MARIA RAQUEL BELLOMO AGRELLO RUIVO

Análise *in vitro* da liberação de antimicrobianos em compósitos de hidroxiapatita, quitosana e nanotubo de carbono como dispositivo de liberação de fármacos

São Paulo

2020

MARIA RAQUEL BELLOMO AGRELLO RUIVO

Análise *in vitro* da liberação de antimicrobianos em compósitos de hidroxiapatita, quitosana e nanotubo de carbono como dispositivo de liberação de fármacos

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 Luís do Valle De Zoppa

De acordo:

Orientador

São Paulo

2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3981
FMVZ

Ruivo, Maria Raquel Bellomo Agrello
Análise *in vitro* da liberação de antimicrobianos em compósitos de hidroxiapatita, quitosana e nanotubo de carbono como dispositivo de liberação de fármacos / Maria Raquel Bellomo Agrello Ruivo. – 2020.
94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

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

1. Osteomielite. 2. Biomateriais. 3. Amicacina. 4. Gentamicina. 5. Ciprofloxacina. I. Título.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 25 de setembro de 2020
CEUAX N [3532220119](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: André Luís Do Valle De Zoppa

Área: Clínica Cirúrgica Veterinária

André Luís Do Valle De Zoppa (orientador)

Título do projeto: "Análise in vitro da liberação de antimicrobianos em compósitos de hidroxiapatita, quitosana e nanotubo de carbono como dispositivo de liberação de fármacos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 001081)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, **ANALISOU** e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 15/setembro/2020) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Peço por favor a troca do título do Projeto, pois o anterior não ficou muito claro. Não houve nenhuma alteração no projeto em si.

Muito obrigada".

Comentários da CEUA: "Alteração de título sem implicações no âmbito desta comissão".

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RUIVO, Maria Raquel Bellomo Agrello

Título: **Análise *in vitro* da liberação de antimicrobianos em compósitos de hidroxiapatita, quitosana e nanotubo de carbono como dispositivo de liberação de fármacos**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a minha mãe Creusa, que sempre foi minha inspiração, meu maior exemplo de força de vontade, dedicação e persistência, me apoiando e me incentivando a cada dia. Aos meus irmãos Fernando, Felipe e Mateus por simplesmente existirem e me ensinarem o significado do amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido eu trilhar esse caminho, sempre me guiando e protegendo.

Ao Prof. Dr. André Luís do Valle De Zoppa, meu orientador, sempre me acolhendo e me instruindo em diversos momentos difíceis, tanto pessoal como profissionalmente. Por ter acreditado em mim e ter me ensinado desde minha residência. Obrigada pela oportunidade.

A Nicole Fidalgo Paretsis e Geissiane Marcondes por sempre estarem disponíveis e me amparando em qualquer dificuldade. Obrigada pela amizade, lealdade e por toda crítica, que com certeza colaborou muito com meu desenvolvimento profissional. Vocês com certeza são minhas inspirações diárias.

A Prof. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis pela produção do meu biomaterial de estudo e por ter cedido o laboratório do Instituto de Química de São Carlos para desenvolvimento do meu experimento.

A Dra. Virgínia Conceição Amaro Martins por também ter me ajudado na execução deste projeto, sendo uma luz diante de momentos tão difíceis. Obrigada por ter me acolhido e não ter medido esforços para que tudo desse certo, sempre com uma palavra de conforto e de carinho.

Aos colegas do grupo de pesquisa do IQSC-USP, que sempre foram muito receptivos e faziam de tudo para tornar o ambiente mais leve.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Romero Corrêa que acreditou em mim desde a graduação acompanhando toda minha trajetória no mundo acadêmico. Obrigada por todo apoio, confiança e por servir como fonte de inspiração.

Ao Prof. Dr. Neimar Vanderlei Roncati a quem sempre me serviu como referência, me aconselhando e fazendo eu enxergar o melhor caminho.

A todos os professores dos Serviços de Clínica Médica de Equinos e Cirurgia de Grandes Animais, da FMVZ-USP, Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, Rodrigo Romero Corrêa, Carla Bargi Belli, Raquel Yvone Arantes Baccarin e ao Dr. Julio David Spagnolo, por de alguma forma terem contribuído positivamente em meu trabalho.

A todos os pós-graduandos da FMVZ-USP, em especial aos pertencente do mesmo grupo de pesquisa, por toda e qualquer ajuda disponibilizada neste período.

Aos meus colegas de profissão Dra. Priscila de Oliveira Azevedo, Roberta Giudice do Valle, Camila Terreran Sandoval, Patrícia Kjeldsen Fantini, Juliana Maria

Ramalho de Freitas e Lucas Alfaia pela amizade, compreensão, companheirismo e por tantos ensinamentos compartilhados. Vocês com certeza me ajudaram muito nessa trajetória.

À minha amiga de pós graduação Laís Lagrotta Garcia por toda sua paciência, lealdade e parceria que fez desse caminho algo muito mais leve a ser percorrido, sempre tendo uma palavra de conforto nos momentos de agonia.

A minha mãe que foi muito mais que meu braço direito nesse longo trajeto, foi minha companheira, parceira e minha grande amiga, sem ela com certeza nada teria dado certo. Obrigada por todas as viagens a São Carlos, por ter me aguentado nos dias mais difíceis, por ter acreditado em mim mais do que eu mesma e por ser absolutamente tudo em minha vida.

Aos meus irmãos, Fernando, Felipe e Mateus que cada um do seu jeito sempre me ampararam e acreditaram em mim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado, processo FAPESP nº 2018/04924-6, para a execução do projeto.

E por fim, porém não menos importante, a todos os animais que mesmo que não tenham sido envolvidos diretamente, são meu motivo de dedicação e satisfação plena em minha profissão. Sem dúvida eles fazem todo e qualquer esforço sempre valer a pena.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”.

Dalai Lama

RESUMO

RUIVO, M. R. B. A. **Análise *in vitro* da liberação de antimicrobianos em compósitos de hidroxiapatita, quitosana e nanotubo de carbono como dispositivo de liberação de fármacos.** 2020. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A dificuldade no controle da osteomielite motiva a busca por alternativas de tratamentos, que sejam eficientes para este tipo de afecção. Dispositivos de liberação de fármacos têm sido uma alternativa nesses casos, por aumentar a atividade do fármaco escolhido, diminuir o intervalo das dosagens e estabelecer altos níveis de concentração no local desejado. Neste trabalho foi incorporado ao compósito à base de quitosana, nanotubos de carbono e hidroxiapatita (QNCHA), o sulfato de amicacina, sulfato de gentamicina e cloridrato de ciprofloxacina. A incorporação de antibiótico foi realizada por dois métodos: durante a confecção das matrizes, nas concentrações 5% e 10% em relação a massa seca, e por imersão em solução concentrada de antibiótico. O objetivo deste trabalho foi estudar a liberação *in vitro* de antibiótico, obtendo esses valores por espectrofotometria UV-visível. Os compósitos foram colocados em solução tampão fosfato salino (PBS) de pH 7.4, e disponibilizadas em Banho Dubnoff. As alíquotas foram coletadas em tempos pré-determinados e o estudo foi realizado em quintuplicata. Os compósitos apesar de apresentarem baixa porosidade foram capazes de atingir taxas relativamente altas de liberação, sendo observado isso principalmente nos grupos impregnados com aminoglicosídeos. A realização do ensaio de intumescimento em PBS foi capaz de mostrar sua boa capacidade de absorção. Este estudo demonstrou valores maiores de liberação nos grupos contendo aminoglicosídeos comparado àqueles impregnados com ciprofloxacina. Compósitos com amicacina apresentaram padrão constante de liberação a partir de seis horas de análise, alcançando valores máximos de liberação estatisticamente iguais ($P=1$). Em relação à gentamicina, o Grupo 5% e imersão têm liberação máxima semelhante com valores estatisticamente iguais ($P=0,82$), e o Grupo 10% em 24 horas de análise foi o que atingiu maior porcentagem de antibiótico liberado, chegando a $90,3 \pm 9,2\%$. Os grupos impregnados com ciprofloxacina comparados aos aminoglicosídeos foram o que obtiveram menor porcentagem de liberação. Para os Grupos 5 e 10% obteve-se valores estatisticamente diferentes

($P=0,017$). Também houve diferença estatística ao comparar Grupo 5% e imersão ($P=0,007$) e Grupo 10% com imersão ($P=0,015$). Os perfis de liberação foram mais adequados aos modelos de Weibull e Korsmeyer-Peppas. Apesar do modelo de Weibull ser empírico e não refletir a cinética de liberação, ele mostrou que os perfis de liberação tendem a ser parabólicos. O estudo de liberação para os aminoglicosídeos mostrou, que o processo que prevalece é a difusão, contudo, para a gentamicina 10% foi observado uma cinética de ordem-zero, ou seja, uma liberação muito rápida e independente do tempo. No caso da ciprofloxacina foi observado um mecanismo quase-fickiano. Concluiu-se que os compósitos apresentaram boa capacidade de liberação e ao levar em consideração a Concentração Inibitória Mínima (CIM), a quantidade de antibiótico liberada em todos os grupos em um período de 24 horas, possui potencial para combater algumas infecções ortopédicas.

Palavras-chave: Osteomielite. Biomateriais. Amicacina. Gentamicina. Ciprofloxacina.

ABSTRACT

RUIVO, M. R. B. A. **In vitro analysis of the release of antimicrobials in hydroxyapatite, chitosan and carbon nanotube composites as a drug delivery device** [Análise in vitro da liberação de antimicrobianos em compósitos de hidroxiapatita, quitosana e nanotubo de carbono como dispositivo de liberação de fármacos]. 2020. 94 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The difficulty in controlling osteomyelitis motivates the search for alternative treatments, which are efficient for this type of condition. Drug delivery devices have been an alternative in these cases, as they increase the activity of the chosen drug, decrease the dosage interval and establish high levels of concentration in the desired location. In this work, chitosan, carbon nanotubes and hydroxyapatite (QNCHA) composites, amikacin sulfate, gentamicin sulfate and ciprofloxacin hydrochloride were incorporated. The incorporation of antibiotics was carried out by two methods: during the preparation of the matrices, in concentrations 5% and 10% in relation to the dry mass, and by immersion in concentrated antibiotic solution. The objective of this work was to study the in vitro antibiotic release, obtaining these values by UV-visible spectrophotometry. The composites were placed in a phosphate buffered saline solution (PBS), pH 7.4, and made available in Dubnoff Bath. The aliquots were collected at predetermined times and the study was carried out in quintuplicate. The composites, despite having low porosity, were able to reach relatively high release rates, being observed mainly in the groups impregnated with aminoglycosides. The PBS swelling test was able to show its good absorption capacity. This study demonstrated higher release values in groups containing aminoglycosides compared to those impregnated with ciprofloxacin. Amikacin composites showed a constant release pattern after six hours of analysis, reaching statistically equal maximum release values ($P = 1$). Regarding gentamicin, Group 5% and immersion have similar maximum release with statistically equal values ($P = 0.82$), and Group 10% in 24 hours of analysis reached the highest percentage of antibiotic released, reaching $90 \pm 9.2\%$. The groups impregnated with ciprofloxacin compared to the aminoglycosides obtained the lowest percentage of release. For Groups 5 and 10%, statistically different values were obtained ($P = 0.017$). There was also a statistical difference when comparing Group 5% and immersion ($P = 0.007$) and Group 10% with immersion ($P = 0.015$). The release profiles were more suitable for the Weibull and Korsmeyer-Peppas

models. Although Weibull's model is empirical and does not reflect release kinetics, he showed that release profiles tend to be parabolic. The release study for aminoglycosides showed that the prevailing process is diffusion, however, for gentamicin 10%, zero-order kinetics was observed, that is, a very fast and time-independent release. In the case of ciprofloxacin, a quasi-Fickian mechanism was observed. It was concluded that the composites showed good release capacity and when considering the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the amount of antibiotic released in all groups in a 24-hour period, had the potential to combat some orthopedic infections.

Keywords: Osteomyelitis. Biomaterials. Amikacin. Gentamycin. Ciprofloxacin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação do DNFB com a gentamicina.....	49
Figura 2 – Fotografia digital do compósito com ciprofloxacina a 5% e 10%, adicionados em célula contendo PBS.....	50
Figura 3 – Fotografia digital das células com sulfato de amicacina a 5% e 10% em quintuplicata, distribuídas em Banho Dubnoff.	51
Figura 4 – Fotografia digital da matriz.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem de incorporação obtida após a imersão das matrizes em solução concentrada de antibiótico.....	54
Tabela 2 – Valores de liberação em $\mu\text{g mL}^{-1}$ para matrizes com sulfato de amicacina	60
Tabela 3 – Tabela comparativa das formas de incorporação, porcentagem incorporada e liberada após 24 horas do sulfato de amicacina, sulfato de gentamicina e cloridrato de ciprofloxacina.....	61
Tabela 4 – Valores de liberação em $\mu\text{g mL}^{-1}$ para matrizes com sulfato de gentamicina	62
Tabela 5 – Valores de liberação $\mu\text{g mL}^{-1}$ para matrizes com cloridrato de ciprofloxacina	64
Tabela 6 – Dados cinéticos da liberação <i>in vitro</i> dos antibióticos da matriz QNCHA.	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva de absorção em PBS dos QNCHA	54
Gráfico 2 – Porcentagem de incorporação obtida após a imersão das matrizes em solução concentrada de antibiótico	55
Gráfico 3 – Curva de calibração para sulfato de amicacina, varredura e leitura em 415nm.....	56
Gráfico 4 – Reta obtida a partir da curva de calibração para sulfato de amicacina. Varredura e leitura em 415nm.....	56
Gráfico 5 – Curva de calibração para sulfato de gentamicina, varredura e leitura em 415nm.....	57
Gráfico 6 – Reta obtida a partir de curva de calibração para sulfato de gentamicina, varredura e leitura em 415nm.....	57
Gráfico 7 – Curva de calibração para cloridrato de ciprofloxacina, varredura e leitura em 271nm.....	58
Gráfico 8 – Reta obtida a partir de curva de calibração para cloridrato de ciprofloxacina, varredura e leitura em 271nm.....	58
Gráfico 9 – Curva de liberação de sulfato de amicacina, nos Grupos 5%, 10% e imersão.....	59
Gráfico 10 – Curva de liberação do sulfato de gentamicina nos Grupos 5%, 10% e imersão.....	61
Gráfico 11 – Curva de liberação de cloridrato de ciprofloxacina nos Grupos 5%, 10% e imersão.....	63

Gráfico 12 - Curva de liberação de cloridrato de ciprofloxacina, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina a 5%.....	65
Gráfico 13 - Curva de liberação de cloridrato de ciprofloxacina, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina a 10%.....	66
Gráfico 14 - Curva de liberação de cloridrato de ciprofloxacina, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina a impregnado por imersão.	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Descrição dos modelos matemáticos utilizados na liberação de fármacos	42
Quadro 2 – Valores para o expoente n com a interpretação dos mecanismos de liberação, para matrizes na forma de cilindro.....	43

LISTA DE ABREVIATURA

AIC - Critério de Informação de Akaike

DNFB - 2,4-dinitrofluorbenzeno

HA – hidroxiapatita

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

NC – nanotubos de carbono

PBS – Tampão Fosfato Salino

QNCHA – Compósito a base de quitosana, nanotubos de carbono e hidroxiapatita

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SQD - Soma dos quadrados dos desvios

TPLO - *Tibial Plateau Leveling Osteotomy* (osteotomia de nivelamento do platô tibial)

TTA - *Tibial Tuberosity advancement* (avanço da tuberosidade tibial)

LISTA DE SÍMBOLOS

h – hora

M_{∞} - quantidade de fármaco máxima para liberação

M_0 – quantidade de fármaco inicial

min – minuto

ml – mililitro

M_t – quantidade de fármaco liberado ao tempo

nm – nanômetro

t – tempo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	BIOMATERIAIS	24
2.1.1	Hidroxiapatita.....	26
2.1.2	Quitosana	27
2.1.3	Nanotubos de Carbono	28
2.2	BIOMATERIAL NA ORTOPEDIA.....	30
2.3	OSTEOMIELITE	30
2.4	SELEÇÃO DO AGENTE ANTIMICROBIANO	33
2.4.1	Aminoglicosídeos	34
2.4.1.1	Sulfato de Amicacina.....	35
2.4.1.2	Sulfato de Gentamicina	36
2.4.2	Quinolonas	36
2.4.2.1	Cloridrato de Ciprofloxacina.....	37
2.5	ASSOCIAÇÃO BIOMATERIAL E ANTIMICROBIANO.....	38
2.6	SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO	38
2.7	ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DO ANTIMICROBIANO	40
2.8	MODELOS DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO	41
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4	MATERIAI E MÉTODOS	46
4.1	MATERIAIS	46
4.1.1	Fármacos.....	46
4.1.2	Biomaterial na forma de matriz	46
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ	47
4.2.1	Porosidade	47
4.2.2	Intumescimento	47
4.3	INCORPORAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS	47
4.4	ESTUDO DE LIBERAÇÃO DE ANTIBIÓTICO	48
4.4.1	Curvas de Calibração.....	48
4.4.1.1	Cloridrato de Ciprofloxacina.....	48
4.5.1.2	Sulfato de Amicacina e Gentamicina	48

4.4.2 Ensaio de Liberação	49
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4.6 ANÁLISE DOS MECANISMOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS ANTIBIÓTICOS.....	52
5 RESULTADOS	53
5.1 CARACTERIZAÇÃO COMPLEMENTAR DAS MATRIZES	53
5.1.1 Determinação da Porosidade	53
5.1.2 Determinação do grau de intumescimento	53
5.2 INCORPORAÇÃO DE ANTIBIÓTICO	54
5.3 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO DE ANTIBIÓTICO	55
5.3.1 Curvas de Calibração	55
5.3.2 Liberação dos antibióticos das matrizes	58
5.4 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO	67
6 DISCUSSÃO	70
6.1 ENSAIO DE POROSIDADE	70
6.2 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO	71
6.3 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO	71
6.4 CONSIDERAÇÕES – ESTATÍSTICA	76
6.5 CONSIDERAÇÕES – MODELAGEM	76
7 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais podem ser definidos como dispositivos que interagem com o sistema biológico e podem ser constituídos a partir de compostos de origem sintética ou natural, não necessariamente sendo fabricados, como por exemplo, as válvulas cardíacas de suínos (PIRES et al., 2015), com o objetivo de melhorar, aumentar ou substituir, de forma definitiva ou temporária, um órgão ou tecido (AMARAL, 2006; NAVARRO et al., 2008; BRYDONE; MEEK; MACLAINE, 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

A bioengenharia tecidual é um campo multidisciplinar capaz de acelerar, assistir a regeneração e o reparo de tecidos danificados ou defeituosos, a fim de criar e aprimorar novas terapias e/ou desenvolver novos biomateriais, que melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida (OLIVEIRA et al., 2010).

