

Inês Albuquerque da Fonseca

Modificação Superficial de Ossos para Aplicações em Ortopedia

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 Doutoradas
Maria Helena Gil e Maria Margarida Figueiredo.

Setembro de 2011



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Júri

Presidente: António Alberto Torres Garcia Portugal

Categoria: Professor Associado

Departamento: Departamento de Engenharia Química da FCTUC

Nome: Maria Margarida Lopes Figueiredo

Categoria: Professor Catedrático

Departamento: Departamento de Engenharia Química da FCTUC

Nome: Maria Helena Mendes Gil

Categoria: Professora Catedrática Aposentada

Instituição: Departamento de Engenharia Química da FCTUC

Nome: Fernando João Monteiro Judas

Categoria: Professor Auxiliar

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Nome: Patrícia Coimbra

Categoria: Post-Doc

Instituição: Departamento de Engenharia Química da FCTUC

Agradecimentos

Queria começar por agradecer às orientadoras desta tese, a Professora Doutora Maria Helena Gil e a Professora Doutora Maria Margarida Figueiredo, pela sua orientação e pela disponibilidade que sempre manifestaram para me ajudar.

Agradeço também à Doutora Patrícia Coimbra pelo constante apoio, disponibilidade, cooperação e pelo exemplo de dedicação e competência.

Agradeço a todos aqueles que durante a minha vida contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e formação enquanto pessoa, a todas as pessoas importantes na minha vida e que me ajudaram a crescer... à minha família, em especial à minha mãe.

Ao pensar nas pessoas que estiveram comigo e que me apoiaram, lembrei-me do meu primeiro ano da faculdade, e por isso gostaria ainda de agradecer a todos os meus colegas e sobretudo amigos, que me acompanharam ao longo destes cinco anos de curso e tornaram o caminho até aqui mais brando. Apesar de não haver aqui lugar para vos mencionar a todos ... Obrigada P&T.

Por fim, agradeço a Coimbra, a cidade onde cresci, aprendi e me formei.

A todos o meu Muito Obrigada!

Índice

RESUMO	IV
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	X
ACRÓNIMOS	XI
MOTIVAÇÃO	XII
CAPÍTULO 1	1
Fundamentos teóricos	1
1.1. Tecido ósseo.....	1
1.2. Substitutos ósseos.....	4
1.3. Sistemas de libertação controlada de fármacos	7
1.4. Sistemas de libertação local de antibióticos para aplicações em ortopedia.....	9
1.4.1. Estado da arte	9
1.4.2. Estratégias	11
1.4.2.1. Polieletrólitos e complexos polielectrolíticos	12
1.4.2.2. Micropartículas	15
CAPÍTULO 2	18
Materiais e Métodos.....	18
2.1. Estratégia experimental	18
2.2. Matéria-prima: matriz óssea de origem bovina.....	20
2.3. Antibiótico: Ceftriaxona	22
2.4. Polímeros.....	25
2.4.1. Pectina	25
2.4.2. Quitossano	27
2.4.3. Poli(ácido láctico).....	28
2.5. Técnicas de Caracterização.....	30
2.5.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	30
2.5.2. Espectrofotometria	31
2.5.3. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)	32
2.5.4. Microanálise por sonda electrónica (EPMA).....	33
2.5.5. Análise Elementar	34
2.5.6. Libertação <i>in vitro</i>	34

CAPÍTULO 3	36
Imobilização do antibiótico à superfície do osso.....	36
3.1. Imobilização directa por meio da carbodiimida.....	36
3.1.1. Procedimento Experimental.....	37
3.1.2. Resultados e Discussão	38
3.2. Ligação covalente da pectina à superfície do osso e posterior ligação do antibiótico	43
3.2.1. Procedimento Experimental.....	44
3.2.2. Resultados e Discussão	45
3.3. Impregnação da amostra com antibiótico seguida de revestimento com camadas alternadas de pectina e quitosano	46
3.3.1. Procedimento experimental.....	46
3.3.2. Resultados e Discussão	47
CAPÍTULO 4	50
Matrizes de polímeros com partículas de osso.....	50
4.1. Esponjas de pectina / quitosano misturadas com partículas de osso e antibiótico	50
4.1.1. Procedimento Experimental.....	51
4.1.2. Resultados e Discussão	52
4.2. Esponjas de pectina/quitosano com partículas de osso e com o antibiótico imobilizado covalentemente.....	56
4.2.1. Procedimento Experimental.....	57
4.2.2. Resultados e Discussão	59
4.3. Matrizes de pectina/quitosano com partículas de osso e com antibiótico encapsulado em micropartículas de PLA.	62
4.3.1. Procedimento Experimental.....	63
4.3.2. Resultados e Discussão	67
CAPÍTULO 5	71
Conclusão e sugestões para trabalho futuro	71
BIBLIOGRAFIA.....	73
ANEXOS	77
Reagentes.....	77
Equipamentos utilizados.....	78

Resumo

Este trabalho teve como propósito proceder à preparação de sistemas de libertação de antibióticos com recurso a matriz óssea de origem bovina, por forma a conferir aos enxertos ósseos, utilizados rotineiramente em cirurgias ortopédicas reconstrutivas, a capacidade de prevenir e combater infecções bacterianas.

A Ceftriaxona, uma cefalosporina de terceira geração, foi o antibiótico utilizado neste trabalho.

Inicialmente, procedeu-se à imobilização química do antibiótico à superfície do osso. Esta imobilização foi feita através da reacção dos grupos carboxílicos presentes à superfície do osso (provenientes do colagénio) com o grupo amina disponível na estrutura do antibiótico. Os resultados obtidos nesta fase não foram conclusivos, uma vez que não foi possível inferir se existia, ou não, essa ligação entre o antibiótico e o osso, quer através da análise dos espectros FTIR-ATR, quer pelos mapas de enxofre obtidos pela técnica de caracterização EPMA.

Numa outra situação foi ainda feita a imobilização prévia de cadeias de pectina à superfície do osso e posterior ligação da Ceftriaxona a essas mesmas cadeias, mas também neste caso não foi possível concluir nada acerca da imobilização do antibiótico.

Seguindo uma outra estratégia, a Ceftriaxona foi impregnada em placas de matriz óssea e essa matriz revestida posteriormente com um filme formado por camadas alternadas de pectina e quitosano. Os perfis de libertação *in vitro* da Ceftriaxona a partir destas placas revestidas revelaram que o revestimento da superfície do osso não tem um efeito muito significativo no perfil de libertação do antibiótico. Verificou-se igualmente que apenas cerca de 15% do fármaco impregnado foi libertado durante o ensaio de libertação *in vitro*, o que sugere que o antibiótico interage fortemente com a matriz óssea, podendo estar fisicamente adsorvido à superfície desta.

Numa segunda fase deste trabalho optou-se por utilizar a matriz óssea na forma de partículas e misturá-la com uma fase polimérica, de forma a obter matrizes

porosas. Neste caso, e ao contrário das estratégias anteriores, o antibiótico foi imobilizado na fase polimérica, recorrendo a diferentes métodos

A fase polimérica, na forma de gel, foi preparada através da complexação polielectrolítica da pectina e quitosano numa solução aquosa. Aos géis de pectina e quitosano assim formados adicionou-se e misturou-se as partículas de osso. Procedendo-se à liofilização dessa mistura, obtiveram as matrizes porosas (esponjas).

O antibiótico foi imobilizado nas matrizes, durante a sua preparação, de três formas diferentes.

- i) Por simples dispersão física;
- ii) Imobilizado covalentemente, por ligação com a pectina;
- iii) Encapsulado em micropartículas de poli(ácido láctico), que por sua vez foram incorporadas na matriz-compósito.

A utilização destas esponjas enquanto sistemas de libertação controlada de antibióticos foi testada através de um estudo de libertação *in vitro* da Ceftriaxona. Os ensaios de libertação *in vitro* mostraram que o antibiótico incorporado nos sistemas i) e ii) é libertado praticamente todo durante o primeiro dia.

Este perfil de libertação seria expectável para o primeiro sistema, onde o fármaco foi incorporado por uma simples dispersão física. Pelo contrário, para o sistema onde o antibiótico foi encapsulado nas partículas de PLA, esperava-se uma libertação gradual do antibiótico ao longo de várias semanas (ou até meses), controlada pela difusão deste através da matriz de PLA e pela biodegradação desta mesma matriz.

O sistema onde a Ceftriaxona foi imobilizada por uma ligação química às cadeias de pectina apresentou o perfil de libertação do antibiótico mais sustentado ao longo do tempo.

Apesar de não se ter obtido nenhum sistema de libertação com a capacidade de libertar a Ceftriaxona de uma forma controlada pelo período de tempo desejado (entre quatro a seis semanas), em cada um dos sistemas de libertação desenvolvidos e apresentados neste trabalho foi possível obter algumas conclusões, que poderão ser utilizadas como bases para a continuação do trabalho no futuro.

Abstract

The main purpose of this work was the preparation of antibiotic local delivery systems based on bone matrix, in order to grant to this material, usually use in reconstructive orthopedic surgeries, the power to actively prevent and fight bacterial infections.

Ceftriaxone, a third generation cephalosporin, was the antibiotic chosen to try to immobilize on or in the bone matrix.

Initially, the chemical immobilization of the antibiotic to the bone matrix surface was tempted. This immobilization was performed through the reaction of the carboxylic groups present on the surface of the bone (from collagen) with the amine group available in the antibiotic structure. The results were not conclusive at this stage, since it was not possible to confirm, with the available characterization techniques (FTIR-ATR and EPMA), the formation of a chemical bound between the antibiotic and the functional groups on the bone surface.

In another approach, pectin polymeric chains were first chemical immobilized on to the bone surface and then the ceftriaxone was chemically bound to those chains. Unfortunately, also in this case was not possible to conclude anything about the antibiotic immobilization.

Following another strategy, ceftriaxone was impregnated in bone matrix slabs and the surfaces of those matrices were subsequently coated with thin films formed by alternating layers of pectin and chitosan. The results of the *in vitro* release studies of ceftriaxone from these slabs lead to the conclusion that the film coating had a small impact in the release profile of the antibiotic. It was also noted that only 15% of the impregnated drug was released during the *in vitro* tests, which suggests that the antibiotic molecules interact strongly with the bone matrix and can be physically adsorbed to its surface.

In a second phase of this project the bone matrix was used in the form of particles and mixed with a polymeric phase, in order to obtain porous composite

matrices. In this case, and unlike the previous strategies, the antibiotic was immobilized in the polymeric phase, using different methods.

The polymeric phase, in gel form before drying, was prepared through the polyelectrolyte complexation of pectin and chitosan in an aqueous solution. The pectin and chitosan gel thus formed was added and mixed to the bone particles. This mixture was then freeze-dried to get the porous composite matrices (sponges).

The antibiotic was immobilized in the composite matrices, during its preparation, through three different methods:

- i) By simple physical dispersion
- ii) Covalently immobilized to pectin
- iii) Encapsulated in microparticles of poly (lactic acid), which in turn were incorporated in the matrix composite.

The ability of the produced sponges to act as ceftriaxone delivery systems was tested through *in vitro* release assays. The obtained *in vitro* release profiles showed that, for systems i) and iii), the incorporated antibiotic was released almost entirely during the first day.

This kind of release profile was expected for the first system, where the drug was incorporated by a simple physical dispersion. On the contrary, for the system in which the antibiotic was encapsulated in the PLA microparticles, it was expected a gradual release of the antibiotic during the course of several weeks, controlled by the antibiotic diffusion through the PLA matrix and by its biodegradation.

The system in which ceftriaxone was chemically immobilized to pectin presented the most prolonged and sustained ceftriaxone release.

Despite the non obtainment of any delivery system with the ability to release Ceftriaxone in a controlled manner for the aimed period of time (four to six weeks), in each delivery system developed and presented in this work it was possible to get some conclusions that can be used as the basis for further work in the future.

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Representação esquemática da estrutura do osso longo [3].	1
Figura 1.2 - Representação esquemática da estrutura do osso compacto e esponjoso [5].	3
Figura 1.3 - Comparação entre a administração de fármacos por métodos convencionais de multidosagem (a) e sistemas de libertação controlada (b), sendo A a administração do fármaco [imagem retirada de [11]].	7
Figura 1.4 - Esquema da formação dos complexos polielectrolíticos (PECs) entre a pectina e o quitosano [imagem retirada de [14]].	12
Figura 1.5 - Representação esquemática das etapas que levam à formação dos PECs [imagem retirada de [14]].	13
Figura 1.6 - Esquema da formação de um filme de multicamadas de polielectrólitos [Imagem retirada de [31]].	14
Figura 1.7 - Técnica de <i>Spin Coating</i> [imagem retirada de [38]].	15
Figura 1.8 - Esquema representativo do método extracção / evaporação do solvente numa emulsão óleo / água [Imagem retirada de [14]].	16
Figura 2.1 - Esquema dos diferentes sistemas de libertação local do antibiótico desenvolvidos no presente trabalho.	19
Figura 2.2 - Amostras de osso bovino preparadas no laboratório na forma de a) partículas de osso esponjoso; b) placas de osso cortical.	21
Figura 2.3 - Espectros FTIR-ATR do osso desmineralizado à superfície e do osso não desmineralizado.	21
Figura 2.4 - Estrutura geral das cefalosporinas [imagem retirada de [51]].	22
Figura 2.5 - Estrutura da Ceftriaxona [Imagem retirada de [54]].	23
Figura 2.6 - Espectro FTIR da Ceftriaxona através de pastilhas de KBr.	24
Figura 2.7 - Estrutura química da pectina [imagem retirada de [55]].	26
Figura 2.8 - Espectro FTIR-ATR obtido para a pectina.	26
Figura 2.9 - Estrutura química do quitosano (n>60) [imagem retirada de [14]].	27
Figura 2.10 - Espectro FTIR-ATR obtido para o quitosano.	28
Figura 2.11 - Fórmula química do poli(ácido láctico) ou poli(lactídeo) [Imagem retirada de [60]].	28
Figura 2.12 - Bifuncionalidade do ácido láctico [Imagem retirada de [64]].	29
Figura 2.13 - Estereoisómeros do ácido láctico [Imagem retirada de [63]].	29
Figura 2.14 - Sistema ATR [imagem retirada de [72]].	31
Figura 2.15 - Sinais emitidos da amostra após interacção com o feixe de electrões [adaptado de [76]].	33
Figura 3.1 - Activação dos grupos carboxílicos, em solução tampão MES, pH 5.5.	37
Figura 3.2 - Acoplamento do antibiótico, em solução tampão PBS, pH 7.4.	37

Figura 3.3 - Espectro FTIR-ATR das amostras desmineralizadas com(osso desmineralizado _CFX) e sem antibiótico (osso desmineralizado _controlo) e do antibiótico (CFX).	39
Figura 3.4 - Espectro FTIR-ATR das amostras não-desmineralizadas com (osso não-desmineralizado _CFX) e sem antibiótico (osso não-desmineralizado _controlo) e do antibiótico (CFX).	39
Figura 3.5 - Comparação entre os Espectros FTIR-ATR do osso desmineralizado e não desmineralizado, ambos com antibiótico ligado (CFX), e da Ceftriaxona.....	40
Figura 3.6 - Mapas de enxofre à superfície das amostras desmineralizadas sem (à esquerda) e com (à direita) imobilização do antibiótico (CFX) (Área: 100 x 100µm).	41
Figura 3.7 - a) Imobilização da pectina; b) Ligação do antibiótico.....	43
Figura 3.8 - Espectro FTIR-ATR da superfície do osso desmineralizado, do osso desmineralizado com cadeias de pectina ligadas à superfície e do osso desmineralizado com cadeias de pectina ligadas à superfície e posterior ligação do antibiótico.....	45
Figura 3.9 - Massa de Ceftriaxona impregnada nas várias placas de osso.	47
Figura 3.10 - Perfis de libertação <i>in vitro</i> do antibiótico a partir das placas de osso.	48
Figura 4.1 -Esquema de formação das esponjas: PECs +osso+CFX.....	52
Figura 4.2 - Espectros FTIR-ATR da pectina, quitosano e PECs e ampliação da zona de interesse.	53
Figura 4.3 - a) Aspecto do PEC (pectina/quitosano); b)Ligação do PEC ao osso; c) e d) Ampliação da ligação do PEC ao osso.	54
Figura 4.4 - Perfis da libertação <i>in vitro</i> da CFX incorporada nas esponjas de PECs com e sem adição de osso de diferentes granulometrias.	55
Figura 4.5 - Esquema da ligação do antibiótico Ceftriaxona à pectina.	56
Figura 4.7 - Esquema de formação das esponjas: PEC(CFX) + osso.	58
Figura 4.6 - Esquema da formação dos complexos polielectrolíticos entre a pectina-CFX e o quitosano.	58
Figura 4.8 - Espectros FTIR-ATR da pectina e da pectina-CFX.....	59
Figura 4.9 - Espectros FTIR-ATR da pectina-CFX, quitosano e PEC(CFX).....	60
Figura 4.10 - Perfis da libertação <i>in vitro</i> da CFX presente nas esponjas de PEC(CFX).....	61
Figura 4.11 - Esquema de formação das esponjas: PECs + osso + MP(CFX).	62
Figura 4.12 - Esquema da preparação das micropartículas de PLA com CFX pelo método da extracção/evaporação do solvente numa dupla emulsão água/óleo/água.	64
Figura 4.13 - Aspecto da esponja obtida no trabalho de laboratório.....	65
Figura 4.14 - Esquema de formação das esponjas: PECS +osso + MP(CFX) + CFX.	66
Figura 4.15 - Imagens de SEM das micropartículas de PLA com CFX encapsulado.	67
Figura 4.16 - a) e b) Micropartículas de PLA-CFX aprisionadas na matriz polimérica formada pelos PECs de pectina e quitosano; c) e d) Partícula de osso envolta na matriz polimérica e micropartículas; e) e f) Ampliação de duas zonas apresentada em d).	69
Figura 4.17 - Perfis de libertação <i>in vitro</i> da Ceftriaxona encapsulada nas micropartículas.....	70

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Classes de materiais utilizados como substitutos ósseos: alguns exemplos de materiais e principais propriedades constituindo vantagens ou inconvenientes para determinadas aplicações [Adaptado de [8]]:	6
Tabela 1.2 - Exemplos de alguns sistemas de libertação local de antibióticos para aplicações em ortopedia referidos na literatura [Adaptado [13]]:.....	10
Tabela 2.1 - Exemplos da estabilidade de soluções de Ceftriaxona sódica [Adaptado [54]].	23
Tabela 2.2 - Atribuição das bandas nos espectros de FTIR da Ceftriaxona [Adaptado [54]]:.....	24
Tabela 4.1 - Atribuição das bandas nos espectros de FTIR-ATR da pectina, quitosano e PECs..	53
Tabela 4.2 - Resultados da análise elementar à pectina modificada (Pectina-CFX) e pectina não modificada (Pectina).	60
Tabela 4.3 - Quantidade de cada um dos constituintes dos diferentes sistemas de libertação.	66
Tabela 4.4 - Eficiência de encapsulamento do antibiótico (média \pm desvio padrão; n = 3).	68
Tabela A.1 - Lista de reagentes utilizados.....	77
Tabela A.2 - Lista de equipamentos utilizados.	78

Acrónimos

SLC	Sistemas de libertação controlada
HA	Hidroxiapatite
TCP	Fosfato de cálcio <i>(Tricalcium phosphate)</i>
PLA	Poli (ácido láctico)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PLGA	Poli (ácido láctico – co - ácido glicólico)
PCL	Poli (ξ-Caprolactona)
PMMA	Polimetacrilato de metilo
PE	Polietileno
PLLA	Poli – L – (ácido láctico)
PDLA	Poli – D – (ácido láctico)
SLLA	Sistemas de libertação localizada de antibióticos
GE	Grau de esterificação
GD	Grau de desacetilação
CFX	Ceftriaxona
UV	Luz Ultravioleta
IV	Infravermelho
VIS	Luz visível
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada
SEM	Microscopia electrónica de varrimento
EPMA	Microanálise por sonda electrónica <i>(Electron probe micronalysis)</i>
PELs	Polieletrólitos
PECs	Complexos polielectrolíticos
MP	Micropartículas

Motivação

Uma das complicações mais comuns após uma cirurgia ortopédica é o aparecimento de infecções. No tratamento de infecções a nível dos tecidos ósseos, a utilização de sistemas de libertação controlada (SLC) e localizada de antibióticos pode colmatar as várias limitações apresentadas por um tratamento com base na administração sistémica de antibióticos, uma vez que a condução do fármaco até ao local específico em que deve actuar maximiza o seu benefício clínico e diminui os efeitos adversos.

Desta forma vários sistemas de libertação controlada e localizada de antibióticos, para aplicações ortopédicas, têm sido propostos e desenvolvidos. Estes têm como base, normalmente, materiais poliméricos ou inorgânicos.

Este trabalho tem como propósito proceder à preparação de sistemas de libertação de antibióticos com recurso a enxertos de osso alógeno. Com esta modificação pretende-se conferir aos enxertos alógenos, utilizados rotineiramente em cirurgias ortopédicas reconstrutivas, a capacidade de prevenir e combater infecções bacterianas.

Capítulo 1

Fundamentos teóricos

1.1. Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo constituído por uma matriz fortemente mineralizada, na qual se encontram vasos sanguíneos, nervos e diversos tipos de células, nomeadamente osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Dependendo da sua posição anatómica, o tecido ósseo apresenta, a nível macroscópico, diferentes configurações. Assim sendo, os ossos podem apresentar diferentes tamanhos e morfologias, sendo por isso classificados de longos, curtos, chatos e irregulares. No seu conjunto, constituem o esqueleto dos seres vertebrados e desempenham importantes funções mecânicas (suporte, mobilidade do organismo e protecção de órgãos internos) e metabólicas (reservatório de minerais, formação de células sanguíneas e equilíbrio hormonal) [1,2].

Relativamente à sua estrutura e tomando como exemplo um osso longo (como o fémur, objecto de estudo neste trabalho), podem identificar-se duas regiões distintas: a *diáfise*, constituindo um longo corpo central de forma aproximadamente cilíndrica e, nas suas extremidades, as *epífises* (formato mais alargado). A pequena região de transição entre a diáfise e cada epífise designa-se por *metáfise*. Em corte longitudinal (Figura 1.1), observa-se que a diáfise

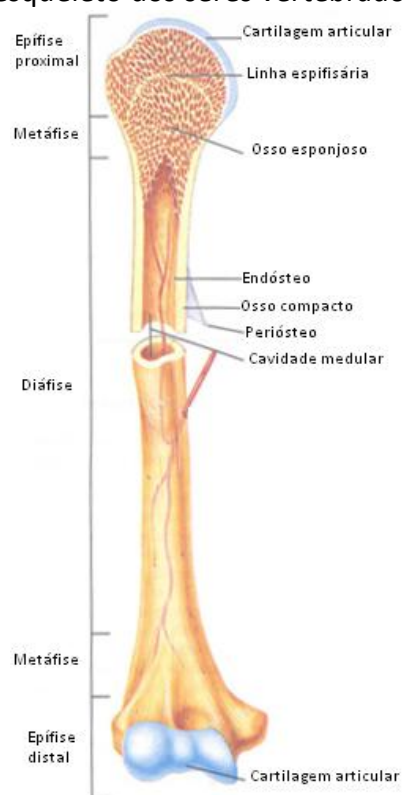


Figura 1.1 - Representação esquemática da estrutura do osso longo [3].

não é maciça, constituindo um cilindro de paredes não muito espessas, porém muito densas e resistentes. Trata-se de tecido ósseo compacto (ou cortical). O interior da diáfise encontra-se preenchido com um tecido mole: a medula óssea. Observa-se ainda que as paredes das epífises também possuem uma periferia densa de osso compacto mas, no seu interior, o tecido ósseo possui uma estrutura porosa, semelhante a uma esponja. Por este motivo, este tecido é designado por esponjoso, ou trabecular. Nesta estrutura de porosidade intercomunicante, os poros encontram-se igualmente ocupados por medula óssea. Para concluir, verifica-se que à excepção da restrita zona da superfície da epífise revestida por cartilagem, ambas as superfícies interna e externa do osso estão revestidas por membranas, sendo respectivamente designadas por endóstio e perióstio. Estas membranas fornecem continuamente células osteoprogenitoras, envolvidas no crescimento e reparação do tecido ósseo [1,2].

A este propósito, torna-se conveniente referir que, no tecido ósseo, existem três tipos fundamentais de células: os osteoblastos e os osteócitos, que derivam de células mesenquimatosas pluripotentes; e os osteoclastos, que derivam do sistema hemotopoiético. Os osteoblastos produzem a matriz óssea, enquanto os osteoclastos reabsorvem a mesma. Por seu lado, os osteócitos resultam da diferenciação dos osteoblastos que, após atingirem a sua maturidade, ficam numa forma latente, alojados em lacunas na matriz extracelular. Os osteócitos comunicam entre si através da emissão de numerosos prolongamentos citoplasmáticos inseridos em redes de canalículos. A acção concertada destes três tipos de células permite o crescimento do osso desde o embrião à fase adulta e a sua manutenção, a partir dessa altura. Com efeito, os processos dinâmicos de remodelação óssea ocorrem durante toda a vida, permitindo ligeiros ajustes na composição e estrutura do osso, de acordo com as solicitações a que este é submetido [1-5].

A compreensão destes mecanismos de ajuste exige uma análise muito mais pormenorizada do osso, além dos aspectos macro-estruturais referidos. De facto, a estrutura compacta ou trabecular do osso é muito complexa, sendo habitualmente descrita como construída a partir de diferentes níveis de organização. No osso cortical, toda essa hierarquia na organização é mais facilmente observada, podendo ser descrita a partir da constituição básica da matriz extracelular.

A matriz óssea, normalmente considerada como um material compósito, é essencialmente constituída por uma fase mineral (65 %) à base de hidroxiapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, uma fase orgânica (25 %) onde predomina o colagénio tipo I, e água (10 %). Estes componentes encontram-se associados de forma a constituírem fibrilhas mineralizadas que se agrupam formando fibras e estas, por sua vez, formam lamelas de tecido ósseo. A disposição de diversas camadas de lamelas, com orientações alternadas, em torno de canais que contêm vasos sanguíneos e nervos (os canais de Havers), origina uma densa estrutura de multicamadas aproximadamente cilíndrica. Esta estrutura, designada de Sistema de Havers, é considerada como a unidade multifuncional do tecido ósseo. Além dos canais de Havers, dispostos longitudinalmente no osso, existem também os chamados canais de Volkman, aproximadamente perpendiculares aos primeiros. Assinala-se ainda a existência de pequenos espaços entre lamelas, os quais constituem as lacunas que contêm osteócitos. Estas lacunas encontram-se ligadas por finos canalículos que atravessam as sucessivas lamelas ósseas, permitindo a difusão de nutrientes e comunicação celular. Observando o corte de uma secção de osso cortical, constata-se a existência de numerosos Sistemas de Havers (aparência de anéis concêntricos) em torno do canal medular ao centro (Figura 1.2) [1-5].

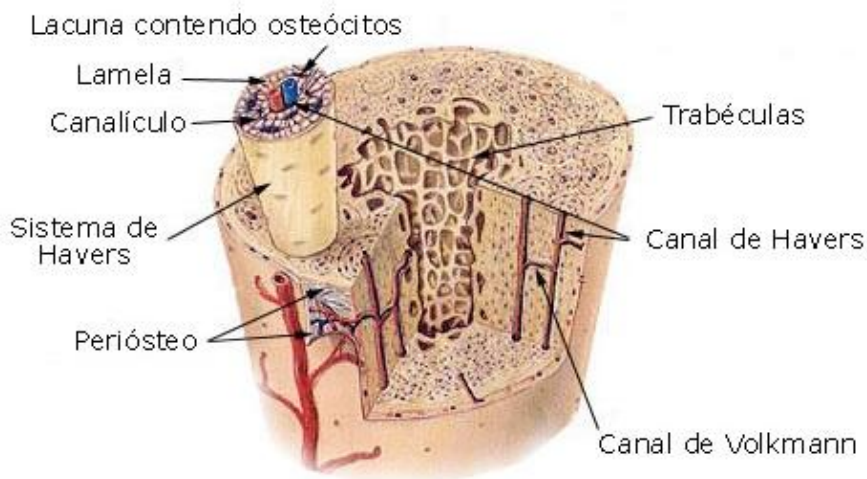


Figura 1.2- Representação esquemática da estrutura do osso compacto e esponjoso [5].

