



Pontifícia Universidade Católica de São Paulo
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde

Dario Mendes Júnior

Modelo Experimental de Tratamento de Osteomielite Aguda com Polímero Reabsorvível
Contendo Vancomicina e Sinvastatina Implantadas em Tíbias de Ratos *Wistar*

Mestrado em Biomateriais e Medicina Regenerativa

Sorocaba/SP

2024

Dario Mendes Júnior

**Modelo Experimental de Tratamento de Osteomielite Aguda com Polímero Reabsorvível
Contendo Vancomicina e Sinvastatina Implantadas em Tíbias de Ratos *Wistar***

Dissertação apresentada à banca examinadora da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, como exigência parcial para obtenção do título de MESTRE em **Biomateriais e Medicina Regenerativa**, sob a orientação da Profa. Dra. **Eliana Aparecida de Rezende Duek** e coorientação do Profa. Dra. **Moema de Alencar Hausen**.

Sorocaba/SP

2024

Sistemas de Bibliotecas da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo -
Ficha Catalográfica com dados fornecidos pelo autor

Júnior, Dario Mendes
Modelo Experimental de Tratamento de Osteomielite Aguda com
Polímero Reabsorvível Contendo Vancomicina e Sinvastatina
Implantadas em Tíbias de Ratos Wistar . / Dario Mendes
Júnior. -- Sorocaba, SP: [s.n.], 2024.
70p. ; cm.

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek.
Dissertação (Mestrado)-- Pontifícia Universidade Católica de
São Paulo, Programa de Estudos Pós-Graduados em Biomateriais
e Medicina Regenerativa.

1. Osteomielite. 2. PLDLA-co-TMC. 3. Eletrofiação. 4.
Regeneração Óssea?. I. Duek, Eliana Aparecida de Rezende. II.
Pontifícia Universidade Católica de Sorocaba, SP, Programa de
Estudos Pós-Graduados em Biomateriais e Medicina
Regenerativa. III. Título.

CDD

Banca Examinadora

Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek

Profa. Dra. Angela Faustino Jozala

Profa. Dra. Jose Mauro da Silva Rodrigues

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) 001 - 88887.701190/2022-00.

“This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) 001 - 88887.701190/2022-00.”

Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer, principalmente, a Deus, por permitir a realização de mais um sonho na minha vida.

Gostaria de agradecer, também, minha avó Guiomar, meu pai Dario, minha mãe Cibele, meus irmãos Victor e Natacha e a todos os meus amigos que me apoiaram nesses trabalhosos dois anos de mestrado, sempre me incentivando a seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis.

Gostaria de agradecer, em especial, minha orientadora Profa. Dra. Eliana e minha co-orientadora Profa. Dra. Moema que tiveram a paciência e dedicação em me orientar e me guiar nesses dois anos de mestrado.

Gostaria de agradecer a toda a equipe do laboratório de biomateriais da PUC-SP, a equipe do laboratório de microbiologia da PUC-SP, ao biotério da PUC-SP, a equipe do laboratório de patologia da PUC-SP, a empresa DBM Nano, responsável por realizar a eletrofiação do polímero estudado neste trabalho, pela essencial ajuda e contribuição dada ao projeto.

Agradeço também ao falecido Dr. André Nachiluk, por idealizar este projeto de mestrado.

Agradeço a todos os animais sacrificados para a realização deste trabalho, por suas inestimáveis contribuições à ciência.

Por fim, e não menos importante, gostaria de agradecer a CAPES, por ter concedido uma bolsa de estudo para a realização do Programa de Mestrado em Biomateriais e Medicina Regenerativa da PUC-SP e a FUNDASP por ter concedido desconto na mensalidade do Programa de Mestrado em Biomateriais e Medicina Regenerativa da PUC-SP.

RESUMO

MENDES JÚNIOR, DARIO. **Modelo Experimental de Tratamento de Osteomielite Aguda com Polímero Reabsorvível Contendo Vancomicina e Sinvastatina Implantadas em Tíbias de Ratos *Wistar***

A osteomielite, uma infecção que leva à inflamação, necrose e neoformação óssea, representa um desafio de saúde pública no Brasil com 183.975 internações registradas entre 2009 e 2019. As opções terapêuticas para seu tratamento incluem antibioticoterapia e procedimentos cirúrgicos com implante de materiais não absorvíveis como o polimetilmetacrilato (PMMA). Entretanto, pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novos biomateriais associados à engenharia tecidual se tornaram promissoras para o tratamento da osteomielite. Neste projeto, foi desenvolvida e avaliada uma membrana de Poli(L-co-D,L ácido lático-co-trimetileno carbonato) (PLDLA-co-TMC) com vancomicina (VAN) e sinvastatina (SIN) para tratar osteomielite em tíbias de ratos *Wistar*, visando combater a infecção e promover a regeneração óssea. Para isto, o polímero PLDLA-co-TMC foi sintetizado e eletrofiado com fármacos VAN e SIN e caracterizado por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para o ensaio *in vivo*, as membranas de PLDLA-co-TMC contendo VAN e SIN foram implantadas nas tíbias dos ratos *Wistar* após a indução de osteomielite. Após sete dias da indução, os ratos passaram por nova cirurgia para implante do biomaterial e, após quinze dias, foram sacrificados e as tíbias foram coletadas para as posteriores análises. Os ratos *Wistar* foram divididos em 5 grupos: controle negativo (lesão com osteomielite), controle positivo (lesão com osteomielite e membrana de PLDLA-co-TMC), PLDLA-co-TMC com VAN, com SIN e com ambos os fármacos. Além disso, foi realizado o ensaio microbiológico, ensaio de liberação de fármaco, dosagem de interleucina-6 (IL-6) e avaliação dos aspectos macro e microscópicos da lesão. Como resultados, a síntese das membranas de PLDLA-co-TMC com os fármacos ocorreu conforme protocolo estabelecido neste projeto. No estudo de caracterização, a análise de FTIR, TG e DSC evidenciaram a presença dos fármacos na membrana eletrofiada de PLDLA-co-TMC, no ensaio microbiológico, as membranas sem fármaco e apenas com SIN não tiveram atividade antibiótica, enquanto aquelas com VAN ou ambos os fármacos apresentaram inibição do crescimento bacteriano. No ensaio de liberação de fármacos, houve liberação rápida por cinco dias, seguida por liberação sustentada por trinta dias de ambos os fármacos. Avaliações *in vivo*, incluindo dosagem de IL-6 e análises macro e microscópicas da lesão, mostraram que os grupos controles apresentaram maior produção de IL-6 em comparação com os outros grupos, além do que, foi identificado infecção com extravasamento para os tecidos adjacentes ao osso nos grupos controles, ao contrário do que se observou nos outros grupos que tentaram isolar o processo infeccioso, formando abscessos. Esses resultados confirmam a viabilidade e eficácia do biomaterial no tratamento da osteomielite.

Palavras-Chaves: Osteomielite, PLDLA-co-TMC, Vancomicina, Sinvastatina, Regeneração Óssea

ABSTRACT

MENDES JÚNIOR, Dario. **Experimental Model for Acute Osteomyelitis Treatment with Resorbable Polymer Containing Vancomycin and Simvastatin Implanted in Wistar Rat Tibias**