A abordagem da engenharia tecidual envolve a reparação do tecido danificado por meio da terapia celular e fatores de crescimento, que podem ser associados aos biomateriais, servindo de suporte ao reparo tecidual (STEFFENS et al., 2018).

Na rotina clínico-cirúrgica veterinária tem-se observado o emprego cada vez maior de biomateriais que podem ser utilizados como substitutos ósseos, com o intuito de estimular o processo de cicatrização (AZEVEDO et al., 2012). A substituição de parte do tecido ósseo se faz necessária, seja em função de fraturas, neoplasias ósseas ou enfermidades ortopédicas que acarretam perda óssea, buscando assim o uso biomateriais, e não de enxertos ou transplantes ósseos (COSTA et al., 2015).

O uso de *scaffolds* tem sido estudado e testado por possuírem estruturas porosas tridimensionais, que permitem a ancoragem de células e o intumescimento, favorecendo assim a liberação local de fármacos (RASQUINI et al., 2017).

O sistema de liberação controlada possui algumas vantagens sobre os métodos convencionais de aplicação: a manutenção constante dos níveis de fármaco no organismo, a aplicação do agente direto no sítio de ação, minimizando os efeitos colaterais sistêmicos e menor frequência de administração do princípio ativo, oferecendo melhor eficácia no tratamento (OGAWA; PLEPIS, 2002; RASQUINI, et al., 2017).

A osteomielite pode ser considerada comum na medicina veterinária, frequentemente associada à processos bacterianos e fúngicos (PICHINELLI, 2014).

Os microorganismos comumente encontrados são *Enterobacteriaceae*, seguido de *Streptococcus beta não-hemolítico*, *Staphylococcus coagulase-positiva*, *Streptococcus beta hemolítico*, *Staphylococcus coagulase-negativa* (GOODRICH, 2006), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus coliformes*, *Escherichia coli* e *Pasteurella multocida* (PICHINELLI, 2014). O cloridrato de ciprofloxacina atinge uma grande variedade de bactérias gram-negativas e gram-positivas (WEESE et al., 2002), assim como o sulfato de amicacina é bastante eficiente contra cepas gram-negativas (SPINOSA, 2017) e o sulfato de gentamicina possui amplo espectro no tratamento das infecções ortopédicas, como a osteomielite e artrite séptica (HAGGETT; WILSON, 2008).

A associação de quitosana, hidroxiapatita e nanotubo de carbono já foi descrita e caracterizada (GRANATO et al., 2011). Esses biomateriais associados aos antibióticos apresentam grande potencial para minimizar as infecções no sítio cirúrgico. Com base nessas informações, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de um biocompósito a base de quitosana, hidroxiapatita e nanotubos de carbono somado a três diferentes antibióticos: cloridrato de ciprofloxacina, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina, realizando a liberação *in vitro* dos mesmos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMATERIAIS

Os biomateriais são dispositivos biomédicos como biossensores, placas metálicas ou substitutos ósseos, dispositivo para liberação controlada de medicamento, órgãos artificiais, entre outros (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). O biomaterial é uma substância que interage com o sistema biológico, com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, compostos de origem natural ou sintética, e naturais quimicamente modificados; presentes na forma sólida, géis, pastas ou líquidos; que sejam capazes de tratar, aumentar ou substituir, temporariamente ou definitivamente, quaisquer tecidos, órgãos ou função do corpo (FERREIRA, 2009; OLIVEIRA et al., 2010; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Os biomateriais podem ser usados para mimetizar a matriz extracelular, servindo como suporte físico e substrato para as células cultivadas, guiando assim a formação de um novo tecido (STEFFENS et al., 2018).

Embora acredite-se que estes dispositivos sejam uma descoberta relativamente recente, a sua aplicação nos mais diversos tipos de problemas vêm desde à antiguidade. Há relatos de suturas de linho e ouro no Antigo Egito (200 a.C.). Até o século retrasado, o desenvolvimento e a aplicação dos biomateriais eram feitas mediante tentativa e erro, porém, mais recentemente há bastante enfoque em estudos nessa área (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

De acordo com o comportamento fisiológico, eles podem ser classificados em: biotoleráveis, bioinertes, bioativo e absorvíveis (FERREIRA, 2009). Atualmente na medicina veterinária é cada vez mais frequente o emprego de materiais sintéticos, que podem ser utilizados como substitutos ósseos a fim de agilizar o processo cicatricial (AZEVEDO et al., 2012).

Os biomateriais de forma geral são classificados de acordo com a origem do material enxertado, como autógenos, quando o doador é o próprio receptor; alógenos quando o doador e o receptor pertencem a mesma espécie e xenógenos quando o doador e o receptor são de espécies distintas. Os aloplásticos são os enxertos produzidos de modo sintético, como fosfato de cálcio, hidroxiapatita e biocerâmicas (PARETSIS, 2016). Para atingir as exigências da ortopedia eles evoluíram em três gerações diferentes. A primeira geração, materiais bioinertes; a

segunda geração, materiais bioativos e biodegradáveis; e a terceira geração, materiais com o objetivo de estimular respostas específicas a nível molecular (NAVARRO et al., 2008).

Os biomateriais ortopédicos podem ser constituídos por metais, cerâmicas, polímeros e materiais de origem natural. Os metais destacam-se pelo excelente desempenho mecânico e têm sido amplamente utilizados como componentes estruturais, oferecendo reforço ou estabilização de tecidos rígidos, são exemplos os parafusos e placas para fixação de fraturas. As cerâmicas são compostos inorgânicos, geralmente menos densas do que a maioria dos metais, apresentam boa estabilidade dimensional, e podem ser classificadas de acordo com sua interação com o tecido do hospedeiro, como bioinertes (alumina e zircônia), bioativas (hidroxiapatita, biovidros e vitrocerâmicas) e bioreabsorvíveis (fosfato tricálcico e gesso) (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Os polímeros são os mais empregados no âmbito médico e suas principais vantagens, são a facilidade de fabricação para produzir formas variadas, custo razoável e disponibilidade em encontrar materiais com propriedades mecânicas e físicas desejadas. São classificados em sintéticos, como o polimetilmetacrilato, e naturais, como o colágeno e a quitosana (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Os compósitos são constituídos por uma fase contínua (matriz) e uma fase dispersa (componente de reforço), onde as características podem incorporar propriedades combinadas de diferentes constituintes. As principais associações são metal-cerâmica e polímero-cerâmica (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

A biocompatibilidade dos biomateriais é baseada na compatibilidade com o meio fisiológico, ou seja, em que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelo tecido ao redor e não causar dano ao organismo (FERREIRA, 2009).

A bioatividade é qualquer interação ou efeito que o material implantado exerce sobre as células para conduzir ou ativar respostas teciduais específicas, onde o comportamento celular deve ser influenciado pelas biomoléculas associadas a superfície do material (NAVARRO et al., 2008).

As características dos biomateriais não podem ser generalizadas, pelo fato de dependerem de sua aplicação, mas algumas propriedades são frequentemente avaliadas. Dentre elas, destacam-se as propriedades biológicas, físicas, mecânicas e

a forma de degradação quando em contato com o organismo (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Os biomateriais não possuem como único objetivo a função de preencher espaço, mas também auxiliar no estímulo de uma resposta biológica específica em função de suas propriedades, como conformação molecular, distribuição eletrônica, estado de agregação e outras propriedades físico-químicas específicas (AMARAL, 2006).

Por fim, os biomateriais devem possuir as seguintes características: atóxico, e não cancerígeno; biocompatível; biofuncional; ser esterilizável; estável (durante o processo de implantação); possuir textura de superfície conveniente para que a adesão celular ocorra; seu tempo de degradação permita a ocorrência do processo de regeneração e propriedades biomecânicas adequadas (OLIVEIRA et al., 2010; MACIEL, 2011).

2.1.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) compreende até 70% do peso seco do osso (BRYDONE; MEEK; MACLAINE, 2010), além de ser um fosfato de cálcio hidratado (FERREIRA, 2009; PIRES et al., 2015; OGAWA et al., 2002); faz parte de um grupo de minerais denominados apatitas, com sua fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e é caracterizada pela sua baixa solubilidade em meio aquoso e bastante solúvel em soluções de ácido halogenídricos. Esta pode ser obtida por meio da desproteinização do tecido ósseo, por tratamento hidrotérmico de corais, ou ainda por processos sintéticos (AMARAL, 2006).

A HA pode ser sintetizada a altas temperaturas, onde apresenta boa cristalinidade e cristais grandes, e a baixas temperaturas apresenta baixa cristalinidade e cristais pequenos. Diferentemente da hidroxiapatita sintetizada a altas temperaturas, no segundo caso elas apresentam características similares as do tecido ósseo (FERREIRA, 2009).

A forma sintética da HA possui capacidade osteocondutora e uma estrutura cristalina semelhante a HA no osso (BRYDONE; MEEK; MACLAINE, 2010). As cerâmicas de hidroxiapatita por sua boa capacidade de depósito e osteocondutividade (COSTA et al., 2015), faz dela um dos substitutos ósseos mais utilizados (URAMIS; HERNÁNDEZ; ESTÉVES, 2012; OLIVEIRA, 2010).

A capacidade em adsorver e/ou absorver moléculas, a torna uma boa opção quando se almeja uma ação prolongada de um fármaco (FERREIRA, 2009; MACIEL, 2011; GAO et al., 2011;), por meio de liberação controlada na tentativa do controle da infecção óssea (OGAWA; PLEPIS, 2002; RASQUINE et al., 2017).

De forma vantajosa ela apresenta a rápida adaptação óssea, devido sua similaridade com o tecido calcificado do osso humano (OGAWA; PLEPIS, 2002), composição uniforme, alta biocompatibilidade, não é tóxica, sua microestrutura pode ser controlável e não é alergênica ou carcinogênica (PARETSIS, 2016). Como desvantagem, possui além da sua lenta biodegradação, que ocorre gradualmente após quatro a cinco anos da implantação (PIRES et al., 2015), o fato de quando usada como veículo de antibióticos faz com que isso tenha uma liberação rápida, já que na maioria das vezes o mecanismo de carregamento do medicamento é a adsorção das soluções, porém essa característica pode ser controlada ao se modificar o método de síntese (CIOCILTEU et al., 2018).

A hidroxiapatita é fabricada para uso clínico na forma de blocos ou grânulos, porosa ou densa (COSTA et al., 2015). Dentre suas aplicações estão: reparo de defeitos ósseos em aplicações ortopédicas ou odontológicas, coadjuvante na colocação de implantes metálicos, regeneração guiada do tecido ósseo, recobrimento de implantes metálicos, entre outros (FERREIRA, 2009).

A associação de fibras colágenas à hidroxiapatita é responsável pela resistência e dureza do tecido ósseo (MACIEL, 2011). As propriedades mecânicas da hidroxiapatita não são indicadas para aplicações onde haja exigência de carga, sendo utilizada como cobertura, em materiais como o titânio (FERREIRA, 2009).

2.1.2 Quitosana

A quitosana é obtida facilmente pela desacetilação da quitina, que é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, como componente de exoesqueletos de insetos e crustáceos. Seu uso no campo farmacêutico e na medicina está cada vez maior devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade (AZEVEDO; KUMAR, 2012), suas propriedades de muco adesão e de melhoramento da permeabilidade (GAO et al., 2011).

A produção de géis de quitosana, sem a adição de agentes de reticulação, permite o desenvolvimento de matrizes da mesma para aplicação em liberação controlada de fármaco (AZEVEDO; KUMAR, 2012). Mais do que um veículo para a

administração de antibióticos, a quitosana possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana (GAO et al., 2011).

O uso desta como biomaterial é baseado em suas propriedades, como: biocompatível, atóxico, biodegradável, bioadesivo, agente bacteriostático e antimicrobiano, hemostático, capaz de formar barreiras, arcabouço para proliferação celular, capacidade de suporte para liberação controlada de fármacos (AMARAL, 2006) e possuir função analgésica (HOLANDA, 2011).

Biomateriais em formato de géis e esponjas de quitosana demonstraram ter maior liberação controlada de antibióticos, podendo *in vitro*, durar até semanas, diferentemente do observado na liberação de antibióticos a partir de géis de colágeno e fibrina (INZANA et al., 2016).

A união da quitosana com mineral gera um compósito com força e flexibilidade de um polímero, resistência e dureza de um mineral. A vantagem desses compósitos se dá na melhoria da capacidade osteogênica dos derivados de cálcio (AMARAL, 2006). Ela sozinha não é o ideal para reparação tecidual, faz-se necessário o uso de outros compósitos para que sua bioatividade seja aperfeiçoada (TAVAKOL et al., 2013).

Ahmed et al. (2009) avaliaram filmes de quitosana associados à ciprofloxacina e diclofenaco, e relataram a obtenção de bons resultados com a liberação controlada de ambos os medicamentos no tratamento tópico da periodontite, além dos filmes terem apresentados boa propriedade físico-química, no que se refere espessura, resistência a tração, liberação *in vitro*, estabilidade e atividade antibacteriana. Sobhani et al. (2017) analisaram o polímero de quitosana como carreador do cloridrato de ciprofloxacina e constataram, que a quitosana não só possui um importante papel na liberação controlada, mas também devido sua atividade antibacteriana, é capaz de diminuir as doses de antibiótico a serem utilizadas nas infecções.

2.1.3 Nanotubos de Carbono

Os nanotubos de carbono (NC) pertencem à família dos fulerenos, que é a terceira forma alotrópica do carbono, assim como o grafite e o diamante. Sua resistência mecânica é uma de suas principais vantagens, assim como seu diâmetro em nanoescala, que permitem serem carreadores de biomoléculas passíveis de interagir com células e tecidos (MACHADO et al., 2014).

Os nanotubos de carbono, quanto às suas camadas, podem ser divididos em nanotubos de multicamadas e camada simples (SOUZA FILHO; FAGAN, 2007), sua densidade é semelhante a um grafite e apresenta propriedade mecânica como a mesma rigidez e a resistência (MARTINS-JÚNIOR et al., 2013). Este composto é considerado como sistema modelo para a nanotecnologia e a nanociência, e está presente na física, na química, nas ciências dos materiais, na biologia e na farmacologia (SOUZA FILHO; FAGAN, 2007).

Estes quando são incorporados em outros materiais com a função de arcabouço, permitem melhor força estrutural e conferem a condutividade elétrica que pode favorecer o direcionamento do crescimento celular (SAITO et al., 2009). Outra vantagem é que permitem o crescimento dos osteoblastos entremeados a eles (TONELLI et al., 2012) e possuem alto grau de flexibilidade, podendo sustentar até 15% de tração antes da fratura (MARTINS-JÚNIOR et al., 2013).

Na medicina veterinária, o uso dos nanotubos de carbono têm tido destaque em diversos setores, como na aplicação de biosensores e nos sistemas de entrega de fármacos. No primeiro caso, o biomaterial possui potencial para de identificação clínica de biomoléculas, por exemplo, anticorpos associados a doenças autoimunes; e no segundo caso, o uso destes como vetor para distribuição, têm tido aplicabilidade para carrear desde pequenas moléculas de fármaco a biomacromoléculas em diferentes tipos celulares (MACHADO et al., 2014).

Em pesquisas recentes foi revelado que os materiais a base de nanotubos de carbono, que passam por um processo de funcionalização antes de serem implantados em animais, possuem melhoras na biocompatibilidade e na biodegradabilidade. Este processo fornece ainda, melhorias na capacidade mecânica do biomaterial, que é importante para a regeneração do tecido ósseo (MARCONDES, 2017).

Compósitos de hidroxiapatita, quitosana e nanotubo de carbono já possuem descrição e caracterização, e através dos estudos de bioatividade estima-se que eles possuam propriedades, que possam colaborar com o processo regenerativo (GRANATO et al., 2011). Diante disso, almeja que este compósito somado à antibióticos possa não apenas auxiliar na reestruturação do tecido ósseo, mas possa também exercer um importante papel no controle de infecções ósseas.

2.2 BIOMATERIAL NA ORTOPEDIA

Os defeitos esqueléticos com perda óssea têm se tornado cada vez mais frequentes, além do surgimento de uma grande variedade de substitutos ósseos para tratar essas lesões como, por exemplo, as cerâmicas de hidroxiapatita e fosfato tricálcico, que possuem boa osteocondutividade e capacidade de depósito (URAMIS; HERNÁNDEZ; ESTÉVES, 2012).

Os biomateriais em *scaffolds* são sólidos tridimensionais que fornecem suporte para fixação, proliferação, diferenciação e orientação das células, servindo como arcabouço para crescimento do tecido semelhante. Normalmente são produzidos a partir de materiais biocompatíveis, biodegradáveis e biabsorvíveis, como, por exemplo, a quitosana (SILVA et al., 2016). O uso de *scaffolds*, para regeneração tecidual, tem sido estudado como sistema de liberação controlada de fármacos, uma vez que as estruturas porosas tridimensionais permitem a ancoragem de células e o intumescimento (RASQUINI et al., 2017).

Biomateriais utilizados como substitutos ósseos devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e osteocondutivos, de forma que proporcionem a condução dos osteoblastos ou de células precursoras de osteoblastos para o sítio da lesão (OLIVEIRA et al., 2010).

O biomaterial não deve apenas realizar o preenchimento da falha óssea, mas ser capaz de proporcionar um ambiente adequado para que haja o reparo ósseo. A fixação do material ocorre em duas fases distintas: fixação primária mecânica, estabilidade biomecânica no momento seguinte ao implante do biomaterial, e fixação secundária, gerada a partir da resposta biológica e do crescimento ósseo (PARETSIS, 2016).

A fim de avaliar toxicidade aguda e citocompatibilidade deve-se realizar primeiramente testes *in vitro*, porém a comprovação da biocompatibilidade só pode ser realizada com testes *in vivo* (PEARCE et al., 2007).