1.2. Substitutos ósseos

Os substitutos ósseos podem ser definidos como materiais de origem natural (animal ou vegetal) ou sintética, que ao serem implantados no organismo poderão servir para reconstituição e reforço da estrutura óssea (através de próteses) ou para o preenchimento de defeitos ósseos, normalmente através de enxertos. Com efeito, nos casos em que o tecido ósseo perde a capacidade de auto-reparação, o recurso a enxertos ósseos tem-se mostrado particularmente eficaz no restauro dos defeitos ósseos – expressão que designa pequenas regiões onde ocorreu uma perda de massa óssea devido a causa traumática ou ortopédica [6].

Como facilmente se compreende, o tecido ósseo representa o melhor material para aplicar como enxerto ósseo, sobretudo se provier do próprio indivíduo (para evitar problemas de imunogenicidade). No entanto, dado que tal nem sempre é possível ou adequado, podem considerar-se outras alternativas. Efectivamente, existe na actualidade uma grande diversidade de enxertos ósseos, incluindo os que são baseados em tecido ósseo (autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos) e outros que resultam de materiais naturais ou de materiais sintéticos, ou mesmo de diferentes combinações entre os tipos de enxerto referidos. Evidentemente, cada um deles apresenta as suas vantagens e os seus inconvenientes [7, 8].

Os autoenxertos referem-se ao transplante de tecidos entre diferentes locais do próprio indivíduo. Apesar destes enxertos não provocarem problemas de rejeição, apresentam a limitação da quantidade disponível e estão associados a uma elevada morbidade, pois exigem cirurgias adicionais. No Homem, é frequente utilizar tecido ósseo da crista ilíaca para reparar um defeito ósseo com outra localização no mesmo indivíduo.

As limitações associadas à quantidade de tecido a transplantar podem ser ultrapassadas utilizando aloenxertos ou xenoenxertos. Nos aloenxertos, o transplante ocorre entre dadores da mesma espécie e no caso dos xenoenxertos, entre espécies diferentes [8]. Além dos problemas de imunogenicidade, a principal desvantagem destes dois tipos de enxertos (principalmente com os xenógenos) prende-se com o risco de transmissão de doenças. Os aloenxertos humanos são habitualmente preparados em ambiente hospitalar e preservados em bancos de ossos. Tal como estes

enxertos alógenos, os xenógenos também requerem uma preparação preliminar que envolve o processamento, conservação e esterilização destes tecidos. Embora estes tratamentos reduzam o risco de transmissão de elementos patogénicos, podem enfraquecer significativamente as propriedades biológicas e mecânicas dos materiais [7,9].

Em alternativa a estes tipos de enxerto, as opções baseadas em materiais, quer de origem natural, quer sintética, deverão ser criteriosamente seleccionadas de acordo com a sua aplicação. Neste contexto, as propriedades mecânicas dos materiais constituem factores de escolha muito relevantes. Verifica-se que é bastante frequente encontrar combinações de materiais que tentam mimetizar as características da matriz óssea, tanto no aspecto da composição química, como relativamente a vários níveis de organização estrutural. No entanto, essa semelhança não é um requisito imprescindível para que os materiais possam servir como enxerto ósseo, como se demonstra com os exemplos apresentados na tabela 1.1.

Com efeito, para que se considere como adequado para enxertos ósseos, o material tem que ser biocompatível e osteocondutor e, preferencialmente, deverá poder ser reabsorvido e possuir propriedades osteoindutivas. Esta capacidade de induzir a formação de novo tecido ósseo constitui um grande desafio que, no desenvolvimento de novos materiais, tem levado à crescente introdução de modificações que potenciem a interacção do enxerto com o meio biológico circundante, melhorando a capacidade de osteointegração. Estas modificações incluem alterações na composição e estrutura do material e, em especial, da sua superfície. Também é comum o recurso à introdução de células e de factores de crescimento específicos. A melhoria dos métodos de aplicação dos enxertos, que se pretende que seja cada vez menos invasiva, tem também contribuído para o surgimento de diversas alternativas aos “tradicionais” blocos de tecido ósseo. Assim, hoje em dia já é possível ter acesso a enxertos na forma de partículas sólidas e fibras, assim como na forma de pastas moldáveis e produtos injectáveis [6,10]. Importa ainda referir que os materiais de origem sintética são frequentemente preferidos relativamente aos de origem natural, sobretudo por motivos de controlo de qualidade e por geralmente possuírem uma melhor relação custo/benefício.

Tabela 1.1 - Classes de materiais utilizados como substitutos ósseos: alguns exemplos de materiais e principais propriedades constituindo vantagens ou inconvenientes para determinadas aplicações [Adaptado de [8]]:

Material	Vantagens	Desvantagens	Aplicações	Exemplos
Metais e ligas	<ul style="list-style-type: none"> - Muito forte; - Resistente; - Dúctil. 	<ul style="list-style-type: none"> - Denso; - Pode corroer. 	Placas ósseas, implantes de osso sujeitos a carga, arcos e braquetes dentais	Titânio, aço inoxidável, ligas de Titânio e Cobalto-Crômio
Cerâmicos	<ul style="list-style-type: none"> - Bioativos; - Reabsorvível; - Alta resistência ao desgaste. 	<ul style="list-style-type: none"> - Frágil; - Tração pobre; - Resistência baixa; - Falta de resiliência. 	Engenharia de tecido ósseo, reconstrução maxilo-facial, preenchimento ósseo, revestimento de bio-implantes	Alumina, zircônia, HA, Vidros bioativos, TCP
Polímeros	<ul style="list-style-type: none"> - Flexível; - Resiliente; - Superfícies modificáveis; - Selecção de grupos funcionais. 	<ul style="list-style-type: none"> - Não é forte; - Alguns produtos de degradação podem ser tóxicos. 	Scaffolds de tecido ósseo, placas ósseas, preenchimento ósseo e dentário, libertação de fármacos no osso	PLA, PGA, PLGA, PCL, PMMA, PE, colagénio, gelatina, quitosano, alginato.
Compósitos	<ul style="list-style-type: none"> - Forte; - Flexibilidade de design. 	Propriedades podem ser alteradas consoante a metodologia de fabricação	Substitutos ósseos, scaffolds de tecido ósseo, membranas de regeneração óssea, libertação de fármacos no osso	HA/colagénio, HA/gelatina, HA/quitosano, HA/alginato, HA/PLGA, HA/PLLA, HA/PE
Nanocompósitos	<ul style="list-style-type: none"> - Maior área de superfície; - Reactividade elevada à superfície; - Forte ligação-interfacial; - Flexibilidade de design. 	Nenhuma técnica optimizado para o processamento do material	Principais áreas de ortopedia, engenharia de tecidos, e entrega de fármacos	Nano-HA/colagénio Nano-HA/gelatina Nano-HA/quitosano Nano-HA/PLLA

1.3. Sistemas de libertação controlada de fármacos

Para administrar um fármaco, as formulações comumente usadas são os comprimidos, cápsulas ou injeções. No entanto, estas formulações convencionais implicam uma elevada concentração do fármaco no momento da libertação e apenas uma pequena dose do fármaco alcança o local pretendido, sendo por isso necessária a administração de dosagens maiores do que as requeridas para que se atinja o efeito terapêutico desejado. Ao invés das formulações tradicionais, os sistemas de libertação controlada (SLC) permitem a libertação gradual e prolongada do fármaco e / ou a entrega deste no local específico em que deve actuar, maximizando desta forma o seu benefício clínico e diminuindo simultaneamente o seus efeitos adversos.

A maior vantagem inerente ao desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos pode ser perceptível pela visualização da Figura 1.3, uma vez que ilustra as alterações nos níveis de plasma sanguíneo por métodos convencionais de multidosagem e com um SLC [11,12].

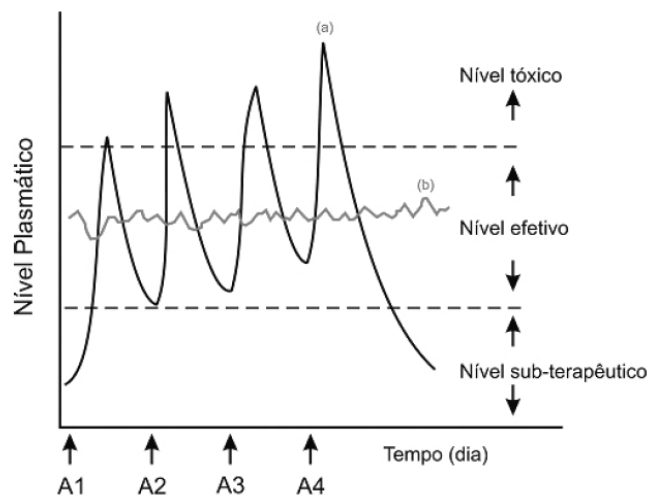


Figura 1.3 - Comparação entre a administração de fármacos por métodos convencionais de multidosagem (a) e sistemas de libertação controlada (b), sendo A a administração do fármaco [imagem retirada de [11]].

Nos SLC podemos verificar que a libertação do fármaco é prolongada, não sendo necessárias administrações tão frequentes comparativamente às formas convencionais, onde se visualiza um pico máximo seguido de um decréscimo quando o fármaco é excretado e /ou metabolizado. Também é possível visualizar que acima de

uma determinada concentração os efeitos do fármaco são indesejáveis, podendo ser uma fonte de toxicidade, e que abaixo de determinadas concentrações não é eficaz. A diferença entre estas duas concentrações é conhecido como índice terapêutico [11,12].

Vários sistemas de libertação controlada de fármacos têm sido propostos e desenvolvidos. Estes têm como base, normalmente, materiais poliméricos, inorgânicos ou lipídicos.

Os polímeros, pela sua composição e propriedades que apresentam, são a classe de materiais mais explorada para o desenvolvimento de SLC. No entanto, para que se possa recorrer ao uso destes materiais na área da biomedicina é necessário que satisfaçam alguns requisitos.

Assim, os materiais poliméricos devem ser biocompatíveis, não devem produzir produtos tóxicos nem induzir reacções alérgicas, e as suas propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, bem como a forma como se degradam (biodegradável / não biodegradável), são importantes aquando da sua selecção.

Uma das formas de classificar os SLC preparados a partir de materiais poliméricos é a divisão em sistemas não-biodegradáveis ou biodegradáveis

O mecanismo que gere a libertação do fármaco é uma outra forma de os classificar, surgindo assim três categorias. Os mais comuns são os sistemas de libertação por difusão, que podem ser subdivididos em sistemas de reservatório e sistemas matriciais. Existem também os sistemas de libertação activados pelo solvente, também estes subdivididos em sistemas de libertação controlados pela pressão osmótica e sistemas controlados pela absorção de água. E por último, os sistemas de libertação controlados quimicamente, podendo ser sistemas de cadeias pendentes e sistemas biodegradáveis [14,15].

Tanto os polímeros naturais e seus derivados, bem como os polímeros sintéticos, são muito utilizados na produção de SLC. E se por um lado, nos polímeros sintéticos facilmente se controlam as propriedades físico-químicas, dos polímeros naturais temos conhecimento da sua alta biodegradabilidade e biocompatibilidade [14].

A pectina e o quitosano são exemplos de dois polímeros naturais, pertencentes à classe dos polissacarídeos, que foram usados neste estudo. A capacidade de gelificar em certas condições físicas e químicas, a facilidade de processamento destes nas mais diversas formas, a não toxicidade, a mucoadesividade, a disponibilidade de um grande número de grupos funcionais, entre outras características, tornam estes polímeros bastante atractivos para o desenvolvimento de um grande número de SLC [16].

1.4. Sistemas de libertação local de antibióticos para aplicações em ortopedia

1.4.1. Estado da arte

Sendo o osso já por si um órgão pobremente perfundido, em condições normais, uma situação de infecção implica uma diminuição da circulação sanguínea na área afectada. Isto faz com que a biodisponibilidade de um antibiótico no local do osso infectado seja muito diminuta, quando o antibiótico é administrado por uma via sistémica. Como tal, e para atingir concentrações terapêuticas na região óssea afectada, é necessária a administração sistémica de doses elevadas de antibiótico, por períodos prolongados, o que pode culminar em efeitos colaterais graves. Por exemplo, para o tratamento da osteomeolite com o antibiótico Ceftriaxona é aconselhada a administração de 2g diárias deste antibiótico por via intravenosa, por um período de 4 a 6 semanas [13,17].

O recurso a sistemas de libertação localizada de antibióticos (SLLA) tem demonstrado eficácia e inúmeras vantagens que colmatam as desvantagens dos métodos tradicionais da administração sistémica de antibióticos. Estes, por propiciarem uma libertação local e controlada do antibiótico apresentam uma maior eficácia terapêutica ao mesmo tempo que eliminam os riscos de uma toxicidade sistémica provocada pela administração de elevadas doses de antibiótico [15,18]. Na Tabela 1.2 é possível ver alguns exemplos de SLLA para aplicações ortopédicas já desenvolvidos.

Tabela 1.2 - Exemplos de alguns sistemas de libertação local de antibióticos para aplicações em ortopedia referidos na literatura [Adaptado [13]].

Sistema Transportador	Antibiótico Libertado
Não - Biodegradável	
Acrylic bone cement	Oxacilina,cefazolina, gentamicina, cefalosporinas
Cement of BIS-GMA / TEGDMA resin	Cefalexina
Polymethylmethacrylate (PMMA) beads	Gentamicina, Vancomicina, tazocin Vancomicina
Polymethylmethacrylate (PMMA) cement	
Biodegradável	
Collagen-gentamicin sponge	Gentamicina
Hydroxyapatite blocks	Vancomicina, gentamicina, arbecacina
Hydroxyapatite cement	Vancomicina
Nano-HA-PHBV/PEG-GM microsphere	Gentamicina Ciprofloxacina
Bone cement	Gentamicina
Hydroxyapatite- β -tricalciumphosphate composite	Cefazolina
Bioglass reinforced plaster of Paris, hydroxyapatite and sodium alginate	Gentamicina,ciprofloxacina,vancomicina,tobramicina,fusidatede sódio
Poly lactide and / or polyglycolide implants	

Em ortopedia, e a nível clínico, o polimetacrilato de metilo (PMMA) é o material mais utilizado como SLLA. O PMMA é um polímero sintético, biocompatível e não biodegradável. Este ficou famoso em ortopedia devido aos irmãos *Judet* que foram pioneiros em próteses da anca, que eram feitas com PMMA tratado termicamente [19].

A incorporação de antibióticos em cimentos de PMMA tem sido amplamente utilizada na profilaxia e tratamento de infecções ósseas. O inconveniente do seu uso recai na necessidade de utilizar antibióticos que se mantenham estáveis com o calor e no facto de ser necessária a sua remoção [20,21]. A gentamicina é um exemplo de um antibiótico que tem sido incorporado com sucesso em cimentos de PMMA [22].

Apesar do esforço feito para desenvolver sistemas de libertação local de antibióticos com materiais biodegradáveis, estes ainda não substituem, ao nível da prática clínica, o uso de SLLA à base de PMMA.

A utilização de enxertos derivados de tecido ósseo, que actuem simultaneamente como substitutos ósseos e SLLA, é uma estratégia muito promissora mas ainda pouco explorada.

Na literatura, ainda são escassos os estudos que utilizam enxertos de osso impregnados com antibióticos para prevenção e tratamento de infecções. Em geral, nos estudos disponíveis, verifica-se que o antibiótico impregnado no enxerto é libertado mais rapidamente do que idealmente se pretende [21,23-28].

Mathijssen et al. investigaram a impregnação de enxertos ósseos e o efeito de diferentes temperaturas no seu armazenamento, mostraram que estes podem ser impregnados com antibióticos antes de serem armazenados num banco ósseo. Desta forma, tornam uma possível cirurgia mais fácil, mais segura e menos demorada, uma vez que não há necessidade de adicionar os antibióticos durante o procedimento [27].

Com este trabalho, e tal como já foi referido, pretende-se colmatar a rápida libertação do antibiótico, prolongando dessa forma o seu efeito por um maior período de tempo. Para isso é necessário testar outros meios de imobilizar o antibiótico no osso sem ser por mera impregnação, como por exemplo, a ligação covalente do antibiótico ao osso e o recurso a micropartículas impregnadas com antibiótico.

Já no decorrer do desenvolvimento deste trabalho, foram publicados dois trabalhos de *Ketonis C. et al.* que promoveram a ligação covalente do antibiótico ao osso, apresentando resultados promissores para evitar a formação de camada bacteriana à superfície do enxerto ósseo [29,30].

1.4.2. Estratégias

Existem diversas técnicas que permitem a imobilização dos fármacos nos SLC, podendo estes ser imobilizados quimicamente ou através de métodos físicos. No decorrer deste trabalho recorreu-se essencialmente à ligação covalente dos

antibióticos a grupos funcionais disponíveis à superfície do osso, uma vez que, teoricamente, esta estratégia pode proporcionar a estes enxertos propriedades bactericidas por maiores períodos de tempo. Utilizou-se também o encapsulamento, onde o antibiótico é imobilizado por oclusão no interior de uma matriz polimérica [18].

Seguidamente, apresenta-se uma explicação sucinta das técnicas seleccionadas para serem efectuadas no decorrer do trabalho. Esta selecção teve como base a experiência acumulada pelo grupo de investigação do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra.

1.4.2.1. Polielectrólitos e complexos polielectrolíticos

Os polielectrólitos são macromoléculas ou polímeros solúveis em água com uma grande quantidade de grupos ionizáveis. Dois polielectrólitos com grupos ionizáveis de carga oposta, quando em solução, e em condições que permitam a ionização parcial ou total, interagem entre si, formando os chamados complexos polielectrolíticos (PECs). Um exemplo de dois polielectrólitos de carga oposta que interagem entre si são os polissacarídeos quitosano (um policatião), que possui grupos amina, e a pectina (um polianião), com grupos carboxílicos (Figura 1.4). Numa gama de pHs situada entre o pKa da pectina e o pKa do quitosano, a maioria dos grupos amina do quitosano e dos grupos carboxílicos da pectina encontram-se ionizados, levando a que, devido às interacções electrostáticas, os dois polissacarídeos complexem entre si, formando os designados PECs.

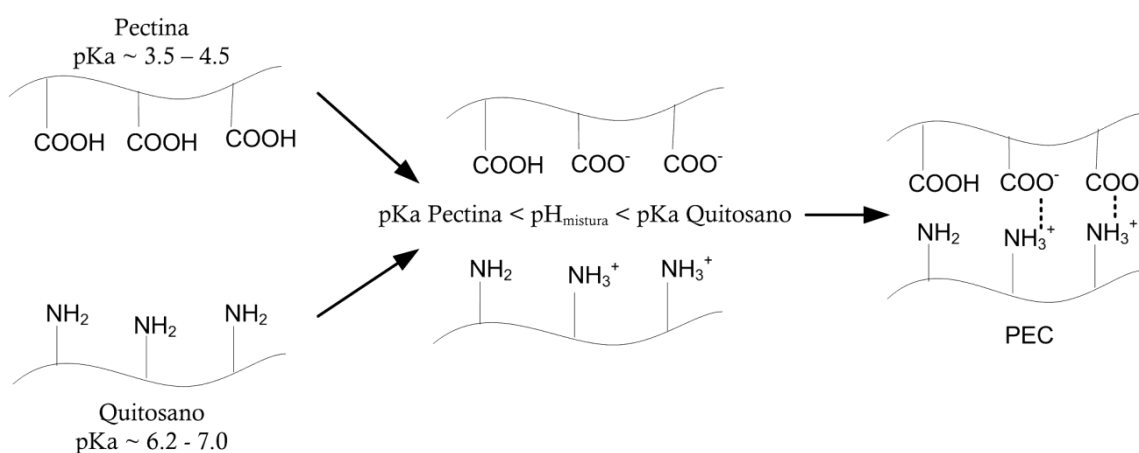


Figura 1.4 - Esquema da formação dos complexos polielectrolíticos (PECs) entre a pectina e o quitosano [imagem retirada de [14]].

De um modo geral, e quando se misturam os dois polieletrólitos numa solução, a formação dos PECs pode ser dividida em três etapas, esquematizadas na Figura 1.5 [14]:

(i) Primeiramente, há a formação de um complexo primário desordenado após a formação de complexos entre as cadeias de um polianião e de um policatião, determinada por forças electrostáticas de Coulomb (Figura 1.5 a));

(ii) Seguidamente, pode ocorrer uma reestruturação do complexo primário desordenado surgindo assim um complexo secundário ordenado (Figurado 1.5 b));

(iii) Por último ocorre a agregação entre os complexos. Nesta etapa estão envolvidas interacções intermoleculares (Figura 1.5 c)).

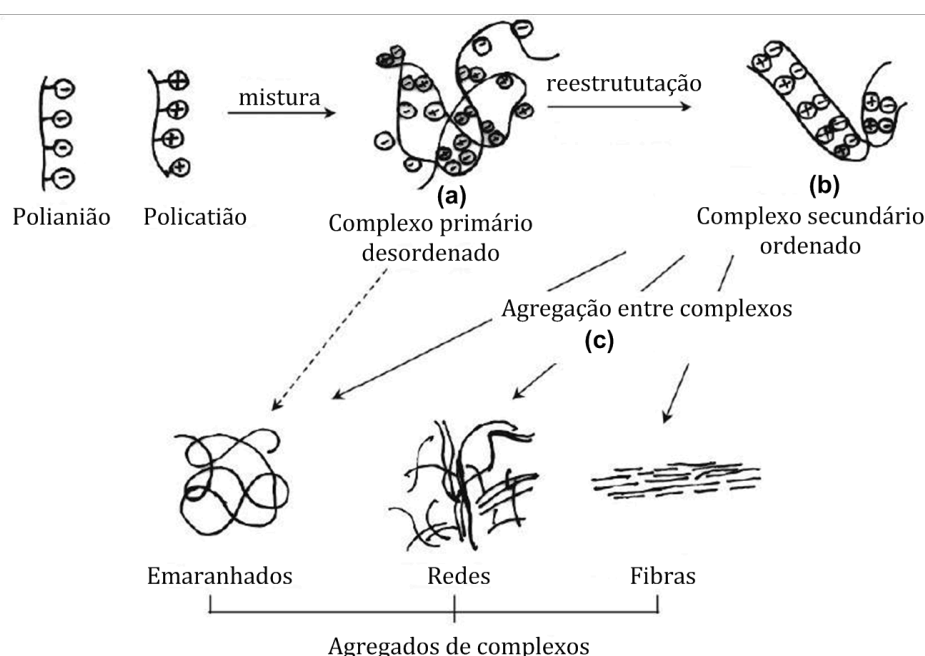


Figura 1.5 - Representação esquemática das etapas que levam à formação dos PECs [imagem retirada de [14]].

A interacção entre dois polieletrólitos em solução resulta normalmente na formação de partículas, que poderão ser isoladas da fase aquosa através de um processo de separação, como a centrifugação ou a filtração.

Actualmente existe um grande interesse na utilização de polieletrólitos no revestimento de superfícies: através da deposição alternada de camadas de polieletrólitos de carga oposta sobre um substrato, é possível formar com base nas interacções electrostáticas, filmes de espessura ultra fina e com propriedades muito

específicas. Um esquema da formação destes filmes, designados por filmes de multicamadas de polielectrólitos (*polyelectrolyte multilayer films*) é apresentado na Figura 1.6.

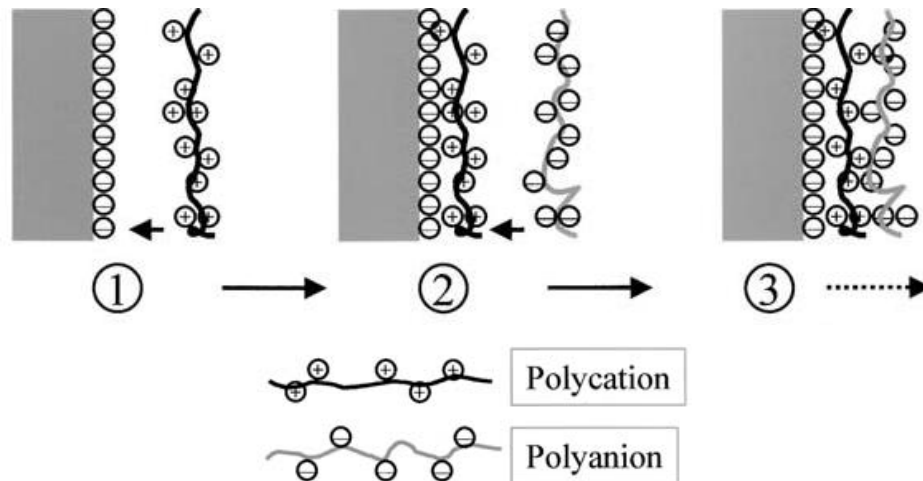


Figura 1.6 - Esquema da formação de um filme de multicamadas de polielectrólitos [Imagem retirada de [31]].

Existem duas técnicas que permitem a construção de filmes de multicamadas de polielectrólitos. A mais utilizada consiste em mergulhar o substrato a revestir, alternadamente, em duas soluções: uma contendo o polícatião e outra o polianião.

Na outra técnica, utilizada neste trabalho, recorre-se a um aparelho de *spin coating* para a deposição das camadas de polielectrólitos. Esta técnica envolve a deposição, sobre a superfície de um substrato plano, de algumas gotas da solução de um dos polielectrólitos. O substrato é então girado no aparelho de *spin coating* a uma velocidade elevada e, devido à força centrífuga, a solução do polielectrólito é espalhada pela superfície (Figura 1.7). Repetindo este processo utilizando as soluções do policatião e do polianião alternadamente, forma-se o filme de multicamadas de polielectrólitos [38].

Nestes tipos de filmes é possível incorporar, durante a sua formação ou posteriormente, vários agentes bioactivos, construindo-se assim revestimentos com a capacidade de actuarem como sistemas de libertação controlada. Esta estratégia tem sido investigada para criar revestimentos bioactivos em próteses metálicas destinadas a aplicações ortopédicas. Analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos e factores de

crescimento são exemplos de alguns tipos de agentes bioactivos já incorporados neste tipo de revestimentos [31-37].

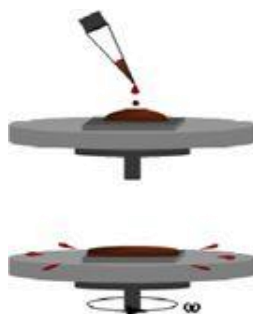


Figura 1.7 - Técnica de *Spin Coating* [imagem retirada de [38]].

1.4.2.2. Micropartículas

A utilização de partículas enquanto veículos para a libertação controlada de fármacos, especialmente nano e micropartículas poliméricas, é e tem sido alvo de muita investigação.

As micropartículas (MP) são partículas com dimensões compreendidas entre 1 a 1000 μ m, sólidas e comumente esféricas. Podem ser constituídas por uma matriz polimérica maciça na qual o fármaco está incorporado (microesferas) ou por uma membrana polimérica com fármaco encapsulado no seu interior (microcápsulas) [14, 15, 39].

Existem características muito importantes nas micropartículas que as tornam aplicáveis no tratamento de diversas patologias, nomeadamente o facto de ser possível obter uma libertação controlada de agentes bioactivos, estando inerente uma baixa toxicidade e a actuação em locais específicos [39,40]. As micropartículas são preferíveis em algumas aplicações porque permanecem maioritariamente concentradas no local de administração. O mesmo não acontece por exemplo com as nanopartículas, que facilmente conseguem penetrar na corrente sanguínea [14].

A técnica de extracção /evaporação do solvente numa emulsão óleo/água é comumente usada para imobilizar compostos em nano e micropartículas, sendo possível utilizar vários tipos de emulsões consoante a natureza hidrofóbica ou hidrofílica do agente bioactivo a imobilizar. A escolha do método ideal tem portanto como base as características de solubilidade do fármaco, para que desta forma haja uma maximização da eficiência de encapsulação [14, 41].