Osteomyelitis, an infection leading to inflammation, necrosis, and new bone formation, represents a public health challenge in Brazil with 183,975 hospitalizations recorded between 2009 and 2019. Therapeutic options for its treatment include antibiotic therapy and surgical procedures with the implantation of non-absorbable materials such as polymethylmethacrylate (PMMA). However, research focused on the development of new biomaterials associated with tissue engineering has become promising for the treatment of osteomyelitis. In this project, a membrane of Poly(L-co-D,L lactic acid-co-trimethylene carbonate) (PLDLA-co-TMC) with vancomycin (VAN) and simvastatin (SIN) was developed and evaluated to treat osteomyelitis in Wistar rat tibias, aiming to combat infection and promote bone regeneration. For this, the PLDLA-co-TMC polymer was synthesized and electrospun with the drugs VAN and SIN and characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermogravimetry (TG), Differential Scanning Calorimetry (DSC), and Scanning Electron Microscopy (SEM). For the *in vivo* assay, PLDLA-co-TMC membranes containing VAN and SIN were implanted in the tibias of Wistar rats after the induction of osteomyelitis. Seven days after induction, the rats underwent another surgery for biomaterial implantation, and after fifteen days, they were sacrificed, and their tibias were collected for subsequent analyses. The Wistar rats were divided into 5 groups: negative control (lesion with osteomyelitis), positive control (lesion with osteomyelitis and PLDLA-co-TMC membrane), PLDLA-co-TMC with VAN, with SIN, and with both drugs. Additionally, microbiological assay, drug release assay, interleukin-6 (IL-6) dosage, and evaluation of the macroscopic and microscopic aspects of the lesion were performed. The synthesis of PLDLA-co-TMC membranes with the drugs followed the protocol established in this project. In the characterization study, FTIR, TG, and DSC analysis evidenced the presence of the drugs in the electrospun PLDLA-co-TMC membrane. In the microbiological assay, membranes without drugs and those with only SIN showed no antibiotic activity, whereas those with VAN or both drugs inhibited bacterial growth. In the drug release assay, rapid release was observed for five days, followed by sustained release for thirty days of both drugs. *In vivo* evaluations, including IL-6 dosage and macroscopic and microscopic analyses of the lesion, showed that the control groups had higher IL-6 production compared to the other groups. Moreover, infection with extravasation into tissues adjacent to the bone was identified in the control groups, in contrast to the other groups that tried to isolate the infectious process by forming abscesses. These results confirm the viability and efficacy of biomaterials in the treatment of osteomyelitis.

Keywords: Osteomyelitis, PLDLA-co-TMC, Vancomycin, Simvastatin, Bone Regeneration

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem do processo de polimerização e PLDLA-co-TMC obtido através da síntese (ampliação).....27
- Figura 2.** Imagem ilustrativa do processo de eletrofição (A) e imagem da membrana de PLDLA-co-TMC eletrofiada na dimensão 15x15 cm (B).....29
- Figura 3.** Imagens do rato anestesiado e tricotomizado (A), da incisão expondo metáfise proximal da tíbia (B), da cavidade óssea (C) e da inoculação das bactérias (D).....34
- Figura 4.** Imagens do rato anestesiado e tricotomizado (A), da incisão expondo cavidade óssea (B) e do implante da membrana eletrofiada (C).....35
- Figura 5.** Espectro de FTIR de vancomicina (VAN), sinvastatina (SIN), PLDLA-co-TMC eletrofiado e das amostras eletrofiadas compostas por PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN.....38
- Figura 6.** Imagens de MEV de PLDLA-co-TMC eletrofiado (A) e das amostras eletrofiadas de PLDLA-co-TMC/VAN (B), PLDLA-co-TMC/SIN (C) e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN (D).....40
- Figura 7.** Curvas de TG (A) e DTG (B) de vancomicina (VAN), sinvastatina (SIN), PLDLA-co-TMC eletrofiado e das amostras eletrofiadas compostas por PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN.....42
- Figura 8.** Curvas de DSC dos fármacos sinvastatina (A), vancomicina (B) e das membranas eletrofiadas por PLDLA-co-TMC (C), PLDLA-co-TMC/SIN (D), PLDLA-co-TMC/VAN (E) e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN (F).....45
- Figura 9.** O estudo microbiológico foi realizado em dois períodos de incubação: 24 horas (Figuras 9A e 9B) e 48 horas (Figuras 9C e 9D). Nas Figuras 10A e 10C, são apresentados os seguintes grupos: disco estéril sem fármaco (1), membrana de PLDLA-co-TMC sem fármaco (2), disco estéril incorporado com sinvastatina (3) e disco controle com gentamicina (GEN). Já nas Figuras 10B e 10D, são mostrados: membrana de PLDLA-co-TMC com vancomicina (4), membrana de PLDLA-co-TMC com vancomicina e sinvastatina (5), membrana de PLDLA-co-TMC com sinvastatina (6) e disco controle com vancomicina (VAN).....47
- Figura 10.** Imagem A representa o gráfico obtido do ensaio com cristal violeta, mostrando os quatro grupos: membrana de PLDLA-co-TMC, membrana de PLDLA-co-TMC/VAN, membrana de PLDLA-co-TMC/SIN e membrana de PLDLA-co-TMC/VAN/SIN e a produção de biofilme bacteriano em %, sendo que * representa $p < 0,05$. Imagem B representa os doze poços, divididos entre os quatro grupos, contendo o cristal violeta em triplicata.....49

Figura 11. Curva de calibração da vancomicina: absorvâncias X concentrações (112,5; 75; 56; 37; 19 e 4,75 µg/ml).....	50
Figura 12. Curva de calibração da sinvastatina: absorvâncias X concentrações (30; 25; 20; 15; 10 e 5 µg/mL).....	51
Figura 13. Gráfico obtido do ensaio de liberação controlada de fármaco das membranas PLDLA-co-TMC com vancomicina (azul), membrana de PLDLA-co-TMC com sinvastatina (laranja) e membrana de PLDLA-co-TMC com vancomicina e sinvastatina (verde) em relação ao tempo.....	51
Figura 14. Gráficos obtidos com a aplicação dos modelos matemáticos de cinética de liberação da membrana de PLDLA-co-TMC com vancomicina.....	53
Figura 15. Gráficos obtidos com a aplicação dos modelos matemáticos de cinética de liberação da membrana de PLDLA-co-TMC com sinvastatina.....	54
Figura 16. Gráfico obtido da análise da dosagem de IL-6 com 7 e 21 dias dos grupos controle (somente infecção), PLDLA-co-TMC, PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN, sendo que * representa $p < 0,05$	57
Figura 17. Análise histológica de metáfise proximal de tíbia não infectada nos aumentos de 2x, 10x, 20x e 40x. Sendo que (*) representa osso cortical, (→) osso medular, (M) medula óssea, (D) disco epifisário e (E) epífise proximal tibial.....	59
Figura 18. Imagens de macroscopia e microscopia das amostras das metáfises proximal de tíbia dos ratos que melhor representa cada grupo analisado. Sendo que (*) representa osso cortical, (→) osso medular, (G) tecido de granulação, (F) cápsula fibrosa de abscesso, (A) abscesso e (>) tecido adiposo.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais agentes encontrados nas osteomielites e seus principais antibióticos de primeira e de segunda linhas usados no tratamento.....	22
Tabela 2. Distribuição dos ratos <i>Wistar</i> nos 5 grupos do estudo <i>in vivo</i>	33
Tabela 3. Propriedades térmicas determinadas por TG e DTG de PLDLA-co-TMC eletrofiado e das amostras eletrofiadas compostas por PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN.....	44
Tabela 4. Valores dos coeficientes de correlação (R^2) para os modelos matemáticos de cinética de liberação da membrana de PLDLA-co-TMC com vancomicina e sinvastatina.....	55

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BMP-2 - Proteína morfogenética óssea-2

DMSO - Dimetilsulfóxido

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

EDTA - Etileno-diamino-tetracético

FTIR - Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier

GTPases - Enzimas que hidrolisam Trifosfato de Guanosina

HE - Hematoxilina-eosina

HMG-CoA - Enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A

IL-1 β - Interleucina-1 β

IL-6 - Interleucina-6

PBS - Solução tampão fosfato-salino

PCL - Policaprolactona

PCR - Proteína C reativa

PLA - Ácido polilático

PLDLA-co-TMC - Poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato)

PLDLA - Poli(L-co-D,L-ácido láctico)

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

PMMA - Polimetilmetacrilato

R - Coeficiente de linearidade

R² - Coeficiente de determinação

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

S. coagulase-negativo - *Staphylococcus coagulase-negativo*

SIN - Sinvastatina

T_{onset} - Temperatura de início de perda de massa

T_{endset} - Temperatura final de perda de massa

T_{max} - Temperatura onde a perda de massa foi máxima

TG - Termogravimetria

Tg - Temperatura de transição vítrea

TMC - 1,3 trimetileno carbonato

TSA - Meio de ágar de soja e tripsina

TSB - Caldo de soja tratada com tripsina

UFC - Unidades formadoras de colônia

VAN - Vancomicina

VHS - Velocidade de hemossedimentação

VISA - *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina

VRSA - *S. aureus* com resistência à vancomicina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Panorama da osteomielite	17
1.2. Diagnóstico da osteomielite	17
1.3. Tratamento da osteomielite	19
1.4. Polímero PLDLA-co-TMC	20
1.5. Eletrofição do polímero PLDLA-co-TMC	21
1.6. Vancomicina.....	21
1.7. Sinvastatina	23
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVO	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	25
4.1. Materiais	26
4.2. Métodos	26
4.2.1. Síntese do polímero PLDLA-co-TMC	26
4.2.2. Incorporação da Vancomicina e da Sinvastatina em PLDLA-co-TMC	27
4.2.3. Obtenção das membranas de PLDLA-co-TMC eletrofiadas contendo os fármacos	28
4.3. Caracterização	29
4.3.1. Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	29
4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	29
4.3.3. Termogravimetria (TG)	29
4.3.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	30

