

José Pedro Teixeira Freire

**Preparação de um sistema de libertação controlada e localizada de  
um antibiótico de largo espectro para aplicação em cirurgias  
ortopédicas reconstrutivas.**

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para a  
obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica, sob orientação das Professoras Doutoras  
Maria Helena Gil e Maria Margarida Figueiredo.

Julho de 2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

# Júri

**Presidente:** António Alberto Torres Garcia Portugal  
Categoria: Professor Associado  
Departamento: Departamento de Engenharia Química

**Nome:** Jorge Manuel dos Santos Rocha  
Categoria: Professor Auxiliar  
Departamento: Departamento de Engenharia Química

**Nome:** Maria Margarida Lopes Figueiredo  
Categoria: Professor Catedrático  
Departamento: Departamento de Engenharia Química

**Nome:** Patrícia Manuela Almeida Coimbra  
Categoria: Investigadora  
Instituição: Departamento de Engenharia Química, FCTUC

**Nome:** Sérgio Miguel Andrade de Matos  
Categoria: Professor Auxiliar  
Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

# Agradecimentos

Quero começar por agradecer às orientadoras desta tese, a Professora Doutora Maria Helena Gil e a Professora Doutora Maria Margarida Figueiredo, pelo apoio e disponibilidade demonstrados.

Quero também agradecer à Doutora Patrícia Coimbra pela sua disponibilidade total ao longo do desenvolvimento desta tese, bem como pelo exemplo de dedicação e perseverança.

Agradeço também à Engenheira Inês Fonseca pelo trabalho desenvolvido no Departamento de Engenharia Química, que possibilitou a criação de bases para este trabalho.

Quero agradecer à minha família e amigos pelo apoio ao longo destes anos, sem vós tudo se teria tornado mais difícil.

Por último, um enorme Obrigado aos meus Pais pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos e pela dedicação ao longo de todo o meu percurso.

# Índice

Resumo.....	VII
Abstract .....	IX
Índice de Figuras .....	XI
Índice de Tabelas.....	XIII
Acrónimos .....	XIV
Motivação e Objectivos.....	XV
Capítulo 1 .....	1
Introdução Geral .....	1
Osso – Estrutura e organização.....	2
Substitutos Ósseos .....	4
Sistemas de libertação controlada de fármacos .....	8
Sistemas de libertação localizada de antibióticos para aplicações em ortopedia.....	10
Técnicas de caracterização utilizadas.....	13
Espectrofotometria .....	13
Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) .....	14
Capítulo 2 .....	15
Preparação dos filmes de revestimento ósseo .....	15
Gelatina .....	16
Principais métodos de reticulação de gelatina .....	18
Procedimento experimental .....	19
Resultados e Discussão: .....	23
Capítulo 3 .....	28
Encapsulamento do antibiótico Ceftriaxona em Micropartículas Poliméricas .....	28
Micropartículas .....	29
Poli Ácido-Láctico .....	32
Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) .....	33
Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona).....	33
Ceftriaxona Sódica.....	34
Procedimento experimental .....	35
Resultados e Discussão .....	41

Capítulo 4 .....	51
Produção dos Sistemas de Libertação.....	51
Procedimento experimental .....	52
Resultados e Discussão .....	55
Capítulo 5 .....	62
Conclusão e sugestões de trabalho futuro .....	62
Bibliografia .....	66
Anexos.....	70

## Resumo

O propósito principal deste trabalho foi a produção de um sistema de libertação controlada e localizada, recorrendo-se a matriz óssea bovina para a obtenção de um enxerto ósseo com propriedades antibacterianas a ser aplicado em cirurgias ortopédicas reconstrutivas.

Com este objectivo em mente, dividiu-se o plano de trabalhos em três áreas distintas. Primeiramente procedeu-se à criação de um filme de gelatina, utilizando para o efeito gelatina de tipo A, produzida a partir de pele de porco. O filme foi então reticulado utilizando diferentes razões molares de carbodiimida EDC para número de grupos carboxílicos presentes na gelatina. Depois de reticuladas, as amostras de gelatina foram sujeitas a ensaios de absorção de água e de degradação. Os primeiros mostraram que o rácio de absorção de PBS por grama de filme diminui com o aumento do grau de reticulação, tal como era esperado. Os testes de degradação denotam um aumento da resistência à degradação à medida que aumenta o grau de reticulação. Além destas características, os filmes de gelatina apresentam ainda uma boa aderência ao osso, mantendo-se o revestimento durante vários dias quando a placa de osso revestida se encontra imersa em solução.

O segundo componente necessário para a criação do sistema de libertação proposto foi a microencapsulação. Utilizaram-se, essencialmente, três métodos de microencapsulação pelo método de extracção/evaporação do solvente para encapsular a Ceftriaxona, fármaco utilizado neste estudo.

- Dupla emulsão água/óleo/água (W/O/W);
- Dupla emulsão água/óleo/óleo (W/O/O);
- Dupla emulsão sólido/óleo/óleo (S/O/O).

O método da dupla emulsão água/óleo/água foi o que apresentou melhores resultados práticos nos testes de libertação *in vitro*, sendo este o caso em que a libertação se processou de forma mais gradual. Também a média de valores da eficiência de encapsulação na totalidade das amostras foi superior neste caso. Ainda assim, as formulações necessitam de ser optimizadas, de modo a diminuir a libertação inicial de fármaco, que se processa de uma forma excessivamente rápida quando comparada com o perfil de libertação ideal. Em todos os casos se obtiveram percentagens de libertação de massa de fármaco de aproximadamente

70% nas primeiras horas, sendo o objectivo a obtenção de um sistema que liberte o antibiótico gradualmente ao longo de cerca de 6 semanas.

O terceiro passo do processo foi a combinação dos componentes descritos anteriormente para obter um sistema de libertação controlada, tendo estes sido combinados de três formas diferentes com o objectivo de verificar qual o melhor sistema de libertação, realizando ao mesmo tempo comparações entre eles, por forma a verificar qual a contribuição de cada componente para o sistema de libertação controlada e localizada proposto como objectivo principal deste trabalho. Os sistemas estudados foram os seguintes.

- Placas de osso revestidas por filmes de gelatina com impregnação em solução de Ceftriaxona;

- Placas de osso revestidas por filmes de gelatina com adição de micropartículas;

- Placas de osso revestidas por gelatina com adição de micropartículas e impregnação em solução de CFX.

Para todos os sistemas foram realizados ensaios de libertação *in vitro*. Em todas os casos se observou a mesma libertação inicial excessivamente elevada, acompanhada do final de libertação de fármaco ao fim de apenas alguns dias.

Há, portanto, necessidade de optimização dos sistemas de libertação estudados, de modo a ser possível obter um sistema com um perfil de libertação ideal, com libertação de fármaco inicial a rondar os 50%, seguida de uma libertação gradual ao longo de, aproximadamente, 6 semanas. No entanto, os resultados obtidos permitem a criação de bases científicas que poderão ser aproveitadas em trabalhos futuros.



# Abstract

The main purpose of this work was the production of a localized controlled delivery system, using bovine bone matrix to obtain a bone graft with antibacterial properties to be applied in reconstructive orthopedic surgery.

With this goal in mind, the work plan was divided into three different areas. Firstly, a gelatin film was produced, using for this purpose type A gelatin, obtained from pig skin. The film was then cross-linked, using different molar ratios of carbodiimide EDC to carboxylic groups present in the gelatin. After being cross-linked, the gelatin samples were subject to swelling and degradation tests. These first tests showed that the PBS absorption per gram of gelatin ratio decreases with the increase of the cross-linking degree, as expected. The degradation tests show an increase of resistance to degradation as the cross-linking degree increases. Other than these characteristics, the gelatin films show great adhering properties to the bone, which leads to a stable coating of the bone over several days, while the bone graft is kept immersed in a PBS solution.

The second needed component to create the aforementioned delivery system was microencapsulation. Essentially, three double emulsion solvent evaporation techniques were used to encapsulate Ceftriaxone, the antibiotic used in this study.

- Water in oil in water double emulsion (W/O/W);
- Water in oil in oil double emulsion (W/O/O);
- Solid in oil in oil double emulsion (S/O/O).

The water in oil in water double emulsion was the technique that showed the best practical results in the *in vitro* release testing. It was with this method that the release occurred in a more gradual manner. It was also in this method that the encapsulation efficiency values average was higher. Even so, these preparations need to be optimized, in order to lower the initial antibiotic release, which is too hasty when compared with the ideal release profile. In all cases, the percent of antibiotic mass release was of approximately 70% in the first few hours. The goal is to achieve a system where the antibiotic is released gradually over around 6 weeks.

The third part of this process was to combine the above-mentioned components to obtain a controlled delivery system. These parts were associated in three different ways in

order to inspect which one was the most suitable delivery system for the main purpose of delivering the antibiotic and also to compare them and verify what was the contribution of each one to the localized controlled delivery system, proposed as the main goal of this work. The investigated systems were the following.

- Gelatin coated bone plates impregnated with Ceftriaxone solution;
- Gelatin coated bone plates with addition of microparticles;
- Gelatin coated bone plates impregnated with Ceftriaxone solution and with addition of microparticles.

All the devices were subject to *in vitro* release testing. They all presented the same excessive initial release, followed by the complete release of the antibiotic after only a few days of the beginning of the test.

There is, therefore, the need to optimize the studied release systems, in order to enable the creation of a system with the ideal release profile, releasing approximately 50% of the antibiotic in the initial instants, followed by a gradual release during around 6 weeks. However, the results acquired during this study allow the creation of scientific foundations that may be used in future work.

# Índice de Figuras

<b>Figura M.1</b> – Representação do perfil de libertação ideal de um sistema de libertação controlada e localizada de antibióticos para o tratamento de infecções ósseas .....	XVI
<b>Figura M.2</b> – Esquema representativo da estratégia experimental adoptada no presente trabalho ...	XVII
<b>Figura M.3</b> – Representação dos perfis de libertação correspondentes a cada metodologia proposta para a incorporação do antibiótico.....	XVII
<b>Figura M.4</b> – Representação esquemática do método utilizado para a incorporação das micropartículas com fármaco imobilizado no filme de gelatina que reveste o osso e posterior impregnação deste sistema com solução de antibiótico.....	XVIII
<b>Figura 1.1</b> - Representação esquemática da estrutura de um osso longo [5].....	2
<b>Figura 1.2</b> - Comparação entre a administração de fármacos por métodos convencionais (a) e por sistemas de libertação controlada (b), onde A representa a administração do fármaco [20].....	9
<b>Figura 1.3</b> – Representação esquemática simplificada do funcionamento de um espectrofotómetro.....	13
<b>Figura 1.4</b> – Representação esquemática do funcionamento da Microscopia Electrónica de Varrimento [30].....	14
<b>Figura 2.1</b> - Variação do módulo de rigidez da gelatina com a temperatura [37].....	17
<b>Figura 2.2</b> – Representação da reacção de reticulação da gelatina por acção da carbodiimida EDC.....	18
<b>Figura 2.3</b> –Esquema representativo do procedimento experimental referente à produção dos filmes de gelatina e respectivos testes.....	19
<b>Figura 2.4</b> – Variação do grau de reticulação (em percentagem) em função do rácio mol EDC / mol COOH.....	23
<b>Figura 2.5</b> – Variação da capacidade de absorção de água em função do grau de reticulação.....	24
<b>Figura 2.6</b> – Ensaio de degradação dos filmes de gelatina em PBS, representando a variação da massa dos filmes de gelatina em função do tempo.....	25
<b>Figura 2.7</b> - Ensaio de degradação dos filmes de gelatina em tampão TES com cálcio e collagenases, representando a variação da massa dos filmes de gelatina em função do tempo.....	26
<b>Figura 3.1</b> – Representação dos vários tipos de micropartículas existentes.....	29
<b>Figura 3.2</b> – Esquema representativo do método extracção/evaporação do solvente numa emulsão óleo/água.....	30

<b>Figura 3.3</b> – Esquema representativo do método de extracção/evaporação do solvente numa dupla emulsão água/óleo/água.....	31
<b>Figura 3.4</b> – Representação esquemática das vias de obtenção de PLA. Adaptado de [50].....	32
<b>Figura 3.5</b> – Representação da estrutura química do PLGA [56].....	33
<b>Figura 3.6</b> – Representação esquemática de um dos processos de obtenção da Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona) [Adaptado de [65]].....	34
<b>Figura 3.7</b> – Estrutura Química da Ceftriaxona [70].....	35
<b>Figura 3.8</b> – Aspecto macroscópico de a) micropartículas w/o/w; b) micropartículas w/o/o; c) micropartículas s/o/o (75PLA/25PLGA); d) micropartículas s/o/o 100PLGA.....	42
<b>Figura 3.9</b> - Imagens de SEM das micropartículas 100%PCL.....	43
<b>Figura 3.10</b> - Imagens de SEM das micropartículas 25%PLA/75%PCL.....	43
<b>Figura 3.11</b> – Imagens de SEM das micropartículas #4.....	44
<b>Figura 3.12</b> – Perfil de libertação in vitro da Ceftriaxona encapsulada nas micropartículas produzidas pelo método de dupla emulsão w/o/w.....	47
<b>Figura 3.13</b> – Perfil de libertação in vitro da Ceftriaxona encapsulada nas micropartículas produzidas pelo método de dupla emulsão w/o/o.....	48
<b>Figura 3.14</b> – Perfil de libertação in vitro da Ceftriaxona encapsulada nas micropartículas produzidas pelo método de dupla emulsão s/o/o.....	49
<b>Figura 4.1</b> – Imagem de placas de osso de origem bovina utilizadas.....	52
<b>Figura 4.2</b> – Imagens de SEM das placas de osso revestidas por gelatina.....	55
<b>Figura 4.3</b> – Imagens de SEM do revestimento de gelatina.....	55
<b>Figura 4.4</b> – Imagens SEM de revestimentos de gelatina com micropartículas incorporadas.....	56
<b>Figura 4.5</b> – Perfil de libertação de placas de osso revestidas por gelatina com impregnação em solução de CFX.....	57
<b>Figura 4.6</b> - Perfil de libertação normalizado de placas de osso revestidas por gelatina com impregnação em solução de CFX.....	58
<b>Figura 4.7</b> – Perfil de libertação de placas de osso revestidas por gelatina, com adição de micropartículas.....	59
<b>Figura 4.8</b> – Perfil de libertação de placas de osso revestidas por gelatina e impregnadas por solução de CFX com adição de micropartículas.....	60
<b>Figura 4.9</b> – Comparação entre os vários perfis de libertação.....	61

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> – Propriedades necessárias de um substituto ósseo e suas definições [Adaptado de [8]].....	4
<b>Tabela 1.2</b> - Exemplos de compósitos e nanocompósitos utilizados como substitutos ósseos [16].....	8
<b>Tabela 1.3</b> - Sistemas de liberação controlada e respectivos mecanismos de liberação.....	10
<b>Tabela 1.4</b> – Materiais transportadores mais utilizados para SLLA e antibióticos associados Adaptado de [22].....	12
<b>Tabela 3.1</b> – Parâmetros variados na preparação de micropartículas pelo método de dupla emulsão água/óleo/óleo (W/O/O).....	38
<b>Tabela 3.2</b> – Eficiências de Encapsulamento dos lotes de micropartículas produzidas.....	45
<b>Tabela 3.3</b> – Percentagem de Ceftriaxona libertada durante as primeiras 24 horas.....	49
<b>Tabela 4.1</b> – Micropartículas utilizadas nas placas de osso revestidas.....	54
<b>Tabela 4.2</b> – Micropartículas utilizadas nas placas de osso revestidas, com impregnação em solução de CFX.....	54

# Acrónimos

ACN - Acetonitrilo

CPC – Cimento de Fosfato de Cálcio

DBM – Matriz Óssea Desmineralizada

DCM - Diclorometano

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

MES - Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidratado

NHS - N-hidroxisuccinimida

PBS – Tampão Fosfato Salino

PCL - Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona)

PE-HD – Polietileno de Alta Densidade

PHB - Poli- $\beta$ -(hidroxibutirato)

PHBV - Poli- $\beta$ -(hidroxibutirato-co-valerato)

PLA - Poli (Ácido-Láctico)

PLGA - Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

PMMA - Poli(metacrilato de metilo)

SEM – Microscopia Eletrônica de Varrimento

SLCL – Sistema de Liberação Controlada e Localizada

SLLA – Sistema de Liberação Localizada de Antibiótico

TCP – Fosfato tricálcico

TES - Ácido N-[Tris(hidroxi metil)-metil]-2-aminoetanosulfónico

TNBS - Acido 2,4,6-Trinitrobenzenosulfonico

UV – Ultra Violeta

## Motivação e Objectivos

O aumento da esperança média de vida e, conseqüentemente, da população geriátrica, assim como alguns efeitos adversos do estilo de vida moderno, têm resultado num aumento do número de pacientes do foro ortopédico. Uma das complicações mais comuns em cirurgia ortopédica é a ocorrência de infecções, onde se inclui a osteomielite, patologia que é definida pela inflamação do tecido ósseo, causada principalmente por bactérias e, por vezes, por fungos. O sucesso no tratamento desta condição patológica ainda não atingiu valores comparáveis aos de outras patologias devido, em grande parte, à incapacidade de maximizar o acesso de antibióticos ao osso e também à inabilidade de manter concentrações adequadas por extensos períodos de tempo quando os antibióticos são administrados por uma via sistémica.

O uso de sistemas de libertação controlada e localizada de antibióticos pode superar estas limitações, uma vez que a condução do fármaco para o local específico onde deve actuar maximiza a sua eficiência e reduz os efeitos adversos. Sendo utilizados numa estratégia de cooperação com antibióticos de aplicação sistémica ou de forma independente, estes sistemas permitem uma diminuição dos níveis de toxicidade celular, já que são necessárias quantidades inferiores de fármaco para efectuar o tratamento.

O objectivo último deste trabalho é a preparação de um sistema de libertação controlada e localizada de antibióticos para ser aplicado em cirurgias reconstrutivas, de modo a prevenir ou tratar possíveis infecções ósseas que possam surgir como consequência directa de intervenções cirúrgicas. Assim, proceder-se-á à imobilização de um antibiótico de largo espectro em matrizes poliméricas, com o objectivo de criar um sistema de libertação apropriado para ser aplicado na área reconstruída e com a capacidade de libertar o fármaco de acordo com uma taxa terapêutica e por um período de tempo consentâneo com a prevenção ou tratamento de possíveis infecções pós-operativas.

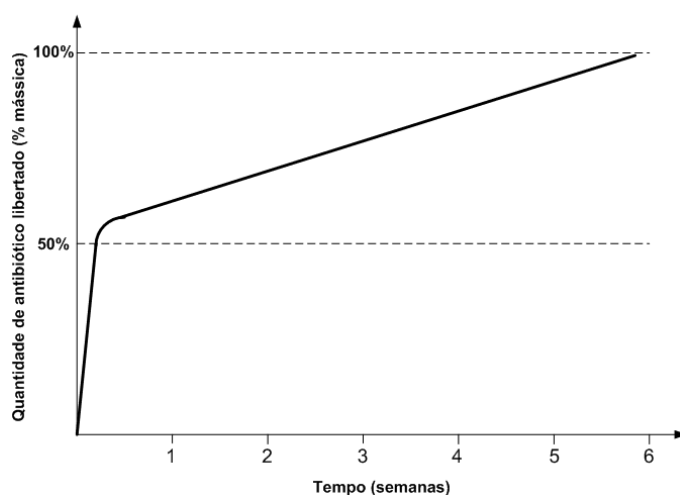
De salientar, todavia, que este objectivo foi já perseguido num trabalho anterior [1], onde se tentou imobilizar um antibiótico (Ceftriaxona) à superfície de um osso de origem bovina, seguindo várias metodologias, designadamente:

- i) A imobilização do fármaco à superfície do osso através de ligações covalentes;

- ii) Impregnação de placas ósseas e posterior revestimento com um filme formado por camadas alternadas de pectina e quitosano;
- iii) Mistura da fase óssea na forma de partículas numa fase polimérica onde o fármaco foi previamente imobilizado.

Nenhuma destas tentativas foi bem sucedida no que concerne à obtenção de um sistema de libertação sustentada adequado.

Com base nestes resultados, planeou-se uma nova estratégia experimental para desenvolver um sistema com um perfil de libertação do fármaco mais adequado para a aplicação pretendida, isto é, um Sistema de Libertação Controlada e Localizada (SLCL) que liberte cerca de 50% do fármaco numa fase inicial, sendo o restante libertado lentamente durante um período que varia entre 4 a 6 semanas, como se observa no perfil de libertação representado na figura 1.1.



**Figura M.1 – Representação do perfil de libertação ideal de um sistema de libertação controlada e localizada de antibióticos para o tratamento de infecções ósseas.**

Para atingir estes objectivos, adoptaram-se diferentes metodologias que tiveram como denominador comum o revestimento de placas de osso com um filme de gelatina (Figura M.2). O antibiótico (Ceftriaxona – CFX) será incorporado neste filme usando diferentes procedimentos: impregnação do filme com solução de CFX, encapsulamento do antibiótico em micropartículas poliméricas e a combinação destas duas metodologias, por forma a verificar qual das formulações apresenta um perfil de libertação mais próximo do pretendido.



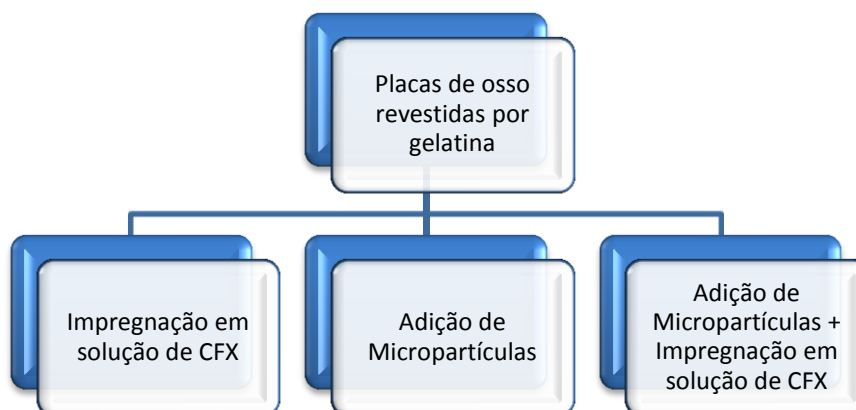


Figura M.2 – Esquema representativo da estratégia experimental adoptada no presente trabalho.

Pretende-se, com a impregnação do antibiótico no filme de gelatina reticulada, libertar uma grande quantidade de fármaco (cerca de 50%) durante os primeiros dias. Já com a utilização de micropartículas pretende obter-se uma libertação mais lenta mas constante do fármaco, de forma a prolongar a sua acção durante algumas semanas.

Idealmente, cada método de imobilização do antibiótico apresentará diferentes contribuições para o sistema de libertação final, tal como ilustrado na figura M.3.

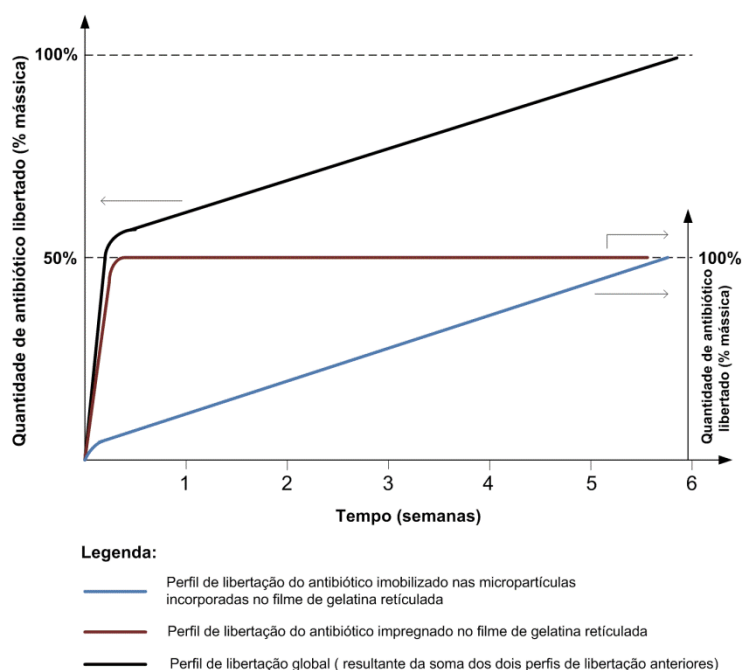
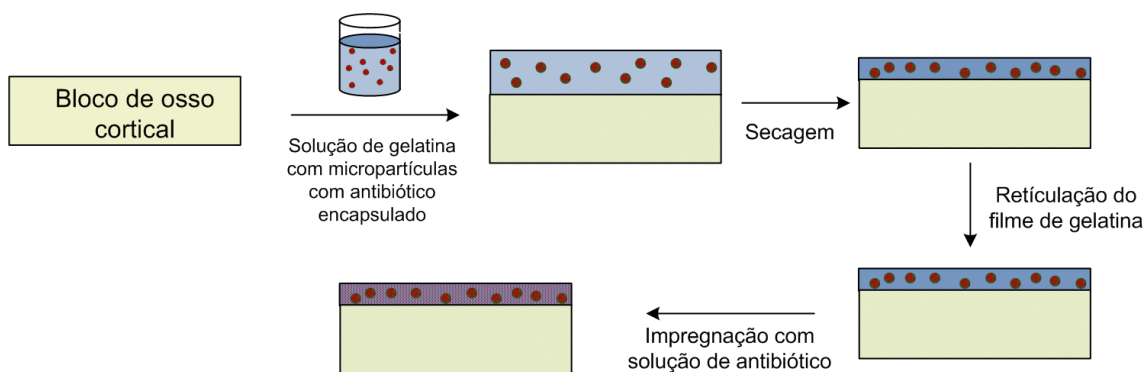


Figura M.3 – Representação dos perfis de libertação correspondentes a cada metodologia proposta para a incorporação do antibiótico.