Para agentes bioactivos hidrofóbicos, insolúveis ou pouco solúveis em água, o método mais utilizado é uma emulsão óleo-água (O/W). Este método é composto por quatro grandes etapas (Figura 1.8) [42,43]:

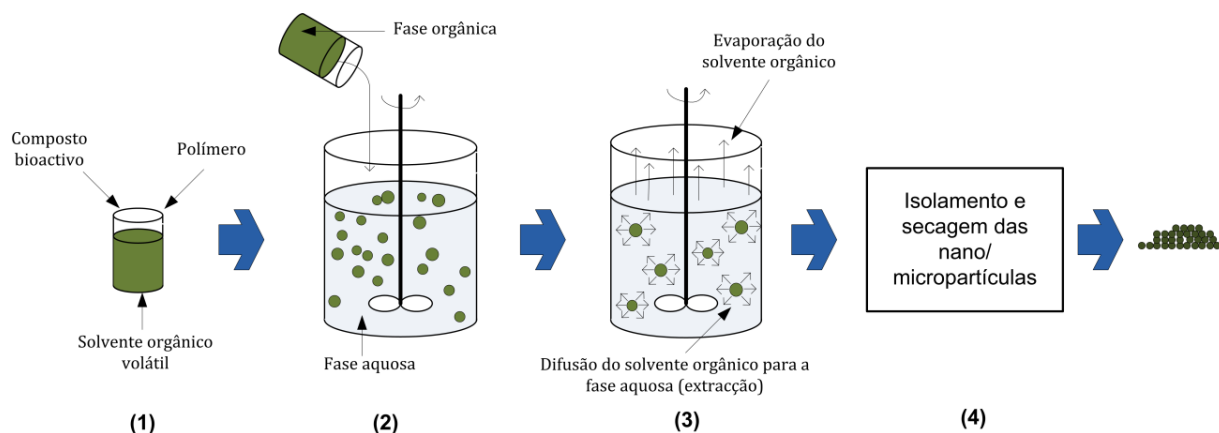


Figura 1.8 - Esquema representativo do método extração / evaporação do solvente numa emulsão óleo / água [Imagem retirada de [14]].

- (1) Dissolução do agente bioactivo hidrofóbico e do polímero num solvente orgânico;
- (2) Emulsificação da fase orgânica (fase dispersa), numa fase aquosa (fase contínua);
- (3) Extração do solvente orgânico da fase dispersa para a fase contínua, acompanhado por evaporação do solvente, transformando gotículas da fase dispersa em partículas sólidas;
- (4) Recuperação e secagem das microesferas para eliminar o solvente residual.

Relativamente aos agentes bioactivos hidrofílicos, há outros métodos para fazer o encapsulamento eficazmente, uma vez que estes agentes bioactivos hidrofílicos não podem ser dissolvidos no solvente orgânico para evitar que se difundam para a fase contínua durante a emulsão [43].

Existem quatro métodos alternativos que tornam possível a encapsulação, são eles [43,44]:

- **Dupla emulsão (W/O/W)**: a solução aquosa do agente bioactivo hidrofílico é emulsionada numa fase orgânica que contém o polímero dissolvido (emulsão W/O). Esta emulsão é então dispersa numa segunda solução aquosa formando uma segunda

emulsão (dupla emulsão – W/O/W). Aquando da evaporação do solvente orgânico formam-se as micropartículas;

- **Co-solvente (O/W):** quando o agente bioactivo não é solúvel no principal solvente orgânico, um segundo solvente, chamado co-solvente, é necessário para o dissolver;

- **Emulsão sólido-óleo-água (S/O/W):** o agente bioactivo está disperso na forma de pó sólido na solução de polímero e solvente orgânico;

- **Emulsão óleo-óleo (O/O):** a fase aquosa é substituída por óleo.

No nosso trabalho o método escolhido para encapsular a Ceftriaxona em micropartículas de poli(ácido láctico) foi o método da extracção/evaporação do solvente numa dupla emulsão água/óleo/água.

No início do próximo capítulo (Capítulo 2) introduz-se, de forma sucinta, todas as diferentes estratégias adoptadas para desenvolver os sistemas de libertação de antibióticos apresentados neste trabalho. Ainda nesta secção, são apresentados os materiais utilizados na construção dos sistemas de libertação preparados (matriz óssea, pectina, quitosano e poli(ácido láctico) e o antibiótico imobilizado (Ceftriaxona). Este Capítulo termina com uma pequena apresentação das várias técnicas e métodos analíticos utilizados para caracterizar os vários sistemas desenvolvidos.

Nos Capítulos 3 e 4 descrevem-se os diferentes procedimentos experimentais utilizados para preparar os vários sistemas de libertação e apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos.

Finalmente, no Capítulo 5, apresentam-se as conclusões sobre o trabalho realizado.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

Este capítulo inicia-se pela apresentação de um resumo das diferentes estratégias adoptadas para a imobilização do antibiótico nas amostras de osso. Seguidamente apresentam-se as características dos materiais utilizados designadamente a matéria-prima de base - matriz óssea bovina - e sua preparação, os diversos compostos usados na produção dos sistemas de libertação estudados, incluindo o antibiótico, a Ceftriaxona. As técnicas usadas na caracterização das amostras produzidas bem como as condições de operação serão também aqui abordadas.

De salientar que a metodologia de preparação dos vários sistemas de libertação produzidos será descrita nos capítulos subsequentes, aquando da apresentação dos respectivos resultados. Com efeito, dado que foram utilizadas estratégias muito diferentes que, por sua vez, implicam distintos procedimentos, julgou-se ser mais conveniente apresentar em capítulos separados (Capítulos 3 e 4), tantos os resultados como a correspondente parte experimental.

2.1. Estratégia experimental

Como se referiu, o objectivo último deste trabalho foi preparar um sistema de libertação controlada baseado na matriz óssea. Idealmente um sistema de libertação local de antibióticos para aplicações ortopédicas deverá ter a capacidade de libertar, imediatamente após ser colocado no local de acção, uma elevada quantidade de antibiótico, de forma a contrariar o risco acrescido de infecção que se segue após a cirurgia. A esta fase inicial deve seguir-se uma libertação gradual, por um período de várias semanas (4 a 6 semanas), a uma taxa que assegure que a concentração do antibiótico nos tecidos alvo seja permanentemente superior à concentração inibitória

mínima do antibiótico. No final, todo o antibiótico imobilizado no sistema deverá ter sido libertado.

Para tal foram exploradas e adoptadas distintas metodologias de imobilização do antibiótico, apresentadas de forma resumida na Figura 2.1.



Figura 2.1 - Esquema dos diferentes sistemas de libertação local do antibiótico desenvolvidos no presente trabalho.

Numa primeira abordagem tentou ligar-se a Ceftriaxona covalentemente à superfície do osso: primeiro directamente e depois através da pectina, que se ligou primeiramente à matriz óssea, ligando-se posteriormente o antibiótico à pectina.

Seguidamente, e com o intuito de prolongar a libertação do fármaco, utilizou-se uma metodologia alternativa, que consistiu no revestimento da superfície do osso com camadas alternadas de pectina e quitosano, que já haviam sido impregnadas com antibiótico. Estes polissacarídeos (pectina e quitosano) foram seleccionados pelas características que apresentam, nomeadamente na formação de complexos polielectrolíticos.

Um último conjunto de experiências consistiu na formação de matrizes compósitas de polímeros com partículas de osso, onde o antibiótico foi incorporado de diferentes formas: disperso fisicamente na matriz-compósito; ligado covalentemente a

um dos polímeros da fase polimérica; e encapsulado em micropartículas de poli(ácido-láctico). Esta última estratégia pretendeu utilizar o *know-how* acumulado nesta área pelo grupo de investigação onde se insere este trabalho.

2.2. Matéria-prima: matriz óssea de origem bovina

No presente trabalho foi utilizada matriz óssea de origem bovina, neste caso um fémur de vaca, com as epífises parcialmente cortadas, o qual foi fornecido por um talhante local. O osso foi fervido durante cerca de uma hora de forma a facilitar a remoção dos restos de tecidos moles e a medula óssea. Depois de limpo, o osso foi mergulhado numa solução de 0,1M de hidróxido de sódio durante cerca de quinze dias e, em seguida, em etanol a 96% durante mais quinze dias. Após este primeiro tratamento foram preparadas placas do osso cortical e a parte esponjosa foi reduzida a grânulos.

Para obter amostras na forma de placas, a diáfise foi cortada transversalmente, com uma serra manual, de modo a obter lâminas com uma espessura de cerca de 3 mm. Estas foram posteriormente polidas com papel de polimento e cortadas em pequenos quadrados de 1 cm × 1cm com uma espessura de aproximadamente 2,5 mm (Figura 2.2 b)). O polimento foi efectuado para obter uma superfície lisa, de forma a ser possível obter os espectros de FTIR-ATR (nesta técnica, o cristal reflector tem de contactar intimamente com a superfície da amostra. No caso de uma amostra rígida, como é o caso do osso, só uma superfície lisa permitirá esse bom contacto).

Algumas destas placas foram sujeitas a um processo de desmineralização superficial (remoção superficial da parte inorgânica) na tentativa de melhor expor os grupos funcionais do colagénio o que, em princípio, facilitaria a ligação do antibiótico. Para isso, 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 só se pretendia a desmineralização da superfície. No final as placas foram lavadas abundantemente com água destilada e secas à temperatura ambiente.



Figura 2.2 - Amostras de osso bovino preparadas no laboratório na forma de a) partículas de osso esponjoso; b) placas de osso cortical.

Na Figura 2.3 são apresentados os espectros FTIR-ATR (obtidos em condições que se descrevem mais adiante) dos dois tipos de amostras: desmineralizada superficialmente e não desmineralizada.

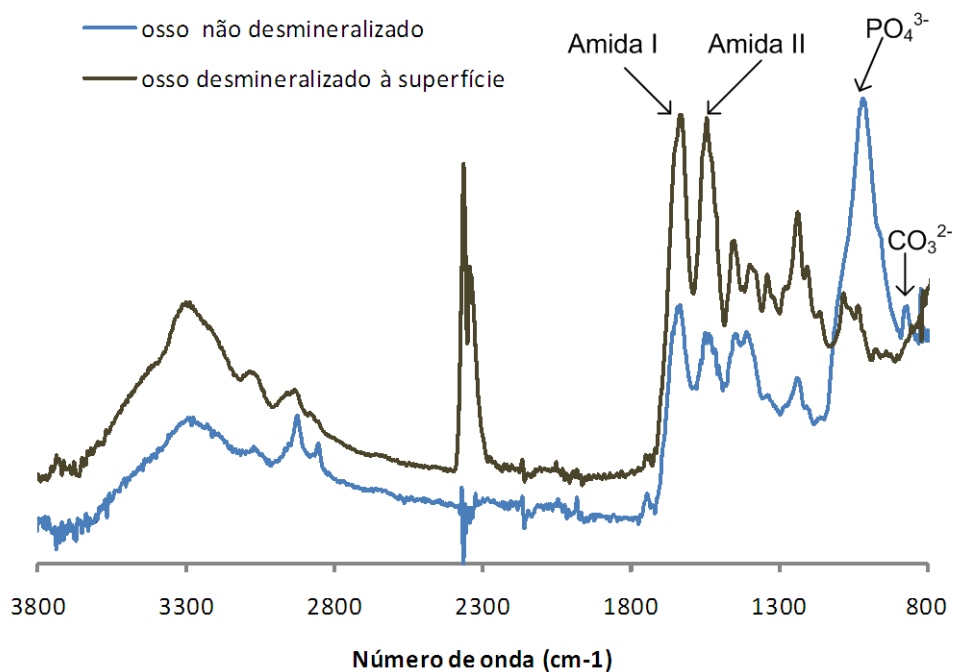


Figura 2.3 - Espectros FTIR-ATR do osso desmineralizado à superfície e do osso não desmineralizado.

Para o osso “tal qual”, ou seja, não desmineralizado, é possível, de acordo com a literatura, identificar os picos de Amida I e II do colagénio, por volta dos 1660 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} , e os picos correspondentes aos iões PO_4^{3-} e CO_3^{2-} da hidroxiapatite por volta dos $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ e 873 cm^{-1} respectivamente [46,47].

As diferenças nos dois espectros confirmam a desmineralização do osso à superfície, uma vez que no espectro do osso não desmineralizado é possível observar os picos a cerca de 1004cm^{-1} (fosfato) e 861cm^{-1} (carbonato) que correspondem às vibrações dos iões fosfato e carbonato, os quais não são visíveis no espectro do osso desmineralizado. Além disso, as bandas amida, a 1662cm^{-1} e 1538cm^{-1} , no espectro do osso desmineralizado tornaram-se mais intensas pois o colagénio é dominante.

Quanto às partículas de osso esponjoso, estas foram obtidas com a ajuda de um escopro e martelo, o que permitiu retirar pequenas lascas as quais foram moídas num moinho de café. As partículas assim obtidas foram em seguida mergulhadas em acetona durante um dia, de forma a extrair a gordura que ainda se encontrava nos poros, e em seguida secas ao ar. Finalmente, foram separadas por tamanhos ($d < 0,5$ mm; $0,5\text{mm} < d < 1$ mm; $1\text{ mm} < d < 2,5$ mm; $d > 2,5$ mm) através da peneiração (Figura 2.2 a)).

2.3. Antibiótico: Ceftriaxona

Como já foi referido anteriormente, o antibiótico utilizado neste trabalho é a Ceftriaxona na forma sódica (CFX). A Ceftriaxona é um antibiótico beta-lactâmico, do grupo das cefalosporinas de terceira geração, que apresenta um espectro de actividade muito mais alargado para bactérias *gram* negativas quando comparada com as cefalosporinas de primeira e segunda geração, embora muito menos activo que as de quarta geração [48-51]. Existem vários tipos de cefalosporinas, residindo a sua diferença nos radicais R1 e R2 (Figura 2.4) [51]. A sua acção bactericida é atribuída principalmente à inibição dos mucopeptídeos na parede celular bacteriana [48,52].

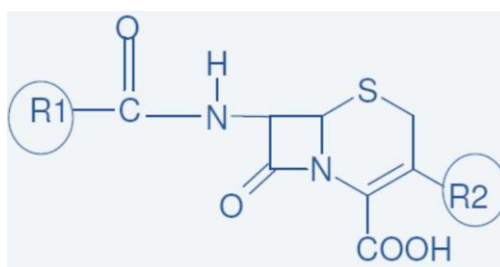


Figura 2.4 - Estrutura geral das cefalosporinas [imagem retirada de [51]].

Este antibiótico é utilizado com regularidade a nível clínico na profilaxia e tratamento de infecções ósseas [53].

A fórmula química da molécula de Ceftriaxona é $C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$, o que lhe confere um peso molecular de aproximadamente $554.53 \text{ g mol}^{-1}$ (Figura 2.5) [54].

O pH de uma solução de Ceftriaxona sódica (10mg/ml) em soro fisiológico foi considerado 5.7 e, o valor deste poderá influenciar a solubilidade do antibiótico. À temperatura ambiente, 25°C , a Ceftriaxona é facilmente solúvel em água, frugalmente solúvel em metanol e pouco solúvel em etanol [54].

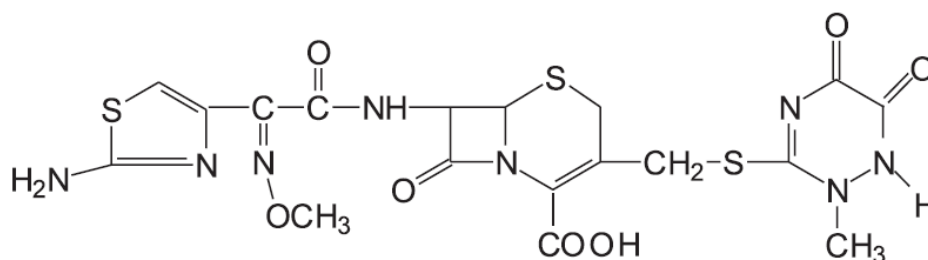


Figura 2.5 - Estrutura da Ceftriaxona [Imagem retirada de [54]].

A Ceftriaxona, na forma de pó, deve ser armazenada a uma temperatura igual ou inferior à temperatura ambiente (25°C) e protegida da luz. A Ceftriaxona, como a grande parte das cefalosporinas, degrada-se rapidamente quando em solução. Assim esta é normalmente comercializada em forma de pó em conjunto com uma solução diluente, sendo a solução de Ceftriaxona preparada imediatamente antes de ser injectada [54]. Na Tabela 2.1 é possível ver alguns exemplos da estabilidade de soluções de Ceftriaxona sódica para uso intramuscular.

Tabela 2.1 - Exemplos da estabilidade de soluções de Ceftriaxona sódica [Adaptado [54]].

Diluyente usado	Concentração (mg/mL)	Condições de armazenamento	
		Temperatura ambiente (25°C)	No frigorífico (4°C)
Água esterilizada para injeção	100	3 Dias	10 Dias
0,9 % de NaCl	250	24 Horas	3 Dias
5% Solução dextrose	100	3 Dias	10 Dias

Seguidamente, na Figura 2.6, é apresentado o espectro FTIR obtido para a Ceftriaxona através de pastilhas de KBr. E na Tabela 2.2 são indicadas as atribuições das respectivas bandas publicadas na literatura [54].

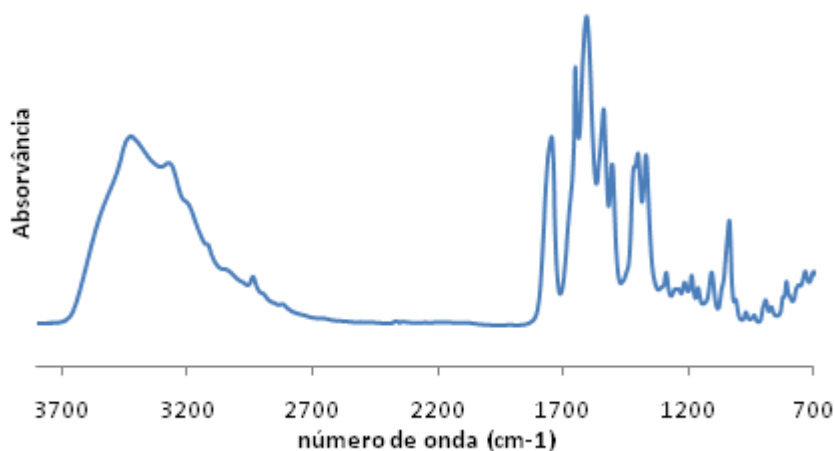


Figura 2.6 - Espectro FTIR da Ceftriaxona através de pastilhas de KBr.

Tabela 2.2 - Atribuição das bandas nos espectros de FTIR da Ceftriaxona [Adaptado [54]].

Número de onda (cm ⁻¹) publicado na literatura	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3530-3570	3454-3294	ν N-H no grupo amida
2948	2927	ν do grupo CH no anel β-lactâmico
1772	1740	ν C=O no anel β-lactâmico
1670	1621	ν C=O no grupo Amida
1650-1550	1600	ν _{as} do carboxilato
1570-1515	1534	ν da amida acíclica
1460	1498	δ CH ₃ no grupo CH ₃ O
1096	1031	ν C-O no grupo CH ₃ O

ν – alongamento; δ – deformação; s – simétrico; as – assimétrico

No espectro FTIR obtido para a Ceftriaxona é possível identificar algumas bandas e alguns picos:

- A banda situada na zona dos 3454cm⁻¹ e 3294cm⁻¹ corresponde às vibrações de alongamento no grupo amida;

- As vibrações de alongamento do grupo CH no anel β-lactâmico têm o seu pico a cerca de 2927cm⁻¹;

- A 1740cm^{-1} encontra-se a vibração de alongamento C=O no anel β -lactâmico;
- O pico situado a 1621cm^{-1} corresponderá a vibrações de alongamento C=O no grupo amida;
- No pico a 1600cm^{-1} encontram-se as vibrações de alongamento assimétricas do carboxilato;
- A 1534cm^{-1} está a vibração de alongamento da amida acíclica;
- A 1498cm^{-1} está a vibração de deformação CH_3 no grupo CH_3O ;
- Por último a cerca de 1031cm^{-1} está a vibração de alongamento C-O no grupo CH_3O .

Comparados os valores reportados na literatura (Tabela 2.2) com os observados no espectro obtido experimentalmente, verifica-se haver ligeiras diferenças, as quais se devem ao facto de, normalmente, os valores tabelados se referirem ao intervalo onde a banda é encontrada e não à sua posição central. Algumas divergências que se observam podem também ser atribuídas a limitações experimentais, designadamente pelas diferenças de contacto da amostra com o diamante na aquisição dos espectros, ou por discrepâncias na própria superfície da amostra. Deve ainda ter-se em conta que espectros obtidos por equipamentos diferentes também não são coincidentes.

2.4. Polímeros

2.4.1. Pectina

A pectina é um polissacarídeo que está presente na parede celular da maioria das plantas, desempenhando várias funções estruturais e funcionais. As moléculas de pectina são constituídas maioritariamente por resíduos de ácido D-galacturónico ligados entre si por uma ligação glicosídica $\alpha(1\rightarrow4)$ [14,16].

Na estrutura química da pectina (Figura 2.7), é possível visualizar alguns grupos funcionais - grupos carboxílicos (COOH), sendo que alguns deles estão parcialmente esterificados com o grupo metilo (COOCH₃) [14,16].

O grau de esterificação (GE) das pectinas, que corresponde à percentagem de grupos metilo, influencia muito as suas propriedades funcionais [14,16].

Comercialmente existem duas categorias de pectinas, baseadas no valor do grau de esterificação: as altamente metiladas (HMP) (GE>50%) e as pouco metiladas (LMP) (GE<50%) [55].

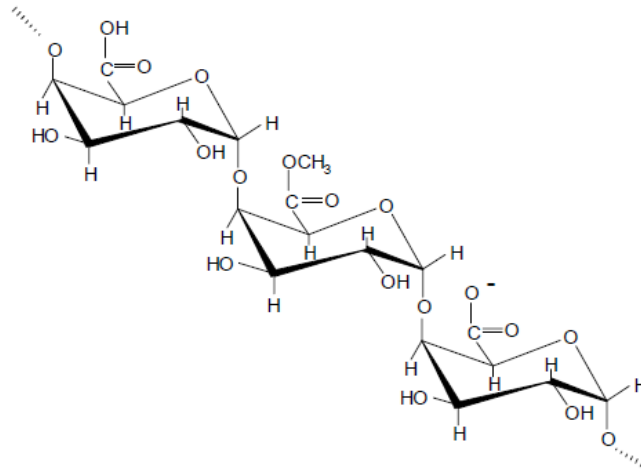


Figura 2.7- Estrutura química da pectina [imagem retirada de [55]].

No espectro FTIR-ATR obtido para a pectina e apresentado na Figura 2.8 é possível observar a cerca de 1725cm^{-1} , a vibração de alongamento do grupo C=O nos grupos carboxílicos não ionizados e esterificados com o grupo metilo, e ainda a vibração de alongamento assimétrica do grupo C=O nos grupos carboxílicos ionizados a 1601cm^{-1} [14,56].

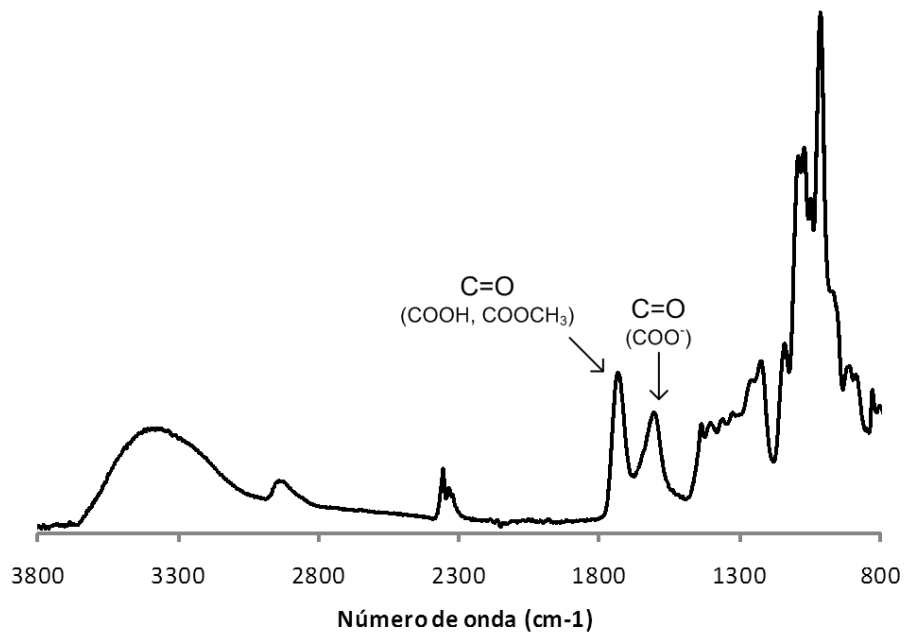


Figura 2.8 - Espectro FTIR-ATR obtido para a pectina.

2.4.2. Quitosano

A quitina, o polissacarídeo a partir do qual se obtém o quitosano, apesar de ter muitas potencialidades tem uma reduzida aplicação, devido à sua baixa solubilidade, quer em solventes aquosos quer em solventes orgânicos. Pelo contrário, o quitosano, obtido a partir da desacetilação da quitina em meio alcalino, é solúvel em soluções ácidas, sendo por isso muito mais utilizado do que a quitina [14,57].

O quitosano (Figura 2.9) é um polissacarídeo composto por duas subunidades: a D-glucosamina (unidade desacetilada) e a N-acetil-D-glucosamina (unidade acetilada) ligadas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ [16]. No quitosano, a fracção de grupos amina, ou grau de desacetilação (GD) é superior a 60% [14,58].

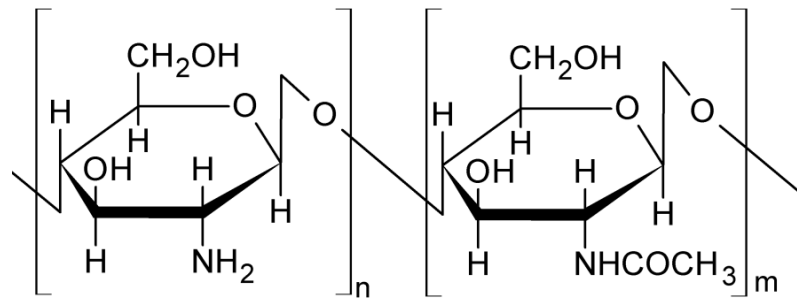


Figura 2.9 - Estrutura química do quitosano ($n>60$) [imagem retirada de [14].

No espectro FTIR-ATR do quitosano (Figura 2.10) são visíveis as duas bandas mais representativas. A primeira a cerca de 1629cm^{-1} devida à vibração de alongamento do grupo carbonilo dos grupos amida (Amida I), presentes nas unidades acetiladas deste polímero e, a segunda a 1570cm^{-1} , resultante da sobreposição das vibrações das ligações N-H e C-N do grupo amida (Amida II) e da vibração de deformação da ligação N-H das aminas primárias presentes nas unidades desacetiladas[14,59].

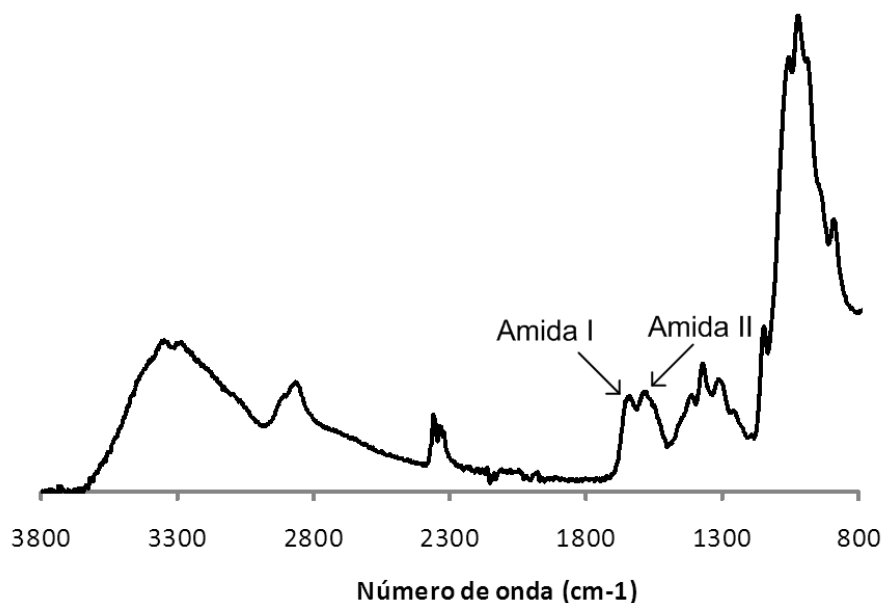


Figura 2.10 - Espectro FTIR-ATR obtido para o quitosano.