4.3.5. Estudo microbiológico das membranas de PLDLA-co-TMC eletrofiada com Vancomicina e Sinvastatina	30
4.3.6. Análise do perfil de liberação controlada de fármacos das membranas de PLDLA-co-TMC.....	30
4.3.7. Estudo <i>in vivo</i>	32
4.3.7.1. Caracterização da amostra	32
4.3.7.2. Distribuição da amostra em grupos	32
4.3.7.3. Indução de osteomielite em tíbias de ratos <i>Wistar</i>	33
4.3.7.4. Procedimento cirúrgico nos animais.....	35
4.3.7.5. Eutanásia dos animais.....	36
4.3.7.6. Processamento do material	36
4.3.7.7. Preparação das lâminas histológicas e coloração	36
4.3.7.8. Dosagem de IL-6 nos ratos e análise estatística.....	37
4.3.7.9. Avaliação do aspecto macroscópico do material	37
4.3.7.10. Avaliação do aspecto microscópico do material	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	38
5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	39
5.3. Termogravimetria (TG)	41
5.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	44
5.5. Estudo microbiológico das membranas de PLDLA-co-TMC eletrofiado com Vancomicina e Sinvastatina.....	46
5.6. Análise do perfil de liberação controlada de fármacos das membranas de PLDLA-co-TMC	50
5.7. Estudo <i>in vivo</i>	56
5.7.1. Dosagem de IL-6 nos ratos e análise estatística	56

5.7.2. Avaliação dos aspectos macroscópicos e microscópicos do material	59
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. Panorama da osteomielite

A osteomielite é uma infecção óssea que leva à inflamação, necrose e neoformação de tecido ósseo, podendo apresentar produção de pus, além do comprometimento de partes moles que rodeiam o osso acometido (BURY; ROGERS; DICKMAN, 2021). Se não tratada ou tratada incorretamente pode resultar em infarto ósseo, perda funcional articular ou de membro, podendo chegar à septicemia potencialmente fatal (LLEWELLYN *et al.*, 2019).

De acordo com o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), no Brasil, entre 2009-2019, foram registradas 183.975 internações por osteomielite, o que faz considerar essa patologia um problema de saúde pública. A região Sudeste apresentou a maior prevalência do número de internações (38,88 %), seguida pelas regiões Nordeste (30,64 %), Sul (15,01 %), Centro-Oeste (8,42 %) e Norte (7,03 %) (SANTOS *et al.*, 2021). Analisando-se a faixa etária, observou-se que as idades mais atingidas pela doença foram entre 30 e 39 anos (16,25 % dos casos). Além do exposto, notou-se que em todas as regiões analisadas o gênero masculino foi mais acometido (70,87 % dos casos) que o gênero feminino (29,12 % dos casos) (SANTOS *et al.*, 2021).

Ao analisar a mortalidade decorrente por osteomielite, foi calculada uma taxa de mortalidade de 1,26 óbitos para cada 100 pacientes hospitalizados. A análise regional revelou que a região Sudeste atingiu uma taxa de mortalidade de 1,6 óbitos para cada 100 pacientes internados, seguida das regiões Nordeste (1,16), Sul (0,99), Centro-Oeste (0,81) e Norte (0,37) (SANTOS *et al.*, 2021).

1.2. Diagnóstico da osteomielite

O diagnóstico da osteomielite deve ser feito através de uma detalhada avaliação clínica e uso de exames complementares, quando necessários, para exclusão dos diagnósticos diferenciais, pois o quadro dessa patologia é inespecífico e pode-se confundir com o de outras patologias, como, por exemplo, tumores ósseos (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Nos pacientes portadores de osteomielite, o diagnóstico deve começar com uma anamnese detalhada do histórico clínico. Nesta etapa, para entender melhor o quadro clínico, é sugerido perguntar sobre infecções prévias, história de fraturas expostas que apresentavam um grande grau de exposição de estruturas nobres (músculos, tendões, ossos, entre outras) ou trauma

com evolução complicada (HEITZMANN *et al.*, 2019). O quadro clínico da osteomielite apresenta-se com sinais e sintomas sistêmicos, como, por exemplo, febre baixa não interferindo no estado geral do enfermo, além de sinais e sintomas inespecíficos locais, como eritema, edema e dor. Dito isso, para auxiliar no diagnóstico, necessita-se de uma busca por meio de exames laboratoriais nos quais o hemograma poderá indicar uma anemia e uma leucocitose, presença de marcadores inflamatórios, tal como proteína C reativa (PCR) e velocidade de hemossedimentação (VHS) elevados (QUEIROZ *et al.*, 2017).

Dos exames laboratoriais existentes para rastreamento infeccioso, a dosagem de interleucina-6 (IL-6) constitui-se como um exame complementar importante para monitorar os níveis deste marcador inflamatório, sendo que, normalmente, é expresso em níveis baixos, exceto durante trauma, infecção ou outros fatores estressantes (ERSHLER, 1993). Exposto isso, a IL-6, de acordo com a literatura, é produzida no tecido ósseo, principalmente, por osteoblastos, em resposta a uma grande variedade de sinais, entre eles, a infecção por *Staphylococcus aureus*, entretanto, é reconhecido, na literatura, que a IL-6 não é exclusiva da osteomielite e pode estar aumentada em diversas condições inflamatórias, incluindo infecções em geral (BRINKMANN *et al.*, 2022).

Em relação aos exames de imagem, pode-se afirmar que eles apresentam, como objetivo inicial, descartar os diagnósticos diferenciais do quadro clínico, pois a radiografia, exame de imagem mais utilizado por ter muita disponibilidade e baixo custo, pode apresentar-se normal na fase aguda da doença, no entanto, à medida que a infecção progride, são identificadas alterações ósseas características (BURY; ROGERS; DICKMAN, 2021). Na fase aguda, são observados sinais como radiolucência, destruição da cortical óssea e a reação periosteal. Como é necessária uma redução entre 30-50 % na densidade óssea antes que a alteração radiográfica apareça, o diagnóstico precoce acaba sendo dificultado. Então, quando disponível, a obtenção de uma imagem de qualidade superior, como pela tomografia computadorizada, fornece uma caracterização ideal da destruição óssea e da reação periosteal e oferece informações sobre alterações nos tecidos moles (SAMBRI *et al.*, 2021).

1.3. Tratamento da osteomielite

Historicamente, a osteomielite foi descrita primeiramente por Hipócrates, no século V a.C., o qual recomendou, como forma de prevenção e tratamento da patologia, o desbridamento e o isolamento, através de materiais estéreis, das fraturas expostas (SANDERS; MAUFFREY, 2013).

Há muitas opções terapêuticas para o tratamento da osteomielite, variando desde antibioticoterapia, passando por procedimentos cirúrgicos que tentem preservar o máximo da estrutura do osso acometido e implantando biomateriais, como o polimetilmetacrilato (PMMA), conhecido como cimento ósseo, para auxiliar no tratamento da doença e até amputação do membro afetado, sendo cada tipo de terapêutica adaptada aos fatores clínicos, como o estágio e extensão da infecção (BURY; ROGERS; DICKMAN, 2021).

Diversos estudos apontam que nenhum dos tratamentos existentes é consensualmente completo, levando-se em consideração a avaliação das vantagens e das desvantagens de cada terapia, podendo até combinar-se mais de um procedimento terapêutico na mesma situação em uma tentativa de obtenção de um resultado mais eficaz e completo possível (CONTERNO; TURCHI, 2013; TARDÁGUILA-GARCIA *et al.*, 2021).

