade que será eluída (liberada), portanto a concentração máxima de antibiótico deve ser alcançada para promover altos níveis locais de antibiótico, porém ultrapassando a quantidade máxima (não conhecida) pode afetar a qualidade do cimento ósseo, e ainda prolongar ou inibir a cura do material, atualmente é indicado adicionar ao cimento ósseo 5% de antibiótico do peso total (GOODRICH; NIXON, 2004). Não foi necessário acrescentar as concentrações máximas de antibiótico para promover a liberação de altos níveis do fármaco.

A média da quantidade utilizada de antibiótico foi de $1,8 \pm 0,5$ % do peso total de cimento ósseo, respeitando o valor de referência descrito por Goodrich e Nixon (2004), esta proporção utilizada, ainda que abaixo do valor de 5 %, mostrou-se efetiva nos testes *in vitro* nas culturas de *S. aureus*, além de não ter alterado as características macroscópicas do cimento ou tempo de cura do material.

Estatisticamente observou-se que as ponderações da variância foram significativamente maiores para o dia 2. Indicando que algo a mais acontece nesse início que não está sendo medido ou controlado pelo experimento, podendo até mesmo ter ocorrido alguma falha que provocou uma elevação considerável para algumas u.a. e quedas consideráveis para outras, e esses efeitos não estão limitados à dose do fármaco, visto que todos os grupos apresentaram este mesmo padrão no dia 2. Estas amostras que apresentaram discrepância de valores foram submetidas a novo teste espectrofotométrico, porém após nova análise os erros se repetiram.

Alguns valores verificados apresentaram-se negativos, e para a análise estatística estes valores foram mantidos (e não excluídos ou considerados nulos), pois esses efeitos negativos foram úteis para estimar a erro de medida. Por outro lado, não existe liberação negativa de uma substância, e caso estes valores fossem considerados igual a zero, as médias seriam subestimadas. Os valores negativos podem ser parcialmente explicados pelo método empregado para correção dos valores de gentamicina liberada desconsiderando-se o controle. Podendo o método ter superestimado a quantidade de amins nos grupos que continham gentamicina.

Como observamos anteriormente no Gráfico 5, o padrão de eluição da gentamicina pela poliuretana de mamona não foi bimodal, já que concentrações mais altas obtidas no dia 1, foram seguidas de uma queda constante e abrupta do dia 2 ao dia 7. Ocorreu então uma diminuição lenta do dia 7 para o dia 14, e um discreto aumento da concentração após o dia 14, este aumento mais acentuado no grupo 24 mg do dia 21 ao 28.

Houve uma diminuição significativa na liberação de gentamicina nos primeiros dias para todos *grupos* (Gráfico 5), porém os grupos 6 e 12mg com relação aos parâmetro quadráticos não apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo, e o grupo 24mg apresentou um efeito quadrático mais acentuado, a médio prazo voltou a apresentar valores mais altos nos últimos dias de experimento. Ou seja, a liberação aparentemente apresenta incremento a partir do dia 21. Este padrão quadrático poderia ser considerado linear caso o experimento tivesse seu término no dia 14, já que o aumento não seria observado.

O aumento observado a partir do dia 21 não pode ser referenciado somente á gentamicina, pois mesmo com o aumento abrupto observado no dia 28 para o grupo 24mg (Tabela 5 e Gráfico 5) que ultrapassa os valores médios dos dias 14 e 21 , não se observa a mesma resposta quando comparamos estes dados com a CIM (Tabela 6), onde verificou-se que não houve inibição do crescimento bacteriano, este não podendo estar relacionado com o desenvolvimento de resistência bacteriana, pois a metodologia utilizava novas colônias de bactéria a cada teste.