2.3 OSTEOMIELOITE

A osteomielite é definida pela inflamação do tecido ósseo envolvendo os canais de Havers, canais de Volkmann, canal medular e periósteo (HORTA; REZENDE, 2014). A infecção pode estar limitada a uma região do osso ou ainda pode

comprometer medula óssea, córtex, tecidos moles adjacentes, além das estruturas sinoviais nas extremidades ósseas. Esta afecção pode estar associada à processos bacterianos e fúngicos (PICHINELLI, 2014; MUSTAFA; YUSOF; IFTIKHAR, 2014).

A infecção óssea pode estar presente em animais de qualquer idade, afetar qualquer osso e pode causar sequelas severas com morbidade persistente (PEREIRA; BETTENCOURT, 2013). A osteomielite se desenvolve por contaminação direta, como, por exemplo, nos casos de traumas por via hematógena, ou seja, disseminação via corrente sanguínea ou ainda pela presença de implantes ortopédicos (INZANA et al., 2016).

A colonização bacteriana exige a aderência das bactérias ao osso ou substrato e subsequente uma fixação permanente. O sistema de defesa do hospedeiro, quando não está comprometido, é capaz de eliminar a colonização bacteriana. Porém quando se tem um trauma ortopédico, por exemplo, a quantidade exacerbada do inóculo, a presença de um corpo estranho e a baixa celularidade da superfície do tecido decorrente ao trauma, dificultam o combate a infecção. (GOODRICH, 2006).

No momento que ocorre a infecção do tecido ósseo, as bactérias induzem reação inflamatória, de forma que afetam o periósteo e o interior do osso causando necrose óssea (BIRT et al., 2017). Ao colonizar a superfície óssea, cartilagem ou implantes, as bactérias formam uma película de material glicoproteico, chamado de biofilme. Este biofilme apresenta característica impermeável e gera resistência a antimicrobianos, sendo responsável por tornar o tratamento desafiante (GOODRICH, 2006). Em alguns casos, a remoção de implantes cirúrgicos, muitas vezes, passa a ser necessária para resolver a infecção tecidual devido à aderência bacteriana ao implante e a formação do biofilme (REED et al., 2016).

Em Medicina Veterinária, particularmente em cães, a frequência da osteomielite como complicação pós-operatória das osteotomias empregadas para tratamento da ruptura do ligamento cruzado cranial é de 7,3% em TPLO (*tibial plateau leveling osteotomy* – osteotomia de nivelamento do platô tibial) e 6,6% em TTA (*tibial tuberosity advancement* – avanço da tuberosidade tibial). A maioria das infecções ósseas tem origem bacteriana e é causada por microrganismos do gênero *Staphylococcus* (DAL-BÓ et al., 2013; REED et al., 2016). Ainda Dal-Bó et al. (2013) afirmaram ter isolado nos implantes ortopédicos *Pseudomonas* spp, e estes foram mais sensíveis à ciprofloxacina, enrofloxacina, gentamicina e norfloxacina; enquanto

bactérias do gênero *Staphylococcus* spp coagulase positiva se mostraram mais sensíveis à amicacina.

Nos equinos a taxa de infecção pós-operatória em cirurgias musculoesqueléticas é cerca de 10% e os casos de contaminação no pós-operatório chegam a 53%. Os microrganismos que comumente são encontrados na osteomielite em equinos são as *Enterobacteriaceae*, seguido de *Streptococcus beta não-hemolítico*, *Staphylococcus coagulase-positiva*, *Streptococcus beta hemolítico* e *Staphylococcus coagulase-negativa*. Os tratamentos locais com implantes impregnados com antimicrobianos têm sido estudado e apresentado melhoras significativas nestes casos (GOODRICH, 2006).

Ainda sobre a osteomielite na Medicina Veterinária, uma revisão feita por Gieling et al. (2019) relatou que é frequentemente associada aos implantes cirúrgicos utilizados para estabilizar fraturas, e a identificação bacteriana associada a testes de sensibilidade aos antibióticos auxilia a eficácia do tratamento. Em cães e gatos normalmente os microrganismos isolados são gram-positivos como *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp., enquanto que em equinos normalmente envolve infecções polimicrobianas por gram-positivas ou gram-negativas sendo *Staphylococcus* sp e *Pseudomonas* sp alguns dos possíveis patógenos envolvidos.

Em humanos a taxa de infecção relacionada a cirurgias ortopédicas com uso de implantes varia de 1,4% até 22,7%, sendo o *Staphylococcus aureus* o microrganismo mais isolado. Essa variação é decorrente do tipo de procedimento ortopédico, condições clínicas do paciente e tipo de vigilância pós-operatória (FRANCO et al., 2015). O *S. aureus* está relacionado com as maiores taxas de osteomielite recorrente, mesmo quando este organismo não está presente nas culturas bacterianas positivas iniciais (INZANA et al., 2016).

A estratégia mais frequente para o tratamento das infecções ósseas é a combinação do desbridamento cirúrgico e o uso de antibióticos, além da remoção dos implantes ortopédicos e a cobertura com retalhos musculares. Antibióticos locais permitem alcançar altas concentrações no sítio da afecção, com baixos níveis séricos e baixa toxicidade sistêmica (AZI et al., 2010).

Mediante as várias desvantagens da terapia antimicrobiana sistêmica tem sido discutido o uso da terapia local por meio de um veículo biocompatível, biodegradável e com perfil de eluição consistente para os antimicrobianos que transporta (REED et al., 2016). O uso do sistema de liberação controlada já vem sendo

estudado na odontologia humana a fim de melhorar a farmacodinâmica, farmacocinética e os efeitos toxicológicos dos fármacos (CARNAVAL, 2015).

2.4 SELEÇÃO DO AGENTE ANTIMICROBIANO

O antimicrobiano ideal deve possuir toxicidade seletiva, ou seja, ser nocivo apenas ao agente patogênico. Os fármacos são divididos conforme seu mecanismo de ação: inibidores da síntese da parede celular; fármacos que alteram a permeabilidade da membrana celular ou o transporte ativo através da membrana celular; inibidores da síntese proteica e inibidores da síntese de ácido nucleico (AKAKI, 2005).

Conforme a farmacodinâmica, os antimicrobianos podem ser divididos em tempo-dependentes e concentração-dependentes. Os antimicrobianos concentração-dependentes são os aminoglicosídeos, as quinolonas e os azalídeos (GAO et al., 2011).

Os agentes antimicrobianos também são descritos como bacteriostáticos e bactericidas, ou seja, aqueles que inibem temporariamente o crescimento do microrganismo e aqueles que causam a morte do microrganismo, respectivamente. O conhecimento do espectro de atividade juntamente com os patógenos envolvidos na afecção é considerado como um dos fatores determinantes para a eficácia do fármaco utilizado (AKAKI, 2005).

Em um processo de regeneração óssea, a antibioticoterapia é um fator de extrema importância. A reconstituição do tecido ósseo lesionado torna necessário o uso de implantes, que frequentemente estão associados ao aparecimento de processos infecciosos (MACIEL, 2011).

O uso incorreto de antimicrobianos e a profilaxia pós-operatória por tempo prolongado podem contribuir com a resistência bacteriana, desta forma o uso ou não de antibióticos no período pós-operatório deve ser embasado em boas evidências. Na medicina humana, recomenda-se que a profilaxia antimicrobiana seja descontinuada em um prazo de 24 horas, porém deve-se ressaltar que o manejo pré e pós-operatório do sítio cirúrgico difere de forma considerável entre pacientes humanos e veterinários (PRATESI et al., 2015). O sistema de liberação prolongada tem sido estudado a fim de diminuir a indução da resistência e maximizar a concentração necessária no sítio de ação (GAO et al., 2011).

Na medicina equina, assim como nas outras espécies, algumas preocupações específicas com relação às práticas de uso de antimicrobianos incluem a administração destes quando não se tem indicação, administração de fármacos ineficazes, tempo inadequado de uso e terapia demasiadamente prolongada (WEESE; CRUZ, 2009).

A seleção de antibióticos é facilitada quando a identificação da bactéria ocorre com precisão, pois o padrão de sensibilidade de muitos organismos é previsível (PAPICH, 2001). Porém, estes resultados não estimam a forma adequada e as concentrações necessárias para o local afetado. Há diversos métodos para fornecer o antimicrobiano diretamente no local de infecção. Em algumas técnicas, a concentração do fármaco impregnado pode ser de até 20 vezes maior, quando comparado a aplicação sistêmica (THOMAS; BIZIKOVA; MINIHAN, 2010).

2.4.1 Aminoglicosídeos

A classe dos aminoglicosídeos é assim denominada devido ao fato da molécula ser constituída por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica à hexose, que normalmente está em posição central. O peso molecular varia de 445 a 600 daltons (Da), são altamente solúveis em água, possuem estrutura polar catiônica e são estáveis em pH 6 a 8 (OLIVEIRA; CIPPULO; BURDMANN, 2006).

Como exemplo dessa categoria, a amicacina e a gentamicina são antibióticos bactericidas importantes no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas (SPINOSA, 2011), embora algumas bactérias do gênero *Staphylococcus* sejam sensíveis a eles, em uma extensão ligeiramente maior para a amicacina (WILSON, 2001). Uma vez dentro da célula, eles se ligam a subunidade 30S do ribossomo e interferem na síntese de proteínas, levando à morte celular bacteriana (HAGGETT; WILSON, 2008).

A passagem do aminoglicosídeo para o interior da célula ocorre por meio de transporte ativo (dependente de energia e oxigênio) associado à diferença de potencial elétrico existente entre o meio externo e interno da bactéria. Bactérias anaeróbias, que não dependem de oxigênio são resistentes a esse grupo de antibiótico (SPINOSA, 2011).

Esses antimicrobianos são moléculas bastante solúveis em água, mas pouco lipossolúveis. A estrutura química deste grupo está relacionada à atividade

antimicrobiana, à toxicidade e à resistência bacteriana (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2017).

Assim como a absorção ativa desse grupo é menor em ambientes pobres de oxigênio, a captação é aumentada pela associação aos β -lactâmicos que interferem na síntese da parede celular bacteriana, obtendo um efeito sinérgico para oferecer uma cobertura antimicrobiana de amplo espectro, por exemplo, no tratamento de pleuropneumonia, artrite séptica e osteomielite. Os aminoglicosídeos possuem melhor funcionamento em ambientes alcalinos, possuindo atividade reduzida em locais onde os danos teciduais levam a diminuição do pH (HAGGETT; WILSON, 2008).

Esses antibióticos por serem concentração-dependente possuem maior efeito bactericida conforme a maior concentração, portanto a administração de uma dose alta, que é capaz de produzir um pico de oito a dez vezes a CIM (Concentração Inibitória Mínima), pode ser usada a fim de obter um ótimo efeito bactericida. Esse delineamento é talvez menos nefrotóxico do que doses menores administradas em maiores frequências (PAPICH, 2001).

2.4.1.1 Sulfato de Amicacina

O sulfato de amicacina é apresentado como solução estéril, límpida e incolor, e sua forma molecular é: $C_{22}H_{43}N_5O_{13}$ (SPINOSA, 2017). Este antibiótico é obtido a partir da camicina e possui o maior espectro de atividade antimicrobiana dentre os aminoglicosídeos. O fato de ser mais resistente à inativação enzimática bacteriana, o torna mais efetivo contra cepas gram-negativas não suscetíveis aos outros antibióticos do mesmo grupo. Em contrapartida, é considerado menos ativo contra estreptococos comparado à gentamicina, e com menor poder nefrotóxico (SPINOSA, 2017).

Embora o uso de aminoglicosídeos seja mais comumente utilizado para tratar infecções gram-negativas, a amicacina tem alta eficácia contra patógenos observados em equinos com afecções ortopédicas, sendo eficaz contra diversas bactérias encontradas no líquido sinovial (KELMER et al., 2012) e possui ação contra diversos organismos envolvidos em sepse nos cavalos, além das bactérias desenvolverem menor resistência a esse antibiótico (SCHEUCH et al., 2002).

2.4.1.2 Sulfato de Gentamicina

O sulfato de gentamicina é produzido a partir de actinomicetos do gênero *Micromonospora purpurea*, e é frequentemente utilizado na medicina equina pelo seu efeito bactericida em gram-negativas e do gênero *Staphylococcus* (GRIGOLETTI, 2015). Frequentemente associa-se às penicilinas quando é necessária cobertura de amplo espectro no tratamento das infecções ortopédicas, como a osteomielite e artrite séptica (HAGGETT; WILSON, 2008).

A gentamicina comparada à amicacina possui melhor atividade contra estreptococos e organismos gram-negativos não-entéricos, e ambos possuem boa atividade contra *Pseudomonas* spp. (HAGGETT; WILSON, 2008). A sua eliminação ocorre por via renal atingindo grandes concentrações urinárias, e quando utilizada por período prolongado e em altas doses exibe efeito nefrotóxico, pois diferente dos outros aminoglicosídeos é muito mais reabsorvida nas células tubulares. As taxas elevadas de resistência frente a esse antibiótico são decorrente pela sua ampla utilização terapêutica (MACIEL, 2011).

O uso deste antibiótico é possível quando associado a esferas de polimetilmetacrilato (PMMA) no tratamento de infecções ósseas e articulares, promovendo a liberação lenta no local apropriado, e dessa forma, evitando os efeitos colaterais quando administrado por via sistêmica (DOWLING, 2010), sendo que sua comercialização em associação ao cimento ósseo, já é existente (AZI et al., 2010).

2.4.2 Quinolonas

As quinolonas pertencem ao grupo de substância química antibacteriana, com grande aplicação na medicina veterinária e medicina humana. São divididas em quatro gerações e com a crescente descoberta destas novas substâncias, as quinolonas de primeira geração estão em desuso, uma vez que os antibióticos pertencentes à segunda geração têm maior espectro de ação e menor ocorrência de resistência microbiana (SPINOSA, 2017).

Consideradas antimicrobianos bactericidas, as quinolonas são concentração-dependentes e possuem alta solubilidade lipídica (HAGGETT; WILSON, 2008). O sinergismo existente entre este grupo e os aminoglicosídeos ou β -lactâmicos é mínimo, além de serem antagonistas ao cloranfenicol e a rifampicina (DOWLING, 2010).

A ciprofloxacina se difere da enrofloxacina apenas pela presença de um átomo de hidrogênio no anel piperazínico e de acordo com a acidez e as diferentes estruturas, esse grupo de antibiótico exibe diferentes ações antibacterianas (SILVA; HOLLENBACH, 2010). O mecanismo de resistência desenvolvido frente às quinolonas ocorre pelas alterações no acúmulo intracelular dos antibióticos e alterações nas moléculas alvo (enzimas DNA girase e topoisomerase) (SILVA; HOLLENBACH, 2010).

2.4.2.1 Cloridrato de Ciprofloxacina

A ciprofloxacina, quinolonas de segunda geração ou fluorquinolonas, é um antibiótico de amplo espectro eficaz contra uma variedade de bactérias gram-negativas e gram-positivas, alguns *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.*, *Rickettsia spp.*, e baixa atividade contra microrganismos anaeróbios (WEESE et al., 2002).

O cloridrato de ciprofloxacina atua na inibição da síntese de ácidos nucleicos e inibe a DNA-girase, essencial para síntese do DNA-bacteriano (OGAWA; PLEPIS, 2002). A base estrutural das quinolonas é o anel 4-quinolona, o qual vem sendo bastante modificado para aumentar o espectro de ação (SPINOSA, 2017). A excreção da ciprofloxacina ocorre por via renal, cerca de 50%, e pelas fezes, cerca de 25% e sua ligação a proteínas plasmáticas é de 30%, considerado uma de suas vantagens (MACIEL, 2011).

Na Medicina Veterinária, a ciprofloxacina é a fluorquinolona comumente utilizada, que exibe largo espectro de atividade, incluindo o uso para o tratamento de osteomielite por gram-negativos (OGAWA et al., 2002; SPINOSA, 2017). Além da sua utilização em infecções ósseas, é também indicada em otorrinolaringologia e oftalmologia, infecções respiratórias, urinárias, intra-abdominais, infecções de pele e no trato gastrointestinal (OGAWA; PLEPIS, 2002). Em equinos, é discutido que a ciprofloxacina pode gerar quadros de colite (WEESE et al., 2002). A incorporação desse antibiótico aos biomateriais é vantajosa por diminuir os efeitos indesejáveis, já que o mesmo será liberado diretamente no sítio de ação (OGAWA; PLEPIS, 2002).

2.5 ASSOCIAÇÃO BIOMATERIAL E ANTIMICROBIANO

Em 1983 foi descrito a associação de agentes antimicrobianos a resinas compostas, sendo avaliado êxito entre a associação em várias concentrações de clorexidina a essas, de forma que o teste de difusão em ágar foi utilizado para verificar a eficácia antibacteriana contra *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Escheria coli* e *Lactobacillus acidophilus* (AKAKI, 2005).

A adição de fármacos em sistemas poliméricos possui uma representatividade importante no mercado. Deve-se considerar a interferência na biodisponibilidade decorrente das implicações biológicas, pela presença destes compostos em fórmulas farmacêuticas (OLIVEIRA et al., 2004).

As propriedades físico-químicas do princípio ativo, como sua disponibilidade e solubilidade devem ser analisadas para atingir a melhor absorção possível, dele pelo organismo (OLIVEIRA; LIMA, 2006). Os sistemas poliméricos podem ser formulados a partir de materiais de natureza biodegradável ou não (BIZERRA; SILVA, 2016). Ainda em relação a eles, estes não devem possuir características químicas que comprometam a ação das substâncias adicionadas, e suas propriedades físicas devem ser consistentes e passíveis de reprodução. Em compósitos cujo objetivo é a liberação controlada de fármacos, espera-se algumas propriedades específicas, como: permeabilidade, lubrificação, energia de superfície, adesão, solubilidade, entre outras (OLIVEIRA; LIMA, 2006).

Os fármacos podem ser ligados aos seus compósitos durante a preparação do arcabouço (*scaffolds*, matrizes), ou por impregnação após a preparação do mesmo, através do uso de solventes. O fator determinante para escolher o método a ser utilizado será dependente das características do fármaco e o tipo de compósito. A técnica de incorporação durante o preparo do biomaterial pode ser mais vantajosa pela sua facilidade de inclusão e por favorecer uma distribuição mais homogênea (VEIGA, 2012).