2.4.3. Poli(ácido láctico)

No que diz respeito à categoria dos polímeros biocompatíveis, o grupo dos polímeros poli(α -hidróxi ácidos) é bastante promissor, sendo o poli(ácido láctico), PLA, um exemplo desses polímeros [60].

O PLA é um poliéster alifático cuja estrutura química se encontra representada na Figura 2.11 [60]. Sendo um dos polímeros mais usados na preparação de micropartículas, foi um dos seleccionados para a execução deste trabalho [61].

A sua larga utilização à escala nano e micrométrica em sistemas de libertação controlada de princípios activos, deve-se essencialmente à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, uma vez que os produtos resultantes da degradação são biocompatíveis e metabolizados através do ciclo do ácido cítrico, sendo posteriormente filtrados e excretados do corpo [62].

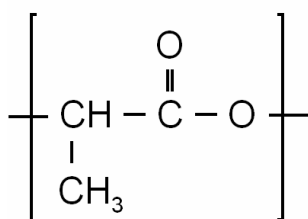


Figura 2.11 - Fórmula química do poli(ácido láctico) ou poli(lactídeo) [Imagem retirada de [60]].

O PLA pode ser sintetizado a partir de dois monómeros, o ácido láctico e o lactídeo, dependendo do peso molecular. O ácido láctico, produzido por animais, nas plantas, e por microorganismos, é uma molécula bifuncional (Figura 2.12) que possui uma função álcool e outra ácido carboxílico, podendo ser transformado em polímero de diferentes formas. O lactídeo é um éster cíclico do ácido láctico, sendo obtido a partir de reacções de esterificação do ácido láctico [60, 63, 64].

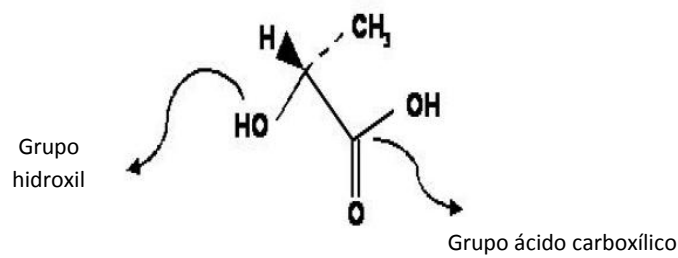


Figura 2.12 - Bifuncionalidade do ácido láctico [Imagem retirada de [64]].

O PLA possui dois estereoisómeros, o Poli(L-ácido láctico), PLLA e o Poli(D-ácido láctico), PDLA [63,65].

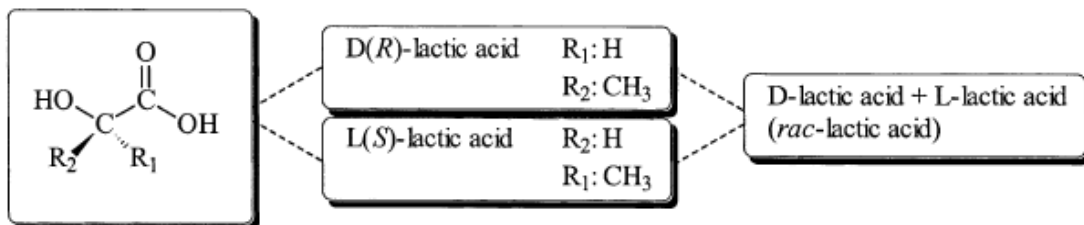


Figura 2.13 - Estereoisómeros do ácido láctico [Imagem retirada de [63]].

O poli(ácido láctico) de baixo peso molecular é produzido por condensação directa do ácido láctico. No entanto, para obter o de elevado peso molecular é usado como monómero de partida o lactídeo, que pode ser polimerizado por abertura do anel, chamando-se neste caso poli(lactídeo) [60,63].

Os polímeros de PLA, geralmente, apesar de solúveis em solventes orgânicos, por exemplo o clorofórmio e o diclorometano, são insolúveis em álcoois e em água [66,67].

2.5. Técnicas de Caracterização

Na caracterização das amostras preparadas foram utilizadas diversas técnicas. Nomeadamente a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR); Espectrofotometria; Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM); Microanálise por sonda electrónica (EPMA) e Análise Elementar, que passamos a descrever sucintamente.

2.5.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A espectroscopia de infravermelho (IV) é uma técnica amplamente utilizada que permite caracterizar processos químicos e estruturas moleculares das amostras em estudo, uma vez que os seus espectros são característicos [68].

Como a radiação IV não tem energia suficiente para excitar os electrões, apenas se consegue que as ligações dos grupos funcionais vibrem com uma frequência característica, o que faz com que quando se expõe uma determinada amostra a radiação infravermelha, ela absorva essa luz a frequências que são características das ligações químicas presentes nas amostras [69].

Neste trabalho damos realce às técnicas de análise por FTIR de transmissão (pastilhas de KBr) e reflexão.

O modo de transmissão, em que o feixe IV atravessa a amostra, foi utilizado apenas para analisar o antibiótico (que se encontra em forma de pó). Dentre as técnicas de transmissão, a utilização de pastilha de KBr é a mais aconselhada para análise de sólidos, nomeadamente sob a forma de pó [70,71].

A combinação de espectroscopia de infravermelho com as teorias de reflexão tem feito avanços na análise da superfície. A técnica de FTIR pode então ser complementada com o ATR (*Attenuated Total Reflectance*), onde um feixe de IV incide num cristal (com alto índice de refração) com um determinado ângulo de incidência, atinge a superfície a analisar e ocorre o fenómeno de reflexão total que se propaga ao longo da superfície do cristal até sair na extremidade oposta (Figura 2.14) [72]. Neste modo o feixe IV penetra apenas algumas centenas de nanómetros abaixo da

superfície da amostra, o que permite a caracterização das ligações químicas presentes apenas à superfície da amostra.

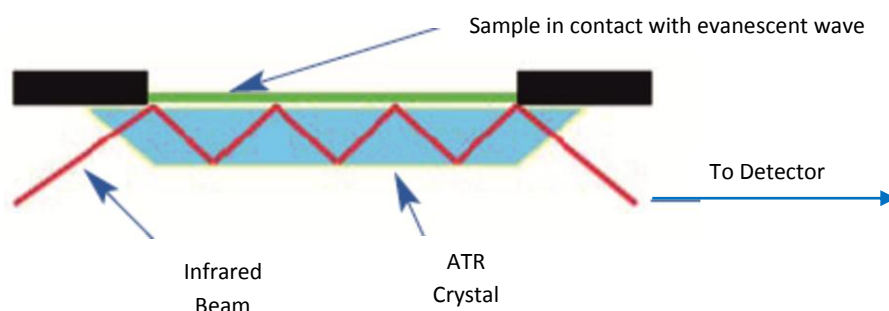


Figura 2.14 - Sistema ATR [imagem retirada de [72]].

Todas as amostras foram analisadas por esta técnica, FTIR-ATR, onde foi usada uma resolução espectral de 4 cm^{-1} , sendo feitas 32 acumulações à temperatura ambiente na região de 4000 a 500 cm^{-1} . Relativamente ao antibiótico foi feita uma exceção, uma vez que se utilizou o modo de transmitância. Neste caso o pó do antibiótico foi diluído, através da mistura com um sal de brometo de potássio (KBr) na proporção de cerca de 1:100 (m/m). Esta mistura foi depois prensada na forma de uma pastilha que foi então analisada.

2.5.2. Espectrofotometria

Para fazer a quantificação do fármaco que é libertado com o decorrer do tempo, pode ser feita uma análise espectrofotométrica UV / Vis da solução onde estão imersos os sistemas de libertação controlada dos fármacos preparados.

A espectrofotometria baseia-se na absorção e / ou emissão de radiação nos comprimentos de onda entre o UV e o infravermelho, quando os electrões se movimentam entre níveis energéticos [73,74].

Num espectrofotómetro, um feixe de luz monocromática atravessa a *cuvette* que tem a solução que se pretende quantificar, e mede a quantidade de luz que foi absorvida por essa mesma solução, recorrendo-se então a um prisma, a luz é separada em feixes com diferentes comprimentos de onda, e é possível saber a quantidade de luz que é absorvida em cada comprimento de onda [73,74].

A lei de Beer-Lambert dá-nos a relação entre a intensidade da luz que incide na solução (I_0) e a que sai (I) [73,74]:

$$\text{Log} \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon \cdot C \cdot L$$

Sendo:

A= Absorvância (num determinado comprimento de onda)

ε = Constante (num determinado comprimento de onda)

C= concentração da solução

L= espessura da *cuvette*

Por norma as *cuvettes* têm 1 cm de comprimento pelo que a equação fica [73]:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot C$$

Para se obter os valores da concentração de um determinado fármaco é necessário usar uma solução padrão (com diferentes concentrações conhecidas) desse mesmo fármaco para que se possa traçar um gráfico da curva-padrão, e a partir deste e dos valores de absorvância é então possível saber a concentração.

2.5.3. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

O microscópio electrónico de varrimento (SEM – *Scanning Electronic Microscope*) em vez de usar luz, usa electrões para obter a imagem ampliada da superfície de um objecto. Este tipo de microscópios, relativamente aos convencionais, tem uma grande profundidade de campo (possibilitando a existência de uma grande quantidade de amostra em foco ao mesmo tempo) e uma resolução muito maior [75].

No SEM a superfície do objecto a analisar, previamente revestida com um metal, é irradiada com um feixe de electrões. Todo este processo ocorre em vácuo para que não haja dispersão ou atenuação dos electrões. Após esta interacção entre os electrões e a superfície é gerado um sinal que é recolhido e analisado por um dispositivo electrónico.

Os sinais mais importantes para gerar imagens SEM são os electrões secundários e os retrodispersados, sendo ainda produzidos durante a interacção electrões Auger, raios – X característicos e outros fotões de várias energias (Figura 2.15) [75,76].

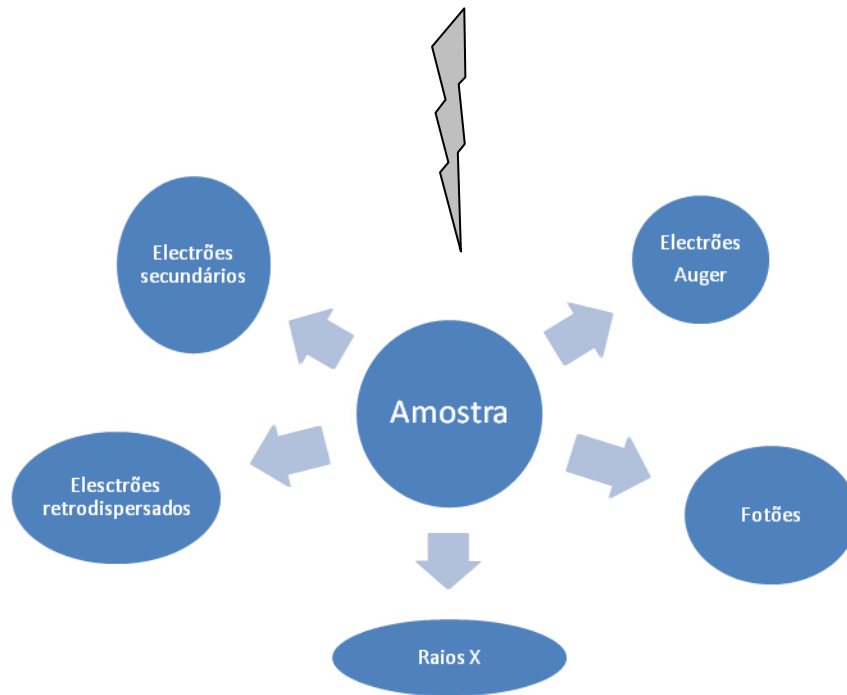


Figura 2.15 - Sinais emitidos da amostra após interação com o feixe de electrões [adaptado de [76]].

As amostras a analisar foram imobilizadas numa fita de grafite colada a um suporte de metal e revestidas a ouro. As observações foram registadas a 20kV num microscópio electrónico de varrimento.

A morfologia da superfície das micropartículas de PLA com fármaco encapsulado; as esponjas constituídas por PECs, osso e antibiótico disperso; e as esponjas constituídas por PECs, osso e micropartículas com CFX encapsulado foram analisadas por esta técnica.

2.5.4. Microanálise por sonda electrónica (EPMA)

A microanálise por sonda electrónica é uma combinação da microscopia electrónica de varrimentos (SEM) e a microanálise de raios X, tendo a capacidade adicional de fazer uma análise química [77].

Esta técnica foi utilizada em amostras de osso desmineralizadas e não desmineralizadas, que não foram modificadas e em superfícies onde se procedeu à imobilização do antibiótico CFX. Com esta técnica foi feito o mapeamento de enxofre presente à superfície das amostras.

A EPMA difere da maioria das outras técnicas utilizadas para analisar os materiais, na medida em que envolve a excitação e análise química de volumes seleccionados com diâmetro e profundidade na ordem de alguns micrómetros perto da superfície.

Na EPMA há uma identificação e medição de elementos baseada no facto dos raios X emitidos por um elemento excitado por um feixe de electrões, geralmente na faixa de 1 a 30 KeV, ter um comprimento de onda característico daquele elemento e uma intensidade relacionada com a sua concentração [78].

2.5.5. Análise Elementar

Através desta técnica é possível determinar quantitativamente a presença de carbono, hidrogénio, nitrogénio, oxigénio e enxofre em compostos orgânicos. É calculada a percentagem de peso de cada um em relação ao peso total da amostra.

O método consiste em submeter a amostra a uma reacção de combustão, sendo feita uma análise aos gases resultantes deste processo, o que permite quantificar os elementos acima referidos.

As amostras analisadas foram a pectina modificada (Pectina-CFX) e a pectina não modificada (PEC). A quantidade de hidrogénio, Carbono, Nitrogénio e Enxofre presentes nas amostras foi então determinada.

2.5.6. Libertação *in vitro*

Esta técnica de caracterização pretende estudar o perfil de libertação *in vitro* do antibiótico, tendo sido testada em alguns sistemas de libertação diferentes.

Para colocar em prática esta técnica começou por ser feita a curva padrão correspondente à Ceftriaxona. Para tal foram preparadas cinco soluções de PBS com diferentes quantidades de Ceftriaxona (20, 15, 10, 5, 2 µg/mL).

Através do espectrofotómetro foi feita a leitura da absorvância a 272 nm (comprimento de onda característico da Ceftriaxona) para cada solução. Sabidos os valores da concentração de fármaco e os valores de absorvância, foi então construída a curva padrão do fármaco.

As amostras que se pretendia analisar foram imersas numa determinada quantidade de tampão fosfato salino (PBS) com pH=7,4 e colocadas na estufa a uma temperatura de 37°C. Em intervalos de tempo determinados, era recolhida a solução de PBS onde as amostras estavam imersas e substituída, posteriormente, pelo mesmo volume de uma nova solução de PBS. A solução que havia sido recolhida era analisada no espectrofotómetro num comprimento de onda de 272 nm.

Para todos os casos os valores de absorvância obtidos permitiram calcular a concentração do fármaco em cada solução, a partir da curva padrão determinada no início.

Capítulo 3

Imobilização do antibiótico à superfície do OSO.

Neste capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados referentes a três metodologias distintas: imobilização directa do antibiótico à superfície do osso, ligação da pectina à superfície do osso seguida da ligação do antibiótico a este polímero e, finalmente, revestimento com camadas alternadas de pectina e quitosano após impregnação do osso com antibiótico. Conforme se referiu, para cada metodologia apresenta-se o respectivo procedimento experimental.

3.1. Imobilização directa por meio da carbodiimida

Numa primeira abordagem tentou ligar-se covalentemente o antibiótico, através do seu grupo amina (NH_2), aos grupos carboxílicos presentes à superfície do osso tendo-se utilizado quer osso desmineralizado quer não desmineralizado. Como agente de acoplamento usou-se a carbodiimida (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) HCl (EDC), ocorrendo a reacção, esquematizada nas Figuras 3.1 e 3.2, em dois passos distintos:

- (i) Activação dos grupos carboxílicos à superfície do osso;
- (ii) Acoplamento do antibiótico.

O procedimento experimental adoptado baseou-se em protocolos estabelecidos para a conjugação, por meio da carbodiimida EDC, de proteínas ou peptídeos a substratos sólidos com superfícies funcionalizadas com grupos carboxílicos [79,80].

Para que a carbodiimida reaja com os grupos carboxílicos do osso é necessário um meio ácido, a fim de que a carbodiimida reaja com um protão em solução

formando um carbocatião. Os grupos carboxílicos existentes na superfície do osso têm de estar ionizados para que o carbocatião reaja ficando então o osso com os grupos carboxílicos activados. Assim, o passo (i) ocorre no meio ácido, solução tampão MES pH 5.5. O passo (ii), que corresponde à ligação dos grupos carboxílicos activados com os grupos NH₂ do antibiótico, ocorre em meio ligeiramente básico, solução tampão PBS pH 7.4.

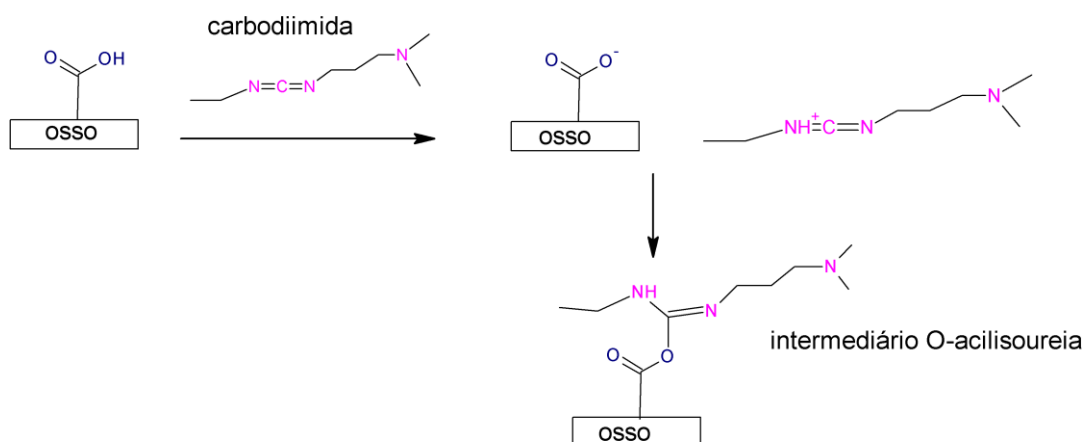


Figura 3.1 - Activação dos grupos carboxílicos, em solução tampão MES, pH 5.5.

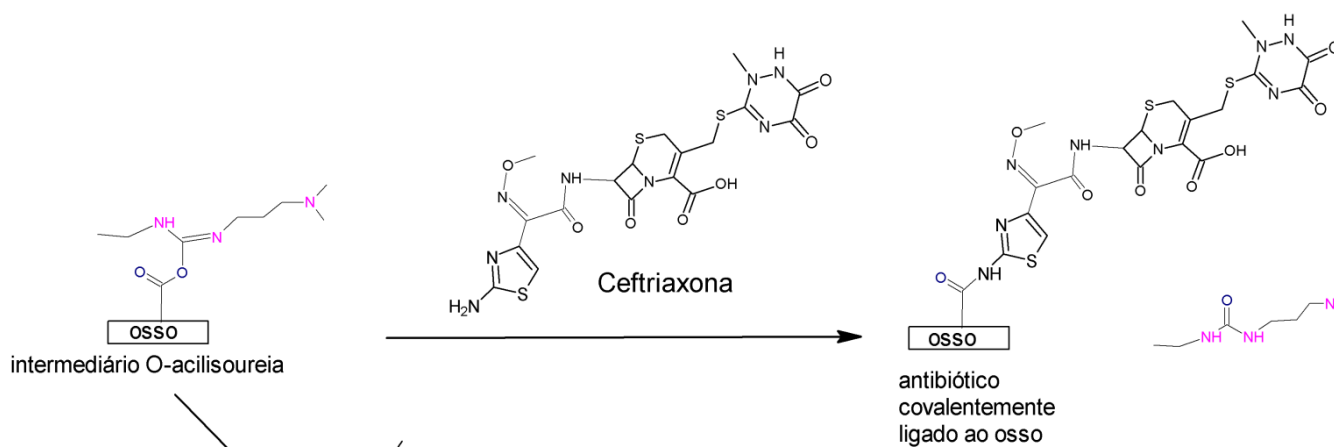


Figura 3.2 - Acoplamento do antibiótico, em solução tampão PBS, pH 7.4.

3.1.1. Procedimento Experimental

(i) Activação dos grupos carboxílicos

Nesta primeira fase mergulharam-se as placas de osso, preparadas conforme descrito na secção 2.1, em 5ml de solução tampão MES (Tampão

morfolinoetanosulfónico) (pH 5.5) e adicionou-se de seguida 1 ml de solução EDC, de forma a que concentração final de EDC na solução de activação fosse de 10mg/ml. A solução de EDC, em água destilada, com a concentração de 60mg/ml, foi preparada imediatamente antes da sua utilização, uma vez que a EDC é instável em solução.

Durante duas horas, as placas de osso foram incubadas na solução de EDC, sob agitação magnética, a uma temperatura de cerca de 4º C, após o qual foram retiradas da solução de activação e lavadas com solução tampão MES.

De acordo com o mecanismo proposto na Figura 3.1, após este tratamento a superfície do osso deverá ter os grupos carboxílicos activados, ou seja, a carbodiimida deverá ter reagido com os grupos carboxílicos e formado um complexo intermediário instável (intermediário O-acilisourea) e altamente reactivo com grupos nucleófilos (como os grupos amina primária do antibiótico).

(ii) Acoplamento do antibiótico

Para o acoplamento do antibiótico, mergulharam-se as placas de osso em 5 ml de uma solução de Ceftriaxona em solução tampão fosfato (pH 7.4) com uma concentração de 10 mg/ml, durante cerca de 20 horas, sob agitação e à temperatura ambiente. No final, as placas foram por várias vezes lavadas com PBS e posteriormente com água destilada. Após estas lavagens, procedeu-se à secagem dos ossos numa estufa de vácuo à temperatura ambiente e guardados ao abrigo da luz.

Este procedimento foi realizado tanto para as placas de osso não desmineralizadas como para as placas superficialmente desmineralizadas. Controlos de reacção foram preparados substituindo no segundo passo, a solução de antibiótico por apenas solução tampão.

3.1.2. Resultados e Discussão

Nas Figuras 3.3 e 3.4 apresentam-se os espectros FTIR-ATR das placas sujeitas ao processo de imobilização covalente do antibiótico: amostra desmineralizada (Figura 3.3) e amostra não-desmineralizada (Figura 3.4). Estes espectros são comparados com os espectros dos respectivos controlos.

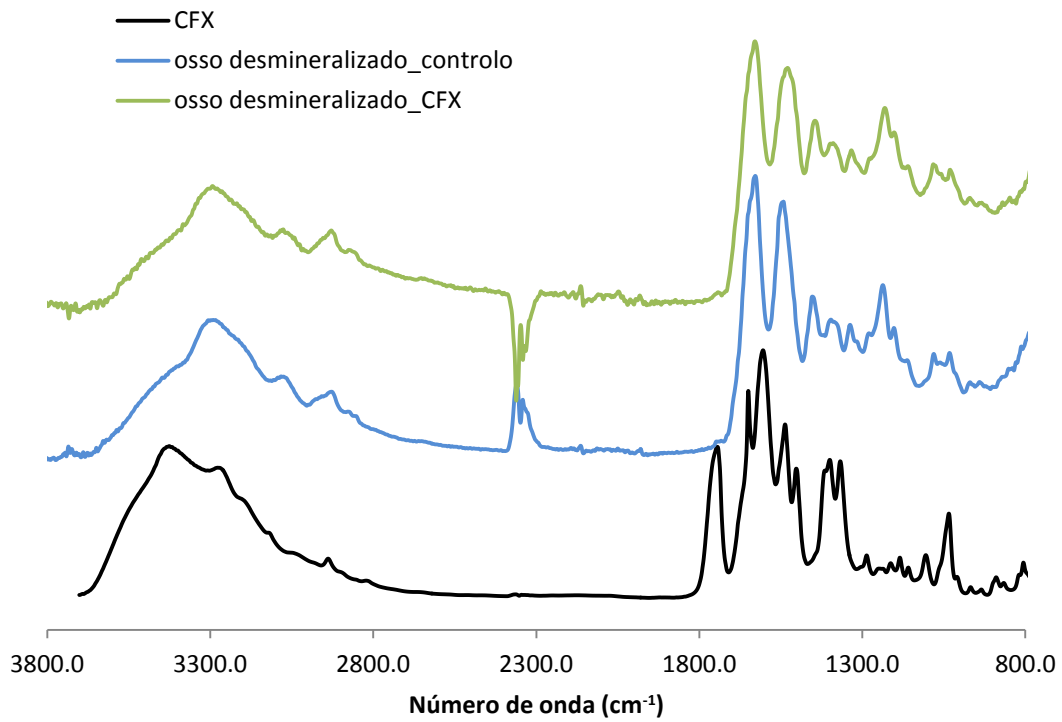


Figura 3.3 - Espectro FTIR-ATR das amostras desmineralizadas com(osso desmineralizado_CFX) e sem antibiótico (osso desmineralizado_controlo) e do antibiótico (CFX).

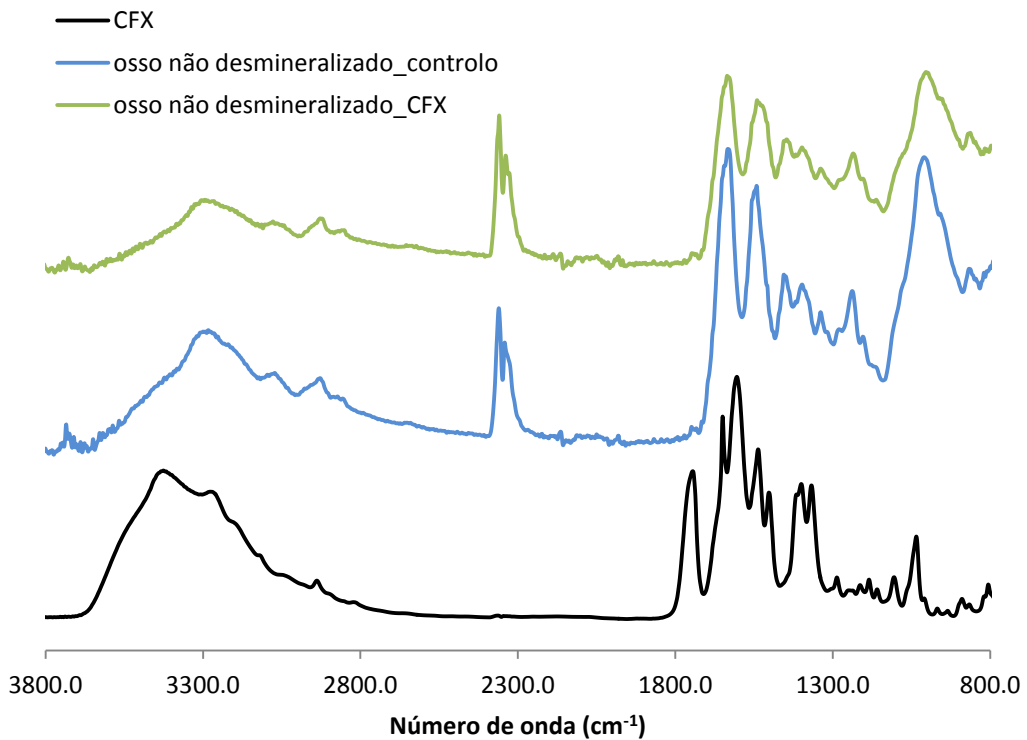


Figura 3.4 - Espectro FTIR-ATR das amostras não-desmineralizadas com (osso não-desmineralizado_CFX) e sem antibiótico (osso não-desmineralizado_controlo) e do antibiótico (CFX).