O estado da arte no tratamento para osteomielite envolve, além da antibioticoterapia, procedimento cirúrgico de limpeza e desbridamento de tecidos desvitalizados, seguida de implantação temporária do biomaterial PMMA, comumente conhecido como cimento ósseo, não absorvível, embebido em vancomicina (VAN) (AMERSTORFER *et al.*, 2017). Dito isso, ressalta-se que há necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para remoção do PMMA após o tempo necessário do tratamento, o que representa um novo risco de reinfecção do paciente (AMERSTORFER *et al.*, 2017).

Diante do exposto, a tecnologia de engenharia tecidual e biomateriais podem aprimorar as atuais terapias de controle de infecção e regeneração óssea. Nesse contexto, a pesquisa em engenharia tecidual e biomateriais têm demonstrado avanços perceptíveis, especialmente no estudo de materiais implantáveis, bioabsorvíveis e que servem de carreador de fármacos. Esses biomateriais têm como objetivo oferecer suporte no tratamento da osteomielite, buscando novas soluções para o enfrentamento dessa condição médica e da regeneração do tecido ósseo (TAO *et al.*, 2021; SMITH; ROBERTS; AL-KASSAS, 2022; ZHONG *et al.*, 2023).

1.4. Polímero PLDLA-co-TMC

Dentre os biomateriais estudados, o uso dos polímeros se destaca, principalmente, por serem utilizados como dispositivos para tratamento de lesões teciduais e estímulo da regeneração tecidual (SMITH; ROBERTS; AL-KASSAS, 2022). Esses materiais poliméricos podem ser permanentes ou temporários. Os permanentes são utilizados para substituir um tecido ou órgão por tempo indeterminado, já os temporários são utilizados para dar suporte terapêutico temporário no tecido lesionado e para direcionar o processo de regeneração local (JUNIOR; WADA, 2007).

Os polímeros temporários, destacam-se os biorreabsorvíveis. Estes têm a propriedade de se degradar, ao mesmo tempo em que o tecido neoformado é produzido, liberando substâncias atóxicas para o organismo. Além dessa característica, eles podem atuar como carreadores de fármacos e células viáveis para fios de suturas cirúrgicas, *stents* e implantes ósseos (GEEVARGHESE *et al.*, 2022).

Entre os polímeros temporários e biorreabsorvíveis, destaca-se o poli(L-co-D,L-ácido láctico) (PLDLA). Este polímero é biocompatível, atóxico para o organismo, versátil e resistente mecanicamente, além de se mostrar um sistema eficaz para a liberação de fármacos. Ele apresenta a vantagem de ser gradualmente reabsorvido pelo organismo, proporcionando suporte transitório na aplicação clínica (CIAMBELLI *et al.*, 2013). Para obter-se um aumento da elasticidade do PLDLA, pode-se empregar um polímero que apresenta em sua estrutura química segmentos de 1,3 trimetileno carbonato (TMC), um policarbonato alifático elastomérico e de comprovada biocompatibilidade (PÊGO *et al.*, 2003). A associação do PLDLA com o TMC visa melhorar especialmente a elasticidade do material, contribuindo para uma resposta mais eficaz às demandas de aplicação e oferecendo potencial para avanços significativos em procedimentos clínicos (DUEK *et al.*, 2018).

Diante do exposto, pode-se inferir que muitos biomateriais poliméricos são utilizados como implantes ósseos e possuem um grande potencial de aplicação nessa área, devido à suas propriedades de serem biocompatíveis, sofrendo hidrólise e seus produtos atóxicos serem metabolizados e eliminados do organismo, e, também, de servirem de carreadores para substâncias, fármacos e células viáveis. Um exemplo disto é o polímero PLDLA-co-TMC que associa as propriedades mecânicas do PLDLA com a grande flexibilidade conferida pelo TMC (CABRERA; DUEK, 2014).

1.5. Eletrofiação do polímero PLDLA-co-TMC

Nos últimos anos, a produção de materiais à base de PLDLA-co-TMC tem se beneficiado do uso da eletrofiação, que se destacou como uma estratégia promissora para a criação de biomateriais com aplicações médicas (CHEN *et al.*, 2020). Nesse contexto, a técnica de eletrofiação tem sido amplamente aplicada no desenvolvimento de membranas para cicatrização de feridas, além de arcabouços e membranas com propriedades de liberação controlada de substâncias ativas e células. Esses materiais são utilizados para auxiliar no tratamento de infecções, estimular a regeneração tecidual e na criação de biossensores vestíveis (LIU; RAMAKRISHNA; LIU, 2020).

Na técnica de eletrofiação, o processo se inicia em uma seringa com agulha que lança um jato fino de solução contendo polímero que se estica e acelera, enquanto passa por uma fonte de alta tensão, até um coletor metálico, resultando em fibras extremamente finas que podem ser confeccionadas em formato de membranas (KAI; LIOW; LOH, 2014).

A literatura descreve mais de 100 tipos de polímeros naturais e sintéticos eletrofiáveis, resultando em membranas porosas. Analisando-se isso, é perceptível a relevância de polímeros biocompatíveis e biorreabsorvíveis, como policaprolactona (PCL) e PLDLA, no desenvolvimento de membranas eletrofiadas para auxílio no tratamento de doenças, como infecções, e regeneração tecidual (KESHVARDOOSTCHOKAMI *et al.*, 2021), pois esse material apresenta vários benefícios em relação à aplicação, incluindo flexibilidade adequada, permitindo ser moldada conforme relevo tecidual, elevada razão área superficial/volume e porosidade ajustável, permitindo carrear grandes quantidades de fármacos e células e capacidade de mimetizar a matriz extracelular do tecido biológico local (PARHAM *et al.*, 2020).

Além do que foi mostrado, a técnica de eletrofiação possibilita a obtenção de materiais, como, por exemplo, membranas com função de carregamento de substâncias bioativa e agentes antimicrobianos em suas fibras, melhorando a eficácia em aplicações médicas, como curativos e implantes teciduais, porque a infecção de feridas e a contaminação microbiana de implantes são grandes desafios e a inclusão de agentes antimicrobianos nesses materiais pode ser crucial para enfrentar esses problemas (ELSADEK *et al.*, 2022).

1.6. Vancomicina

De acordo com a literatura, os microrganismos mais comumente identificados em osteomielites são bactérias, como: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus coagulase-*

negativo e bacilos aeróbios gram-negativos (WU *et al.*, 2022). Considerando-se as vias etiológicas da doença, nas osteomielites por disseminação hematogênica, constata-se, frequentemente, um único agente causador da infecção, *S. aureus*, e, nas osteomielites por contiguidade, constata-se, frequentemente, uma infecção polimicrobiana (SCHMITT, 2017). Já, levando-se em consideração a cronologia da doença, nas infecções agudas, regularmente, encontra-se *S. aureus* e, nas infecções crônicas, pode-se encontrar também os microrganismos: *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Escherichia coli* (PAULA, 2013; PANTELI; GIANNOUDES, 2016).

Em vista disso, os principais agentes bacterianos responsáveis por causar osteomielite e os respectivos antibióticos escolhidos para o tratamento são mostrados na Tabela 1 (LIMA; ZUMIOTTI, 1999; HEITZMANN *et al.*, 2019).

Tabela 1. Principais agentes encontrados nas osteomielites e seus principais antibióticos de primeira e de segunda linhas usados no tratamento.

AGENTE	ANTIBIÓTICO DE PRIMEIRA LINHA	ANTIBIÓTICO DE SEGUNDA LINHA
<i>S. aureus</i> ou <i>S. coagulase</i> negativos sensíveis à meticilina	Cefazolina ou Oxacilina	Ampicilina, Clindamicina ou Vancomicina
<i>S. aureus</i> ou <i>S. coagulase</i> negativos resistentes a meticilina	Vancomicina ou Teicoplanina	Sulfametoxazol/Trimetoprima, Clindamicina, Daptomicina, Tigeciclina ou Fluoroquinolona
<i>Pseudomonas spp.</i>	Cefepime, Meropenem ou Imipenem	Fluoroquinolona
Polimicrobiana aeróbia e anaeróbia	Amoxicilina com Clavulanato	Ertapenem

O tempo médio de duração do tratamento dessa patologia com o uso de antibióticos, geralmente, é de 4 a 6 semanas, podendo-se ainda prolongar a antibioticoterapia por via intravenosa, via intramuscular ou via oral por até 6 meses ou mais em pacientes com osteomielite crônica (PAULA, 2013).