A duração da liberação do antibiótico pode variar dependendo da sensibilidade do método escolhido. Com a falta de métodos padronizados há certa dificuldade de se comparar a duração de liberação de determinado agente antibacteriano, já que um mesmo fármaco pode apresentar variação no seu comportamento aplicando-se diferentes métodos, outro fator que dificulta a padronização é a utilização de mecanismos de liberação de diferentes materiais, com tratamentos diferentes (esterilização por exemplo), este fator observado por Weisman; Olmstead e Kowalski (2000), onde o cimento ósseo com cefalotina esterilizada apresentou características de eluição diferentes da do grupo com cefalotina não esterilizada, estas características não foram avaliadas no presente experimento, sendo necessário realizar tal comparação em projetos futuros.

6 CONCLUSÃO

- A Poliuretana de mamona associada ao carbonato de cálcio, apresentou-se como método efetivo de liberação de gentamicina *in vitro*, porém testes mais precisos *in vitro* e *in vivo*, que possibilitem quantificar a liberação deste aminoglicosídeo a partir deste biopolímero, devem ser considerados;
- A espectrofotometria colorimétrica com reação da ninhidrina não se mostrou o método mais adequado para avaliar e quantificar a liberação de gentamicina a partir da poliuretana de mamona associada ao carbonato de cálcio;
- A utilização da proporção de 24mg de gentamicina por grama de material mostrou-se mais efetiva ao longo do tempo, com efeito bactericida satisfatório sobre culturas de *S. aureus*;

REFERÊNCIAS

- AZI, M. L.; JUNIOR, M. K.; MARTINEZ, R.; PACCOLA, C. A. J. Cimento ósseo com Gentamicina no tratamento da infecção óssea. Estudo da eluição *in vitro*. **ACTA Ortopédica Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 31–34, 2010.
- BAXTER, G. M. Instrumentation and techniques for treating orthopaedic infections in horses. **Veterinary Clinics of North America, Equine Practice**, v. 12, n. 2, p. 303-335, 1996.
- DOWLING, P. M. Aminoglicosídeos. In: GIGUÈRE, S.; PRESSCOT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P. M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**, Ed. Rocca, 2010, p. 213–236.
- ELSON, R. A.; JEPHCOTT, A. E.; MCGECHIE, D. B.; VERETTAS, D. Antibiotic-Loaded Acrylic Cement. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 59-B, n. 2, p.200-205, 1977.
- FOSSUM, W. T.; DUPREY, P. L.; O'CONNOR, D. Surgical infections and Antibiotic. In: **Small Animal Surgery**. 3ed. St. Louis, Saunders Elsevier, 2007 c.10, p.79-89.
- FRUTOS, P.; TORRADO, S.; LORENZO, M.E.P.; FRUTOS, G. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 1149 – 1159, 2000.
- FUJIIU, T.; OGINO, M. Difference of bond bonding behavior among surface active glasses and sintered apatite. **Journal Biological Material Research**, v. 18, n. 7, p. 845-59, 1984.
- GINEBRA, M. P.; TRAYKOVA, T.; PLANELL, J. A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. **Journal of Controlled Release**. v. 113, p.102–110, 2006.
- GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. Treatment options for osteomyelitis. **Equine Veterinary Education**, v. 16, n. 5, p. 267 – 280, 2004.
- HENRY, S. J.; SELINGSON, D.; MANGINO, P.; POPHAM, G. J. Antibiotic-impregnated beads, Part I: Bead implantation versus systemic therapy. **Orthopaedic Review**, v. 20, n. 3, p. 242-247, 1991.
- HILL, J.; KLENERMAN, L.; TRUSTEY, S.; BLOWERS, H. R. Diffusion of Antibiotics From Acrylic Bone-Cement *in vitro*. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 59-B, n. 2, p. 197-199, 1977.
- IGNÁCIO, H. **Avaliação da poliuretana da ammona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea. Estudo experimental em cães**. 1999. 75 f. Tese (Doutorado em Ortopedia Traumatologia e Reabilitação) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1999.

IGNÁCIO, H.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; CHIERICE, G. O. Utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 37, n. 4, 2002.