Azi et al. (2010) avaliaram as características de eluição da gentamicina, ou seja de separação, impregnada a um cimento ósseo, para tratamento de infecções ósseas, e inferiram que o antibiótico a ser adicionado deve ser preferencialmente em pó, já que as soluções aquosas podem apresentar uma incorporação limitada.

2.6 SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

Desde a descoberta da penicilina, em 1928, diversos fármacos antibacterianos foram introduzidos na rotina clínica e muitas doenças foram tratadas. Com o surgimento da resistência bacteriana, a procura por novos antibióticos tem crescido em grande escala, enquanto por outro lado, tem se pesquisado melhorar os resultados clínicos através de novas formulações de fármacos já existentes. A incorporação de antimicrobianos em sistemas de liberação controlada vem com o objetivo de diminuir a resistência antimicrobiana (GAO et al., 2011), modular o perfil de liberação, reduzir os efeitos tóxicos, aumentar sua atividade (VIANA, 2014), monitorar os níveis do fármaco no local da aplicação, obter altas concentrações do princípio ativo no local desejado e diminuir intervalo das dosagens (BIZERRA; SILVA, 2016).

A tecnologia de liberação controlada de medicamentos envolve pesquisa multidisciplinar e representa uma área promissora da ciência (HOLANDA, 2011). O sistema de liberação sustentada tem se mostrado eficiente em relação aos métodos convencionais de tratamento, porém a impossibilidade de se interromper a ação farmacológica em caso de intolerância pelo paciente ainda é uma dificuldade (BIZERRA; SILVA, 2016).

O controle da liberação do medicamento é relacionado à permeabilidade do dispositivo polimérico, e estes são classificados em reservatório ou matriz. No primeiro caso, o princípio ativo é armazenado em um reservatório recoberto por membrana polimérica, e no segundo, o fármaco está dissolvido ou disperso de forma homogênea na matriz polimérica (VEIGA, 2012).

A biodegradação dos compósitos tem influência direta na cinética de liberação do fármaco, e dessa forma a integridade na forma farmacêutica é um fator determinante a fim de evitar a degradação prematura. Em casos onde houver falhas nos requisitos de biocompatibilidade pode ocorrer adesão de plaquetas no compósito e infecção da área adjacente (BIZERRA; SILVA, 2016).

Sistemas de liberação de fármacos à base de fosfato de cálcio estão em análise, e estão limitados ainda à liberação *in vitro*, com compostos modelos como hormônios de crescimento, quimioterápicos e antibióticos. Esse tipo de sistema de entrega de medicamento é promissor no controle de infecções ósseas (OGAWA; PLEPIS, 2002).

A liberação controlada de fármacos atua a partir de três mecanismos distintos: difusão, erosão e a ativação por solvente. Na difusão, o princípio ativo faz

parte de um sistema de reservatório ou matricial e a difusão irá ocorrer por meio de gradiente de concentração (BIZERRA; SILVA, 2016) através de um polímero insolúvel em água (HOLANDA, 2011).

No processo de erosão, a taxa de liberação será determinada pela escolha do polímero, já que o controle químico é estabelecido por meio da degradação da matriz. O mecanismo de ativação por solvente faz a liberação do fármaco impregnado por meio da quebra das cadeias poliméricas, que ocorre pela clivagem de suas ligações intermoleculares, ou pela ação de enzimas específicas quando o fármaco está ligado covalentemente ao polímero (BIZERRA; SILVA, 2016).

O progresso no campo de liberação controlada tem sido crescente e novas formulações entraram no mercado. A aplicação de novos materiais melhorou esse sistema de entrega, entre eles materiais biodegradáveis de origem natural, como a quitosana e o colágeno (GAO et al., 2011).

2.7 ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DO ANTIMICROBIANO

Os métodos utilizados para determinar a taxa de liberação dos fármacos podem ser diretos ou indiretos. A cromatografia líquida é responsável pela obtenção da concentração por forma direta, através da separação de compostos químicos em solução. A espectrofotometria obtém os dados através da análise óptica para mensurar a concentração das espécies químicas. A colorimetria é baseada na absorção de luz visível, que envolve a percepção das cores, sendo esses dois últimos classificados como métodos indiretos (NARDI, 2014).

A espectrofotometria visível e ultravioleta (UV) permite a análise de diversos fármacos associados em comprimidos e pastilhas, por exemplo, sem haver a necessidade da separação prévia dos compostos. Os espectrofotômetros são capazes de registrar a absorbância ou a transmitância em função do comprimento de onda (PASCHOAL et al., 2003).

Diferentes estudos analisaram a liberação de fármaco com esta técnica. Ogawa et al. (2009) usaram o espectrofotômetro de UV-visível para estimar a quantidade de cloridrato de ciprofloxacina liberada no meio, em função do tempo. Sivakumar et al. (2002) determinaram a quantidade de gentamicina liberada, em associação com compósitos de hidroxiapatita, por meio também de espectrofotometria UV. Surya (2018) e colaboradores validaram um método espectrofotométrico

considerado aplicável, para a análise quantitativa de rotina, da amicacina em formulações puras ou comercializadas, sendo considerado um método fácil com boa precisão e exatidão.

2.8 MODELOS DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO

Para estudar os diferentes resultados da cinética de liberação dos fármacos, a quantidade de fármaco liberada é estudada em função do tempo fornecendo a informação de qual é o modelo mais adequado para essa cinética. Dentro da grande variedade de modelos matemáticos têm-se os de ordem zero, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin, Higuchi e Weibull como exposto na Quadro 1 (PAARAKH et al., 2018; SHAIKH et al., 2015; DASH et al., 2010; SIEPMANN; PEPPAS, 2001). Os modelos de Higuchi e de ordem zero caracterizam dois casos limites no que tange o transporte e liberação dos fármacos, tendo-se o modelo de Korsmeyer-Peppas como um critério de decisão entre estes dois modelos.

Para a cinética de ordem zero, deve-se ter uma forma farmacêutica (como as matrizes), que não se desagregue e que libere o fármaco lentamente, presumindo-se que a variação de área é desprezível e que não se atingem condições de equilíbrio. Isso forneceria uma relação direta de quantidade liberada no tempo t (M_t) versus o tempo (t), tendo-se k_0 como a constante dessa cinética de liberação (DASH et al., 2010; COSTA, 2002).

Quadro 1 – Descrição dos modelos matemáticas utilizados na liberação de fármacos

Modelo	Equação	Parâmetros
Ordem Zero	$Mt = M_0 + k_0 t$	k_0 é a constante cinética de liberação de ordem zero
Korsmeyer-Peppas	$Mt/M_\infty = k_{KP} t^n$	k_{KP} é a constante cinética de Korsmeyer-Peppas, n é o expoente de liberação, relacionado ao mecanismo de liberação como mostrado no Quadro 2
Peppas-Sahlin	$Mt/M_\infty = k_D t^m + k_R t^{2m}$	k_D e k_R são as constantes de difusão e de relaxamento das cadeias poliméricas na cinética de liberação; m é o expoente de liberação
Higuchi	$Mt/M_\infty = k_H t^{1/2}$	k_H é a constante cinética de Higuchi;
Weibull	$\frac{Mt}{M_\infty} = 1 - e^{-[(t-T)^b]/a}$	T é o parâmetro de localização que representa o tempo antes do início do processo de dissolução ou liberação e, na maioria dos casos é zero; a é o parâmetro de escala que define a escala de tempo do processo; b é indicativo da forma da curva de dissolução ou liberação, sendo uma exponencial ($b = 1$, caso 1), em forma de sigmoidal com curvatura para cima ($b > 1$, caso 2) ou parabólica ($b < 1$, caso 3)

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2019).

Legenda: Mt é a quantidade de fármaco liberado ao tempo t ; M_0 é a quantidade de fármaco em solução ao início da liberação (em geral é zero); M_∞ é a quantidade de fármaco máxima para liberação.

O modelo descrito por Korsmeyer-Peppas é geralmente usado para analisar a liberação de fármacos de matrizes poliméricas, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando está envolvido mais de um tipo de mecanismo de liberação, ou seja, quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não-Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas). Neste modelo tem-se a incorporação das características estruturais e geométricas da matriz, sendo necessário que a liberação ocorra unidimensionalmente e que a relação largura-espessura ou comprimento-espessura seja menor que 10. Assim o modelo fornece k_{KP} como a constante cinética e n o expoente de liberação cujo valor numérico caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco como mostrado na Quadro 2.

Outro modelo é descrito por Peppas-Sahlin, que traz os efeitos da difusão fickiana e do transporte do Caso II, em dois termos separados. O primeiro termo da equação representa a contribuição da difusão fickiana e o segundo termo refere-se a contribuição do relaxamento do polímero no mecanismo de liberação. As constantes determinadas neste mecanismo são k_D de difusão e k_R de relaxamento e m é o

expoente de liberação, relacionado ao mecanismo de liberação e está também intimamente relacionada com a geometria da matriz de liberação.

Quadro 2 – Valores para o expoente n com a interpretação dos mecanismos de liberação, para matrizes na forma de cilindro

Expoente de Liberação (n)	Mecanismo de transporte do fármaco	Velocidade como uma função do tempo
$n < 0,45$	Difusão Quasi-Fickiana	t^n
0,45	Difusão Fickiana	$t^{0,5}$
$0,45 < n < 0,89$	Anomalo (Transporte não-Fickiano)	t^{n-1}
0,89	Transporte caso II	Independente do tempo (Ordem Zero)
$n > 0,89$	Transporte super caso II	t^{n-1}

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2019).

Higuchi desenvolveu teoricamente vários modelos para a liberação de fármacos hidrossolúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes semi-sólidas e/ou sólidas. Esse mecanismo de liberação é descrito como um processo de difusão baseado na lei de Fick (SHAIKH et al., 2015), estando dependente da raiz quadrada do tempo e sendo o fármaco homogeneamente disperso em matriz uniforme e k_H como a constante de liberação. Para matrizes que intumescem e que podem ser erodíveis, deve-se atender a propriedade do relaxamento das cadeias poliméricas para o transporte do fármaco, levando a equação de Higuchi a algumas limitações na interpretação.

O modelo de Weibull é descrito por uma equação empírica, que foi adaptada para o processo de dissolução/liberação e pode ser aplicada para quase todos os tipos de curvas de dissolução. Este modelo por si só não descreve a cinética de liberação, mas a forma da curva de dissolução através de seus parâmetros (Quadro 1).

Esses modelos são aplicados para analisar o principal mecanismo de liberação de diferentes tipos de sistemas. No entanto, todos eles devem ser usados para os primeiros 60% de uma curva de liberação (SAURÍ et al., 2014; UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2018; SIEPMANN; PEPPAS, 2001). A soma dos quadrados dos desvios (SQD) pode ser obtida para se determinar o modelo com melhor ajuste. O valor mínimo do SQD infere ao melhor modelo para os dados experimentais (SERRA et al., 2006). No entanto, como o número total de parâmetros afeta o valor do SQD, é necessário o uso de um critério independente do número de parâmetros em cada

modelo. Portanto, o Critério de Informação de Akaike (AIC) foi usado como dado abaixo (AKAIKE, 1976; UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2018):

$$AIC = N (\ln SQD) + 2p$$

onde **N** é o número de pontos de dados experimentais, **p** é o número de parâmetros em um modelo estimado e SQD é a soma dos quadrados dos desvios. O modelo com o menor valor de AIC é considerado o modelo mais adequado ao mecanismo de liberação (COSTA; LOBO, 2001; SERRA et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar *in vitro* a capacidade de liberação dos antibióticos sulfato de amicacina, sulfato de gentamicina e cloridrato de ciprofloxacina associado ao compósito a base de quitosana, nanotubos de carbono e hidroxiapatita (QNCHA).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Incorporar os antibióticos sulfato de amicacina, sulfato de gentamicina e cloridrato de ciprofloxacina em compósitos de quitosana, nanotubos de carbono e hidroxiapatita, a partir de duas formas diferentes, sendo elas, no momento da confecção do arcabouço e através de imersão quando este já estiver pronto;
- Caracterização do compósito quanto a sua porosidade e intumescimento;
- Estudar a liberação *in vitro*, verificando-se a quantidade de antibiótico liberado através da espectrofotometria UV-visível.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Fármacos

Os fármacos utilizados foram sulfato de amicacina¹, sulfato de gentamicina² e cloridrato de ciprofloxacina³. Estes princípios ativos foram adquiridos comercialmente, pelo Laboratório Buenos Ayres, em forma de pó e foram incorporados ao biomaterial no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC – USP).

4.1.2 Biomaterial na forma de matriz

Os compósitos a base de quitosana, nanotubos de carbono e hidroxiapatita (QNCHA) foram preparados e caracterizados pelo Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos – USP sob a responsabilidade da Prof^a. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis. Para a obtenção de quitosana utilizou-se gládios de lulas do gênero *Doryteuthis spp*, cedidas por Miami Comércio e Exportação de Pescados Ltda. (Cananéia-SP). A HA foi sintetizada a partir de nitrato de cálcio e fosfato de amônio. Os nanotubos de carbono (NC) utilizados foram de parede múltipla e funcionalizados com ácido carboxílico (> 8%) da marca Aldrich, diâmetro médio de 9,5nm e comprimento de 1,5µm. Todos os demais reagentes utilizados na obtenção dos materiais e matrizes foram de grau PA. O protocolo de produção e caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) está apresentado no Anexo A.

¹ Sulfato de amicacina, Laboratório Buenos Ayres, Registro: 554740, S.P., Brasil.

² Sulfato de gentamicina, Laboratório Buenos Ayres, Registro: 554737, S.P., Brasil.

³ Cloridrato de ciprofloxacina, Laboratório Buenos Ayres, Registro: 554739, S.P., Brasil.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ

4.2.1 Porosidade

A porosidade da matriz foi determinada seguindo o procedimento descrito por Hu et al., 2018, sendo feita em triplicata. As matrizes secas foram pesadas e imersas em 3ml de etanol por aproximadamente 24 h a temperatura ambiente, até que estivessem saturadas, sendo retiradas do etanol e novamente pesadas. A porosidade foi determinada segundo a equação (1):

$$P = \frac{m_2 - m_1}{\rho(V_2 - V_1)} \times 100 \quad (1)$$

Nesta equação, m_1 e m_2 referem-se as massas das matrizes, antes e após a imersão em etanol, respectivamente; V_1 e V_2 se referem ao volume da matriz antes e após a saturação em álcool, e ρ é a densidade do etanol.

4.2.2 Intumescimento

As matrizes foram pesadas e colocadas em frascos contendo 5ml de tampão fosfato salino PBS pH 7,4 a temperatura ambiente, e em intervalos de tempo conhecidos foram retiradas e pesadas, sendo em seguida retornadas aos frascos com tampão para novas medidas de tempo.

O procedimento foi feito em quintuplicata. Ao final, calculou-se a quantidade tampão absorvida pela matriz, utilizando-se a equação (2):

$$\%sol = \frac{m_u - m_s}{m_s} \times 100 \quad (2)$$

Nesta equação: % sol é a porcentagem de PBS absorvida pela matriz, m_u é a massa úmida da matriz, e m_s a massa seca.

4.3 INCORPORAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS

Foram feitos dois métodos de incorporação dos antibióticos amicacina, gentamicina ou ciprofloxacina, às matrizes desse biomaterial. Primeiramente os antibióticos foram adicionados durante o preparo da mistura base para a confecção das matrizes, nas concentrações de 5 ou 10% desses fármacos em relação a massa seca da mistura preparada, como descrito no Anexo A.

Um segundo método de incorporação foi feito com as matrizes já prontas. Cada matriz foi pesada e imersa em 10ml da solução dos respectivos antibióticos na concentração de 10 mg ml⁻¹, durante 24h sendo então removida da solução, lavada rapidamente com água deionizada, congelada, liofilizada em equipamento da marca Edwards modelo *Freeze Dryer Modulyo (Edwards High Vacuum International)* e novamente pesada. A quantidade de fármaco incorporada na matriz foi calculada de acordo com a equação (3). Todos os fármacos tiveram sua incorporação feita em quintuplicata.

$$\% \text{ incorporada} = \frac{\text{massa}_{\text{final}} - \text{massa}_{\text{inicial}}}{\text{massa}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (3)$$

4.4 ESTUDO DE LIBERAÇÃO DE ANTIBIÓTICO

4.4.1 Curvas de Calibração

4.4.1.1 Cloridrato de Ciprofloxacina

Uma solução estoque para ciprofloxacina foi preparada pesando-se 1,7mg de ciprofloxacina que foram dissolvidos em 50ml de PBS, obtendo-se uma concentração de 34 µg/ml. A partir desta solução foram feitas as diluições para as concentrações de 1,70; 3,40; 5,44; 6,80; 7,48; 10,20 e 13,60 µg/ml.

Essas soluções foram colocadas em cubetas de quartzo de 1cm de caminho ótico e foram feitas varreduras de comprimento de onda de 225-375nm em espectrofotômetro UV-visível, Modelo HITACHI U-1000. A partir das curvas obtiveram-se os valores de Absorbância a 271nm para se construir a curva de calibração de Abs_{271nm} em função da concentração (µg/ml).

4.5.1.2 Sulfato de Amicacina e Gentamicina

Os dois aminoglicosídeos tiveram suas curvas de calibração feitas com o mesmo procedimento. Foram preparadas soluções estoque para amicacina e gentamicina pesando-se 10 mg de Amicacina e 10 mg de Gentamicina, que foram dissolvidos em 50ml de PBS, obtendo-se em ambos os casos concentrações de 200 µg/ml. A partir destas soluções foram feitas as diluições para as concentrações de 40, 80, 100, 120, 140, 160 µg/ml.

Para a leitura em espectrofotômetro de UV-Visível dessas soluções foi necessário fazer uma reação de derivatização. Essa reação foi feita com 1,0ml de cada solução estoque adicionando-se 1,0ml de solução de NaHCO_3 2% e 2,0ml de solução de 2,4-dinitrofluorbenzeno 0,25% (DNFB) em etanol 95%, agitando-se e, após 30 min em repouso foi adicionado 0,5ml de HCl 0,1 mol l^{-1} . O DNFB é usado para formar produtos que absorvem na região do ultravioleta com antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, no caso da gentamicina, o DNFB reage com a amina terminal (RYANG, 1984). A reação do cromóforo formado com a gentamicina está representada na Figura 1.