Prevê-se que o resultado da combinação dos dois métodos de incorporação do fármaco (encapsulamento nas micropartículas e impregnação no filme), cujo procedimento experimental é representado esquematicamente na figura M.4, corresponda a um perfil de libertação o mais próximo possível do ideal.



**Figura M.4 – Representação esquemática do método utilizado para a incorporação das micropartículas com fármaco imobilizado no filme de gelatina que reveste o osso e posterior impregnação deste sistema com solução de antibiótico.**

A presente tese está organizada em 5 capítulos. No capítulo inicial apresentam-se os fundamentos teóricos necessários à compreensão deste trabalho.

O segundo capítulo inicia-se por uma introdução teórica relativa ao material utilizado como revestimento ósseo, a gelatina, juntamente com uma abordagem aos principais métodos de reticulação existentes. Termina com a apresentação do procedimento experimental utilizado na produção de filmes de gelatina, seguido pelos resultados e respectiva discussão.

No terceiro capítulo descreve-se o processo de produção das micropartículas, suas características e materiais e métodos empregues no seu desenvolvimento. O capítulo é concluído pela apresentação e discussão de resultados.

O quarto capítulo relata a combinação dos processos apresentados nos capítulos anteriores, com vista à criação de um Sistema de Libertação Controlada e Localizada. Inclui-se o procedimento experimental adoptado, bem como a exposição dos resultados e sua explicação.

O capítulo final pretende expor as conclusões obtidas no decurso deste trabalho, juntamente com algumas sugestões para trabalho futuro, de modo a otimizar o processo.

# Capítulo 1

## Introdução Geral

## Osso – Estrutura e organização

O osso é um órgão que constitui o esqueleto dos seres vertebrados, sendo as suas principais funções as de suporte mecânico, protecção dos órgãos vitais, mobilidade, armazenamento de minerais (nomeadamente cálcios e fosfatos) e produção de células sanguíneas. De entre as várias morfologias e modos de as agrupar destacam-se as quatro categorias seguintes: ossos longos, curtos, chatos ou planos e irregulares. No caso do osso utilizado neste trabalho, o fémur (Figura 1.1), que se classifica como sendo um osso longo, uma vez que o seu comprimento predomina sobre a sua largura e espessura, evidenciam-se, em traços gerais, três regiões. A diáfise, a parte mais longa e de formato aproximadamente cilíndrico, sendo o resultado do centro de ossificação primário do osso, as epífises, nome que tomam as extremidades de forma irregular onde se associam as estruturas articulares, e as metáfises, designação dada às regiões que fazem a ligação entre diáfise e epífise [2-4].

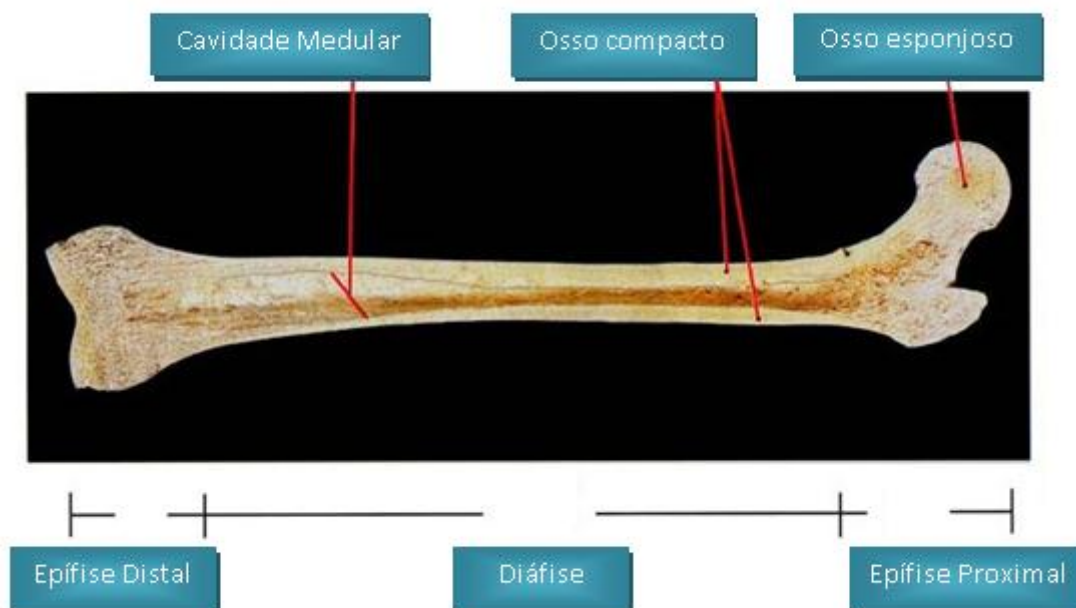


Figura 1.1 - Representação esquemática da estrutura de um osso longo [5].

Ainda que apresentem morfologias variadas, a organização a nível geral dos ossos é bastante semelhante. Quanto às componentes básicas, destacam-se duas distintas: o osso cortical ou compacto e o osso esponjoso ou trabecular [2].

O osso cortical constitui cerca de 70 a 80 por cento da massa óssea total, apresentando uma elevada densidade, com valores de porosidade que variam entre os 5 e os 10 por cento e encontra-se na superfície exterior de todos os ossos, conferindo-lhes rigidez. O osso compacto é composto por sistemas de Havers, sendo estes uma densa estrutura de anéis concêntricos de matriz óssea que contêm no seu interior os canais de Havers (conjuntos de lamelas mineralizadas orientadas alternadamente que englobam vasos sanguíneos e nervos). Entre os anéis de matriz encontram-se interstícios designados por lacunas, estando estas ligadas aos canais de Havers por canalículos que providenciam um meio de comunicação através da densa matriz óssea.

O osso esponjoso constitui os 20 a 30 por cento restantes da massa óssea, sendo menos denso e mais poroso do que o osso cortical e encontra-se no interior dos ossos, sendo responsável pela sua resiliência e flexibilidade. O osso esponjoso é constituído por espículas de osso adjacentes a pequenas cavidades irregulares que contêm medula óssea vermelha, um tecido hematopoiético capaz de produzir células sanguíneas [2, 3].

Ao nível da composição química da matriz óssea evidenciam-se o colagénio e a hidroxiapatite. O colagénio é uma macromolécula proteica que representa a quase totalidade da fase orgânica do osso e que se entrelaça entre si própria para originar fibras flexíveis e elásticas no tecido ósseo. Esta fase orgânica é impregnada pela hidroxiapatite,  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , um fosfato de cálcio, sendo uma fase mineral que representa aproximadamente 65% do conteúdo da matriz óssea. É graças à combinação destes dois materiais que o osso apresenta propriedades excelentes de resposta a tensões externas, sendo ao mesmo tempo capaz de apresentar crescimento e auto-renovação no caso, por exemplo, da ocorrência de fracturas [2-4].

Quanto ao tipo de células ósseas destacam-se os três principais: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos, que tal como os osteoclastos derivam de células mesenquimatosas pluripotentes, são células mononucleadas de forma variável e originam precursores de medula óssea e regulam a sua mineralização. Estes osteoblastos, uma vez atingida a sua maturação, permanecem depois aprisionados dentro das lacunas da própria matriz e convertem-se em osteócitos, células que mantêm o tecido ósseo e que recebem nutrientes através de canalículos, permitindo-lhe sobreviver num ambiente altamente

mineralizado. Os osteoclastos são células multinucleadas, derivadas de células hematopoiéticas da linhagem monócito-macrofágica e operam de modo antagónico aos osteoblastos, sendo responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo. Este compromisso entre os vários processos opostos de formação e absorção óssea permite aos ossos manter ou alterar a sua forma e dimensão durante o seu crescimento [2-4].

## Substitutos Ósseos

Os enxertos ósseos são o segundo tipo de tecido mais transplantado, sendo apenas superados pelo sangue e, enquanto órgão, o osso é transplantado com uma frequência 10 vezes superior à de qualquer outro órgão transplantável. São utilizados em cirurgia ortopédica, traumatológica e maxilofacial, sendo indicados para fracturas com perda óssea, cominuição, defeitos metafisais, uniões atrasadas, mal-uniões e não-uniões, lesões ósseas e artrodese podendo-se definir um substituto ósseo como sendo “todo o material de origem humana, animal, vegetal ou sintético, destinado à implantação no Homem com a perspectiva de uma reconstituição do capital ósseo, para o reforço de uma estrutura óssea ou para o preenchimento de uma perda de substância óssea de origem traumática ou ortopédica [6, 7].

O material ideal para actuar como substituto ósseo deve, além de exibir propriedades mecânicas semelhantes às do osso, ser biocompatível, biodegradável, bioactivo, osteoindutor, osteocondutor e osteointegrador. A definição destas propriedades é dada na Tabela 1.1 [8].

**Tabela 1.1 – Propriedades necessárias de um substituto ósseo e suas definições [Adaptado de [8]].**

Característica	Definição
<b>Biocompatibilidade</b>	Capacidade de despoletar uma resposta apropriada por parte do organismo onde se insere
<b>Biodegradabilidade</b>	Capacidade de se degradar in vivo, permitindo o crescimento de novo tecido
<b>Bioactividade</b>	Capacidade de formar ligações químicas com o osso, originando uma interface robusta
<b>Osteoindução</b>	Capacidade de induzir formação óssea pela diferenciação ou maturação de células estaminais em precursores ósseos
<b>Osteocondução</b>	Capacidade de permitir a invasão vascular e celular do tecido ósseo em formação
<b>Osteointegração</b>	Capacidade de criar e desenvolver tecido ósseo

De um modo geral, estes podem ser classificados tendo em conta a sua composição química ou o seu comportamento biológico. No primeiro caso consideram-se 3 categorias: polímeros, cerâmicos e compósitos. Na classificação segundo o comportamento biológico, o factor a ter em conta é a resposta do tecido hospedeiro e as categorias são as seguintes: Bioinertes, biotolerados, bioactivos e reabsorvíveis. Neste trabalho utilizar-se-á a primeira classificação [6, 7].

O **enxerto autólogo**, recolhido do próprio indivíduo, normalmente de osso da crista ilíaca, é o que reúne as melhores características, promovendo propriedades osteoindutoras, osteocondutoras e osteointegradoras óptimas, considerando-se os restantes tipos de enxerto como tendo capacidades sub-óptimas. Apresentam uma matriz condutora de minerais, cartilagem e proteínas, sem problemas de histocompatibilidade, não se levantando problemas de rejeição ou de transmissão de doenças [6, 9].

No entanto, os auto-enxertos também apresentam algumas limitações como sendo a baixa disponibilidade para recolha, morbilidade do local dador, aumento do período operativo, aumento da perda de sangue, aumento do tempo de internamento e conseqüente aumento de custos, podendo também falhar na prática clínica, uma vez que grande parte dos elementos osteogénicos não sobrevivem ao transplante. O próprio mecanismo de recolha de osso autólogo está também associado ao aparecimento de hematomas, danificação de nervos, formação de hérnias, dor crónica no local dador, entre outras complicações, numa percentagem que varia entre os 8.5 e os 20 pontos percentuais [7-10].

Os **enxertos alógenos** (aloenxertos) são também um material muito utilizado enquanto substituto ósseo, podendo ser utilizado congelado, liofilizado ou fresco, ainda que nesta última forma o seu uso seja menos aconselhado já que pode levantar problemas de respostas imunitárias e transmissão de doenças. O processamento e esterilização podem ser solução para esta questão, ainda que possam reduzir as propriedades biológicas e mecânicas do tecido ósseo [6, 11].

Uma outra alternativa de substitutos ósseos, com estrutura e composição semelhante ao osso humano são os **enxertos xenógenos**, provenientes de indivíduos de outra espécie, sendo os mais comuns os de origem bovina. No entanto, tal como os enxertos alógenos, também os enxertos xenógenos apresentam problemas imunitários agravados pela possibilidade de transmissão do prião da encefalopatia espongiforme bovina (vulgo, doença das vacas loucas). Contudo, a sua acessibilidade e baixo custo, associados a tratamentos e

selecção adequados, como tratamento térmico apropriado (> 300°C) e/ou tratamento com alcalis minimiza esses riscos [6].

Tanto os enxertos alógenos como os xenógenos podem sofrer tratamento por forma a que seja aproveitada apenas a parte orgânica, composta essencialmente por colagénio ou a parte mineral, maioritariamente constituída por hidroxiapatite.

O **colagénio** é a proteína mais abundante da matriz extracelular. Funciona maioritariamente como transportador de outros materiais (factores osteogénicos, osteoindutores e osteocondutores) e não como substituto ósseo *per si*. Isto acontece porque o colagénio não apresenta propriedades mecânicas estruturais. Além disto, apresenta risco de imunogenicidade [2, 4, 6, 7, 12].

A **matriz óssea desmineralizada (DBM)** é o resultado da remoção da maior parte da componente mineral de um aloenxerto pela sua colocação em ácido, mantendo a componente proteica. É posteriormente processada, de modo a reduzir o potencial viral do enxerto mas mantendo a sua estrutura trabecular. O facto de ser desmineralizada torna a estrutura mais fraca, não eliminando no entanto os factores de crescimento, tornando-os até mais disponíveis, o que torna a DBM mais osteoinductiva quando comparada com aloenxerto não processado [6, 7].

Em alternativa, os enxertos ósseos podem ser tratados por **calcinação**, de modo a que apenas seja aproveitada a parte mineral. Este método baseia-se no tratamento térmico de amostras ósseas a temperaturas entre os 600 e os 1200°C, obtendo-se hidroxiapatite natural[13].

Por forma a ultrapassar muitos dos inconvenientes citados dos auto, alo e xenoenxertos, surgiram estratégias alternativas para desenvolver materiais capazes de promover a reparação óssea - os materiais sintéticos (ou aloplásticos). Com efeitos estes materiais não exigem procedimentos cirúrgicos prévios, são facilmente disponíveis e em quantidade ilimitadas e são inertes, podendo ser produzidos com vários tamanhos, composição química, morfologia e estrutura.

São utilizados como substitutos ósseos vários polímeros naturais e sintéticos, normalmente em compósitos com materiais cerâmicos, como sendo por exemplo a gelatina, material utilizado neste trabalho na produção dos filmes para revestimento ósseo, o quitosano, o alginato e, no grupo dos poliésteres, o PLA, o PLGA, o PCL, o PHB e o PHBV.



No campo dos substitutos ósseos cerâmicos destacam-se aqueles baseados em fosfatos de cálcio, onde se incluem os fosfatos tricálcicos (TCP), os cimentos de fosfato de cálcio (CPC), a hidroxiapatite e o biovidro [6, 7].

Os **fosfatos tricálcicos** existem sob a forma  $\alpha$  e  $\beta$ , tendo como fórmula química  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . São rapidamente absorvidos pelo organismo e apresentam uma estequiometria semelhante aos precursores ósseos, enquanto que a **hidroxiapatite** é semelhante à componente mineral. São ambos biocompatíveis, diferindo no entanto no contacto com o local onde são implantados. Os TCPs são removidos e o seu espaço é ocupado por novo osso, sendo a hidroxiapatite mais permanente. As suas aplicações são realizadas maioritariamente na forma granular, condição que aumenta a porosidade e superfície de contacto da matriz. Comparativamente com os fosfatos de cálcio cerâmicos, a hidroxiapatite apresenta algumas vantagens na medida em que providencia maior suporte estrutural, uma vez que a sua reabsorção ocorre a uma velocidade mais controlada. Além disso, a hidroxiapatite facilita a invasão vascular, pela sua estrutura, sendo também favorável ao crescimento ósseo [6, 7, 14].

Os **cimentos de fosfato de cálcio** são uma mistura de TCP- $\alpha$  com carbonatos de cálcio e fosfato monocálcico monohidratado. São aplicados na forma líquida, endurecendo depois *in vivo* no local da fractura ou defeito ósseo, sendo a longo prazo substituídos por novo tecido ósseo [6, 14].

O **biovidro** é o que apresenta maior variedade em termos de composição química, sendo esta de extrema importância, uma vez que diferentes conjugações de sílica, cálcio e fósforo permitem a produção de uma gama de vidros que varia desde os solúveis até aos não-reabsorvíveis. Este tipo de material tem como principal desvantagem a sua baixa resistência mecânica, limitação que reduz a sua aplicação a locais onde são exercidas cargas pequenas. O seu ponto forte reside nas suas propriedades osteocondutivas e osteointegrativas [6, 7, 10]

Por último, os **compósitos** são associações entre os materiais anteriormente referidos, geralmente entre materiais cerâmicos e poliméricos, com vista à obtenção das melhores características que cada um apresenta. Surge assim a oportunidade de manipular factores como a osteocondução, osteoindução e osteointegração e propriedades mecânicas tal como a resistência e o módulo de Young de modo a obter um material com propriedades funcionais semelhantes às dos enxertos autólogos, eliminando os seus factores negativos.

Incluídos neste grupo encontram-se os **nanocompósitos**, que utilizam materiais para enxerto ósseo a uma escala nanométrica, juntamente com componentes osteoindutivos e

osteogénicos, apresentando maior interacção química com o local onde são implantados, tal como maior área de superfície e melhores propriedades mecânicas quando comparados com os seus equivalentes à escala micro e macroscópica. Na tabela 1.2 apresentam-se alguns compósitos e nanocompósitos já investigados enquanto substitutos ósseos [7, 9, 14, 15].

**Tabela 1.2 - Exemplos de compósitos e nanocompósitos utilizados como substitutos ósseos [16].**

	<b>Exemplos</b>	<b>Aplicações</b>
<b>Compósitos</b>	HA/colagénio, HA/gelatina, HA/quitosano, HA/alginato, HA/PLGA, HA/PLLA, HA/PE	Substitutos ósseos, implantes auriculares, matrizes de tecido ósseo, membranas de regeneração óssea, libertação de fármacos no osso.
<b>Nanocompósitos</b>	Nano-HA/colagénio Nano-HA/gelatina Nano-HA/quitosano Nano-HA/PLLA	Áreas de ortopedia, engenharia de tecidos e sistemas de libertação de fármacos.

## **Sistemas de libertação controlada de fármacos**

Um sistema de libertação controlada de fármacos (SLC) define-se como uma formulação com a capacidade de direccionar uma substância farmacológica até aos tecidos/órgãos alvo podendo libertá-la de forma programada ao longo do tempo. Estes sistemas pretendem colmatar os aspectos negativos verificados nas formulações convencionais que, para serem eficazes, requerem a utilização de elevadas concentrações de fármaco, já que apenas uma pequena percentagem deste alcança o local pretendido. É assim possível, utilizando SLC, atingir valores superiores de concentração de fármaco no local pretendido e níveis reduzidos na circulação sistémica [17-19].

As diferenças no funcionamento destes dois tipos de aplicação podem ser facilmente entendidas pela observação da figura 1.2.

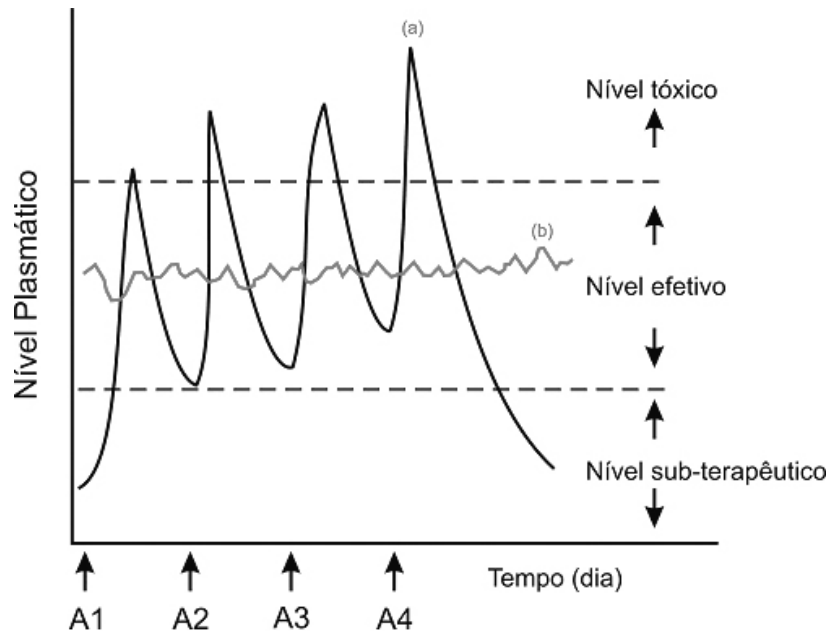


Figura 1.2 - Comparação entre a administração de fármacos por métodos convencionais (a) e por sistemas de liberação controlada (b), onde A representa a administração do fármaco [20].

Através da análise do gráfico, que compara a aplicação de um fármaco utilizando uma formulação convencional com a aplicação do mesmo fármaco através de um sistema de liberação controlada, verifica-se que nos SLC os níveis se mantêm relativamente constantes, com baixa oscilação, enquanto no método convencional além de ser necessário um maior número de aplicações são ainda registados valores de nível plasmático fora da banda efectiva de tratamento, tanto na zona de nível tóxico como no nível sub-terapêutico[15].

Existem vários métodos de classificação de sistemas de liberação controlada, sendo estes baseados no tipo de material utilizado, tipo de agente terapêutico utilizado, estado físico, modo de liberação do fármaco, entre outros. Utilizando o modo de liberação do fármaco como critério, destacam-se três categorias: sistemas controlados por difusão, sistemas controlados pelo solvente e sistemas controlados quimicamente. Na tabela 1.3 apresenta-se um resumo destes sistemas e dos seus mecanismos de liberação [15, 17, 18].

Tabela 1.3 - Sistemas de libertação controlada e respectivos mecanismos de libertação

Tipo de sistema	Mecanismo de libertação
<b>Controlado por difusão</b>	
- Sistemas de reservatório	Difusão através da membrana;
- Sistemas matriciais	Difusão através da matriz polimérica;
<b>Controlado por solvente</b>	
- Sistemas osmóticos	Transporte osmótico através da membrana semipermeável;
- Sistemas de swelling	Absorção de água pela matriz polimérica;
<b>Controlado quimicamente</b>	
- Sistemas de cadeias pendentes	Hidrólise/acção enzimática e difusão através da matriz polimérica;
- Sistemas monolíticos	Desintegração da matriz por erosão e difusão.

Os materiais mais utilizados na preparação de SLC são os polímeros, estando ainda assim sujeitos a alguns requisitos para que possam ser utilizados. Estes devem ser biocompatíveis e os seus produtos de decomposição não podem apresentar toxicidade para o organismo onde estão inseridos. As suas propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas são também um factor a considerar, uma vez que uma grande percentagem do corpo humano é constituída por água. Por último, o factor biodegradabilidade assume uma elevada importância na escolha do polímero para uma determinada aplicação, sendo as características pretendidas variáveis dependendo do fim a que se destina o SLC [1, 18].