Dentre os antimicrobianos mais utilizados no tratamento de osteomielite, destacam-se a vancomicina (VAN) e gentamicina por serem eficazes no tratamento clínico da osteomielite e por

resistirem às altas temperaturas do PMMA no tratamento cirúrgico da osteomielite, porém considerando que a gentamicina apresenta efeito ototóxico e nefrotóxico (GOODMAN, 2022), optou-se por usar vancomicina, um glicopeptídeo tricíclico, fabricado pela bactéria gram-positiva chamada *Amycolatopsis orientalis*, com peso molecular de 1485,7 D, muito solúvel em água, pouco solúvel em álcool e praticamente insolúvel em éter e clorofórmio (MARTINDALE, 1999). O mecanismo de ação da VAN consiste em ligar-se com alta afinidade nas terminações D-alanyl-D-alanine, precursora da parede celular bacteriana, inibindo a síntese dessa estrutura celular presente nas bactérias gram-positivas, como, por exemplo, a *S. aureus*, interrompendo assim o processo de divisão e proliferação bacteriana (BRUNTON, 2012; PATEL; PREUSS; BERNICE, 2023).

Além do citado anteriormente, dentre os antibióticos que podem ser combinadas aos biomateriais estão os antibióticos do grupo aminoglicosídeos e a vancomicina, sendo, este último, historicamente, administrado por via intravenosa, permitindo uma ação sistêmica, ou em mistura com PMMA, permitindo uma ação local no tratamento da osteomielite (FRAIMOW, 2009; JORGE; CHUEIRE; ROSSIT, 2010; XIE *et al.*, 2022). A dosagem e a duração do tratamento são determinadas com base na gravidade da infecção, características clínicas do paciente e resultados de testes de sensibilidade bacteriana.

1.7. Sinvastatina

Considerando-se que a osteomielite, rotineiramente, leva à inflamação, necrose e destruição do tecido ósseo, é importante que seja planejado o tratamento da regeneração óssea. Diante disto, a aplicação de medicações com propriedades osteoindutoras, osteocondutoras e osteogênicas, além de tentar solucionar esse problema, potencializa o sucesso da utilização de biomateriais, como, por exemplo, a membrana eletrofiada, pois a degradação de alguns tipos de polímeros permite que o fármaco seja liberado na circulação periférica do implante de forma lenta e gradual, reduzindo a toxicidade farmacológica ao hospedeiro e permitindo a ação de regeneração óssea local (RASHIDI *et al.*, 2010; TOKER *et al.*, 2012).

O grupo das estatinas é usualmente associado à intervenção no metabolismo do colesterol. Tais substâncias inibem a enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzimas A (HMG-CoA), resultando na quebra de outras cadeias metabólicas mevalonato-dependentes e, por consequência, redução do anabolismo de colesterol. Todavia, alguns estudos demonstraram que a sinvastatina possui propriedade pleiotrópica: a osteogênese (CHAMANI *et al.*, 2021). RASHIDI *et al.*, 2010 relatam

que, além da sinvastatina (SIN) ter a capacidade de estimular a diferenciação de osteoblastos e de inibir a diferenciação de osteoclastos, ela pode aumentar a expressão da proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2), pelo mecanismo de inibição da prenilação de enzimas que hidrolisam trifosfato de guanosina (GTPases), as quais têm efeito negativo na síntese dessa proteína. WOO *et al.*, (2000) afirmam que a sinvastatina parece ser capaz de inibir a fusão de precursores dos osteoclastos e romper os filamentos de actina presentes na zona clara dessas células, auxiliando ainda mais a osteogênese.

Deste modo, trabalhos atuais vêm descrevendo o potencial da SIN associada a biomateriais, como, por exemplo, membranas eletrofiadas, para atuar na osteogênese, para favorecer o tratamento das infecções ósseas ao minimizar a necrose e, conseqüente, destruição óssea por acelerar o processo de produção e remodelamento desse tecido. Assim, ao ser incorporado ao biomaterial, a degradação do polímero gradualmente permitirá sua liberação sustentada, contribuindo para uma resposta terapêutica aprimorada (JIN *et al.*, 2021).

2. JUSTIFICATIVA

As opções terapêuticas limitadas para o tratamento da osteomielite incluem antibioticoterapia e procedimentos cirúrgicos com implante de materiais não absorvíveis como o polimetilmetacrilato (PMMA). Posto isso, a utilização do biomaterial PMMA associado a antibióticos é um dos tratamentos preventivos e curativos das infecções ósseas mais realizados, especialmente, nas infecções periprotéticas. A eficácia desse tipo de tratamento das osteomielites, utilizado desde 1970, é comumente reconhecida (BUCHHOLZ; ENGELBRECHT, 1970; BURY; ROGERS; DICKMAN, 2021).

Porém, o PMMA apresenta algumas desvantagens em relação ao seu uso, tais como: natureza agressiva do ato cirúrgico, aumento excessivo de temperatura no local do implante e, por vezes, sistêmica, reação do tecido hospedeiro ao acúmulo de partículas de cimento ósseo provenientes de dissolução e desgaste do material que são pouco bioabsorvíveis e de alta toxicidade para a maioria dos organismos, além da necessidade de realização de um segundo procedimento cirúrgico para remoção do material, o que pode prejudicar sua eficácia como tratamento de infecções ósseas (PATEL *et al.*, 2023).

Baseado nessas informações, este projeto pretendeu avaliar o biomaterial poli(L-co-D,L ácido lático-co-trimetileno carbonato) (PLDLA-co-TMC) associada a vancomicina (VAN) e

sinvastatina (SIN) em formato de membrana eletrofiada como substituto do cimento ósseo para o tratamento da osteomielite para tentar reduzir as complicações do uso do PMMA e aumentar a eficácia do tratamento dessa patologia, visto que a membrana eletrofiada de PLDLA-co-TMC é biocompatível, é atóxico para o organismo, apresenta versatilidade e resistência mecânica e mostra-se um sistema de liberação de fármacos eficaz, principalmente, de antibióticos e medicamentos que estimulem a regeneração tecidual, proporcionando suporte transitório na aplicação clínica da osteomielite (CIAMBELLI *et al.*, 2013).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste projeto foi obter membranas eletrofiadas de poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato) (PLDLA-co-TMC) adicionadas dos fármacos vancomicina (VAN) e sinvastatina (SIN) para o tratamento de osteomielite induzida em tíbias de ratos *Wistar*.

3.2. Objetivos específicos

- Incorporar VAN e SIN no PLDLA-co-TMC;
- Obter a membrana eletrofiada de PLDLA-co-TMC adicionada de VAN e SIN;
- Avaliar as propriedades físico-químicas da membrana eletrofiada de PLDLA-co-TMC e do mesmo eletrofiado com VAN e SIN;
- Induzir osteomielite aguda por contiguidade em metáfise proximal de tíbia de ratos *Wistar*;
- Implantar cirurgicamente, após 7 dias da indução da osteomielite, a membrana eletrofiada de PLDLA-co-TMC sem ou com VAN e SIN na tíbia com infecção óssea;
- Analisar macro e microscopicamente, no estudo *in vivo*, o resultado do tratamento da infecção e a regeneração do osso acometido.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Este capítulo aborda os procedimentos experimentais realizados neste projeto, incluindo os materiais utilizados, os métodos empregados e o conjunto de caracterizações dos experimentos realizados.

4.1. Materiais

Os monômeros L-lactideo (114,13 g/mol) e D,L-lactideo (144,13 g/mol) foram obtidos da Purac Biochem (Holanda). O carbonato de trimetileno (1,3 dioxan-2-ona) (TMC) (102,089 g/mol) foi obtido da Boehringer Ingelheim (Alemanha). A vancomicina pura (VAN) foi obtida pela Sigma-Aldrich. A sinvastatina pura (SIN) foi obtida pela farmácia de manipulação Phito Fórmulas / CNPJ: 16.705.291/0001-53.

4.2. Métodos

4.2.1. Síntese do polímero PLDLA-co-TMC

A síntese do polímero poli(L-co-DL ácido lático-co-trimetileno carbonato) (PLDLA-co-TMC) ocorreu conforme protocolo estabelecido por MOTTA; DUEK, 2014. Para isso, a síntese foi realizada através da polimerização de quantidades apropriadas dos monômeros L-lactídeo, D,L-lactídeo e TMC, nas proporções L:D,L:TMC de 49:21:30 w/w, respectivamente. Em seguida, os respectivos monômeros com TMC foram misturados e colocados em uma ampola de vidro. Após essa etapa, o catalisador 2-etil-hexanoato de estanho foi acrescentado a uma razão molar de monômeros com TMC/octoato de estanho de ~5000. A ampola foi selada sob vácuo e, posteriormente, imersa em banho de óleo a 130°C por 48 horas, conforme apresentado na Figura 1.