Fonte: Ogawa (2002).

Essas soluções foram colocadas em cubetas de quartzo de 1,0cm de caminho ótico e foram feitas varreduras de comprimento de onda de 390-500nm em espectrofotômetro UV-visível, Modelo HITACHI U-1000. A partir das curvas obtiveram-se os valores de Absorbância a 415nm para se construir a curva de calibração de $\text{Abs}_{415\text{nm}}$ em função da concentração ($\mu\text{g/ml}$) para cada antibiótico.

4.4.2 Ensaios de Liberação

O estudo de liberação foi feito imergindo-se o compósito contendo o antibiótico, pesando cerca de 150mg, em 100ml de tampão fosfato salino (PBS) pH

7,4, em uma célula de vidro, devidamente identificada com o peso da matriz (Figura 2), e então colada em Banho Dubnoff (Figura 3) sob agitação constante a 75rpm e 37°C. Alíquotas de 1ml da solução foram retiradas em tempos pré-determinados (5, 10, 15, 20, 30, 60, 100, 120, 240, 360, 480, 1440 min) e então repostas com tampão fresco para manter o volume fixo.

Figure 2 – Fotografia digital do compósito com ciprofloxacina a 5% e 10%, adicionados em célula contendo PBS

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Compósitos impregnados com cloridrato de ciprofloxacina a 5% e 10%, com suas massas identificadas e imersas em PBS.

Figure 3 – Fotografia digital das células com sulfato de amicacina a 5% e 10% em quintuplicata, distribuídas em Banho Dubnoff

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Compósitos QNCHA imersos em PBS em Banho Dubnoff com agitação de 75rpm e temperatura de 37°C.

As alíquotas referentes ao compósito contendo ciprofloxacina, foram diluídas para 5ml com PBS, e a leitura procedeu-se em 271nm em espectrofotômetro UV-visível, Modelo HITACHI U-1000. Porém, quando as alíquotas eram de soluções provenientes das matrizes com aminoglicosídeos, anteriormente à leitura realizou-se derivatização com o mesmo procedimento feito para as curvas de calibração e com as leituras em 415nm. O estudo de liberação foi realizado em quintuplicata para cada fármaco e método de incorporação.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de liberação dos fármacos a 24h foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para encontrar diferenças significativas entre os dados, utilizando como nível de significância o valor de 5%.

4.6 ANÁLISE DOS MECANISMOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DOS ANTIBIÓTICOS

A partir dos dados de liberação obtidos foi feito o procedimento de modelagem usando a ferramenta adicional DD solver no Microsoft® Excel, que pode estimar os parâmetros de uma função não linear fornecendo o ajuste mais próximo entre dados experimentais e a função não linear. Os modelos matemáticos foram empregados no perfil de liberação (Ordem Zero, Higuchi, Hixson–Crowell, Korsmeyer Peppas e Weibull), utilizaram dados referentes a 60% de fármaco liberado.

5 RESULTADOS

As matrizes mostraram-se compactas e com uma coloração cinza devido à presença dos nanotubos de carbono (Figura 4).

Figure 4 – Fotografia digital da matriz

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

As matrizes foram caracterizadas como descrito no Anexo A. Além dessas caracterizações foram feitas a determinação da porosidade e do grau de intumescimento da matriz.

5.1 CARACTERIZAÇÃO COMPLEMENTAR DAS MATRIZES

5.1.2 Determinação da Porosidade

As imagens obtidas através da MEV (Figura 4 do Apêndice A) ilustram uma matriz praticamente sem a presença de poros, que foi comprovado pelo o ensaio de porosidade o qual se obteve um valor de $4,41 \pm 0,12\%$, obtido através da equação 1.

5.1.2 Determinação do grau de intumescimento

O estudo de absorção em PBS mostrou que o intumescimento dessas matrizes é bastante rápido, chegando a 410% de absorção em relação à massa seca nos dois primeiros minutos, valor esse obtido através da equação 2 (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Curva de absorção em PBS dos QNCHA

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Gráfico de % de absorção em função do tempo (min) para obtenção do valor de absorção do QNCHA.

5.2 INCORPORAÇÃO DE ANTIBIÓTICO

Os três fármacos foram incorporados à matriz pelas duas metodologias descritas, mistura e imersão. Na primeira o antibiótico foi incorporado com 5 e 10% de antibiótico em relação a massa seca da matriz. Na segunda metodologia a matriz pronta foi submetida a uma imersão em soluções dos antibióticos e essa incorporação resultou nos valores descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Porcentagem de incorporação obtida após a imersão das matrizes em solução concentrada de antibiótico

Antibiótico	% Incorporada
Sulfato de Amicacina	11,02 ± 0,63
Sulfato de Gentamicina	10,19 ± 0,64
Cloridrato de Ciprofloxacina	16,09 ± 2,44

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Porcentagem impregnada por imersão de sulfato de amicacina, sulfato de gentamicina e cloridrato de ciprofloxacina nas matrizes.

No Gráfico 2 pode ser visto de forma mais clara a diferença na incorporação existente entre os três tipos de fármacos utilizados.

Gráfico 2 – Porcentagem de incorporação obtida após a imersão das matrizes em solução concentrada de antibiótico

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Porcentagem de incorporação em função do sulfato de amicacina, sulfato de gentamicina e cloridrato de ciprofloxacina pelo método de imersão.

5.3 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO DE ANTIBIÓTICO

5.3.1 Curvas de Calibração

Para quantificação dos antibióticos liberados pela matriz foi necessária a obtenção de curvas de calibração para cada antibiótico, que podem ser observadas nos Gráficos 3 a 8, juntamente com suas respectivas equações e o valor de R^2 . Para a curva de calibração da ciprofloxacina diluiu-se uma solução estoque ($34\mu\text{g/ml}$) deste antibiótico para concentrações variando entre $1,7$ e $13,6\mu\text{g/ml}$, com PBS. Para a curva de calibração da amicacina e da gentamicina diluiu-se uma solução estoque ($200\mu\text{g/ml}$) para concentrações variando entre 40 e $200\mu\text{g/ml}$. As soluções estoques foram feitas dissolvendo-se uma quantidade necessária de fármaco em tampão. A leitura foi realizada em varredura de espectro onde é possível observar, através do pico, o espectro ideal para leitura das amostras. A partir destas curvas, obteve-se a reta com seus respectivos valores de R^2 , que estão dentro do esperado, ou seja, próximo a 1.

Gráfico 3 – Curva de calibração para sulfato de amicacina, varredura e leitura em 415nm.

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Curva de calibração para sulfato de amicacina lida em espectrofotômetro UV-visível (415nm).

Gráfico 4 – Reta obtida a partir da curva de calibração para sulfato de amicacina. Varredura e leitura em 415nm.

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Equação obtida através da curva de calibração para sulfato de amicacina com valor de r , índice de correlação linear.

Gráfico 5 – Curva de calibração para sulfato de gentamicina, varredura e leitura em 415nm.

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Curva de calibração para sulfato de gentamicina lida em espectrofotômetro UV-visível (415nm).

Gráfico 6 – Reta obtida a partir de curva de calibração para sulfato de gentamicina, varredura e leitura em 415nm.

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Equação obtida através da curva de calibração para sulfato de gentamicina com valor de r , índice de correlação linear.

Gráfico 7 – Curva de calibração para cloridrato de ciprofloxacina, varredura e leitura em 271nm.

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Curva de calibração para cloridrato de ciprofloxacina lida em espectrofotômetro UV-visível (271nm).

Gráfico 8 – Reta obtida a partir de curva de calibração para cloridrato de ciprofloxacina, varredura e leitura em 271nm.

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Equação obtida através da curva de calibração para cloridrato de ciprofloxacina com valor de r , índice de correlação linear.

5.3.2 Liberação dos antibióticos das matrizes

A amicacina, a gentamicina e a ciprofloxacina foram incorporadas ao QNCHA a fim de quantificar a taxa de liberação em função do tempo. Assim como detalhado na metodologia proposta, os antibióticos foram incorporados em duas concentrações diferentes (5 e 10%) nas matrizes, enquanto fazia-se o preparo das

mesmas, e também através da imersão em solução concentrada desses antibióticos, quando estes arcabouços já estavam prontos.

Para a análise do sistema de liberação do sulfato de amicacina foi adicionado o antibiótico ao QNCHA e então estudado o padrão obtido. O Gráfico 9 ilustra os três grupos analisados, 5%, 10% e imersão.

Gráfico 9 – Curva de liberação de sulfato de amicacina, nos Grupos 5%, 10% e imersão

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Comparação entre as taxas de liberação do compósito QNCHA com 5%, 10% e impregnado por imersão de sulfato de amicacina.

Foi possível verificar que a taxa de liberação se eleva em função do tempo, apresentando certa constância após seis horas de liberação. Normalizando-se as liberações considerando todos os compósitos como tendo 150mg, então para 5% de antibiótico tem-se uma massa de 7,5mg do fármaco. Se essa matriz tiver 10% de antibiótico então teríamos 15mg do fármaco. Contudo, se essa matriz tiver a incorporação posterior de fármaco então para a amicacina que teve 11,02% de antibiótico incorporado, teríamos 16,53mg do fármaco.

Utilizando-se os valores de M_t / M_{∞} para cada tempo com esta matriz e fazendo a média das $\mu\text{g ml}^{-1}$ das replicatas temos a Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de liberação em $\mu\text{g ml}^{-1}$ para matrizes com sulfato de amicacina

T(min)	$\mu\text{g ml}^{-1}$		
	5%	10%	Imersão
10	27,89 $\pm$ 11,35	18,32 $\pm$ 2,65	56,19 $\pm$ 21,68
20	39,82 $\pm$ 10,58	32,02 $\pm$ 5,30	113,37 $\pm$ 18,70
60	52,67 $\pm$ 3,56	67,36 $\pm$ 9,09	127,03 $\pm$ 14,90
120	53,31 $\pm$ 6,85	92,80 $\pm$ 9,18	122,78 $\pm$ 12,00
240	47,34 $\pm$ 3,52	108,78 $\pm$ 3,63	114,35 $\pm$ 15,89
360	54,81 $\pm$ 1,97	113,02 $\pm$ 3,99	125,63 $\pm$ 6,91
480	54,59 $\pm$ 1,02	112,35 $\pm$ 1,84	122,44 $\pm$ 11,34
1440	56,12 $\pm$ 2,10	114,15 $\pm$ 2,23	125,79 $\pm$ 12,17

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Valores obtidos em $\mu\text{g ml}^{-1}$ durante período de liberação das matrizes impregnadas com sulfato de amicacina.

A amicacina apresentou taxas distintas de liberação inicial entre os grupos, variando entre 37,19%, 12,21% e 33,99% nos Grupos 5%, 10% e imersão, respectivamente, nos primeiros dez minutos de liberação. As taxas liberadas apresentaram-se diferentes entre si, até próximo de quatro horas, o qual teve uma liberação de 63,13% no Grupo 5%, 72,52% no Grupo 10% e 69,18% no Grupo imersão.

O comportamento de liberação constante pode ser observado nos três grupos estudados a partir de seis horas das matrizes imersas em PBS. Sendo alcançado liberação máxima de 74,8 $\pm$ 2,8% no Grupo 5%, 76,1 $\pm$ 1,5% no Grupo 10% e 76,1 $\pm$ 7,4% no Grupo imersão como ilustrado na Gráfico 9. Os três grupos apresentaram valores estatisticamente iguais com P=1,0 como observado na Tabela 3, o qual valores estatísticos iguais são representados por letras iguais.

Tabela 3 – Tabela comparativa das formas de incorporação, porcentagem incorporada e liberada após 24 horas do sulfato de ampicilina, sulfato de gentamicina e cloridrato de ciprofloxacina.

Antibiótico	Modo de Incorporação	% Incorporada	% Liberada
Ampicilina	mistura	5	74,8 ± 2,8 ^{b,c}
	mistura	10	76,1 ± 1,5 ^{b,c}
	Imersão	11,02 ± 0,63	76,1 ± 7,4 ^{b,c}
Gentamicina	mistura	5	71,5 ± 9,8 ^{b,c}
	mistura	10	90,3 ± 9,2 ^a
	Imersão	10,19 ± 0,64	77,7 ± 6,7 ^{a,b}
Ciprofloxacina	mistura	5	65,1 ± 4,1 ^c
	mistura	10	51,7 ± 7,0 ^d
	Imersão	16,09 ± 2,44	37,5 ± 1,4 ^e

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Na mesma coluna, letras iguais (a-e) significam valores estatisticamente iguais enquanto que letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

O sulfato de gentamicina foi também impregnado ao QNCHA a fim de estudar o sistema de liberação desse antibiótico. O comportamento obtido na análise dos três grupos pode ser observado na Gráfico 10.

Gráfico 10 – Curva de liberação do sulfato de gentamicina nos Grupos 5%, 10% e imersão.

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Comparação entre as taxas de liberação do compósito QNCHA com 5%, 10% e impregnado por imersão de sulfato de gentamicina.

Assim como citado anteriormente, ao normalizar a liberação de cada fármaco para M_{∞} fixo em cada grupo, tem-se para o sulfato de gentamicina uma incorporação de 10,19% de antibiótico pelo processo de imersão, que equivale a 15,28 mg de fármaco. Desta forma, utilizando os valores de M_t/M_{∞} para cada tempo com esta matriz e fazendo a média por $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cada liberação, observa-se a tabela a seguir:

Tabela 4 – Valores de liberação em $\mu\text{g ml}^{-1}$ para matrizes com sulfato de gentamicina.

T(min)	$\mu\text{g ml}^{-1}$		
	5%	10%	Imersão
10	16,21 $\pm$ 3,94	11,69 $\pm$ 7,53	15,20 $\pm$ 9,11
20	28,45 $\pm$ 2,22	31,98 $\pm$ 11,71	98,32 $\pm$ 12,06
60	47,06 $\pm$ 5,16	98,09 $\pm$ 19,39	115,81 $\pm$ 14,86
120	53,46 $\pm$ 12,82	125,75 $\pm$ 12,83	128,38 $\pm$ 17,03
240	66,93 $\pm$ 8,39	138,48 $\pm$ 17,15	143,81 $\pm$ 18,78
360	61,54 $\pm$ 4,97	137,17 $\pm$ 9,69	130,32 $\pm$ 14,68
480	61,29 $\pm$ 8,69	120,79 $\pm$ 3,32	133,03 $\pm$ 8,19
1440	53,63 $\pm$ 7,32	135,51 $\pm$ 13,84	118,77 $\pm$ 10,20

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Valores obtidos em $\mu\text{g ml}^{-1}$ durante período de liberação das matrizes impregnadas com sulfato de gentamicina.

Foi observado uma liberação de gentamicina de 7,79% e 9,95%, nos Grupos 10% e imersão, respectivamente, após dez minutos de imersão em PBS. Já os compósitos impregnados com 5% do antibiótico apresentaram uma taxa de 21,61% neste mesmo intervalo de tempo.

De uma forma geral, até quatro horas de análise pode ser observado um aumento gradativo da quantidade de antibiótico liberada no decorrer do tempo, nos três grupos analisados. A partir das seis horas é possível observar uma constância na curva de liberação, mesmo assim é notado um acréscimo na liberação no ponto de 24 horas em relação a oito horas, quando se trata do Grupo 10%. Enquanto que no Grupo imersão, é visto uma diminuição neste mesmo intervalo de tempo.

O Grupo 5% e imersão apresentam taxas de liberação semelhantes entre si, sendo $71,5 \pm 9,8\%$ e $77,7 \pm 6,7\%$ respectivamente corroborando com o fato de serem estatisticamente iguais ($P=0,82$). São observados valores estatísticos iguais

também entre o Grupo 10% e imersão ($P=0,070$), porém apesar de possuírem quantidade semelhante de antibiótico, o Grupo 10% apresentou em 24 horas $90,3 \pm 9,2\%$, enquanto que o Grupo imersão teve $77,7\% \pm 6,7$ de antibiótico liberado. Foi observado valores estatisticamente diferentes entre o Grupo 5% e 10% ($P=0,002$)

O comportamento das matrizes contendo cloridrato de ciprofloxacina também foi estudado e a liberação dos três grupos pode ser visto no Gráfico 11.

Gráfico 11 – Curva de liberação de cloridrato de ciprofloxacina nos Grupos 5%, 10% e imersão.

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Comparação entre as taxas de liberação do compósito QNCHA com 5%, 10% e impregnado por imersão de cloridrato de ciprofloxacina.

No caso da ciprofloxacina, ao seguir o mesmo preceito utilizado para a ampicilina e gentamicina, para uma incorporação de 16,09% de antibiótico pelo método de imersão, tem-se 24,13 mg do fármaco. Sendo assim, os valores de liberação em $\mu\text{g ml}^{-1}$ em função do tempo são demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de liberação $\mu\text{g mL}^{-1}$ para matrizes com cloridrato de ciprofloxacina

T(min)	$\mu\text{g mL}^{-1}$		
	5%	10%	Imersão
10	16,22 $\pm$ 1,33	35,95 $\pm$ 20,23	21,11 $\pm$ 8,98
20	19,60 $\pm$ 2,72	43,97 $\pm$ 17,35	30,73 $\pm$ 9,75
60	25,41 $\pm$ 2,75	52,47 $\pm$ 18,07	48,13 $\pm$ 10,88
120	30,56 $\pm$ 4,13	59,03 $\pm$ 17,22	60,89 $\pm$ 9,71
240	33,41 $\pm$ 5,08	64,82 $\pm$ 15,99	70,08 $\pm$ 6,76
360	37,67 $\pm$ 4,39	66,15 $\pm$ 17,43	76,41 $\pm$ 5,55
480	38,48 $\pm$ 3,92	70,38 $\pm$ 14,97	82,10 $\pm$ 4,59
1440	48,85 $\pm$ 3,08	77,56 $\pm$ 10,49	90,41 $\pm$ 3,32

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Valores obtidos em $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante período de liberação das matrizes impregnadas com sulfato de ciprofloxacina.

A ciprofloxacina apresentou uma liberação inicial de 21,63% e 23,96% nos Grupos 5% e 10%, respectivamente, nos primeiros dez minutos de liberação. Já o Grupo imersão, nesse mesmo intervalo de tempo, liberou 8,74% do antibiótico incorporado.