## Sistemas de libertação localizada de antibióticos para aplicações em ortopedia

Os sistemas de libertação localizada de antibióticos (SLLA) constituem parte do protocolo indicado para o tratamento de infecções ósseas, fracturas e osteomielite. Estes sistemas permitem, idealmente, produzir elevadas concentrações de antibiótico no local infectado ao mesmo tempo que mantêm baixos os níveis de toxicidade na circulação sistémica [17, 21, 22].

Os SLLA são utilizados há mais de 90 anos, ainda que não nos moldes que hoje se conhecem. A utilização de sistemas de libertação localizada para o tratamento de tecidos

ósseos era já registada aquando da Primeira Guerra Mundial, altura em que Alexander Fleming observou que a aplicação de anti-sépticos em infecções crónicas reduzia a actividade bacteriana. Com o evoluir dos métodos de tratamento e com a descoberta de novos agentes antimicrobianos, os sistemas de libertação localizada de antibióticos foram-se popularizando e em 1970, na Alemanha, Buchholz e Engelbrecht anunciaram a possibilidade de se incorporarem antibióticos em cimentos de poli(metacrilato de metilo) (PMMA), sendo que a sua libertação localizada reduzia as infecções pós-operativas. Foi, no entanto, a partir do ano 2000 que a investigação no campo dos SLLA cresceu mais significativamente, sendo várias as formulações que procuram obter um sistema ideal [22-24].

Em 2001, K. Klemm publicou um artigo onde comprovava a eficácia da utilização de contas de PMMA contendo gentamicina no tratamento da osteomielite (90.4%). Nelson *et al.* (2004) desenvolveram pérolas de cimento ósseo carregadas com gentamicina, sendo estas o *gold-standard* para SLLA em cirurgia ortopédica actualmente [23, 24].

No entanto, este sistema não é biodegradável, obrigando a nova operação de remoção das pérolas de cimento ósseo após libertação do antibiótico. O processo de remoção apresenta, normalmente, maiores complicações do que o processo de implantação uma vez que existe cicatrização e adesão dos tecidos, podendo originar novas infecções. Levantam-se ainda questões de risco adicional para o doente, aumento de custos e possibilidade de desenvolvimento de resistência ao antibiótico por parte das bactérias. Surge então uma tendência para o desenvolvimento de materiais biodegradáveis, evitando assim a necessidade de procedimentos cirúrgicos secundários, possibilitando de igual modo a manutenção de valores antibacterianos no local de infecção. Destacam-se nesta área a utilização de enxertos e substitutos ósseos e outros polímeros naturais, sendo estes impregnados ou revestidos por filmes contendo antibióticos, possibilitando a sua libertação no local infectado [22-25].

Em 2011, Ketonis C. *et al* publicaram os resultados da ligação covalente do antibiótico vancomicina a enxertos alógrafos, obtendo melhorias nos tempos de libertação do fármaco assim como na resistência bacteriana do osso [1].

São essencialmente dois os componentes a considerar aquando do desenvolvimento de um sistema de libertação local de antibióticos: material transportador e antibiótico utilizado. Apresenta-se na tabela 1.4 um resumo de potenciais SLLA de antibióticos já investigados.

Tabela 1.4 – Materiais transportadores mais utilizados para SLLA e antibióticos associados Adaptado de [22].

Material Transportador	Antibiótico Utilizado
<b>Não Biodegradáveis</b>	
Cimentos ósseos	Gentamicina, Vancomicina, Cefazolina, Ciprofloxacina.
Contas de cimento ósseo	Gentamicina, Tobramicina, Cefuroxima, Vancomicina.
<b>Biodegradáveis</b>	
Gesso de Paris	Gentamicina
Esponjas de colagénio	Gentamicina
Osso esponjoso	Vancomicina, Ciprofloxacina
Selante de fibrina	Cefazolina, Ciprofloxacina
Blocos de hidroxiapatite	Vancomicina
Cimento de fosfato de cálcio	Teicoplanina
<b>Diversos</b>	
Poliuretanos	Gentamicina, Ciprofloxacina
Fibras	Tetraciclina
Quitosano	Vancomicina

Além dos critérios referidos anteriormente, os agentes microbianos eleitos devem ter a capacidade de serem activos contra as bactérias patogénicas mais comuns no aparecimento da infecção ortopédica em causa, devem ser libertados localmente, excedendo a concentração inibitória mínima de forma evidente, não devem entrar na circulação sistémica nem originar respostas por parte do organismo, devendo ainda ser estáveis e solúveis em meios aquosos de modo a assegurar a difusão a partir do material transportador [22].

## Técnicas de caracterização utilizadas

### Espectrofotometria

A espectrofotometria é um método que se baseia na absorção de radiação electromagnética entre o ultravioleta e o vermelho - radiação luminosa - por parte das moléculas, processo este que tem lugar aquando da mudança de nível energético dos electrões, permitindo determinar a concentração de uma substância numa amostra[26, 27].

O espectrofotómetro divide a luz em feixes monocromáticos, utilizando um prisma, fazendo-os atravessar a amostra em estudo e registando a quantidade de luz absorvida pela solução para cada comprimento de onda (Figura 1.3).

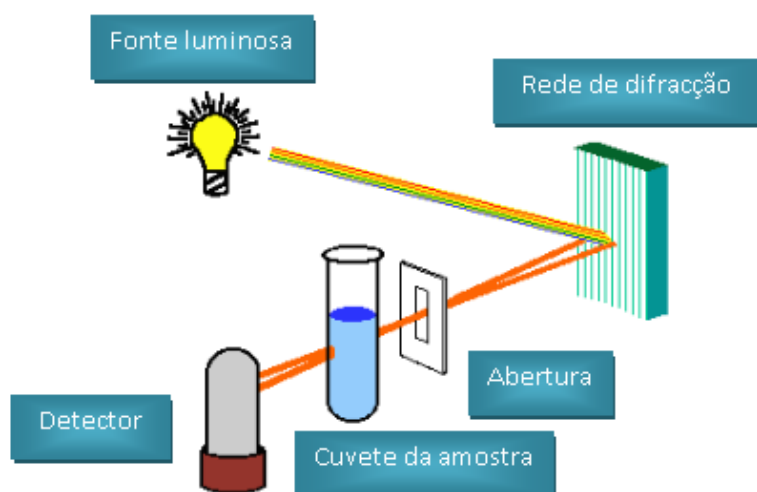


Figura 1.3 – Representação esquemática simplificada do funcionamento de um espectrofotómetro.

É assim possível obter um espectro de absorção, específico para cada substância, facilitando a identificação da amostra ou, como no caso deste trabalho, determinar a sua concentração. Isto é possível porque a quantidade de luz absorvida está directamente relacionada com a concentração do composto, segundo a Lei de Beer-Lambert.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

onde A é a absorvância para um determinado comprimento de onda,  $\epsilon$  uma constante correspondente a um comprimento de onda específico, c a concentração da solução e l a distância percorrida pelo feixe através da amostra, ou seja, a espessura da cuvete utilizada [26, 27].

## Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

A microscopia electrónica de varrimento é uma técnica que permite a obtenção de imagens de uma amostra com maior resolução, ampliação e profundidade de campo, quando comparada com outros métodos como sendo a microscopia óptica, possibilitando a aquisição de imagens tridimensionais.

Para este efeito, o SEM utiliza um canhão de electrões, ao contrário da microscopia óptica convencional onde se usa uma fonte luminosa. O canhão de electrões produz um feixe de electrões, normalmente por aquecimento de um filamento de tungsténio através de uma corrente eléctrica, que é depois colimado ao passar por um conjunto de lentes electromagnéticas que direccionam o feixe para a amostra.

Ao incidir na amostra, os electrões interagem dissipando energia cinética e originando sinais que incluem electrões secundários, que geram as imagens SEM, electrões retrodispersados, fotões, luz visível e energia na forma de calor. Estes sinais são então recolhidos por detectores dos vários tipos de sinal, produzindo as imagens SEM [28-32].

O esquema de funcionamento de SEM é representado na figura 1.4.

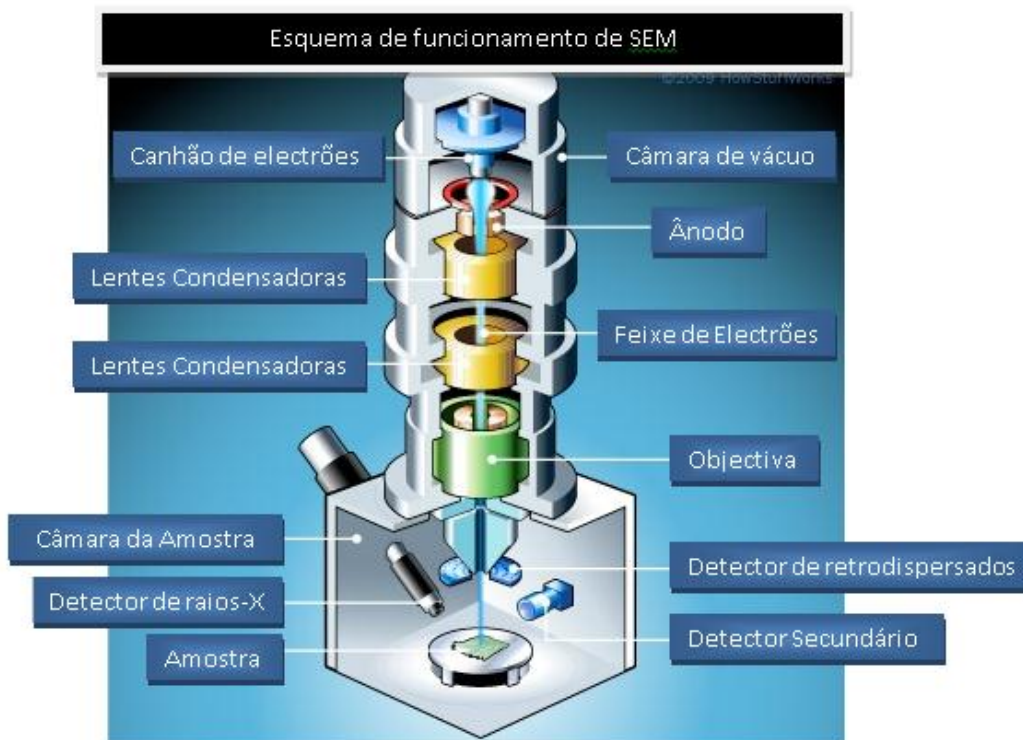


Figura 1.4 – Representação esquemática do funcionamento da Microscopia Electrónica de Varrimento [30].



## **Capítulo 2**

### **Preparação dos filmes de revestimento ósseo**

Este capítulo inicia-se pela descrição das características da gelatina, elemento principal na preparação dos filmes de revestimento ósseo que servirão de matriz para a imobilização do fármaco utilizado, como será relatado nos capítulos seguintes. Posteriormente introduzem-se os principais métodos utilizados na reticulação deste material, com enfoque na reticulação por carbodiimidas, método utilizado neste trabalho. Por fim apresenta-se o procedimento experimental relativo à sua produção e aos testes efectuados na averiguação das suas características, concluindo-se o capítulo com a apresentação e discussão dos resultados obtidos.

## **Gelatina**

A gelatina é um polímero natural solúvel derivado da hidrólise parcial do colagénio, sendo utilizada em aplicações farmacêuticas, médicas, cosméticas e alimentares pelas propriedades que apresenta como sendo a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade em meio fisiológico. Difere das restantes proteínas na sua ausência de organização interna, devida à organização aleatória das suas cadeias polipeptídicas. É solúvel em água, formando estruturas tridimensionais com zonas de junções intermoleculares microcristalinas [33-36].

Para ser convertido em gelatina o colagénio é pré-tratado, sendo aquecido em água até atingir temperaturas de cerca de 45°C. É, posteriormente, tratado quimicamente de modo a quebrar as ligações não-covalentes existentes, desorganizando assim a estrutura da proteína, induzindo a solubilização do colagénio. Finalmente, através de tratamento térmico, dá-se a quebra de ligações covalentes e pontes de hidrogénio, obtendo-se assim gelatina. A intensidade do pré-tratamento térmico e químico reflecte-se directamente na razão de conversão de colagénio em gelatina [33-35].

Consoante o pré-tratamento seja efectuado em meio ácido ou em meio básico, assim se obterá respectivamente gelatina Tipo-A ou gelatina Tipo-B. A principal diferença entre estes dois tipos de gelatina reside nos seus pontos isoeléctricos. Enquanto a gelatina Tipo-A apresenta um ponto isoeléctrico que varia entre 7 e 9, a gelatina Tipo-B apresenta valores entre 4 e 5,5. A variação entre os dois tipos de gelatina deve-se à maior concentração de grupos carboxílicos na gelatina Tipo-B, tornando-se carregada negativamente e, conseqüentemente, baixando o seu ponto isoeléctrico.

A utilização de um ou outro tipo de gelatina em diversas áreas varia consoante as propriedades reológicas desejadas, em particular as características viscoelásticas. São também de enorme importância as suas propriedades físico-químicas como a cor, transparência, solubilidade, bem como a sua estabilidade térmica e resistência mecânica. Como fontes de matéria-prima para obtenção de gelatina destacam-se a pele, cartilagem, tendões e ossos de porco e de bovino. É também possível produzir gelatina a partir de peixes, ainda que a sua quota de mercado seja de apenas 1,5%. No entanto, a sua utilização tem vindo a aumentar devido ao menor número de reacções alérgicas que despoleta [33-35].

O processo de gelificação da gelatina varia grandemente por acção da temperatura. A temperaturas mais baixas o processo de gelificação decorre de um modo mais acelerado, diminuindo à medida que a temperatura do sistema aumenta. Na figura 2.1 apresenta-se um gráfico representativo da evolução do módulo de rigidez da gelatina com a variação da temperatura [37-39].

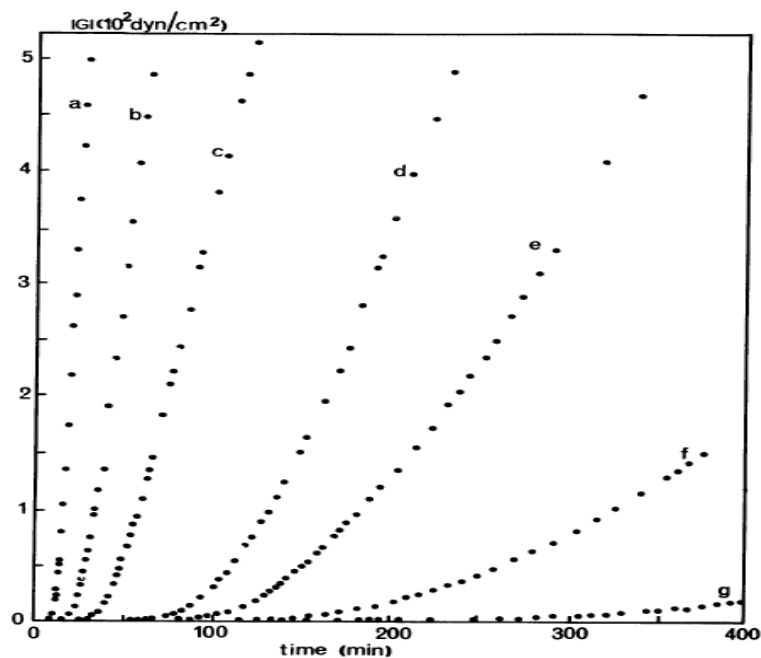


Figura 2.1 - Variação do módulo de rigidez da gelatina com a temperatura:

- a) T = 24°C; b) T = 25°C; c) T = 26°C; d) T = 26,5°C; e) T = 27°C;  
f) T = 27,5°C; g) T = 28°C [37].

## Principais métodos de reticulação de gelatina

A gelatina é obtida, tal como referido anteriormente, a partir do colagénio, material este que apresenta uma elevada taxa de degradação no organismo [40]. Assim, é necessário proceder a algum tipo de reticulação, de modo a tornar a estrutura mais resistente, mecânica e quimicamente, pela criação de ligações químicas entre os segmentos poliméricos [36, 41, 42].

Os materiais mais utilizados na reticulação de colagénio são o glutaraldeído, que faculta os maiores graus de reticulação à amostra, quando comparado com outros agentes químicos como os compostos epóxi, as acil-azidas e as carbodiimidas, material utilizado neste trabalho [43].

O processo de reticulação pela utilização de carbodiimidas (Figura 2.2) baseia-se na activação dos grupos carboxílicos presentes na gelatina, formando um complexo instável que reage com os grupos amina. As carbodiimidas, no caso concreto deste estudo, a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), têm a vantagem de não serem incorporadas no sistema, reduzindo os riscos de toxicidade [42, 44, 45].

Há ainda métodos físicos de reticulação, caracterizados pelo facto de não introduzirem elementos químicos no processo, como são exemplo a secagem, o aquecimento e a irradiação UV [45].

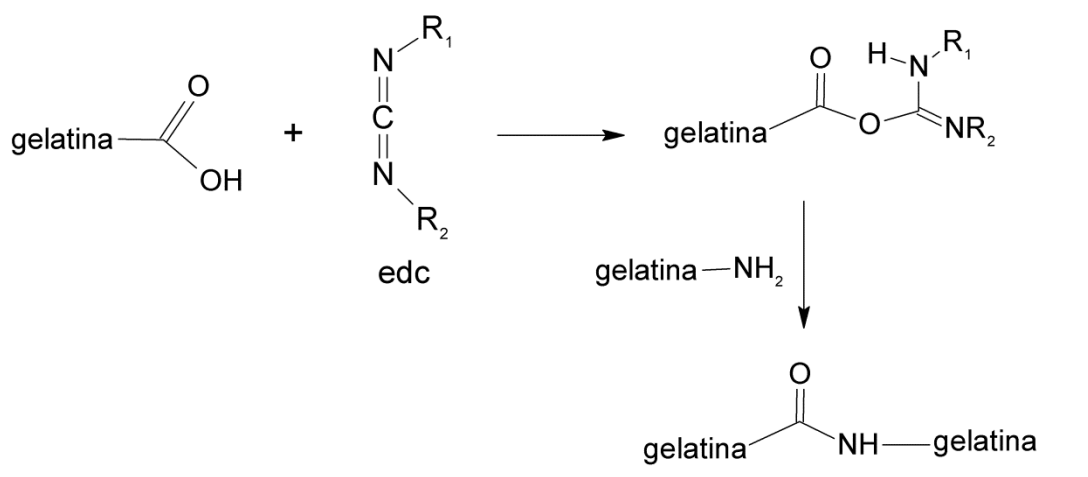


Figura 2.2 – Representação da reacção de reticulação da gelatina por acção da carbodiimida EDC.

Apresenta-se de seguida o procedimento experimental relativo à produção dos filmes de gelatina, seguindo-se os testes a que estes foram submetidos, de acordo com o esquema seguinte.

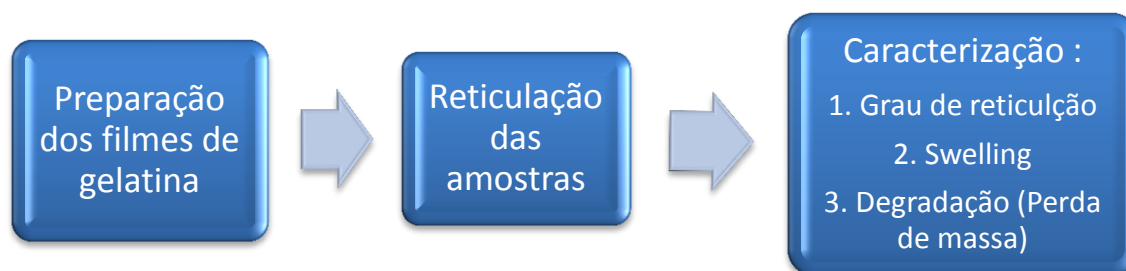


Figura 2.3 –Esquema representativo do procedimento experimental referente à produção dos filmes de gelatina e respectivos testes.

## Procedimento experimental

### Preparação dos filmes de gelatina

A gelatina foi dissolvida em água destilada (a uma temperatura de cerca de 50°C) na concentração de 4% (m/v). A solução preparada foi vertida em placas de Petri de PE–HD com 8,5 cm de diâmetro (40 ml por placa) e as placas foram deixadas a secar ao ar (numa *hotte*). Depois de secos, os filmes de gelatina, com uma espessura de  $0,156 \pm 0,01$  mm ( $n=13$ ), foram cortados em amostras quadradas com 1 cm de lado (e aproximadamente 25 mg de peso).

### Reticulação das amostras de gelatina com a carbodiimida EDC

A reacção ocorreu numa solução tampão MES (pH 5,5; C=0,1M; I=0,018M). As amostras de gelatina foram reticuladas utilizando diferentes razões molares de EDC para número de grupos COOH presentes na gelatina (nEDC:nCOOH): 0,25:1; 0,5:1; 1:1; 2:1; 4:1. O composto N-hidroxisuccinimida (NHS) foi adicionado na razão molar de 0,4:1 relativamente às moles de EDC. Para os cálculos considerou-se que existem 80 mmol de grupos carboxílicos por cada 100g de gelatina, conforme o indicado na ficha do produto.

A reacção deu-se em placas de cultura com 24 poços. Em cada poço foi colocada uma amostra de filme de gelatina (com aproximadamente 25 mg) e adicionado 1 ml de solução reaccional preparada no momento (tampão MES com as quantidades desejadas de EDC e NHS). As amostras foram deixadas a reticular durante 5 horas à temperatura de 4°C.

No final, as amostras foram retiradas da solução reaccional e mergulhadas numa solução 0,1 M de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> com 0,2 M de NaCl (pH ~ 8,7) durante 30 minutos, de forma a parar a reacção e desactivar os grupos COOH que não reagiram.

De seguida as amostras foram lavadas com água destilada abundante e secas numa estufa de vácuo à temperatura ambiente durante dois dias.

#### **Determinação do grau de reticulação por reacção com o reagente TNBS**

O grau de reticulação dos filmes de gelatina foi quantificado através da diferença entre a quantidade de grupos ε-amina livres antes e depois da reticulação. Na gelatina, estes grupos provêm essencialmente dos resíduos do aminoácido lisina e hidroxiprolina. A quantificação dos grupos amina foi feita através da reacção destes com o reagente Ácido 2,4,6-Trinitrobenzenosulfónico (TNBS), com base nos protocolos descritos na literatura.

Pequenas amostras de filmes reticulados (2 – 4 mg), pesadas com uma precisão de ± 0,01 mg, foram colocadas em tubos de ensaio. Em cada tubo adicionou-se 1 ml de água destilada, 1 ml de uma solução de NaHCO<sub>3</sub> a 4% (m/v) e 1 ml de solução de TNBS 0,5% (m/v). A reacção foi deixada a decorrer durante 5 horas a 40°C. Para isso, os tubos de ensaio foram mergulhados num banho de água termoestatizado.

Depois da reacção, e de forma a dissolver os filmes, adicionaram-se 3 ml de HCl 6M e elevou-se a temperatura para 60°C, até os filmes se dissolverem completamente.

Finalmente, adicionaram-se 4 ml de água destilada, deixou-se a mistura arrefecer até à temperatura ambiente e mediu-se a absorção das soluções a 345 nm contra um branco preparado da mesma forma.

Uma curva padrão para a gelatina não reticulada foi construída conforme o procedimento anterior e utilizando soluções padrão de gelatina com concentrações entre 0,5 e 3,2mg/ml.

A percentagem de reticulação foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Grau de Reticulação} = \frac{1 - A(\text{amostra})}{A(\text{padrão})} * 100$$

onde A (amostra) corresponde à absorvância das amostras e A (padrão) à absorvância da gelatina não reticulada, calculada a partir da curva padrão[41].

### **Capacidade de absorção de água (Swelling)**

A capacidade de absorção de água dos filmes com vários graus de reticulação foi avaliada em PBS a 37°C. As amostras (com 1 cm de lado e com aproximadamente 25 mg) foram pesadas secas e em seguida mergulhadas em PBS e incubadas numa estufa a 37°C até atingirem o equilíbrio. Os filmes eram então removidos do meio, o excesso de água à superfície limpo com papel de filtro humedecido, sendo de seguida pesados.

A capacidade de absorção de solução tampão foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{Swelling Index} = \frac{M_{eq} - M_i}{M_i}$$

onde  $M_i$  é a massa dos filmes secos e  $M_{eq}$  a massa dos filmes em equilíbrio na solução de PBS.

### **Ensaio de degradação/perda de massa**

#### **- Em tampão fosfato salino (PBS) com a adição de azida de sódio (pH = 7,4, 37°C)**

Uma série de filmes, previamente pesados, foram colocados em poços de cultura e cobertos com PBS (C=0,01 M, I= 0,16M, pH= 7,4). À solução tampão adicionou-se previamente azida de sódio na concentração de 0,025% (m/v), de forma a evitar a proliferação de microrganismos.

