

Mariana Soares Almeida dos Santos

Desenvolvimento de membranas fibrosas para a libertação controlada e localizada de antibióticos

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, especialização em Biosistemas, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Mariana Soares Almeida dos Santos

Desenvolvimento de membranas fibrosas para a libertação controlada e localizada de antibióticos

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, sob a orientação da Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo e da Investigadora Pós-doc. Patrícia Manuela Almeida Coimbra
Apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Supervisores

Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo
Investigadora Pós-doc. Patrícia Manuela Almeida Coimbra

Instituições

Departamento de Engenharia Química Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Coimbra

2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“We must become the change we want to see”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Quero começar por agradecer às orientadoras desta tese, a Professora Doutora Maria Margarida Figueiredo e à Doutora Patrícia Coimbra pela sua orientação, conselhos, e a disponibilidade que sempre apresentaram para me ajudar.

Gostaria também de agradecer, a todos aos meus amigos que me acompanharam ao longo do curso. Em particular apresento os meus agradecimentos à Marta Duarte pela grande amizade demonstrada ao longo destes últimos anos.

Por fim, quero agradecer a minha família pelo apoio incondicional, por toda a ajuda e compreensão, pelo apoio fundamental e incansável.

A todos, o meu sincero obrigado,

Mariana Santos

RESUMO

A osteomielite – uma infecção do tecido ósseo, normalmente provocada por bactérias - ocorre com alguma frequência após uma cirurgia óssea reconstrutiva ou após a inserção de uma prótese articular. Geralmente, o tratamento desta infecção compreende a administração sistêmica de elevadas doses de antibióticos, por via intravenosa ou oral. Esta estratégia terapêutica, para além de ter o risco da ocorrência de efeitos adversos graves, nem sempre é eficaz, pois a fraca irrigação do tecido ósseo faz com que seja muito difícil atingir e manter, no local afetado, concentrações de antibiótico acima do nível terapêutico.

Face às limitações apresentadas, este trabalho teve como objetivo a produção de membranas fibrosas de base polimérica produzidas pela técnica de *electrospinning*, capazes de atuarem como sistemas de liberação controlada e localizada de antibióticos (SLCs).

Os SLCs vão, assim, possibilitar a liberação gradual e prolongada dos fármacos no local específico em que devem atuar, maximizando desta forma o seu benefício clínico e diminuindo simultaneamente os seus efeitos adversos. Uma vez que estes materiais vão estar inseridos no organismo, é necessário que estes possuam diversas características, nas quais se destacam a biodegradabilidade de forma a que não seja necessário a sua remoção após o tratamento- e a biocompatibilidade. Assim, neste trabalho, optou-se pela utilização dos polímeros poli (ácido láctico) (PLA) e policaprolactona (PCL).

Desta forma, foram incorporados nestas membranas dois fármacos: o sulfato de gentamicina (GS) - que tem como objetivo combater a possível infecção bacteriana - e a dexametasona (DEX), que para além de minimizar uma resposta adversa ao implante possui também a capacidade de promover a regeneração do tecido ósseo.

O carácter hidrofílico do GS propicia uma liberação inicial muito acentuada deste fármaco. Assim, uma possível solução para contornar este problema consiste na imobilização deste fármaco em nanopartículas de sílica mesoporosa (NPSi) e, por sua vez, a incorporação das nanopartículas carregadas com GS (NPSiGS) em matrizes fibrosas produzidas por *electrospinning*.

Desenvolvimento de membranas fibrosas para a libertação controlada e localizada de antibióticos

O trabalho desenvolvido foi dividido em duas fases: a primeira compreende a imobilização do GS nas NPSi e a sua caracterização enquanto que a segunda envolveu a produção e caracterização das membranas fibrosas produzidas pela técnica de *electrospinning*. Nesta segunda etapa prepararam-se várias membranas, onde o GS foi incorporada nas fibras em diferentes formas: i) Na forma “livre”; ii) imobilizada nas NPSi; iii) uma parte na forma livre e outra parte imobilizada em NPSi. Em algumas membranas incorporou-se também, a par com a GS, o anti-íflamatório DEX. Foram também utilizadas duas variantes da técnica de *electrospinning*: o *electrospinning* por *blending*, com a qual se obteve fibras de PLA com uma estrutura homogénea, e o *electrospinning* coaxial, onde se obteve fibras com uma estrutura núcleo-camada externa (*core-shell*), onde o núcleo das fibras é composto de um material diferente da camada externa. Neste último tipo de fibras a GS (nas três formas mencionadas em cima), foi incorporada no núcleo das fibras (formado por PLA), enquanto que a DEX foi incorporada na camada externa, formada por PLC.

As nanopartículas de sílica - antes e depois do carregamento com GS - foram caracterizadas pelo método de adsorção de azoto, que permitiu a obtenção de parâmetros como a área de superfície específica (S), o volume dos poros (V_p) e respetivo diâmetro médio (D_p). A diminuição da S bem como do V_p das NPSiGS relativamente às NPSi demonstrou que o objetivo de incorporar o GS nas NPSi foi conseguido. A quantificação de GS imobilizada nas nanopartículas foi determinada através de uma análise termogravimétrica, tendo-se obtido uma percentagem de carregamento de 43 % (m/m), concluindo-se assim que o GS foi imobilizado com sucesso nas NPSi.

Através da análise SEM foi possível a caracterização morfológica das membranas a partir da qual foi possível observar, de uma forma geral, que todas as membranas apresentavam fibras bem formadas, aleatoriamente distribuídas sendo também possível verificar a presença de alguns *beads*.

Nos estudos de libertação *in vitro* (realizados durante um período de 21 dias) constatou-se que, para todas as membranas, o perfil de libertação do GS é mais rápido do que o perfil de libertação da DEX, tal como seria de esperar, dada a natureza hidrofóbica da DEX e a hidrofílicidade da GS. Verificou-se ainda que nas membranas que possuem os dois fármacos incorporados simultaneamente a presença do GS nas membranas altera o perfil de libertação da DEX, tornando-o mais rápido, relativamente ao perfil da DEX a partir da membrana em que esta se encontra imobilizada sozinha (PLA+ DEX). Ainda nesta situação, através dos perfis de libertação do GS concluiu-se que a presença das NPSiGS na formulação contribui para uma diminuição da cinética de libertação resultando assim um perfil de libertação mais lento e gradual para o caso das membranas compostas por NPSiGS.

Desenvolvimento de membranas fibrosas para a libertação controlada e localizada de antibióticos

Por fim, os resultados obtidos através das membranas produzidas por *electrospinning* coaxial não foram os esperados já que em vez de se obter uma libertação mais lenta e gradual de ambos os fármacos, obteve-se *burst release* elevados para todas as membranas.

Face aos resultados alcançados pode concluir-se que as membranas fibrosas produzidas por *electrospinning* por *blending* podem ser utilizadas como SLCs no tratamento da osteomielite já que possuem a capacidade de libertarem os fármacos de uma forma controlada por um período de tempo desejado. Relativamente às membranas produzidas por *electrospinning* coaxial foi possível obter algumas conclusões, que poderão ser utilizadas como bases para a continuação do trabalho no futuro.

PALAVRAS-CHAVE: Sistemas de libertação controlada, membranas fibrosas, poli (ácido láctico), policaprolactona, *electrospinning*, nanopartículas de sílica, sulfato de gentamicina, dexametasona.

ABSTRACT

Osteomyelitis - a bone infection usually caused by bacteria – occurs with some frequency in the following of a bone reconstructive surgery or implantation of an articular prosthesis. Generally, the treatment of this infection includes the systemic administration of high doses of antibiotics, intravenously or orally. This therapeutic strategy, besides the risk of serious adverse effects, is not always effective, because the poor irrigation of bone tissue makes it very difficult to achieve and maintain, at the affected site, antibiotic concentrations above the therapeutic level.

Considering these restrictions, this work aimed the development of polymeric fibrous implants produced by electrospinning technique, capable of localised and controlled release of antibiotics (SLCs). These SLCs will allow the controlled and sustained release of drugs in the specific site at which they are implanted, thus maximising the clinical benefit of the drugs and simultaneously reducing its adverse effects. As materials that will be inserted in the body, they must have some characteristics like biodegradability - so there will be no need for a second surgical procedure to remove the device after the treatment - and biocompatibility. In this work, two polymers were selected to fabricate the SLC: poly (lactic acid) (PLA) and polycaprolactone (PCL). Also, two different drugs were immobilized in the fibrous implants: gentamicin sulfate (GS) – whose aim is to fight a possible bacterial infection – and dexamethasone (DEX), which minimizes the risk of an eventual adverse reaction to the material and also has the capacity to promote the regeneration of the damaged bone tissue. GS's hydrophilic character promotes a fast and extensive release at the beginning of the process. One possible solution for this problem is the immobilisation of this drug into mesoporous silica nanoparticles (NPSi). These GS loaded nanoparticles will then be introduced into the electrospinning polymer solution.

This work has been developed in two phases: the first one involved the loading of the nanoparticles with GS and its characterization, while the second stage dealt with the production of the drug loaded electrospun membranes and its characterization. In this second stage several membranes have been produced, with GS being loaded in different forms into the fibers: i) entirely in its “free form”; ii) completely immobilized in NPSi; iii) part in its free form and part immobilized in NPSi. In some membranes the anti-inflammatory DEX was also added along with GS. Two different types of electro spinning techniques have also been used:

Desenvolvimento de membranas fibrosas para a liberação controlada e localizada de antibióticos

the blending one, which originated PLA fibers with a homogenous structure; and the coaxial type, that allows the production of fibers with a core-shell structure, where the core material differs from the shell one. In these core-shell fibers the GS – in the three forms mentioned above – was inserted in the fiber's core (made with PLA) while DEX was immobilized in the shell (made of PLC).

Silica nanoparticles – before and after being loaded with GS – were studied using the nitrogen adsorption method, which allowed the determination of certain parameters like the specific surface area, S , pores volume, V_p , and average diameter, D_p . Reduction of S as well as of V_p on NPSiGS when compared with pure NPSi revealed GS was successfully loaded onto the NPSi. The amount of GS immobilized in the nanoparticles was determined through thermo-gravimetric analysis: results showed a 43 % (m/m) loading, thus concluding a successful GS immobilization on NPSi.

Membranes' morphological characterization was made through SEM analysis, showing that, in general, all membranes presented well-formed fibers, randomly distributed. The presence of some beads was also observed.

During the 21 days period of the in vitro releasing studies, it was observed that the GS release profiles were faster than the DEX ones, for all membranes. These were expected, considering the hydrophobic nature of DEX and the hydrophilicity of GS.

Results also showed that, in those membranes in which the two compounds were added simultaneously, GS changed DEX's release profile, speeding it up when compared with the membrane where DEX stands alone (PLA + DEX). Results also showed that in these membranes NPSiGS helped to reduce GS release kinetics, thus giving a slower and balanced release profile. On the contrary, membranes made by co-axial electro spinning didn't achieve the expected results originating, for both drugs, release profiles with accentuated burst releases.

Giving the achieved results we may conclude that nano fibrous membranes produced by blended electro spinning might be used as SLCs for osteomyelitis treatment or prevention, as they help to control –in speed and time- the release of the pharmaceutical compounds. Regarding co-axial electrospinning made-up membranes, the results from this work could be used for future investigation.

KEY-WORDS: controlled release systems, fibrous membrane, poly (lactic acid), polycaprolactone, electrospinning, silica nanoparticles, gentamicin sulphate, dexamethasone

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 - OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE	1
1.1. Motivação	1
1.2. Objetivos	3
1.3. Estrutura do trabalho	3
CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
2.1. Sistema de libertação controlada de fármacos	5
2.1.1. Sistemas de libertação controlada de fármacos de base polimérica	6
2.1.2. Nanopartículas de sílica enquanto sistema de libertação de fármacos	9
2.2. Técnica de preparação de membranas fibrosas como SLC – <i>Electrospinning</i>	10
2.2.1. Membranas produzidas por <i>electrospinning</i> enquanto SLC	11
2.3. Osteomielite	13
2.3.1. Sistema de libertação local de antibiótico para a prevenção/tratamento da osteomielite	14
2.4. Sulfato de gentamicina e Dexametasona	15
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Materiais	21
3.2. Preparação das membranas fibrosas	21
3.2.1. Imobilização do GS nas nanopartículas de sílica	21
3.2.2. Preparação das membranas fibrosas através da técnica de <i>electrospinning</i>	22
3.3. Caracterização das nanopartículas de sílica e das membranas	26
3.3.1. Quantificação do GS incorporada nas nanopartículas	26
3.3.2. Determinação do tamanho de poros através do método de adsorção de azoto	27
3.4. Caracterização das membranas produzidas através da técnica de <i>electrospinning</i>	28
3.4.1. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) das membranas fibrosas	28

<i>Desenvolvimento de membranas fibrosas para a libertação controlada e localizada de antibióticos</i>	
3.4.2. Análise do comportamento hidrofílico das membranas por medição dos ângulos de contacto.....	28
3.4.3. Estudo da libertação <i>in vitro</i> dos fármacos.....	29
3.4.4. Quantificação da dexametasona e gentamicina através da espectrofotometria UV/VIS	30
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Caracterização das Nanopartículas de Sílica	31
4.1.1. Quantificação de GS incorporado nas nanopartículas de sílica com base na técnica de termogravimetria	31
4.1.2. Caracterização morfológica das NPSi	33
4.2. Caracterização das membranas fibrosas	35
4.2.1. Morfologia das fibras por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).....	36
4.2.2. Análise do comportamento hidrofílico das membranas fibrosas.....	43
4.2.3. Estudo da libertação <i>in vitro</i> dos fármacos.....	45
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	52
5.1. Conclusão Geral.....	52
5.2. Perspetivas Futuras	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	I
ANEXO I- AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE CARREGAMENTO DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA.....	II
ANEXO II - PROTOCOLO CURVA DE CALIBRAÇÃO DE DEXAMETASONA E DO SULFATO DE GENTAMICINA.....	III

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1- Representação do nível de fármaco no sangue no caso de (a) administração do fármaco tradicional e (b) administração do fármaco através de um SLC	5
Figura 2.2- Estrutura do PLA.	8
Figura 2.3-Estrutura química da policaprolactona.....	9
Figura 2.4-Diagrama esquemático de um sistema de fibras incorporado com um sistema de entrega de fármacos à base de nanopartículas, e a sua cinética de libertação.	12
Figura 2.5- Comparação entre a configuração do <i>electrospinning</i> coaxial e o <i>electrospinning</i> por <i>blending</i>	13
Figura 2.6-Estrutura química do sulfato de gentamicina.....	16
Figura 2.7- Estrutura química da dexametasona.	17
Figura 3.1- Esquema das etapas do procedimento experimental.....	20
Figura 3.2- Esquema representativo das várias etapas necessárias para incorporar o GS nas NPSi.....	22
Figura 3.3- Esquema da montagem do sistema de <i>electrospinning</i> por <i>blending</i>	24
Figura 3.4- Esquema da montagem do sistema de <i>electrospinning</i> coaxial.....	26
Figura 4.1-Perfis de degradação das NPSi, NPSiGS e GS.....	32
Figura 4.2-Gráfico das curvas isotérmicas de adsorção/dessorção de azoto das NPSi e das NPSiGS.....	35
Figura 4.3-A1, B1, C1: Fotografia da superfície das nanofibras de PLA-GS, PLA-NPSiGS e PLA-GS-NPSiGS obtidas através da técnica SEM para uma ampliação de 1000x e respetivos histogramas (A2, B2 e C2). B3 e C3: -Fotografia da superfície das nanofibras PLA-NPSiGS e PLA-GS-NPSiGS para uma ampliação de 30000 x.	37
Figura 4.4-D1, E1, F1, G1: Fotografia da superfície das nanofibras de PLA-DEX, PLA-GS-DEX, PLA-NPSiGS-DEX e PLA-GS-NPSiGS-DEX obtidas através da técnica SEM para uma ampliação de 1000x e respetivos histogramas (D2, E2, F2 e G2). F3 e G3: -Fotografia da superfície das nanofibras, PLA-NPSiGS-DEX e PLA-GS-NPSiGS-DEX para uma ampliação de 30000 x.	39
Figura 4.5-H1, I1, J1: Fotografia da superfície das nanofibras de PLA-GS/PCL-DEX, PLA-NPSiGS/PCL-DEX e PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX obtidas através da técnica SEM para uma	

Desenvolvimento de membranas fibrosas para a liberação controlada e localizada de antibióticos

ampliação de 1000x e respectivos histogramas (H2, I2, J2). H3, I3 e J3: -Fotografia da superfície das nanofibras PLA-GS/PCL-DEX, PLA-NPSiGS/PCL-DEX e PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX para uma ampliação de 30000 x.....41

Figura 4.6- Modelo do ângulo de contacto para membranas fibrosas.....43

Figura 4.7- Representação da distribuição da média e desvio padrão dos ângulos de contacto para todas as amostras.44

Figura 4.8- Perfil de libertação (%) de sulfato de gentamicina libertado ao longo de 21 dias.46

Figura 4.9-Comparação do perfil de libertação (%) entre libertação dos dois fármacos sulfato de gentamicina (A) e dexametasona (B) para as membranas: PLA-DEX, PLA-GS-DEX, PLA-NPSiGS-DEX e PLA-GS-NPSiGS-DEX.....48

Figura 4.10-Comparação do perfil de libertação (%) entre libertação dos dois fármacos sulfato de gentamicina (A) e dexametasona (B) para as membranas coaxiais: PLA-GS/PCL-DEX, PLA-NPSiGS/PCL-DEX e PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX.50

Figura AII.1- Curva de calibração do Sulfato de Gentamicina.IV

Figura AII.2- Curva de calibração da dexametasona. V

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Exemplos de polímeros sintéticos utilizados como SLCs.....	6
Tabela 2.2 - Diferentes polímeros utilizados pela técnica de <i>electrospinning</i> e as suas aplicações.....	11
Tabela 2.3 - Exemplos de alguns SLC de antibióticos desenvolvidos para o tratamento da osteomielite..	15
Tabela 3.1 - Lista de reagentes utilizados neste trabalho experimental.	21
Tabela 3.2 - Composição e formulação das membranas fibrosas utilizadas na abordagem experimental I.	23
Tabela 3.3 - Composição e formulação das membranas fibrosas coaxiais utilizadas na abordagem experimental II.....	25
Tabela 4.1 - Valores obtidos através da análise termogravimétrica.	33
Tabela 4.2 - Valores dos parâmetros obtidos através das isotérmicas de adsorção de azoto.	34
Tabela 4.3 - Distribuição da média e desvio padrão (σ) dos diâmetros (nm) das fibras.	42
Tabela AII.1 - Concentração das soluções padrão de sulfato de gentamicina, e os respetivos valores de absorvância (a 332 nm) após a reação com o reagente OPA, conforme o protocolo descrito na secção 3.3.6.	III
Tabela AII.2 - Concentração das soluções padrão dexametasona e respetiva absorvância a 242 nm.	IV

NOMENCLATURA

BET	Teoria de Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Método de Barret-Joyner-Helenda
<i>C</i>	Concentração das soluções padrão ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
CLO	Clorofórmio
DEX	Dexametasona
DMF	Dimetilformamida
<i>Dp</i>	Diâmetro médio do poro (nm)
GS	Sulfato de Gentamicina
IPN	Instituto Pedro Nunes
<i>m_{perdida}</i>	massa perdida (%)
<i>m_{permanece}</i>	massa que permanece (%)
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PCL	Policaprolactona
PGA	Poli ácido glicólico
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)
PMMA	Poli (metacrilato de metilo)
<i>P/P₀</i>	Pressão Relativa
PU	Poliuretano
<i>S</i>	Área de superfície específica (m^2/g)
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento
SLC	Sistema de liberação controlada
TGA	Termogravimetria
UV	Radiação Ultravioleta
VIS	Radiação Visível
<i>V_p</i>	Volume dos poros (cm^3/g)
σ	Desvio padrão

CAPÍTULO 1 - OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE

1.1. Motivação

Para além de doença e trauma, diversos aspetos, tais como o envelhecimento da população e a adoção de um estilo de vida sedentário estão a contribuir para uma necessidade crescente de soluções eficazes na substituição e regeneração óssea (Costa, 2015).

Contudo, apesar da medicina regenerativa óssea ter sofrido grandes avanços durante os últimos anos, as terapias atuais, como os enxertos ósseos, ainda apresentam diversas limitações (Salgado *et al.*, 2004).

Assim, o tratamento de infeções ósseas, nomeadamente a osteomielite, continua a ser uma situação desafiadora para os cirurgiões ortopédicos. A osteomielite é uma inflamação no osso provocada por bactérias que ocorre com alguma frequência após uma cirurgia óssea reconstrutiva ou após a inserção de um implante (Cook *et al.*, 2015). Esta infeção óssea é causada principalmente pela bactéria *Staphylococcus aureus* (Saidykhan *et al.*, 2016).

Geralmente, o tratamento desta infeção compreende a administração de doses elevadas de antibióticos por via sistémica e, adicionalmente e em casos mais graves, um desbridamento completo de todo o osso infetado, o enchimento da cavidade resultante com um substituto ósseo (Aurégan & Bégué, 2015) sendo que para este caso, não só as próteses infetadas têm que ser removidas e substituídas, como também a vida do próprio paciente pode estar em risco (Campoccia *et al.*, 2010). As elevadas doses de antibióticos administradas por via sistémica acarretam o risco de efeitos adversos graves e nem sempre se mostram eficazes, uma vez que o fornecimento de sangue no tecido ósseo é limitado, o que dificulta que a área infetada adquira as concentrações de antibióticos desejadas (Cao *et al.*, 2015).

Assim, um dos principais avanços no tratamento desta doença foi o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos que têm a capacidade de preencher as cavidades e entregarem o antibiótico localmente (Cao *et al.*, 2015) e, para além de melhorarem a eficiência terapêutica tanto a nível do tratamento como na sua prevenção, possuem também a capacidade de eliminar os riscos de uma toxicidade sistémica provocada pela administração de elevadas doses de antibiótico (Shaik *et al.*, 2012).

Capítulo 1 – Objetivos e Estrutura da Tese

Face ao exposto, existe uma grande motivação para o desenvolvimento de sistemas de libertação local de antibióticos com a capacidade de libertar antibióticos no local infetado em concentrações terapêuticas e de forma prolongada no tempo.