Após seis horas de análise é observado um padrão de liberação constante principalmente nos Grupos 10% e imersão, notando-se pequeno acréscimo em ambos os grupos na análise de 24 horas, em relação ao período de 8 horas. O Grupo 5% mostrou-se constante nas coletas de seis e oito horas porém apresentou um aumento significativo na última análise.

A ciprofloxacina teve maior taxa de liberação, chegando aos 65,1 $\pm$ 4,1% de antibiótico liberado no Grupo 5%, o qual teve uma menor porcentagem incorporada. Já no Grupo 10%, a liberação máxima chegou a 51,7 $\pm$ 7,0%, ainda assim foi superior ao Grupo imersão o qual apresentou liberação máxima de 37,5 $\pm$ 1,4%. Quando comparado Grupo 5% e Grupo 10% obteve-se valores estatisticamente diferentes ($P=0,017$). Também houve diferença estatística ao comparar Grupo 5% e Grupo imersão ($P=0,007$) e Grupo 10% com Grupo imersão ($P=0,015$).

Conforme pode ser visualizado na Tabela 3, a porcentagem máxima de antibiótico liberada em 24 horas de análise, foi inverso da porcentagem incorporada inicialmente.

Ao realizar uma avaliação conjunta dos compósitos com 5% de antibiótico, foi observado um perfil de liberação bastante semelhante como pode ser visto no

Gráfico 12. Foi observado valores estatísticos iguais ao comparar nessa mesma concentração os compósitos com amicacina e gentamicina ($P=0,973$), compósitos com amicacina e ciprofloxacina ($P=0,087$) e compósitos com gentamicina e ciprofloxacina ($P=0,768$).

Gráfico 12 - Curva de liberação de cloridrato de ciprofloxacina, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina a 5%.

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Comparação entre as taxas de liberação do compósito QNCHA com 5% de cloridrato de ciprofloxacina, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina.

Esta mesma comparação foi realizada com os grupos com 10% de antibiótico incorporado, e neste caso foi observado que o compósito com gentamicina apresentou maior porcentagem de liberação quando comparado com os demais, sendo que o grupo contendo ciprofloxacina ainda foi o que obteve menor percentual de liberação (Gráfico 13). Foi observado valores estatisticamente diferente ao comparar nesta mesma concentração compósitos com amicacina e gentamicina ($P=0,026$), compósitos com amicacina e ciprofloxacina ($P=0,026$) e compósitos com gentamicina e ciprofloxacina ($P=0$).

Gráfico 13 - Curva de liberação de cloridrato de ciprofloxacina, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina a 10%.

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Comparação entre as taxas de liberação do compósito QNCHA com 10% de cloridrato de ciprofloxacina, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina.

Ao correlacionar os três antibióticos impregnados por imersão foi possível observar no Gráfico 14, que embora graficamente o desenho de liberação seja semelhante para todos os fármacos, os grupos contendo aminoglicosídeos, que possuem valores estatísticos iguais ($P=0,999$), atingiram em 24 horas valores bem mais alto quando comparado com o grupo contendo ciprofloxacina. Ao comparar Grupo imersão amicacina e Grupo imersão ciprofloxacina obteve-se valores estatisticamente diferentes ($P=0$), assim como Grupo imersão gentamicina e Grupo imersão ciprofloxacina ($P=0$).

Gráfico 14 - Curva de liberação de cloridrato de ciprofloxacina, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina a impregnado por imersão.

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2020).

Legenda: Comparação entre as taxas de liberação do compósito QNCHA com cloridrato de ciprofloxacina, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina impregnado por imersão.

5.4 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO

A Tabela 6 mostra os resultados cinéticos da liberação dos antibióticos estudados, sendo que para os dois aminoglicosídeos incorporados pelo método de imersão não foi possível ser feita a modelagem devido ao pequeno número de pontos com valores de $Mt/M_{\infty} < 0,60$ (3 pontos).

Tabela 6 – Dados cinéticos da liberação *in vitro* dos antibióticos da matriz QNCHA.

Modelos	Matrizes								
	Amicacina			Ciprofloxacina			Gentamicina		
	5%	10%	Imersão	5%	10%	Imersão	5%	10%	Imersão
Ordem Zero									
k₀	0,02392	0,0064		0,0015	0,0005	0,0004	0,0118	0,0010	
R²	0,9096	0,9433		0,8078	0,6319	0,7422	0,9519	0,9766	
SQD	0,07413	0,05289		0,46462	0,8984	0,2948	0,04086	0,00235	
AIC	-13,61	-21,52		-7,20	0,61	-13,88	-13,99	-28,27	
Korsmeyer-Peppas									
k_{KP}	0,1477	0,0382		0,1404	0,1787	0,0653	0,0573	0,0145	
n	0,4067	0,5805		0,2140	0,1540	0,2566	0,5868	0,8809	
R²	0,9965	0,9861		0,9958	0,9904	0,9746	0,9910	0,9793	
SQD	0,00151	0,00669		0,00105	0,0044	0,0085	0,00383	0,00205	
AIC	-34,98	-36,05		-78,36	-66,53	-58,03	-23,83	-26,94	
Peppas-Sahlin									
k_d	0	0		0	0	0	0	0	
k_r	0,1477	0,0382		0,1404	0,1787	0,0653	0,0573	0,0145	
m	0,2033	0,2902		0,1070	0,0770	0,1283	0,2934	0,4404	
R²	0,9965	0,9861		0,9978	0,9904	0,9746	0,9910	0,9793	
SQD	0,00151	0,00669		0,00105	0,0044	0,00846	0,00383	0,00205	
AIC	-32,98	-34,05		-76,36	-64,53	-56,03	-21,83	-24,94	
Higuchi									
k_H	0,1126	0,0525		0,0302	0,0212	0,0143	0,0778	0,04606	
R²	0,9923	0,9853		0,99240	0,8185	0,8981	0,9876	0,9493	
SQD	0,00391	0,00942		0,13328	0,3417	0,07621	0,00608	0,00547	
AIC	-31,27	-35,32		-22,18	-11,96	-31,46	-23,51	-24,04	
Weibull									
a	7,58	35,85		7,29	5,52	16,70	26,46	86,31	
b	0,5575	0,7287		0,2718	0,2009	0,0336	0,8003	0,9961	
R²	0,9976	0,9912		0,9983	0,9936	0,9803	0,9925	0,9810	
SQD	0,00104	0,00422		0,0008	0,00294	0,00654	0,00318	0,00189	
AIC	-37,19	-39,75		-81,53	-71,78	-61,37	-24,76	-27,35	

Fonte: (RUIVO, M. R. B. A., 2019).

Legenda: SQD - soma dos quadrados dos desvios

AIC - critério de informação de Akaike ("*Akaike information criteria*") (Akaike, 1976; Unagolla e Jayasuriya, 2018).

De acordo com os resultados obtidos após o ajuste dos modelos cinéticos descritos no Quadro 1 (página 42), pode-se observar que o modelo de Weibull é o

mais adequado dentre os modelos estudados devido aos menores valores de AIC observados. Embora esse modelo não possa caracterizar adequadamente as propriedades cinéticas de liberação do fármaco, ele pode descrever a curva de dissolução em termos de parâmetros aplicáveis. O parâmetro **b** caracteriza a forma da curva de liberação dependendo do seu valor (Tabela 6), em todos os casos foi obtido $b < 1$ indicando que a curva de liberação é descrita por uma parábola.

Ao levar em consideração os modelos que descrevem o mecanismo de liberação, o de Korsmeyer – Peppas passa a ser o mais adequado já que obtivemos o valor mínimo de AIC em todos os casos exceto para gentamicina 10% onde prevalece o mecanismo de ordem zero. Os valores do expoente de liberação **n** estiveram entre $0,45 < n < 0,89$ sugerindo um transporte anômalo para os aminoglicosídeos. Para a ciprofloxacina os valores de **n** foram menores que 0,45 sugerindo um transporte quase-fickiano.

6 DISCUSSÃO

Os resultados da pesquisa suportam o uso das matrizes a base de quitosana, nanotubos de carbono e hidroxiapatita como dispositivos de liberação farmacológica. Foi observado que as matrizes impregnadas com antibiótico foram capazes de efetuar a liberação dos mesmos independentemente da concentração e da forma de incorporação.

6.1 ENSAIO DE POROSIDADE

Nos estudos realizados por Uskokovic (2019) foi analisado a interferência que a cinética de cristalização dos pós precursores da HA exerce sobre cinética de liberação do antibiótico, sendo isso avaliado na vancomicina e na ciprofloxacina. Neste estudo, aqui realizado, foi constatado que esta formação afeta não somente a cinética, mas também o mecanismo de liberação. No entanto, foi observado que a porosidade, que muitas vezes é um determinante crítico na cinética de liberação, não tem papel significativo no controle da taxa liberada do medicamento, sendo isso muitas vezes controlado por uma junção tripla entre a superfície da partícula, a água, e a molécula do fármaco.

A porosidade das matrizes utilizadas neste experimento é relativamente pequena, porém mesmo assim obteve-se uma liberação relativamente alta principalmente quando se trata dos aminoglicosídeos, concordantemente com o relatado por Uskokovic (2019), que relata que a cinética de liberação não depende unicamente da porosidade da matriz mas sofre também efeito da molécula do fármaco.

Quando objetiva-se regeneração óssea além da liberação farmacológica, a porosidade também deve ser considerada, já que implantes porosos favorecem o crescimento de novo tecido ósseo por conta da colonização celular, neovascularização, migração e adesão de células osteoprogenitoras (MONÇÃO; ROSA, 2019). A porosidade também é responsável por favorecer a ancoragem entre o implante e o hospedeiro (SEPULVEDA et al., 1999; ARITA et al., 1994).

6.2 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO

O intumescimento é descrito como o aumento no volume do polímero quando este está imerso em um determinado solvente, ou também pode ser determinado a partir da quantidade de massa de fluido absorvida pelo polímero em relação a sua massa inicial. Esse grau pode variar de acordo com a presença de grupos hidrofílicos em regiões acessíveis, a densidade de ligações cruzadas que modificam a elasticidade da rede polimérica tridimensional e os espaços vazios que podem ser ocupados pela água (CAMPOS et al., 2005; ZHANG et al., 2007).

No compósito deste estudo tem-se a quitosana com uma grande capacidade de retenção de água devido à presença dos grupos aminos e hidroxílicos em sua estrutura, que efetuam um grande número de ligações de hidrogênio com a água presente no PBS, contudo espaços vazios são refletidos na porosidade e como esta é pequena o intumescimento é menor do que se a matriz fosse constituída somente de quitosana. Este fato foi demonstrado em outros estudos onde o grau de intumescimento diminui quanto maior o conteúdo de HA presente (OGAWA, 2002; REVES, 2012).

A habilidade de absorção de água é um fator importante para materiais em regeneração tecidual, pois ela permite a absorção de fluidos corpóreos e a transferência de metabólitos e nutrientes e até mesmo migração de células responsáveis pela reconstituição do tecido danificado. Capacidade de intumescimento é uma característica importante quando objetiva-se a aplicação em sistemas de liberação controlada, por exercer efeito significativo na cinética de liberação do fármaco impregnado (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Neste estudo o compósito utilizado possui alta taxa de intumescimento favorecendo assim sua atividade como dispositivo de liberação de antibiótico.

Os *scaffolds*, estruturas porosas tridimensionais, permitem através da ancoragem de células e do intumescimento a liberação local de fármacos (RASQUINI, et al., 2017), sendo assim, a taxa de intumescimento da matriz afeta significativamente a porcentagem de liberação do fármaco.

6.3 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO

O uso de sistemas de liberação de fármacos tem como objetivo a eliminação efetiva de bactérias patogênicas, através de concentrações adequadas em

um período de tempo suficiente exatamente no foco de contaminação. Estes sistemas além de controlarem a liberação de seus agentes, garantem estabilidade de liberação contínua no local (REISE et al., 2012).

Esse experimento foi pautado em dois amplos conceitos: diminuir os efeitos colaterais causados por antibióticos quando utilizados em grandes doses e por tempo prolongado via sistêmica, e ser mais efetivo no tratamento das osteomielites que são um desafio na medicina veterinária. O foco foi confeccionar dispositivos biodegradáveis impregnados com três diferentes antibióticos, que comumente são utilizados na rotina clínico-cirúrgica nesses casos.

A fim de simular situações locais em que este biomaterial ficaria retido no foco cirúrgico, os ensaios foram realizados em solução tampão com pH 7,4 que simula o pH sanguíneo. A escolha por esse compósito contemplou algumas características como a capacidade da HA em absorver e/ou adsorver moléculas (FERREIRA, 2009; MACIEL, 2011; GAO et al., 2011); a biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de suporte para liberação controlada de fármacos da quitosana (AMARAL, 2006); e a capacidade do nanotubos de carbono em transportar de pequenas moléculas de fármaco a biomacromoléculas em diferentes tipos celulares (MACHADO et al., 2014).

A utilização da metodologia com o compósito QNCHA como transportador de antimicrobiano, demonstrou para os três fármacos (amicacina, gentamicina e ciprofloxacina) uma rápida liberação inicial (efeito *burst*) na primeira hora, tendendo a se tornar um platô de sustentação da liberação a partir da sexta hora de análise. Os resultados obtidos foram apresentados nos Gráficos 9, 10 e 11. Essa rápida liberação inicial é causada pelo fármaco presente na superfície das partículas. Já a sustentação na liberação ocorre devido ao tempo necessário para que ocorra a erosão da matriz, e assim, permitindo a dissolução e a liberação do fármaco restante (KIM; BURGESS, 2000).

De uma forma geral o valor de n obtido indica que os aminoglicosídeos mostram uma liberação não-fickiana com exceção da gentamicina 10%, onde o valor de n se enquadra no modelo Korsmeyer-Peppas com uma liberação bastante rápida independente do tempo. Enquanto que para a ciprofloxacina o n indica um mecanismo quase-fickiano, ambos os casos serão discutidos em modelagem.

Perry et al. (1985) avaliaram um sistema de liberação de gentamicina para tratamento de osteomielite e observaram que o uso deste mesmo antibiótico, por via

sistêmica, alcança concentrações no tecido ósseo inferior a 1 µg/ml. A liberação de sulfato de gentamicina incorporado aos compósitos QNCHA atingiu níveis bem superiores como pode ser observado na Tabela 4, o que se torna vantajoso quando objetiva-se altos níveis de antibiótico no local.

Ao impregnar 40g de cimento ósseo com 480mg de gentamicina Azi et al. (2010) obtiveram 6,15 µg/ml de liberação em 24 horas, enquanto que as matrizes com 5% de fármaco no presente estudo, obtiveram no mesmo intervalo de tempo cerca de oito vezes mais concentração, designando ao QNCHA uma boa capacidade de liberação.

O pó de hidroxiapatita na presença de saliva humana mostra-se um inibidor do crescimento bacteriano, e quando associado à gentamicina é ainda mais eficaz, sendo capaz de inibir completamente o crescimento de microrganismos (FERREIRA, 2009). Castro (2017), ao estudar nanocápsulas de quitosana com ácido polilático (PLA) impregnadas com sulfato gentamicina (12mg de antibiótico para três diferentes proporções de quitosana e PLA), observou inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, além de confirmar a CIM da gentamicina para cepas desse mesmo microrganismos em 0,5 µg/ml. Ao levar em consideração a CIM citada e a liberação em µg/ml demonstrada na Tabela 4, pode-se dizer que o QNCHA associado à gentamicina é capaz de ser eficaz contra esse patógeno.

Esponjas de quitosana impregnadas com sulfato de amicacina apresentaram uma liberação mais rápida quando comparada com perfil de liberação de cimento ósseo, e isso se dá ao fato das esponjas se degradarem mais rapidamente. Vantagens de um sistema assim está no fato de serem efetivos quando objetiva-se a prevenção em um estágio inicial. A velocidade da liberação está interligada também com a porosidade da matriz, já que a natureza porosa de uma esponja de quitosana permite uma rápida difusão do fármaco impregnado (NOEL et al., 2010). O compósito impregnado com amicacina, utilizado neste estudo, demonstrou também uma rápida liberação inicial, obtendo em quatro horas grande parte de seu antibiótico liberado.

Em um ensaio realizado por Sabaeifard et al. (2016) um perfil de liberação a partir de nanopartículas PLGA (ácido láctico-co-ácido glicólico) carregadas com amicacina se mostrou eficiente contra *Pseudomonas aeruginosa*. A análise foi realizada por um período de 24 horas, com uma alta liberação nas primeiras quatro horas provavelmente devido à presença do medicamento na superfície das

nanopartículas. No caso do compósito aqui analisado, uma rápida liberação dos antibióticos estudados também é observada. Contudo, ainda se mostra retido no compósito parte dos fármacos, que podem ser liberados por tempos maiores ou por biodegradação do mesmo. Este efeito é mais pronunciado para o caso da ciprofloxacina.

A Anvisa (2005) estabelece para a amicacina uma CIM de 32 µg/ml para *Pseudomonas aeruginosa*, e como pode ser observado na Tabela 2, a partir de 20 minutos de análise, as matrizes impregnadas com esse antibiótico já atingem uma concentração passível de combater a infecção. No caso onde o sulfato de amicacina foi incorporado através da imersão em solução concentrada, essa liberação alcança nível ainda mais alto, atingindo em média 125 µg/ml, ou seja, quase quatro vezes a mais do que o necessário para combater o microrganismo.

De acordo com estudo de Ciocilteu et al. (2018) que sintetizaram compósitos de hidroxiapatita impregnados com ciprofloxacina através de um método de precipitação química, foi observado, difusão controlada como mecanismo de liberação e que se mostrou eficaz contra *Staphylococcus aureus*. Os compósitos que possuíam 18,13% de fármaco tiveram em 24 horas cerca de 40% de liberação, enquanto que no presente estudo, nesse mesmo período, foi obtido valores aproximados de 65%, 54% e 35% para os grupos com 5%, 10% e imersão (16,09% ± 2,44%), respectivamente.

Ao comparar as matrizes com ciprofloxacina foi observado que quanto maior a concentração de fármaco incorporada, menor a porcentagem de liberação, o que vai de acordo com Baker (1987) onde cita-se que quando se tem um agente dissolvido, a quantidade liberada em um determinado tempo independe da quantidade incorporada inicialmente, enquanto que, em um agente disperso, a quantia liberada em um determinado tempo diminui conforme aumenta a quantidade incorporada. Visto isso é notado que o cloridrato de ciprofloxacina está disperso na matriz aqui avaliada.