As placas de poços de cultura com os filmes foram colocadas numa estufa a 37°C. Regularmente, os meios foram renovados com soluções tampão frescas. Em tempos pré-determinados, alguns filmes foram retirados, lavados cuidadosamente com água desionizada,

secos numa estufa de vácuo à temperatura ambiente durante dois dias e, posteriormente, pesados. A percentagem de massa remanescente dos filmes foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Massa remanescente: (\%)} = \frac{W_t}{W_0} \times 100$$

onde  $W_0$  é a massa do filme original e  $W_t$ , a massa do filme depois de ter estado mergulhada na solução tampão durante o tempo  $t$ .

#### **- Em tampão TES com cálcio e colagenases (pH= 7,4, 37°C)**

Preparou-se uma solução tampão TES (0,05 M, pH 7.4) com adição de 5mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (na forma de cloreto de cálcio). Uma série de amostras de filmes secos, com diferentes graus de reticulação, foram pesados e colocados em placas de poços de cultura. Com o tampão pronto anteriormente preparou-se uma solução de colagenase na concentração de 0,1 mg/ml (24,5 U/ml) e adicionou-se 1 ml desta solução a cada amostra de gelatina reticulada. As amostras foram então deixadas a incubar numa estufa a 37°C.

Durante todo o ensaio, e de 24 em 24 horas, o meio de degradação era substituído por uma solução de enzima fresca. Em tempos pré-determinados alguns filmes eram retirados, lavados cuidadosamente com água desionizada, secos numa estufa de vácuo à temperatura ambiente durante dois dias e, posteriormente, pesados. A percentagem de massa remanescente dos filmes foi calculada da forma acima referida.



## Resultados e Discussão:

### Determinação do grau de reticulação por reacção com o reagente TNBS:

Realizaram-se ensaios com o objectivo de averiguar o grau de reticulação de cada amostra. Para isso, calculou-se a diferença entre o número de grupos  $\epsilon$ -amina livres antes e depois da reticulação, tal como descrito no procedimento experimental.

Analisando o gráfico da figura 2.4 observa-se, tal como previsto, o aumento do grau de reticulação das amostras com o aumento do rácio mol EDC / mol COOH. Apenas no caso da amostra R4 se observa uma alteração ao padrão, estando no entanto esta variação contida no desvio-padrão.

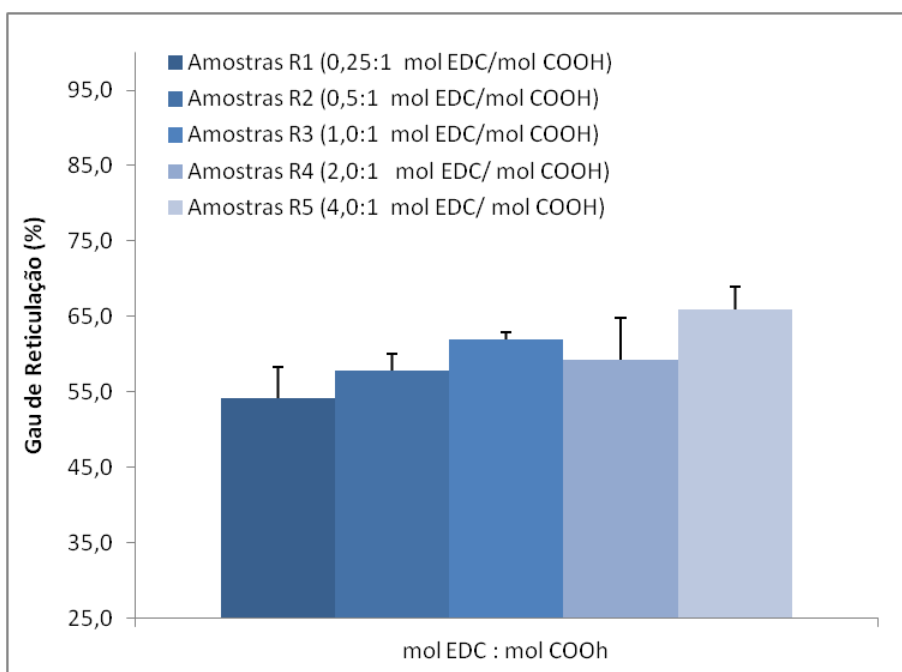


Figura 2.4 – Variação do grau de reticulação (em percentagem) em função do rácio mol EDC / mol COOH.

### Capacidade de absorção de água (Swelling):

Na Figura 2.5 apresentam-se os rácios de absorção de água de cada amostra, notando-se uma clara diminuição da capacidade da amostra absorver água com o aumento do grau de reticulação, tal como esperado.

Isto acontece porque a reticulação de cadeias poliméricas cria uma rede tridimensional que impede o polímero de absorver água indefinidamente, devido às forças elásticas criadas

pela rede, juntamente com uma diminuição da entropia do sistema proveniente do aumento de rigidez.

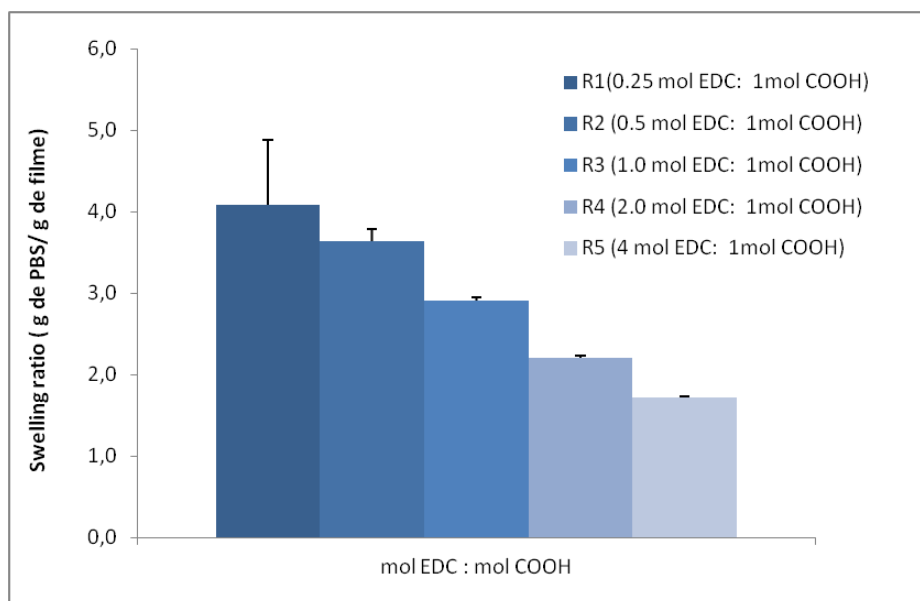


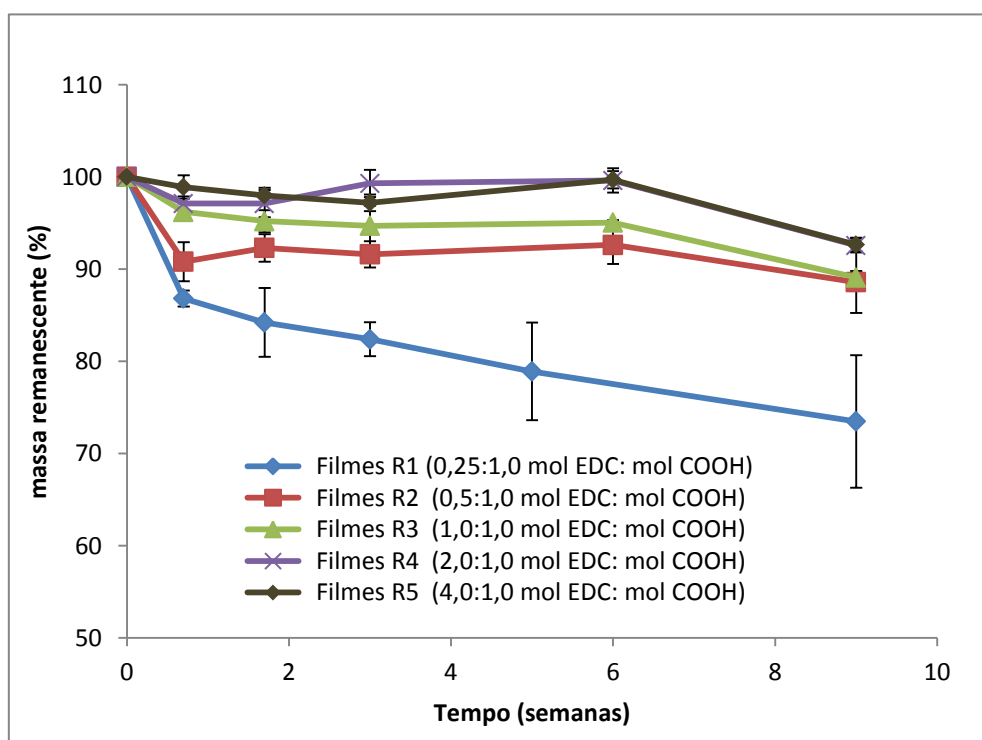
Figura 2.5 – Variação da capacidade de absorção de água em função do grau de reticulação.

#### Ensaio de degradação/perda de massa:

Foram realizados ensaios de degradação dos filmes de gelatina reticulada em duas condições distintas. Primeiramente analisou-se o comportamento dos filmes numa solução-tampão PBS, sendo adicionada azida de sódio, de modo a prevenir a proliferação de microorganismos. Como tentativa de recriar o meio in vivo, onde se encontram várias enzimas com a capacidade de degradar o colagénio e a gelatina, foi depois conduzida outra experiência, com o mesmo objectivo, substituindo a solução-tampão PBS por um tampão TES, com adição de collagenases. Ambos os ensaios foram realizados a um pH de 7,4 e a uma temperatura de 37°C.

**- Em tampão fosfato salino (PBS) com a adição de azida de sódio (pH = 7.4, 37°C):**

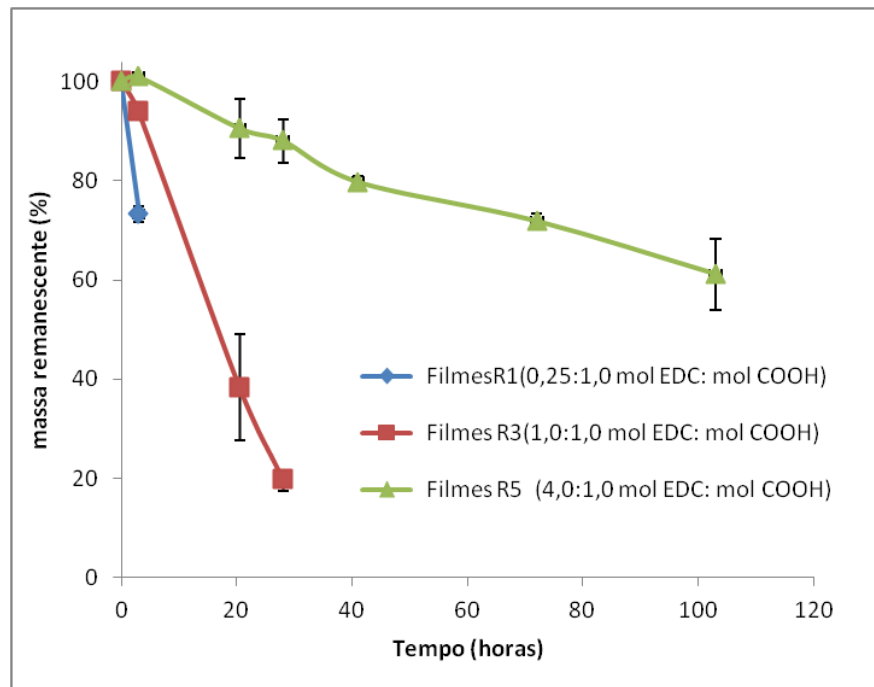
Na figura 2.6 são apresentados os resultados da perda de massa em PBS, sem adição de cálcio e colagenases. Neste meio, todos os filmes mantiveram a sua integridade, perdendo relativamente pouca massa, ao longo das 9 semanas em que decorreu o ensaio. De facto, todos os filmes perderam menos de 10% da sua massa, exceptuando o filme menos reticulado (R1), no qual se verificou uma perda gradual de massa ao longo do tempo, tendo, no final do ensaio, perdido cerca de 25% da massa inicial. A maior perda de massa verificou-se na primeira semana, sendo provavelmente uma consequência da dissolução das cadeias de polímero não reticuladas. Estes resultados indicam que a reticulação das cadeias de gelatina é bastante efectiva. Como neste meio não existem enzimas que degradem o polímero, a degradação química do polímero pode ser atribuída exclusivamente à hidrólise das ligações amida que ligam os resíduos de aminoácido componentes da gelatina, sendo por isso uma degradação bastante lenta.



**Figura 2.6 – Ensaio de degradação dos filmes de gelatina em PBS, representando a variação da massa dos filmes de gelatina em função do tempo.**

**- Em tampão TES com cálcio e collagenases (pH= 7,4, 37°C):**

Na figura 2.7 são apresentados os resultados de perda de massa ao longo do tempo dos filmes de gelatina reticulada quando mergulhados num meio com a presença de cálcio e collagenases. Neste ensaio observa-se uma diminuição da massa dos filmes analisados, sendo que o aumento do grau de reticulação está relacionado com o aumento da resistência à degradação dos filmes. Os filmes com menor grau de reticulação desintegraram-se e perderam a maior parte da massa durante o primeiro dia. No filme com maior grau de reticulação (4 mol EDC: 1 mol COOH) verifica-se que, decorridas 100 horas, a percentagem de massa remanescente de filme é de cerca de 60%.



**Figura 2.7 - Ensaio de degradação dos filmes de gelatina em tampão TES com cálcio e collagenases, representando a variação da massa dos filmes de gelatina em função do tempo.**

Quando comparados os dois ensaios de degradação de massa, em PBS e em tampão TES com presença de collagenases, destaca-se o efeito destas proteases na degradação dos filmes de gelatina, sendo constatável a maior rapidez de degradação em qualquer uma das amostras aquando da presença das collagenases.

Isto acontece porque as collagenases actuam sobre a matriz polimérica que constitui o filme, degradando-o mais rapidamente do que se verifica na sua ausência.

É de destacar que se pretende um filme biodegradável, capaz de ser dissolvido pelo organismo, mas com a capacidade de manter a sua integridade durante pelo menos 6 semanas. Para este efeito, os resultados *in vitro* indicam que os filmes com o maior grau de reticulação são os mais adequados. Contudo, é importante referir que a concentração de colagenase utilizada nos ensaios é provavelmente várias vezes superior à concentração das várias colagenases presentes no organismo. Assim, *in vivo*, os filmes produzidos provavelmente degradar-se-ão mais lentamente.

## **Capítulo 3**

# **Encapsulamento do antibiótico Ceftriaxona em Micropartículas Poliméricas**

Este capítulo começa com uma breve introdução sobre micropartículas, as suas características e os materiais e métodos normalmente utilizados para as produzir, destacando os adoptados neste trabalho. De seguida, descrevem-se os procedimentos experimentais adoptados para encapsular o antibiótico Ceftriaxona Sódica em micropartículas poliméricas. Termina-se com a apresentação e discussão dos resultados obtidos.

## Micropartículas

A microencapsulação de substâncias bioactivas em materiais poliméricos é um campo em desenvolvimento na área da tecnologia farmacêutica devido aos resultados promissores que se têm obtido em sistemas de libertação local e controlada, através da utilização de micropartículas que actuam com elevada especificidade mantendo, no entanto, baixos níveis de toxicidade [46-48].

Não existindo uma definição única, as micropartículas podem ser definidas como partículas esféricas de pequenas dimensões (entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$ ) e subdividem-se em duas categorias: microcápsulas e microesferas (Figura 3.1). As microcápsulas são micropartículas constituídas por um núcleo (em estado sólido, líquido ou gasoso) diferenciado do material que o reveste, enquanto nas microesferas o agente encapsulado se encontra uniformemente disperso na matriz polimérica [47, 48].

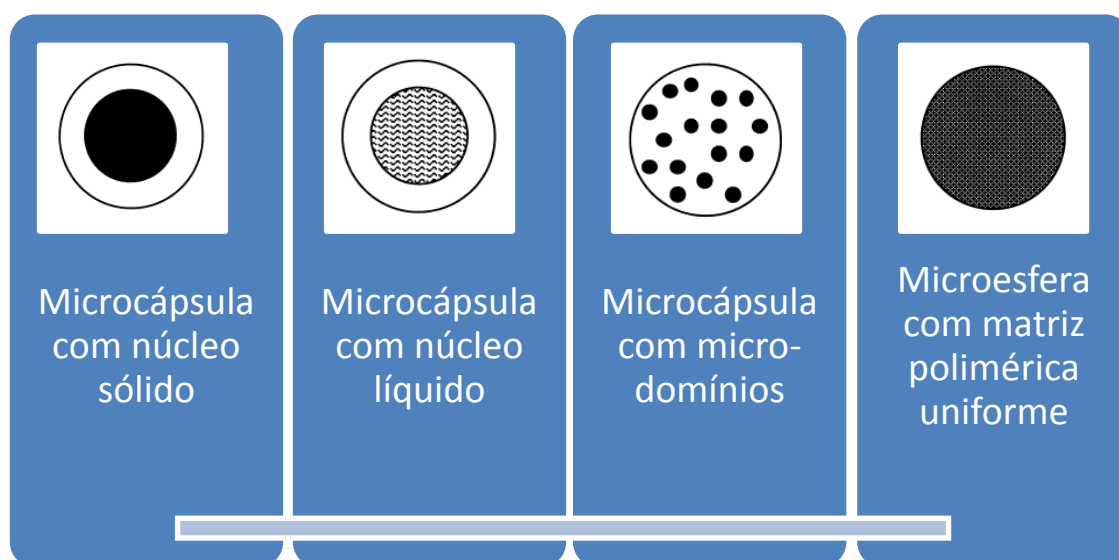


Figura 3.1 – Representação dos vários tipos de micropartículas existentes.

São várias as metodologias utilizadas para a preparação de micropartículas, destacando-se a emulsão simples e o método de dupla emulsão. O método de emulsão simples óleo/água com evaporação de solvente é vastamente empregue, permitindo encapsular fármacos insolúveis em água. Para a realização deste processo são necessários 4 passos gerais, esquematizados na figura 3.2 [46, 47].

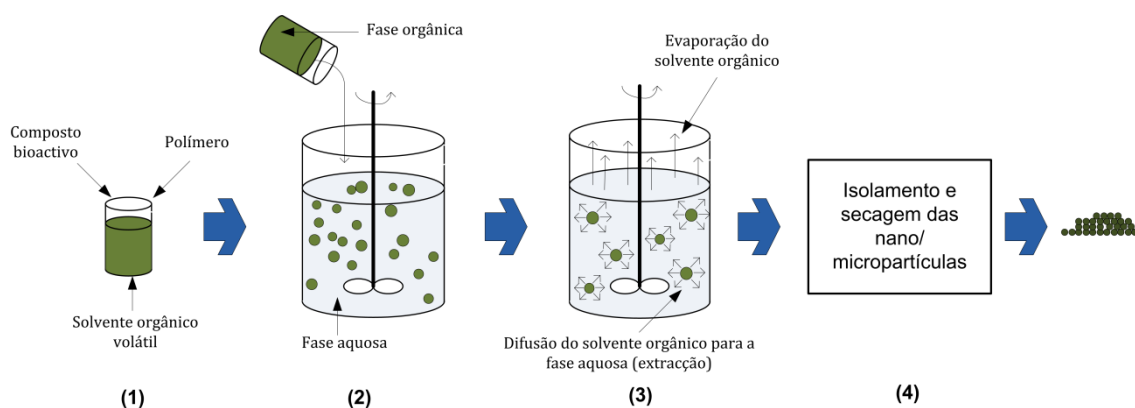


Figura 3.2 – Esquema representativo do método extração/evaporação do solvente numa emulsão óleo/água.

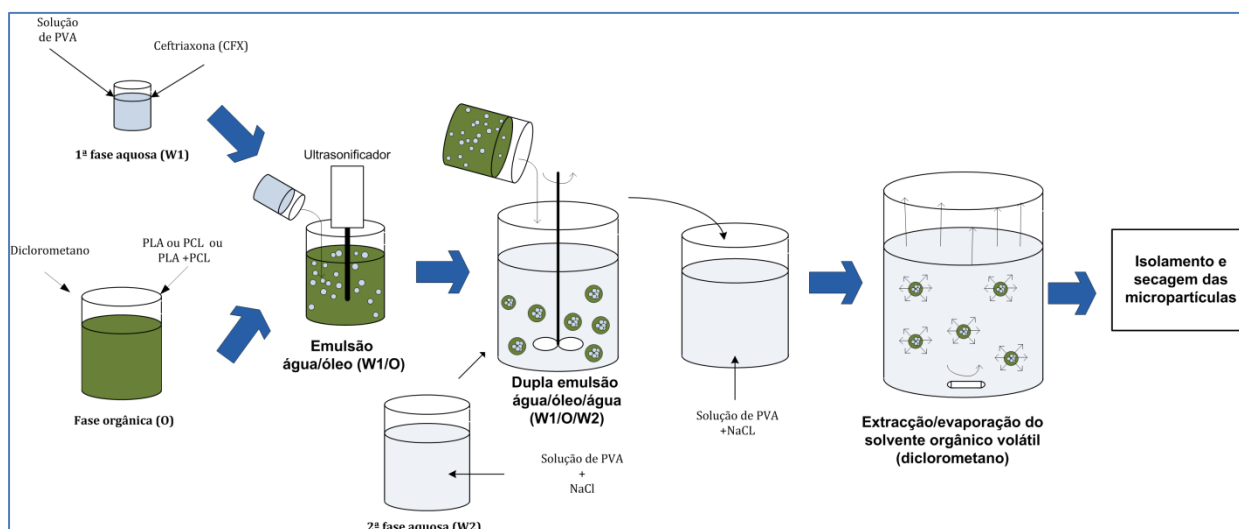
Primeiro dissolve-se o composto bioativo e o polímero num solvente orgânico volátil. De seguida emulsifica-se a fase orgânica (fase dispersa) numa fase aquosa contendo um agente estabilizante (fase contínua). O próximo passo é a extração e evaporação do solvente orgânico, dando-se a precipitação do polímero e do fármaco na forma de micropartículas. As micropartículas são então isoladas, filtradas e secas, obtendo-se o produto final [18, 49].

Este método não é adequado, no entanto, para encapsular fármacos que apresentem alta solubilidade em água uma vez que, pela sua natureza hidrofílica, estes são pouco solúveis em solventes orgânicos e tendem a migrar da fase orgânica para a fase aquosa durante o processo de formação/solidificação das micropartículas, facto este que conduz a baixas eficiências de encapsulação e à distribuição do fármaco maioritariamente à superfície das micropartículas, provocando assim a libertação de grande quantidade de fármaco numa fase inicial. Com o objectivo de minorar estes problemas têm sido propostas várias modificações ao método da emulsão óleo/água com evaporação de solvente para a microencapsulação de fármacos marcadamente hidrofílicos. O método de emulsão óleo/óleo é um desses métodos, sendo a fase aquosa substituída por um meio hidrofóbico. No entanto, a grande maioria dos métodos propostos envolve a formação de duplas emulsões [47].

No decurso deste trabalho foram utilizados três métodos de encapsulação [1, 18, 47-49]:



**1 - Dupla emulsão água/óleo/água** – A solução aquosa onde está dissolvido o fármaco é emulsificada numa fase orgânica que contém o polímero, originando a primeira emulsão. Esta é, posteriormente, dispersa numa segunda fase aquosa, formando a segunda emulsão. Após a extracção/evaporação do solvente volátil recolhem-se as micropartículas. Na figura 3.3 esquematiza-se o processo utilizado para a formação de micropartículas pelo método de extracção/evaporação do solvente numa dupla emulsão água/óleo/água.



**Figura 3.3 – Esquema representativo do método de extracção/evaporação do solvente numa dupla emulsão água/óleo/água.**

**2 - Dupla emulsão água/óleo/óleo** – À semelhança do método anterior, o fármaco hidrofílico é primeiramente dissolvido numa fase aquosa, sendo esta emulsificada numa fase orgânica volátil onde está dissolvido o polímero, de forma a originar uma primeira emulsão água/óleo. De seguida, esta emulsão é dispersada num solvente orgânico não volátil (como o óleo mineral) formando desta forma uma dupla emulsão água/óleo/óleo.