Assim, durante a última década, os sistemas de libertação local de fármacos têm sido intensivamente estudados no campo da cirurgia ortopédica devido à capacidade de libertarem o fármaco de uma forma controlada e direcionada à zona desejada e, por conseguinte, a dosagem do fármaco requerido para o período de tempo desejado é administrado de uma só vez e libertado de forma constante ao longo do tempo (Ho *et al.*, 2005)

Estes sistemas devem apresentar algumas características tais como: biocompatibilidade, estabilidade mecânica, capacidade de carregamento de fármaco elevada e facilidade em serem administrados (Hélary & Desimone, 2015).

Posto isto, atualmente, diversos materiais têm sido desenvolvidos para atuarem como sistemas de entrega de fármacos (Hélary & Desimone, 2015) de onde se destacam os materiais cerâmicos, poliméricos e metálicos (Bongio *et al.*, 2010).

Os polímeros ganharam grande importância nesta área devido à sua diversidade em propriedades químicas e mecânicas relativamente aos restantes (Bongio *et al.*, 2010).

Neste sentido, vários SLCs têm sido investigados nomeadamente micelas (Safari & Zarnegar, 2014) lipossomas, microsferas, nanopartículas (Rani & Paliwal, 2014), e nanofibras (Sharma *et al.*, 2015).

De entre os vários métodos usados na produção de nanofibras, o *electrospinning* tem despertado grande interesse dado que permite a produção de fibras ultra finas à micro e nano escala de baixo custo (Hu *et al.*, 2014) com elevada área de superfície em relação ao volume, porosidade ajustável, elevada flexibilidade e alta eficiência de encapsulação de fármacos (Martins *et al.*, 2007).

Uma forma de obter um perfil de libertação mais prolongado e uniforme é através da incorporação de nanopartículas em fibras poliméricas (Hu & Cui, 2012). Neste processo, as nanopartículas são misturadas com a solução do polímero formando uma dispersão que se vai eletrofiar. Assim, é necessário incorporar, primeiramente, o fármaco nas nanopartículas que, seguidamente, são misturadas com as soluções poliméricas para formar as nanofibras. Esta abordagem mostra-se vantajosa uma vez que reduz a libertação brusca do fármaco permitindo uma libertação mais prolongada e constante, sendo ainda possível a produção de nanofibras com boas propriedades mecânicas (Bannwarth & Crespy, 2014).

1.2. Objetivos

Este trabalho pretende preparar um sistema de liberação controlada (membrana fibrosa de base polimérica) implantável com a capacidade de libertar em simultâneo dois fármacos: um antibiótico (sulfato de gentamicina) e um anti-inflamatório (dexametasona).

Estes sistemas serão produzidos através da técnica de *electrospinning*, uma técnica que tem sido extensivamente estudada para a produção de diversos tipos de nanofibras de diferentes polímeros, sendo os polímeros sintéticos os mais utilizados. Estes polímeros têm excelente biocompatibilidade e estabilidade mecânica adequada para aplicações *in vivo* (Jahan & Tabrizian, 2015) e, desta forma, a escolha dos polímeros a utilizar neste trabalho recaiu sobre os polímeros sintéticos nomeadamente o poli (ácido láctico) (PLA) e a policaprolactona (PCL).

Pretende-se então que este sistema possa ser utilizado em intervenções ortopédicas através da sua implantação junto ao osso intervencionado e que, através da liberação controlada do antibiótico, possa prevenir/tratar uma possível infeção óssea e em simultâneo através da liberação da dexametasona - promova a regeneração do tecido ósseo danificado.

De forma a atingir uma liberação prolongada e controlada do antibiótico gentamicina este será previamente immobilizado em nanopartículas mesoporosas de sílica, que por sua vez serão incorporadas nas nanofibras produzidas.

1.3. Estrutura do trabalho

A Dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos principais. No **Capítulo 1** para além de se apresentarem as razões que motivaram este trabalho, é também evidenciado o objetivo que se pretende atingir.

O **Capítulo 2** inclui um enquadramento teórico sobre o tema, no qual se faz referência ao sistema de liberação controlada de fármacos e se clarificam conceitos a estes essenciais.

São também discutidas as diferentes abordagens do método de *electrospinning* capazes de produzirem nanofibras usadas como veículos de fármacos.

No **Capítulo 3** são apresentados os materiais utilizados na produção das membranas fibrosas e das nanopartículas bem como uma descrição detalhada da preparação destes. Este capítulo compreende ainda a descrição das técnicas utilizadas para a caracterização das nanofibras e das nanopartículas.

Capítulo 1 – Objetivos e Estrutura da Tese

O **Capítulo 4** engloba todos os resultados obtidos e a sua discussão.

No **Capítulo 5** chega-se às conclusões gerais de todo o trabalho experimental e apresentam-se algumas recomendações do trabalho a desenvolver e das linhas/estratégias de investigação a seguir no futuro.

CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Este capítulo compreende os fundamentos teóricos necessários para a compreensão do tema. Assim, começa-se com uma breve introdução sobre sistemas de libertação controlada (SLC) de fármacos, de onde se destacam os sistemas de libertação de base polimérica bem como alguns polímeros sintéticos usados na sua produção. Introduce-se ainda a técnica de *electrospinning*, a técnica utilizada neste trabalho para produzir os SLC desenvolvidos, apresentando-se igualmente as características gerais dos SLC produzidos com recurso a esta tecnologia.

É também descrita uma das infeções mais comuns na cirurgia ortopédica, a osteomielite, e as diversas formas de a combater. Conclui-se o capítulo com uma breve descrição dos fármacos utilizados.

2.1. Sistema de libertação controlada de fármacos

A tecnologia de libertação controlada de fármacos tem progredido ao longo das últimas seis décadas. Esta começou em 1952 com o desenvolvimento da primeira formulação de libertação controlada (Park, 2014). Nas formulações de entrega de fármacos convencionais, tais como as injeções ou comprimidos, a concentração do fármaco no sangue sobe drasticamente quando o fármaco é administrado, atingindo-se a concentração máxima do fármaco no organismo, seguindo-se uma diminuição até à próxima administração (Figura 2.1a) (Shaik *et al.*, 2012). Desta forma, para manter a concentração do fármaco no organismo dentro de um intervalo terapêutico eficaz, é necessário administra-lo várias vezes ao dia, resultando numa flutuação significativa dos seus níveis no organismo (Moura, 2012).

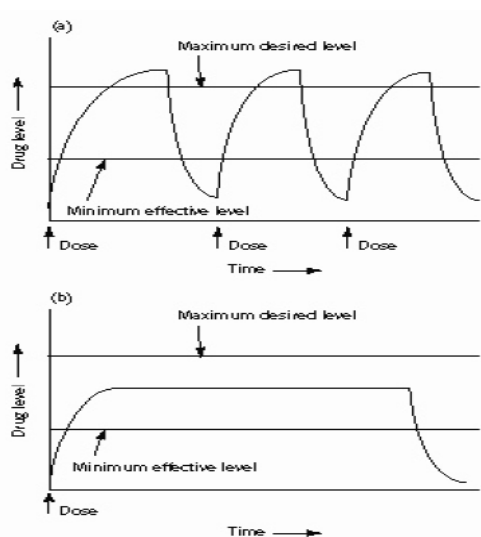


Figura 2.1- Representação do nível de fármaco no sangue no caso de (a) administração do fármaco tradicional e (b) administração do fármaco através de um SLC. Fonte: Shaik *et al.*, 2012

Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos

Estas limitações conduziram ao desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos (SLC), sistemas capazes de conduzir o fármaco para o local onde é preciso e/ou libertá-lo por um período de tempo desejado, a uma taxa controlada (Ikada & Tsuji, 2000).

Através dos SLC é possível manter a concentração do fármaco no organismo dentro do intervalo terapêutico por tempo prolongado, utilizando-se uma única dosagem (Figura 2.1 b) (Moura, 2012).

Uma via promissora para conseguir alcançar a entrega controlada de fármaco é através da incorporação dos agentes terapêuticos em matrizes de natureza polimérica (Engineer *et al.*, 2011).

2.1.1. Sistemas de libertação controlada de fármacos de base polimérica

Os materiais poliméricos, pela sua variedade, diversidade e propriedades, são a classe de materiais mais investigada no desenvolvimento de sistema de libertação controlada.

Os materiais poliméricos utilizados nesta área são de origem natural (como por exemplo, o colagénio, a gelatina e o quitosano (Aravamudhan *et al.*, 2013) e sintética (Bongio *et al.*, 2010; Llorens *et al.*, 2016) .

Os polímeros sintéticos ganharam popularidade nesta área não só devido à ampla capacidade de controlo sobre a cinética de libertação, mas também devido às excelentes propriedades mecânicas apresentadas por estes. Os poliésteres, incluindo o poli (ácido láctico) (PLA), a policaprolactona (PCL) e o poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) são os polímeros sintéticos mais utilizados nesta área (Inzana *et al.*, 2016).

Na Tabela 2.1 encontram-se listados alguns dos polímeros sintéticos mais utilizados e investigados como sistemas de libertação controlada.

Tabela 2.1-Exemplos de polímeros sintéticos utilizados como SLCs. Adaptado de Inzana *et al.*, 2016.

Material	Antibiótico	Referências
PLGA	Gentamicina	(Garvin <i>et al.</i> , 1994)
PLA	Linezolid	(Tsiolis <i>et al.</i> , 2011)
PCL	Vancomicina	(Le Ray <i>et al.</i> , 2005)
PCL	Gatifloxacina	(El-Kamel & Baddour, 2007)
Poliuretano	Vancomicina	(Li <i>et al.</i> , 2010)

Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos

Dado que os materiais poliméricos vão estar presente no organismo, um dos requisitos fundamentais para que estes possam ser utilizados como SLCs é serem biocompatíveis, ou seja a capacidade do implante não apresentar reações imunológicas, como inflamações, toxicidade ou infeções no organismo diminuindo, assim, a possibilidade de o organismo desenvolver uma resposta adversa à presença do biomaterial (Coimbra, 2010; Patel & Gohil, 2012).

Outra característica decisiva na viabilidade de um polímero para ser aplicado nesta área é a forma como este se degrada. Os sistemas de libertação controlada de fármacos de base polimérica podem ser divididos em sistemas biodegradáveis e sistemas não biodegradáveis. Os sistemas biodegradáveis são caracterizados pelo facto de serem constituídos por polímeros suscetíveis de degradação química por hidrólise ou por ação enzimática, originando produtos capazes de serem excretados pelas vias fisiológicas (Nandi *et al.*, 2009).

A degradação de matrizes poliméricas pode ser classificada como degradação na massa ou degradação de superfície. Na degradação na massa, a taxa de penetração da água excede a taxa de degradação e a solubilização das moléculas da superfície, resultando uma degradação de todo o volume do material. No caso da degradação superficial, as moléculas da superfície degradam-se e solubilizam mais rapidamente do que a taxa de penetração da água, resultando uma erosão da superfície, enquanto que o material que não está à superfície mantém a sua integridade estrutural. Num SLC, os polímeros biodegradáveis que apresentam uma degradação na massa, como por exemplo o PLA e o PLGA geralmente produzem perfis de libertação de primeira ordem, enquanto que os polímeros que sofrem degradação à superfície – como é o caso da PCL - produzem perfis de libertação de ordem zero (Porter *et al.*, 2009). Isto, claro, se o processo de degradação for o mecanismo dominante na libertação do fármaco.

Tal como mencionado anteriormente, os sistemas de entrega de fármacos poliméricos mais investigados são os sistemas constituídos por polímeros sintéticos, de onde se destacam os poliésteres biodegradáveis hidrofóbicos tais como o poli (ácido láctico) e a policaprolactona (Bhardwaj & Kundu, 2010), os polímeros selecionados para preparar os SLC desenvolvidos neste trabalho. Seguidamente faz-se um breve resumo das características apresentadas por estes polímeros.

Poli (ácido láctico) (PLA)

O poli (ácido láctico) (PLA) – ver Figura 2.2 - é um poliéster alifático que se encontra na família dos poli (hidróxi ácidos). A molécula base na síntese deste polímero é o ácido láctico, que atualmente pode ser obtido a partir de fontes renováveis, tais como a glicose do milho, através de processos de fermentação. Para além do milho, é possível a obtenção do ácido láctico através de outras fontes renováveis como a mandioca, a beterraba e a cana-de-açúcar (Oliveira *et al.*, 2014).

Devido às excelentes propriedades apresentadas por este polímero, nomeadamente a biodegradabilidade e a biocompatibilidade, a elevada capacidade de processamento e modificação, e boas propriedades mecânicas (desempenho semelhante aos polímeros convencionais como o PET), o PLA possui diversas aplicações na área biomédica, sendo utilizado extensivamente no fabrico de *scaffolds*, implantes/próteses, e sistemas de libertação controlada de fármacos (Yuan *et al.*, 2016).

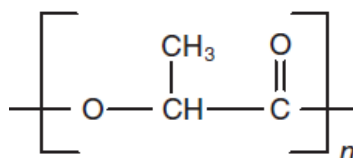


Figura 2.2- Estrutura do PLA.
Fonte: Brito, 2013

A degradação do PLA ocorre a partir da quebra das ligações ésteres através da hidrólise espontânea em cadeias mais curtas e, finalmente, em ácido láctico. O ácido láctico é convertido em piruvato e glicolato e, em seguida, entra no ciclo de *Krebs* degradando-se assim em CO₂ e H₂O. Assim, os produtos finais provenientes da degradação do PLA são metabolitos não tóxicos uma vez que são eliminados pelo corpo na forma de dióxido de carbono e água (Domb *et al.*, 2011).

Policaprolactona (PCL)

A policaprolactona (PCL) ou poli (ϵ -caprolactona) – ver Figura 2.3 - foi um dos primeiros polímeros sintetizados pelo grupo *Carruthers* no início de 1930 (Woodruff & Hutmacher, 2010).

Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos

Este polímero biodegradável sintético é um poliéster alifático linear, hidrofóbico e semi-cristalino (Marini *et al.*, 2009). A boa solubilidade da PCL em vários solventes orgânicos comuns, o seu baixo ponto de fusão (59 - 64 °C) e a boa miscibilidade com outros polímeros são características que tornam este um polímero facilmente processável e versátil (Woodruff & Hutmacher, 2010). Estas características, aliadas à biocompatibilidade e biodegradabilidade apresentada pela PCL, fazem com que este seja um dos polímeros sintéticos mais investigados no desenvolvimento de dispositivos biomédicos, tais como sistemas de libertação controlada de fármacos e *scaffolds* para a regeneração de tecidos (Dash & Konkimalla, 2012).

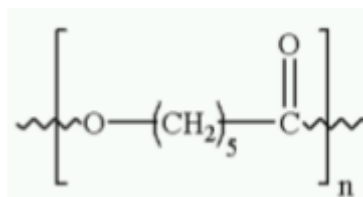


Figura 2.3-Estrutura química da policaprolactona. Adaptado de Casarin, 2010.

2.1.2. Nanopartículas de sílica enquanto sistema de libertação de fármacos

As nanopartículas são partículas coloidais sólidas cujas dimensões do diâmetro variam entre 10 e 1000 nm (Mudshinge *et al.*, 2011).

Os materiais mesoporosos à base de sílica foram sintetizados pela primeira vez em 1991 pela *Mobil Oil Corporation* (Vallet-Regí *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, o campo da pesquisa biomédica tem mostrado um interesse crescente nas nanopartículas mesoporosas de sílica, cuja composição química é de sílica e apresentam poros com uma distribuição de tamanhos muito estreita, com diâmetros numa gama entre 2 - 50 nm, dependendo do tipo de nanopartícula (Vallet-Regí, 2009; Kwon *et al.*, 2013).

Este tipo de nanopartículas diferenciam-se dos outros materiais inorgânicos devido à sua estrutura ordenada de poros mesoporosos, o que lhes confere uma elevada área superficial e uma elevada capacidade de carregamento de diferentes tipos de fármacos (Shi *et al.*, 2015).

Para além disso, estes nanomateriais mesoporosos à base de sílica apresentam uma baixa toxicidade, decompõem-se gradualmente quando imersos no fluido corporal simulado a 37 °C, o que demonstra a sua biodegradabilidade (Shadjou & Hasanzadeh, 2015). Estes

Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos

materiais desenvolvem uma camada de apatite, semelhante à do osso natural, quando imersos no fluido corporal, devido à presença dos grupos silanol que cobrem a superfície destes materiais, sendo por isso materiais bastante interessantes para a fabricação de substitutos ósseos e *scaffolds* para a regeneração de tecido ósseo.

Como nanotransportadores, as nanopartículas mesoporosas de sílica (NPSi) têm sido exploradas como sistemas de entrega de fármacos eficazes para transportarem uma variedade de agentes terapêuticos que combatem diversos tipos de doenças, incluindo a inflamação do tecido ósseo (Vallet-Regí, 2009; Tang *et al.*, 2012; Walmsley *et al.*, 2015). As moléculas farmacêuticas incorporadas nas nanopartículas de sílica devem ser da ordem de 1 nm de tamanho, de modo a que os fármacos possam ser facilmente introduzidos nos poros destes materiais (Vallet-Regí *et al.*, 2008).

O método mais utilizado para incorporar o fármaco nos mesoporos de sílica é o método de impregnação onde as nanopartículas são dispersas numa solução que contém o fármaco com uma determinada concentração. Vários fatores devem ser tidos em conta como o pH da solução, a temperatura, a solubilidade e a polaridade do fármaco. O solvente a utilizar deve ser selecionado de acordo com a solubilidade do fármaco de forma a que a quantidade de medicamento absorvida seja elevada (Vallet-Regí *et al.*, 2008).

2.2. Técnica de preparação de membranas fibrosas como SLC – *Electrospinning*

A técnica de *electrospinning*, conhecida desde 1930 (Gao *et al.*, 2014), tornou-se uma maneira fiável de produzir fibras com diâmetros desde algumas dezenas de nanómetros até alguns micrómetros, dimensões muito menores do que as geralmente observadas em fibras produzidas por técnicas convencionais, tais como o método de auto-montagem e a técnica de separação de fases (Zhao *et al.*, 2016).

Um aparelho de *electrospinning* inclui uma seringa com uma agulha de metal, através da qual passa a solução polimérica que está a ser bombeada, uma fonte de alimentação de alta tensão que está ligada à agulha e um coletor ligado à terra. Quando é aplicada uma determinada tensão à solução polimérica, há formação de forças eletrostáticas (Sharma *et al.*, 2015). Estas forças de repulsão eletrostáticas opõem-se à tensão superficial do polímero e levam à formação de uma gota da solução polimérica na extremidade da agulha conhecida como o *cone de Taylor* (Sharma, et al., 2015).

Uma vez que a força do campo elétrico é aumentada de forma a superar as forças da tensão superficial, um jato é ejetado a partir da gota pendente. Este jato é esticado e acelerado

Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos

na direção do coletor ligado à terra, e o solvente evapora-se durante o trajeto, formando-se as fibras que são depositadas no coletor (Meinel *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2014).

A morfologia da fibra pode ser influenciada por parâmetros de solução (por exemplo, viscosidade, condutividade, tensão superficial), parâmetros do processo (por exemplo, intensidade do campo elétrico, caudal, tipo de coletor) e por parâmetros ambientais (temperatura, humidade) (Meinel *et al.*, 2012).

Na Tabela 2.2 estão listados alguns dos polímeros mais utilizados na produção de matrizes fibrosas produzidas por *electrospinning* para aplicações na área biomédica.

Tabela 2.2- Diferentes polímeros utilizados pela técnica de *electrospinning* e as suas aplicações. Adaptado de Bhardwaj & Kundu, 2010; Haider *et al.*, 2015

Polímeros	Aplicações	Referências
Poli ácido glicólico (PGA)	<i>Scaffolds</i> /membranas nanofibrosas	(Boland, Telemeco, Wnek, & Bowlin, 2004)
Poli (Ácido Lático-co-ácido Glicólico) (PLGA)	Aplicações biomédicas/ cicatrização de feridas	(Zong, Fang, Kim, & Chen, 2002)
Policaprolactona (PCL)	Engenharia de Tecido óssea	(Yoshimoto, Shin, Terai, & Vacanti, 2003)
poli(l-ácido láctico) (PLA)	Engenharia de tecidos	(Fertala, Han, & Ko, 2001)
Poliuretano(PU)	Aplicações biomédicas/ cicatrização de feridas	(Khil, Cha, Kim, & Bhattarai, 2003)
Gelatina	<i>Scaffold</i> /Membrana para a cicatrização de feridas	(Huang, Zhang, Ramakrishna, & Lim, 2004)
Policaprolactona (PCL) (camada externa) e Polietilenoglicol (núcleo)	Sistema de entrega de fármacos	(Zhang, et al., 2006)

2.2.1. Membranas produzidas por *electrospinning* enquanto SLC

As matrizes fibrosas produzidas por *electrospinning* são estruturas de grande interesse como SLCs devido à alta capacidade de incorporarem fármacos no seu interior e à sua elevada superfície específica (Yu *et al.*, 2009). Kenawy *et al.*, (2002) relataram pela primeira vez a incorporação de um antibiótico em nanofibras produzidas por *electrospinning*. Desde então, vários antibióticos, hidrofílicos e hidrofóbicos, foram incorporados em nanofibras poliméricas por este método (Yu *et al.*, 2009).

Membranas fibrosas com fármaco produzidas através deste tipo de *electrospinning* têm sido utilizados como agentes de transporte de diferentes tipos de fármacos, em que os perfis de libertação de fármaco podem ser controlados pela modulação da composição da membrana, diâmetro e morfologia das fibras, podendo ser obtido um perfil de libertação ao longo de 2-5 semanas, com uma elevada “explosão” inicial (*burst release*) (Hu & Cui, 2012).

Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos

Existem várias formas de incorporar os fármacos nas fibras produzidas por *electrospinning*. A mais comum é o chamado *electrospinning* por *blending*, onde todos os polímeros constituintes bem como os fármacos são formulados numa única mistura, sujeita a *electrospinning* (Repanas *et al.*, 2016). Com o objetivo de melhorar a eficiência do carregamento de fármacos e o perfil de libertação das nanofibras produzidas através do método de *electrospinning*, pode-se adicionar nanopartículas carregadas de fármaco às soluções poliméricas a eletrofiar, isto é, as nanopartículas são incorporadas nas nanofibras obtendo-se assim fibras compósitas e um sistema de libertação fármacos com uma cinética de libertação mais gradual (Son *et al.*, 2014) (Figura 2.4).