Esta mesma relação foi apontada no estudo de Kumar, Govidan e Girija (2014) onde avaliou-se nanopartículas de hidroxiapatita carregadas com ciprofloxacina e observou um comportamento de liberação sustentada e controlada, em que os grupos que possuíam maior teor de ciprofloxacina tinham menor porcentagem de liberação. A fração que se mantém impregnada garante uma terapia prolongada para o tratamento de osteomielite.

Em contrapartida, diferente dos trabalhos citados anteriormente, o compósito aqui analisado possui, além da hidroxiapatita, a quitosana e os nanotubos de carbono. A quitosana por possuir um amplo espectro de atividade antimicrobiana (GAO, et al., 2011) corrobora com o efeito bactericida, dificultando assim o crescimento bacteriano, portanto acredita-se que a quantidade liberada de antibiótico em 24 horas, somado a essas características da quitosana, já é bastante eficiente para controlar a infecção inicial. Em um estudo realizado por Maragon (2015) foi possível observar o efeito bactericida de gel de quitosana com gelatina, principalmente contra *S. aureus* e *E. coli*.

A partir dos valores descritos na Tabela 5, é possível notar, por exemplo, que nos primeiros 10 minutos de análise o compósito que menos libera a ciprofloxacina é o pertencente ao grupo com 5% de antibiótico, em que a matriz libera em torno de 16,22 µg/ml, o que já seria uma taxa eficiente para inibir *Pseudomonas Aeruginosa*, cuja concentração inibitória mínima (CIM) é de 4 µg/ml (ANVISA, 2005).

Provavelmente a interação das cargas entre a matriz e a ciprofloxacina sejam mais intensas do que quando comparado com as matrizes incorporadas com aminoglicosídeos, visto que no primeiro caso a liberação se torna menor, apresentando então maior dificuldade de ser liberada. Este fato pode ser justificado devido a complexação que ocorre entre os íons de cálcio da HA com o antibiótico, como mencionado por Martins e Goissis (2000). Ainda neste sentido, é observado que quando se trata dos grupos onde os antibióticos foram impregnados por imersão, a incorporação é de cerca de 11% para os aminoglicosídeos e tem-se valores de $76,1 \pm 7,4\%$ e $77,7 \pm 6,7\%$ para amicacina e gentamicina, respectivamente, enquanto que para a ciprofloxacina tem-se $16,09 \pm 2,44\%$ de fármaco incorporado e por volta de apenas 37% liberado. Dessa forma pode ser ainda mais evidenciado a complexação entre a HA e a ciprofloxacina.

Ao fazer uma análise geral das liberações, com exceção do grupo com gentamicina 10%, os aminoglicosídeos possuem perfis bem similares de liberação, inclusive concordando estatisticamente entre si. É visto também uma semelhança entre os grupos impregnados com amicacina, gentamicina e ciprofloxacina 5%.

As análises das liberações pelos compósitos foram feitas por um período de 24 horas, como já mencionado anteriormente, e observar por um período maior poderia ser capaz de fornecer uma visão mais ampla quanto ao uso por tempos mais prolongados. Contudo, a liberação rápida em altos níveis permite o uso como uma

estratégia preventiva, ou ainda suficiente para diminuir em grande escala a quantidade de patógeno existente, tornando mais fácil o controle da infecção.

Compósitos de quitosana, nanotubos de carbono e hidroxiapatita ainda não tinham sido estudados como sistema de liberação de fármacos, e por este estudo pode-se dizer que possuem grande potencial no auxílio ao tratamento das osteomielites.

Estudos *in vitro*, apesar de necessários, não são capazes de transpor com tanta fidelidade as situações reais, dessa forma, trabalhos *in vivo* se tornam imprescindíveis para saber como um sistema de liberação viria se comportar frente a casos de infecção óssea.

6.4 CONSIDERAÇÕES – ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey com $p < 0,05$ para os valores de liberação a 24 h mostra claramente que entre os aminoglicosídeos não se observa diferenças significativas quando comparado os modos de incorporação mistura 5%, 10% e imersão, exceto para gentamicina 10%, o que seria esperado já que estruturalmente ambos os antibióticos são similares. Em relação à ciprofloxacina os modos de incorporação resultam em liberações estatisticamente diferentes.

Esses resultados poderiam ser explicados como descrito por Baker (1987) que afirma que quando se tem agentes dissolvidos na matriz a fração liberada em um determinado período de tempo é independente da concentração inicial incorporada, enquanto que no caso de agentes dispersos na matriz, a fração liberada em determinado período de tempo diminui com o aumento da quantidade incorporada. Assim para os aminoglicosídeos tem-se uma dissolução dos fármacos na matriz, enquanto para a ciprofloxacina tem-se uma dispersão do fármaco.

6.5 CONSIDERAÇÕES – MODELAGEM

A seleção de um modelo adequado para ajustar os dados de liberação de fármacos é importante para determinar as características de liberação usando abordagens dependentes do modelo. Assim as curvas de liberação puderam ser analisadas dentro de modelos matemáticos como os de ordem zero, Korsmeyer-

Peppas, Peppas-Sahlin, Higuchi e Weibull como exposto no Quadro 1 (PAARAKH et al., 2018; SHAIKH et al., 2015; DASH et al., 2010; SIEPMANN; PEPPAS, 2001). O modelo matemático com o menor valor de AIC é o que melhor se ajusta aos dados. Como mostrado na Tabela 6 as curvas de liberação não seguiram uma cinética descrita pelos modelos de Peppas-Sahlin e Higuchi. Os perfis de liberação estão mais adequados aos modelos de Weibull e Korsmeyer-Peppas. O modelo de Weibull é empírico e não reflete a cinética de liberação, contudo mostra que os perfis de liberação tendem a ser parabólicos.

Já o modelo de Korsmeyer-Peppas descreve bem a cinética de liberação em praticamente todos os casos e o valor do expoente de n pode ser usado para interpretar e caracterizar o mecanismo de liberação, esse valor é dependente da forma da matriz (dispositivo) cujo fármaco está incorporado.

Aqui temos uma matriz com relação largura-espessura menor que 10 e neste caso, quando se tem n igual a 0,45, o mecanismo principal, que controla a liberação do fármaco no sistema é a difusão pura (difusão Fickiana clássica). Quando $n = 0,89$, a equação corresponde à cinética de liberação é de ordem zero, sendo a liberação controlada por mecanismo de transporte de Caso II, ou seja, a difusão é muito mais rápida se comparado com o processo de relaxação das cadeias poliméricas presentes na matriz devido ao intumescimento, sendo que a difusão e a relaxação devem ocorrer simultaneamente. Outros valores de n ($0,45 < n < 0,89$) indicam cinética de transporte anômalo, ou seja, ocorre quando os tempos da difusão e da taxa de relaxação das cadeias poliméricas são comparáveis. Nesse caso, o intumescimento e o transporte de moléculas são afetados pela presença de microcavidades existentes na matriz (FRISH, 1983).

Para os aminoglicosídeos o modelo mostra uma liberação com expoente entre $0,45 < n < 0,89$, sugerindo um transporte anômalo, ou seja, não-fickiano. Os valores do expoente que estão mais próximos de 0,45 mostram que embora ambos os mecanismos coexistam, a contribuição da difusão prevalece. Contudo, para gentamicina 10% pode-se observar uma cinética de ordem zero como mostrado pelo menor valor de AIC, tendo-se esse mecanismo também observado pelo valor de n (0,8809) do modelo de Korsmeyer-Peppas, ou seja, uma liberação muito rápida e independente do tempo. Neste caso, tem-se uma alta taxa e desvio de liberação diferentemente dos demais e já mencionado anteriormente (Tabela 2 e Tabela 3) podendo estar modificando a interpretação do mecanismo de liberação.

Para a ciprofloxacina que é uma fluorquinolona em todos os casos tem-se um mecanismo quase-fickiano, ou seja, $n < 0,45$. Esse mecanismo indica que a quitosana na matriz é hidratada intumescendo e, em seguida, a ciprofloxacina se difunde através da matriz intumescida, o que leva a uma cinética de liberação lenta (MABROUK et al., 2013).

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e nas condições em que o experimento foi desenvolvido, foi possível concluir:

- O compósito QNCHA apresentou boa capacidade de liberação em todos os grupos, não havendo grandes diferenças na forma de incorporação, apresentando apenas taxas menores no grupo impregnado com ciprofloxacina por imersão, que liberou 37,5%;
- Os níveis de liberação pelos compósitos, quando comparados com os dados da literatura, possuem grande potencial para combater infecções causadas por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- O compósito apresentou baixa porosidade e alta capacidade de intumescimento em PBS;
- Estudos *in vivo* devem ser feitos futuramente para avaliar o real potencial de liberação e combate a processos infecciosos em situações clínico-cirúrgicas de osteomielite.

REFERÊNCIAS

AMARO MARTINS, V. C.; GOISSIS, G. Nonstoichiometric hydroxyapatite-anionic collagen composite as support for the double sustained release of gentamicin and norfloxacin/ciprofloxacin. **Artificial Organs**, v. 24, n. 3, p. 224-230, 2000.

AHMED, M. G.; HARISH, N. M.; CHARYULU, R. N.; PRABHU, P. Formulation of chitosan-based ciprofloxacin and diclofenac film for periodontitis therapy. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 1, p. 33-41, 2009.

AKAIKE H. An information criterion (AIC). **Mathematical Sciences**, v. 14, p. 5–9, 1976

AKAKI, M. **Avaliação da incorporação de agentes antibacterianos em cimentos resinosos**. 2005. 144 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Faculdade de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

ALMEIDA, R. S.; RIBEIRO, I. I. A.; SILVA, M. H. P.; ROCHA, D. N.; MIGUEL, F. B.; ROSA, F. P. Avaliação da fase inicial do reparo ósseo após implantação de biomateriais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 331-336, 2014.

AMARAL, M. B. Do. **Citotoxicidade *in vitro* e biocompatibilidade *in vivo* de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestre em Bioengenharia) – Programa Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, 2006.

ARITA, I. H. et al. Chemistry and sintering behaviour of thin hydroxyapatite ceramics with controlled porosity. **Biomaterials**, v. 16, n. 5, p. 403-408, 1995.

AZEVEDO, E. P.; KUMAR, V. Rheological, water uptake and controlled release properties of a novel self-gelling aldehyde functionalized chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 894-900, 2012.

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.

BAKER, R. **Controlled release of biologically active agents**. New York, Willey-Interscience, 1987. 279 p.

BIRT, M. C., ANDERSON, D. W., TOBY, E. B., WANG, J. Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies. **Journal of orthopaedics**, v. 14, n. 1, p. 45-52, 2017.

BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016.

BRYDONE, A. S.; MEEK, D.; MACLAINE, S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 224, n. 12, p. 1329-1343, 2010.

CAMPOS, M. G. N.; GROSSO, C. R. F.; CÁRDENAS, G.; MEI, L. H. I. Effects of neutralization process on preparation and characterization of chitosan membranes for wound dressing. **Macromolecular Symposia**, v. 229, n. 1, p. 253-257, 2005.

CARNAVAL, T. G. **Análise *in vitro* de um dispositivo polimérico como alternativa para o uso de antimicrobiano sistêmico em Odontologia**. 2015. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2015.

CASTRO, K. C. **Síntese de nanopartículas de quitosana/PLA para liberação controlada de antibiótico no tratamento de mastite**. 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Alfenas, 2017.

CIOCILTEU, M. R.; MOCANU, A. G.; DUCU, C.; NICOLAESCU, O. E.; MANDA, V. C.; TURCU-STIOLICA, A.; NICOLAESCU, C.; MELINTE, R.; BALASOIU, M.; CROITORU, O.; NEAMTU, J. Hydroxyapatite-ciprofloxacin delivery system: Synthesis, characterisation and antibacterial activity. **Acta Pharmaceutica**, v. 68, n. 2, p. 129-144, 2018.

COSTA, P. J. C. Avaliação *in vitro* da bioequivalência de formulações farmacêuticas, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 38, n. 2, p. 141-153, 2002.

COSTA P.J., LOBO M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, p. 123-133, 2001

COSTA, B.; CAMARGO, N. H.; OLESKOVISC, N.; GAVA, A.; DALLABRIDA, A. L.; REGALIN, D.; LIMA, M. P. A.; MORAES, A. N. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, n. 35, p.177-187, 2015.

SILVA, J. Da; HOLLENBACH, C. Fluoroquinolonas resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 363-9, 2010.

DAL-BÓ, Í. dos. S.; FERRIGNO, C. R. A.; FERREIRA, M. P.; CAQUÍAS, D. F. I.; De SOUZA, A. N. A.; CERNIAWSKY, M. F.; RIZZO, I.; CAVALCANTI, R. A. O.; SANTOS De, J. F. Infecção óssea após osteotomia para tratamento da ruptura de ligamento cruzado em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1, 2013.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217-223, 2010.

AZEVEDO, A. S. De; SÁ, M. J. C. De; COSTA NETO, P. I. Da; FOOK, M. V. L.; PORTELA, R. De A.; AZEVEDO, S. S. De. Avaliação de diferentes proporções de

fosfato de cálcio na regeneração do tecido ósseo de coelhos: estudo clínicocirúrgico, radiológico e histológico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 1, p. 12-18, 2012.

DE CASTRO FRANCO, L. M.; ERCOLE, F. F.; DE MATTIA, A. Infecção cirúrgica em pacientes submetidos a cirurgia ortopédica com implantes. **Revista SOBECC**, v. 20, n. 3, p. 163-170, 2015.

DIARRA, M.; POURROY, G.; MUSTER, D.; ZINGRAFF, M.; BOYMOND, C. Elaboration and evaluation of an intraoral controlled release delivering system. **Biomaterials**, v. 19, n. 16, p. 1523-1527, 1998.

DOWLING, O. M. Aminoglicosídeos. In: GIGUÉRE, S., PRESSCOT, J. F., BAGGOT, J. D., WALKER, R. D., DOWLING P. M. **Terapia antimicrobiana em Medicina Veterinária**. São Paulo: Rocca, 2010. p. 213-236.

FERREIRA, F. R. **Síntese, caracterização e aplicação biológica de hidroxiapatita: em presença de gelatina e associada a sulfato de gentamicina**. 2009. 120 f. Dissertação (Mestre em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

GAO, P.; NIE, X., ZOU, M.; SHI, Y., CHENG, G. Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 9, p. 625, 2011.

GOMES, D.; PEREIRA, M.; BETTENCOURT, A. F. Osteomyelitis: an overview of antimicrobial therapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, p. 13-27, 2013.

GOODRICH, L. R. Osteomyelitis in horses. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 22, n. 2, p. 389-417, 2006.

GRANATO, A. E.; LOBO, A. D. O.; PACHECO-OLIVEIRA, C.; CORAT, E. J. E HIDROXIAPATITA PARA APLICAÇÕES COMO ARCABOUÇOS DE CRESCIMENTO ÓSSEO Materiais e Métodos. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14.; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 10., 2011, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba 1, 2011.

GRIGOLETTO, R. **Avaliação da concentração intra-articular de gentamicina, associada ou não ao DMSO, administrada por perfusão regional intravenosa em membro de equinos sadios**. 2015. 75 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

HAGGETT, E. F.; WILSON, W. D. Overview of the use of antimicrobials for the treatment of bacterial infections in horses. **Equine Veterinary Education**, v. 20, n. 8, p. 433-448, 2008.

HOLANDA, A. L. **Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização**. 2011. 113 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2011.

HORTA, R. Dos S.; REZENDE, C. M. De. F. Fraturas expostas em pequenos animais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 1800-1814, 2014.

HU, S.; BI, S.; YAN, D.; ZHOU, Z.; SUN, G.; CHENG, X.; CHEN, X. Preparation of composite hydroxybutyl chitosan sponge and its role in promoting wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, p. 154-163, 2018.

INZANA, J. A.; SCHWARZ, E. M.; KATES, S. L.; AWAD, H. A. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. **Biomaterials**, v. 81, p. 58-71, 2016.

KELMER, G.; BELL, G. C.; MARTIN-JIMENEZ, T.; SAXTON, A. M.; CATASUS, C., ELLIOT, S. B.; MEIBOHM, B. Evaluation of regional limb perfusion with amikacin using the saphenous, cephalic, and palmar digital veins in standing horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, n. 3, p. 236-240, 2013.

KIM, T.-K.; BURGESS, D. J. Formulation and release characteristics of poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres containing chemically modified protein. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 23-31, 2001.

KUMAR, G. Suresh; GOVINDAN, R.; GIRIJA, E. K. In situ synthesis, characterization and in vitro studies of ciprofloxacin loaded hydroxyapatite nanoparticles for the treatment of osteomyelitis. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 31, p. 5052-5060, 2014.

LOPES, M. C.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, 2005.

MABROUK, M.; MOSTAFA, A. A.; OUDADESSE, H.; MAHMOUD, A. A.; GAAFAR, A. M.; EL-GOHARY, M. I. Fabrication, characterization and drug release of ciprofloxacin loaded porous polyvinyl alcohol/bioactive glass scaffold for controlled drug delivery. **Bioceramics Development and Applications**, v. 1, n. 1, p. 2-5, 2013.

MACHADO, I. R. L.; MENDES, H. M. F.; ALVES, G. E. S.; FALEIROS, R. R. Nanotubos de carbono: potencial de uso em medicina veterinária. **Ciência Rural**, v. 44, n. 10, 2014.

MACIEL, M. De. S. G. P. **A antibioterapia como factor de regeneração óssea**. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

MARANGON, C. A. **Atividade antimicrobiana e citotoxicidade de emulsões de quitosana/gelatina/óleo de copaíba**. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

MARCONDES, G. DE. M. **Avaliação da interação biológica entre compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita e tecido ósseo ovino**. 2014. 176 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MARTINS-JÚNIOR, P. A.; ALCÂNTARA, C. E.; RESENDE, R. R.; FERREIRA, A. J. Carbon nanotubes: Directions and perspectives in oral regenerative medicine. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 7, p. 575–583, 2013.

MONÇÃO, M. M.; ROSA, F. P. Estudo das propriedades físicas de um biomaterial com nova composição de wollastonita e beta fosfato tricálcico para regeneração óssea após implante in vivo. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 18, n. 2, p. 239-248, 2019.