**3 - Dupla emulsão sólido/óleo/óleo** – Neste caso, o fármaco hidrofílico, no estado sólido, é disperso numa fase orgânica volátil onde se encontra dissolvido o polímero. Esta suspensão é então dispersa numa fase orgânica não volátil, originando uma emulsão sólido/óleo/óleo.

Os polímeros mais utilizados na imobilização de compostos bioactivos em micropartículas, tendo também sido utilizados no decurso deste trabalho, são os poliésteres alifáticos PLA, PLGA e PCL.

## Poli Ácido-Láctico

O Poli (Ácido Láctico), PLA, é um polímero biodegradável e bioabsorvível, produzido a partir de fontes renováveis como açúcares e amido, sendo por esse motivo tido como uma possível solução para o problema dos desperdícios sólidos, além de possuir óptimas capacidades mecânicas e térmicas. Ainda que o seu custo de produção seja superior ao da generalidade dos polímeros comercializados, o PLA é vastamente utilizado, oferecendo uma vasta gama de aplicações, não apenas enquanto plástico biodegradável mas também no campo da Medicina. É insolúvel em água, sendo no entanto solúvel em solventes orgânicos como é o caso do diclorometano [50-53].

O PLA é um poliéster termoplástico alifático linear, podendo ser obtido por duas vias distintas sendo elas a condensação directa e a polimerização por abertura do anel láctico - molécula bifuncional com uma função álcool e outra ácido carboxílico - com a formação de um dímero cíclico que actua como intermediário. Este toma o nome de lactídeo, sendo um éster cíclico do ácido láctico[50-53]. Uma representação do ácido láctico e do lactídeo, bem como um esquema das vias de obtenção de PLA são apresentados na figura 3.4.

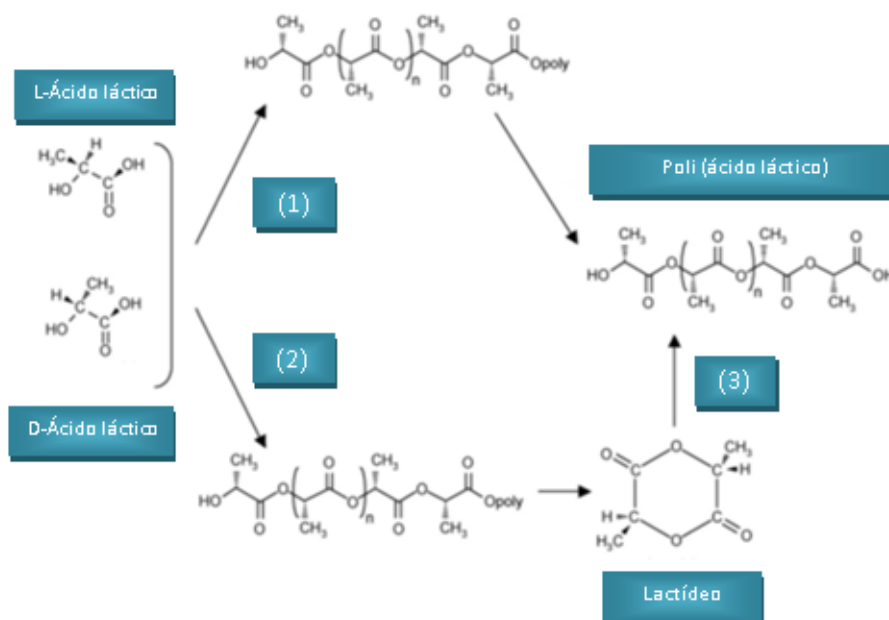


Figura 3.4 – Representação esquemática das vias de obtenção de PLA. Adaptado de [50].

## Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

O Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA (Figura 3.5), é um co-polímero de poli-ácido-láctico e poli-ácido-glicólico biodegradável e biocompatível, muito utilizado no encapsulamento de fármacos em micropartículas, uma vez que as suas características de degradação são consentâneas com a utilização em sistemas de libertação controlada, tendo também aplicações em engenharia de tecidos, já que apresenta boas propriedades mecânicas e ainda no campo da medicina onde são utilizados em suturas [54-58].

É solúvel numa vasta gama de solventes orgânicos, como sendo solventes clorados, tetrahidrofurano e acetona, degradando-se em água por hidrólise das ligações éster [54, 55]. A sua estrutura química é representada de seguida.

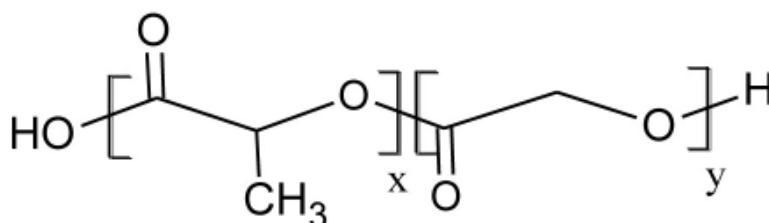


Figura 3.5 – Representação da estrutura química do PLGA [56].

## Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona)

A Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona), PCL (Figura 3.6), é um polímero sintético biodegradável, ainda que de forma mais lenta quando comparado com outros polímeros, não tóxico e biocompatível, tornando-se assim apelativo para aplicações no campo dos sistemas de libertação controlada. Pertence ao grupo dos poliésteres alifáticos, apresentando uma configuração semi-cristalina, com baixa temperatura de fusão (entre 59 e 64°C) e de transição vítrea (-60°C). É um polímero hidrofóbico maioritariamente sintetizado por polimerização por abertura de anel, a partir de monómeros de  $\epsilon$ -Caprolactona [59-64].

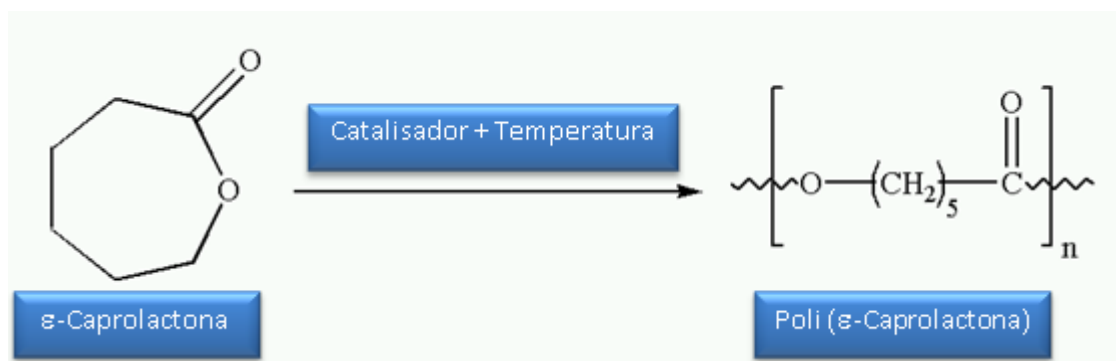


Figura 3.6 – Representação esquemática de um dos processos de obtenção da Poli (ε-Caprolactona)

[Adaptado de [65]].

Como antibiótico a encapsular nas micropartículas escolheu-se a Ceftriaxona Sódica, por ser um antibiótico recorrentemente utilizado no tratamento e prevenção de infecções ósseas na sequência de uma cirurgia ortopédica.

### Ceftriaxona Sódica

A Ceftriaxona Sódica (CFX) é uma cefalosporina semi-sintética de terceira geração, sendo um antibiótico beta-lactâmico de largo espectro que apresenta óptima actividade microbacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Em comparação com cefalosporinas de primeira e segunda geração, a Ceftriaxona Sódica exibe um espectro de actuação mais alargado para bactérias gram-negativas, sendo no entanto menos activa quando comparada com cefalosporinas de quarta geração. Em relação às bactérias gram-positivas, a Ceftriaxona Sódica é menos activa do que as cefalosporinas de primeira geração [65-69].

A Ceftriaxona apresenta um peso molecular de 554,53 g/mol, é muito solúvel em água, degradando-se rapidamente em solução, sendo por esse motivo disponibilizada em pó, juntamente com uma solução diluente e preparada imediatamente antes da aplicação [70].

Quando analisada por espectrofotometria, a Ceftriaxona regista máximos de absorção em água de 242, 272 e 330nm e em metanol de 227nm, para uma concentração de 50 mg/ml [70].

O método de actuação da Ceftriaxona assemelha-se aquele da penicilina. A Ceftriaxona Sódica contém um anel β-lactâmico que, em conjugação com um anel dihidro-metatzina, inibe a reticulação dos peptidoglicanos, estruturas que conferem rigidez às paredes celulares das bactérias [70].

A fórmula química da Ceftriaxona é  $C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$  e a sua estrutura química é aquela apresentada na figura 3.7.

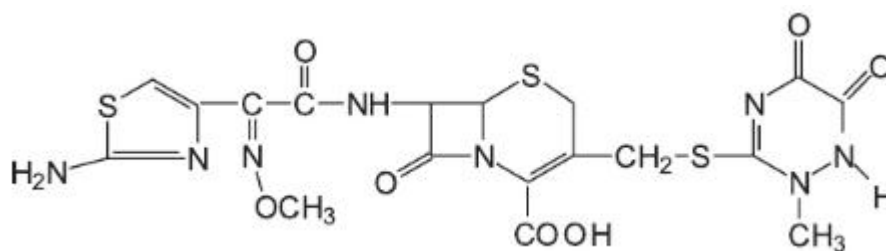


Figura 3.7 – Estrutura Química da Ceftriaxona [70].

De entre as suas propriedades farmacocinéticas destacam-se o elevado tempo de meia-vida de eliminação (entre 6 a 9 horas em adultos), tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco seja reduzida à metade, a sua elevada estabilidade metabólica, a baixa toxicidade e a sua alta actividade intrínseca, ou seja, a capacidade de produzir efeitos farmacológicos aquando da união com o seu receptor [71].

Além das aplicações na área da cirurgia ortopédica, a Ceftriaxona está indicada no tratamento da otite média aguda, gonorreia, meningite e infecções do tracto urinário e tracto respiratório inferior. Regista-se como principal desvantagem a possibilidade de provocar calculose biliar e renal, especialmente quando combinada com produtos que contenham cálcio na sua composição [66].

## Procedimento experimental

### Preparação de micropartículas pelo método de dupla emulsão água/óleo/água (W/O/W)

Neste primeiro método, esquematizado na figura 3.3, apresentada anteriormente, foram utilizados os polímeros PCL (MW  $\approx$  50 kDa) e um PLA comercial (MW  $\approx$  120 kDa).

#### Preparação da fase orgânica e fases aquosas:

A fase orgânica (O) foi preparada dissolvendo o polímero (PLA, PCL, ou uma mistura dos dois polímeros, nas proporções mássicas de 75%PLA/25%PCL, 50%PLA/50%PCL e 25%PLA/75%PCL) em 25 ml de diclorometano na concentração de 7,5% (m/v).

De seguida preparou-se a primeira fase aquosa (W1), dissolvendo 185,7 mg de CFX (correspondente a 10% da massa do polímero) em 1,5 ml de uma solução de 0,5% (m/v) PVA.

Por último, preparou-se a segunda fase aquosa (W2), composta por 600 ml de uma solução aquosa de PVA (0,5% m/v) e NaCl (0,2 M).

#### **Preparação da dupla emulsão e extracção/evaporação do solvente orgânico volátil:**

A primeira emulsão W1/O foi formada através da adição da fase aquosa W1 à fase orgânica O. A emulsificação foi feita utilizando um ultrasonificador a funcionar a 50% da amplitude (potência de 15-17 W) durante 1 minuto.

De seguida, a emulsão W1/O foi adicionada gota a gota a 200 ml da fase aquosa W2, sobre agitação mecânica (4000 rpm) e deixada a agitar durante 5 minutos, de modo a formar a dupla emulsão W1/O/W2.

Por último, adicionou-se esta dupla emulsão à restante fase aquosa W2 (400 ml), de forma a extrair mais rapidamente o diclorometano, deixando-se sobre agitação magnética (600 rpm) durante quatro horas, à temperatura ambiente, de forma a evaporar o diclorometano.

#### **Isolamento e lavagem das micropartículas:**

Decorridas as quatro horas, as micropartículas formadas foram isoladas por centrifugação (2500 rpm durante 3 minutos) e lavadas por três vezes com água destilada. As partículas foram então secas numa estufa de vácuo à temperatura ambiente durante dois dias.

Desta forma foram produzidos 5 lotes de micropartículas nos quais se variou o polímero (100%PLA, 75%PLA/25%PCL, 50%PLA/50%PCL e 25%PLA/75%PCL, 50% PCL), mantendo-se constantes as restantes variáveis do processo.

#### **Preparação de micropartículas pelo método de dupla emulsão água/óleo/óleo (W/O/O)**

Nas micropartículas produzidas pelo método de dupla emulsão w/o/o utilizaram-se PLC (MW  $\approx$  50 kDa), PLA comercial (MW  $\approx$  120 kDa) e um PLA sintetizado no DEQ pela Engenheira Dina Marques, designado neste trabalho por PLA\_Lab (MW $\approx$  60 kDa).

### **Preparação da fase aquosa e fases orgânicas**

Para a preparação da fase aquosa (W) dissolveram-se 50 mg de CFX em 0,5 ml de água destilada. Preparou-se de seguida a primeira fase orgânica (O1), dissolvendo-se o polímero (500 mg) numa mistura de DCM e ACN (5 ml), nas proporções de 2:3, 1:1 ou 3:2.

Por fim preparou-se a segunda fase orgânica (O2), adicionando-se 1,5 g de SPAN80 a 50 ml de óleo mineral, de forma a obter uma concentração de surfactante de 3%.

### **Preparação da dupla emulsão**

A primeira emulsão W/O1 foi preparada no ultrasonificador a trabalhar a 50% da amplitude (potência de 15-17 W) durante 30 segundos.

De seguida, a emulsão W/O1 foi adicionada gota a gota aos 50 ml da fase orgânica O2, sobre agitação mecânica (4000 rpm) e deixada a agitar durante 15 minutos, de forma a criar a dupla emulsão W/O1/O2.

A dupla emulsão foi colocada numa placa de agitação magnética (~600 rpm) durante cerca de 3 horas.

### **Isolamento e lavagem das micropartículas:**

Adicionou-se n-hexano para precipitar as micropartículas formadas. Depois de isoladas, as micropartículas foram lavadas várias vezes com n-hexano, por forma a remover os restos de óleo mineral. Depois de lavadas foram secas numa estufa de vácuo durante um dia.

Durante este procedimento mantiveram-se constantes a razão fármaco/polímero (m/m) sendo esta de 1/10, a razão entre fases (v/v), de 0,5/5/50, a concentração de Span80 (3%) e ainda as condições de formação das emulsões, quer em termos temporais quer em termos de velocidade de agitação.

Os parâmetros que foram variados são apresentados na seguinte tabela:

**Tabela 3.1 – Parâmetros variados na preparação de micropartículas pelo método de dupla emulsão água/óleo/óleo (W/O/O)**

Lote	Polímero	Concentração (w/v)	DCM:ACN (v:v)
#01	PLA_Lab	10%	1:1
#02	PLA_Lab	10%	3:2
#03	75%PLA_Lab/25%PCL	10%	1:1
#04	PLA_Lab	10%	2:3
#05	PLA_Lab	16%	1:1
#06	PLA comercial	7,5%	1:1

### **Preparação de micropartículas pelo método emulsão sólido/óleo/óleo (S/O/O)**

Neste método, os polímeros utilizados foram o PLGA (MW = 60 kDa) e o PLA\_Lab.

#### **Preparação das fases orgânicas**

Foram preparadas duas fases orgânicas neste processo. Primeiramente, dissolveu-se o polímero (16 % w/v) numa mistura de DCM e ACN (3 ml), nas proporções de 1:1. Em segundo lugar adicionou-se 1,5 g de SPAN80 a 50 ml de óleo mineral, de forma a obter uma concentração de surfactante de 3%.

#### **Preparação da emulsão**

Na preparação da emulsão, suspenderam-se 48 mg de fármaco (10% da massa de polímero) no estado sólido, na fase orgânica 1 (O1), deixando-se a agitar durante 3 dias. A suspensão S/O1 foi então emulsificada na fase orgânica O2, utilizando-se o ultraturax a 4000 rpm durante 15 minutos.



Por fim colocou-se a emulsão numa placa de agitação magnética (600 rpm) durante cerca de 3 horas.

#### **Isolamento e lavagem das micropartículas:**

Adicionou-se n-hexano para precipitar as micropartículas formadas. Depois de isoladas, foram lavadas várias vezes com n-hexano, para remover os restos de óleo mineral. Depois de lavadas, as partículas foram secas numa estufa de vácuo durante um dia.

Foram produzidos 4 lotes de micropartículas nos quais se variou o polímero (100%PLA\_Lab, 75%PLA/25%PLGA, 25%PLA\_Lab/75%PLGA, 100% PLGA), mantendo constantes todas as restantes variáveis do processo.

#### **Determinação da quantidade experimental de CFX imobilizado nas micropartículas e cálculo da eficiência de encapsulamento**

A quantidade de CFX nas micropartículas foi determinada por espectroscopia UV/VIS. A quantidade de antibiótico encapsulado nas micropartículas preparadas pelo **método w/o/w** foi determinada da seguinte forma:

Dissolveu-se uma quantidade conhecida de micropartículas (~10mg) em 1 ml de diclorometano, seguida da adição de 10 ml de PBS, de modo a extrair o fármaco. Depois de agitação vigorosa, as duas fases formadas (fase orgânica com o polímero dissolvido e fase aquosa com o antibiótico) foram separadas por centrifugação. A fase aquosa foi retirada, diluída com PBS para uma concentração apropriada, e a absorvância a 272 nm, correspondente ao pico de absorção da CFX, medida num espectrofotómetro UV/VIS (Jasco V-550). Soluções padrão de CFX em PBS, com concentrações entre 2 e 20 µg/ml foram utilizadas para construir a curva de calibração.

No caso das partículas produzidas pelos **métodos w/o/o e s/o/o** adoptou-se o seguinte protocolo:

A uma quantidade conhecida de micropartículas (~10mg) foram adicionados 10 ml de PBS. Esta suspensão foi sonicada por duas vezes durante 30 minutos e em seguida deixada em repouso durante 24 horas. As partículas foram isoladas da fase aquosa por centrifugação. A fase aquosa foi retirada, diluída com PBS para uma concentração apropriada e a absorvância a

272 nm, correspondente ao pico de absorção da CFX, medida num espectrofotómetro UV/VIS (Jasco V-550).

O processo de quantificação da CFX nas micropartículas foi realizado em triplicado para todos os lotes de micropartículas produzidas.

A quantidade experimental de fármaco encapsulado (imobilizado) nas micropartículas foi calculada da seguinte forma:

Quantidade experimental de fármaco encapsulado (%)

$$= \frac{\text{massa de fármaco quantificada}}{\text{massa micropartículas}} \times 100$$

A quantidade teórica de fármaco encapsulado corresponde à percentagem de fármaco que as micropartículas teriam se nenhum fármaco fosse perdido durante o processo da sua formação. Esta quantidade é definida da seguinte forma:

Quantidade teórica de fármaco encapsulado(%)

$$= \frac{\text{massa de fármaco adicionado}}{\text{massa de fármaco adicionado} + \text{massa de polímero adicionado}} \times 100$$

Este parâmetro foi mantido constante em todas as formulações, a um valor de aproximadamente 10 %.

A eficiência de encapsulamento (EE, %) expressa a razão entre a quantidade fármaco efectivamente imobilizado (quantidade experimental de fármaco encapsulado) e a quantidade de fármaco adicionada inicialmente:

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade experimental de fármaco encapsulado}}{\text{Quantidade teórica de fármaco encapsulado}} \times 100$$

### **Ensaio de libertação *in vitro***

Os perfis de libertação *in vitro* da CFX foram avaliados num meio de libertação composto por PBS e 0,025% (m/v) de azida de sódio.

Para as micropartículas produzidas pelo **método w/o/w** adoptou-se o método de diálise para investigar a libertação *in vitro*. Uma quantidade conhecida de micropartículas, correspondente a aproximadamente 5 mg de CFX, foi suspensa em 15 ml de meio de libertação e a suspensão colocada no interior de membranas de acetato de celulose (com um *cut-off* de cerca 4 500 Da). Os sacos de diálise foram fechados e colocados em frascos com tampa contendo 40 ml de meio de libertação exterior. Os frascos foram colocados numa estufa a 37° C. Em tempos pré-determinados, os 40 ml foram recolhidos para análise e substituídos por meio de libertação fresco. A quantidade de CFX nas amostras foi determinada através da análise da absorvância das soluções a 272 nm, num espectrofotómetro UV/VIS (Jasco V-550). Como controlo, e para avaliar o efeito da membrana de diálise na cinética de libertação, realizou-se um ensaio onde as micropartículas foram substituídas por fármaco puro.

Para as micropartículas produzidas pelos **métodos de w/o/o e s/o/o** adoptou-se o seguinte procedimento:

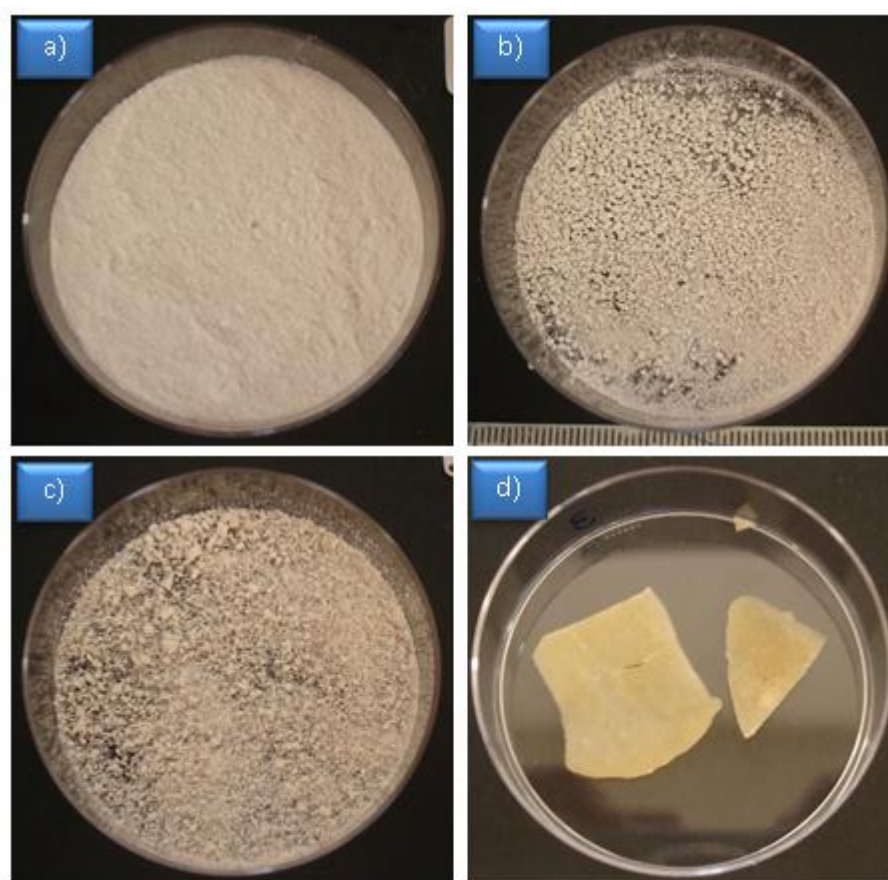
Colocou-se, num tubo de falcon, uma determinada massa de micropartículas, equivalente a 2mg de fármaco, adicionando-se 10 ml de meio de libertação. De seguida colocaram-se os tubos numa estufa a 37°C. Em tempos pré-determinados as amostras foram centrifugadas, para sedimentar as micropartículas, e o meio de libertação removido e substituído por um mesmo volume por meio de libertação fresco.

## **Resultados e Discussão**

Tal como referido anteriormente, a preparação de um Sistema de Libertação Controlada e Localizada era o objectivo último deste trabalho. No sistema idealizado, a CFX encapsulada nas micropartículas poliméricas devia ser libertada de forma gradual e a uma taxa constante durante um período de algumas semanas. Assim, e de forma a obter micropartículas que possibilitem o perfil de libertação pretendido, foram produzidas micropartículas por diferentes métodos, tendo em cada um, variado alguns parâmetros.