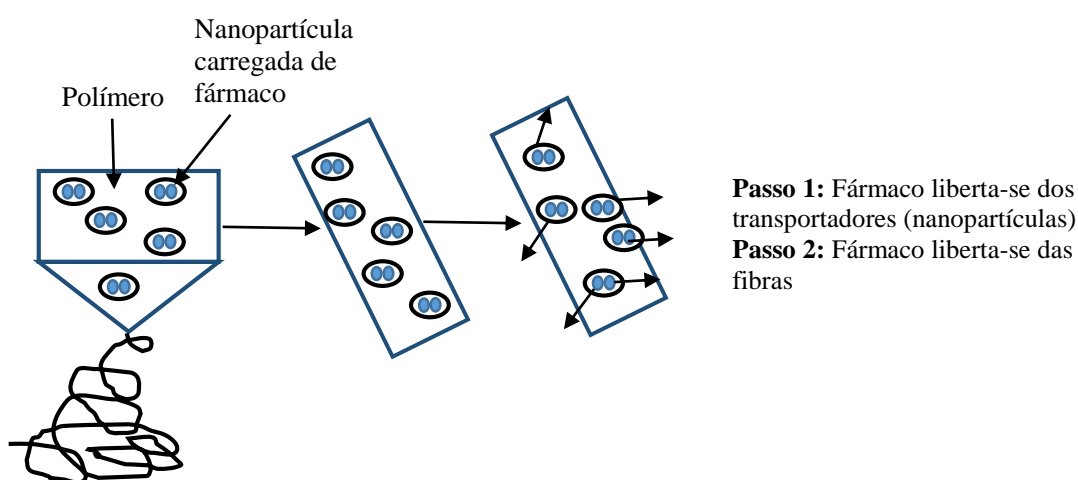


Figura 2.4-Diagrama esquemático de um sistema de fibras incorporado com um sistema de entrega de fármacos à base de nanopartículas, e a sua cinética de libertação. Adaptado de: Son *et al.*, 2014

A estrutura núcleo-camada externa (do inglês *core-shell*), desenvolvida pela primeira vez por (Loscertales & Gañán-Calvo, 2002), é uma outra importante estrutura no campo de *electrospinning*. Esta estrutura é também muito promissora em aplicações biomédicas, especialmente para a sistemas de libertação controlada de fármacos (Sharma *et al.*, 2015).

Na configuração do *electrospinning* coaxial, a agulha única tradicional apresentada na configuração mencionada anteriormente é substituída por duas agulhas concêntricas que também estão ligadas a uma fonte de energia de alta tensão. Assim, neste caso, são usadas duas bombas individuais, com controlo separado sobre o caudal da solução polimérica. Esta configuração origina nanofibras que têm uma estrutura núcleo-camada externa que podem ser utilizadas como sistemas de entrega de fármacos sendo também possível controlar a cinética de libertação.

Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos

Assim, geralmente, o fármaco encontra-se no interior do núcleo e, conseqüentemente o polímero da camada externa impede a libertação inicial acelerada do fármaco encapsulado no polímero do núcleo (Jiang *et al.*, 2014). Esta configuração permite ainda a incorporação de dois fármacos (Szentivanyi *et al.*, 2011).

Para além disso, a camada externa obtida através deste tipo de *electrospinning* tem a capacidade de proteger o fármaco presente no núcleo do meio ambiente (Repanas *et al.*, 2016). Costa *et al.*, (2012) afirma que as características mecânicas das membranas fibrosas alcançadas pelo *electrospinning* coaxial são geralmente melhores do que as nanofibras produzidas por *electrospinning* por *blending*.

A Figura 2.5 mostra as duas configurações da técnica de *electrospinning* utilizados no presente trabalho.

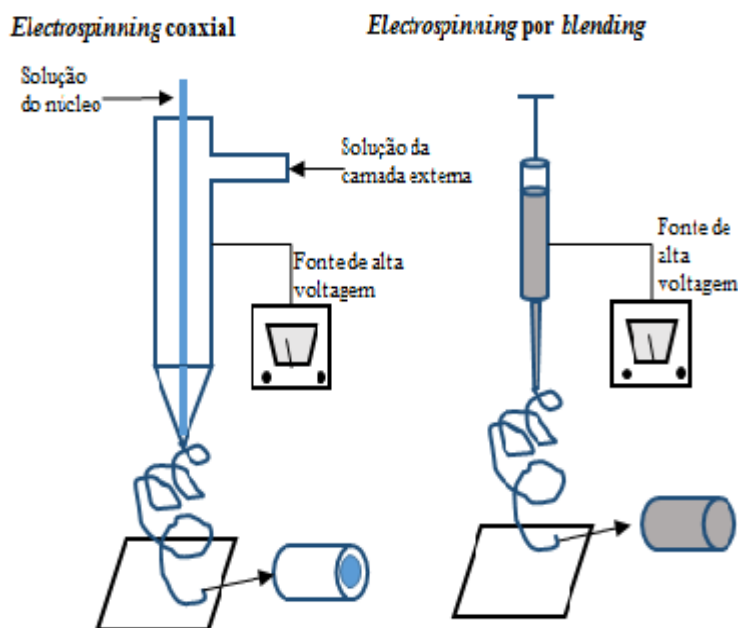


Figura 2.5- Comparação entre a configuração do *electrospinning* coaxial e o *electrospinning* por *blending*. Adaptado de: Repanas *et al.*, 2016

2.3. Osteomielite

A osteomielite é uma infeção óssea causada por bactérias ou por fungos (Nandi *et al.*, 2009) que, quando não tratada, leva à destruição do osso (osteólise) (Inzana *et al.*, 2016).

Esta infeção está, geralmente, associada a um implante ortopédico. Em 2004, havia cerca de 600 000 próteses artificiais e 2 milhões de dispositivos de fixação de fratura implantadas por ano, só nos EUA, resultando em mais de 110 000 infeções (Inzana *et al.*, 2016).

A bactéria mais comum causadora desta infeção óssea é a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Inzana *et al.*, 2016). A adesão das bactérias em torno dos implantes ósseos cria um biofilme espesso que para além de funcionar como uma barreira contra o sistema imunitário do hospedeiro não permite, também, a absorção dos antibióticos administrados levando à

Capítulo 2 – Fundamentos Teóricos

rejeição do implante, ao aumento da infecção, a custos mais elevados de tratamento e, por vezes, à morte dos pacientes (Farokhi *et al.*, 2016).

O tratamento desta infecção envolve, principalmente, o desbridamento cirúrgico, a remoção de todos os corpos estranhos e a administração de antibióticos em doses elevadas por um longo período de tempo. Geralmente, os antibióticos intravenosos são prescritos durante 3 semanas, seguidas por 3 semanas de administração de antibiótico por via oral. Além disso, há uma necessidade de administrar uma elevada dose de antibióticos para se atingir as concentrações desejadas de fármaco no osso infetado, bem como um tratamento prolongado que pode conduzir à toxicidade sistémica (Nandi *et al.*, 2009).

Contudo, mesmo com este regime agressivo de administração de antibióticos, os resultados nem sempre são positivos, pois o fornecimento de sangue é limitado, impedindo que a área infetada adquira as concentrações suficientes de antibióticos. Assim, foram desenvolvidos veículos transportadores de antibióticos que têm como finalidade preencher cavidades e entregar antibióticos localmente. No entanto, o SLC mais frequentemente utilizado no combate a esta infecção, o poli (metacrilato de metilo) (PMMA) tem diversos inconvenientes tais como a produção de calor durante a síntese, o que pode resultar na destruição do fármaco carregado (Cao *et al.*, 2015). Para além disso, este polímero não é bioabsorvível, exigindo uma cirurgia adicional para a sua remoção (Inzana *et al.*, 2016).

Neste sentido, diversos sistemas de libertação biodegradáveis têm sido estudados e avaliados para entregarem o antibiótico localmente, fornecendo concentrações de antibiótico elevadas no tecido alvo durante o tempo prolongado necessário para erradicar a infecção possuindo ainda a peculiaridade de não ser necessário a sua remoção cirúrgica (Nandi *et al.*, 2009).

2.3.1. Sistema de libertação local de antibiótico para a prevenção/tratamento da osteomielite

Tal como mencionado anteriormente, com o objetivo de melhorar a eficácia do tratamento da osteomielite foram desenvolvidos inúmeros sistemas de libertação controlada de antibióticos com vista a proporcionar elevadas concentrações de antibiótico no local de infecção sem o risco de toxicidade sistémica (Nandi *et al.*, 2009). Alguns destes sistemas encontram-se listados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3- Exemplos de alguns SLC de antibióticos desenvolvidos para o tratamento da osteomielite. Adaptado de Nandi *et al.*, 2009.

Sistema de liberação controlada (SLC)	Antibiótico libertado	Referências
Não biodegradáveis		
Cimento Acrílico	Oxacilina	Marks K. <i>et al</i> (1976)
	Cefazolina	Marks K. <i>et al</i> (1976)
	Gentamicina	Rissing J., (1997)
PMMA (grânulos)	Gentamicina	Montali A., (2006)
	Vancomicina	Zelken J. <i>et al</i> , (2007)
PMMA (cimento)	Vancomicina	Zalavras C. <i>et al</i> , (2004)
Biodegradáveis		
Cimento de hidroxiapatite	Vancomicina	Joosten U. <i>et al</i> ,(2005)
Nano-HA-PHBV/PEG-GM microsferas	Gentamicina	Wang Y. <i>et al</i> , (2006)
Quitossano	Gentamicina	Aimin C. <i>et al</i> , (1999)
	Vancomicina	Cevher E. <i>et al</i> , 2006
Poli (ácido acrílico) e gelatina reticulada	Ofloxacina	Changez M. <i>et al</i> , (2005)
Policaprolactona	Tobramicina	Rutledge B. <i>et al</i> , (2003)
Sulfato de cálcio	Tobramicina	Nelson C. <i>et al</i> , (2002)
	Daptomicina	Webb N. <i>et al</i> , (2008)

2.4. Sulfato de gentamicina e Dexametasona

Sulfato de Gentamicina

O sulfato de gentamicina (Figura 2.6), cujo peso molecular é aproximadamente 547,6 g/mol, é um dos antibióticos de eleição no tratamento da osteomielite devido ao seu baixo custo e atividade efetiva, o amplo espectro de ação e boa solubilidade em água (Klemm, 2001; Gogia *et al.*, 2009).

É um aminoglicosídeo, ativo contra *Staphylococcus aureus* e bacilos Gram-negativo e é mais eficaz do que os restantes antibióticos do mesmo grupo (Maciel, 2011).

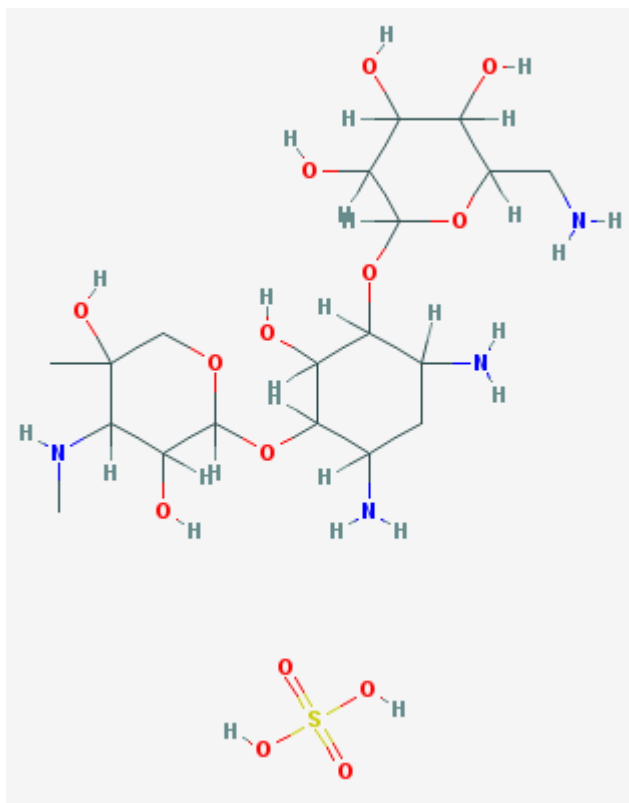


Figura 2.6-Estrutura química do sulfato de gentamicina. Fonte: *National Institute of Standards and Technology*

Dexametasona

A dexametasona (Figura 2.7) apresenta uma massa molar de 392,5 g/mol, pertence ao grupo dos glucocorticóides sintéticos e é utilizada no tratamento de inflamações graves (Costa-Pinto *et al.*, 2011; Gaharwar *et al.*, 2014);. Assim, quando este fármaco é entregue no local da infecção, reduz significativamente a resposta inflamatória por parte do organismo (Vacanti *et al.*, 2012).

Diversos estudos na área da engenharia de tecidos afirmam que a dexametasona tem a capacidade de promover a diferenciação específica das células estaminais mesenquimais em células osteoblásticas sendo por isso possível a regeneração do tecido ósseo danificado (Tang *et al.*, 2010). Este anti-inflamatório hidrofóbico é frequentemente usado na área da engenharia de tecido óssea (Duarte *et al.*, 2009) e incorporado em matrizes porosas constituídas por polímeros biodegradáveis para se alcançar uma libertação controlada (Yoon *et al.*, 2003).

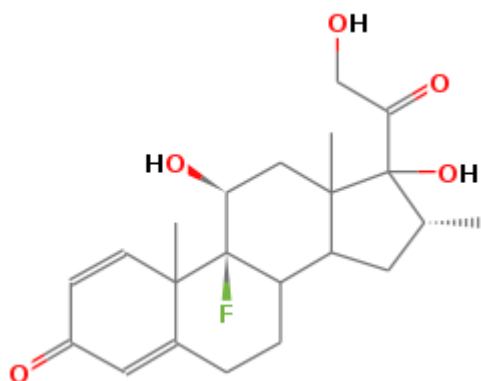


Figura 2.7- Estrutura química da dexametasona. Fonte: *National Institute of Standards and Technology*

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Tal como foi referido anteriormente, o trabalho experimental desenvolvido nesta dissertação consiste na preparação de um sistema de libertação controlada implantável eficaz na libertação simultânea de dois fármacos (GS e DEX).

O trabalho experimental iniciou-se com a imobilização do sulfato de gentamicina em nanopartículas de sílica mesoporosa. O comportamento térmico das nanopartículas foi estudado através da termogravimetria (TGA) que mediu a alteração da massa da amostra em função da temperatura, permitindo assim a determinação da quantidade de fármaco incorporado nas nanopartículas. Procedeu-se ainda à caracterização morfológica e estrutural das nanopartículas de sílica, recorrendo-se por isso ao método de adsorção de azoto.

O segundo passo consistiu na produção de nanofibras, através da técnica de *electrospinning*, com diferentes formulações, avaliando-se desta forma os diferentes perfis de libertação obtidos.

Numa primeira abordagem experimental desenvolveram-se nanofibras produzidas por *electrospinning* por *blending* nas quais as três primeiras formulações foram caracterizadas pelas três formas diferentes de incorporação do antibiótico (GS):

- com o sulfato de gentamicina simplesmente disperso na solução polimérica;
- dispersão das nanopartículas carregadas com sulfato de gentamicina na solução polimérica;
- combinando as duas formas de incorporação referidas nos pontos anteriores, ou seja, uma formulação com sulfato de gentamicina disperso na solução polimérica e com sulfato de gentamicina incorporado nas nanopartículas de sílica.

Relativamente às restantes formulações utilizadas nesta abordagem experimental, estas foram caracterizadas não só pela incorporação do GS mas também pela adição de um anti-inflamatório (DEX). É importante mencionar que contrariamente ao antibiótico, a dexametasona foi sempre incorporada na solução polimérica.

Seguidamente, e com o intuito de prolongar a libertação do fármaco, utilizou-se uma metodologia alternativa. A abordagem experimental II consistiu na produção de nanofibras através do *electrospinning* coaxial.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

As formulações descritas anteriormente foram submetidas à técnica de *electrospinning* dando origem a membranas fibrosas que, posteriormente, foram sujeitas a estudos de libertação *in vitro* durante 21 dias.

A etapa seguinte baseou-se na caracterização das membranas fibrosas através da caracterização por SEM e através da medição do ângulo de contato, onde foi possível avaliar a hidrofiliabilidade das fibras.

Por fim, recorreu-se à fotoespectrofotometria UV/VIS para a obtenção dos perfis de libertação que permitiram avaliar a quantidade de fármaco libertado.

A Figura 3.1 pretende esquematizar o processo experimental que foi realizado neste trabalho.

Sulfato de Gentamicina Nanopartículas de sílica

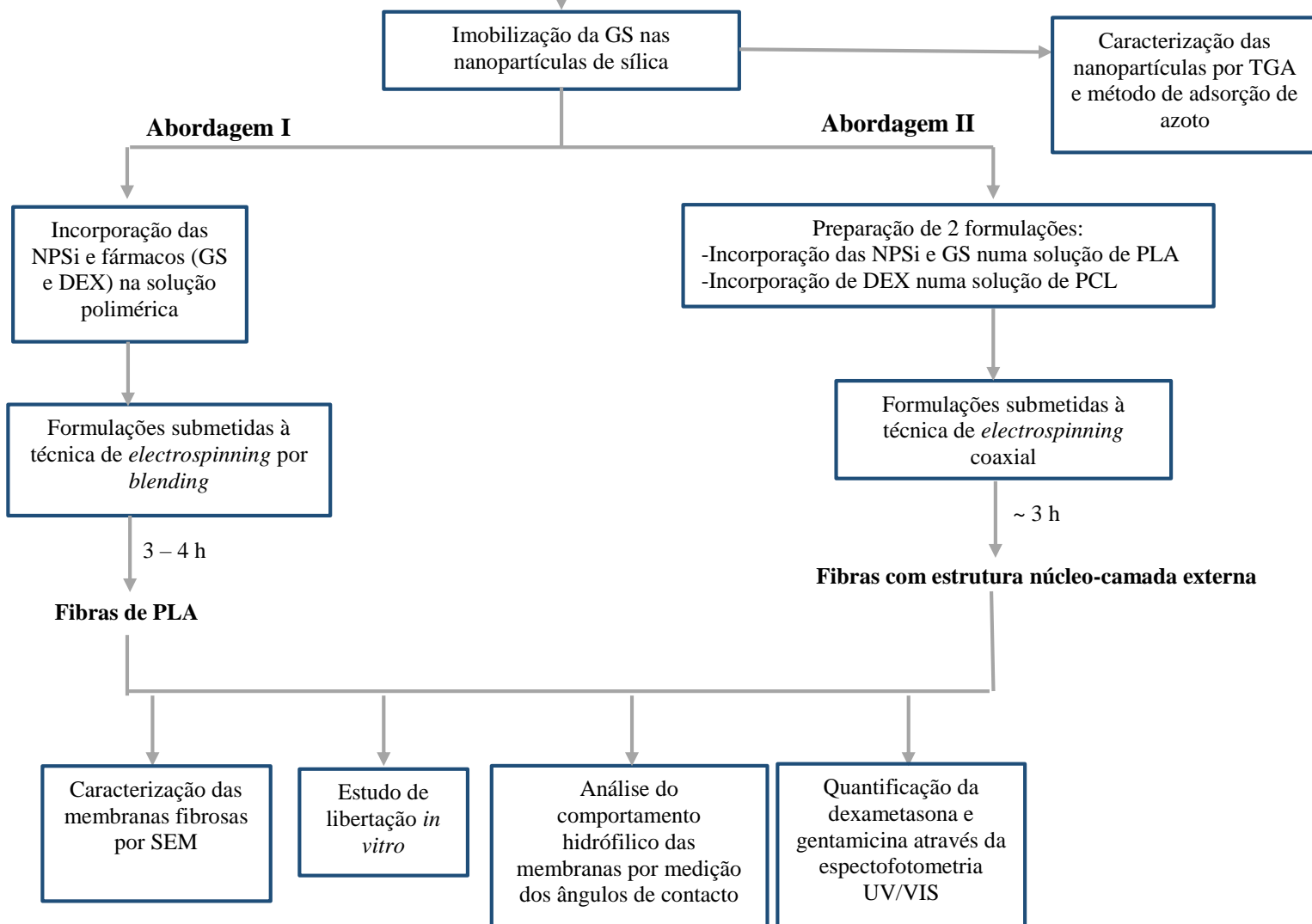


Figura 3.1- Esquema das etapas do procedimento experimental.

3.1. Materiais

Os solventes, reagentes e fármacos utilizados no trabalho experimental são apresentados na Tabela 3.1. De referir que os polímeros policaprolactona (PCL) e poli (ácido láctico) (PLA), foram utilizados tal como fornecidos.

Tabela 3.1- Lista de reagentes utilizados neste trabalho experimental.

Reagente	Distribuidor	Outra informação	CAS	Utilização
Poli (ácido láctico) PLA	NatureWorks 2002D	120000 g/mol	33135- 50-1	Preparação das membranas
policaprolactona (PCL)	Sigma-Aldrich	80 000 g/mol		Preparação das membranas
Clorofórmio	Fisher ®	-	67-66-3	Solvente
Dimetilformamida (DMF)	Acros Organics	-	68-12-2	Solvente
Sulfato de gentamicina	TCI		1405-41- 0	Antibiótico
Dexametasosa	Alfa Aesar ®	98 % pureza	50-02-2	Anti- inflamatório
Nanopartículas de sílica	Sigma-Aldrich	200 nm $D_{poro} = 4$ nm	7631-86- 9	Preparação das membranas
Metanol	Fisher ®	-	67-56-1	Solução de <i>o</i> - <i>ftaldialdeído</i>
Mercaptoetanol	SigmaAldrich ®	-	60-24-2	Solução de <i>o</i> - <i>ftaldialdeído</i>
<i>O</i> - <i>ftaldialdeído</i>	Alfa Aesar ®	98 % de pureza	643 - 79 - 8	Solução de <i>o</i> - <i>ftaldialdeído</i>
Borato de sódio	JMGS	-	1303-96- 4	Solução de <i>o</i> - <i>ftaldialdeído</i>
Isopropanol	-	-	67-63-0	Solução de gentamicina

3.2. Preparação das membranas fibrosas

3.2.1. Imobilização do GS nas nanopartículas de sílica

A primeira etapa do trabalho passou pela imobilização do sulfato de gentamicina nas nanopartículas de sílica por adsorção. Para isto, dissolveu-se 1 g de sulfato de gentamicina em 10 mL de água *milli-Q*. Posteriormente adicionou-se 1 g de nanopartículas de sílica à solução

anterior. Com o intuito de melhorar a dispersão das nanopartículas, isto é, desagregar melhor as nanopartículas, a suspensão resultante foi colocada num banho de ultrassons durante 25 minutos. Seguidamente a suspensão foi incubada sobre agitação magnética durante algumas horas.