Em ambas as Figuras (Figura 3.3 e 3.4) não é detectável nenhuma evidência acerca da ligação, ou não, do antibiótico, uma vez que os espectros obtidos para o controlo, onde não existe antibiótico, e o para o osso modificado, com o antibiótico, são idênticos quer para a amostra desmineralizada quer para a amostra “tal qual”.

Na Figura 3.5 podem comparar-se os espectros FTIR-ATR obtidos para o osso não desmineralizado e desmineralizado com o espectro do antibiótico.

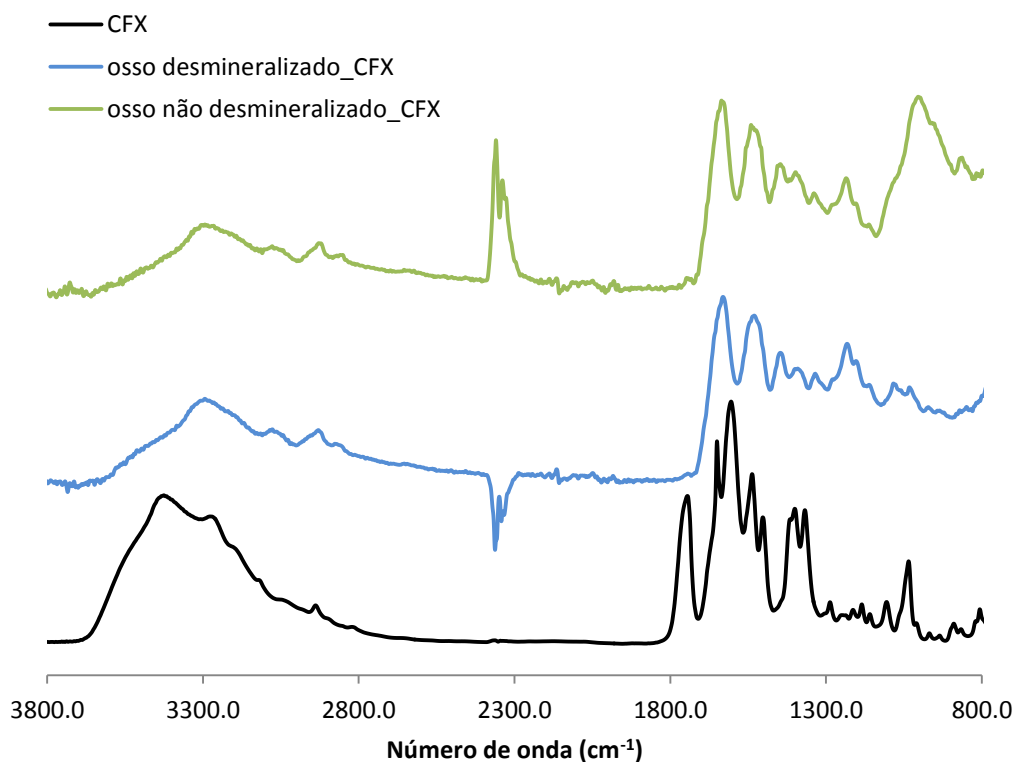


Figura 3.5 - Comparação entre os Espectros FTIR-ATR do osso desmineralizado e não desmineralizado, ambos com antibiótico ligado (CFX), e da Ceftriaxona.

Como se pode ver nesta Figura (e também na Tabela 2.2), as bandas de maior intensidade de absorção do antibiótico situam-se em regiões onde também existem bandas de absorção do osso, o que dificulta a detecção da Ceftriaxona. Além disso, como o antibiótico, supostamente ligado à superfície, existe numa concentração muito pequena, as suas bandas características serão completamente mascaradas pelas bandas relativas aos componentes do osso (colagénio e hidroxiapatite). Isto explica de algum modo porque não se detecta qualquer melhoria nas amostras desmineralizadas, as quais, em princípio, deveriam ter mais grupos carboxílicos livres à superfície disponíveis para reagirem com a Ceftriaxona.

Como através da análise FTIR-ATR não foi possível identificar nenhum grupo químico específico do antibiótico, teve de recorrer-se a técnicas alternativas para tentar confirmar a presença do antibiótico à superfície do osso. Optou-se então pela utilização da técnica de microanálise por sonda electrónica (EPMA), disponível no Departamento de Engenharia Mecânica da FCTUC, que permite determinar a composição da superfície da amostra em termos de elementos. Neste caso procedeu-se ao mapeamento da distribuição do elemento enxofre à superfície do osso (porque o antibiótico contém enxofre na sua composição e o osso apenas contém enxofre em quantidades residuais). Estes resultados estão apresentados na Figura 3.6.

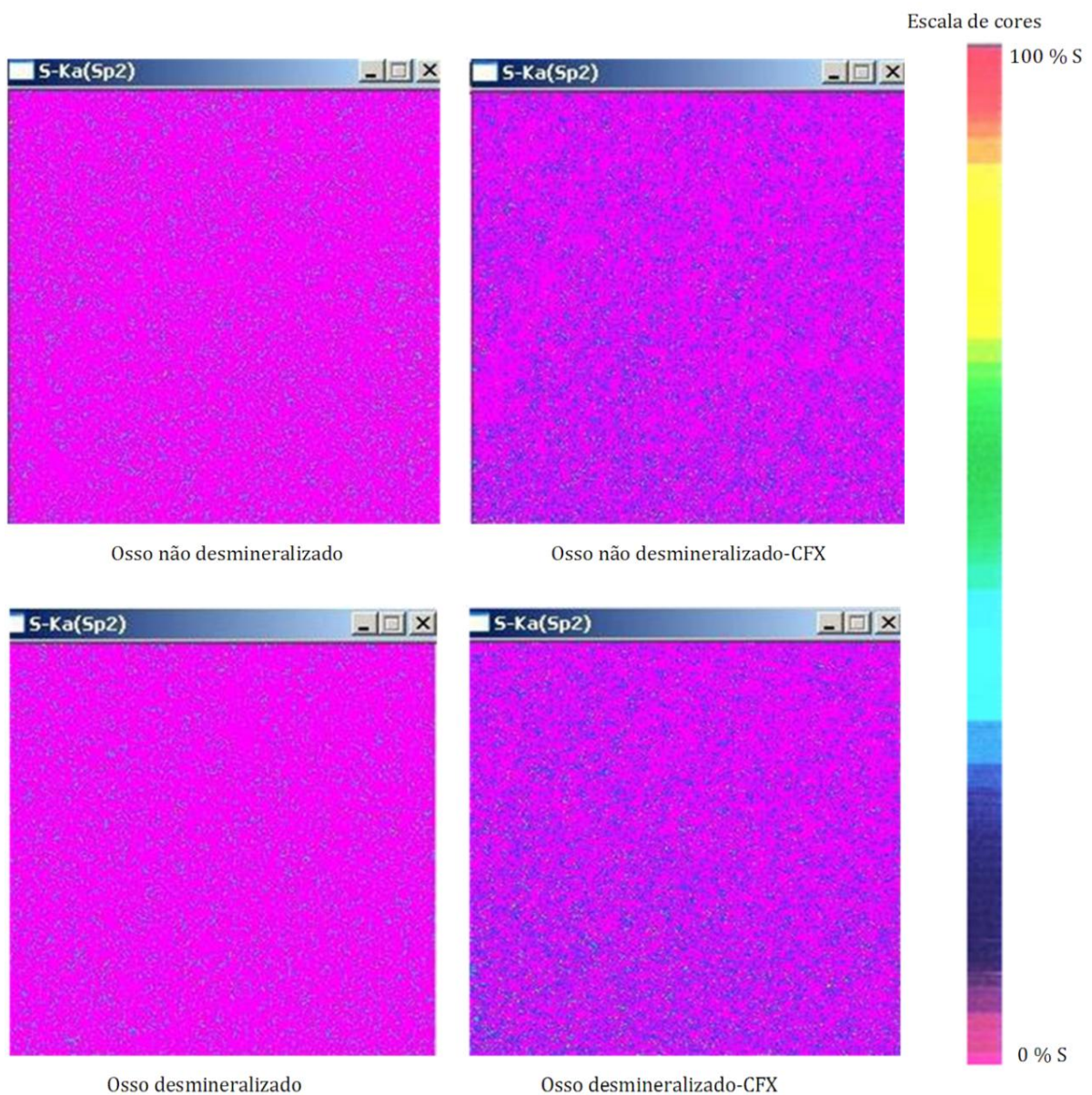


Figura 3.6 - Mapas de enxofre à superfície das amostras desmineralizadas sem (à esquerda) e com (à direita) imobilização do antibiótico (CFX) (Área: 100 x 100µm).

Os mapas de enxofre revelam que a imobilização do antibiótico ocorreu efectivamente, uma vez que as amostras com antibiótico apresentam uma maior quantidade de enxofre na sua superfície. No entanto nada se pode concluir acerca da natureza dessa imobilização, isto é, não se pode afirmar que as moléculas de antibiótico se encontram imobilizadas à superfície do osso por uma ligação química, pois estas também podem estar imobilizadas apenas por interacções físicas. De facto, se as moléculas estiverem apenas fisicamente adsorvidas à superfície do osso, irão libertar-se mais facilmente do que se estiverem imobilizadas covalentemente, pois neste último caso a libertação só será possível através da hidrólise da ligação amida estabelecida entre a molécula de antibiótico e os grupos carboxílicos da superfície do osso.

Por outro lado, da Figura 3.6. constatou-se ainda que não existem diferenças significativas na quantidade de enxofre no osso não desmineralizado e no osso desmineralizado, ao contrário do que se estava à espera, pois supostamente, o osso desmineralizado terá à superfície mais grupos carboxílicos livres disponíveis para reagirem com a Ceftriaxona.

Uma possibilidade alternativa seria o estudo da libertação do fármaco, contudo depressa se constatou que este estudo não era viável dado que a quantidade de fármaco supostamente ligada é demasiado pequena para ser detectada pelo espectrofotómetro. Além disso, várias outras substâncias se libertam do osso que absorvem na mesma zona do espectro (região ultravioleta), o que adultera os resultados.

Fez-se, por isso, outra tentativa de ligação do antibiótico ao osso desmineralizado, usando pectina, com o intuito de poder acoplar maior quantidade de antibiótico e assim facilitar a sua detecção com os meios disponíveis.

3.2. Ligação covalente da pectina à superfície do osso e posterior ligação do antibiótico

Nesta abordagem, a pectina foi imobilizada à superfície do osso desmineralizado por ligação covalente ligando-se posteriormente a Ceftriaxona às cadeias de pectina. Neste caso, o antibiótico é imobilizado às cadeias de pectina, e não directamente aos grupos carboxílicos do colagénio à superfície do osso. Nesta situação, teoricamente, as moléculas de antibiótico imobilizadas têm mais liberdade de movimentos, visto que as cadeias de pectina são estruturas flexíveis. Este aspecto poderá influenciar a actividade do antibiótico imobilizado.

Neste processo, ilustrado esquematicamente na Figura 3.7, é também possível a identificação de duas etapas distintas:

(i) Imobilização, por ligação química, da pectina à superfície do osso.

(ii) Ligação do antibiótico CFX às cadeias de pectina previamente imobilizadas à superfície do osso.

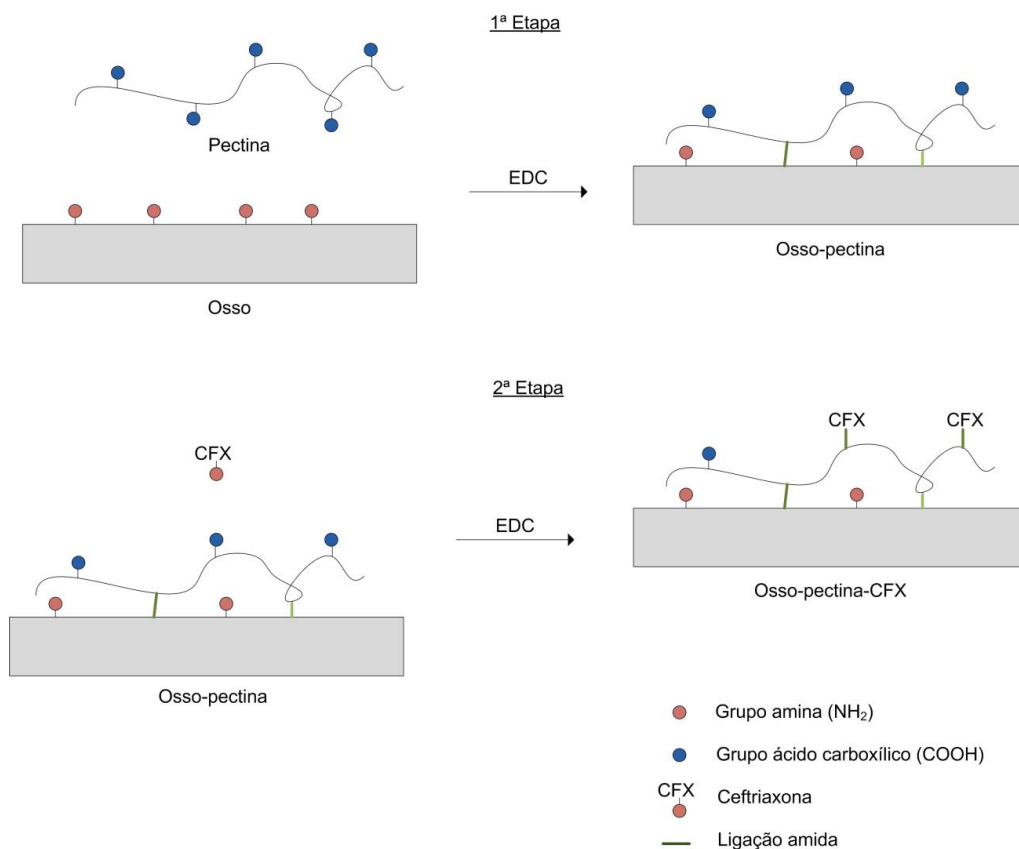


Figura 3.7 - a) Imobilização da pectina; b) Ligação do antibiótico.

3.2.1. Procedimento Experimental

(i) Imobilização da pectina à superfície do osso

Nesta primeira etapa preparou-se uma solução de 1% (m/v) de pectina em água destilada, e colocaram-se 10ml desta solução num copo, o que corresponde a cerca de 100mg de pectina. Posteriormente ajustou-se o pH com uma solução de NaOH 0,1M para 4,3, sendo inicialmente de 3,75.

Adicionou-se 100 mg de EDC dissolvidas em cerca de 2 ml de água destilada, e deixou-se reagir com a pectina sobre agitação magnética e à temperatura ambiente, durante cerca de 45 minutos. No decorrer desse período de tempo o pH da mistura reaccional foi mantido entre 4,5 e 5,3 através da adição de uma solução 0,1M de HCl. Esta gama de pH é considerada gama de pH óptima para a reacção de activação dos grupos carboxílicos com a carbodiimida EDC.

Em seguida, para reagir os grupos carboxílicos activados da pectina aos grupos NH_2 do colagénio à superfície do osso, elevou-se o pH para 7.9 com 0,1M NaOH e adicionaram-se duas placas de osso superficialmente desmineralizadas. A mistura foi deixada a reagir, com agitação magnética, durante 20 horas à temperatura ambiente. Após este tempo, as placas supostamente com a pectina imobilizada foram lavadas, abundantemente com água destilada, e seguidamente congeladas e liofilizadas.

(ii) Ligação do antibiótico às cadeias de pectina

Uma das amostras de osso-pectina foi mergulhada em 5 ml de solução tampão MES (pH 5.5). Em 1ml de água destilada dissolveram-se 60 mg de EDC e adicionou-se esta solução à anterior para que se obtivesse uma concentração de EDC de 10mg/ ml. Deixou-se a solução a agitar durante 1 hora.

Teoricamente, os grupos carboxílicos activados reagiram todos com os grupos NH_2 do colagénio. Espera-se, no entanto, que só uma fracção dos grupos COOH tenha sido activada na primeira etapa. Assim, ainda existirão grupos COOH da pectina (já ligada ao osso) que poderão ser activados para ligar, desta vez, o antibiótico, através dos grupos amina deste.

Prepararam-se 5 ml de solução de CFX em PBS (pH 7.4) com a concentração de 10 mg/ml e mergulhou-se a placa de osso revestido com pectina, durante cerca de

24horas sob agitação magnética. No final, a placa foi lavada com PBS e água destilada, e posteriormente congelada e liofilizada.

3.2.2. Resultados e Discussão

Na Figura 3.8 são apresentados os espectros FTIR-ATR da superfície do osso desmineralizado usado como controlo, da superfície do osso com cadeias de pectina imobilizadas e da superfície do osso com as cadeias de pectina imobilizadas e com a Ceftriaxona ligada a essas mesmas cadeias.

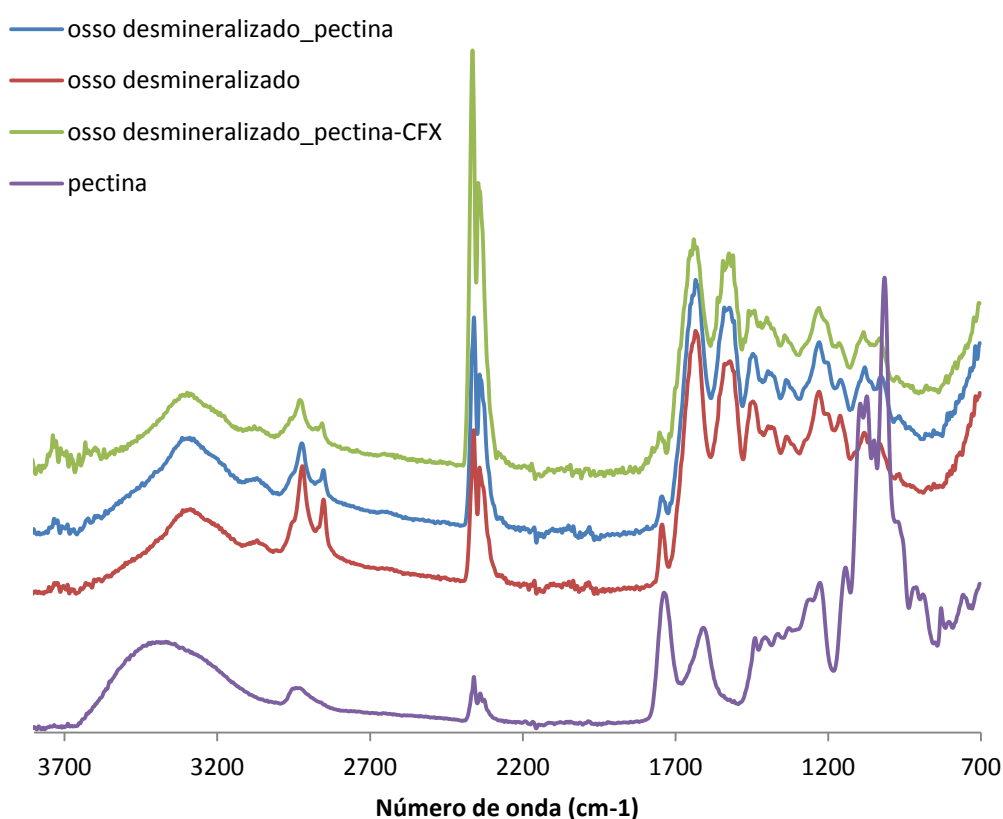


Figura 3.8 - Espectro FTIR-ATR da superfície do osso desmineralizado, do osso desmineralizado com cadeias de pectina ligadas à superfície e do osso desmineralizado com cadeias de pectina ligadas à superfície e posterior ligação do antibiótico.

Como se vê nesta figura, também não é possível concluir nada acerca desta metodologia pois os espectros são praticamente coincidentes, tal como já tinha sido detectado aquando da ligação directa do antibiótico por meio da carbodiimida EDC. Mais uma vez se conclui que as quantidades quer de pectina quer de antibiótico são

demasiado pequenas para serem detectadas por FTIR. Dado que a técnica de mapeamento do enxofre nem sempre estava disponível, decidiu-se adoptar outras abordagens para o acoplamento do antibiótico como se descreve de seguida.

3.3. Impregnação da amostra com antibiótico seguida de revestimento com camadas alternadas de pectina e quitosano

Nesta metodologia, e ao invés do que foi feito anteriormente, o osso foi apenas impregnado com antibiótico (e não imobilizado), procedendo-se de seguida ao seu revestimento com um filme formado por multicamadas de pectina e quitosano.

Tendo em conta os estudos presentes na literatura acerca da impregnação de matrizes ósseas com antibióticos, esperava-se que o antibiótico impregnado fosse todo libertado rapidamente. Assim pensou-se revestir a matriz óssea, depois de impregnada com a Ceftriaxona, com um filme de multicamadas de polielectrólitos que, teoricamente, poderia modelar/retardar a libertação do antibiótico.

3.3.1. Procedimento experimental

Três placas de osso foram mergulhadas em soluções de antibiótico com a concentração inicial de 4 mg/ml durante 24 horas. As placas foram de seguida retiradas da solução e secas numa estufa de vácuo.

Utilizando um aparelho de *spin coating* duas das três placas de osso impregnadas foram revestidas, nas duas faces, com camadas alternadas de pectina e quitosano. Para isso preparou-se uma solução de pectina e outra de quitosano em solução tampão acetato (pH 5; C= 0,1M; I=0,1M), na concentração de 0,5% m/v.

Antes do primeiro ciclo de revestimento as placas foram mergulhadas, cerca de um minuto, numa solução HCl 0,1M, de forma a permitir a protonação dos grupos amina do colagénio (ou seja, obter uma superfície com carga positiva).

Cada camada de polielectrólito era produzida colocando, na superfície da amostra, algumas gotas de solução do polielectrolítico (pectina ou quitosano). A placa

de osso, segura por vácuo, girava então durante 30s a 3000 rpm, de forma a espalhar a solução de polielectrólito.

A primeira camada de revestimento foi efectuada com a solução de pectina. Alternando entre pectina e quitosano revestiu-se desta forma uma placa com 5 bicamadas (cada bicamada corresponde a uma camada de pectina e outra de quitosano) e outra placa com 15 bicamadas.

As placas de osso cortical impregnadas com o antibiótico e revestidas com camadas alternadas de pectina e quitosano, depois de secas numa estufa de vácuo à temperatura ambiente, foram sujeitas a testes de libertação *in vitro*.

3.3.2. Resultados e Discussão

A massa de Ceftriaxona impregnada nas três placas de osso foi determinada realizando um balanço mássico (massa de CFX na solução inicial – massa de CFX na solução final) estando expressa na Figura 3.9. Para obter o valor da massa de CFX final foi necessário calcular o valor da concentração do antibiótico na solução de impregnação remanescente, a qual foi determinada por espectroscopia UV/Vis a 272 nm.

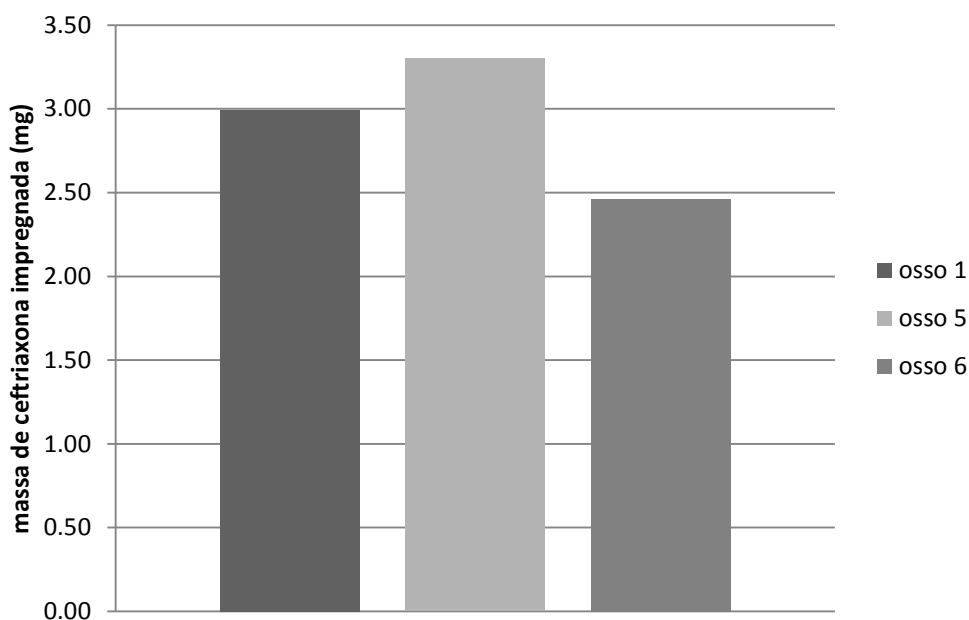


Figura 3.9 - Massa de Ceftriaxona impregnada nas várias placas de osso.

Para as placas de osso 1 (não revestido), 5 (revestido com 5 bicamadas) e 6 (revestido com 15 bicamadas) foi obtida, respectivamente, uma massa de 3mg, 3,30mg e 2,46mg de Ceftriaxona impregnada.

Uma das variáveis que não foi possível controlar foi a quantidade de antibiótico impregnada. Apenas se pôde alterar a concentração da solução de impregnação e, em princípio, quanto mais elevada a concentração da solução de impregnação maior a quantidade de antibiótico impregnada.

No entanto, e como as amostras têm aproximadamente as mesmas dimensões, a diferença na quantidade de antibiótico impregnada em cada uma delas não é muito significativa.

Após a impregnação das três placas com antibiótico, apenas duas foram então revestidas com multicamadas de pectina e quitosano deixando-se a restante para controlo. Depois de secas, estas placas foram guardadas e postas a libertar posteriormente. Os perfis de libertação *in vitro* do antibiótico das três placas de osso são apresentados na Figura 3.10, que foram obtidos em solução tampão fosfato salino (PBS) a 37°C, conforme descrito na secção 2.5.6.

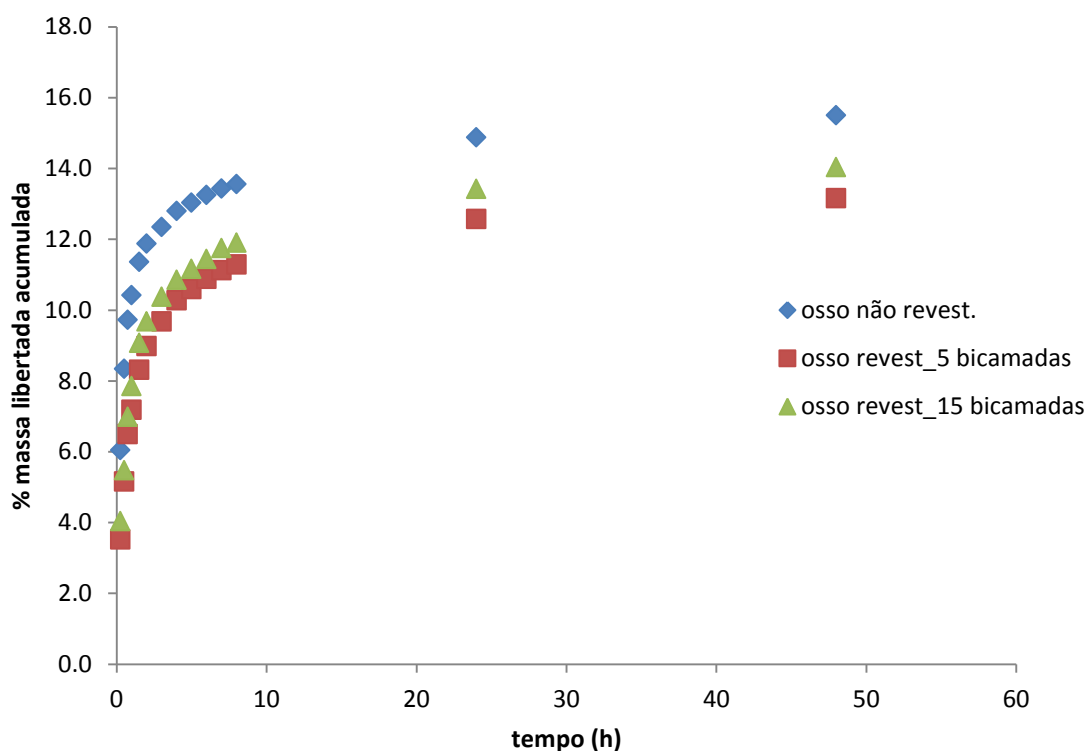


Figura 3.10 - Perfis de libertação *in vitro* do antibiótico a partir das placas de osso.