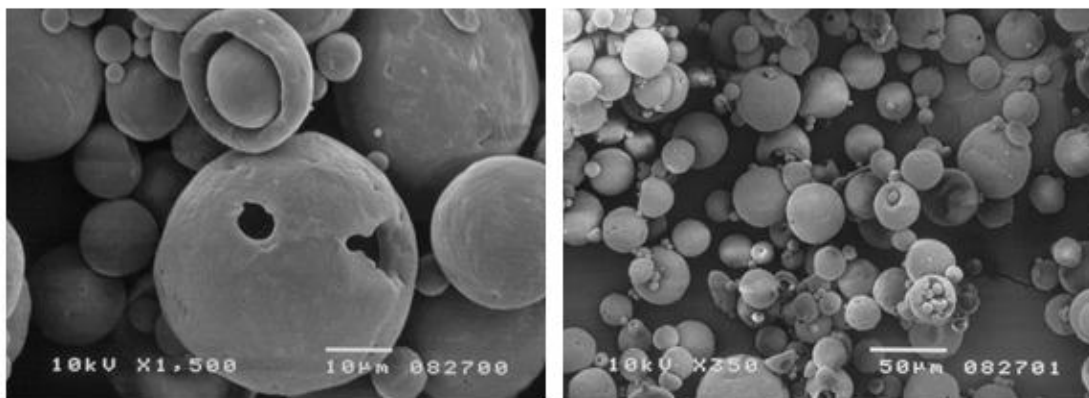
Relativamente ao tamanho e morfologia das partículas, os diferentes métodos utilizados deram origem a partículas com características marcadamente diferentes, como se pode observar na figura 3.8. Macroscopicamente, as partículas produzidas pelo método w/o/w tinham a aparência e textura de um pó fino.

Em contraste, as partículas produzidas pelo método w/o/o e s/o/o tinham a aparência de um granulado fino, com uma distribuição de tamanhos heterogénea. No caso do método s/o/o, quando se utilizou apenas PLGA e a mistura 75PLGA /25PLA\_LAb, não se obtiveram partículas mas sim um filme.



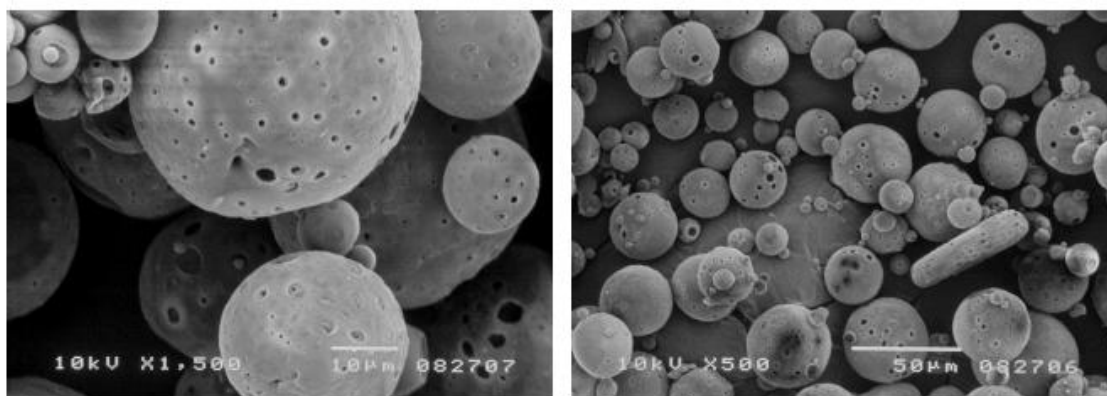
**Figura 3.8 – Aspecto macroscópico de a) micropartículas w/o/w; b) micropartículas w/o/o; c) micropartículas s/o/o (75PLA/25PLGA); d) micropartículas s/o/o 100PLGA**

Estas diferenças a nível macroscópico foram depois analisadas através da análise SEM de alguns lotes de micropartículas. Na figura 3.9 apresentam-se as imagens de SEM das micropartículas 100PCL obtidas pelo método w/o/w.



**Figura 3.9 - Imagens de SEM das micropartículas 100%PCL.**

Nas imagens observa-se que as partículas 100% PCL são ocas, com uma estrutura de microcápsulas. As micropartículas pertencentes ao lote 25PLA/75PCL parecem ter uma estrutura intermediária entre microcápsulas e microesferas (Figura 3.10). Superficialmente as micropartículas 25PLA/75PCL apresentam uma maior quantidade de poros que as partículas de 100% PCL. Em relação à forma e dimensões das micropartículas, não se registam variações consideráveis entre os dois lotes, sendo bastante semelhantes.



**Figura 3.10 - Imagens de SEM das micropartículas 25%PLA/75%PCL.**

Do método de dupla emulsão w/o/o apresentam-se as imagens do lote #4 (Figura 3.11), escolhido para a incorporação no Sistema de Libertação desenvolvido na fase final do trabalho, juntamente com os lotes 100PCL e 25PLA/75PCL do método w/o/w.

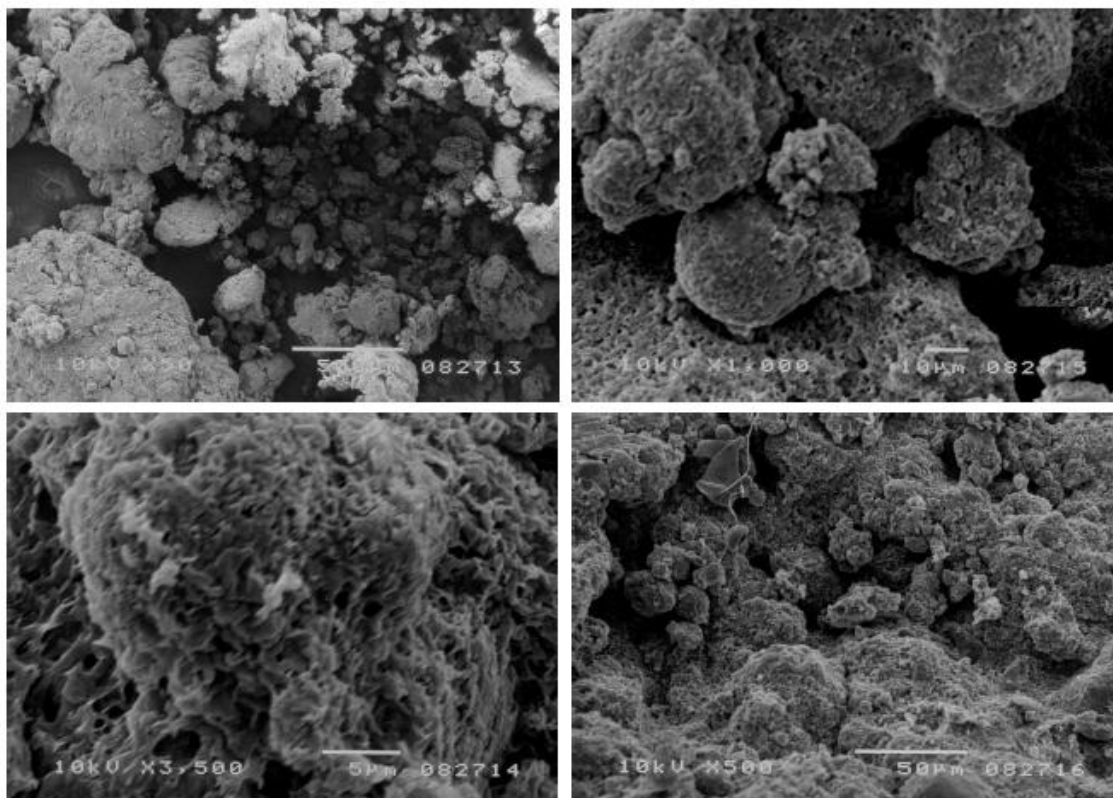


Figura 3.11 – Imagens de SEM das micropartículas #4.

Constata-se que a formação de micropartículas pretendida não foi bem sucedida, tendo-se formado uma massa polimérica desorganizada, com aglomeração de material. Nos raros casos em que se observam formas aproximadamente esféricas, é evidente que a massa formada é compacta e não oca.

Quando comparadas as imagens SEM dos métodos w/o/w e w/o/o, as diferenças são visíveis, destacando-se a diferença de forma e a superfície do material obtido. Enquanto no método w/o/w se observa uma superfície plana, ainda que com imperfeições, no caso do método w/o/o a superfície é irregular, porosa e disforme.

As partículas preparadas pelo método s/o/o não foram observadas no microscópio electrónico, mas atendendo ao seu aspecto microscópico é provável que elas tenham uma morfologia semelhante à das partículas preparadas pelo método w/o/o.

Na Tabela 3.2 apresentam-se os resultados da EE para todos os lotes de micropartículas produzidas.

**Tabela 3.2 – Eficiências de Encapsulamento dos lotes de micropartículas produzidas.**

Lote	Eficiência de Encapsulamento
<b>Método w/o/w</b>	
100 PLA	53,6 ± 1.4
75 PLA / 25 PCL	64,7 ± 4.5
50 PLA / 50 PCL	59,2 ± 0.7
25 PLA / 75 PCL	45,7 ± 1.8
100PCL	18,1 ± 0.5
<b>Método w/o/o</b>	
#1	31,7
#2	27,6 ± 3.3
#3	34,8 ± 4.5
#4	38,5 ± 7.3
#5	61,0 ± 4.0
#6	13,2 ± 5.3
<b>Método s/o/o</b>	
100 PLA	54.4 ± 0.7
75 PLA / 25 PLGA	51.3 ± 2.6

Os resultados obtidos nos ensaios para determinar a eficiência de encapsulamento das micropartículas produzidas pelo método de dupla emulsão w/o/w mostram uma maior eficiência do PLA em relação ao PCL, com uma diferença de 35,5%. Quanto às partículas constituídas pelos dois polímeros, nota-se um decréscimo da eficiência de encapsulamento à medida que a percentagem de PCL na amostra aumenta. De todas as formulações, aquela que apresentou maior eficiência de encapsulamento foi aquela constituída por 75% de PLA e 25% de PCL, apresentado o valor de 64,7%.

No caso da dupla emulsão w/o/o, verifica-se que a formulação que regista maior eficiência de encapsulamento é a #5, com uma concentração de PLA de 16%. As quatro primeiras formulações representadas apresentam uma média de eficiência de encapsulamento de 33,2%, sendo a formulação #6 a que apresenta menor eficiência (13,2%).

Quando comparados com os resultados obtidos na eficiência de encapsulamento pelo método w/o/w, observam-se discrepâncias, com vantagem em termos de eficiência para o método w/o/w. Conclui-se que o método de dupla emulsão w/o/o utilizado carece de optimização já que, ainda que em teoria seja mais eficaz no encapsulamento de fármacos hidrofílicos, isso não se verifica na prática.

Como se comprova pelas imagens obtidas pela técnica de SEM, as micropartículas resultantes do método de dupla emulsão w/o/o apresentam características incompatíveis com

um encapsulamento ideal de fármaco. Presume-se que a água saia das micropartículas por difusão, arrastando consigo o fármaco, levando ao colapso das partículas e às baixas eficiências de encapsulação obtidas neste método.

O método *s/o/o* apresentou eficiências de encapsulamento na ordem dos 50%, no caso das formulações 100PLA e 75PLA/25PLGA. Nas duas formulações em que o PLGA se encontra em concentração maioritária, relativamente ao PLA, não se obtiveram micropartículas mas sim um filme.

#### **Perfis de libertação *in vitro* da CFX (PBS, 37°C):**

Pela observação do gráfico da figura 3.12, que ilustra os perfis de libertação *in vitro* da Ceftriaxona encapsulada em micropartículas obtidas pelo método de dupla emulsão *w/o/w*, constata-se que para todos os grupos de micropartículas há uma libertação inicial acentuada, sendo que em todos os casos mais de 50% do fármaco é libertado nos primeiros momentos do ensaio.

Pela comparação da libertação controlo, a laranja na figura, com a formulação 75PLA/25PCL, presume-se que estas micropartículas, quando em contacto com um meio aquoso, libertem rapidamente o fármaco contido no seu interior, uma vez que não se observa uma distinção evidente entre a libertação controlo, onde o fármaco foi apenas dissolvido em PBS, não estando encapsulado em micropartículas, e a formulação 75PLA/25PCL. Pressupõe-se assim que tenha sido a membrana de diálise a actuar como barreira, sendo as micropartículas pouco eficazes, ao contrário do que se pretendia.

No caso das formulações 50PLA/50PCL, 100PCL e 100 PLA parece existir uma leve distinção entre estas e o controlo, podendo inferir-se que houve diminuição da velocidade de libertação de fármaco por acção das micropartículas, ainda que mínima.

Finalmente, para a formulação 25PLA/75PCL, constata-se que apenas cerca de 75% do fármaco encapsulado foi libertado, sendo possível que a eficiência de encapsulamento tenha sido mal calculada, levando assim à estagnação da libertação por volta dos 75% que, na realidade, corresponderiam a 100% do fármaco. É também possível que tenha havido perda de material aquando da montagem do sistema de libertação por método de diálise. Outra opção, menos provável, será a de o fármaco se encontrar ainda no interior das micropartículas no final do tempo de ensaio, não se atingindo portanto os 100% de libertação.



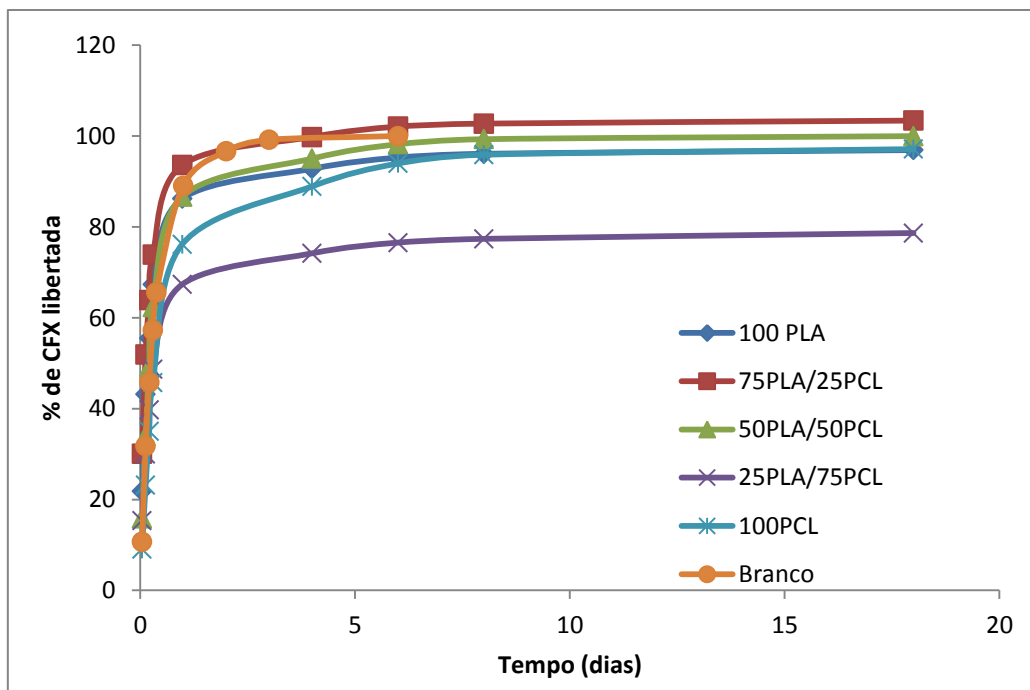
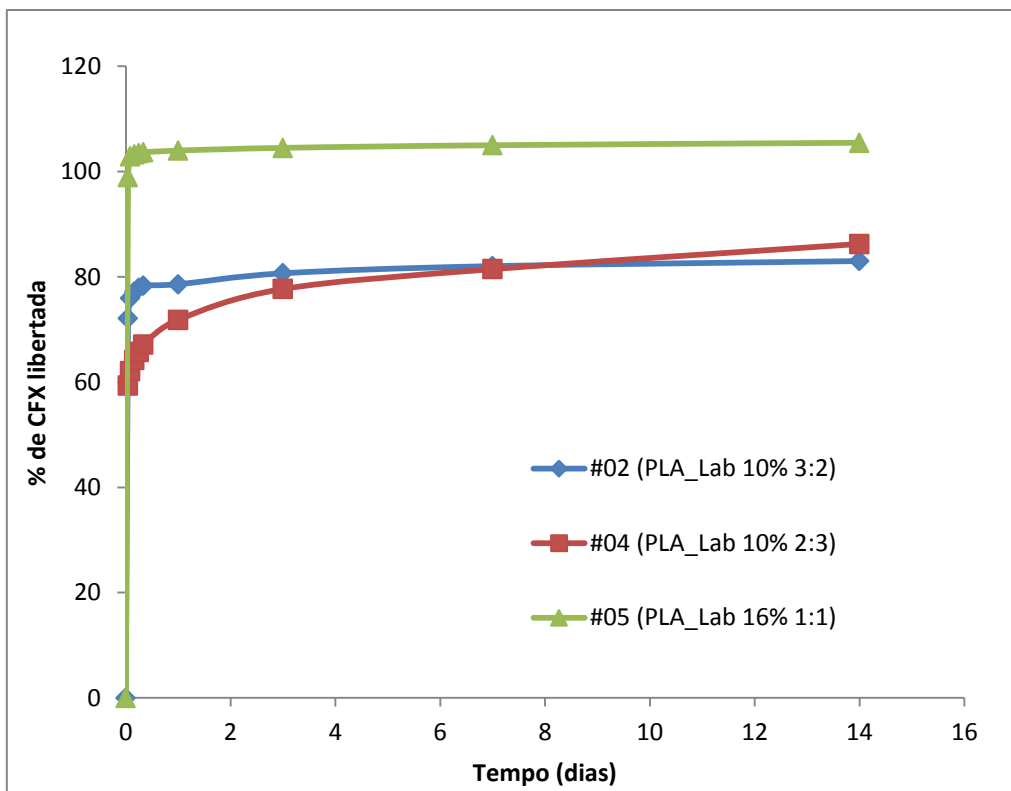


Figura 3.12 – Perfil de liberação in vitro da Ceftriaxona encapsulada nas micropartículas produzidas pelo método de dupla emulsão w/o/w.

A análise da figura 3.13, referente ao perfil de liberação obtido para o método w/o/o, permite verificar que a quase totalidade de fármaco é libertada durante as primeiras horas, atingindo logo de seguida um patamar que se prolonga até ao final do ensaio. Estes perfis de liberação, quando comparados com aqueles do método de dupla emulsão w/o/w, afastam-se ainda mais do perfil de liberação ideal, na medida em que a liberação inicial é superior, sendo ainda muito reduzido o tempo decorrido até à liberação total do fármaco contido nas micropartículas.

Mais uma vez, como explicado na discussão de resultados do método de dupla emulsão w/o/w, a discrepância entre o total de fármaco libertado no final do ensaio, que deveria ser de, aproximadamente, 100%, e o fármaco realmente libertado no caso das formulações #2 e #4 deve-se provavelmente a um mau cálculo da eficiência de encapsulamento, que terá sido estimada por excesso ou a uma perda de material durante a preparação do ensaio, depois da pesagem. É ainda possível que algum fármaco tenha ficado retido no interior das micropartículas, não sendo assim atingidos os 100% de liberação esperados.



**Figura 3.13 – Perfil de liberação in vitro da Ceftriaxona encapsulada nas micropartículas produzidas pelo método de dupla emulsão w/o/o.**

Na figura 3.14 apresentam-se os perfis de liberação referentes às duas formulações que, pelo método s/o/o, permitiram a criação de micropartículas. Como no perfil de liberação das micropartículas obtidas pelo método de dupla emulsão w/o/o, também aqui se regista uma liberação inicial elevada, sendo a totalidade do fármaco encapsulado libertado durante as primeiras horas de ensaio.

Ao contrário do sucedido nos ensaios de liberação anteriormente apresentados, nestes dois tipos de formulações verifica-se que todo o fármaco contido no interior das micropartículas foi libertado, ainda que no início do ensaio.

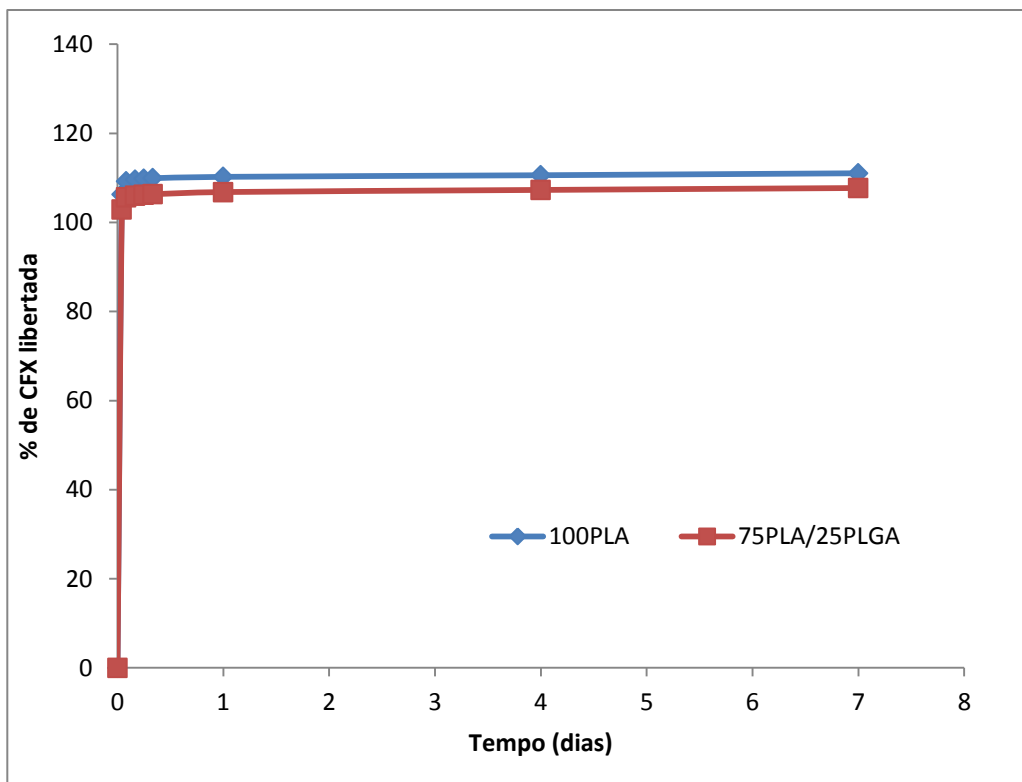


Figura 3.14 – Perfil de liberação in vitro da Ceftriaxona encapsulada nas micropartículas produzidas pelo método de dupla emulsão s/o/o.

Com o propósito de aferir qual dos grupos de micropartículas seria o mais indicado para esta aplicação, construiu-se uma tabela com os valores, em percentagem, da quantidade de fármaco libertada durante as primeiras 24 horas, apresentado na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Percentagem de Ceftriaxona libertada durante as primeiras 24 horas.

Lote	% CFX libertada no primeiro dia
<b>Método w/o/w</b>	
100 PLA	86.2
75 PLA / 25 PCL	93.6
50 PLA / 50 PCL	86.7
25 PLA / 75 PCL	67.4
100PCL	76.2
<b>Método w/o/o</b>	
#1	
#2	78.6
#3	-----
#4	71.8
#5	100
#6	-----
<b>Método s/o/o</b>	
100 PLA	100
75 PLA / 25 PLGA	100

Pela análise da tabela e, tendo em conta que se pretende que apenas cerca de 50% do fármaco incorporado nas partículas seja libertado numa primeira fase, escolheram-se os lotes de partículas que melhor serviam estas condições, sendo estes o lote 25PLA/75PCL e 100 PCL, pelo método w/o/w e o lote #4 pelo método w/o/o.

## **Capítulo 4**

### **Produção dos Sistemas de Libertação**

Neste capítulo, e de acordo com a estratégia apresentada no início deste trabalho, descreve-se a forma dos filmes de gelatina e as micropartículas foram combinados de forma a formar um revestimento com boa aderência à superfície do enxerto ósseo e com a capacidade de libertar o antibiótico de forma adequada.