Terminada a agitação, a dispersão foi colocada numa centrifugadora, durante 10 minutos a 4000 rpm, com a finalidade de isolar as nanopartículas carregadas de fármaco. Foi assim possível retirar as nanopartículas de sílica presentes no sobrenadante que foram descartadas enquanto que a fase sedimentada foi liofilizada durante 1 dia sendo posteriormente colocada numa estufa a vácuo durante 1 dia para garantir que a água seja removida na totalidade.

A Figura 3.2 esquematiza as várias etapas deste procedimento experimental.

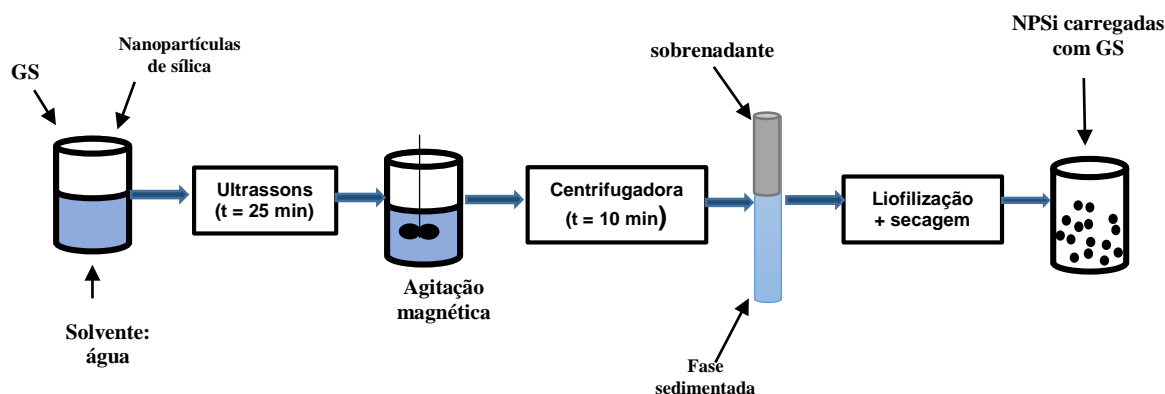


Figura 3.2- Esquema representativo das várias etapas necessárias para incorporar o GS nas NPSi.

3.2.2. Preparação das membranas fibrosas através da técnica de *electrospinning*

Como foi referido anteriormente, numa primeira fase foram produzidas fibras através da técnica *electrospinning* por *blending*, enquanto que a segunda abordagem consistiu na preparação de membranas fibrosas por *electrospinnig* coaxial.

Assim, na abordagem experimental I os fármacos (dexametasona e sulfato de gentamicina) foram misturados numa solução polimérica (PLA) juntamente com os dois solventes. A solução resultante foi submetida à técnica de *electrospinning* por *blending* resultando membranas fibrosas compostas por fibras aleatórias.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Por sua vez na abordagem experimental II foram preparadas duas formulações diferentes compostas por diferentes polímeros (PLA e PCL) que foram sujeitas à técnica de *electrospinning* coaxial produzindo-se nanofibras com morfologia coaxial com estrutura núcleo-camada externa onde todas as camadas externas das nanofibras são constituídas por PCL e DEX enquanto que o núcleo é composto por PLA e GS (encontrando-se o GS na forma livre, imobilizado nas nanopartículas, ou numa combinação das duas formas anteriores).

- **Preparação de membranas fibrosas através da técnica de *electrospinnig* por *blending* (Abordagem experimental I)**

A composição das formulações utilizadas nesta abordagem experimental, tal como os parâmetros de *electrospinning* utilizados, encontram-se listados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Composição e formulação das membranas fibrosas utilizadas na abordagem experimental I.

Nomenclatura	Descrição	Massa de fármaco livre (mg)	Massa de NPSi-GS (mg)	Caudal (mL/h)	Tensão (kV)
PLA-GS	GS livre	80 mg de GS	-	3	9
PLA-NPSiGS	GS imobilizada nas nanopartículas	-	186	3	9
PLA-GS-NPSiGS	50 % de GS livre + 50 % de GS imobilizadas nas nanopartículas	40 mg de GS	93	3	9
PLA-DEX	DEX livre	20 mg de DEX	-	3	10
PLA-GS-DEX	GS e DEX livre	80 mg de GS + 20 mg de DEX	-	3	9
PLA-NPSiGS-DEX	GS imobilizada nas nanopartículas + DEX livre	20 mg de DEX	186	3	9
PLA-GS-NPSiGS-DEX	50 % de GS livre + 50 % de GS imobilizadas nas nanopartículas + DEX livre	40 mg GS + 20 mg DEX	93	3	9

Resumidamente, e para todas as formulações, a solução polimérica sujeita a *electrospinnig* foi preparada dissolvendo 1 g de PLA numa mistura de 10 mL de clorofórmio/DMF (90:10) (v/v). O clorofórmio foi usado na preparação da formulação devido ao seu bom desempenho na dissolução deste polímero e pela elevada volatilidade. Contudo, a solução não poderia ser submetida à técnica de *electrospinning* se apenas fosse utilizado este solvente devido à sua baixa condutividade e constante dielétrica (Gonçalves *et al.*, 2015). Assim adicionou-se à solução DMF. A adição de DMF é muito comum na literatura (Tan *et*

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

al., 2005; Zhu *et al.*, 2010) na medida em que este solvente possui elevada constante dielétrica e, desta forma, a sua presença na mistura leva a um aumento da mobilidade das cargas na solução que vai ser sujeita à técnica de *electrospinning* (Alcobia, 2013). A mistura resultante foi colocada sob agitação. Posteriormente adicionaram-se os fármacos (GS e/ou DEX) e a solução foi novamente sujeita a um ciclo de agitação. Em todas as formulações a quantidade de fármaco adicionado corresponde a 8 % do peso do polímero, para a GS, e 2 % do peso do polímero, para a DEX. No caso das formulações onde se utilizou GS imobilizada nas NPSi, a % de carregamento (determinada por TGA) foi utilizada para calcular a quantidade de nanopartículas carregadas a adicionar, de forma a manter a percentagem de carregamento a 8 %. Importante referir que nas formulações com nanopartículas de sílica, estas foram primeiramente adicionadas à mistura de solventes e submetidas um banho de ultra-sons durante aproximadamente 15 minutos, de forma a facilitar a dispersão das mesmas. Só depois deste passo foi adicionado o polímero e, em algumas delas, o(s) fármaco(s) “livres”. É importante mencionar que ao contrário da DEX, que é completamente solúvel na mistura de solventes utilizada, a GS é apenas parcialmente solúvel nesta mistura, encontrando-se este fármaco (quando utilizado na forma livre) parcialmente em suspensão na solução polimérica. Devido à viscosidade da solução polimérica, e às pequenas dimensões das partículas de fármaco, estas suspensões eram, no entanto, estáveis, não se verificando a precipitação do fármaco durante o processo de *electrospinning*. O mesmo se verificou nas suspensões compostas pelas nanopartículas carregadas.

Após a solubilização do polímero e dos fármacos, as suspensões obtidas foram inseridas numa seringa com um diâmetro de 15,8 mm, iniciando-se assim o processo de *electrospinning*. A seringa foi colocada numa bomba de injeção, modelo *NE-1000 Multiphaser da New Era Pump Systems*, que empurrou a um fluxo constante de 3 mL/h sendo aplicada uma tensão de entre os 9 e 10 kV proveniente de uma fonte de alimentação de alta tensão que está ligada à agulha através de um cabo crocodilo. A solução polimérica acumula carga elétrica devido à tensão aplicada através da fonte de alta tensão, que é acelerada pelo campo elétrico, entre o coletor e a seringa, havendo, desta forma, deposição das fibras poliméricas no coletor quadrado revestido previamente com alumínio.

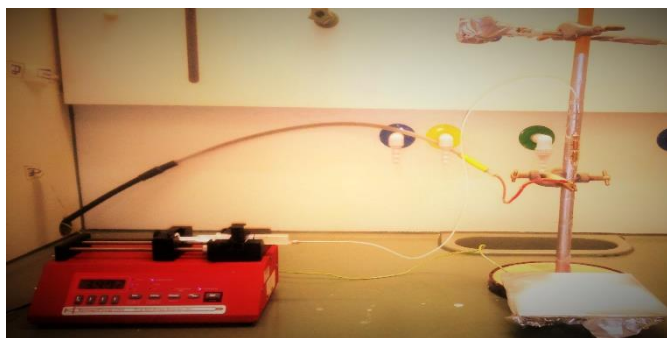


Figura 3.3- Esquema da montagem do sistema de *electrospinning* por *blending*.

Na Figura 3.3 é possível observar o equipamento referente ao processo de electrospinning utilizado nesta dissertação.

- **Preparação de membranas fibrosas através da técnica de *electrospinning* coaxial (Abordagem experimental II)**

Na Tabela 3.3 estão apresentados os parâmetros de *electrospinning* e as formulações utilizadas nesta abordagem experimental.

Tabela 3.3- Composição e formulação das membranas fibrosas coaxiais utilizadas na abordagem experimental II.

Nomenclatura	Núcleo				Camada externa			
	Sol. Polimérica	Massa GS livre (mg)	Massa de NPSi-GS (mg)	Caudal (mL/h)	Sol. Polimérica	Massa DEX (mg)	Caudal (mL/h)	Tensão (kV)
PLA-GS/PCL-DEX	0,7 g PLA / 7 ml (5 mL CLO + 2 mL DMF)	81,1	-	2,5	0,3 g PCL / 3 mL (2,5 CLO + 0,5 DMF)	22	1	17
PLA-NPSiGS/PCL-DEX	0,7 g PLA / 7 mL (5 mL CLO + 2 mL DMF)	-	186,1	2	0,3 g PCL / 3 mL (2,5 CLO + 0,5 DMF)	20,5	1	
PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX	0,7 g PLA / 7 mL (5 mL CLO + 2 mL DMF)	40,1	93,6	2,5	0,3 g PCL / 3 mL (2,5 CLO + 0,5 DMF)	20,7	1	11

Nesta abordagem pretendeu-se sintetizar três tipos de membranas fibrosas diferentes com estrutura núcleo-camada externa cujo núcleo é composto por uma solução polimérica de PLA e sulfato de gentamicina incorporado nas três formas descritas anteriormente, enquanto que a camada externa é igual para todas as nanofibras e composta por uma solução polimérica de PCL e dexametasona.

Posto isto, e para fabricar cada membrana, prepararam-se duas soluções/suspensões – uma que dará origem ao núcleo da nanofibra e outra que dará origem à camada externa.

As formulações utilizadas no núcleo das membranas fibrosas foram preparadas de forma idêntica às formulações descritas anteriormente. O primeiro passo consistiu na dissolução de 0,7 g de PLA numa mistura de solventes composta por 5 mL de clorofórmio e 2 mL de DMF. O único fármaco que estava presente no núcleo das membranas fibrosas é o sulfato de gentamicina que foi incorporado das três maneiras diferentes, já referidas anteriormente, nestas fibra.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Na preparação das formulações usadas na camada externa das membranas fibrosas dissolveram-se 0,3 g de PCL numa mistura de 3 mL de solventes formada por 2,5 mL de clorofórmio e 0,5 mL de DMF.

Seguidamente iniciou-se o processo de *electrospinning* coaxial onde as duas soluções foram inseridas em duas seringas diferentes com 10 mL de volume. A etapa seguinte consistiu na fixação das duas seringas nas respetivas bombas de injeção.

O princípio de funcionamento do *electrospinning* coaxial é muito semelhante ao descrito anteriormente, mas neste caso, duas soluções diferentes são inseridas em duas seringas distintas e apresentadas de forma independente por meio de um capilar coaxial que gera fibras com estrutura núcleo-camada externa (Elahi *et al.*, 2013). Este tipo de membranas foi produzido na instalação de *electrospinning* retratada na Figura 3.4.

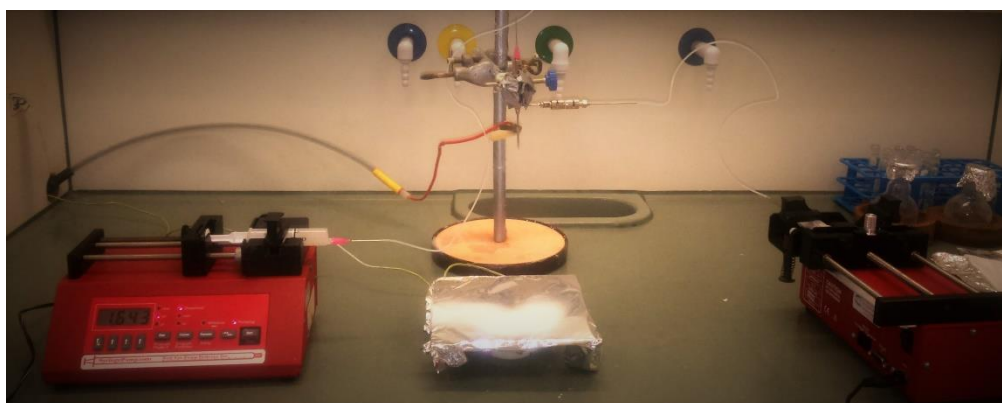


Figura 3.4- Esquema da montagem do sistema de *electrospinning* coaxial.

3.3. Caracterização das nanopartículas de sílica e das membranas

Depois de preparadas as diversas membranas fibrosas, procedeu-se à sua caracterização através das técnicas apresentadas em seguida.

3.3.1. Quantificação do GS incorporada nas nanopartículas

Através da análise termogravimétrica (TGA) foi possível determinar a quantidade de gentamicina (GS) incorporada nas nanopartículas de sílica. Esta, é uma técnica simples que não requer nenhuma preparação especial da amostra para além da sua secagem.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Os materiais submetidos a uma análise termogravimétrica (TGA) são aquecidos a uma taxa constante num dado intervalo de temperatura, enquanto se regista a variação de massa da amostra (Mansfield *et al.*, 2014).

A perda de massa do sulfato de gentamicina (GS), nanopartículas de sílica (NPSi) e nanopartículas impregnadas com sulfato de gentamicina (NPSiGS) foi analisada num equipamento de análise térmica (*TA Instruments SDT Q600*). Estas amostras foram aquecidas desde a temperatura ambiente até 1200 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Os dados obtidos foram tratados no *Universal Analysis 2000, software* da *TA Instruments*.

Assim através dos valores de perda de massa das amostras foi possível determinar a % de GS incorporado nas nanopartículas.

3.3.2. Determinação do tamanho de poros através do método de adsorção de azoto

É possível obter informação textural das nanopartículas de sílica pura e das nanopartículas de sílica carregadas com sulfato de gentamicina, tal como área de superfície específica (área superficial por unidade de volume), tamanhos de poros e a sua distribuição, mediante a medição da área ocupada por uma determinada quantidade de moléculas de gás adsorvidas na superfície do material. Este processo é realizado pela adsorção e dessorção de nitrogénio gasoso sobre a superfície através de um aparelho da análise de superfícies ASAP-2000, da *Micromeritics*.

A partir da curva de adsorção/dessorção obteve-se a área da superfície específica das nanopartículas, com base na teoria Brunauer-Emmett-Teller (BET). Além da possibilidade de extrair informação textural do material como a área superficial determinada mediante o método BET é possível extrair dados sobre a sua estrutura porosa, volume e tamanho de poros e volume de microporos. Uma técnica de análise desenvolvida por Kelvin, Barrett, Joyner e Halenda, denominado método BJH fornece informação sobre a mesoporosidade e permite calcular a distribuição de tamanho de poros sendo que esta última se faz aplicando o método BJH nas isotérmicas de dessorção.

3.4. Caracterização das membranas produzidas através da técnica de *electrospinning*

3.4.1. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) das membranas fibrosas

A caracterização das membranas fibrosas produzidas por *electrospinning* foi realizada através de um microscópio eletrônico de varrimento utilizando um microscópio *Scanning Microscope JSM-5310* da *Jeol* disponível no Instituto Pedro Nunes (IPN) que permitiu a obtenção de imagens da superfície das membranas com elevada resolução e diferentes ampliações (1000x e 30000x).

As amostras das nanofibras foram imobilizadas numa fita de grafite colada a um suporte de metal e revestidas a ouro durante 10 s, com a finalidade de se tornarem eletricamente condutoras.

Utilizando-se o *software* de análise de imagens *ImageJ*, foi possível a determinação dos diâmetros médios das fibras de todas as membranas. Para isso, foram realizadas pelo menos 60 medições de diâmetros nas imagens SEM de cada amostra.

3.4.2. Análise do comportamento hidrofílico das membranas por medição dos ângulos de contacto

Com o objetivo de caracterizar a molhabilidade da superfície das membranas fibrosas, recorreu-se à medição dos ângulos de contacto estáticos, no qual uma gota de água de aproximadamente 10 μL foi depositada sobre a superfície das amostras e as suas imagens capturadas por um sistema ótico para o cálculo do ângulo de contacto. O ângulo de interesse foi formado pelo plano horizontal da membrana e pela tangente ao perfil da gota na zona de contacto.

Este procedimento ocorreu no equipamento *OCA 20*, da *Dataphysics*. Para cada amostra foram realizadas 5 medições de ângulo de contacto sendo que valor final do ângulo de contacto foi obtido através do cálculo da média desses valores.

3.4.3. Estudo da libertação *in vitro* dos fármacos

Através deste procedimento foi possível o estudo do perfil de libertação *in vitro* do antibiótico (sulfato de gentamicina) e do anti-inflamatório (dexametasona), nos diferentes sistemas de libertação.

As membranas foram cortadas em tiras de 8×2 cm (com pesos na gama de 50 – 100 mg) e mergulhadas em frascos preenchidos com 2,5 ou 5 mL de solução PBS (pH = 7,4), dependendo da membrana.

Os frascos com as membranas e o PBS foram colocados numa estufa a uma temperatura de 37 °C (temperatura fisiológica do corpo humano) durante cerca de 21 dias. Em tempos pré-determinados o meio de incubação era retirado para análise e substituído por um igual volume de meio de libertação fresco. As amostras recolhidas foram guardadas num frigorífico até serem analisadas. É importante referir que este teste foi realizado três vezes para cada membrana nanofibrosa obtida através da técnica de *electrospinning*.

A solução PBS pretende simular a concentração salina do plasma sanguíneo. Para a preparação de 1 L de PBS, adicionou-se 0,381 g de KH_2PO_4 , 1,273 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de KCl e 8,066 g de NaCl a 1 L de água *miliQ*. Depois de preparada armazenou-se no frigorífico.

Os fármacos libertados ao longo do tempo foram quantificadas por espectroscopia UV/VIS. Assim, para todas as amostras, foram medidas as absorvâncias a 332 nm de forma a conseguir quantificar a gentamicina libertada, e a 242 nm para conseguir quantificar a dexametasona libertada, ao longo do tempo. Para isso, utilizou-se um espectrofotómetro *UV-Vis Jasco V-550*. Para todos os casos os valores de absorvância obtidos permitiram calcular a concentração do fármaco em cada solução, a partir da curva de calibração que foi realizada para o estudo em causa.

É importante referir que durante a realização deste teste nem todo o fármaco presente nas membranas fibrosas foi libertado para o meio. Desta forma, foi necessário quantificar o fármaco existente nas membranas após o final do teste (21 dias). Assim, com o objetivo de dissolver as membranas foi-lhes adicionado 1 mL de clorofórmio. Seguidamente, adicionou-se 3 mL de PBS e agitou-se a solução durante alguns minutos para favorecer o contacto entre a fase orgânica e a fase aquosa e desta forma extrair o fármaco não libertado. Com a finalidade de facilitar a separação das fases, a solução foi ainda centrifugada durante 3 min sendo então possível extrair o sobrenadante que continha o fármaco não libertado e proceder à sua quantificação. O processo foi repetido duas vezes e a quantificação do fármaco foi realizada por espectroscopia UV/VIS.

3.4.4. Quantificação da dexametasona e gentamicina através da espectrofotometria UV/VIS

A quantidade de dexametasona e gentamicina presente em todas as amostras recolhidas e no sobrenadante foram medidas utilizando um espectrofotómetro *UV-Vis Jasco V-550*.

O primeiro passo consistiu da determinação da curva de calibração da dexametasona. Para tal foram preparadas cinco soluções de PBS com diferentes quantidades de dexametasona (26,6; 19,5; 13,3; 6,65; 2,66 µg/mL). Assim, através do espectrofotómetro foi feita a leitura da absorvância num comprimento de onda de 242 nm para cada solução. Conhecidos os valores da concentração de fármaco e os valores da absorvância foi então possível a realização da curva de calibração do fármaco.

Uma vez que o sulfato de gentamicina não absorve luz ultravioleta nem visível, foi necessário aplicar um método indireto de forma a quantificar este fármaco por espectrofotometria UV/VIS. O método utilizado baseou-se na reação entre o agente *o-ftaldialdeído* e os grupos amina da gentamicina que originou um derivado que absorve na região da luz visível. O procedimento experimental adotado foi idêntico ao relatado por Cabanillas *et al.*, 2000.

Inicialmente preparou-se a solução de *o-ftaldialdeído* misturando as quantidades de reagentes seguidamente apresentados:

- 0,417 g de *o-ftaldialdeído*;
- 10 mL de metanol;
- 95 mL de solução de borato de sódio (0,04 M);
- 0,5 mL de 2-mercaptoetanol.

A solução resultante foi guardada no escuro durante pelo menos 24 h e utilizada até três dias depois de preparada.

Em cuvetes descartáveis foram adicionadas em partes iguais (800 µL), a solução de gentamicina, o reagente *o-ftaldialdeído* e isopropanol (para evitar a precipitação dos produtos). Posteriormente, a mistura foi agitada num agitador de vórtex e deixada a repousar/reagir durante 30 minutos sendo que nesta altura foi medida a absorvância a um comprimento de onda de 332 nm. Também neste caso, foi construída uma curva de calibração com soluções de gentamicina (102; 76,5; 51; 26,5 e 10,2 µg/mL) que permitiu a quantificação do fármaco.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

No trabalho experimental desenvolvido produziram-se diferentes membranas fibrosas para a libertação controlada e localizada de fármacos com vista à sua possível utilização em intervenções ortopédicas através da sua implantação junto ao osso intervencionado.