Após esse processo, a ampola foi aberta e o conteúdo dissolvido em clorofórmio e precipitado em metanol. Por fim, o polímero foi seco sob vácuo por 8 horas a 45°C para eliminar o solvente residual. O PLDLA-co-TMC obtido apresentou massa molar numérica média de 143569 g/mol, massa molar ponderal média em massa de 197552 g/mol e índice de polidispersividade de 1,3. O polímero sintetizado, PLDLA-co-TMC, resultante é apresentado de forma ampliada na Figura 1.

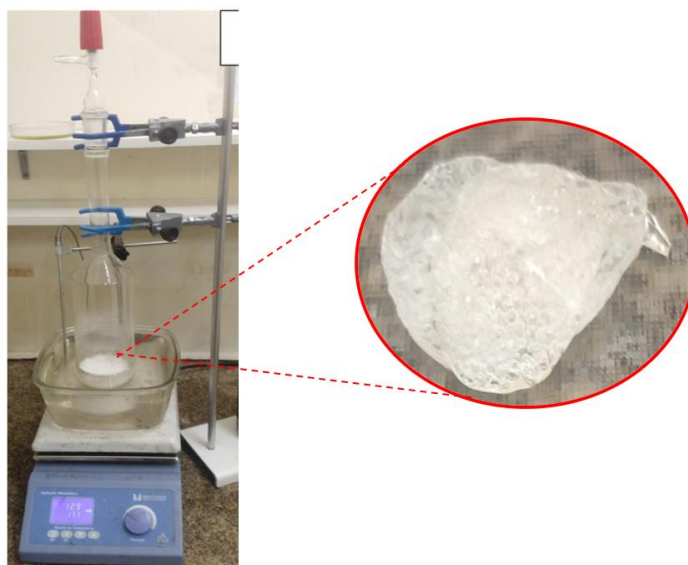


Figura 1. Imagem do processo de polimerização e PLDLA-co-TMC obtido através da síntese (ampliação).

4.2.2. Incorporação da Vancomicina e da Sinvastatina em PLDLA-co-TMC

Para obtenção da membrana de PLDLA-co-TMC eletrofiadas contendo vancomicina (VAN) e sinvastatina (SIN), primeiramente, preparou-se a solução do polímero contendo os fármacos. Numa primeira etapa, o PLDLA-co-TMC sintetizado foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração 10% (m/v). Após completa dissolução, adicionou-se à solução VAN na concentração de 3% em relação à massa do polímero conforme descrito por MAKAROV *et al.*, (2010). Após a dissolução da VAN, a solução foi vertida em placa de Petri e colocada sobre uma placa aquecida com controle de temperatura de 30-35°C por 21 dias para completa evaporação do solvente. Após esse processo, o PLDLA-co-TMC contendo VAN foi solubilizado e submetido ao processo de eletrofição para obtenção das membranas.

A solução de PLDLA-co TMC contendo SIN seguiu o mesmo procedimento citado para a preparação da mistura de PLDLA-co-TMC com VAN, sendo que a SIN foi adicionada à solução numa concentração final de 1% do peso do material e o solvente utilizado foi o DMSO (MENDES JÚNIOR *et al.*, 2017).

4.2.3. Obtenção das membranas de PLDLA-co-TMC eletrofiadas contendo os fármacos

A partir das amostras do PLDLA-co-TMC incorporadas com os fármacos VAN e SIN, detalhada no item 4.2.2, para o processo de eletrofição, foram preparadas 4 soluções distintas: PLDLA-co-TMC sem a incorporação de fármaco a 12% de massa; PLDLA-co-TMC contendo apenas vancomicina (PLDLA-co-TMC/VAN); PLDLA-co-TMC contendo apenas sinvastatina (PLDLA-co-TMC/SIN) e PLDLA-co-TMC contendo uma combinação dos dois fármacos a 12% em massa (PLDLA-co-TMC/VAN/SIN). Para o processo de eletrofição das membranas, utilizou-se como solvente uma mistura de DMSO e clorofórmio na proporção de 1:9 para preparação das soluções referentes aos 4 grupos. Optou-se por preparar essa mistura de solventes, pois o DMSO é um solvente que, apesar de dissolver o polímero e os fármacos, é pouco volátil, dificultando o processo de eletrofição. Por outro lado, o clorofórmio é um solvente que, apesar de não dissolver a VAN, volatiliza facilmente à temperatura ambiente (25 °C), favorecendo o processo de eletrofição. As soluções foram agitadas a 300 rpm, usando um agitador magnético por 19 horas à temperatura ambiente, para manter a homogeneização das soluções.

Em seguida, as soluções de PLDLA-co-TMC foram colocadas em uma seringa de 10 mL e acoplada a uma bomba de infusão em equipamento da marca: DBM Eletrotech / modelo: EF 2B RT 0219. As seringas foram conectadas em agulhas metálicas de 0,70 x 25 mm. As soluções previamente preparadas foram então eletrofiadas sob parâmetros fixos de vazão de 0,08 ml/min e tensão elétrica de 15,8 kV. A distância da agulha até o coletor foi de 180 mm. As fibras eletrofiadas foram depositadas sobre um coletor rotativo, composto por um cilindro giratório de alumínio com velocidade de 99 rpm, conforme mostrado na Figura 2A. O processo de eletrofição resultou em membranas de 15 x 15 cm, conforme apresentado na Figura 2B. Todo o experimento foi realizado a uma temperatura de 25°C.

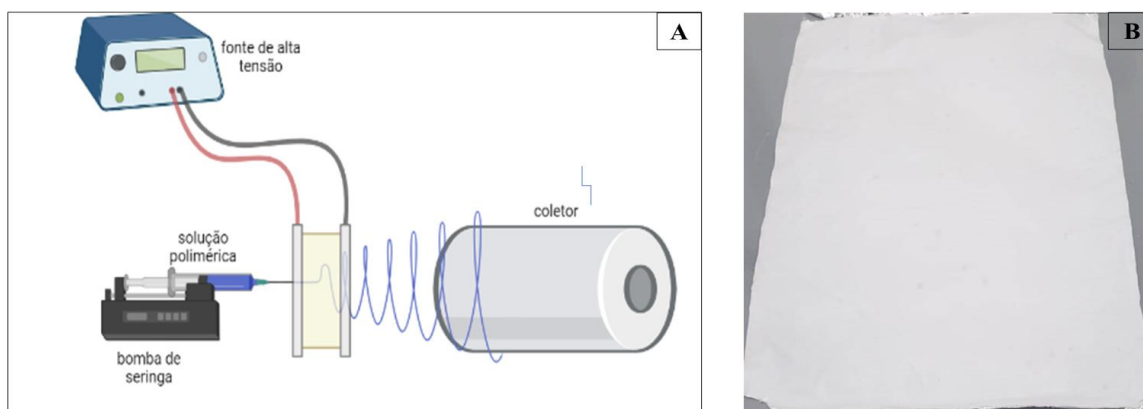


Figura 2. Imagem ilustrativa do processo de eletrofiação (A) e imagem da membrana de PLDLA-co-TMC eletrofiada na dimensão 15x15 cm (B).

4.3. Caracterização

4.3.1. Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do polímero PLDLA-co-TMC, das membranas eletrofiadas de PLDLA-co-TMC, PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN foram realizados em um espectrômetro da marca: Perkin Elmer / modelo: Spectrum 65, com módulo ATR, resolução de 4 cm^{-1} , usando comprimentos de onda entre $500\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$ e 32 scans.

4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das fibras eletrofiadas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JEOL, JSM-6010LA) com parâmetro de tensão de 3 kV. As amostras foram previamente revestidas com ouro em um pulverizador (Denton Vacuum).

4.3.3. Termogravimetria (TG)

As análises de termogravimetria (TG) do polímero PLDLA-co-TMC, das membranas eletrofiadas de PLDLA-co-TMC, PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN foram realizadas em equipamento da marca: TA Instruments / modelo: TGA 55. Para isso, foram utilizados aproximadamente 5 mg de cada amostra. A análise térmica foi realizada em um intervalo de temperatura entre 25 e $450\text{ }^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e fluxo de nitrogênio de $100\text{ ml}/\text{min}$.