MUSTAFÁ, M.; YUSOF, S. M.; IFTIKHAR, M. Osteomyelitis: pathogenesis, clinical and therapeutic challenge. **International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 9-18, 2014.

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTANO, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 5, n. 27, p. 1137-1158, 2008.

NOEL, S. P.; COURTNEY, H. S.; BUMGARDNER, J. D.; HAGGARD, W. O. Chitosan sponges to locally deliver amikacin and vancomycin: a pilot in vitro evaluation. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 468, n. 8, p. 2074-2080, 2010.

OGAWA, C. A. **Compósitos hidroxiapatita: colágeno - preparação, caracterização e estudos em liberação controlada de ciprofloxacina**. 2002. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

OGAWA, C. A.; PLEPIS, A. M. G. Liberação *in vitro* de cloridrato de ciprofloxacina em compósitos hidroxiapatita: colágeno. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, n. 2, p. 115-122, 2002.

OLIVEIRA, A. G. D.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; RODRIGUES CERA, L. F.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 21, n. 4, p. 444-452, 2006.

OLIVEIRA, L. S. D. A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea—método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 37-44, 2010.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n.1, p. 29-35, 2006.

PAARAKH, M. O.; JOSE, M. P.; SETTY, C. M.; CHRISTOPER, G. V. P. Release kinetics: concepts and applications. **International Journal of Pharmacy Research & Technology**, v. 8, p. 12-20, 2018

PAPICH, M. G. Current concepts in antimicrobial therapy for horses. **AAEP Proceedings**, v. 47, p. 94-102, 2001.

PARETSIS, N. F. **Avaliação histológica e histomorfométrica da regeneração óssea a partir da utilização de mantas ósseas à base de quitosana, hidroxipatita e colágeno como substituto ósseo em falhas ósseas induzidas em tíbias de ovinos**. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

PEARCE, A. I.; RICHARDS, R. G.; MILZ, S.; SCHNEIDER, E.; PEARCE, S. G. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. **European Cells and Materials**, v.13, p. 1-10, 2007.

PERRY, C. R.; RICE, S.; RITTERBUSCH, J. K.; BURDGE, R. E. Local administration of antibiotics with an implantable osmotic pump. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 192, p. 284-290, 1985.

PICHINELLI, M. A. **Análise comparativa das alterações radiográficas observadas no osteossarcoma e na osteomielite em cães**. 2014. 12 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho, Araçatuba, 2014.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C.; MORAES, Â. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

PRATESI, A., MOORES, A. P., DOWNES, C., GRIERSON, J., MADDOX, T. W. 2015. Efficacy of postoperative antimicrobial use for clean orthopedic implant surgery in dogs: a prospective randomized study in 100 consecutive cases. **Veterinary Surgery**, v. 44, n. 5, p. 653-660, 2015.

RAQUINI, L. Do; A. B.; MARTINS, V. C. M.; HORN, M. M.; PLEPIS, A. M. De. G. Diferentes formas de incorporação e estudo de liberação *in vitro* de ciprofloxacina em scaffolds quitosana/HA/resina de Jatobá. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE LATINO AMERICANA DE BIOMATERIAIS, ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E ENGENHARIA DE TECIDOS – SLABO, 14., 2017, São Paulo. **Anais...** São Paulo: 2017.

REED, T. P., THOMAS, L. A., WEEREN, F. R., RUTH, J. D., ANDERS, B. B. A novel dextran polymer hydrogel local antimicrobial therapy in dogs: a pilot study. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 57, n. 2, p. 189, 2016.

REISE, M.; WYRWA, R.; MULLER, U.; ZYLINSKI, M.; VOLPEL, A.; SCHNABELRAUCH, M.; BERG, A.; JANDT, K. D.; WATTS, D. C.; SIGUSCH, B. W.

Release of metronidazole from electrospun poly (L-lactide-co-D/L-lactide) fibers for local periodontitis treatment. **Dental Materials**, v. 28, n. 2, p. 179-188, 2012.

RYAN, J. A. Colorimetric determination of gentamicin, kanamycin, tobramycin, and amikacin aminoglycosides with 2,4-dinitrofluorobenzene. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 1301-2, 1984.

SABAEIFARD, P.; ABDI-ALI, A.; SOUDI, M. R.; GAMAZO, C.; IRACHE, J. M. Amikacin loaded PLGA nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 392-398, 2016.

SAITO, N.; USUI, Y.; AOKI, K.; NARITA, N.; SHIMIZU, M.; HARA, K.; OGIWARA, N.; NAKAMURA, K.; ISHIGAKI, N.; KATO, H.; TARUTA, S.; ENDO, M. Carbon nanotubes:biomaterials applications. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 1897-1903, 2009.

SAURÍ, J.; MILLÁN, D.; SUÑÉ-NEGRE, J. M.; COLOM, H.; TICÓ, J. R.; MIÑARRO, M.; PÉREZ-LOZANO, P.; GARCÍA-MONTOYA, E. Quality by Design approach to understand the physicochemical phenomena involved in controlled release of captopril SR matrix tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, p. 431–441, 2014.

SCHEUCH, B. C.; VAN HOOOGMOED, L. M.; WILSON, W. D.; SNYDER, J. R.; MACDONALD, M. H.; WATSON, Z. E.; STEFFEY, E. P. Comparison of intraosseous or intravenous infusion for delivery of amikacin sulfate to the tibiotarsal joint of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 3, p. 374-380, 2002.

SEPULVEDA, P.; BINNER, J. G. P.; ROGERO, S. O.; HIGA, O. Z.; BRESSIANI, J. C. Production of porous hydroxyapatite by the gel-casting of foams and cytotoxic evaluation. **Journal of Materials Research**, v. 50, p. 27-34, 2000.

SERRA L.; DOMÉNECH J.; PEPPAS N.A. Drug transport mechanisms and release kinetics from molecularly designed poly(acrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. **Biomaterials**, v. 27 p. 5440–5451, 2006.

SHAIKH, H.; KSHIRSAGAR, R. V.; PATIL, S. G. Mathematical models for drug release characterization: a review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 324-338, 2015.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139–157, 2001.

SILVA, M. C.; NASCIMENTO, I.; RIBEIRO, V. De. S.; FOOK, M. V. L. Avaliação do método de obtenção de scaffolds quitosana/curcumina sobre a estrutura, morfologia e propriedades térmicas. **Revista Matéria**, v. 21, n. 3, p. 560-568, 2016.

SOBHANI, Z.; SAMANI, S. M.; MONTASERI, H.; KHEZRI, E. Nanoparticles of Chitosan Loaded Ciprofloxacin: Fabrication and Antimicrobial Activity. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 3, p. 427, 2017.

SOUZA-FILHO, A. G. De.; FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química nova**, v. 30, n. 7, p. 1695, 2007.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2017. 950 p.

STEFFENS, D.; BRAGHIROLI, D. I.; MAURMANN, N.; PRANKE, P. Update on the main use of biomaterials and techniques associated with tissue engineering. **Drug Discovery Today**, v. 23, p. 1474-1488, 2018.

SURYA, T. G.; GURUPADAYYA, B. M.; VENKATA, S. K. Spectrophotometric method for the determination of amikacin in pure and pharmaceutical dosage form. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 38-42, 2018.

TAVAKOL, S.; NIKPOUR, M. R.; AMANI, A.; SOLTANI, M.; RABIEE, S. M.; REZAYAT, S. M.; CHEN, P.; JAHANSHAH, M. Bone regeneration based on nano-hydroxyapatite and hydroxyapatite/chitosan nanocomposites: an in vitro and in vivo comparative study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 1, p.1-16, 2013.

THOMAS, L. A.; BIZIKOVA, T.; MINIHAN, A. C. In vitro elution and antibacterial activity of clindamycin, amikacin, and vancomycin from R-gel polymer. **Veterinary Surgery**, v. 40, n. 6, p. 774-780, 2011.

TONELLI, F.M.P.; SANTO, A.K.; GOMES, K.N.; LORENÇON, E.; GUATIMOSIN, S.; LADEIRA, L.O.; RESENDE, R.R. Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, n. 7, p. 4511-4529, 2012.

UNAGOLLA, J. M.; JAYASURIYA, A. C. Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, p. 199–209, 2018.

URAMIS, M. R.; HERNÁNDEZ, C. N. R., FUENTES, M. G. Actividad antimicrobiana de un cemento fosfocálcico nacional para su empleo en implantes óseos. In: CONVENCIÓN INTERNACIONAL DE SALUD PÚBLICA, La Habana. **Memorias...** La Habana: 2012.

USKOKOVIĆ, Vuk. Mechanism of formation governs the mechanism of release of antibiotics from calcium phosphate nanopowders and cements in a drug-dependent manner. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 25, p. 3982-3992, 2019.

VEIGA, I. G. **Produção e caracterização de membranas de quitosana associada com outros biopolímeros para liberação controlada de anti-inflamatórios**. 2012. 145f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, 2012.

VIANA, J. F. C. **Estratégias biotecnológicas para produção e liberação controlada de peptídeos antimicrobianos**. 2014. 127 f. Tese (Doutorado em

Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

WEESE, J. S.; CRUZ, A. Retrospective study of perioperative antimicrobial use practices in horses undergoing elective arthroscopic surgery at a veterinary teaching hospital. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 2, p. 185, 2009.

WEESE, J. S.; KAESE, H. J.; BAIRD, J. D.; KENNEY, D. G.; STAEMPFLI, H. R. Suspected ciprofloxacin-induced colitis in four horses. **Equine Veterinary Education**, v. 14, n. 4, p. 182-189, 2002.

WILSON, W. D. Rational selection of antimicrobials for use in horses. **AAEP Proceedings**, v. 47, p. 75 – 93, 2001.

ZHANG, Y.; HUANG, X.; DUAN, B.; WU, L.; LI, S.; YUAN, X. Preparation of electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol) membranes. **Colloid and Polymer Science**, v. 285, n. 8, p. 855-863, 2007.

ANEXO A

Protocolo de preparação e caracterização dos compósitos a base de quitosana, nanotubo de carbono e hidroxiapatita impregnados com sulfato de amicacina, sulfato de gentamicina e cloridrato de ciprofloxacina – IQSC-USP

OBTENÇÃO DOS MATERIAIS

Quitosana:

A quitosana foi obtida a partir de gládios de lula e foi resultado de duas etapas básicas de preparo. Primeiramente o gládio foi lavado, seco em estufa a 40°C, triturado. Em seguida foi feita a desproteinização-desmineralização, através de um tratamento alcalino com uma solução de NaOH 0,3 mol L⁻¹, obtendo-se a β-quitina. Na etapa final, foi feita a desacetilação com NaOH 40%, obtendo-se a quitosana (Horn et al., 2009).

Síntese da Hidroxiapatita (HA)

A síntese da hidroxiapatita foi feita seguindo o método de JARCHO et al (1976). Preparou-se uma solução de Ca(NO₃)₂·4H₂O com pH entre 11,0 e 12,0 ajustado com hidróxido de amônio concentrado (Solução I). Preparou-se a seguir uma solução de (NH₄)₂HPO₄ também com pH entre 11,0 e 12,0 (Solução II).

A solução de cálcio (Solução I) foi vigorosamente agitada e mantida sob fluxo constante de N₂, sendo então adicionada, lentamente, a solução de fosfato (Solução II), produzindo uma suspensão com precipitado de forma gelatinosa, que permaneceu sob agitação durante 40 horas à temperatura ambiente, sempre sob fluxo constante de N₂.

Após este tempo, deixou-se a suspensão foi decantada com posterior remoção do sobrenadante e o sólido resultante foi lavado com água deionizada até que o pH do sobrenadante se tornasse constante. A suspensão de HA formada foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min a 20°C, filtrada e seca em estufa à 90°C durante um período de 24 h. Após este período a HA foi triturada e separada em peneira obtendo-se partículas menores que 0,2 mm. O rendimento total do processo foi de 95%.

Obtenção das matrizes

As matrizes foram feitas por suspensão de nanotubos de carbono (NC) em ácido acético 1% sob constante agitação, seguido por homogeneização num banho de ultrassom (Único USC 1400 A) durante 60 min. Essa sonicação de alta energia do nanotubo de carbono é normalmente necessária para produzir suspensões uniformemente dispersas. A quitosana foi então adicionada lentamente sob agitação a 2000 rpm por 24h sendo que nas primeiras 2h essa agitação foi feita em banho de ultrassom, para dissolução completa e homogeneização. Após esse período foi adicionada a hidroxiapatita voltando-se a repetir o mesmo procedimento descrito para a adição de quitosana. A proporção final dos materiais foi de 1:20:180 de NC: quitosana: HA.

A incorporação dos antibióticos, ciprofloxacina, gentamicina ou ampicilina foi feita por adição de 5 ou 10 % desses fármacos em relação a massa seca da mistura preparada e pelo método de imersão feito com as matrizes já prontas. Cada matriz foi pesada e imersa em 10ml da solução dos respectivos antibióticos na concentração de 10 mg ml⁻¹, durante 24h sendo então removida da solução, lavada rapidamente com água deionizada, congelada, liofilizada em equipamento da marca Edwards modelo *Freeze Dryer Modulyo (Edwards High Vacuum International)* e novamente pesada.

Para a obtenção das matrizes, 800mg de mistura contendo antibiótico foi colocada em cada molde de teflon® de 140 mm de diâmetro (Figura 1), sendo congeladas e liofilizadas. As matrizes foram neutralizadas em vapor de amônia por 8 horas e em seguida colocadas em fluxo de ar por 72 horas. Após liofilização apresentaram um diâmetro de 120 mm, mostraram-se compactas e com uma coloração cinza devido à presença dos nanotubos de carbono (Figura 2).

Figura 1. Fotografia Digital do molde para confecção das matrizes.

Figura 2: Fotografia digital da matriz

Caracterização dos Materiais e Matrizes

Os materiais foram caracterizados nos equipamentos da Central de Análises Químicas Instrumentais do IQSC/USP.

Quitosana:

Grau de acetilação da quitosana: a quitosana foi caracterizada quanto a seu GA por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) sendo utilizado o método proposto e validado por Lavertu et al. (2003). Os espectros de RMN ^1H das amostras de quitosana foram obtidos no espectrômetro com transformada de Fourier da marca Agilent Technologies, modelo 500/54 Premium Shielded a 70°C, acumulando 64 varreduras.

Determinação da Massa Molar: a massa molar média da quitosana foi determinada pelo método viscosimétrico como descrito por (Rinaudo, 2006), com soluções de quitosana em tampão ácido acético/acetato de sódio em um viscosímetro capilar de vidro do tipo Ubbelohde a temperatura constante de 25°C e em triplicata.

Hidroxiapatita:

Difração de raio-x: os difratogramas da HA foram obtidos em um difratômetro Bruker D8 Advance Instrument, com radiação monocromática de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$) com potência de 40 kV, 40 mA, operado em modo de varredura. A amostra teve a varredura de 2θ entre 5 - 65° utilizando-se um passo de 0,03° e tempo de 0,4 s por passo.

Energia Dispersiva por raio-x (EDX): A análise foi feita em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 200), com detector de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II (Atmosphere Thin Window), de resolução de 133 eV à 5,9 keV, acoplado a um microscópio eletrônico LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltd), com um detector Oxford (Oxford Instruments Inc.). Utilizou-se padrão de cobalto para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, “dead time” de 30 %, corrente de 2,82 A e I “probe” de 950 pA.

Matriz:

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): as fotomicrografias foram obtidas na superfície matriz colada em stubs por fita condutora de carbono e recoberta com uma fina camada de ouro de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) com pressão na câmara de $2,00 \times 10^{-2}$ mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de $0,60 \text{ nm s}^{-1}$, possibilitando a análise de suas estruturas. Utilizou-se o equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV. Imagens com elétrons restroespalhados foram obtidas utilizando *four quadrant backscattered electron detector* (QBSD) type 400, operando com feixe de elétrons de 20 kV, corrente de 2,82 A e I probe de 1500 nA.

RESULTADOS DAS CARACTERIZAÇÕES DOS MATERIAIS

A quitosana foi caracterizada por espectroscopia de RMN ^1H determinando-se o grau de desacetilação de 93,5% (Horn et al., 2009; Torres et al., 2005). A massa molar determinada foi de $(2,83 \pm 0,6) \times 10^5$.

O padrão de difração de raio-X para HA seca a 90°C (Figura 2A) mostra os picos em 2θ de $26,1^\circ$, $31,9^\circ$, $32,3^\circ$, $33,1^\circ$, $34,2^\circ$, $46,9^\circ$ e $49,7^\circ$ que correspondem aos descritos para HA [HA, JCPDS 9-0432]. O alargamento dos picos são uma indicação de uma cerâmica com baixa cristalinidade. A análise por dispersão de raio-X (EDX) foi feita para se verificar a relação cálcio e fósforo (Ca/P) que foi determinada como sendo de 1,89, caracterizando uma HA rica em cálcio (Ramesh et al., 2007). Os elementos encontrados nesta análise foram o carbono (0,2 keV), oxigênio (0,5 keV), cálcio (3,7 e 4,0 keV), e fósforo (2,0 keV), como mostrado na Figura 2B.

Figura 3 Espectro de difração de raio-X (A) e dispersão de raio-X (B) para a HA obtida

As fotomicrografias por MEV obtidas para as superfícies das matrizes estão mostradas na Figura 3 sendo observada a homogeneidade da mistura.

Figura 4 Fotomicrografia por MEV para a matriz quitosana/nanotubo de carbono/hidroxiapatita. (A) detector de espalhamento (SE) e (B) detector QBSD

REFERÊNCIAS

HORN, M.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G., Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 239, 2009.

JARCHO, M. et al. Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form, **Journal Materials Science**, p.2027-2035, 1976.

LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQI, A. N.; BERRADA, M.; RODRIGUES, A.; WANG, D.; BUSCHMANN, M. D.; GUPTA, A. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 6, p. 1149-1158, 2003.

RAMESH S., TANB C. Y., HAMDI M., SOPYAN I., TENG W. D. The influence of Ca/P ratio on the properties of hydroxyapatite bioceramics. **Proceedings of SPIE 2007**; v. 6423, p. 64233A-1.

TORRES, M. A.; VIEIRA R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente, **Polímeros: ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 306-312, 2005.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.