Este capítulo inicia-se com a caracterização morfológica e estrutural das nanopartículas de sílica através da análise de parâmetros como:

- A quantidade de sulfato de gentamicina incorporado nas nanopartículas (através da análise termogravimétrica);
- A área de superfície específica (S (m²/g)), o volume dos poros (V_p (cm³/g)) e respetivo diâmetro médio (D_p (nm)).

A segunda etapa deste capítulo destina-se à caracterização das membranas fibrosas produzidas pela técnica de *electrospinning*. Desta forma foi possível o estudo da superfície das amostras, já que estas foram submetidas a uma análise SEM; segue-se um estudo da hidrofiliabilidade/hidrofobicidade das fibras. Por último, avalia-se e discute-se os perfis de libertação *in vitro* obtidos durante 21 dias para os dois fármacos imobilizados nas membranas fibrosas.

4.1. Caracterização das Nanopartículas de Sílica

Nesta secção analisa-se a eficiência de carregamento das nanopartículas de sílica. Avaliam-se também os parâmetros (mencionados anteriormente) para o caso das nanopartículas de sílica com e sem incorporação de sulfato de gentamicina.

4.1.1. Quantificação de GS incorporado nas nanopartículas de sílica com base na técnica de termogravimetria

Tal como descrito no Capítulo 3, pretendeu-se com a análise termogravimétrica quantificar a quantidade de GS imobilizada nas nanopartículas de sílica pelo processo de

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

adsorção. Na Figura 4.1 encontram-se representadas as curvas termogravimétricas do sulfato de gentamicina puro (GS), das nanopartículas de sílica (NPSi) e das nanopartículas de sílica carregadas com gentamicina (NPSiGS). Foi assim possível, com base na percentagem de perda de massa para as três amostras, e através da realização de um balanço mássico, estimar a percentagem de gentamicina presente nas nanopartículas carregadas.

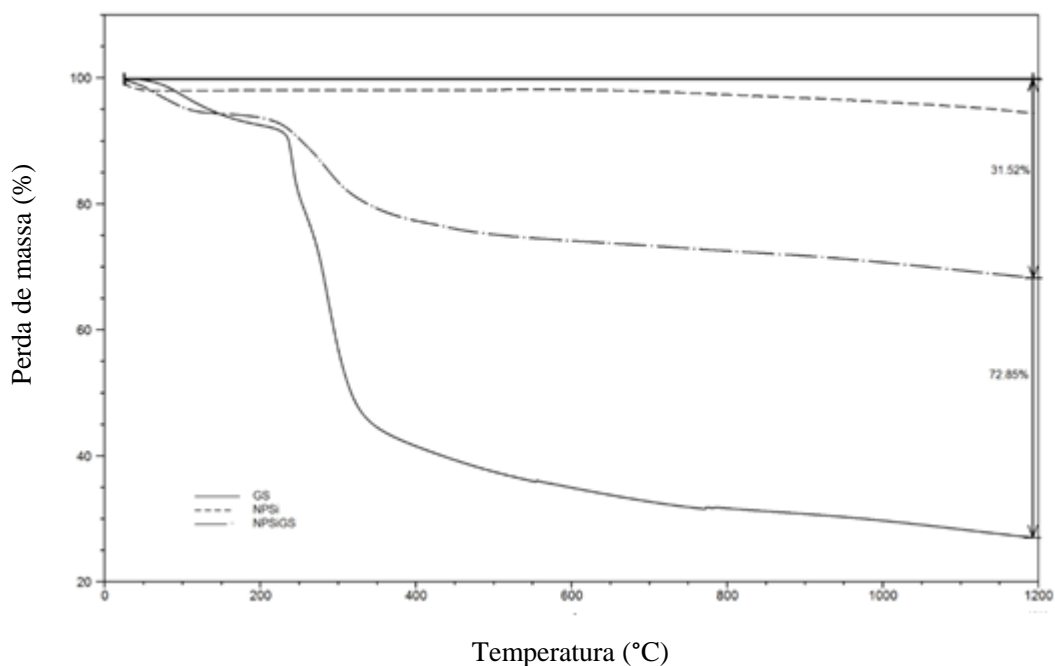


Figura 4.1-Perfis de degradação das NPSi, NPSiGS e GS.

Analisando o perfil termogravimétrico das nanopartículas de sílica é possível observar que estas não apresentam uma perda de massa considerável quando submetidas a um aumento da temperatura até 1200 °C. Considerando que a perda de massa observada quando as nanopartículas submetidas a temperaturas mais elevadas é devido à instabilidade do aparelho é plausível admitir que a perda de massa é de 0 %, concluindo assim que as nanopartículas de sílica são termoestáveis. A rede tridimensional apresentada pelas nanopartículas composta por grupos silanol (Si-OH, dentro dos poros ou na superfície) e siloxano (Si-O-Si, no interior da rede), são os responsáveis pela termoestabilidade apresentada por estes materiais.

Observando atentamente o perfil termogravimétrico do sulfato de gentamicina puro verificou-se que este é caracterizado por dois degraus de perda de massa. A primeira perda de massa, a cerca dos 100 °C, está relacionada com a evaporação da água residual presente na amostra e evidencia a natureza hidrocópica deste fármaco. Por sua vez, a segunda perda de massa - mais acentuada do que a primeira - ocorre sensivelmente entre os 250 °C até aos

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

400 °C e corresponde à degradação do antibiótico. A partir dos 400 °C observa-se uma perda de massa constante até à temperatura em que se completa análise, 1200 °C. A esta temperatura a percentagem de massa é apenas 27 % da massa inicial da amostra. A massa residual que persiste no final do ensaio corresponde provavelmente a sais inorgânicos associados ao fármaco.

Relativamente às nanopartículas de sílica carregadas com gentamicina, é possível observar na Figura 4.1 que o perfil termogravimétrico é caracterizado por uma variação de perda de massa entre os 240 °C e os 400 °C, relacionada com degradação do antibiótico. Após este degrau, o perfil mantém-se sensivelmente constante até aos 1200 °C, onde a perda de massa das NPSiGS atinge aproximadamente os 31,52 %.

Pelos resultados apresentados na Tabela 4,1, obtidos a partir da análise dos perfis de degradação apresentados na Figura 4.1, foi possível efetuar balanços mássicos (apresentados no Anexo I) que permitiram quantificar o fármaco no interior das nanopartículas de sílica. Assim, o sulfato de gentamicina incorporado nas nanopartículas foi de aproximadamente 43 % (m/m).

Tabela 4.1-Valores obtidos através da análise termogravimétrica.

Amostra	massa perdida ($m_{perdida}$) (%)	massa permanece ($m_{permanece}$) (%)
NPSi	~ 0	~ 100
GS	72,85	27,15
NPSiGS	31,52	68,48

4.1.2. Caracterização morfológica das NPSi

A segunda etapa da caracterização das nanopartículas de sílica consistiu na sua análise morfológica. De acordo com o que foi referido no Capítulo 2, as nanopartículas de sílica mesoporosas possuem uma estrutura ordenada que lhes permite que os poros possam ser ocupados com fármacos.

A adsorção física de moléculas de azoto é uma técnica muito importante para a caracterização da superfície específica e da distribuição do tamanho de poros das amostras, que são verificadas através da determinação dos seguintes parâmetros: S , V_p e respetivo D_p . Na Tabela 4.2 estão especificados os parâmetros anteriormente referidos para as nanopartículas de sílica puras e para as nanopartículas de sílica carregadas com gentamicina.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

O volume e tamanho dos poros foram determinados pelo método de BJH, através das curvas isotérmicas de adsorção/dessorção. Por sua vez o modelo de BET, aplicado à análise das isotérmicas de adsorção, foi a ferramenta usada na determinação da área superficial.

Tabela 4.2-Valores dos parâmetros obtidos através das isotérmicas de adsorção de azoto.

Amostra	S (m²/g)	V_p (cm³/g)	D_p (nm)
NPSi	776	0,801	4,13
NPSiGS	295	0,318	4,31

Observando os resultados apresentados na Tabela 4.2 foi possível verificar que as nanopartículas de sílica apresentam uma área de superfície quase três vezes maior do que as nanopartículas de sílica carregadas com gentamicina. A mesma situação é verificada no caso do volume do poro onde as nanopartículas de sílica carregadas com gentamicina possuem um volume de poro muito menor (0,318 cm³/g) do que as nanopartículas de sílica puras (0,801 cm³/g). Isto deve-se ao facto de os poros das nanopartículas estarem preenchidos com o antibiótico resultando uma diminuição dos valores dos parâmetros anteriormente mencionados.

Relativamente ao diâmetro dos poros os valores obtidos para ambas as amostras são muito semelhantes, sendo a diferença apresentada insignificante. Os valores do diâmetro médio de poro das nanopartículas vão de encontro com a gama de valores apresentada na literatura onde o tamanho dos poros deste tipo de nanopartículas é na ordem dos 2-6 nm (Huang *et al.*, 2014).

Conclui-se ainda que os valores dos restantes parâmetros apresentados estão de acordo com os valores reportados na literatura, nomeadamente por Mohseni *et al.*, 2015 que, para partículas do mesmo tipo, reportam valores de área de superfície específica e volume dos poros de 816 m²/g e 1,07 cm³/g, respetivamente.

As isotérmicas de adsorção/dessorção de azoto das NPSi e das NPSiGS são apresentadas na Figura 4.2. Tal como seria de esperar, observa-se nos dois casos, que as isotérmicas apresentadas são do tipo IV, que são isotérmicas tipicamente exibidas por sólidos mesoporosos.

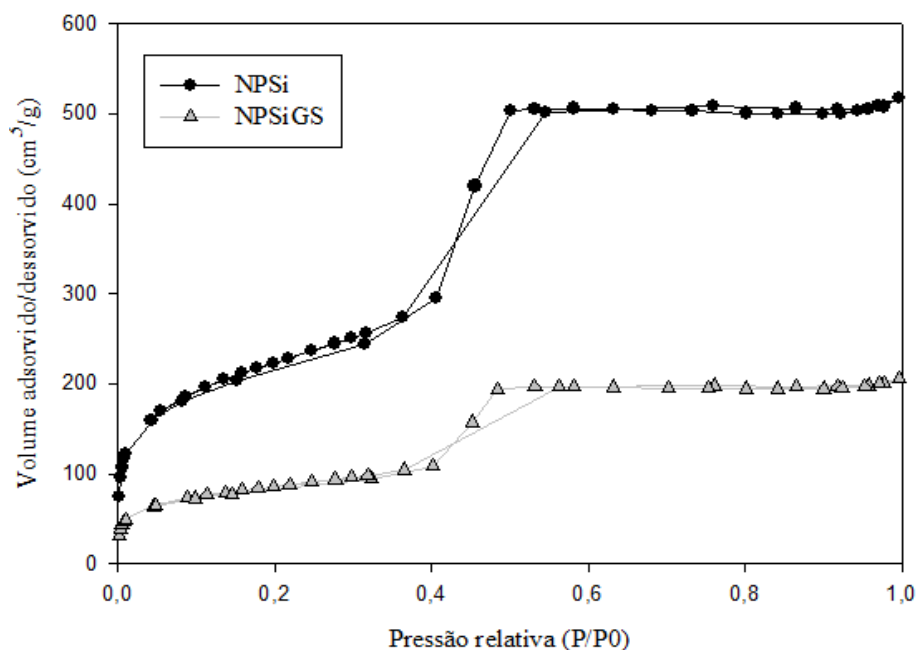


Figura 4.2-Gráfico das curvas isotérmicas de adsorção/dessorção de azoto das NPSi e das NPSiGS.

4.2. Caracterização das membranas fibrosas

A presente etapa envolve a caracterização das membranas fibrosas produzidas através da técnica de *electrospinning*. Como referido anteriormente, esta técnica é uma técnica simples e versátil que permite a formação de fibras com diâmetros que vão desde alguns nanómetros a vários micrómetros. As características apresentadas pelas fibras, nomeadamente a elevada área superficial, juntamente com a elevada porosidade e excelentes propriedades mecânicas e estruturais tornam-nas úteis no desenvolvimento de sistemas de libertação controlada (Yu *et al.*, 2009).

As membranas caracterizadas encontram-se seguidamente listadas. É importante referir que as sete primeiras membranas foram produzidas por *electrospinning* por *blending* (Tabela 3.2) e as restantes através de *electrospinning* coaxial (Tabela 3.3).

- | | |
|-------------------------------------|--|
| A. PLA-GS (<i>blending</i>) | F. PLA-NPSiGS-DEX(<i>blending</i>) |
| B. PLA-NPSiGS(<i>blending</i>) | G. PLA- GS-NPSiGS-DEX(<i>blending</i>) |
| C. PLA-GS-NPSiGS(<i>blending</i>) | H. PLA-GS/PCL-DEX(coaxial) |
| D. PLA-DEX(<i>blending</i>) | I. PLA-NPSiGS/PCL-DEX(coaxial) |
| E. PLA-GS-DEX(<i>blending</i>) | J. PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX(coaxial) |

Todas as membranas fibrosas produzidas neste trabalho foram analisadas pela técnica SEM permitindo assim verificar as diferenças morfológicas entre elas.

4.2.1. Morfologia das fibras por microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

A microscopia eletrônica de varrimento permitiu a obtenção de imagens de elevada resolução de detalhes da superfície das amostras referidas anteriormente permitindo assim a sua caracterização morfológica. Foi assim possível observar a forma como as fibras se encontram depositadas bem como a sua orientação. No caso das formulações que possuem nanopartículas de sílica, esta técnica permitiu ainda verificar como estas estão integradas nas nanofibras. Para além da superfície das nanofibras foram ainda calculados, através do *software ImageJ*, os diâmetros médios das fibras e o seu desvio padrão (Tabela 4.3).

Inicialmente vão ser apresentadas as fotografias de SEM obtidas para a superfície das membranas fibrosas produzidas por *electrospinning* por *blending* a diferentes ampliações bem como um histograma relativo ao diâmetro das fibras.

A morfologia da superfície das membranas que contém apenas sulfato de gentamicina é apresentada na Figura 4.3.

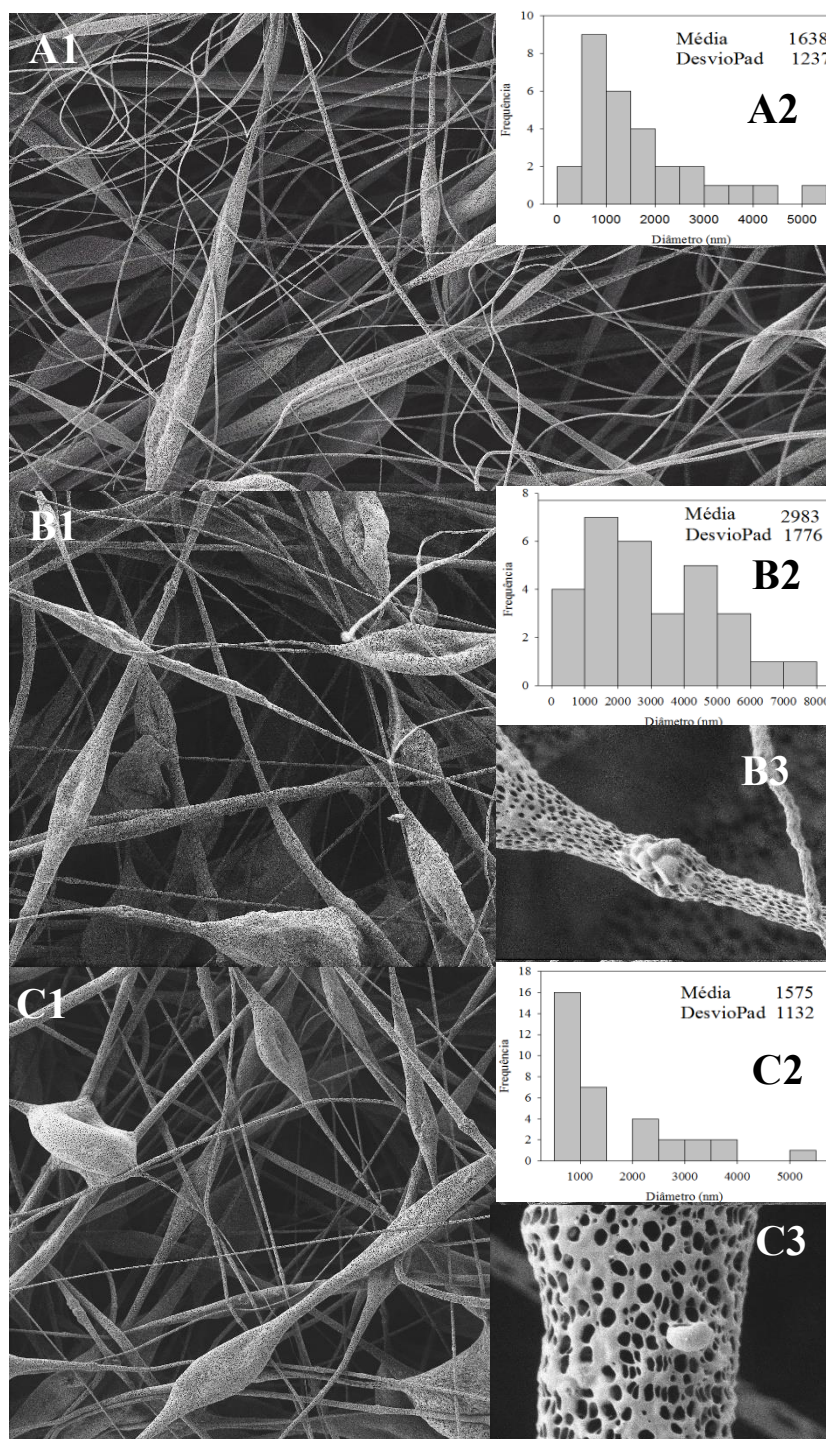


Figura 4.3-A1, B1, C1: Fotografia da superfície das nanofibras de PLA-GS, PLA-NPSiGS e PLA-GS-NPSiGS obtidas através da técnica SEM para uma ampliação de 1000x e respectivos histogramas (A2, B2 e C2). B3 e C3: -Fotografia da superfície das nanofibras PLA-NPSiGS e PLA-GS-NPSiGS para uma ampliação de 30000 x.

Observando as fotografias de SEM presentes na Figura 4.3 é possível verificar que as fibras de todas as amostras apresentam uma orientação aleatória. Esta disposição resulta do facto de estas fibras terem sido depositadas num coletor estático. Utilizando um coletor rotativo ou outro tipo de coletor seria possível orientar as fibras numa única direção, ou obriga-las a formar padrões específicos (Costa *et al.*, 2012).

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Verifica-se ainda na Figura 4.3 que todas as amostras exibem uma quantidade significativa de aglomerados de polímeros designados por *beads*. Este resultado poderá estar associado à aplicação de uma voltagem inadequada e ainda à adição de nanopartículas de sílica na solução polimérica. A Figura 4.3 B1 e C1 confirmam este pressuposto. Estas amostras para além de apresentarem mais *beads* estes são ainda mais evidentes nestas duas formulações do que no caso da amostra PLA-GS que não possui nanopartículas de sílica.

Observando a Figura 4.3 B3 e C3, é possível verificar a disposição das nanopartículas de sílica nas fibras. Apenas algumas nanopartículas se encontram à superfície das fibras estando as restantes no seu interior. Observa-se ainda que as fibras apresentam uma estrutura porosa. (Li & Xia, 2004) referem que o fenómeno de formação de poros na superfície das nanofibras poderá estar relacionado com a evaporação do solvente. Durante este processo há formação de duas fases nas fibras, uma rica em polímero e outra rica em solvente. Este resultado pode estar associado a fraca interação entre o DMF e o PLA. Assim, a fase rica em polímero solidifica logo após a separação de fases formando a matriz enquanto que, quando a fase rica em solvente evapora, o espaço ocupado por esse solvente vai dar origem aos poros.

No que diz respeito aos histogramas apresentados na Figura 4.3 é possível observar que a distribuição dos diâmetros das fibras é bastante larga em todos os casos, resultando assim um elevado desvio padrão.

Seguidamente são apresentadas as imagens obtidas para as nanofibras que contêm dexametasona, podendo também incluir na sua composição sulfato de gentamicina.

Através da Figura 4.4 é possível avaliar as fotografias de SEM obtidas para as nanofibras compostas por PLA-DEX, PLA-GS-DEX, PLA-NPSiGS-DEX e PLA-GS-NPSiGS-DEX.