4.3.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises da calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas em um equipamento da marca: TA Instruments / modelo: Discovery DSC 25. Para isso, foram utilizados aproximadamente 8 mg de polímero PLDLA-co-TMC, das membranas eletrofiadas de PLDLA-co-TMC, PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN. As amostras foram depositadas em cápsulas herméticas de alumínio, as quais foram submetidas a um primeiro aquecimento de 25°C até 120°C, mantendo uma isoterma de 3 minutos, com posterior resfriamento até -25°C, com isoterma de 1 minuto. Por fim, as amostras foram submetidas novamente a um segundo aquecimento até 350°C. Todos os eventos ocorreram sob atmosfera dinâmica de gás nitrogênio com vazão de 250 mL/min, com razão de aquecimento e resfriamento de 10°C/min para todas as amostras.

4.3.5. Estudo microbiológico das membranas de PLDLA-co-TMC eletrofiada com Vancomicina e Sinvastatina

Foram realizados antibiogramas para todas as membranas eletrofiadas antes de serem implantadas nos animais. Para isso, adquiriu-se um tubo contendo cultura de *S. aureus* do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo / FCMS PUC-SP, diluídas até a concentração final próxima à escala 0,5 de Mc Farland, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC (unidades formadoras de colônia). Em seguida, foi umedecido o *swab* na cultura, pressionando o mesmo sobre as paredes do tubo para retirar o excesso de líquido. Após isso, semeou-se o *swab* sobre toda a placa de petri uniformemente, colocando os discos contendo gentamicina e vancomicina (controles) e pedaços das membranas eletrofiadas com o auxílio da pinça em pontos equidistantes. Por fim, incubou-se, por 24-48 horas a 37°C em aerobiose, para, posteriormente, fazer as leituras da presença ou ausência dos halos de inibição ao redor dos materiais.

4.3.6. Análise do perfil de liberação controlada de fármacos das membranas de PLDLA-co-TMC

A análise do perfil de liberação controlada de fármacos *in vitro* para todas as membranas eletrofiadas de PLDLA-co-TMC, PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-

TMC/VAN/SIN foi dada pela concentração de fármaco lixiviado no meio de liberação. O ensaio foi realizado em triplicata, usando amostras das membranas de PLDLA-co-TMC com VAN e/ou SIN que foram imersas em tubos Falcon com 5 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) 0,01M e mantidas a 37°C em banho termostático com agitação constante. Em seguida, as alíquotas de 3 ml das soluções foram coletadas, inicialmente, após 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 minutos, seguidas por coletas em 2, 3, 4 e 5 horas. Após essa etapa inicial, as alíquotas foram colhidas a cada 24 horas até completar 380 horas de ensaio. A quantidade retirada em cada alíquota foi repostada com solução de PBS após cada coleta.

As alíquotas coletadas foram analisadas em um espectrofotômetro da marca: Femto / modelo: 800 XI, utilizando um comprimento de onda de 235 nm para VAN e 238 nm para SIN. A partir da absorbância obtida para cada alíquota, foi calculada a concentração de VAN e SIN liberada em cada intervalo de tempo. Para este cálculo, foi utilizada a curva de calibração.

Os dados experimentais foram então ajustados aos modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin utilizando o software DDSolver. A avaliação dos modelos foi realizada com base no coeficiente de determinação (R^2), sendo selecionado como o melhor modelo aquele que apresentou o maior valor de R^2 , indicando um melhor ajuste aos dados experimentais.

No modelo de ordem zero, a liberação é constante ao longo do tempo, independentemente, da quantidade inicial do fármaco, representado pela equação $Qt=k_0 \times t$, onde Qt é a quantidade de fármaco liberado no tempo t e k_0 é a taxa de liberação constante.

No modelo de primeira ordem, a liberação é exponencialmente decaída ao longo do tempo, com a taxa de liberação sendo proporcional à quantidade de fármaco presente, representado pela equação $Qt=Q_0 \times (1 - e^{-k_1 \times t})$, onde Q_0 é a quantidade inicial de fármaco, k_1 é a taxa de liberação e e é a base do logaritmo natural.

Por sua vez, o modelo de Higuchi é aplicável a sistemas onde a liberação é dominada pela difusão através de uma matriz sólida, com a taxa de liberação sendo proporcional à raiz quadrada do tempo, representado pela equação $Qt=k_H \times \sqrt{t}$, onde k_H é o coeficiente de difusão.

O modelo de Korsmeyer-Peppas, uma extensão do modelo de Higuchi, é usado quando a liberação é influenciada por outros mecanismos além da difusão, como a erosão da matriz, sendo comum em sistemas poliméricos. É representado pela equação $Qt=k_t \times t^n$, onde k_t é uma constante

que depende do sistema de liberação e n é o expoente de liberação que reflete o mecanismo de liberação.

O modelo de Peppas-Sahlin considera a heterogeneidade dos sistemas poliméricos e a não linearidade das taxas de relaxação, sendo útil para sistemas com mudanças significativas na estrutura do polímero durante a liberação do fármaco. É representado pela equação $Q_t = k_1 \times t^m + k_2 \times t^{2m}$ onde Q_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t , k_1 e k_2 são constantes relacionadas aos mecanismos de liberação, e m é um parâmetro que reflete a complexidade do sistema de liberação.

4.3.7. Estudo *in vivo*

4.3.7.1. Caracterização da amostra

Para a realização do estudo *in vivo*, foram adquiridos 25 ratos da classe *Mammalia*, ordem *Rodentia*, família *Muridae*, espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem *Wistar*, machos, adultos jovens com idade aproximada de dois a três meses, pesando entre 250 e 300 g, obtidos do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo / FCMS PUC-SP.

Os animais foram mantidos no Biotério da FCMS PUC-SP, passaram por ambientação de duração de 7 dias e foram deixados em gaiolas grandes com, no máximo, cinco ratos por gaiola. Durante todo o experimento, eles foram hidratados com água *ad libitum* e alimentados com dieta sólida da marca: Labina / Agribands-Purina Ltda; Paulínia, São Paulo, Brasil.

Todas as etapas do experimento foram conduzidas em conformidade com a Lei nº 11.794/2008 e foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo / CEUA FCMS PUC-SP, sob o protocolo nº 2023/134, seguindo as diretrizes estabelecidas no Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica.

4.3.7.2. Distribuição da amostra em grupos

Para o estudo *in vivo*, foram utilizados 25 ratos *Wistar* os quais foram divididos em 5 grupos distintos mostrados na Tabela 2:

Tabela 2. Distribuição dos ratos *Wistar* nos 5 grupos do estudo *in vivo*.

GRUPO	DESCRIÇÃO	Nº DE RATOS	TEMPO DE ESTUDO
Controle Negativo	Lesão em tíbia com osteomielite sem material	5	21 dias
Controle Positivo	Lesão em tíbia com osteomielite e membrana de PLDLA-co-TMC	5	21 dias
PLDLA-co-TMC com Vancomicina	Lesão em tíbia com osteomielite e membrana de PLDLA-co-TMC com Vancomicina	5	21 dias
PLDLA-co-TMC com Sinvastatina	Lesão em tíbia com osteomielite e membrana de PLDLA-co-TMC com Sinvastatina	5	21 dias
PLDLA-co-TMC com Vancomicina e Sinvastatina	Lesão em tíbia com osteomielite e membrana de PLDLA-co-TMC com Vancomicina e Sinvastatina	5	21 dias

4.3.7.3. Indução de osteomielite em tíbias de ratos *Wistar*

Para esta etapa do trabalho, foram utilizadas cepas de *S. aureus* (ATCC 6538) cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo / FCMS PUC-SP, após ativação adequada de uma cultura pura, verificada através da coloração de Gram e de testes bioquímicos de catalase e coagulase. Para a ativação da cultura pura, as cepas bacterianas foram submetidas ao meio líquido de caldo de soja tratada com tripsina (TSB) da marca: Biocen do Brasil e a concentração celular foi determinada pela técnica da contagem padrão em placas usando o meio de ágar de soja e tripsina (TSA) da marca: Biocen do Brasil (JUNIOR; PINHEIRO; ALMEIDA, 2014).