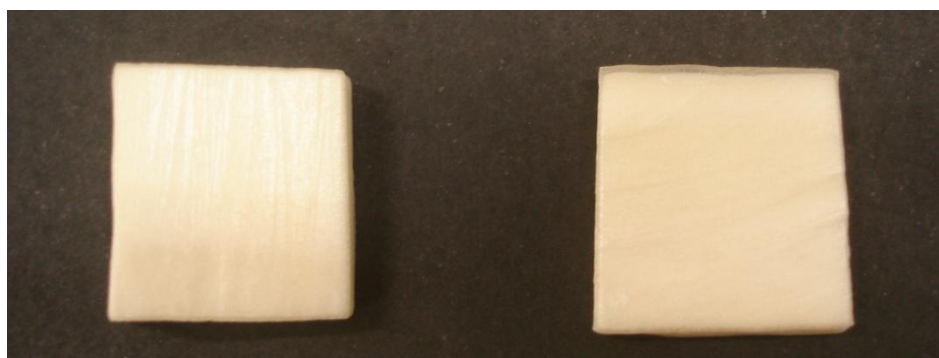
## **Procedimento experimental**

### **Obtenção de placas de osso de origem bovina**

Para a obtenção das placas de osso recorreu-se a fêmures de bovino, fornecidos por um talhante local. Com o objectivo de remover tecidos moles, medula óssea e impurezas presentes no osso, este foi submetido a fervura durante, aproximadamente, uma hora. Posteriormente, mergulhou-se o osso numa solução de 0,1M de hidróxido de sódio durante cerca de quinze dias e, de seguida, em etanol a 96% pelo mesmo período de tempo.

Após este tratamento, e utilizando uma serra manual, a diáfise foi cortada em placas de aproximadamente 2×2,5×0,5 cm (Figura 4.1).

Estas placas foram posteriormente sujeitas a um processo de desmineralização superficial, com o objectivo de remover a componente inorgânica presente na superfície do osso e expor as fibrilas de colagénio e, desta forma, aumentar a aderência entre a superfície do enxerto ósseo e a gelatina. Assim, mergulharam-se as placas de osso numa solução 1,2M de ácido clorídrico durante um curto espaço de tempo (cerca de 10 minutos), uma vez que se pretendia apenas a desmineralização da superfície. No final as placas foram lavadas em água destilada abundante e secas à temperatura ambiente.



**Figura 4.1 – Imagem de placas de osso de origem bovina utilizadas.**

### **Placas de osso revestidas por gelatina e impregnadas em solução de CFX**

Pesaram-se quatro placas de osso, registrando-se as suas massas. De seguida, procedeu-se ao revestimento destas com uma solução de gelatina de concentração 4% (m/v). As placas de osso revestidas foram então secas ao ar durante alguns dias tendo-se efectuado nova pesagem no fim desse período de modo a registar a massa de gelatina no revestimento de cada placa de osso, com o objectivo de calcular a quantidade necessária de EDC e NHS para a sua reticulação, que foi efectuada segundo o rácio nEDC : nCOOH de 4:1. As placas de osso com o revestimento de gelatina foram então mergulhadas numa solução de tampão MES com EDC e NHS durante três horas, de forma a reticular a gelatina.

Depois de lavadas abundantemente com água destilada, as amostras foram mergulhadas durante quatro horas numa solução de CFX de concentração 2 mg/ml, de modo a absorverem o fármaco, sendo de seguida secas numa estufa de vácuo por à temperatura ambiente ou alternativamente, liofilizadas.

### **Placas de osso revestidas por gelatina com adição de micropartículas**

Pesaram-se três placas de osso, registrando-se as suas massas. De seguida, procedeu-se ao revestimento destas com 10 ml de uma solução de gelatina a 4% (m/v), na qual se suspenderam uma quantidade de micropartículas correspondente a 25% da massa de gelatina em solução.

As placas de osso foram secas ao ar durante cerca de 3 dias, tendo-se efectuado nova pesagem no final desse período de modo a registar a massa de gelatina no revestimento de cada placa de osso, permitindo-se assim o cálculo da quantidade necessária de EDC E NHS necessários para a sua reticulação. De seguida procedeu-se à reticulação do filme de gelatina, da mesma forma que descrito anteriormente. Depois de lavadas, as amostras foram secas numa estufa de vácuo.

As micropartículas utilizadas neste processo foram aquelas que apresentaram melhores perfis de libertação e são apresentadas na tabela 4.1.

**Tabela 4.1 – Micropartículas utilizadas nas placas de osso revestidas.**

Nome da amostra	Micropartículas utilizadas
H4	100PCL W/O/W
H5	PLA #4 W/O/O
H6	75PCL/25PLA W/O/W

### **Placas de osso revestidas por gelatina com adição de micropartículas e impregnação em solução de CFX**

Procedeu-se da forma descrita anteriormente mas, logo a seguir à reticulação e antes de serem secas, as placas de osso revestidas com gelatina e micropartículas foram mergulhadas durante quatro horas numa solução de CFX de concentração 2mg/ml.

As micropartículas utilizadas são apresentadas na tabela 4.2.

**Tabela 4.2 – Micropartículas utilizadas nas placas de osso revestidas, com impregnação em solução de CFX.**

Nome da amostra	Micropartículas utilizadas
H1	100PCL W/O/W
H2	PLA #4 W/O/O
H3	75PCL/25PLA W/O/W

### **Ensaio de libertação *in vitro***

Posteriormente, efectuaram-se ensaios de libertação *in vitro* durante cerca de duas semanas, a 37°C. Cada placa de osso revestida foi colocada em frascos de plástico com tampa à temperatura de 37°C, contendo 10 ml de PBS com 0.025% de azida de sódio. Regularmente, o meio de libertação era removido para análise, e substituído por 10 ml de meio de libertação fresco.



## Resultados e Discussão

Os resultados e respectiva discussão referentes a este quarto capítulo estão organizados de modo a permitir uma comparação entre os vários métodos utilizados na criação do Sistema de Libertação Controlada e Localizada proposto. Assim, inicia-se esta secção com a exposição das imagens adquiridas pela técnica de SEM, seguida da apresentação e discussão dos perfis de libertação referentes a cada método.

As imagens obtidas das placas de osso revestidas por gelatina, representadas na figura 4.2, permitem observar num plano mais próximo o revestimento produzido, estando a componente óssea num plano mais afastado.

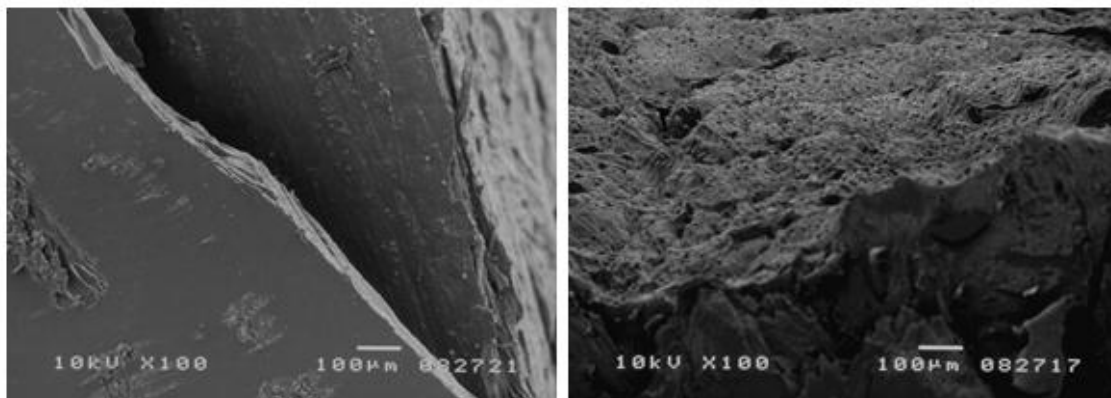


Figura 4.2 – Imagens de SEM das placas de osso revestidas por gelatina.

O filme de revestimento aparenta ser constituído por camadas de gelatina de espessura reduzida, sendo esta observação facilitada pela análise da figura 4.3, com uma ampliação superior às imagens anteriores.

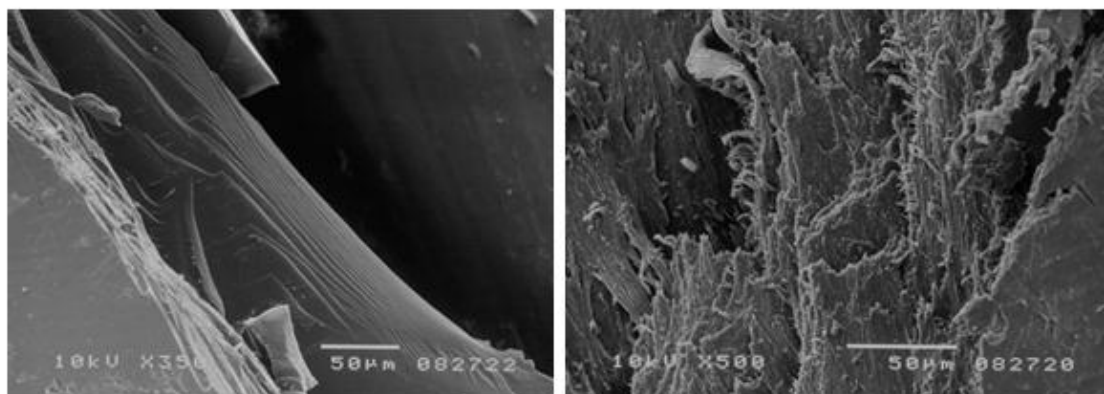


Figura 4.3 – Imagens de SEM do revestimento de gelatina.

O filme de gelatina apresenta uma óptima aderência ao osso, situação que já havia sido verificada anteriormente, no decorrer dos ensaios de libertação. Mesmo na presença de um meio aquoso, o revestimento apresentou óptimas propriedades adesivas.

Na figura 4.4 apresentam-se as imagens relativas aos revestimentos de gelatina com micropartículas incorporadas. Como se pode observar, as micropartículas encontram-se dispersas no revestimento ósseo de um modo relativamente uniforme. É de notar também que a análise de SEM foi efectuada depois das amostras terem sido sujeitas aos ensaios de libertação *in vitro*, ou seja, depois de terem estado mergulhadas em PBS durante duas semanas. No entanto, e como se pode ver, o revestimento mantém-se intacto e com poucos sinais de degradação e de perda de micropartículas. Isto corrobora os resultados obtidos no capítulo 2, onde se pode constatar que os filmes de gelatina reticulada eram bastante estáveis, quando mergulhados em PBS.

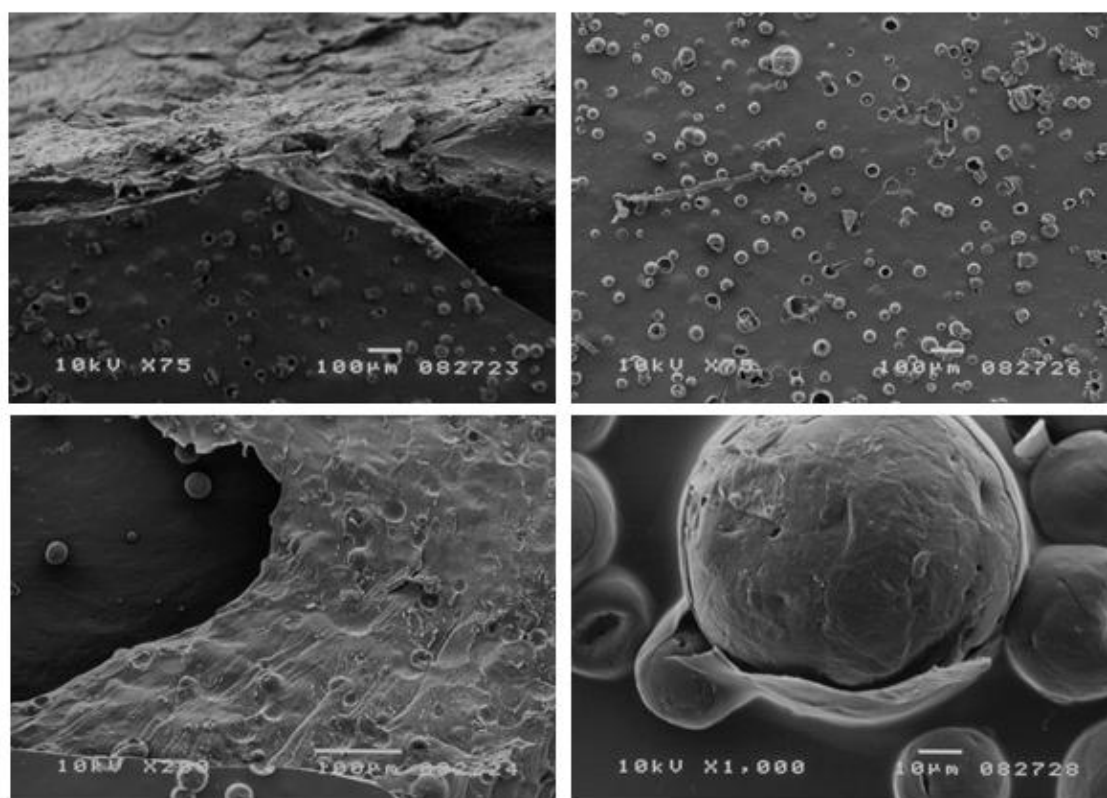


Figura 4.4 – Imagens SEM de revestimentos de gelatina com micropartículas incorporadas.

**Perfis de libertação *in vitro* da CFX (PBS, 37°C) de placas de osso revestidas por gelatina e impregnadas por solução de CFX:**

O gráfico da figura 4.5 apresenta os perfis de libertação das placas de osso revestidas por gelatina e impregnadas numa solução de CFX, obtidas de acordo com o método descrito no procedimento experimental. As amostras G1, G2 e G4 correspondem às placas secas na estufa de vácuo e a amostra G5 às placas liofilizadas.

É possível observar pela análise do gráfico que a quase totalidade do fármaco é libertada durante o primeiro dia, sendo o restante libertado de forma mais gradual até se atingir um patamar que se prolonga até ao final do ensaio.

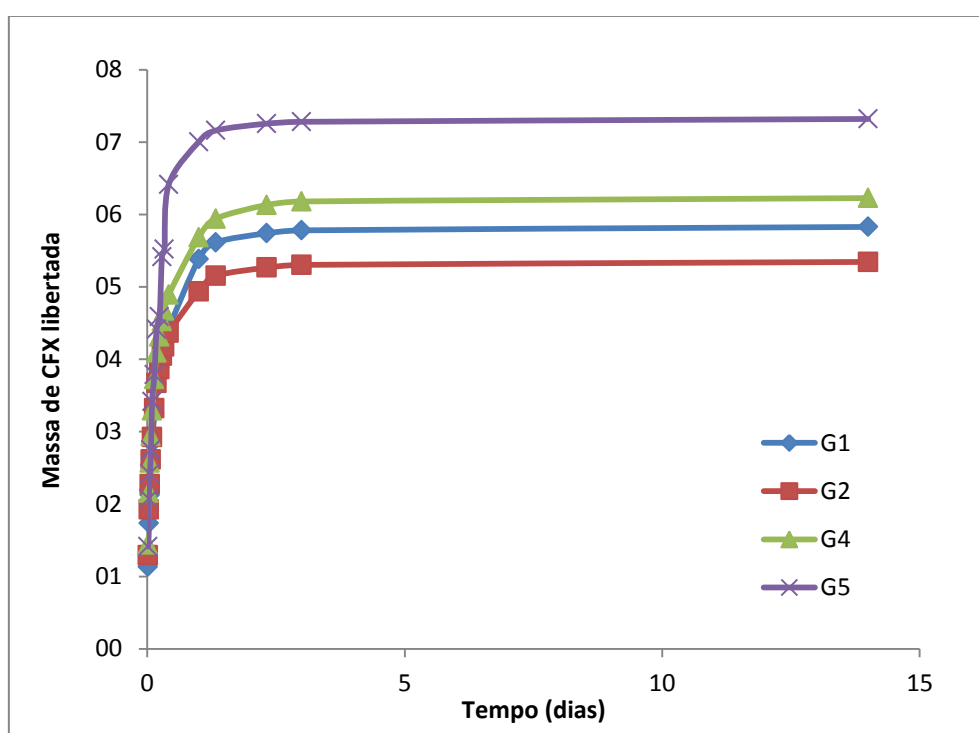


Figura 4.5 – Perfil de libertação de placas de osso revestidas por gelatina com impregnação em solução de CFX.

Ainda que esta figura permita uma visualização correcta dos perfis de libertação, as quantidades de fármaco impregnado em cada filme de revestimento não são as mesmas, já que as massas destes diferem entre amostras e um filme com maior massa irá absorver maior quantidade de fármaco. Assim, apresenta-se na figura 4.6 um gráfico de valores normalizados onde se apresenta a massa de fármaco libertado por massa de filme de gelatina. O valor médio apresentado refere-se à média dos perfis de libertação das amostras G1, G2 e G4.

Observam-se assim algumas diferenças em relação ao gráfico da figura 4.5, ainda que as curvas dos perfis de libertação apresentem o mesmo formato. É agora possível verificar a existência de discrepâncias na quantidade de fármaco absorvido por massa de filme, sendo esta superior no caso da amostra G5.

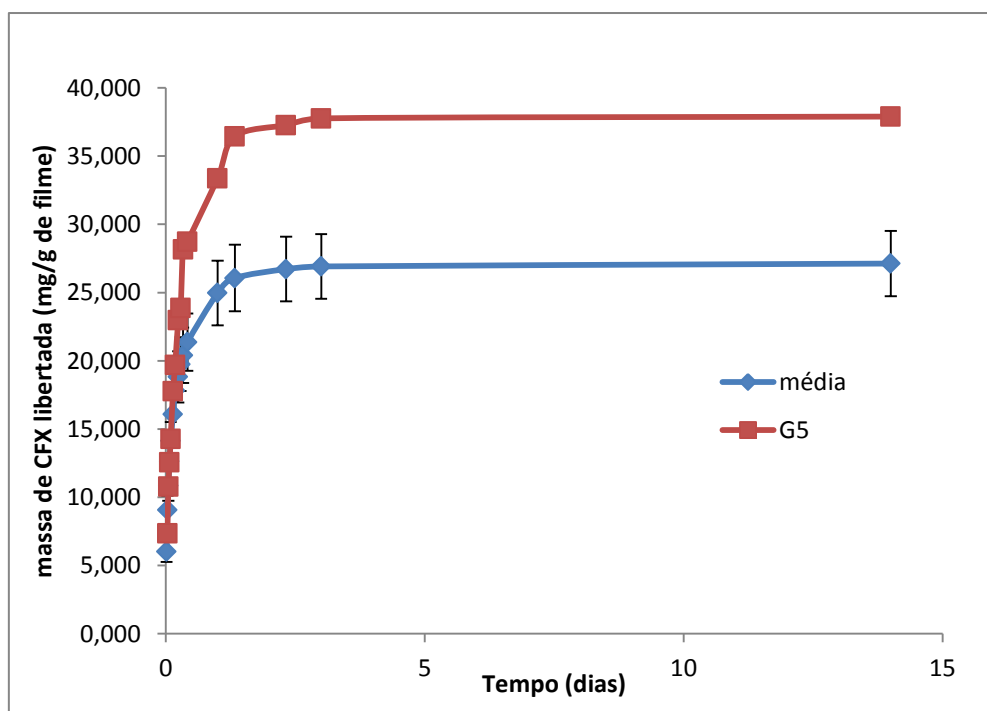


Figura 4.6 - Perfil de libertação normalizado de placas de osso revestidas por gelatina com impregnação em solução de CFX.

Este facto deve-se provavelmente ao diferente método de secagem utilizado. Enquanto nas amostras G1, G2 e G4 o método utilizado foi a secagem ao ar, no caso da amostra G5 recorreu-se à liofilização. Assim, a amostra G5 terá perdido água de uma forma mais rápida, diminuindo a existência de interações entre o fármaco e o filme, fazendo com que o fármaco fosse libertado mais rapidamente e em maior quantidade. No caso das restantes amostras formaram-se interações mais fortes entre fármaco e filme de gelatina, originando uma libertação mais lenta, impedindo mesmo a libertação de uma parte do fármaco.

**Perfis de libertação *in vitro* da CFX (PBS, 37°C) de placas de osso revestidas por gelatina com adição de micropartículas:**

O perfil de libertação obtido por este método (Figura 4.7) apresenta algumas diferenças quando comparado com o perfil apresentado na Figura 4.6, notando-se uma libertação inicial mais controlada, juntamente com uma posterior libertação mais gradual, prolongando-se até ao 11<sup>o</sup> dia.

A principal diferença entre as três formulações apresentadas na Figura 4.7 está relacionada com a quantidade de fármaco libertada, em valores absolutos, estando este factor relacionado com a eficiência de encapsulamento de cada grupo de micropartículas, sendo este valor superior para as H6, intermédio para as H5 e inferior para as H4.

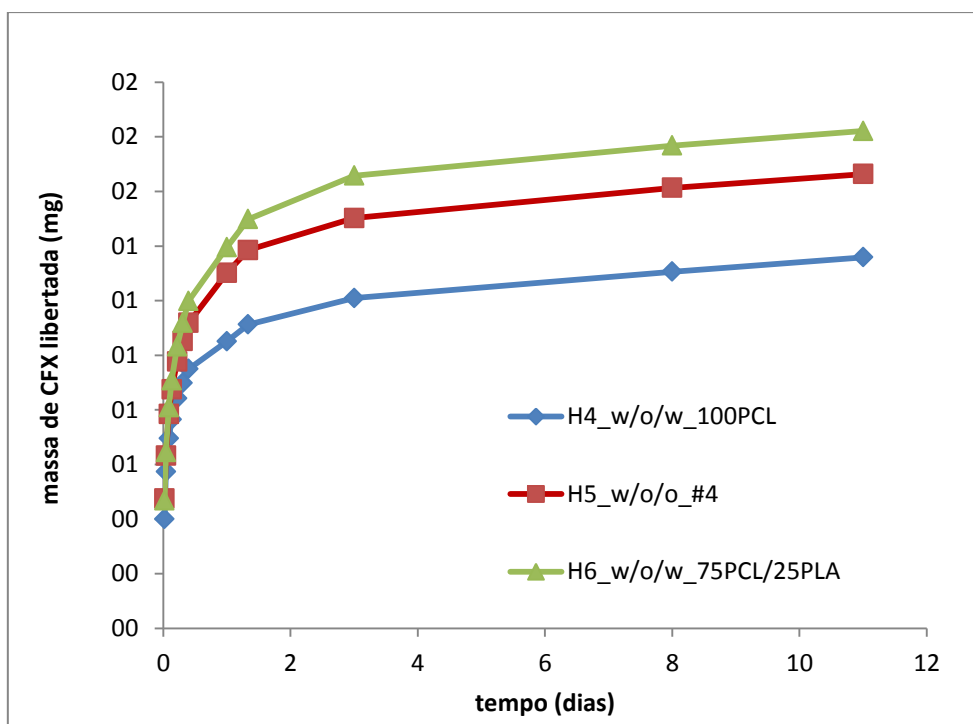
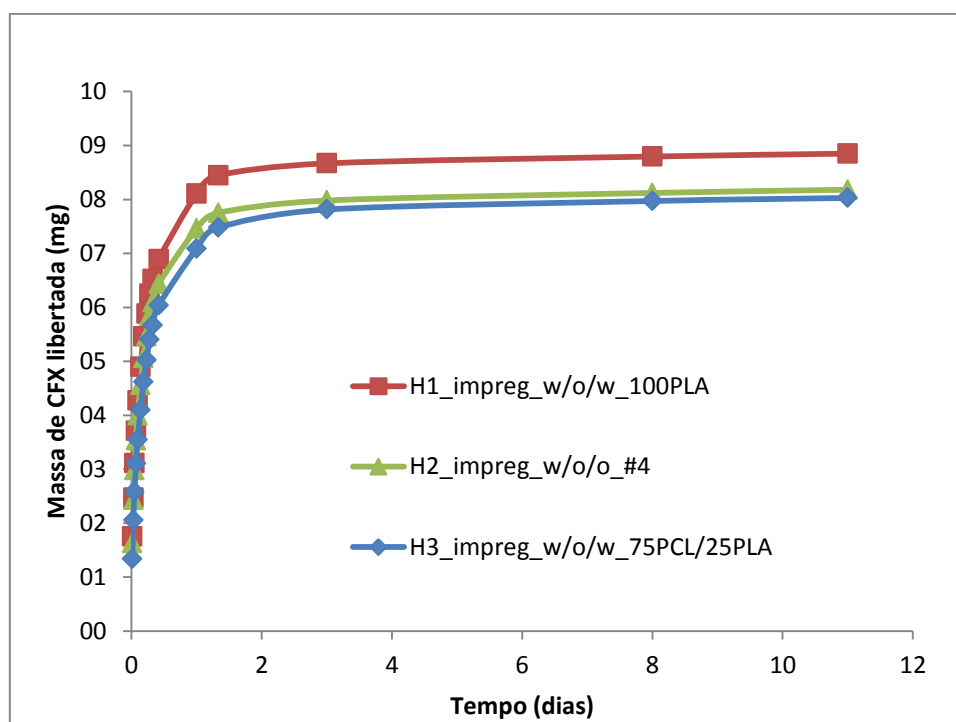


Figura 4.7 – Perfil de libertação de placas de osso revestidas por gelatina, com adição de micropartículas.