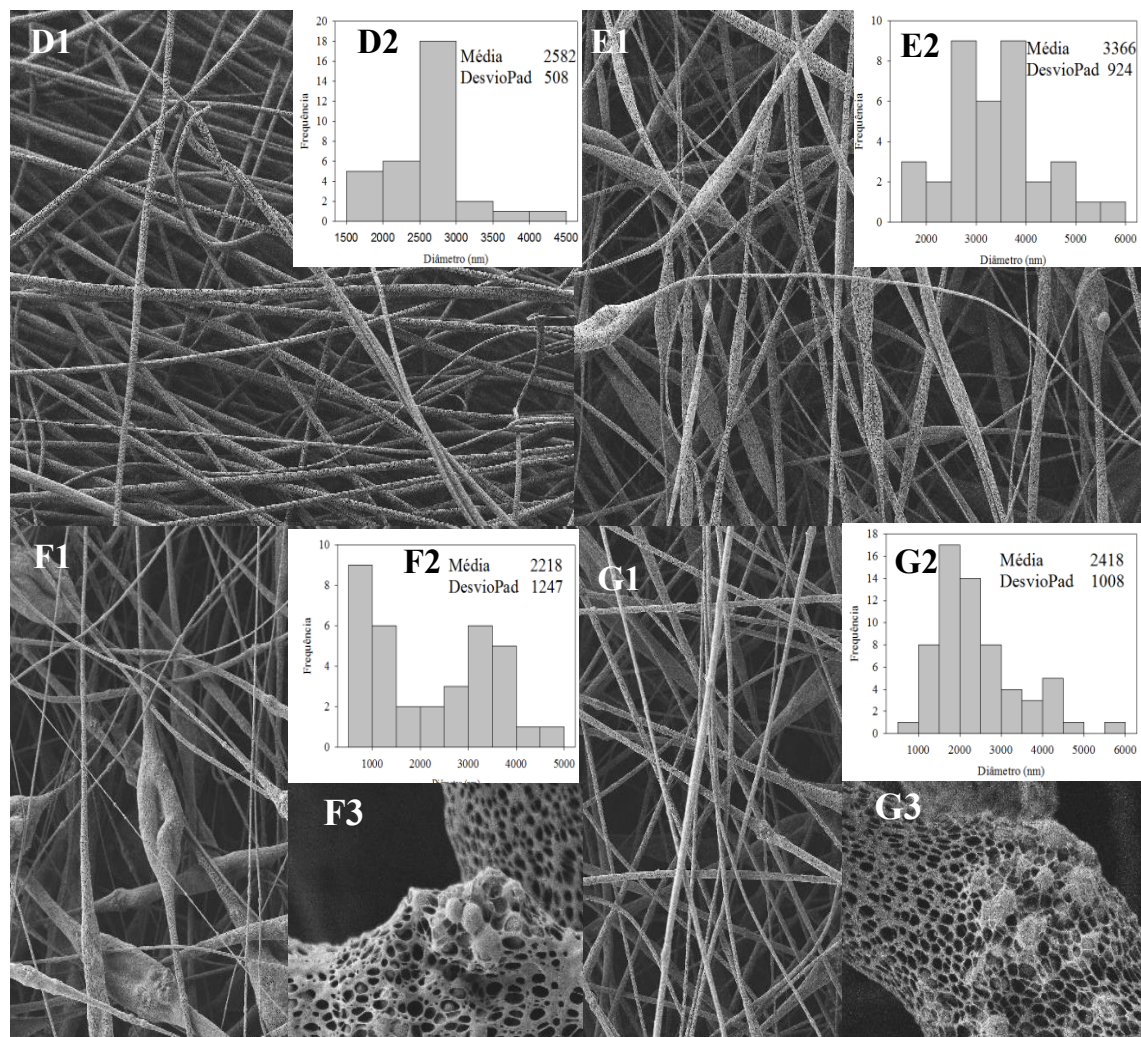


Figura 4.4-D1, E1, F1, G1: Fotografia da superfície das nanofibras de PLA-DEX, PLA-GS-DEX, PLA-NPSiGS-DEX e PLA-GS-NPSiGS-DEX obtidas através da técnica SEM para uma ampliação de 1000x e respectivos histogramas (D2, E2, F2 e G2). F3 e G3: -Fotografia da superfície das nanofibras, PLA-NPSiGS-DEX e PLA-GS-NPSiGS-DEX para uma ampliação de 30000 x.

Comparando a membrana composta por PLA-GS apresentada na Figura 4.3 A1 e a nanofibra composta por PLA-DEX observada na Figura 4.4 D1 é possível constatar que a morfologia das fibras de PLA com dexametasona “livre” (PLA + DEX) não apresenta *beads*. Isto poderá estar associado à ausência de GS na sua formulação resultando assim fibras com uma estrutura mais uniforme. De facto, a gentamicina utilizada neste trabalho (sulfato de gentamicina) encontra-se sobre a forma iónica. Consequentemente, e nas formulações que contêm gentamicina, a aplicação da fonte de alta tensão durante o processo de *electrospinnig* resulta na acumulação de uma elevada densidade de carga eléctrica à superfície do fluido, e um aumento nas repulsões eletrostáticas, que pode conduzir à divisão/ destabilização do jato, consequentemente, o jato pode dividir-se em pequenas gotículas resultando na formação de *beads* (Huang *et al.*, 2003).

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Observando agora a formulação composta pelo polímero PLA, nanopartículas de sílica carregadas com gentamicina e gentamicina “livre” (PLA-GS-NPSiGS, Figura 4.3 C1) e a formulação constituída pelo polímero PLA, nanopartículas de sílica carregadas com gentamicina e dexametasona “livre (PLA-NPSiGS-DEX, Figura 4.4 F1) verifica-se que ambas as superfícies apresentam *beads*. Assim, é razoável concluir que a dexametasona não tem qualquer influência na morfologia das membranas fibrosas, podendo este facto ser explicado pela baixa quantidade de massa de DEX usada nas formulações.

As membranas produzidas pela técnica de *electrospinning* coaxial foram também caracterizadas por análise SEM. Também para estas amostras, as fotografias obtidas foram analisadas determinando-se assim os diâmetros das fibras em cada caso. Os diâmetros médios de cada tipo de fibras encontram-se na Tabela 4.3.

Na Figura 4.5 apresenta-se a análise efetuada para cada membrana fibrosas PLA-GS/PCL-DEX, PLA-NPSiGS/PCL-DEX e PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX para diferentes ampliações.

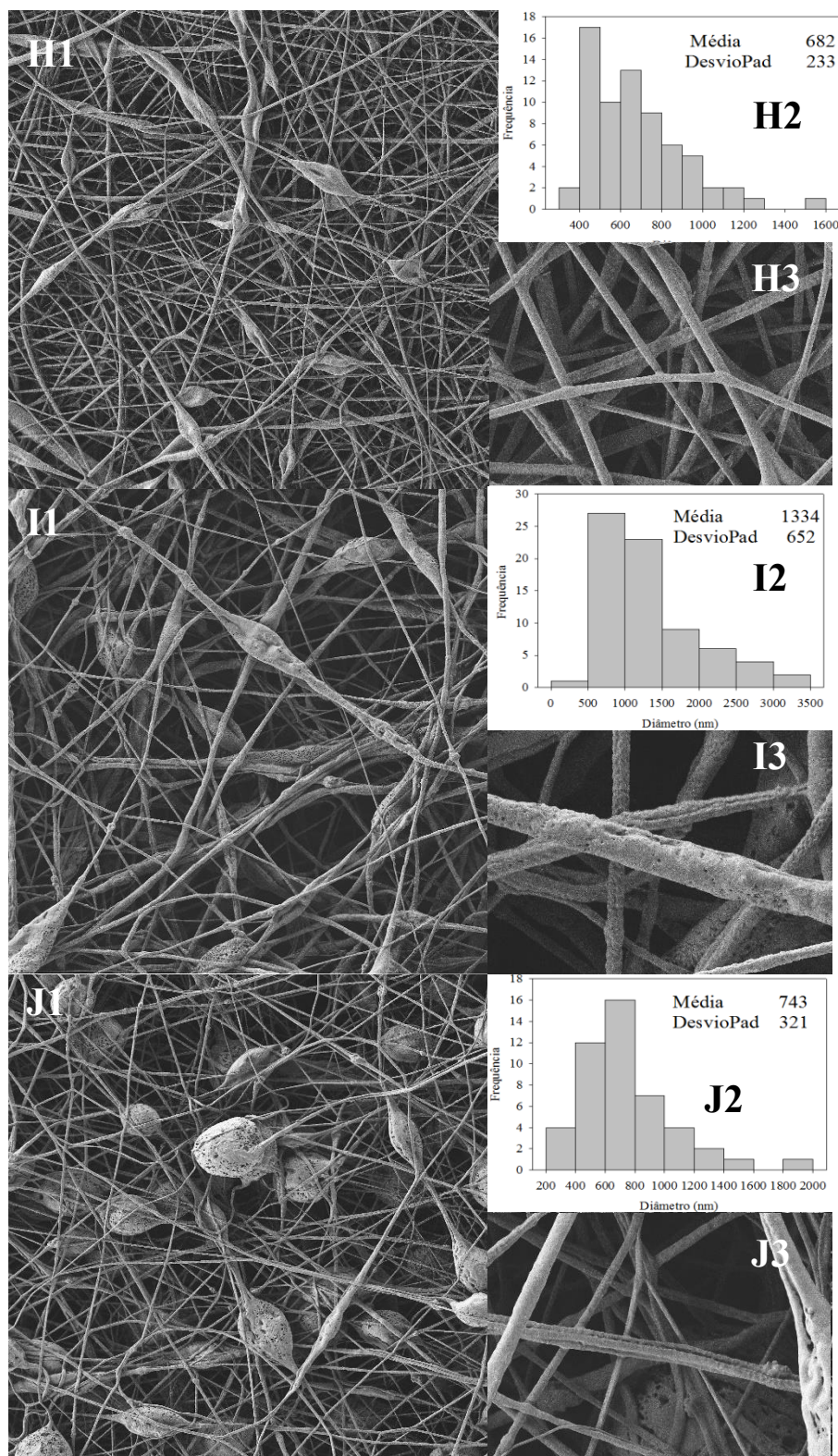


Figura 4.5-H1, I1, J1: Fotografia da superfície das nanofibras de PLA-GS/PCL-DEX, PLA-NPSiGS/PCL-DEX e PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX obtidas através da técnica SEM para uma ampliação de 1000x e respectivos histogramas (H2, I2, J2). H3, I3 e J3: - Fotografia da superfície das nanofibras PLA-GS/PCL-DEX, PLA-NPSiGS/PCL-DEX e PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX para uma ampliação de 30000 x.

Analisando atentamente a Figura 4.5 observa-se um comportamento semelhante às nanofibras analisadas anteriormente, visto que em todas as superfícies apresentadas nestas

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

fotografias se pode observar a presença de *beads*. Comparando agora a superfície apresentada pelas membranas produzidas pela técnica de *electrospinning* por *blending* (Figura 4.4 F3, G3 e Figura 4.3 B3 e C3) e as fotografias exibidas para o caso das fibras fabricadas pela técnica de *electrospinning* coaxial (Figura 4.5 H3, I3 e J3) constata-se que para o último caso as nanofibras apresentam uma porosidade bastante mais reduzida. Isto advém do facto de as nanofibras coaxiais apresentarem uma estrutura núcleo-camada externa na qual apenas o núcleo é constituído pelo polímero PLA que contribui para a estrutura porosa das fibras sendo que a camada externa da fibra é constituída por PCL que torna a superfície destas nanofibras lisas e sem poros visíveis.

Tal como referido anteriormente, a Tabela 4.3 apresenta os valores de médias e desvio padrão para os diâmetros das fibras.

Tabela 4.3- Distribuição da média e desvio padrão (σ) dos diâmetros (nm) das fibras.

Formulação	Média $\pm \sigma$
A. PLA-GS	1638 \pm 1237
B. PLA-NPSiGS	2983 \pm 1776
C. PLA-GS-NPSiGS	1575 \pm 1132
D. PLA-DEX	2582 \pm 508
E. PLA-GS-DEX	3366 \pm 924
F. PLA-NPSiGS-DEX	2218 \pm 1247
G. PLA-GS-NPSiGS-DEX	2418 \pm 1008
H. PLA-GS/PCL-DEX	682 \pm 233
I. PLA-NPSiGS/PCL-DEX	1334 \pm 652
J. PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX	743 \pm 321

Relativamente aos diâmetros apresentados na Tabela 4.3 verifica-se que as membranas fabricadas através da técnica *electrospinning* coaxial exibem uma média de diâmetros menores do que as fibras produzidas por *electrospinning* por *blending*. Um parâmetro importante do *electrospinning* que poderá explicar esta diferença de valores é o caudal usado na produção das nanofibras. No caso das fibras com estrutura núcleo-camada externa, o caudal utilizado foi menor e, conseqüentemente, o diâmetro das fibras é também menor.

Ao analisar os valores obtidos para os diâmetros médios das fibras PLA-GS, PLA-NPSiGS e PLA-GS-NPSiGS verificou-se que estes não variam muito entre si, o que implica que as diferentes proporções de GS e NPSiGS não influenciam este aspeto morfológico. De facto, o mais importante para a caracterização do diâmetro da fibra será a eletrofiação da

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

solução polimérica e os seus parâmetros que, ao serem constantes, contribuem assim para a pouca discrepância nestas medições. Considerando ainda os diâmetros médios das fibras, apresentados de uma forma resumida na Tabela 3, verifica-se que as membranas apresentam fibras com uma distribuição alargada de diâmetros sendo que o diâmetro médio das fibras PLA-GS (1638 nm) e PLA-GS-NPSiGS (1575 nm) é menor do que o diâmetro médio das fibras PLA-DEX (285 nm) e PLA-NPSiGS-DEX (2218 nm).

4.2.2. Análise do comportamento hidrofílico das membranas fibrosas

A avaliação da hidrofilicidade/hidrofobicidade das membranas produzidas baseia-se na medição do ângulo de contacto formado entre uma gota de água e a superfície da membrana (Figura 4.6). Geralmente, materiais hidrofílicos exibem baixo ângulo de contacto, isto é menor do que 90° (espalhamento de água em toda a superfície), enquanto que materiais hidrofóbicos mostram um ângulo de contacto elevado (maior do que 90°) uma vez que o contacto entre a gota de água e a superfície é baixo.



Figura 4.6- Modelo do ângulo de contacto para membranas fibrosas. Adaptado de: (Huang *et al.*, 2008).

Para cada membrana fibrosa foram medidos os ângulos de contacto estáticos utilizando como solvente água desionizada.

Todas as amostras foram submetidas a cinco medições de ângulos de contacto. Os valores apresentados na Figura 4.7 dizem respeito às médias e desvios padrões dessas cinco medições.

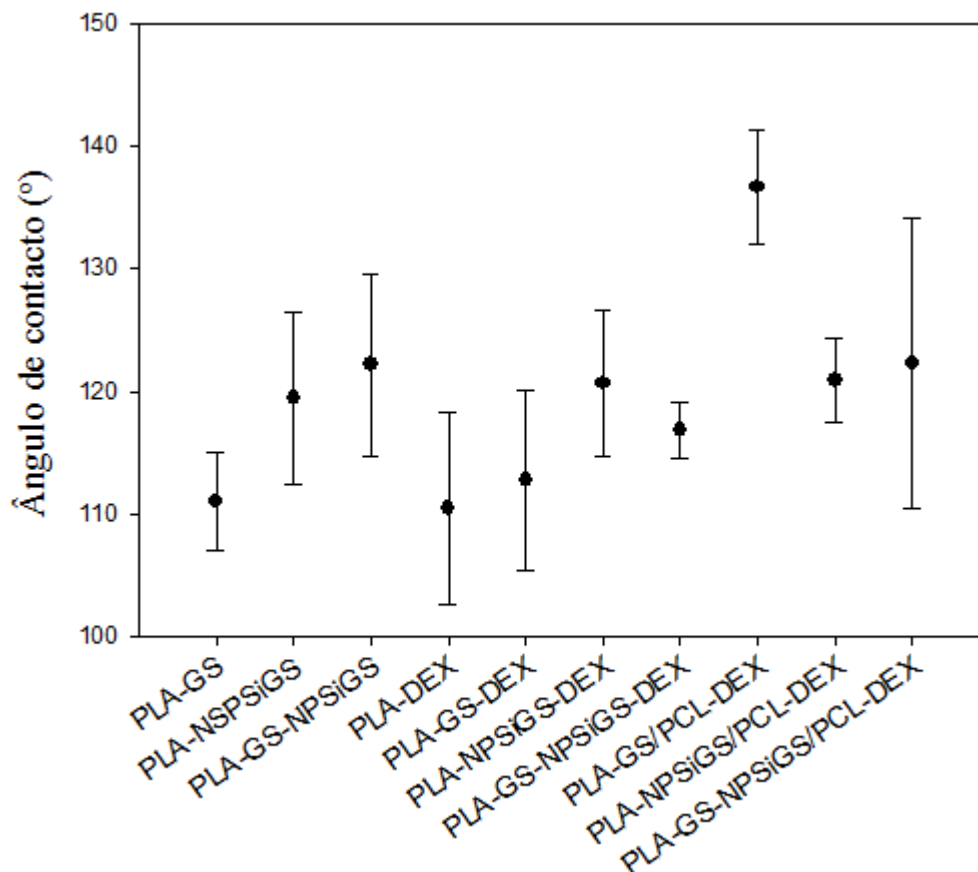


Figura 4.7- Representação da distribuição da média e desvio padrão dos ângulos de contacto para todas as amostras.

Através da Figura 4.7, verifica-se que todas as amostras apresentam ângulos de contacto semelhantes, com valores médios que variam entre os 110 ° e os 137 °. Tal como seria de esperar – tendo em conta a natureza hidrofóbica dos polímeros PLA e PCL - todas as nanofibras apresentam ângulos de contacto superiores a 90 °, o que indica que estas apresentam um elevado carácter hidrofóbico.

Verifica-se ainda que a adição das nanopartículas de sílica e de sulfato de gentamicina não têm qualquer influência na hidrofobicidade das nanofibras. Apesar de tanto as NPSi como a GS exibirem um carácter hidrofílico o ângulo de contacto das membranas constituídas por estes materiais não apresenta um valor menor do que as membranas que contém DEX (praticamente insolúvel em água). Isto poderá ser consequência da baixa quantidade de fármacos e nanopartículas presentes na formulação podendo também ser explicado pelo facto de parte das nanopartículas estarem incorporadas no interior das fibras. Conclui-se assim que o fator predominante na análise do comportamento hidrofílico das membranas é a natureza do polímero.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Analisando agora o valor médio dos ângulos de contacto das membranas produzidas pela técnica de *electrospinning* coaxial constata-se que, apesar da PCL possuir um carácter hidrofóbico superior ao do PLA, as membranas coaxiais não apresentam ângulos de contacto superiores.

4.2.3. Estudo da libertação *in vitro* dos fármacos

De forma a avaliar a capacidade das membranas fibrosas para serem utilizadas como sistema de libertação controlada de fármacos, procedeu-se à incorporação de um antibiótico (GS) e um anti-inflamatório (DEX) tendo-se avaliado a sua libertação ao longo de 21 dias.

Tal como referido no capítulo dos materiais e métodos, os ensaios de libertação de todas as amostras consistiram na incubação das membranas fibrosas em PBS a 37 °C.

Numa primeira etapa vão ser analisados os perfis de libertação obtidos para as diferentes formas utilizadas para incorporar a GS nas fibras:

- a) Dispersão das partículas de sulfato de gentamicina na solução polimérica (PLA-GS);
- b) Dispersão das nanopartículas de sílica impregnadas com sulfato de gentamicina na solução polimérica (PLA-NPSiGS);
- c) Combinação das duas formas anteriores, onde 50 % do GS foi adicionado na forma livre e a outra metade imobilizada nas nanopartículas de sílica (PLA-GS-NPSiGS).

Os perfis de libertação das formulações descritas anteriormente são apresentados na Figura 4.8. As curvas de calibração são apresentadas no Anexo II.

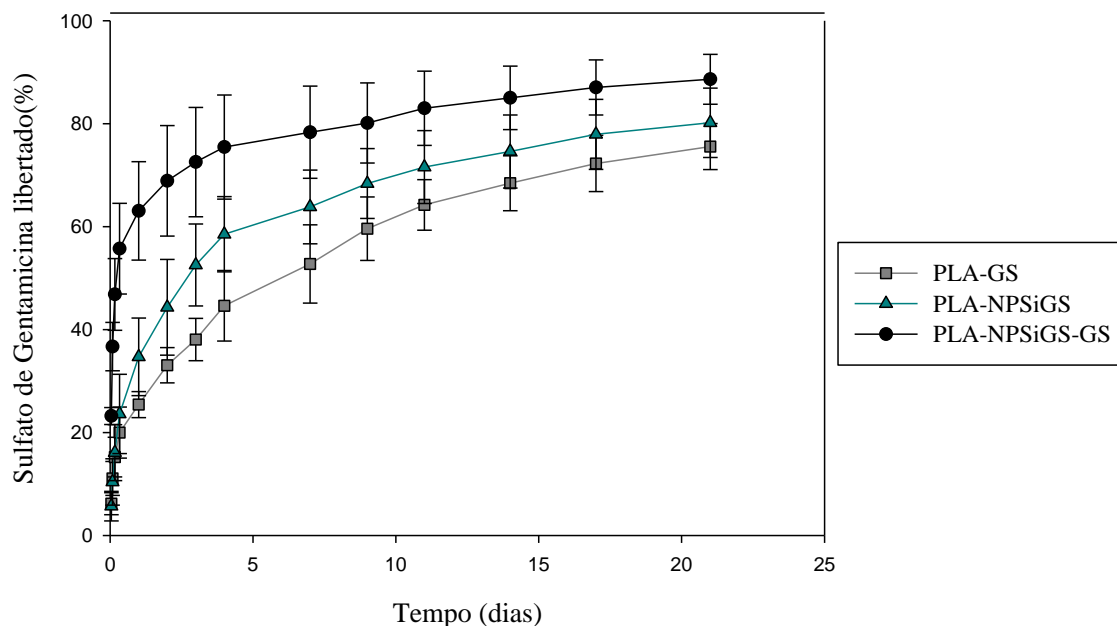


Figura 4.8- Perfil de liberação (%) de sulfato de gentamicina libertado ao longo de 21 dias.

Analisando os perfis de liberação apresentados na Figura 4.8, constata-se que ocorre uma liberação acentuada de antibiótico nas primeiras horas em todas as membranas seguindo-se uma liberação gradual de GS. Esta liberação acentuada é chamada de *burst release* e diz respeito à elevada liberação de fármaco nos instantes iniciais após a membrana ter sido introduzida no meio de liberação. Assim, no primeiro dia, verifica-se um *burst release* com a liberação de 25 % (PLA-GS), 35 % (PLA-NPSiGS) e 63 % (PLA-GS-NPSiGS) de sulfato de gentamicina; a etapa seguinte é caracterizada por uma liberação controlada de GS que durou aproximadamente duas semanas. Na última semana do teste a taxa de liberação do antibiótico diminui.

O *burst release* corresponde à liberação da fração de fármaco que se encontra à superfície das nanofibras.

Um *burst release* acentuado, principalmente para moléculas pequenas e hidrofílicas, é característico deste tipo de sistemas, devido à elevada superfície específica apresentada por estas membranas. Neste caso, e devido às nanofibras apresentarem uma elevada densidade de poros, a área superficial total será ainda mais elevada. A segunda etapa de liberação corresponde ao fármaco que não se encontra à superfície, mas sim no interior das fibras libertando-se assim de uma forma gradual.

A liberação do fármaco a partir de matrizes fibrosas biodegradáveis pode ser controlada através dos mecanismos de difusão e de degradação da matriz polimérica. Contudo, o processo de hidrólise do PLA é bastante lento, (podendo demorar um ano ou até mais até o

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

PLA ser completamente degradado e reabsorvido), não tendo por isso muita influência no perfil de libertação do sulfato de gentamicina (o tempo de análise do perfil de libertação apenas de 21 dias). Assim, o método que domina a libertação da GS é a difusão.