O objectivo desta tentativa também não foi conseguido, uma vez que, talvez devido à secagem, o antibiótico interagiu fortemente com osso e ficou imobilizado (provavelmente adsorvido fisicamente) e assim não se libertou.

Observou-se que, nas primeiras 10 horas se libertou cerca de 12% do fármaco impregnado. Nos dois dias seguintes praticamente nenhum fármaco foi libertado. No final do ensaio apenas cerca de 14% do fármaco tinha sido libertado. Não foi possível continuar o ensaio de libertação por mais tempo e quantificar a eventual libertação de mais antibiótico porque a libertação de outros compostos (proteínas, resíduos de proteínas) interfere com o espectro UV/VIS do antibiótico.

Aparentemente o osso não revestido terá apresentado resultados ligeiramente melhores, no entanto não há muitas diferenças no perfil de libertação, tal como se pode observar na Figura 3.10.

O que é constatado desde logo é que apenas pequenas quantidades de antibiótico são libertadas, correspondendo à placa sem revestimento, uma libertação relativamente mais elevada mas mesmo assim baixa, em termos absolutos (16 % em 80 horas). Conclui-se portanto que o antibiótico interage fortemente com a matriz óssea, através de interacções físicas. O facto de as placas revestidas libertarem ainda menores quantidades, era esperado, sugerindo os resultados um efeito diminuto das camadas de revestimento.

Estes resultados levam a concluir que numa futura continuação deste trabalho em vez de impregnar o osso com o antibiótico, o antibiótico deverá estar impregnado no revestimento polielectrolítico, com o intuito de obter uma maior libertação.

Uma outra solução passará também por utilizar o osso que tem a pectina ligada já com a Ceftriaxona (Pectina-CFX) e revestir de seguida com o quitosano.

Capítulo 4

Matrizes de polímeros com partículas de osso

Neste capítulo apresenta-se uma nova metodologia que consistiu na produção de géis de pectina e quitosano formados pela complexação polielectrolítica, aos quais se adicionou partículas de osso com diferentes granulometrias e o antibiótico. Estas formulações no fim de secas têm o aspecto de esponjas. Produziram-se diferentes tipos de esponjas que diferem essencialmente na forma como o antibiótico se encontra nelas imobilizado: primeiramente o antibiótico foi apenas misturado no gel (ligação física), depois foi imobilizado covalentemente e, por fim, foi encapsulado em micropartículas de poli(ácido láctico).

A ideia neste Capítulo era ter um sistema em que se pudesse incorporar uma quantidade grande de antibiótico, e que uma parte (mais de 50%) se libertasse rapidamente e outra parte do antibiótico fosse libertada de forma gradual ao longo de 4 a 6 semanas. Teoricamente, um sistema onde uma parte do antibiótico estivesse apenas disperso fisicamente, numa matriz polimérica hidrofílica, e outra parte do antibiótico imobilizada, covalentemente, ou por oclusão em micropartículas, poderia proporcionar o perfil de libertação pretendido.

4.1. Esponjas de pectina / quitosano misturadas com partículas de osso e antibiótico

Neste sistema escolheu-se para matriz polimérica hidrofílica, um gel formado pela complexação polielectrolítica entre a pectina e o quitosano. Como se referiu na introdução, quando ionizados, ou parcialmente ionizados, estes dois polissacarídeos reagem entre si formando complexos insolúveis.

Os géis de PECs podem ser vistos como hidrogéis físicos que são formados devido às ligações iónicas estabelecidas entre cadeias de polianiões e policatiões, e onde outras interacções físicas (como pontes de hidrogénio e hidrofóbicas) desempenham um papel cooperativo na estabilização dos complexos.

Uma das vantagens destas matrizes é que a sua formação é realizada apenas em soluções aquosas, não requerendo nem a adição de iniciadores, catalisadores, ou a utilização de solventes orgânicos, os quais são normalmente necessários para produzir estruturas hidrofílicas covalentemente reticuladas.

4.1.1. Procedimento Experimental

(i) Preparação do gel de pectina / quitosano por complexação polielectrolítica

Uma solução de pectina e outra de quitosano, ambas de concentração 1% (m/v), foram preparadas em solução tampão acetato (pH 5; C= 0,1M; I=0,1M).

A 200 ml da solução de quitosano foram adicionados 200 ml de solução de pectina, sob agitação mecânica. A mistura foi deixada a agitar, a cerca de 6000 rpm, durante 5 minutos.

A reacção de complexação entre a pectina e o quitosano deu origem a uma suspensão de partículas. Essas partículas foram então isoladas do sobrenadante por centrifugação (4000 rpm, 5 minutos) e lavadas por duas vezes com água destilada. Devido à centrifugação, as partículas sofreram um processo de agregação, formando, depois de isoladas e lavadas, um material com a consistência de um gel e com uma grande percentagem de água. Esse gel foi então deixado ao ar durante dois dias à temperatura ambiente para perder, por evaporação, uma parte da água. Nas secções seguintes este gel é designado por gel de pectina/quitosano ou, simplesmente, por PECs.

(ii) Preparação de esponjas com pectina/quitosano com partículas de osso e com o antibiótico disperso

Num *empendorf* foram colocados cerca de 2,0 ml de gel pectina/quitosano (PECs). Em seguida adicionou-se e misturou-se com ajuda de uma espátula cerca de 50

mg de Ceftriaxona. Como o gel está no estado hidratado (possui uma grande quantidade de água), quando se mistura o pó do antibiótico este dissolve-se na água. A algumas amostras adicionou-se ainda cerca de 250 mg de partículas de osso de diferentes granulometrias: num caso utilizaram-se partículas de osso com um diâmetro inferior a 0,5mm, noutra caso com um diâmetro entre 0,5mm e 1mm e, noutra caso com um diâmetro entre 1mm e 5mm, todas elas foram obtidas por peneiração.

As misturas assim preparadas (PECs + osso + CFX) foram congeladas com azoto líquido e liofilizadas. Depois de secas, as amostras apresentavam uma forma cilíndrica e uma consistência esponjosa. Na figura 4.1 apresenta-se um esquema da preparação deste sistema.

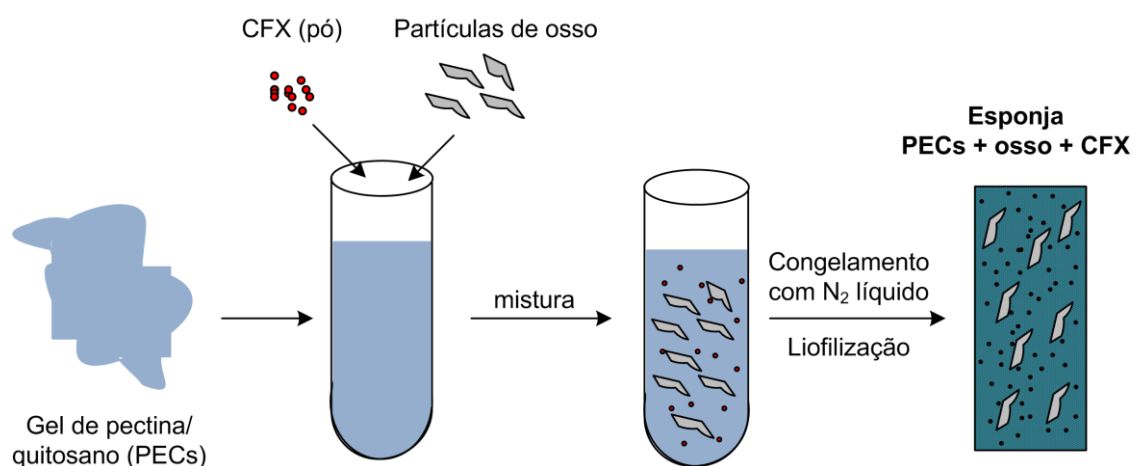


Figura 4.1 -Esquema de formação das esponjas: PECs +osso+CFX.

4.1.2. Resultados e Discussão

Os espectros FTIR-ATR da pectina, do quitosano, e dos PECs por eles formados estão representados na Figura 4.2. A região mais informativa destes espectros encontra-se na gama entre os 1800 e 1400 cm^{-1} , pois é nela que aparecem algumas das vibrações atribuídas aos grupos carboxílicos e amina.

No espectro dos PECs de pectina/quitosano é possível observar uma banda com um pico a 1580 cm^{-1} , podendo esta vibração ser atribuída à deformação assimétrica da ligação N-H dos grupos amina protonados, a qual de acordo com as referências bibliográficas está situada entre 1625 e 1560 cm^{-1} [14]. Esta vibração encontra-se

sobreposta com a vibração $\nu_{as}C=O$ dos grupos COO^- da pectina e a vibração Amida I do quitosano. A Tabela 4.1 lista também a localização das principais bandas.

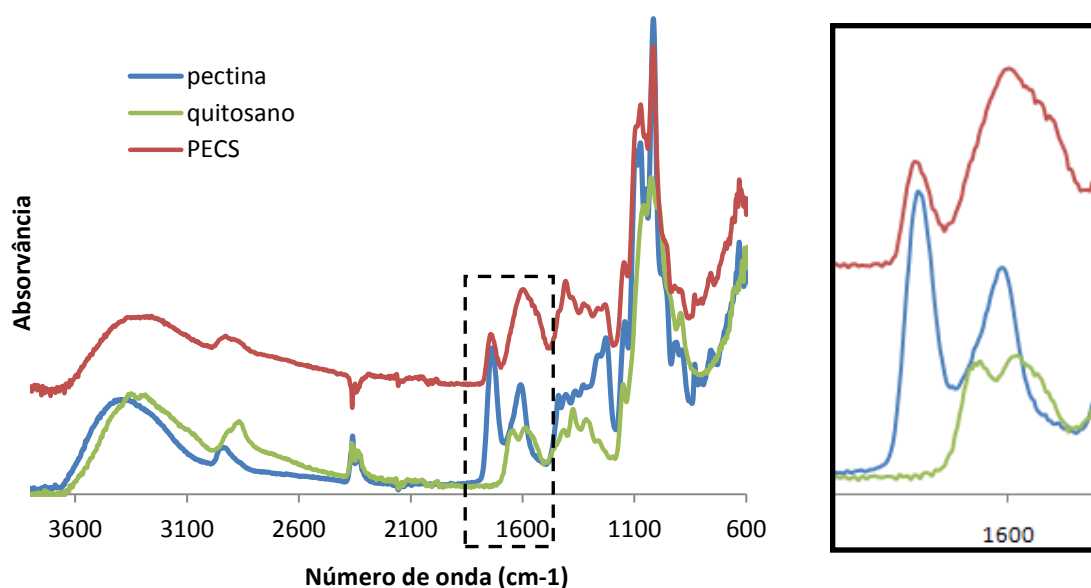


Figura 4.2 - Espectros FTIR-ATR da pectina, quitosano e PECs e ampliação da zona de interesse.

Devido à grande sobreposição de bandas nesta zona do espectro é impossível identificar o aparecimento de novas bandas que poderiam indicar o estabelecimento de ligações iônicas entre os grupos ionizáveis dos dois polissacarídeos, nomeadamente o aparecimento de bandas associadas às vibrações dos grupos COO^- e NH_3^+ .

Por análise FTIR não é possível identificar evidências da formação dos PECs.

Tabela 4.1 - Atribuição das bandas nos espectros de FTIR-ATR da pectina, quitosano e PECs.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
Pectina	
1725	$\nu C=O$ (COOH e $COOCH_3$)
1601	$\nu_{as} C=O$ (COO^-)
Quitosano	
1629	$\nu C=O$ grupo amida (Amida I)
1570	$\delta(N-H) + \nu(C-N)$ grupo amida (Amida II) $\delta(N-H)$ grupos amina (NH_2)
PECs	
1580	$\delta_{as}(N-H)$ grupos amina protonados (NH_3^+)

ν – alongamento; δ – deformação; s – simétrico; as – assimétrico

O aspecto das esponjas de pectina/quitosano com partículas de osso e com antibiótico disperso na matriz está ilustrado nas imagens de SEM apresentadas na Figura 4.3.

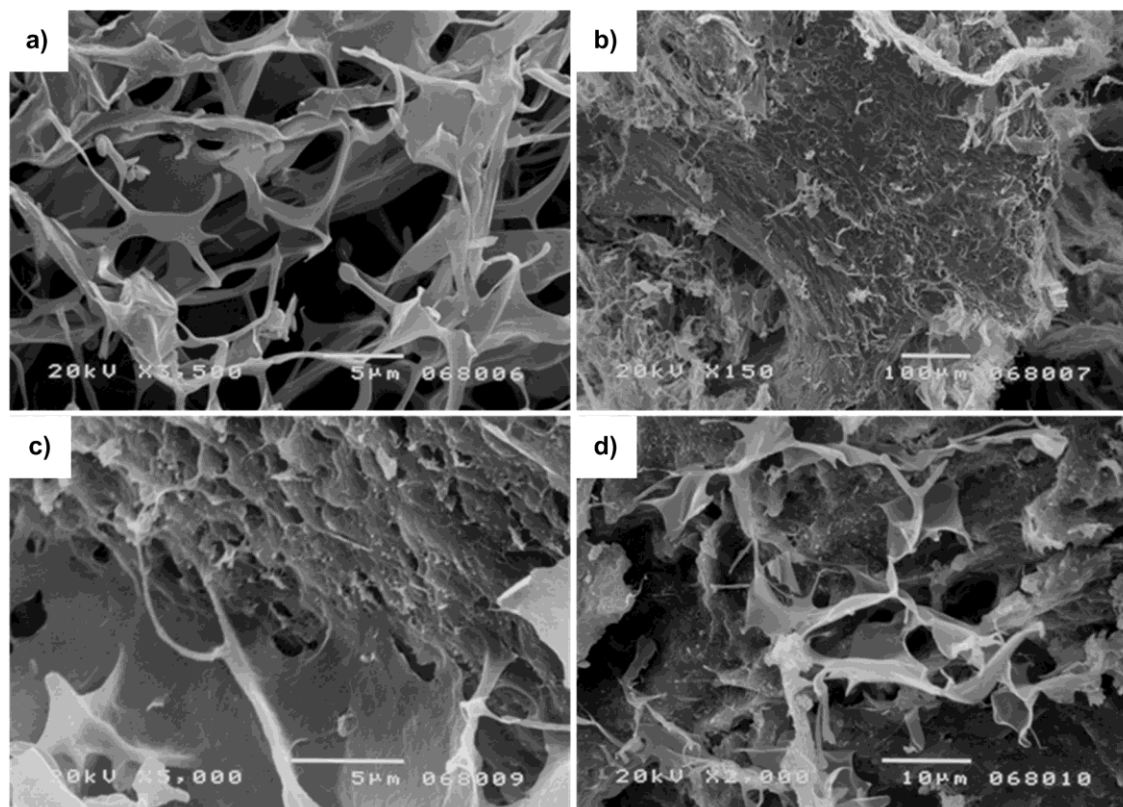


Figura 4.3- a) Aspecto do PEC (pectina/quitosano); b) Ligação do PEC ao osso; c) e d) Ampliação da ligação do PEC ao osso.

Da imagem da Figura 4.3 a) pode constatar-se que os complexos polielectrolíticos (PECs) formados entre os polissacarídeos de pectina e quitosano, depois de liofilizados, têm uma estrutura bastante porosa e regular, e nas restantes Figuras, é possível distinguir uma partícula de osso integrada na matriz polimérica liofilizada. Nas Figuras 4.3 c) e d), de uma ampliação maior, pode observar-se o aspecto da interface entre a matriz polimérica e a matriz óssea.

Não é possível visualizar partículas de fármaco, o que indica que este se encontra disperso a nível molecular, ou seja, o fármaco não precipitou em partículas mas encontra-se dissolvido na estrutura polimérica.

Na Figura 4.4 é possível visualizar os perfis de libertação *in vitro* da Ceftriaxona incorporada nas esponjas de PECs com partículas de osso, de diferentes

granulometrias. Estes perfis de libertação foram obtidos em solução tampão fosfato salino (PBS) a 37°C, conforme descrito na secção 2.5.6.

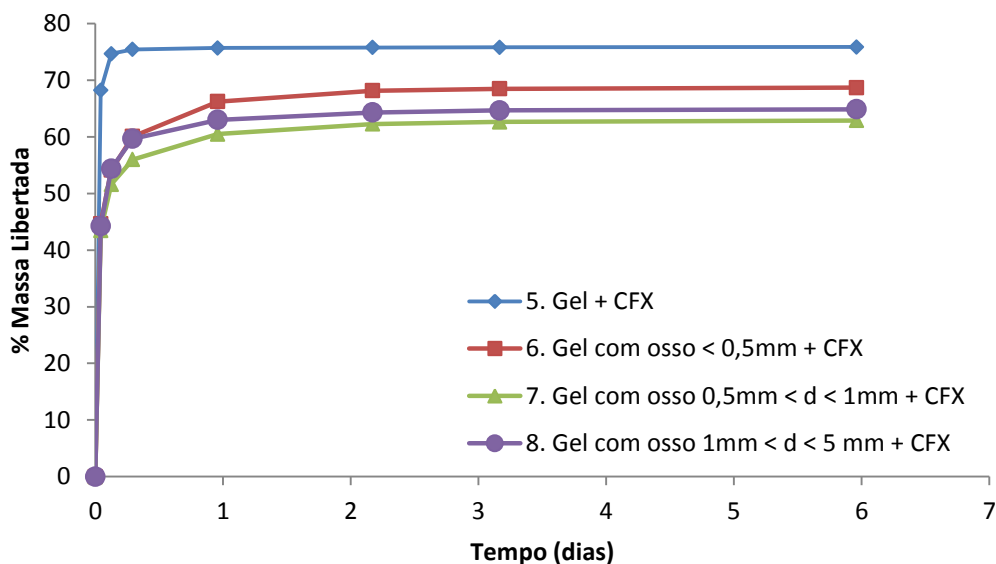


Figura 4.4 - Perfis da libertação *in vitro* da CFX incorporada nas esponjas de PECs com e sem adição de osso de diferentes granulometrias.

Da análise do gráfico podemos concluir que em todos os ensaios se verifica uma libertação muito rápida do antibiótico nas primeiras horas: cerca de 60 % no caso das amostras que incorporam partículas de osso e cerca de 75 % no caso das amostras constituídas apenas pela esponja de PEC ao qual se misturou antibiótico. Além disso é ainda possível constatar que a diferença de tamanho das partículas de osso não afecta a libertação do antibiótico pois os três perfis de libertação são idênticos.

Estes elevados valores contrastam com os resultados obtidos no capítulo anterior e estão certamente relacionados com o facto do antibiótico se encontrar apenas disperso fisicamente nas esponjas. Embora não se tenha alcançado uma libertação gradual, esta metodologia permitiu obter uma libertação rápida que contrasta com a não libertação do antibiótico quando este se encontra ligado covalentemente ao osso, o que incentiva à procura de outras soluções que apresentem um comportamento intermédio.

4.2. Esponjas de pectina/quitosano com partículas de osso e com o antibiótico imobilizado covalentemente

Com o intuito de tentar aprisionar o fármaco de uma forma mais eficaz na esponja imobilizou-se o antibiótico covalentemente na matriz polimérica, mais propriamente à pectina e não ao quitosano pois este não tem grupos carboxílicos para activar. Para tal, foi necessário recorrer a uma carbodiimida, pois como já foi descrito esta promove a ligação covalente entre os grupos carboxílicos da pectina e os grupos amina do antibiótico. Na Figura 4.5 encontram-se esquematizados os passos que levaram à ligação covalente entre a pectina e o antibiótico.

Para que a carbodiimida reaja com a pectina é necessário um meio ácido, a fim de que a carbodiimida reaja com um protão em solução formando um carbocatião. Os grupos carboxílicos existentes na pectina têm de estar ionizados para que o carbocatião reaja ficando então a pectina com os grupos carboxílicos activados. Com um valor de pH básico ocorrerá a reacção para ligar o antibiótico covalentemente.

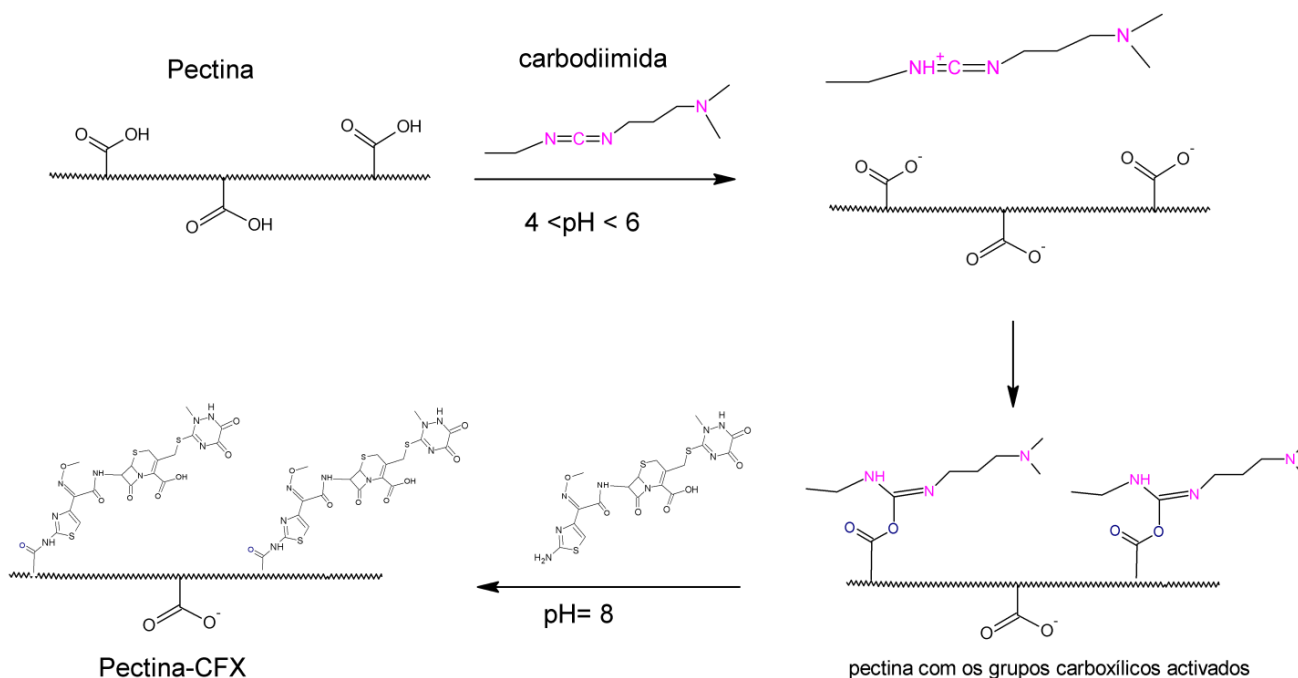


Figura 4.5 - Esquema da ligação do antibiótico Ceftriaxona à pectina.

4.2.1. Procedimento Experimental

O protocolo utilizado para ligar quimicamente o antibiótico à pectina foi baseado no trabalho publicado na literatura por Araújo *et al.* [81].

(i) Ligação química do antibiótico à pectina

Dissolveu-se 1,0 g de pectina em 50 ml de água destilada de forma a obter uma solução de pectina a 2% (m/v). O pH inicial da solução preparada (3,79) foi ajustado, com 0,1M de NaOH, para cerca de 4,2.

Seguidamente, adicionou-se à solução de pectina 300 mg de EDC dissolvida em cerca de 10 ml de água destilada (esta solução foi preparada e imediatamente adicionada à solução de pectina). Durante 1 hora deixou-se a solução a agitar, controlando-se o pH com 0,1 M de HCl, de forma a manter o pH entre 4,2 e 5.

Dissolveu-se cerca de 950 mg de CFX em cerca de 20 ml de água destilada, solução que também se adicionou à solução de pectina, tendo-se de seguida ajustado o pH para 8,0 com 0,1M de NaOH. Deixou-se a solução resultante a agitar durante 24 horas.

No final desse tempo, a solução foi colocada em membranas de celulose (*cut-off* de aproximadamente 12 000 Da) e dialisada contra água destilada durante três dias. Finalmente a solução foi congelada com azoto líquido e liofilizada.

(ii) Preparação do gel de pectina – CFX / quitosano por complexação polielectrónica

Seguindo um protocolo idêntico ao utilizado para preparar o gel de pectina / quitosano (PECs) (secção 4.1.1), preparou-se um gel com o antibiótico já ligado à pectina (abreviadamente designado por pectina-CFX) e quitosano, o qual se designou por PEC(CFX)), de acordo o mecanismo esquematizado na Figura 4.6.

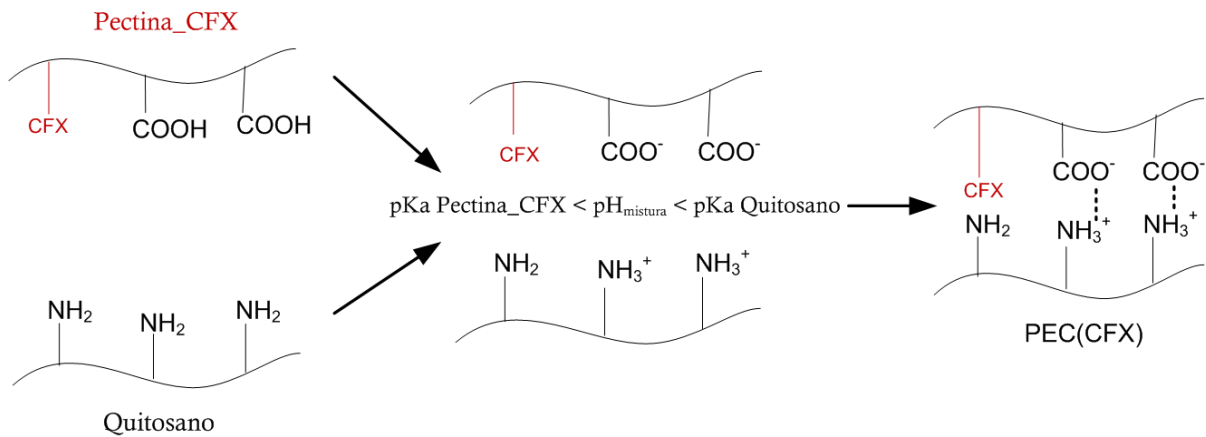


Figura 4.6 - Esquema da formação dos complexos polieletrólitos entre a pectina-CFX e o quitosano.

(iii) Preparação das esponjas de pectina – CFX / quitosano e partículas de osso

Num *empendorf* foram colocados cerca de 2,0 ml de gel pectina-CFX/quitosano. Numa amostra foram adicionadas e misturadas, com o auxílio de uma espátula, cerca de 250 mg de partículas de osso com um diâmetro entre 0,5mm e 1mm.

As misturas resultantes foram congeladas com azoto líquido e liofilizadas. Depois de secas, as amostras apresentavam uma forma cilíndrica e uma consistência esponjosa.

Na Figura 4.7 é possível visualizar o esquema representativo da preparação destas esponjas.

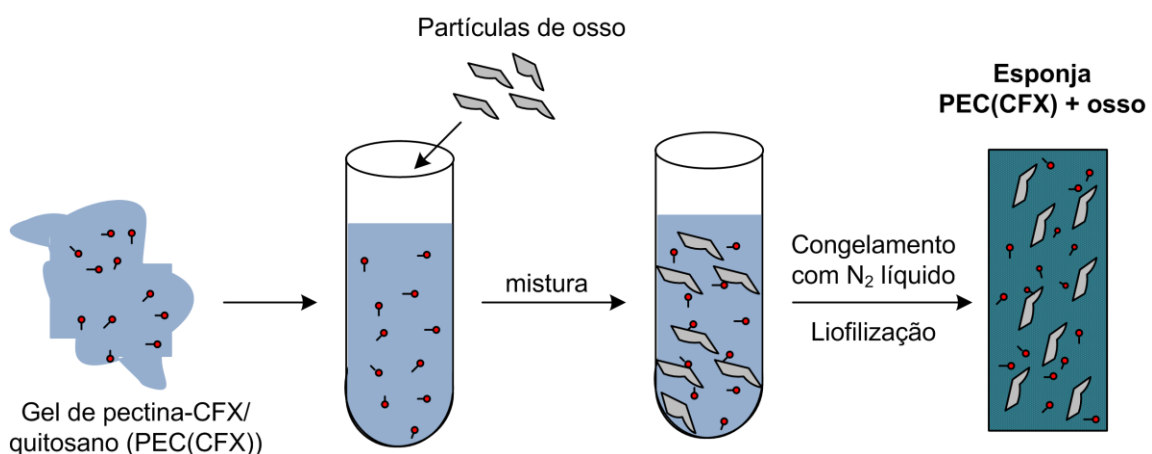


Figura 4.7 - Esquema de formação das esponjas: PEC(CFX) + osso.