IGNÁCIO, H.; MAZZER, N.; BARBIERI, H.; CHIERICE, G. Uso da poliuretana derivada de óleo de mamona para preencher defeitos ósseos diafisários segmentares do rádio. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 32, n. 1, 1997.

LAZZARINI, L.; MADER, T. M.; CALHOUN, J. H. Osteomyelitis in long bones. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 86, n. 10, p. 2305-2318, 2004.

LUGO, J. Regional Limb perfusion with Antimicrobials. In: **Current Therapy in Equine Medicine**. 6ed. St. Louis, Saunders Elsevier, 2009. c.117, p.529-531.

MCILWRAITH, C. W. **Advanced techniques in the diagnosis of bone disease**. Fort Collins, Colorado, Colorado State University, 2006. p. 373-381

MOORE, R. M.; SCHNEIDER, R. K.; KOWALSKI, J.; BRAMLAGE, L. R.; MEKLENBURG, L. M.; KOHN, C. W. Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from 233 horses with musculoskeletal infection during 1979-1989. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, n. 6, p. 450-456, 1992.

MOORE, S.; STEIN, W. H. A modified Ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 211, n. 2, p.907-913, 1954.

MOORE, S.; STEIN, W. H. Photometric Ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 176, n. 1, p. 367-388, 1948.

NANDI, S. K.; MUKHERJEE, P.; ROY, S.; KUNDU, B.; DE, D. K.; BASU, D. Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis – A review. **Materials Science and Engineering C**, c. 29, p. 2478-2485, 2009.

OHARA, G. H. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.3, n.2, p.62-68, 1995.

ORSINI, J. A. Diagnosis and treatment of bone infections. In: WHITE, N. A.; MOORE, J. N. **Current Practice of Equine Surgery**, J. B. Lippincott Company Philadelphia, 1990, p. 682-686.

PINHEIRO, J. C.; BATES, D. M. **Mixed-Effects Models in S and S-PLUS**. U.S.A. Springer, 2000. p.528

POPHAM, G. J.; MANGINO, P.; SELINGSON, D.; HENRY, S. L. Antibiotic impregnated beads, Part II: factors in antibiotic selection. **Orthopedic Review**, v. 20, n. 4, p.331-337, 1991.

RICHARDSON, D. W. Complications of orthopaedic surgery in horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 24, n. 3, p. 591–610, 2008.

SCHNEIDER, R. K.; BRAMLAGE, L. R.; MOORE, R. M.; MECKLENBURG, L. M.; KOHN, C. W.; GABEL, A. A. A retrospective study of 192 horses affected with septic arthritis/tenosynovitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, n. 6, p. 436-442, 1992.

SELDES, R. M.; WINIARSKY, R.; JORDAN, L. C.; BALDINI, T.; BRAUSE, B.; ZODDA, F.; SULCO, T. P. Liquid gentamicin in bone cement: a laboratory study of a potentially more cost-effective cement spacer. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 87-A, n. 2, p. 268-272, 2005.

SNYDER, J. R.; PASCOE, J. R.; HIRSH, D. C. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from equine orthopedic patients. **Veterinary Surgery**, v. 16, n. 3, p. 197-201, 1987.

TORRADO, S.; FRUTOS, P.; FRUTOS, G. Gentamicin bone cements: characterisation and release (*in vitro* and *in vivo* assays). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 217, p. 57 – 69, 2001.

WEISMAN, D. L.; OLMSTEAD, M. L.; KOWALSKI, J. J. In vitro evaluation of antibiotic elution from polymethylmethacrylate (PMMA) and mechanical assesment of antibiotic – PMMA composites. **Veterinary Surgery**, v. 29, p. 245–251, 2000.

WOODARD, J. C. Sistema esquelético (infecções do osso). In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**, 6ª ed, Ed. Manole, 2000, p. 944–945.

ZOPPA, A. L. V. Seleção e terapia com antimicrobianos em equinos com trauma musculoesquelético. Local: AOVET, 2012. p. 87-89. Apostila