Contrariamente ao que seria de esperar, a membrana composta pelo polímero PLA e sulfato de gentamicina “livre”, PLA-GS, apresenta uma cinética de libertação mais lenta do que a membrana PLA-NPSiGS, onde o fármaco se encontra imobilizado nas nanopartículas. Teoricamente, previa-se que a membrana PLA-NPSiGS apresentasse uma libertação de fármaco mais gradual que a membrana PLA-GS, visto que no caso das fibras compostas por PLA-NPSiGS o antibiótico tem que vencer mais barreiras para se libertar (inicialmente tem de se desorver da superfície dos poros das nanopartículas e se difundir para o exterior destes, e só depois é possível a sua difusão da matriz polimérica até à superfície das fibras). Porém, este resultado poderá estar relacionado com a distribuição das nanopartículas de sílica ao longo das fibras. De facto, se estas se encontrarem à superfície das fibras o GS imobilizado nelas rapidamente entra em contacto com o PBS difundindo-se para o meio de libertação e, consequentemente, a cinética de libertação vai ser mais rápida.

Observando agora o perfil de libertação exibido pela membrana PLA-GS-NPSiGS, esta apresenta a cinética de libertação mais rápida das três membranas bem como o *burst release* mais acentuado.

Como mencionado anteriormente, um dos grandes objetivos deste trabalho consistia na produção de uma membrana fibrosas que possuísse a capacidade de libertar em simultâneo dois fármacos, o sulfato de gentamicina (GS) e a dexametasona (DEX). Assim as formulações seguintes conjugam os dois fármacos.

A Figura 4.9 descreve os perfis de libertação do GS (A) e da dexametasona (B) para diferentes membranas.

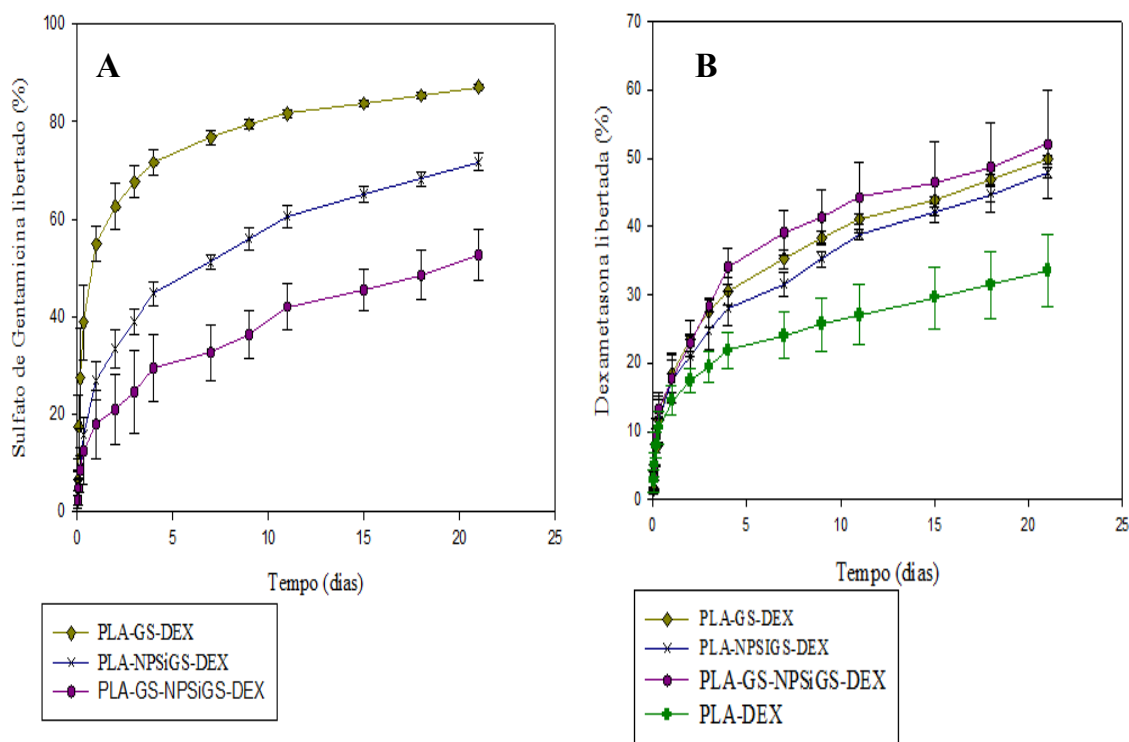


Figura 4.9- Comparação do perfil de libertação (%) entre libertação dos dois fármacos sulfato de gentamicina (A) e dexametasona (B) para as membranas: PLA-DEX, PLA-GS-DEX, PLA-NPSiGS-DEX e PLA-GS-NPSiGS-DEX.

Analisando o perfil de libertação da gentamicina (Figura 4.9A) das membranas PLA-GS-DEX, PLA-NPSiGS e PLA-GS-NPSiGS-DEX constata-se que a presença das NPSiGS na formulação contribui para uma diminuição da cinética de libertação resultando assim um perfil de libertação mais lento e gradual, como se tinha teorizado e, como já se referiu, não se observou no caso das membranas contendo apenas GS.

A membrana PLA-NPSiGS-DEX apresenta uma cinética de libertação de GS (Figura 4.9A) mais rápida do que a membrana PLA-GS-NPSiGS-DEX. O atraso na libertação apresentado pela última membrana poderá estar associado ao facto de que neste caso o GS se encontrar bem incorporado e distribuído nas nanopartículas.

Porém, o mesmo não se verifica para o caso do perfil de libertação da dexametasona (Figura 4.9B). Para este último caso, as nanopartículas não terão influência tão acentuada na libertação da dexametasona dado que as curvas de libertação obtidas das membranas PLA-GS-DEX, PLA-GS-NPSiGS-DEX e PLA-NPSiGS-DEX são muito semelhantes.

Comparando os perfis de libertação de DEX com o obtido para a membrana contendo apenas DEX (PLA-DEX), Figura 4.9B, verifica-se que a presença de GS nas formulações desempenha um papel importante na cinética de libertação da dexametasona tornando-a mais

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

rápida. Este resultado está associado à hidrofiliabilidade da gentamicina. Este antibiótico é rapidamente dissolvido quando em contacto com o PBS originando microporosidades ao longo das fibras que favorecem a difusão da DEX resultando assim um perfil de libertação mais rápido. Por esta razão, o perfil de libertação de DEX da membrana PLA-DEX é o que apresenta uma cinética mais lenta.

Comparando os diferentes *burst release* apresentados na Figura 4.9B constata-se que a membrana PLA-DEX apresenta uma libertação de DEX, durante as primeiras 24 h, inferior às restantes membranas já que o *burst release* exibido por esta membrana apresenta um valor de 15 %, enquanto que as membranas PLA-GS-DEX, PLA-NPSiGS-DEX e PLA-GS-NPSiGS-DEX apresentam todas um valor de aproximadamente 18 %. Este resultado poderá também ser explicado pela hidrofobicidade da DEX. Para além disso, a baixa quantidade de dexametasona presente nas formulações (20 mg) pode também contribuir para uma libertação mais lenta deste anti-inflamatório.

No final dos 21 dias de ensaio de libertação *in vitro*, verifica-se que a libertação da dexametasona não é completa já que a membrana PLA-GS-DEX liberta 50 %, a membrana PLA-NPSiGS-DEX liberta aproximadamente 48 % e a membrana PLA-GS-NPSiGS-DEX liberta 52 %. Posto isto, é possível que a libertação total da DEX não seja atingida apenas por difusão, mas que também necessite do contributo da degradação do polímero.

Avaliando agora o *burst release* apresentado pela membrana PLA-NPSiGS-GS (35%) presente na Figura 4.8 com o *burst release* exibido pelas nanofibras PLA-GS-NPSiGS-DEX (18 %) evidenciado na Figura 4.9A, verifica-se uma diminuição na libertação de GS para o caso da membrana composta por dexametasona. Esta situação poderá estar relacionada com a hidrofobicidade da dexametasona ou pelo facto de nestas formulações as nanopartículas estarem mais dispersas incorporadas nas fibras.

Como referido anteriormente, diversas estratégias têm sido desenvolvidas com o objetivo de se alcançar uma libertação mais controlada. Através da tecnologia de *electrospinning* coaxial foi possível a produção de nanofibras com a estrutura núcleo-camada externa no qual a camada exterior é constituída pelo polímero e o anti-inflamatório (DEX) e a solução no interior contém o antibiótico (GS).

Assim, última etapa deste subcapítulo consiste na análise de diferentes membranas fibrosas que, apesar de todas as camadas externas apresentarem a mesma composição (PCL-DEX), o núcleo é constituído pelas diferentes formas de incorporar GS, sendo assim possível a sua comparação. Também aqui são estudados e comparados a libertação dos dois fármacos.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Na Figura 4.10 apresentam-se os perfis de liberação de GS (A) e da dexametasona (B) para as membranas coaxiais.

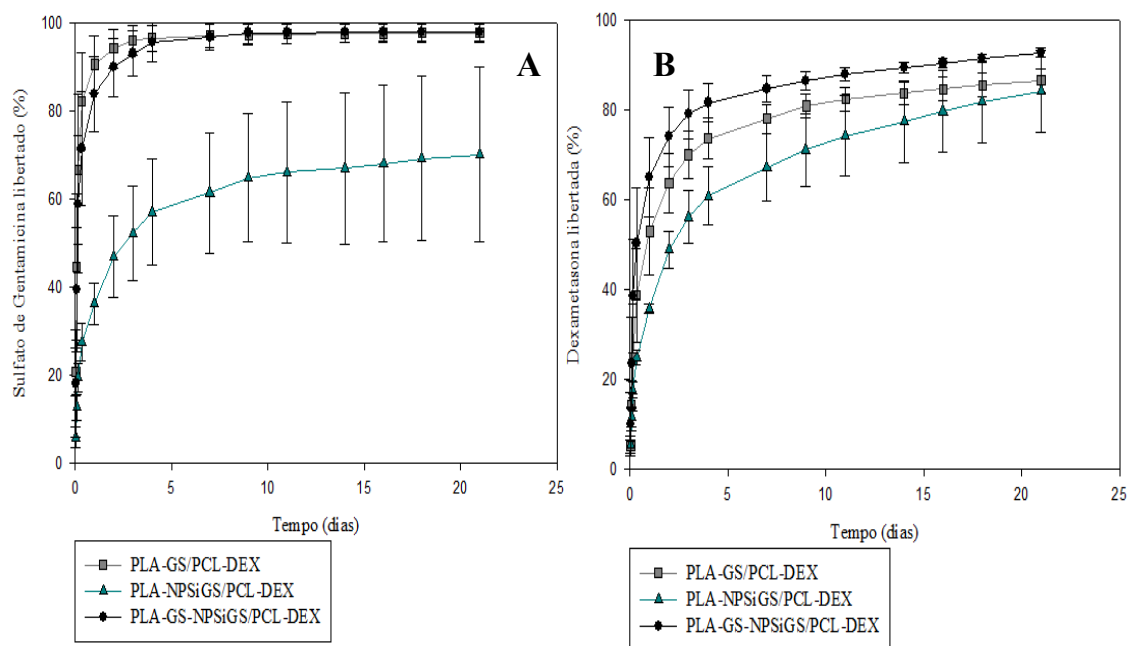


Figura 4.10- Comparação do perfil de liberação (%) entre liberação dos dois fármacos sulfato de gentamicina (A) e dexametasona (B) para as membranas coaxiais: PLA-GS/PCL-DEX, PLA-NPSiGS/PCL-DEX e PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX.

As fibras produzidas através da técnica *electrospinning* coaxial apresentam uma estrutura núcleo-camada externa que encapsulam o fármaco (GS) no interior do núcleo minimizando assim a liberação brusca inicial do fármaco sendo que neste caso o mecanismo de liberação deveria ser essencialmente difusão do fármaco ou degradação das nanofibras em vez de desorção a partir da superfície de nanofibras. Contudo, contrariamente ao que seria de esperar, todas as membranas apresentadas na Figura 4.10 apresentam um *burst release* muito acentuado.

Observando os perfis de liberação de gentamicina na Figura 4.10 A é possível confirmar que estes são caracterizados por três etapas: a primeira etapa consiste numa liberação acentuada sendo que a quantidade de GS libertado durante as primeiras 24 h para a membrana PLA-GS/PCL-DEX é 91 %, para a membrana PLA-NPSiGS/PCL-DEX é 36 % e para a membrana PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX é sensivelmente 84 %; segue-se uma liberação lenta e gradual até aos dias 7, 11 e 8 respetivamente. Na última etapa a curva de liberação mantém-se constante uma vez que não há liberação de gentamicina durante o restante período em que o estudo de liberação *in vitro* ocorre.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

A grande extensão do fenómeno de *burst release* observada nas membranas PLA-GS/PCL-DEX e PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX (Figura 4.10A) poderá estar associada ao facto de que nestes casos - e aquando formação das fibras - a GS tenha migrado para a camada externa da nanofibras, ficando assim à superfície desta e resultando, assim, na libertação quase total do antibiótico nas primeiras 24 h. Esta migração para a superfície das fibras em formação terá sido provavelmente promovida pela natureza iónica da GS. Contudo, o *burst release* da membrana PLA-GS-NPSiGS/PCL-DEX é visivelmente inferior, comparativamente com as restantes membranas. Nesta situação, a quantidade de GS na superfície das fibras é menor e conseqüentemente o *burst release* exibido por esta membrana é também menor. A libertação lenta e gradual apresentada após o *burst release* é o resultado do GS bem incorporado nas nanopartículas de sílica.

Também aqui, a gentamicina desempenha um papel importante nos perfis de libertação de dexametasona presentes na Figura 4.10B, já que as membranas que possuem GS “livre” na sua constituição apresentam uma libertação de dexametasona superior.

Por fim, a elevada libertação de GS exibida pelas membranas coaxiais (Figura 4.10A), relativamente às membranas apresentadas na Figura 4.8 poderá também estar relacionado com o diâmetro médio das fibras. As membranas coaxiais apresentam um diâmetro médio menor (Tabela 4.3) resultando assim fibras com uma área de superfície mais elevada e, conseqüentemente, a transferência de massa do fármaco também vai ser maior.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

5.1. Conclusão Geral

Neste trabalho foram preparadas e caracterizadas membranas fibrosas de base polimérica, nas quais foram incorporados os fármacos sulfato de gentamicina e dexametasona, através da técnica de *electrospinning*. Com esta estratégia de produção de membranas fibrosas pretende-se obter um sistema de libertação controlada de fármacos que permite uma libertação controlada e constante de ambos os fármacos.

A primeira fase do trabalho consistiu na impregnação do sulfato de gentamicina nas nanopartículas de sílica e teve como objetivo retardar a libertação deste antibiótico. O sulfato de gentamicina é um fármaco hidrofílico e, desta forma, iria difundir-se muito rapidamente da matriz polimérica. Assim, incorporando este antibiótico nas nanopartículas este vai ter que vencer mais barreiras para se libertar. A análise termogravimétrica permitiu quantificar a GS presente nas nanopartículas, tendo-se verificado que o sulfato de gentamicina incorporado nas nanopartículas foi de aproximadamente 43 % (m/m). Conclui-se assim que o GS foi imobilizado com sucesso nas nanopartículas de sílica.

Com o propósito de avaliar a superfície específica das nanopartículas de sílica puras e das nanopartículas de sílica carregadas com gentamicina recorreu-se à técnica de adsorção física das moléculas de azoto tendo-se verificado uma diminuição da área de superfície bem como o volume do poro das nanopartículas carregadas com gentamicina ($295 \text{ m}^2/\text{g}$; $0,318 \text{ cm}^3/\text{g}$) relativamente às nanopartículas puras ($776 \text{ m}^2/\text{g}$; $0,801 \text{ cm}^3/\text{g}$). Esta diminuição nos parâmetros anteriormente referidos indica que o sulfato de gentamicina preencheu os espaços vazios, demonstrando-se também que o propósito de incorporar o GS nas nanopartículas foi alcançado.

A segunda etapa deste trabalho foi dividida em duas abordagens experimentais: produção de membranas fibrosas a partir de *electrospinning* por *blending*; e produção de membranas fibrosas a partir de *electrospinning* coaxial. Em ambas as abordagens a produção de nanofibras teve em conta os diferentes tipos de incorporação dos fármacos: GS e DEX dispersos na matriz polimérica; nanopartículas de sílica carregadas com gentamicina, e a combinação dois (nanopartículas de sílica carregadas com gentamicina e fármaco livre (GS

Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras

e/ou DEX). Todas as amostras obtidas foram caracterizadas pela técnica SEM tendo também sido analisados o diâmetro médio das fibras para cada uma das formulações. Todos os conjuntos de imagens apresentaram fibras bem formadas, aleatoriamente distribuídas sendo que, contrariamente ao desejado, quase todas as membranas apresentavam *beads*.

Todas as nanofibras obtidas neste procedimento têm diâmetros que variam entre os 682 e os 3366 nm, dimensões que proporcionam uma relação área superficial/volume elevada. Esta característica é favorável para a incorporação e libertação de fármacos

Os perfis de libertação dos fármacos existentes em cada membrana foram obtidos através da realização de testes *in vitro* durante um período de 21 dias, em PBS. A análise da libertação dos fármacos foi realizada separadamente para cada um dos fármacos. O estudo de libertação dos fármacos comprovou que todas as matrizes tiveram tendência de libertar a maior quantidade de fármaco nas primeiras horas.

Nas membranas onde o sulfato de gentamicina é o único fármaco, obtiveram-se libertações deste antibiótico superiores a 75 % após o período de realização do teste (21 dias). Relativamente ao *burst release* apresentados por estas membranas estes variam entre os 25 e os 63 %.

No que diz respeito às membranas constituídas pelos dois fármacos e relativamente ao perfil de libertação do GS concluiu-se que a adição das nanopartículas de sílica à formulação contribui para uma cinética de libertação mais lenta e gradual deste fármaco. Por sua vez, através do estudo da libertação do fármaco dexametasona comprovou-se que a hidrofobicidade da gentamicina exerce um papel importante na libertação deste anti-inflamatório na medida em que a torna mais rápida. Após o estudo de libertação durante os 21 dias verificou-se que ainda existia uma elevada quantidade de dexametasona presente nas fibras, concluindo-se por isso que o mecanismo de libertação da dexametasona, em tempos mais longos, poderá ser determinado também pelo processo de degradação do polímero e não apenas pelo processo de difusão do fármaco na matriz polimérica.

Face a estes resultados, conclui-se que foi possível a libertação de ambos os fármacos durante 21 dias, sendo sempre notório uma elevada libertação inicial nas primeiras horas, seguida de uma libertação mais lenta e gradual em ambos os casos. Este desempenho vai tornar estas membranas fibrosas extremamente promissoras em cirurgia ortopédica já que no tratamento da osteomielite uma elevada concentração de antibiótico é necessária após a cirurgia sendo que o segundo e último passo no tratamento desta infeção requer uma dosagem de antibiótico consistente a uma concentração mais baixa. Por sua vez, por exibir um perfil de

Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras

libertação mais lento, a dexametasona vai atuar durante mais tempo do que a gentamicina, minimizando assim uma resposta adversa do organismo à membrana fibrosa.

Finalmente, na realização do estudo *in vitro* para as membranas coaxiais não se obtiveram os resultados desejados já que, ao invés de se obter uma libertação mais lenta e gradual de ambos os fármacos, obteve-se *burst release* elevados para todas as membranas. Este resultado poderá estar associado ao facto de o GS estar à superfície das membranas e não no núcleo concluindo-se assim que a estrutura núcleo-camada externa poderá não ter sido alcançada.

Após todos estes resultados conclui-se que a técnica de *electrospinning* se mostrou uma ferramenta adequada para a obtenção de fibras poliméricas com diâmetros na ordem dos nanómetros. Para além disso verifica-se que as membranas fibrosas produzidas por *electrospinning* por *blending* possivelmente poderão ser aplicadas como sistemas de libertação controlada.

5.2. Perspetivas Futuras

De futuro ficam algumas propostas de continuidade do trabalho desenvolvido que passam por:

- Efetuar análises da capacidade de crescimento celular e atividade antimicrobiana: averiguar a atividade antibacteriana do sulfato de gentamicina imobilizado nas membranas;
- Aumentar a quantidade de GS encapsulado nas nanopartículas de sílica aumentando a concentração do fármaco na solução;
- Controlar os parâmetros do processo de *electrospinning* de forma a obter fibras com menos *beads*;
- Repetição da produção das membranas fibrosas produzidas pela técnica *electrospinning* coaxial com o objetivo de se obter membranas com a estrutura núcleo-camada externa;
- Realização de testes de biocompatibilidade *in vivo*: com o propósito de estudar possíveis efeitos adversos no organismo, tais como inflamações.

REFERÊNCIAS

Alcobia, D.S. (2013). *Produção de nanofibras alinhadas de polímeros biodegradáveis para crescimento e regeneração de células neurais*. Dissertação para a obtenção de Grau de Mestre, Universidade de São Paulo, Brasil.

Aravamudhan, A., Ramos, D.M., Nip, J., Harmon, M.D., James, R., Deng, M., Laurencin, C.T.; Yu, X.; Kumbar, G.S. (2013). Cellulose and collagen derived micro-nano structured scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **9**, 719–731.

Aurégan, J.-C. & Bégue, T. (2015). Bioactive glass for long bone infection: a systematic review. *Injury* **46**, 3–7.

Bannwarth, M. & Crespy, D. (2014). Combining the best of two worlds: Nanoparticles and nanofibers. *Chemistry - An Asian Journal* **9**, 2030–2035.

Bhardwaj, N. & Kundu, S.C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* **28**, 325–347.

Bongio, M., van den Beucken, J.J.J.P., Leeuwenburgh, S.C.G. & Jansen, J.A. (2010). Development of bone substitute materials: from “biocompatible” to “instructive”. *Journal of Materials Chemistry* **20**, 8747.

Brito, T.A.V. (2013). *Preparação e Caracterização de Nanofibras da Blenda PLLA/PCL obtidas pelos Processos de Eletrofiação e Rotofiação*. Dissertação para a obtenção de Grau de Mestre. Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Cabanillas, P.F., Peña, E.D., Barrales-Rienda, J.M. & Frutos, G. (2000). Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release. *International Journal of Pharmaceutics* **209**, 15–26.

Campoccia, D., Montanaro, L., Speziale, P. & Arciola, C.R. (2010). Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials* **31**, 6363–6377.

Cao, Z., Jiang, D., Yan, L. & Wu, J. (2015). In vitro and in vivo osteogenic activity of the novel vancomycin-loaded bone-like hydroxyapatite/poly(amino acid) scaffold. *Journal of*

Referências

Biomaterials Applications **30**, 1566–1577.

Casarin, S.A. (2010). *Blendas de PHBV e PCL para uso em dispositivos de osteossíntese*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

Coimbra, P.M.A. (2010). *Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural*. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra, Portugal.