4.2.2. Resultados e Discussão

Para confirmar a ligação química do antibiótico à pectina, esta foi analisada por FTIR-ATR, obtendo-se o gráfico ilustrado na Figura 4.8, o qual pode ser comparado com o espectro da pectina pura.

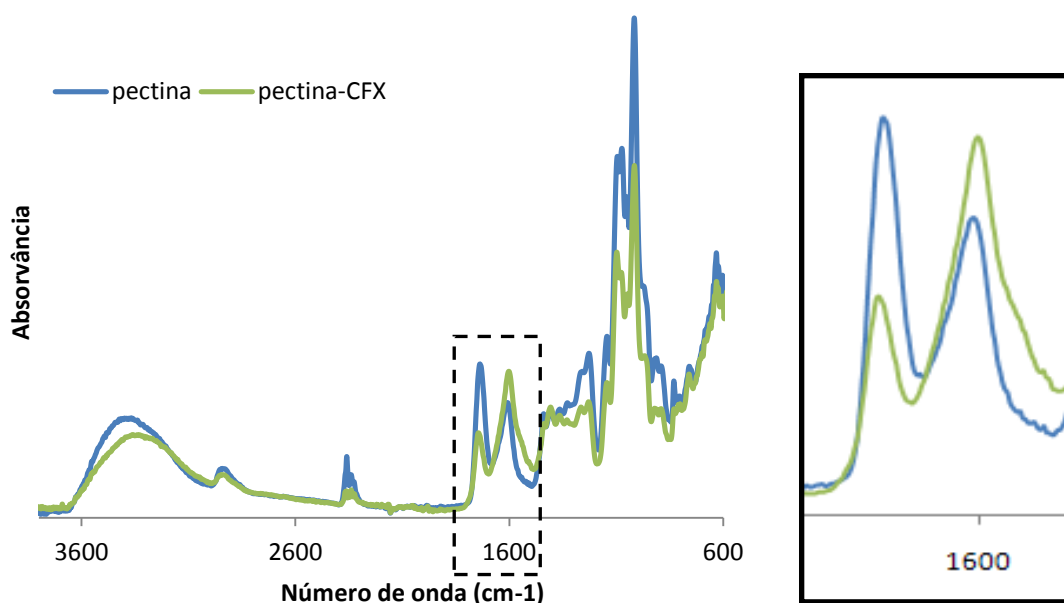


Figura 4.8 - Espectros FTIR-ATR da pectina e da pectina-CFX.

A comparação dos espectros FTIR-ATR das duas amostras revela diferenças que evidenciam a ligação covalente do antibiótico à pectina por meio da formação de uma ligação amida entre os grupos COOH da pectina e os grupos NH₂ do antibiótico. Nomeadamente verifica-se, na pectina-CFX, uma diminuição da intensidade do pico a cerca de 1725 cm⁻¹, o que indica a diminuição dos grupos COOH livres na pectina, e um aumento da intensidade e alargamento da banda a cerca de 1550-1450 cm⁻¹, o que indica a presença das vibrações amida I e amida II da ligação amida sobrepostas com outras vibrações específicas da pectina.

Também através dos dados obtidos por análise elementar, Tabela 4.2, nomeadamente a partir da percentagem de enxofre presente é possível confirmar que a pectina modificada (Pectina-CFX) apresenta uma percentagem mássica de enxofre muito superior à pectina não modificada, cuja percentagem de enxofre é

negligenciável (≤ 100 ppm). A partir da percentagem de enxofre presente na pectina modificada, estimou-se que a quantidade de Ceftriaxona ligada covalentemente à pectina seria de 18,3 mg CFX/100 mg Pectina-CFX, o que é uma quantidade bastante significativa.

Tabela 4.2- Resultados da análise elementar à pectina modificada (Pectina-CFX) e pectina não modificada (Pectina).

Técnica Utilizada		Análise Elementar		
Amostra	% N (p/p)	% C (p/p)	% H (p/p)	% S (p/p)
Pectina-CFX	4,857	38,105	6,366	3,168
Pectina	0,531	37,031	6,150	≤ 100 ppm

Na Figura 4.9, para além do espectro da pectina com a Ceftriaxona ligada (pectina-CFX), apresentam-se ainda o do gel de pectina com CFX/ quitosano (PECs-CFX) e o do quitosano.

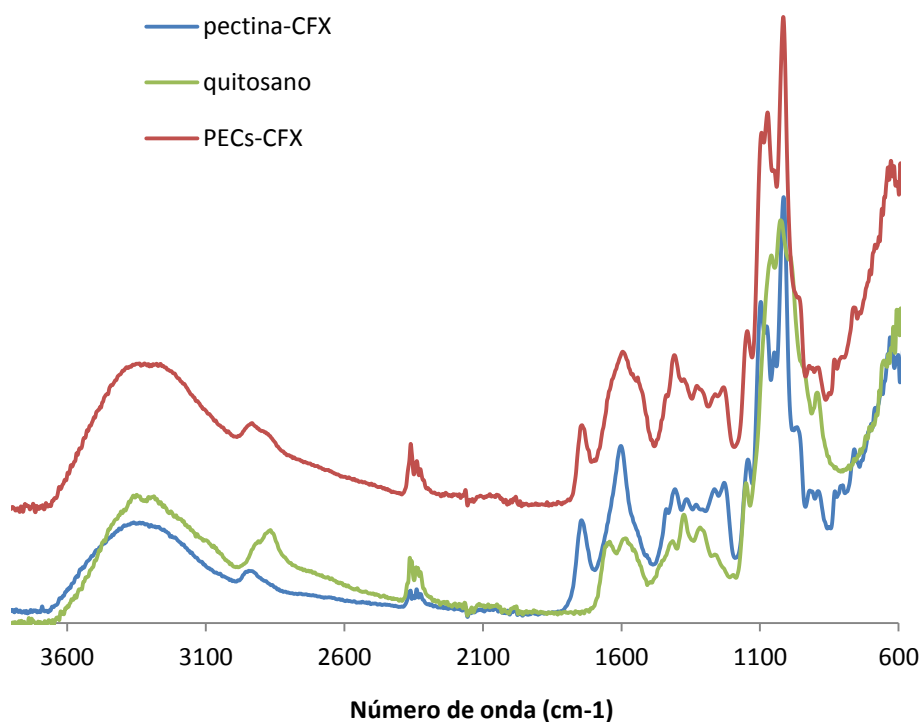


Figura 4.9 - Espectros FTIR-ATR da pectina-CFX, quitosano e PEC(CFX).

As esponjas PEC(CFX) com e sem partículas de osso, foram sujeitas a ensaios de libertação *in vitro* em solução tampão fosfato salino (PBS) a 37°C, conforme descrito na secção 2.5.6.

Os resultados desses ensaios são apresentados na Figura 4.10. Contudo, e ao contrário dos perfis apresentados na Figura 4.4, estes resultados não podem ser expressos em percentagem de massa libertada, porque neste caso, não é possível determinar a quantidade total de CFX presente nas esponjas mesmo tendo-se tentado fazer essa quantificação por análise elementar. Assim, o perfil de libertação vem expresso em quantidade de massa libertada acumulada ao longo do tempo e não em percentagem.

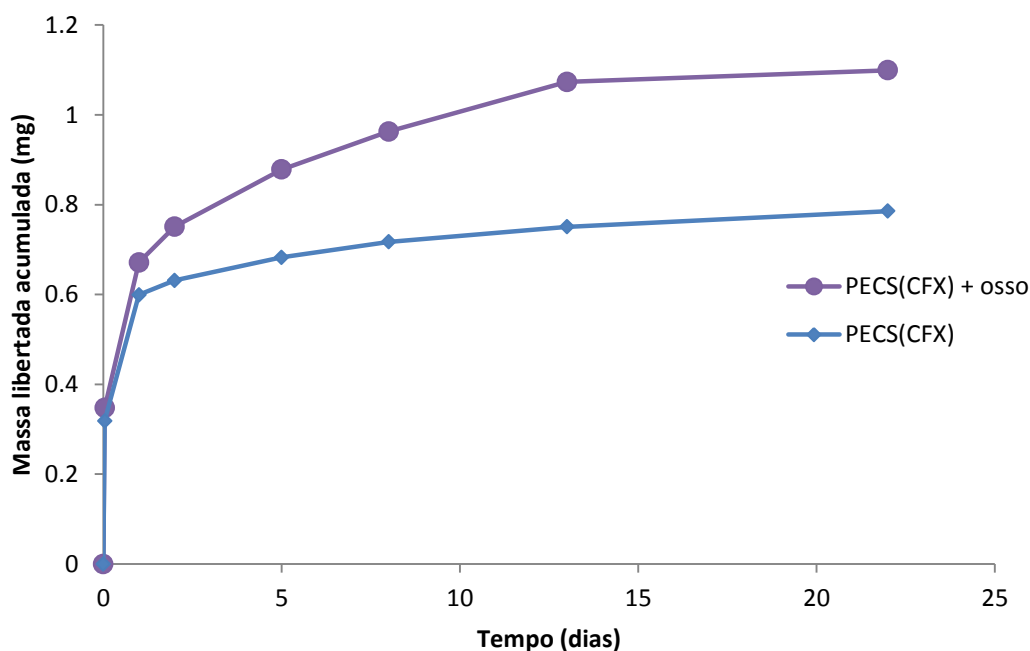


Figura 4.10 - Perfis da libertação *in vitro* da CFX presente nas esponjas de PEC(CFX).

Como se pode observar, a massa de CFX libertada no final do ensaio (após 22 dias) é cerca de 1 mg. Ao contrário dos outros sistemas, em que é possível incorporar a quantidade de CFX desejada, aqui a quantidade de CFX é determinada pela quantidade de moléculas de antibiótico covalentemente ligadas às cadeias de pectina e pela percentagem de pectina-CFX presente nos complexos.

Tal como nas esponjas anteriormente produzidas, também aqui mais de metade da totalidade do fármaco é libertada no primeiro dia. Provavelmente esta facilidade de libertação será o resultado da dissociação e dissolução das cadeias de pectina-CFX mais fracamente complexadas com o quitosano.

Contudo, e ao contrário do que aconteceu nos outros sistemas, depois do primeiro dia, observa-se uma libertação contínua e praticamente constante do antibiótico até ao final do ensaio. Este perfil resulta provavelmente da dissolução progressiva das cadeias de pectina_CFX e da hidrólise da ligação amida que liga covalentemente o antibiótico à pectina.

4.3. Matrizes de pectina/quitosano com partículas de osso e com antibiótico encapsulado em micropartículas de PLA.

Como ultima tentativa, encapsulou-se a Ceftriaxona em micropartículas de poli(ácido láctico), as quais se integraram nas esponjas de pectina/quitosano .

Tratando-se a Ceftriaxona de um composto bioactivo hidrofílico, para evitar a sua difusão para a fase aquosa da emulsão durante o processo de solidificação das partículas, escolheu-se o método da dupla emulsão água / óleo / água, usando o diclorometano como solvente orgânico volátil e o PVA como surfactante [14].

Após a obtenção das micropartículas de PLA com CFX encapsulado, estas foram integradas, conjuntamente com partículas de osso em matrizes de pectina/quitosano, conforme indicado esquematicamente na Figura 4.11.

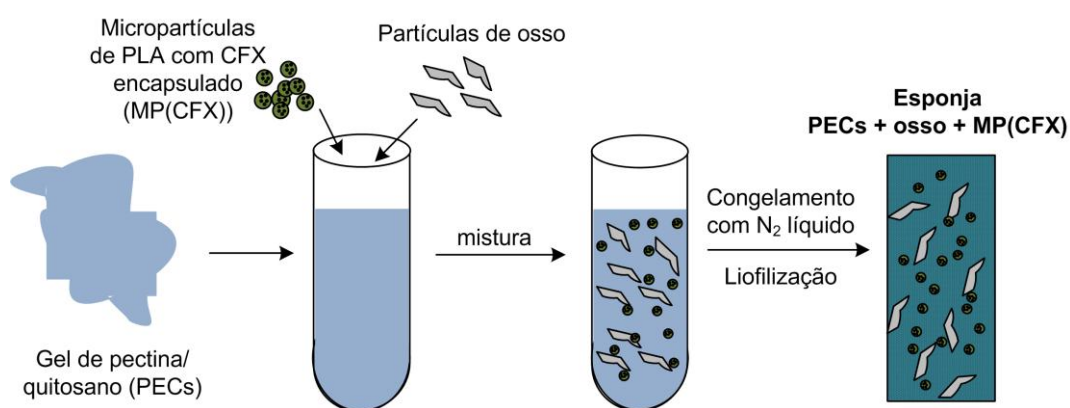


Figura 4.11 - Esquema de formação das esponjas: PECs + osso + MP(CFX).

4.3.1. Procedimento Experimental

(i) Encapsulação do antibiótico em micropartículas de PLA preparadas pelo método extracção / evaporação do solvente numa dupla emulsão água / óleo / água.

O antibiótico CFX foi encapsulado em micropartículas de poli (ácido láctico) por meio do método da extracção / evaporação do solvente numa dupla emulsão água / óleo / água (W1/O/W2) (Figura 4.12).

O procedimento experimental utilizado foi adaptado do proposto para a preparação de microesferas de PLGA com colistina por Meng Shi et al. [82]. Este procedimento engloba a preparação das duas fases aquosas e da fase orgânica. A preparação e a composição dessas fases foi a seguinte:

(i) Preparação da primeira fase aquosa (W1):

Preparou-se uma solução aquosa de gelatina de 0.2% (m/v). Retirou-se 2,5 ml dessa solução e dissolveu-se nesse volume 500 mg de CFX.

(ii) Preparação da fase orgânica (O):

Dissolveu-se 2,5g de PLA em 25 ml de diclorometano.

(iii) Preparação da segunda fase aquosa (W2):

Preparou-se 250 ml de uma solução 1% de PVA em água destilada.

Para preparar a dupla emulsão os 2,5 ml da fase aquosa W1 foram adicionados gota a gota à fase orgânica sob agitação mecânica de 7000 rpm. Manteve-se a agitação durante cerca de 2 minutos.

A emulsão formada anteriormente (W1/O) foi de seguida adicionada aos 250 ml da segunda fase aquosa (W2), também sob agitação mecânica (4000 rpm) durante dois minutos, formando-se assim a dupla emulsão (W1/O/W2). Esta dupla emulsão foi adicionada seguidamente a 250 ml de outra solução de PVA (0,1%, 0,1M NaCl), de forma a aumentar o volume da segunda fase aquosa e, desta forma promover a extracção do solvente orgânico volátil.

A dupla emulsão foi então deixada com agitação magnética durante cerca de 4 horas, de forma a evaporar o solvente orgânico volátil (diclorometano), e endurecer as micropartículas. Passado esse tempo, a mistura foi centrifugada de forma a isolar as micropartículas.

As micropartículas isoladas foram lavadas por duas vezes com água destilada, sendo centrifugadas entre cada lavagem e, por fim, secas ao ar.

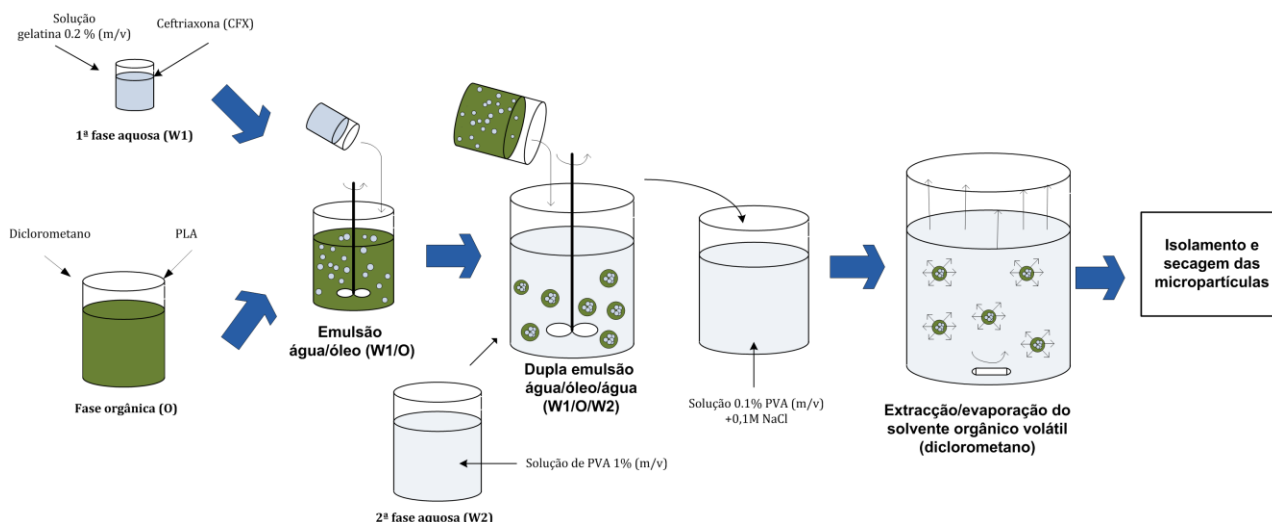


Figura 4.12 - Esquema da preparação das micropartículas de PLA com CFX pelo método da extracção/evaporação do solvente numa dupla emulsão água/óleo/água.

(ii) Determinação da eficiência de encapsulamento do antibiótico.

Cerca de 50 mg de micropartículas com o fármaco encapsulado (PLA-CFX) foram colocadas num tubo de ensaio e dissolvidas com a adição de 2ml de diclorometano. Seguidamente, adicionou-se 8ml de PBS, de forma a extrair o antibiótico. A mistura foi vigorosamente agitada e em seguida centrifugada. A fase aquosa foi então recolhida e analisada por espectrofotometria a 272 nm, de forma a quantificar o fármaco.

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

Quantidade experimental de fármaco encapsulado (%)

$$= \frac{\text{massa de fármaco quantificada}}{\text{massa (PLA CFX)}} \times 100(\%)$$

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:

$$= \frac{\text{Quantidade teórica de fármaco encapsulado}(\%)}{\frac{\text{massa de fármaco adicionado}}{\text{massa de fármaco adicionado} + \text{massa de PLA adicionado}}} \times 100\%$$

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

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

(iii) Preparação das matrizes de pectina/quitosano, partículas de osso e micropartículas de PLA – CFX

Num *empendorf* foram colocados cerca de 5ml de gel pectina/quitosano (PECs). Em seguida adicionou-se e misturou-se cerca de 100 mg de micropartículas com CFX incorporado MP(CFX), correspondente a 6mg de CFX. Adicionou-se ainda cerca de 250 mg de partículas de osso com um tamanho entre 1 mm e 2,5 mm.

As misturas de PECs + osso + MP(CFX) foram congeladas com azoto líquido e liofilizadas. Depois de secas, as amostras apresentavam uma forma cilíndrica e uma consistência esponjosa (Figura 4.13).



Figura 4.13 - Aspecto da esponja obtida no trabalho de laboratório.

Adicionalmente foram preparadas outras esponjas em que o antibiótico foi adicionado à matriz polimérica de diferentes maneiras:

a) Preparou-se uma esponja onde metade do CFX se encontrava disperso na matriz de pectina/quitosano e outra metade encapsulado nas micropartículas de PLA: PECs + osso + MP(CFX) + CFX (Figura 4.14).

b) Preparou-se ainda outra esponja onde o antibiótico foi disperso fisicamente no gel de pectina / quitosano tal como se fez na secção 4.1.

Em cada um destes casos a quantidade total do CFX incorporado foi de 6 mg.

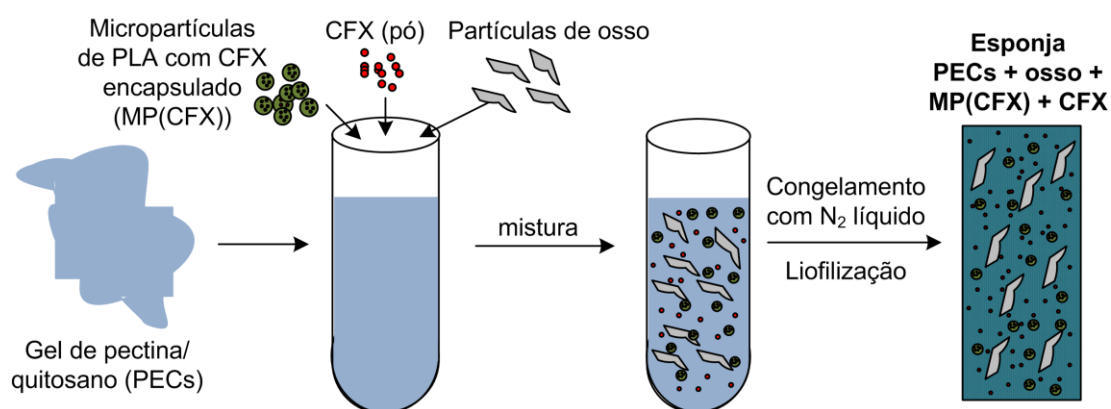


Figura 4.14 - Esquema de formação das esponjas: PECs +osso + MP(CFX) + CFX.

Na Tabela 4.3 são apresentadas as quantidades de cada um dos constituintes dos sistemas de libertação preparados:

Tabela 4.3 - Quantidade de cada um dos constituintes dos diferentes sistemas de libertação.

Sistema de libertação	Gel de pectina / quitosano (PEC)	Partículas de osso	Micropartículas MP (CFX)	Fármaco disperso (CFX)
PECs + Osso + CFX	5ml	250mg	--	6mg
MP (CFX)	--	--	100mg (6mg CFX)	--
PECs + Osso + MP (CFX)	5ml	250mg	100mg (6mg CFX)	--
PECs + Osso + MP (CFX) + CFX	5ml	250mg	50mg (3mg CFX)	3mg

Procedeu-se à libertação *in vitro* dos sistemas descritos na tabela 4.3.

A libertação *in vitro* foi realizada com os diferentes sistemas colocados numa membrana de diálise (*cut-off* de aproximadamente 12000 Da) que estava imersa numa solução de 280 ml de PBS a cerca de 37°C.

4.3.2. Resultados e Discussão

A morfologia das micropartículas de PLA produzidas pode ser observada nas imagens de SEM apresentadas na Figura 4.15. Facilmente se infere que as micropartículas apresentam grande diversidade de tamanhos, são bastantes porosas e algumas delas evidenciam ser ocas.

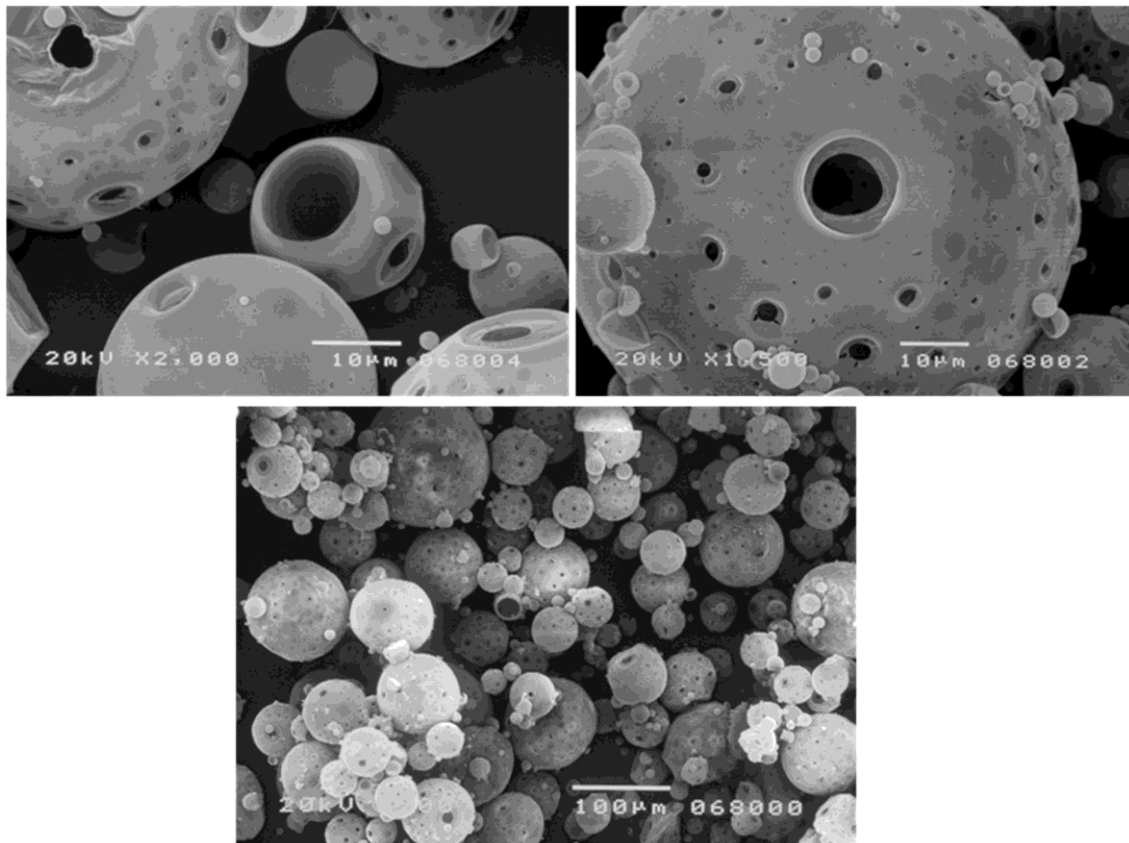


Figura 4.15 - Imagens de SEM das micropartículas de PLA com CFX encapsulado.

Na Tabela 4.4 são apresentados os valores obtidos para a quantidade experimental de antibiótico encapsulado e a eficiência de encapsulamento (EE) do antibiótico.

Tabela 4.4 - Eficiência de encapsulamento do antibiótico (média \pm desvio padrão; n = 3).

Quantidade teórica de antibiótico encapsulado (% m/m)	Quantidade experimental de antibiótico encapsulado (% m/m)	Eficiência de encapsulamento EE (%)
16,7	6,11 \pm 0,24	36,6 \pm 1,4

Como se vê, a eficiência de encapsulamento é cerca de 37%, o que significa que mais de metade do antibiótico adicionado à fase orgânica é perdido para a fase aquosa externa durante o processo de solidificação das micropartículas poliméricas. Esta relativa baixa eficiência do processo de encapsulamento deve-se, essencialmente, à elevada hidrofiliabilidade do antibiótico, que origina que este se distribua preferencialmente na fase aquosa.

Para melhorar a eficiência de encapsulação poderia utilizar-se outro método para a produção de micropartículas, ou tentar otimizar as variáveis operacionais do processo utilizado de forma de forma a maximizar a eficiência de encapsulamento.

O aspecto das matrizes de pectina/quitosano com partículas de osso e micropartículas de PLA-CFX está ilustrado nas imagens de SEM apresentadas na Figura 4.16.

Os três constituintes das matrizes são facilmente identificáveis. Com efeito, nas Figuras 4.16 a) e b) é possível visualizar as micropartículas de PLA-CFX aprisionadas na matriz de pectina/quitosano. Enquanto nas Figuras 4.16 c) e d) são visíveis partículas de osso com a matriz polimérica e as micropartículas aderentes à sua superfície. Nas Figuras 4.16 e) e f) destacam-se duas zonas assinaladas na Figura 4.16 d).