**Perfis de libertação in vitro da CFX (PBS, 37°C) de placas de osso revestidas por gelatina e impregnadas por solução de CFX com adição de micropartículas:**

Este último modelo de libertação, representado na Figura 4.8, pretende recriar o sistema de libertação controlada e localizada proposto como objectivo principal deste trabalho. Nele estão incorporados todos os modelos estudados e desenvolvidos durante o projecto, pretendendo-se obter um perfil de libertação semelhante aquele apresentado na Figura M.1.

Tal como nos sistemas percursos deste último, a libertação inicial regista valores elevados, começando a estabilizar por volta das oito horas de libertação e atingindo um patamar aos 3 dias de libertação. As quantidades de fármaco libertado não variam significativamente entre as três formulações de micropartículas, sendo os perfis bastante semelhantes.



**Figura 4.8 – Perfil de libertação de placas de osso revestidas por gelatina e impregnadas por solução de CFX com adição de micropartículas**

### Comparação dos perfis de libertação dos três sistemas de libertação controlada e localizada

O gráfico da Figura 4.9 compara os perfis de libertação dos três sistemas de libertação discutidos anteriormente. Pela análise do gráfico verifica-se que o perfil de libertação da placa de osso revestida por filme de gelatina com incorporação de micropartículas e impregnado é semelhante ao perfil que resultaria da soma dos perfis de libertação dos outros dois sistemas (osso revestido por filme de gelatina com micropartículas e osso revestido por filme de gelatina impregnado em solução de Ceftriaxona), tal como tinha sido idealizado.

No entanto, por não se conseguirem obter micropartículas com um perfil de libertação optimizado, o perfil de libertação global do sistema projectado não é o ideal, uma vez que as micropartículas libertam praticamente todo o fármaco encapsulado durante o primeiro dia, e não gradualmente ao longo de algumas semanas.

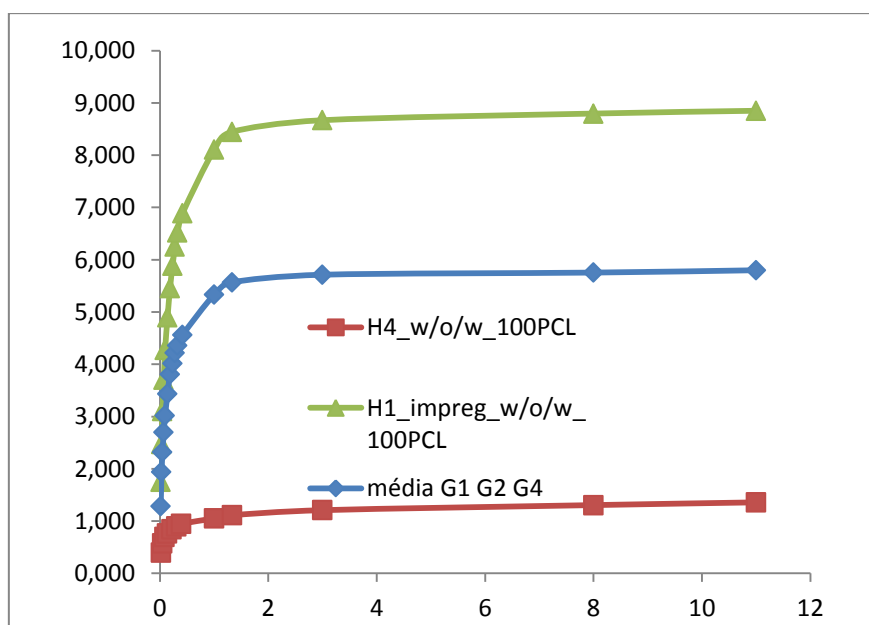


Figura 4.9 – Comparação entre os vários perfis de libertação.

## **Capítulo 5**

### **Conclusão e sugestões de trabalho futuro**



No decurso deste trabalho foi utilizada matriz óssea bovina como base estrutural para a criação de um Sistema de Libertação Controlada e Localizada. Foram seguidas várias metodologias distintas, executadas ao longo de três fases:

1. Em primeiro lugar procedeu-se à preparação de filmes de gelatina com diferentes graus de reticulação, com o objectivo subsequente de incorporar a componente farmacêutica, a Ceftriaxona Sódica, por impregnação, ou por incorporação nos filmes de micropartículas poliméricas com o antibiótico imobilizado. Os filmes de gelatina, reticulados com a carbodiimida EDC, foram caracterizados relativamente ao grau de reticulação, capacidade de absorção de água, e perda de massa em meio aquosa, com e sem a presença de colagenases.

Relativamente ao grau de reticulação, verificou-se que este aumentava com o aumento do rácio de mol EDC / mol COOH, tal como esperado.

Seguiram-se ensaios de absorção de água (swelling), com o objectivo de relacionar a capacidade de absorção de água de um filme com o seu grau de reticulação. Os resultados demonstram uma clara tendência para a diminuição desta capacidade com o aumento do grau de reticulação. Assim, valores mais altos de grau de reticulação implicam valores inferiores de swelling, tal como previsto pela teoria, uma vez que a reticulação leva à criação de uma rede tridimensional mais densa, o que dificulta a absorção de água por parte do polímero.

Com os ensaios de perda de massa pretendeu-se observar o processo de degradação dos filmes em meio aquoso, sendo estes realizados na ausência e presença de colagenases. Na ausência destas enzimas a degradação das amostras foi muito reduzida nos filmes com maior grau de reticulação, sendo ligeiramente superior quando o grau de reticulação era inferior. Com a introdução de colagenases, a perda de massa das amostras é muito mais rápida. Ainda assim, o filme com maior grau de reticulação manteve cerca de 60% da sua massa ao fim de 4 dias de ensaio.

2. O passo seguinte foi o desenvolvimento de estratégias de microencapsulação do fármaco em partículas poliméricas, onde se seguiram 3 metodologias de dupla emulsão distintas: método w/o/w, método w/o/o e método s/o/o. Foram utilizadas diferentes combinações de polímeros, entre PLA, PCL e PLGA. As micropartículas produzidas foram analisadas no que diz respeito à sua morfologia, eficiência de encapsulação do antibiótico e perfil de libertação *in vitro*. Calculou-se a eficiência de encapsulamento de cada lote de micropartículas, tendo a média sido de 48,3% para o método w/o/w, 34,4% para o método w/o/o e 52,9% para o método s/o/o. Tendo em conta os valores de Eficiência de

Encapsulamento obtidos, crê-se que na maioria dos casos o fármaco tenha sido totalmente libertado aquando do término do ensaio, sendo este um resultado positivo já que é tido como um dos parâmetros necessários à criação de um sistema de libertação apropriado.

Foram também investigados os perfis de libertação *in vitro* para cada lote de partículas, que se revelaram muito distantes daquilo que seria o perfil de libertação ideal. A libertação inicial registou valores muito elevados, sendo que na grande maioria dos casos, a totalidade do fármaco foi libertada ao fim de apenas algumas horas de ensaio. As partículas produzidas pelo método w/o/w e, dentro deste grupo, aquelas produzidas unicamente por PCL foram as que apresentaram melhores resultados, prolongando-se a libertação durante cerca de uma semana.

Das técnicas desenvolvidas durante o presente trabalho, esta é claramente a mais complexa e aquela que requer maior optimização. É necessário diminuir os valores de libertação inicial e prolongar o tempo de libertação para tempos mais próximos das 4 a 6 semanas pretendidas. O processo de formação das micropartículas terá que ser optimizado, com vista à diminuição da sua porosidade e impedindo a migração do fármaco para o meio exterior de forma tão abrupta, de modo a prolongar a libertação por mais algumas semanas.

3. Por fim procedeu-se à junção dos constituintes desenvolvidos, com vista à produção dos Sistemas de Libertação finais. Assim, escolheram-se os componentes que apresentaram melhores resultados práticos, sendo estes o filme de gelatina R5, com grau de reticulação de nEDC : nCOOH de 4:1, que apresentou maior resistência à degradação e, na categoria das micropartículas, aquelas que registaram valores de libertação nas primeiras 24 horas mais reduzidos, ou seja, as 100PCL e 75PCL/25PLA pelo método w/o/w e, pelo método w/o/o, as #4.

Foram então fabricados três SLCL diferentes, utilizando-se a estratégia referida na M.4. Dos sistemas desenvolvidos, aquele que apresentou melhores resultados foi o resultante da combinação de todas as técnicas desenvolvidas, ou seja, a placa de osso revestida por um filme de gelatina impregnado numa solução de CFX, com adição de micropartículas.

Este resultado é expectável, uma vez que cada constituinte tem uma função específica, sendo a conjugação de todos os elementos aquela que permitiu um melhor produto final. A elevada libertação inicial deve-se essencialmente ao fármaco impregnado nos filmes de revestimento enquanto que a libertação prolongada é uma consequência da difusão do fármaco encapsulado nas micropartículas para o exterior, que se processa mais lentamente.

Ainda assim, os perfis de liberação obtidos não foram os desejados, afastando-se claramente do perfil ideal. Como alternativa propõe-se a ligação covalente do fármaco aos filmes de gelatina, criando assim ligações mais fortes e diminuindo a intensidade da liberação inicial. Além disso e, como referido anteriormente neste capítulo, é necessário otimizar o processo de microencapsulação, experimentando novos polímeros e suas combinações, alterar as concentrações poliméricas, razões entre fases e razões de fármaco/polímero e ainda as condições de formação das emulsões, no que diz respeito ao tempo e velocidade de agitação, bem como à temperatura do processo.

## Bibliografia

1. **Fonseca, I.A.d.**, *Modificação Superficial de Ossos para Aplicações em Ortopedia*. 2011.
2. **Tim D. White, M.T.B., Pieter A. Folkens**, *Human Osteology, Third Edition*. 2012.
3. **Lieberman, D.E.**, *Musculoskeletal System – Overview*. Encyclopedia of Life Sciences, 2001.
4. **Seeley RR, S.T., Tate P.**, *Anatomia&Fisiologia*. 8.ª edição, ed. Lusodidacta. 2012: Lisboa.
5. [http://www.daviddarling.info/encyclopedia/L/long\\_bone.html](http://www.daviddarling.info/encyclopedia/L/long_bone.html).
6. **Manuel Gutierrez, M.A.L., Nandyala Sooraj Hussain, Abel Trigo Cabral, Luís Almeida, José Domingos Santos**, *Substitutos Ósseos - Conceitos Gerais e Estado Actual*. ArquiMed, 2006. 19(4): p. 153 - 162.
7. **Peter V. Giannoudis , H.D., Eleftherios Tsiridis**, *Bone substitutes: An update*. Injury, Int. J. Care Injured, 2005. 36S: p. S20—S27.
8. **Matilde Bongio, J.J.J.P.v.d.B., Sander C. G. Leeuwenburgh, John A. Jansen**, *Development of bone substitute materials: from ‘biocompatible’ to ‘instructive’*. Journal of Materials Chemistry, 2010. 20: p. 8747–8759.
9. **Doug Sutherland, M.B.**, *Grafts and Bone Graft Substitutes*. Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications, 2010: p. 133-155.
10. **Doron I. Ilan, A.L.L.**, *Bone Graft Substitutes*. Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery, 2003. 9: p. 151-160.
11. **C. Delloye, O.C., V. Druetz, O. Barbier**, *Bone allografts - What they can offer and what they cannot*. British Editorial Society of Bone and Joint Surgery, 2007. 89-B.
12. **X.H. Wang, D.P.L., W.J. Wang, Q.L. Feng, F.Z. Cuia, Y.X. Xub, X.H. Songb, Mark van der Werfc**, *Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers*. Biomaterials, 2003. 24: p. 3213-3220.
13. **Figueiredo, M., et al.**, *Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone*. Ceramics International, 2010. 36(8): p. 2383-2393.
14. **Karen J.L. Burg, S.P., James F. Kellam**, *Biomaterial developments for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2000. 21: p. 2347 - 2359.
15. **Viviana Mouriño, A.R.B.**, *Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds*. Journal of the Royal Society, 2010. 7: p. 209–227.
16. **R. Murugan , S.R.**, *Development of nanocomposites for bone grafting*. Composites Science and Technology, 2005. 65: p. 2385–2406.
17. **Buddy D. Ratner, A.S.H., Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons**, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 1996.
18. **Coimbra, P.M.A.**, *Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural*. 2010.
19. **Peng Wu, D.W.G.**, *Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis*. Biomaterials 2006. 27 p. 2450–2467.
20. **Magaly A.M. de LYRA, J.L.S.-S., Mariana T. BRASILEIRO, and J.A.B. Mônica F. de La ROCA, Osnir de S. VIANA, Pedro J. ROLIM-NETO**, *Sistemas Matriciais Hidrofilicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos*. Latin American Journal of Pharmacy, 2007. 26(5): p. 784-793.
21. **Jain, K.K.**, *Drug Delivery Systems*. John M. Walker, University of Hertfordshire. 2008: Hatfield.

22. **Samit Kumar Nandi, P.M., Subhasis Roy, Biswanath Kundu, and D.B. Dipak Kumar De,** *Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis – A review.* Materials Science and Engineering C, 2009. 29: p. 2478–2485.
23. **Charalampos G. Zalavras, M.J.P., Paul Holtom,** *Local Antibiotic Therapy in the Treatment of Open Fractures and Osteomyelitis.* Clinical Orthopaedics and related research, 2004. 427: p. 86–93.
24. **Tsourvakas, S.,** *Local Antibiotic Therapy in the Treatment of Bone and Soft Tissue Infections.* 2012.
25. **Meital Zilberman, J.J.E.,** *Antibiotic-eluting medical devices for various applications.* Journal of Controlled Release, 2008. 130: p. 202–215.
26. [http://www.anaseca.uac.pt/pdf\\_bioquimica/introd\\_espectrof.pdf](http://www.anaseca.uac.pt/pdf_bioquimica/introd_espectrof.pdf).
27. <http://www.rrcap.unep.org/male/manual/national/11Chapter11.pdf>.
28. <http://home.utad.pt/~ume/Fundamentos%20Te%F3ricos.pdf>.
29. [http://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/SEM.html](http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html).
30. <http://science.howstuffworks.com/scanning-electron-microscope2.htm>.
31. <http://www.purdue.edu/rem/rs/sem.htm>.
32. <http://www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/SEM.pdf>.
33. **Z.A. Nur Hanani, Y.H.R., Joe P. Kerry,** *Use of beef, pork and fish gelatin sources in the manufacture of films and assessment of their composition and mechanical properties.* Food Hydrocolloids, 2012. 29: p. 144-151.
34. **Zhongkai Zhang, G.L., Bi Shi,** *Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes.* Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, 2006. 90: p. 23-28.
35. **M.C. Gómez-Guillén, B.G., M.E. López-Caballero, M.P. Montero,** *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review.* Food Hydrocolloids, 2011. 25: p. 1813 -1827.
36. **Jui-Yang Lai, Y.-T.L.,** *Evaluation of cross-linked gelatin membranes as delivery carriers for retinal sheets.* Materials Science and Engineering C, 2010. 30: p. 677 - 685.
37. **Madeleine Djabourov, J.L., Pierre Papon,** *Gelation of aqueous gelatin solutions. II. Rheology of the sol-gel transition.* J. Phys. France, 1988. 49: p. 333-343.
38. **Edith van den Bosch, C.G.,** *Gelatin degradation at elevated temperature.* International Journal of Biological Macromolecules, 2003. 32: p. 129–138.
39. **Susan M. Tosh, A.G.M.,** *Determination of the maximum gelation temperature in gelatin gels.* Applied Physics Letters 2004. 84(21).
40. **L.H.H. Olde Damink, P.J.D., M.J.A. van Luyn, P.B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen,** *Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide.* Biomaterials, 1996. 17: p. 765 - 773.
41. **Young Seon Choi, S.R.H., Young Moo Lee, Kang Won Song, Moon Hyang Park, Young Soo Nam,** *Studies on Gelatin-Containing Artificial Skin: II. Preparation and Characterization of Cross-Linked Gelatin-Hyaluronate Sponge.* Journal of Biomed Mater Res, 1999. 48: p. 631-639.
42. **L.H.H. Olde Damink, P., J. Dijkstra, M.J.A. van Luyn, P.B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen,** *In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a watersoluble carbodiimide.* Biomaterials, 1996. 17: p. 679-684.
43. **L. H. H. Olde Damink, P.J.D., M. J. A. Van Luyn, P. B. Van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen,** *Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials.* Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1995. 6: p. 460-472.
44. **A.J. Kuijpers , P.B.v.W., M.J.A. van Luyn, G.H.M. Engbers, J. Krijgsveldc, S.A.J. Zaat, J. Dankert, J. Feijen,** *In vivo and in vitro release of lysozyme from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves.* Journal of Controlled Release, 2000. 67: p. 323-336.

45. **Huang-Chien Liang, W.-H.C., Hsiang-Fa Liang, Meng-Horng Lee, Hsing-Wen Sung,** *Crosslinking Structures of Gelatin Hydrogels Crosslinked with Genipin or a Water-Soluble Carbodiimide.* *Journal of Applied Polymer Science*, 2004. 91: p. 4017–4026.
46. **Kumar, M.N.V.R.,** *Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices.* *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000. 3: p. 234-258.
47. **C.E. Mora-Huertasa, H.F., A. Elaissari,** *Polymer-based nanocapsules for drug delivery.* *International Journal of Pharmaceutics*, 2010. 385: p. 113-142.
48. **H.N.M. Chambi, I.D.A., D. Barrera-Arellano, C.R.F. Grosso,** *Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: Production, characterisation and release profiles.* *Food Research International*, 2008. 41: p. 229-236.
49. **Christian Wischke, S.P.S.,** *Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles.* *International Journal of Pharmaceutics*, 2008. 364: p. 298-327.
50. **L.-T. Lima, R.A., M. Rubino,** *Processing technologies for poly(lactic acid).* *Progress in Polymer Science*, 2008. 33: p. 820-852.
51. **Bhuvanesh Gupta, N.R., Jons Hilborn,** *Poly(lactic acid) fiber: An overview.* *Progress in Polymer Science*, 2007. 32: p. 455-482.
52. **F. Carrasco, P.P., J. Gámez-Pérez, O.O. Santana, M.L. Maspoch,** *Processing of poly(lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties.* *Polymer Degradation and Stability*, 2010. 95: p. 116-125.
53. **Rahul M. Rasal, A.V.J., Douglas E. Hirt,** *Poly(lactic acid) modifications.* *Progress in Polymer Science*, 2010. 35: p. 338-356.
54. **Derek T. O'Hagan, M.S., Rajesh K. Gupta,** *Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines.* *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998. 32: p. 225-246.
55. **Michael Vajdy, D.T.O.H.,** *Microparticles for intranasal immunization.* *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001. 51: p. 127–141.
56. **Anjum Shabir, F.A., Yvonne Perrie, Afzal R. Mohammed,** *Effects of ball-milling on PLGA polymer and its implication on lansoprazole-loaded nanoparticles.* *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 2011. 2(2).
57. **Giles T. S. Kirby, L.J.W., Cheryl V. Rahman, Helen C. Cox, Omar Qutachi, and D.W.H. Felicity R. A. J. Rose, Kevin M. Shakesheff, Maria A. Woodruff,** *PLGA-Based Microparticles for the Sustained Release of BMP-2.* *Polymers*, 2011. 3: p. 571-586.
58. **Hirenkumar K. Makadia, S.J.S.,** *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier.* *Polymers*, 2011. 3: p. 1377-1397.
59. **XiaWei Weia, C.G., MaLing Gou, ShaoZhi Fu, QingFa Guo, and F.L. Shuai Shi, Gang Guo, LiYan Qiu, ZhiYong Qian,** *Biodegradable poly(E-caprolactone)–poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system.* *International Journal of Pharmaceutics*, 2009. 381: p. 1-18.
60. **V.R. Sinha, K.B., R. Kaushik, R. Kumria, A. Trehan,** *Poly-E-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview.* *International Journal of Pharmaceutics*, 2004. 278: p. 1-23.
61. **Yuzhi Xu, C.W., Nicole M. Stark, Zhiyong Cai, Fuxiang Chu,** *Miscibility and thermal behavior of poly (-caprolactone)/long-chain ester of cellulose blends.* *Carbohydrate Polymers*, 2012. 88: p. 422-427.
62. **Legras, T.F.V.R.,** *Physico-mechanical properties of poly(e-caprolactone) for the construction of rumino-reticulum devices for grazing animals.* *Biomaterials*, 1995. 16: p. 1395-1400.
63. **Xudong Wang, Y.W., Kun Wei, Naru Zhao, Shuhua Zhang, Jingdi Chen,** *Drug distribution within poly(E-caprolactone) microspheres and in vitro release.* *Journal of Materials Processing Technology*, 2009. 209: p. 348-354.

64. **M.P. Grosvenor, J.N.S.,** *The effect of molecular weight on the rheological and tensile properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone).* International Journal of Pharmaceutics, 1996. 135: p. 103-109.
65. **de Klerk, G.J., et al.,** *A randomised, multicentre study of ceftriaxone versus standard therapy in the treatment of lower respiratory tract infections.* International Journal of Antimicrobial Agents, 1999. 12(2): p. 121-127.
66. **Ali, A.E.,** *Synthesis, spectral, thermal and antimicrobial studies of some new tri metallic biologically active ceftriaxone complexes.* Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011. 78(1): p. 224-230.
67. **Arpacik, M., et al.,** *Effects of ceftriaxone sodium on in vitro gallbladder contractility in guinea pigs.* Journal of Surgical Research, 2004. 122(2): p. 157-161.
68. **Zhang, C.-t., H.-r. Wang, and Y.-l. Wang,** *Internally generated seeding policy in anti-solvent crystallization of ceftriaxone sodium.* Chemical Engineering and Processing, 2010. 49(4): p. 396-401.
69. **Zhao, W., Y. Zhang, and Q. Li,** *Indirect spectrophotometric determination of sodium ceftriaxone with *n*-propyl alcohol-ammonium sulfate-water system by extraction flotation of copper(II).* Clinica Chimica Acta, 2008. 391(1-2): p. 80-84.
70. **Owens HM, D.A.,** *Profiles of Drug Substances.* Department of Pharmacy Sciences, 2003. 30: p. 21-28.
71. **Dorcas Lamounier Costa, M.D.d.O.B. and e.M.T.d.O. Barbosa,** *Colelitíase associada ao uso de ceftriaxona.* Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2005. 38(6): p. 521-523.

# Anexos

## Reagentes

Apresenta-se, de seguida, uma lista dos reagentes utilizados no decorrer deste trabalho.

Reagente	Grau de Pureza	Marca
<b>Gelatina de tipo A</b>		Sigma Aldrich
<b>EDC</b>	> 98%	Fluka
<b>NHS</b>	> 98%	Acros Organics
<b>Tampão MES ácido</b>		Boehringer Mannheim GmbH
<b>Tampão MES Na</b>	> 99%	Sigma Aldrich
<b>Cloreto de Sódio</b>	> 99%	Sigma Aldrich
<b>PBS</b>		Sigma Aldrich
<b>Azida de Sódio</b>	> 99%	Panreac
<b>Ácido Clorídrico</b>	37%	Vaz Pereira
<b>TNBS</b>	5% (w/v)	Sigma Aldrich
<b>Hidrogenocarbonato de Sódio</b>		
<b>Cloreto de Cálcio</b>		
<b>Tampão TES</b>	> 99%	Sigma Aldrich
<b>Colagenase</b>		Sigma Aldrich
<b>PLA_Lab</b>		Sintetizado no DEQ
<b>PLA</b>		NatureWorks
<b>PCL</b>		Perstorp UK
<b>Span80</b>		Sigma Aldrich
<b>Diclorometano</b>		Fisher Scientific
<b>Acetonitrilo</b>		
<b>Óleo mineral</b>		Sigma Aldrich
<b>CFX - Ceftriaxona Mespurin®</b>		Mepha
<b>n-hexano comercial</b>		
<b>PLGA</b>		Sigma Aldrich