Cook, G.E., Markel, D.C., Ren, W., Webb, L.X., McKee, M.D. & Schemitsch, E.H. (2015). Infection in Orthopaedics. *Journal of Orthopaedic Trauma* **29**, 19–23.

Costa, P.F. (2015). Bone Tissue Engineering Drug Delivery. *Current Molecular Biology Reports* 87–93.

Costa, R.G.F., Oliveira, J.E., Paula, G.F., Medeiros, E.S., Ribeiro, C., Mattoso, L.H.C., Picciani, P.H.S. (2012). Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica. *Polímeros* **22**, 170–177.

Costa-Pinto, A.R., Reis, R.L. & Neves, N.M. (2011). Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **17**, 331–347.

Dash, T.K. & Konkimalla, V.B. (2012). Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release* **158**, 15–33.

Domb, A., Kumar, N. & Ezra, A. (2011). *Biodegradable polymers in clinical use and clinical development*. Hoboken, New Jersey. John Wiley & Sons. ISBN: 9781118015810

Duarte, A.R.C., Mano, J.F. & Reis, R.L. (2009). Dexamethasone-loaded scaffolds prepared by supercritical-assisted phase inversion. *Acta Biomaterialia* **5**, 2054–2062.

Elahi, F., Lu, W., Guoping, G. & Khan, F. (2013). Core-shell Fibers for Biomedical Applications-A Review. *Bioengineering and Biomedical Sciences Journal* **3**, 1–14.

El-Kamel, A.H. & Baddour, M.M. (2007). Gatifloxacin biodegradable implant for treatment of experimental osteomyelitis: in vitro and in vivo evaluation. *Drug delivery* **14**, 349–356.

Engineer, C., Parikh, J. & Raval, A. (2011). Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System. *Trends Biomater. Artif. Organs* **25**, 79–85.

Farokhi, M., Mottaghtalab, F., Shokrgozar, M.A., Ou, K.L., Mao, C. & Hosseinkhani, H. (2016). Importance of dual delivery systems for bone tissue engineering. *Journal of*

Referências

Controlled Release **225**, 152–169.

Gaharwar, A.K., Mihaila, S.M., Kulkarni, A.A., Patel, A., Di Luca, A., Reis, R.L., Gomes, M.E., van Blitterswijk, C., Moroni, L., Khademhosseini, A. (2014). Amphiphilic beads as depots for sustained drug release integrated into fibrillar scaffolds. *Journal of Controlled Release* **187**, 66–73.

Gao, Y., Truong, Y.B., Zhu, Y. & Louis Kyratzis, I. (2014). Electrospun antibacterial nanofibers: Production, activity, and in vivo applications. *Journal of Applied Polymer Science* **131**, 9041–9053.

Garvin, K.L., Miyano, J.A., Robinson, D., Giger, D., Novak, J. & Radio, S. (1994). Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model. *The Journal of bone and joint surgery* **76**, 1500–1506.

Gogia, J.S., Meehan, J.P., Di Cesare, P.E. & Jamali, A.A. (2009). Local antibiotic therapy in osteomyelitis. *Seminars in Plastic Surgery* **23**, 100–7.

Gonçalves, R.P., da Silva, F.F.F., Picciani, P.H.S. & Dias, M.L. (2015). Morphology and Thermal Properties of Core-Shell PVA/PLA Ultrafine Fibers Produced by Coaxial Electrospinning. *Materials Sciences and Applications* **06**, 189–199.

Haider, A., Haider, S. & Kang, I.K. (2015). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry* .

Hélary, C. & Desimone, M.F. (2015). Recent Advances in Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **16**, 635–645.

Ho, Y.-C., Huang, F.-M. & Chang, Y.-C. (2005). Biodegradable Polymer–Silica Xerogel Composite Microspheres for Controlled Release of Gentamicin. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **83**, 340–344.

Hu, C. & Cui, W. (2012). Hierarchical Structure of Electrospun Composite Fibers for Long-Term Controlled Drug Release Carriers. *Advanced Healthcare Materials* **1**, 809–814.

Hu, X., Liu, S., Zhou, G., Huang, Y., Xie, Z. & Jing, X. (2014). Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release* **185**, 12–21.

Huang, F., Wei, Q., Cai, Y. & Wu, N. (2008). Surface Structures and Contact Angles of Electrospun Poly(vinylidene fluoride) Nanofiber Membranes. *International Journal of*

Referências

Polymer Analysis and Characterization **13**, 292–301.

Huang, X., Young, N.P., Townley, H.E., P, N. & E, H. (2014). Characterization and Comparison of Mesoporous Silica Particles for Optimized Drug Delivery. *Nanomaterials and Nanotechnology* **4**, 1–15.

Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Kotaki, M. & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* **63**, 2223–2253.

Ikada, Y. & Tsuji, H. (2000). Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromolecular Rapid Communications* **21**, 117–132.

Inzana, J.A., Schwarz, E.M., Kates, S.L. & Awad, H.A. (2016). Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials* **81**, 58–71.

Jahan, K. & Tabrizian, M. (2015). Composite biopolymers for bone regeneration enhancement in bony defects. *Biomater.* **4**, 25–39.

Jiang, H., Wang, L. & Zhu, K. (2014). Coaxial electrospinning for encapsulation and controlled release of fragile water-soluble bioactive agents. *Journal of Controlled Release* **193**, 296–303.

Kenawy, E.R., Bowlin, G.L., Mansfield, K., Layman, J., Simpson, D.G., Sanders, E.H., Wnek, G.E. (2002). Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *Journal of Controlled Release* **81**, 57–64.

Klemm, K. (2001). The use of antibiotic-containing bead chains in the treatment of chronic bone infections. *Clinical Microbiology and Infection* **7**, 28–31.

Kwon, S., Singh, R.K., Perez, R.A., Abou Neel, E.A., Kim, H.-W. & Chrzanowski, W. (2013). Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery. *Journal of tissue engineering* **4**

Le Ray, A.M., Gautier, H., Laty, M.K., Daculsi, G., Merle, C., Jacqueline, C., Hamel, A., Caillon, C. (2005). In vitro and in vivo bactericidal activities of vancomycin dispersed in porous biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microparticles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 3025–3027.

Li, B., Brown, K. V., Wenke, J.C. & Guelcher, S.A. (2010). Sustained release of vancomycin from polyurethane scaffolds inhibits infection of bone wounds in a rat femoral segmental defect model. *Journal of Controlled Release* **145**, 221–230.

Referências

- Li, D. & Xia, Y. (2004). Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?. *Advanced Materials* **16**, 1151–1170.
- Llorens, E., Del Valle, L.J. & Puiggali, J. (2016). Multifunctional ternary drug-loaded electrospun scaffolds. *Journal of Applied Polymer Science* **133**, 1–16.
- Loscertales, I.G. & Gañán-Calvo, A.M. (2002). Micro / Nano Encapsulation via Electrified Coaxial Liquid Jets. *Science* **295**, 1695–1698.
- Maciel, M. (2011). *A antibioterapia como factor de regeneração óssea*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre. Universidade Fernando Pessoa, Portugal.
- Mansfield, E., Tyner, K.M., Poling, C.M. & Blacklock, J.L. (2014). Determination of Nanoparticle Surface Coatings and Nanoparticle Purity Using Microscale Thermogravimetric Analysis. *Analytical Chemistry* **86**, 1478–1484.
- Marini, J., Beatrice, C., Favaro, M., Branciforti, M. & Bretas, R. (2009). Processamento no comportamento reológico de nanocompósitos de PCL / MMT. *Anais do 10o Congresso Brasileiro de Polímeros*.
- Martins, A., Araújo, J. V., Reis, R.L. & Neves, N.M. (2007). Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. *Nanomedicine* **2**, 929–942.
- Meinel, A.J., Germershaus, O., Luhmann, T., Merkle, H.P. & Meinel, L. (2012). Electrospun matrices for localized drug delivery: Current technologies and selected biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **81**, 1–13.
- Mohseni, M., Gilani, K. & Mortazavi, S.A. (2015). Preparation and characterization of rifampin loaded mesoporous silica nanoparticles as a potential system for pulmonary drug delivery. *Iranian journal of pharmaceutical research* **14**, 27–34.
- Moura, M.J. (2012). Aplicações Do Quitosano Em Libertação Controlada De Fármacos: Algumas Considerações. *Enciclopédia Biosfera* **814**, 1489–1509.
- Mudshinge, S.R., Deore, A.B., Patil, S. & Bhalgat, C.M. (2011). Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal* **19**, 129–141.
- Nandi, S.K., Mukherjee, P., Roy, S., Kundu, B., De, D.K. & Basu, D. (2009). Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis - A review. *Materials Science and Engineering C* **29**, 2478–2485.
- Oliveira, B., Vieira, D.P., Silva, J.D.K., Dohler, L., Santos, V.F., & Moraes, A.C. (2014).

Referências

Estudo Comparativo Entre a Degradação do Poli(L-Ácido Lático) (PLLA) e do Polietileno de Alta Densidade (PEAD) em Solo Compostado. *Revista de Extensão e Iniciação Científica* **1**, 1–16.

Park, K. (2014). Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *Journal of Controlled Release* **190**, 3–8.

Patel, N. & Gohil, P. (2012). A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering* **2**, 91–101.

Porter, J.R., Ruckh, T.T. & Papat, K.C. (2009). Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology Progress* **25**, 1539–1560.

Rani, K. & Paliwal, S. (2014). A Review on Targeted Drug Delivery: its Entire Focus on Advanced Therapeutics and Diagnostics. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences* **2**, 328–331.

Repanas, A., Andriopoulou, S. & Glasmacher, B. (2016). The significance of electrospinning as a method to create fibrous scaffolds for biomedical engineering and drug delivery applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **31**, 137–146.

Safari, J. & Zarnegar, Z. (2014). Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society* **18**, 85–99.

Saidykhan, L., Bakar, M.Z.B.A., Rukayadi, Y., Kura, A.U. & Latifah, S.Y. (2016). Development of nanoantibiotic delivery system using cockle shell-derived aragonite nanoparticles for treatment of osteomyelitis. *International Journal of Nanomedicine* **11**, 661–673.

Salgado, A.J., Coutinho, O.P. & Reis, R.L. (2004). Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience* **4**, 743–765.

Shadjou, N. & Hasanzadeh, M. (2015). Silica-based mesoporous nanobiomaterials as promoter of bone regeneration process. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **103**, 3703–3716.

Shaik, M.R., Korsapati, M. & Panati, D. (2012). PLGA/mesoporous silica hybrid structure for controlled drug release. *International Journal of Pharma Sciences* **2**, 112–116.

Sharma, J., Lizu, M., Stewart, M., Zygula, K., Lu, Y., Chauhan, R., Yan, X., Guo, Z., Wujcik, E.K., Wei, S. (2015). Multifunctional nanofibers towards active biomedical therapeutics.

Referências

Polymers.

- Shi, S., Jiang, W., Zhao, T., Aifantis, K.E., Wang, H., Lin, L., Fan, Y., Feng, Q., Cui, F., Li, X. (2015). The application of nanomaterials in controlled drug delivery for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **103**, 3978–3992.
- Son, Y.J., Kim, W.J. & Yoo, H.S. (2014). Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems. *Archives of Pharmacal Research* **37**, 69–78.
- Szentivanyi, A., Chakradeo, T., Zernetsch, H. & Glasmacher, B. (2011). Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**, 209–220.
- Tan, S.H., Inai, R., Kotaki, M. & Ramakrishna, S. (2005). Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer* **46**, 6128–6134.
- Tang, F., Li, L. & Chen, D. (2012). Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advanced Materials* **24**, 1504–1534.
- Tang, G., Yang, Y., Sun, A., Song, T., Zhao, Y., Yuan, X., Fan, Y., Wang, M., (2010). Controlled release of dexamethasone from porous PLGA scaffolds under cyclic loading. *Science China Chemistry* **53**, 594–598.
- Tsiolis, P., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Mavrogenis, A.F., Savvidou, O., Lалlos, S.N., Frangia, K., Lazarettos, I., Nikolaou, V., Efsthopoulos, N.E. (2011). Experimental Osteomyelitis Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Treated with a Polylactide Carrier Releasing Linezolid. *Surgical Infections* **12**, 131–135.
- Vacanti, N.M., Cheng, H., Hill, P.S., Guerreiro, J.D.T., Dang, T.T., Ma, M., Watson, S., Hwang, N.S., Langer, R. (2012). Localized delivery of dexamethasone from electrospun fibers reduces the foreign body response. *Biomacromolecules* **13**, 3031–3038.
- Vallet-Regí, M. (2009). Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine. *Journal of Internal Medicine* **267**, 22–43.
- Vallet-Regí, M., Balas, F., Colilla, M. & Manzano, M. (2008). Bone-regenerative bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability. *Progress in Solid State Chemistry* **36**, 163–191.
- Walmsley, G.G., Mcardle, A., Tevlin, R., Momeni, A., Atashroo, D., Hu, M.S., Feroze, A.H., Wong, V.W., Lorenz, P.H., Longaker, M.T., Wan, D.C. (2015). Nanotechnology in bone tissue engineering. *Nanomedicine* **11**, 1253–1263.

Referências

- Woodruff, M.A. & Hutmacher, D.W. (2010). The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* **35**, 1217–1256.
- Yoon, J.J., Kim, J.H. & Park, T.G. (2003). Dexamethasone-releasing biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas-foaming/salt-leaching method. *Biomaterials* **24**, 2323–2329.
- Yu, D.-G., Zhu, L.-M., White, K. & Branford-White, C. (2009). Electrospun nanofiber-based drug delivery systems. *Health* **1**, 67–75.
- Yuan, Y., Hu, Z., Fu, X., Jiang, L., Xiao, Y., Hu, K., Yan, P., Lei, J. (2016). Poly(lactic acid) plasticized by biodegradable glyceryl lactate. *Journal of Applied Polymer Science* **133**, 1–9.
- Zhao, W., Li, J., Jin, K., Liu, W., Qiu, X. & Li, C. (2016). Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering. *Materials Science and Engineering C*. **59**, 1181–1194.
- Zhu, Y., Cao, Y., Pan, J. & Liu, Y. (2010). Macro-alignment of electrospun fibers for vascular tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **92**, 508–516.

ANEXOS

ANEXO I- AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE CARREGAMENTO DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA

Este anexo pretende quantificar a quantidade de GS carregada das nanopartículas de sílica através da análise termogravimétrica (TGA). Da análise dos perfis termogravimétricos obteve-se a seguinte informação (Capítulo 4, Figura 4.1, Tabela 4.1):

- Curva das nanopartículas de sílica (NPSi): massa perdida ($m \text{ NPSi}_{\text{perdida}}$) = 0 %; massa permanece ($m \text{ NPSi}_{\text{permanece}}$) = 100 %;
- Curva do Sulfato de Gentamicina (GS): massa perdida ($m \text{ GS}_{\text{perdida}}$) = 72,9 %; massa permanece ($m \text{ GS}_{\text{permanece}}$) = 27,1 %;
- Curva das Nanopartículas de Sílica carregadas com gentamicina (NPSiGS) = massa perdida ($m \text{ NPSiGS}_{\text{perdida}}$) = 31,52 %; massa permanece ($m \text{ NPSiGS}_{\text{permanece}}$) = 68,48 %.

$$m \text{ NPSi}_{\text{permanece}} = 1 \times m \text{ NPSi}_{\text{inicial}}$$

$$m \text{ GS}_{\text{permanece}} = 0,271 \times m \text{ GS}_{\text{inicial}}$$

$$m \text{ NPSiGS}_{\text{inicial}} = m \text{ NPSi}_{\text{inicial}} + m \text{ GS}_{\text{inicial}}$$

Considerando que $m \text{ NPSiGS}_{\text{inicial}} = 1$ (em fração mássica) resulta:

$$m \text{ NPSi}_{\text{inicial}} = 1 - m \text{ GS}_{\text{inicial}}$$

$$m \text{ NPSiGS}_{\text{permanece}} = m \text{ NPSi}_{\text{permanece}} + m \text{ GS}_{\text{permanece}}$$

$$\Leftrightarrow m \text{ NPSiGS}_{\text{permanece}} = m \text{ NPSi}_{\text{inicial}} + m \text{ GS}_{\text{permanece}}$$

$$\Leftrightarrow 0,6848 = (1 - m \text{ GS}_{\text{inicial}}) + 0,271 \times m \text{ GS}_{\text{inicial}}$$

$$\Leftrightarrow 0,729 \times m \text{ GS}_{\text{inicial}} = 0,3152$$

$$\Leftrightarrow m \text{ GS}_{\text{inicial}} = 0,432$$

Logo, ~ 43 % de sulfato de gentamicina está incorporado nas nanopartículas de sílica.

ANEXO II - PROTOCOLO CURVA DE CALIBRAÇÃO DE DEXAMETASONA E DO SULFATO DE GENTAMICINA

No presente anexo são apresentadas as curvas de calibração utilizadas para quantificar - por fotoespectrometria UV/VIS - a quantidade de GS e DEX libertada ao longo do tempo.

Resultados obtidos para o sulfato de Gentamicina

Para a elaboração da curva de calibração da GS preparou-se uma solução mãe, dissolvendo 10 mg de GS em 100 mL de PBS ($C = 100 \mu\text{g/mL}$). A partir de alíquotas da solução mãe preparam-se cinco soluções padrão com concentrações na gama 10 -100 $\mu\text{g/mL}$. Seguindo o mesmo procedimento experimental executado para as amostras (secção 3.3.6), realizou-se a reação de derivatização da GS com alíquotas das soluções padrão, medindo-se de seguida a absorvância do produto da reação a 332 nm, utilizando cuvetes de poliestireno descartáveis.

Seguidamente apresentam-se as concentrações das soluções de sulfato de gentamicina, em formato tabela, com as respetivas absorvâncias obtidas e a respetiva curva de calibração.

Tabela AII.1. Concentração das soluções padrão de sulfato de gentamicina, e os respetivos valores de absorvância (a 332 nm) após a reação com o reagente OPA, conforme o protocolo descrito na secção 3.3.6.

Nomenclatura	C ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância (nm)
C5	102	0,9593
C4	76,5	0,8195
C3	51	0,4992
C2	26,5	0,2574
C1	10,2	0,0988

Anexo II

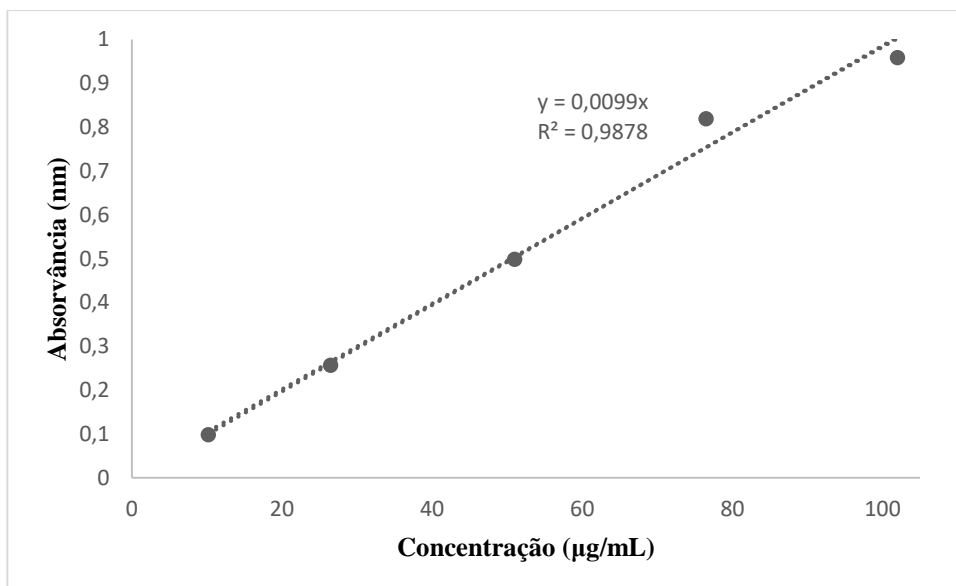


Figura AII.1- Curva de calibração do Sulfato de Gentamicina.

Resultados obtidos para a dexametasona

Para a elaboração da curva de calibração da DEX preparou-se uma solução mãe, dissolvendo 13,3 mg de DEX em 50 mL de PBS ($C = 266 \mu\text{g/mL}$). A partir de alíquotas da solução mãe preparam-se cinco soluções padrão com concentrações na gama 2,5 -27 $\mu\text{g/mL}$. As absorvâncias das cinco soluções foram medidas a 242 nm, utilizando cuvetes de quartzo.

Tabela AII.2-Concentração das soluções padrão dexametasona e respetiva absorvância a 242 nm.

Nomenclatura	C (µg /mL)	Absorvância (nm)
C5	26,6	0,9149
C4	19,5	0,7329
C3	13,3	0,5989
C2	6,65	0,3902
C1	2,66	0,2328

Anexo II

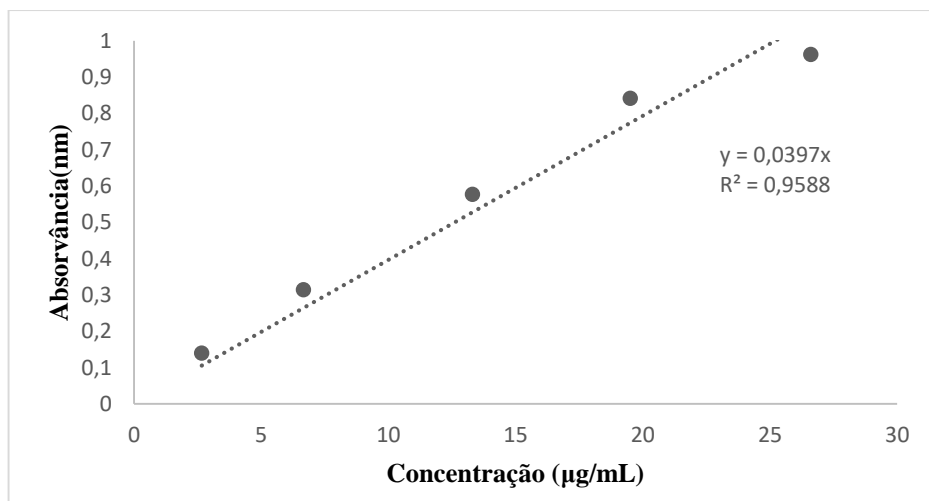


Figura AII.2- Curva de calibração da dexametasona.