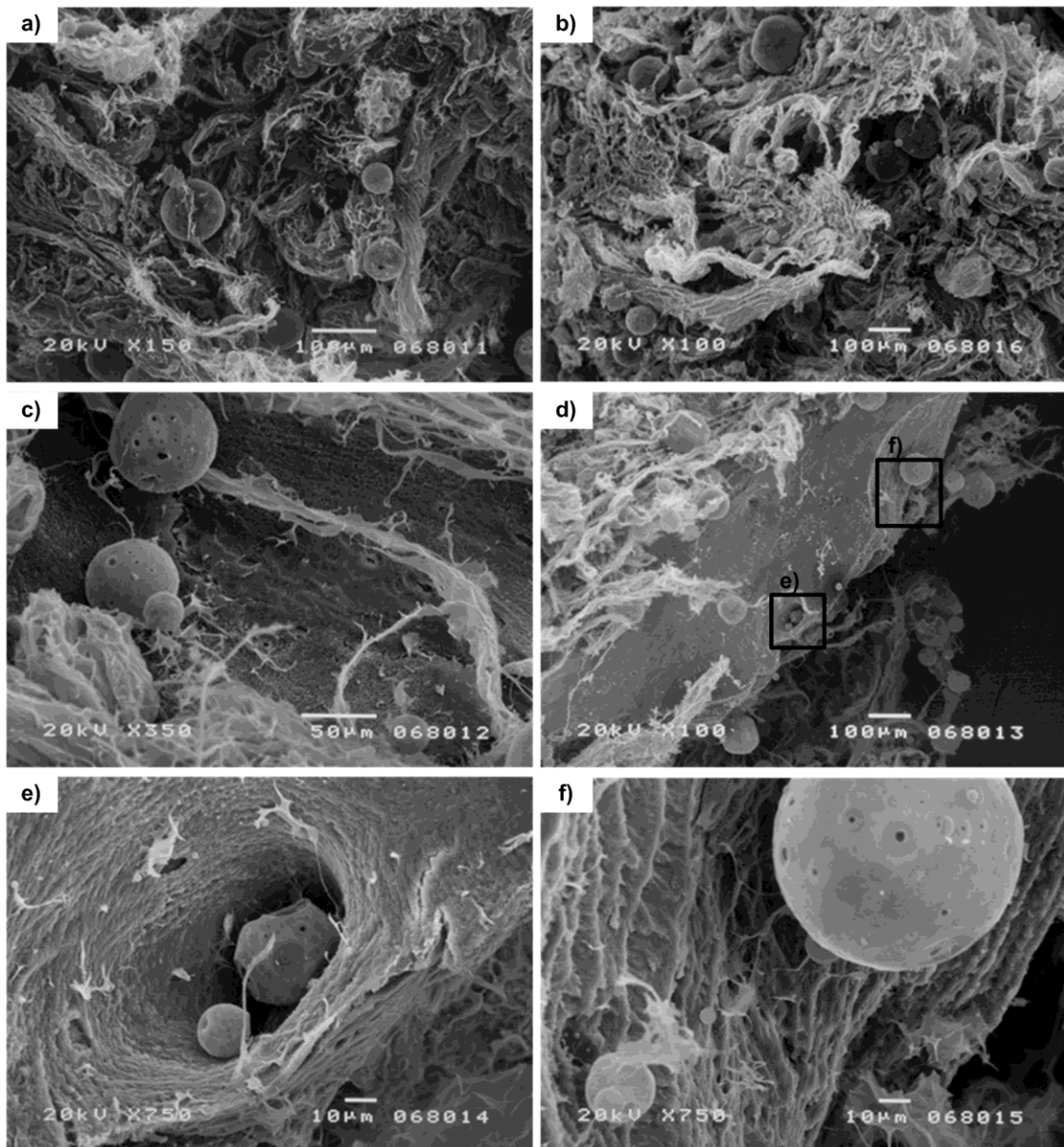


Figura 4.16- a) e b) Micropartículas de PLA-CFX aprisionadas na matriz polimérica formada pelos PECs de pectina e quitosano; c) e d) Partícula de osso envolta na matriz polimérica e micropartículas; e) e f) Ampliação de duas zonas apresentada em d).

Na Figura 4.17 são apresentados os perfis de libertação *in vitro* da Ceftriaxona:

- (i) A partir das micropartículas de PLA-CFX por si só (MP(CFX));
- (ii) A partir da esponja de pectina/quitosano com partículas de osso, micropartículas (PECs + Osso + MP (CFX));
- (iii) A partir da esponja de pectina/quitosano com partículas de osso, micropartículas com antibiótico incorporado e antibiótico disperso (PECs + Osso + MP (CFX) + CFX);

(iv) E para comparação, da esponja de pectina/quitosano com partículas de osso e antibiótico disperso (PECs + osso + CFX).

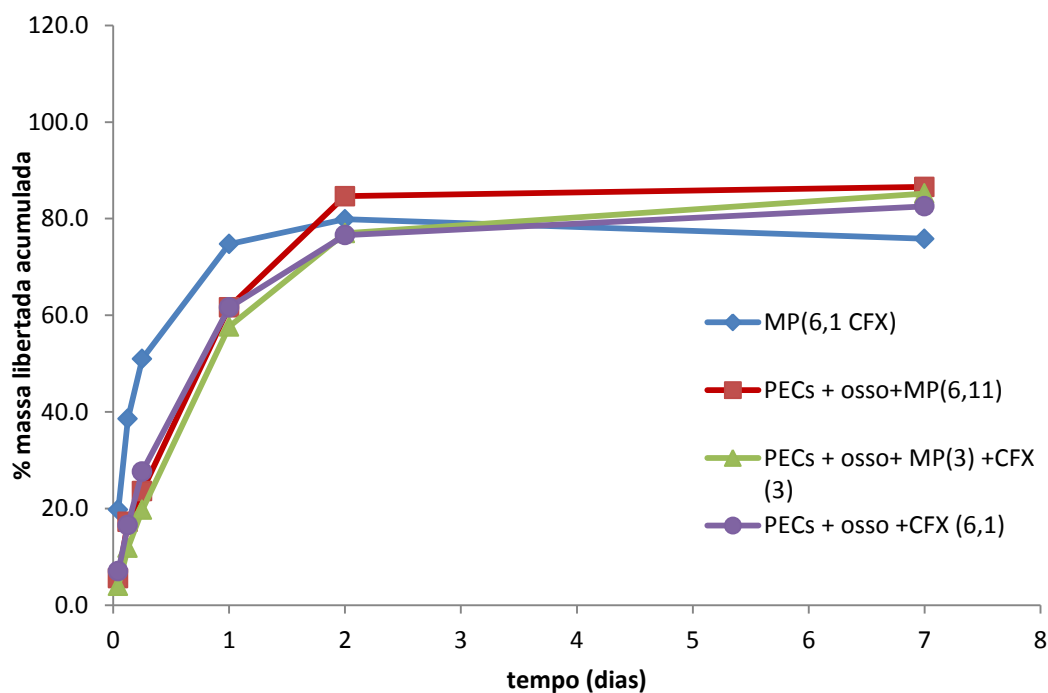


Figura 4.17 - Perfis de libertação in vitro da Ceftriaxona encapsulada nas micropartículas.

Similarmente ao que acontece nos outros casos, por análise do gráfico podemos concluir que a encapsulação do antibiótico nas micropartículas não torna a libertação mais gradual.

Em todos os sistemas de libertação preparados, a libertação de praticamente todo o fármaco libertado durante o ensaio dá-se nos dois primeiros dias, não existindo diferenças significativas entre os sistemas onde a Ceftriaxona está encapsulada nas micropartículas de PLA e no sistema em que a Ceftriaxona está apenas dispersa na matriz polimérica. Isto indica que a Ceftriaxona encapsulada nas micropartículas não se encontra efectivamente aprisionada nestas. A morfologia das micropartículas, porosas e ocas, poderá justificar o não aprisionamento do antibiótico.

Devido à marcada natureza hidrofílica do antibiótico, o encapsulamento numa matriz hidrofóbica, como é o caso do PLA, é uma tarefa difícil e que requer a optimização do processo de encapsulamento e fabricação das micropartículas. Assim, esta tarefa terá de ser feita em futuros trabalhos.

Capítulo 5

Conclusão e sugestões para trabalho futuro

Ao longo deste trabalho, foram preparados e caracterizados diversos sistemas de libertação local de um antibiótico. Em todos estes sistemas foi utilizada matriz óssea bovina, como suporte para a imobilização do antibiótico, ou apenas como um dos constituintes do sistema.

Numa primeira fase investigou-se a imobilização covalente do antibiótico à superfície do osso na forma de placas. Os resultados experimentais permitem-nos concluir que existe antibiótico imobilizado à superfície do osso, mas não foi possível concluir nada acerca da natureza dessa imobilização, ou seja, se a imobilização é de natureza química ou física. Para esclarecer esta questão será necessário recorrer a outros métodos experimentais e técnicas de caracterização. Seguidamente revestiram-se as placas de osso com pectina sendo o antibiótico posteriormente ligado à pectina, verificando-se a mesma dificuldade em detectar o antibiótico.

Posteriormente, tentou ligar-se o antibiótico apenas fisicamente à superfície das placas (por simples impregnação) revestindo-se seguidamente as placas com bicamadas de polielectrólito pectina/quitosano. Os resultados obtidos através dos perfis de libertação *in vitro* de amostras revestidas com várias bicamadas e sem nenhum revestimento (isto é, apenas impregnadas com antibiótico) revelaram que o antibiótico interage fortemente com a matriz óssea impedindo a sua libertação.

Adoptou-se então outro tipo de estratégia, designadamente a de utilizar a matriz óssea na forma de partículas, as quais eram combinadas com uma fase polimérica, constituída por complexos polielectrolíticos (PECs) formados entre a pectina e o quitosano. A liofilização das partículas de osso envolvidas no gel de PECs deu origem a uma matriz-compósito com uma elevada porosidade (esponja). O antibiótico foi imobilizado nesta matriz base, durante a sua preparação, de diferentes

formas: por simples dispersão física, ligado covalentemente a um dos polímeros da fase polimérica, ou encapsulado em micropartículas de PLA, que por sua vez foram dispersas na matriz-compósito. Os ensaios de libertação *in vitro* mostraram que o antibiótico incorporado nestes sistemas é libertado praticamente todo durante o primeiro dia.

Este perfil de libertação seria expectável para o primeiro sistema, onde o fármaco foi incorporado por uma simples dispersão física. Pelo contrário, para o sistema onde o antibiótico foi encapsulado nas partículas de PLA, esperava-se uma libertação gradual do antibiótico ao longo de várias semanas (ou até meses), controlada pela difusão deste através da matriz de PLA e pela biodegradação desta mesma matriz. A rápida libertação do antibiótico, e a morfologia das micropartículas de PLA obtidas, observada por análise SEM, indicam que o antibiótico não foi encapsulado como era desejado nas micropartículas de PLA. Assim, será necessária a optimização do processo de formação das micropartículas de forma a encontrar os parâmetros operacionais que conduzam a uma imobilização efectiva do fármaco nas micropartículas.

Contudo, o sistema onde a Ceftriaxona foi imobilizada por uma ligação química às cadeias de pectina, apresentou o perfil de libertação do antibiótico mais sustentado ao longo do tempo. Assim, este tipo de imobilização tem potencial para ser explorado para preparar um sistema com uma libertação mais prolongada. No entanto, com esta estratégia a quantidade de antibiótico incorporada no sistema é limitada, o que impede a sua identificação por técnicas rotineiramente utilizadas como o FTIR. Assim, propõe-se por exemplo, que se avalie a capacidade destes sistemas, ao longo do tempo, para eliminar e prevenir o crescimento de colónias de certas bactérias patogénicas através de testes *in vitro* com uma estirpe de um microrganismo sensível ao antibiótico imobilizado.

De qualquer modo, com este trabalho demonstrou-se que é possível a combinação de matriz óssea e materiais poliméricos na preparação de sistemas de libertação controlada de antibióticos. Os vários sistemas preparados, e as diferentes estratégias utilizadas para a imobilização do antibiótico, poderão ser explorados no futuro no desenvolvimento de sistemas de libertação de antibióticos eficazes.

Bibliografia

- [1] **Rodrigues FC.** O Corpo Humano e a Saúde. Didacta Enciclopédia Temática Ilustrada Fernando. Lisboa. 1995.
- [2] **Seeley RR, Stephens TD, Tate P.** Anatomia&Fisiologia. Lusodidacta. 3.ª edição.
- [3] <http://www.auladeanatomia.com/osteologia/generalidades.htm> [acedido em 20.05.2011]
- [4] **Nather Aziz, Ong HJC, Aziz Zameer.** Structure of Bone. Bone grafts and bone substitutes - Basic Science and Clinical Applications. [<http://www.worldscibooks.com/medsci/5695.html>]
- [5] <http://www.infoescola.com/histologia/tecido-osseo/> [acedido em 20.05.2011]
- [6] **Gutierrez M, Lopes MA, Hussain NS, Cabral AT, Almeida L, Santos JD.** Susbtitutos ósseos. Arquivos de Medicina. 2006; 19.
- [7] **Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E.** Bone substitutes: an update. Injury. 2005;36 Suppl 3:S20-7.
- [8] **Murugan R, Ramakrishna S.** Development of nanocomposites for bone grafting. Composites Science and Technology. 2005;65:2385-406.
- [9] **Delloye C, Cornu O, Druetz V, Barbier O.** Bone allografts - What they can offer and what they cannot. Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume. 2007;89B:574-9.
- [10] **Ilan DI, Ladd AL.** Bone Graft Substitutes. Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery. 2003; 9, No 4:151-160
- [11] **Lyra MAM etal.** Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. Latin American Journal of Pharmacy. 2007; 26(5):784-93
- [12] **Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE.** Biomaterials Science.An Introduction to Materials in Medicine ed. A. Press. 1996; 346
- [13] **Nandi SK, Mukherjee P, Roy S, Kundu B, De DK, Basu D.** Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis - A review. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications. 2009;29:2478-85.
- [14] **Coimbra PMA.** Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural. Tese de doutoramento. Faculdade Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. 2010
- [15] **Azevedo MMM.** Nanoesferas e a libertação controlada de fármacos. Laboratório de Química do Estado Sólido, Instituto de Química.
- [16] **Reis R et al.**Natural-based polymers for biomedical applications. Cambridge, Woodhead Publishing Limited. 2008.
- [17] **Soundrapandian C, Sa B, Datta S.** Organic-Inorganic Composites for Bone Drug Delivery. Aaps Pharmscitech. 2009;10:1158-71.
- [18] **Rouxinol FS.** Preparação de nanopartículas para sistemas de libertação controlada de substâncias activas usadas no tratamento de doenças oftalmológicas. Tese de mestrado. Faculdade Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. 2009
- [19] **Hendriks JGE, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ.** Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. Biomaterials. 2004;25:545-56.
- [20] **Rhyu KH, Jung MH, Yoo JJ, Lee MC, Seong SC, Kim HJ.** In vitro release of vancomycin from vancomycin-loaded blood coated demineralised bone. International Orthopaedics. 2003;27:53-5
- [21] **Kazimoglu C, Karapinar H, Sener M, Afsar I, Sener AGK, Akgun U.** In vitro evaluation of gentamicin and teicoplanin release from cancellous human bone. Acta Orthopaedica Et Traumatologica Turcica. 2008;42:64-9.

- [22] **Zalavras CG, Patzakis MJ, Holtom P.** Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2004;86-93.
- [23] **Witso E, Persen L, Loseth K, Benum P, Bergh K.** Cancellous bone as an antibiotic carrier. Department of Orthopaedic Surgery, University Hospital, Trondheim, Norway. 2000 Feb;71(1):80-4.
- [24] **Witso E, Persen L, Benum P, Bergh K.** Cortical allograft as a vehicle for antibiotic delivery. Department of Orthopaedic Surgery, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim. 2005 Aug;76(4):481-6.
- [25] **Witso E, Persen L, Benum P, Bergh K:** Release of netilmicin and vancomycin from cancellous bone. *ActaOrthopScand*2002, 73(2):199-205.
- [26] **Winkler H, Janata O, Berger C, Wein W, Georgopoulos A.** In vitro release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine
- [27] **Mathijssen NMC, Petit PLC, Pilot P, Schreurs BW, Buma P, Bloem RM.** Impregnation of bone chips with antibiotics and storage of antibiotics at different temperatures: an in vitro study. *Bmc Musculoskeletal Disorders*. 2010;11.
- [28] **Çalış S, Sayın B, Atilla B, Sargon MF, Hincal AA.** Evaluation of vancomycin impregnated bone grafts and vancomycin loaded poly(lactide-co-glycolide) (PLGA (75:25)) microspheres-bone grafts blend for the treatment of surgical bone infections.
- [29] **Ketonis C, Barr S, Shapiro IM, Parvizi J, Adams CS, Hickok NJ.** Antibacterial activity of bone allografts: Comparison of a new vancomycin-tethered allograft with allograft loaded with adsorbed vancomycin. *Bone*. 2011;48:631-8.
- [30] **Ketonis C, Barr S, Adams CS, Shapiro IM, Parvizi J, Hickok NJ.** Vancomycin Bonded to Bone Grafts Prevents Bacterial Colonization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55:487-94.
- [31] **Ai H, Jones SA, Lvov YM.** Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2003;39:23-43.
- [32] **Jiang B, Barnett JB, Li B.** Advances in polyelectrolyte multilayer nanofilms as tunable drug delivery systems. *Nanotechnology, Science and Applications* 2009;2 21–27.
- [33] **Jiang B, Li B.** Polypeptide Nanocoatings for Preventing Dental and Orthopaedic Device-Associated Infection: pH-Induced Antibiotic Capture, Release, and Antibiotic Efficacy. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*. 2009;88B:332-8.
- [34] **LiH, Ogle H, Jiang B, Hagar M, Li B.** Cefazolin Embedded Biodegradable Polypeptide Nanofilms Promising for Infection Prevention: A Preliminary Study on Cell Responses. *Journal of Orthopaedic Research*. 2010;28:992-9.
- [35] **Moskowitz JS, Blaisse MR, Samuel RE, Hsu H-P, Harris MB, Martin SD, Lee JC, Spector M, Hammond PT.** The effectiveness of the controlled release of gentamicin from polyelectrolyte multilayers in the treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a rabbit bone model. *Biomaterials*. 2010;31:6019-30.
- [36] **Chiarelli PA, Johal MS, Holmes DJ, Casson JL, Robinson JM, Wang HL.** Polyelectrolyte spin-assembly. *Langmuir*. 2002;18:168-73.
- [37] **Johal MS, Casson JL, Chiarelli PA, Liu DG, Shaw JA, Robinson JM, Wang HL.** Polyelectrolyte Trilayer Combinations Using Spin-Assembly and Ionic Self-Assembly. 2003; 19.
- [38] **Spin Coating:** <http://home.wanadoo.nl/tom.peeters/Subpaginas/spin%20coating.htm> [acedido em 29.07.2011]
- [39] **Tan ML, Choong PFM, Dass CR.** Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*. 2010; 31, (1), 184-193.
- [40] **Freiberg S, Zhu X.** Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;282:1-18.
- [41] **Elkharraz k, Ahmed AR, Dashevsky A, Bodmeier R.** Encapsulation of water-soluble drugs by an o/o/o-solvent extraction microencapsulation method. *International Journal of Pharmaceutics* 409. 2011; 89–95

- [42] **Freitas S, Merkle HP, Gander B.** Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*. 2005, 102, (2), 313-332.
- [43] **Li M, Rouaud O, Poncelet D.** Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008; 363, (1-2), 26-39.
- [44] **Wischke C, Schwendeman SP.** Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;364:298-327.
- [45] **Figueiredo M, Cunha S, Martins G, Freitas J, Judas F, Figueiredo H.** Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of cortical bone. *Chemical Engineering Research and Design*. 2010.
- [46] **Kimura-Suda H, Kajiwara M, Matsumoto N, Murayama H, Yamato H.** Characterization of Apatite and Collagen in Bone with FTIR Imaging. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2009;505:302-7.
- [47] **Chang MC, Tanaka J.** FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials*. 2002;23:4811-8.
- [48] **Zhao W, Zhang Y, Li QM.** Indirect spectrophotometric determination of sodium ceftriaxone with n-propyl alcohol-ammonium sulfate-water system by extraction flotation of copper(II). *Clinica Chimica Acta*. 2008;391:80-4.
- [49] **Anacona JR, Rodriguez A.** Synthesis and antibacterial activity of ceftriaxone metal complexes. *Transition Metal Chemistry*. 2005;30:897-901.
- [50] **Cho SW, Lee JS, Choi SH.** Enhanced oral bioavailability of poorly absorbed drugs. I. Screening of absorption carrier for the ceftriaxone complex. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93:612-20.
- [51] **Ferreira BLA.** Identificação da atividade antibiótica e relação estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal. Universidade federal Fluminense. 2007.
- [52] **Glaria MD, Mosciati GG, Ramos RG, Riquelme MM.** Stability of ceftriaxone in water and cerebrospinal fluid determined by high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2003;26:939-42.
- [53] **Esposito S, Mittelkötter U.** Ceftriaxone prophylaxis in abdominal, cardiovascular, thoracic, orthopaedic, neurosurgical and general surgery: A review of practice 1996-2003. *Journal of Chemotherapy*. 2005;17:17-32.
- [54] **Owens HM, Dash AK.** Profiles of Drug Substances. Department of Pharmacy Sciences Omaha. 2003;30:21-28.
- [55] **Brandão EM, Andrade CT.** Influência de Fatores Estruturais no Processo de Gelificação de Pectinas de Alto Grau de Metoxilação. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 1999; 9:38-44
- [56] **Purcell JM, Fishman ML.** Dissociation of dissolved pectins: Fourier-transform infrared spectroscopy. *Carbohydrate Research*. 1987; 159:185-190
- [57] **Pinto LFMS.** Síntese e estudo de derivados do quitosano com potencial interesse biológico e ambiental. Tese de mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 2005
- [58] **Monteiro NS.** Caracterização de matrizes de Quitosano para a regeneração de tecidos produzidas pela técnica de TIPS. Tese de mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova Lisboa. 2008
- [59] **Paulino AT, Simionato JI, Garcia JC, Nozaki J.** Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate Polymers*. 2006;64:98-103.
- [60] **Simões MS.** Desenvolvimento e estudo in vitro de implante biorreabsorvível em poli(L-lactídeo) (PLLA) para artrodese de coluna lombar. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- [61] **Wen Y, Gallego MR, Nielsen LF, Jorgensen L, Everland H, Møller EH, Nielsen HM.** Biodegradable nanocomposite microparticles as drug delivering injectable cell scaffolds. *Journal of Controlled Release*. 2011.
- [62] **Hans ML, Lowman AM.** Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002. 6(4): p. 319-327.

- [63] **Sodergard A, Stolt M.** Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*, 2002. 27(6): p. 1123-1163.
- [64] **Jahno VD, Ligabue R, Einloft S, Ribeiro GBM, Santos LA, Ferreira MRWF, Bombonato-Prado KF.** Síntese e caracterização do poli(Ácido L-Láctico) e sua avaliação em culturas de osteoblastos humanos. 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. 2006
- [65] **Middleton JC, Tipton AJ.** Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 2000; 21(23):2335-2346.
- [66] **Schliecker G, et al.** Characterization of a homologous series of lactic acidoligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics in vitro. *Biomaterials*. 2003; 24(21):3835-3844.
- [67] **Park TG.** Degradation of poly(D,L-lactic acid) microspheres - Effect of molecular-weight. *Journal of Controlled Release*. 1994; 30(2):161-173.
- [68] **FTIR:** http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd7149894026/unrestricted/ETD_CHAPTER_4.PDF [acedido em 02.06.2011]
- [69] **FTIR:** <http://www.siliconfareast.com/FTIR.htm> [acedido em 02.06.2011]
- [70] **FTIR:** http://www.shimadzu.com.br/analitica/aplicacoes/espectrofotometros/ftir/NT-FTIR-011-Prep_pastilhas_KBr_para_FTIR.pdf [acedido em 02.08.2011]
- [71] **FTIR:** <http://br.monografias.com/trabalhos/aplicacao-metodolgias-ftir/aplicacao-metodolgias-ftir.shtml> [acedido em 02.08.2011]
- [72] **FTIR:** http://shop.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FTIRATR.pdf [acedido em 02.06.2011]
- [73] **Espectrofotometria:** http://www.anaseca.uac.pt/pdf_bioquimica/introd_espectrof.pdf [acedido em 02.06.2011]
- [74] **Espectrofotometria:** <http://plato.if.usp.br/~fap0181d/texts/espectro-2006.pdf> [acedido em 02.06.2011]
- [75] **SEM:** <http://home.utad.pt/~ume/Fundamentos%20Te%F3ricos.pdf> [acedido em 02.06.2011]
- [76] **SEM:** <http://www.purdue.edu/rem/rs/sem.htm> [acedido em 02.06.2011]
- [77] **EPMA:** <http://eps.berkeley.edu/department/facilities/epml/intro.pdf> [acedido em 06.07.2011]
- [78] **EPMA:** http://www1.tu-darmstadt.de/fb/ms/studium/lab_course_EPMA.pdf [acedido em 06.07.2011]
- [79] **Carbodimides (EDAC): Heterobifunctional cross-linkers:**
<http://www.interchim.fr/ft/5/52005A.pdf> [acedido em 06.08.2011]
- [80] **Covalent Coupling of Proteins to Carboxylated Polystyrene Microparticles by the "Carbodiimide" Method:**
<http://www.polysciences.com/SiteData/docs/TDS%20238C/d45dc260ae457216da32c7fadf8da780/TDS%20238C.pdf> [acedido em 06.08.2011]
- [81] **Araújo PM, et al.** Sulfated fucan as support for antibiotic Immobilization. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2004) 37: 301-305.
- [82] **Shi M, Kretlow JD, Nguyen A, Young S, Scott Baggett L, Wong ME, Kasper FK, Mikos AG.** Antibiotic releasing porous polymethylmethacrylate constructs for osseous space maintenance and infection control. *Biomaterials*. 2010. 31(14):4146-56.

Anexos

Reagentes

Na Tabela A.1 são apresentados os reagentes utilizados, bem como o grau de pureza, fornecedor e número de registo no *Chemical Abstracts Service* (CAS).

Tabela A.1 - Lista de reagentes utilizados.

Reagente	Pureza	Marca	CAS
Quitosano de baixa viscosidade	-	Fluka	9012-76-4
Pectina de citrinos (91,0 % AGal; 8,9% OCH ₃)	-	Sigma	900-69-5
Poli(ácido L-lático) (Ingeo2002D)	-	NatureWorks	26100-51-6
Gelatina do tipo A de origem porcina	?	Sigma	9000-70-8
Poli(álcoolvinílico) (PVA), hidrolizado a 98%, Mw 13000-23000	?	Sigma	9002-89-5
Ceftriaxona sódica (CeftriaxonaMesporin®)	?	Mepha	74578-69-1
Hidróxido de sódio	?	PRONALAB	1310-73-2
Ácido clorídrico 37%	-	PRONALAB	7647-01-0
Tampão fosfato salino (tablets) (PBS)	-	Sigma	-
Cloreto de sódio	99,8%	Riedel-deHaen	7647-14-15
Acetato de sódio	>99%	SigmaUltra	127-09-3
Ácido acético	96%	Merk	64-19-7
Ácido 2-N-(morfolino)etanosulfónico (MES)	?	Boehringer Mannheim GmbH	4432-31-9
2-N-[morfolino] etano sulfonato de sódio (MESNa)	> 99%	Sigma	71119-23-8
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)	>98.0%	Fluka	25952-53-8

carbodiimida HCL (EDC)			
Diclorometano	99,5%	Sigma	75-09-2
Etanol de lavagem	96%	Vaz Pereira	64-17-5

Equipamentos utilizados

Na Tabela A.2 são apresentados os equipamentos utilizados, bem como a técnica que os utiliza, marca, modelo e origem.

Tabela A.2 - Lista de equipamentos utilizados.

Equipamento	Técnica	Marca	Modelo	Origem
- Espectrofotómetro		JASCO	FT/IR – 4200 Mk II Golden	Inglaterra
- Acessório ATR	FTIR-ATR	SPECAC	GateTM com cristais de diamante	Inglaterra
- Microscópio electrónico de varrimento	SEM	JEOL	JSM - 5310	Japão
- Analisador elementar	Análise Elementar	FISONS Instruments	EA1108 CHNS-O	
- Espectrofotómetro UV/Vis	Libertação <i>in vitro</i>	JASCO	JASCO 550	
- Microsonda	EPMA	CAMECA	CAMECA 5 x 50	