Após o crescimento bacteriano, realizou-se o implante das mesmas nos animais. Para tanto, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de cloridrato de quetamina 2 % da marca: Vetaset / Fort Dodge Laboratories; Overland Park, Kansas City, USA, administrado na posologia de 60 mg/kg, e de solução de cloridrato de xilazina da marca: Coopazine / Coopers; Brasil, administrado na posologia de 30 mg/kg. Após anestesia, foi feita tricotomia

manual em toda região tibial, como mostrado na Figura 3A, seguida de antissepsia com solução de digluconato de clorexidina a 2 %.

Posteriormente, foi feita uma incisão de, aproximadamente, 2 cm seguindo o eixo vertical da tíbia para exposição óssea, como mostrado na Figura 3B. Logo em seguida, com o objetivo de padronizar a área a ser operada, as cavidades ósseas de $\phi = 2$ mm foram confeccionadas com ajuda de uma broca cirúrgica de material mini-micro montada em ângulo reto com a cortical óssea no terço superior da face medial da tíbia, como mostrado na Figura 3C. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado sob refrigeração externa e constante de, aproximadamente, 20°C e com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9% (JUNIOR; PINHEIRO; ALMEIDA, 2014).

Após esse procedimento, a inoculação das bactérias dentro da cavidade óssea foi realizada através de uma pipeta automática com uma alíquota de 50 μ l de solução salina com *S. aureus* contendo, aproximadamente, 9×10^8 UFC, como mostrado na Figura 3D. Em seguida a este procedimento, a ferida operatória foi suturada por planos e, por fim, aguardado um período de 7 dias para a indução da osteomielite (FUKUSHIMA *et al.*, 2005).

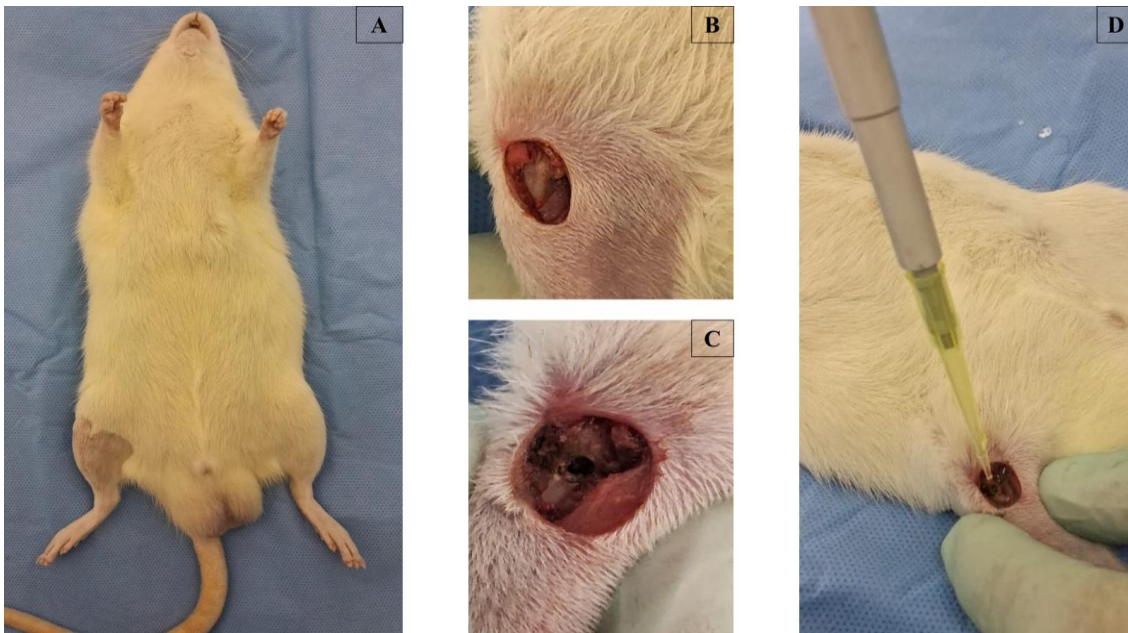


Figura 3. Imagens do rato anestesiado e tricotomizado (A), da incisão expondo metáfise proximal da tíbia (B), da cavidade óssea (C) e da inoculação das bactérias (D).

4.3.7.4. Procedimento cirúrgico nos animais

Após 7 dias da indução da osteomielite nos ratos, foi realizado o procedimento cirúrgico de implante do biomaterial para tratamento da osteomielite. Para isso, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de cloridrato de quetamina 2% da marca: Vetaset / Fort Dodge Laboratories, Overland Park, Kansas City, USA, administrado na posologia de 60 mg/kg, e de solução de cloridrato de xilazina da marca: Coopazine / Coopers, Brasil, administrado na posologia de 30 mg/kg. Depois da anestesia, foi feita nova tricotomia manual em toda região tibial, como mostrado na Figura 4A, seguida de antissepsia com solução de digluconato de clorexidina a 2%. Posteriormente ao preparo cirúrgico, foi feita nova incisão, aproveitando-se a cicatriz cirúrgica feita na indução da osteomielite, para exposição óssea. Assim que visualizado a cavidade óssea de $\phi = 2$ mm com infecção local, como mostrado na Figura 4B, foi implantado a membrana eletrofiada de acordo com o grupo ao qual o rato que estava sendo operado pertencia, como mostrado na Figura 4C. Em seguida a este procedimento, a ferida operatória foi suturada por planos e, por fim, aguardado um período de 14 dias para o sacrifício dos animais. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado sob refrigeração externa e constante de, aproximadamente, 20°C e com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%.



Figura 4. Imagens do rato anestesiado e tricotomizado (A), da incisão expondo cavidade óssea (B) e do implante da membrana eletrofiada (C).

4.3.7.5. Eutanásia dos animais

Passado o período de 14 dias de implantação das membranas, os ratos foram eutanasiados por overdose de isoflurano, colocando-se os animais em uma câmara de vidro fechada junto com algodão embebido com a droga durante 20 minutos. As tíbias contendo a região do implante foram retiradas e, imediatamente, armazenadas em recipientes de vidro, individualmente identificados, com solução fixadora de formol 10% por um período de 24 horas à temperatura ambiente.

4.3.7.6. Processamento do material

As tíbias foram submetidas à descalcificação em solução descalcificadora contendo ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) 4,13% pelo período de 45 dias, pois elas apresentam em sua composição cálcio que dificulta o corte do osso para preparo das lâminas histológicas para, posteriormente, produzir as lâminas para análise histológica de acordo com as técnicas utilizadas para microscopia de luz. Passada essa etapa, as tíbias foram colocadas em parafina como meio de inclusão. Os fragmentos ósseos contendo a cavidade óssea foram submetidos aos seguintes processos: lavagem, desidratação em soluções crescentes de etanol, diafanização em etanol absoluto/xilol na proporção de 1:1 por 30 minutos, seguida de xilol por 30 minutos e embebição em xilol/parafina à 60°C na proporção 1:1 por 30 minutos, seguida de parafina líquida pura por 3 horas. Após essas etapas, as tíbias foram depositadas em formas de aproximadamente 5 cm³ e preenchidos com parafina à 60°C, formando blocos. Esses blocos com os fragmentos ósseos incluídos permaneceram em repouso durante 24 horas em temperatura ambiente para o endurecimento dos mesmos. Em seguida, foi realizado o aparo dos blocos que seguiram para o processo de corte histológico.

4.3.7.7. Preparação das lâminas histológicas e coloração

Os blocos de parafina com os fragmentos ósseos incluídos foram seccionados através de um micrótomo da marca: Leica / modelo: RM2245 para obtenção de cortes histológicos em folhetos com espessura de 3 µm, prosseguindo com a técnica de coloração das lâminas por hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram fotografadas em um microscópio óptico da marca: NIKON / modelo: E 800.

4.3.7.8. Dosagem de IL-6 nos ratos e análise estatística

A avaliação *in vivo* do tratamento da osteomielite em tíbia de ratos *Wistar* estipulado por este projeto começou dosando-se a quantidade de interleucina-6 (IL-6) no plasma sanguíneo dos animais antes da implantação do biomaterial e antes da realização da eutanásia, pois o IL-6 é marcador bioquímico de atividade pró-inflamatória que está muito presente na osteomielite (BRINKMANN *et al.*, 2022). Para isso, foi realizada coleta de sangue nos ratos antes da cirurgia de implantação do biomaterial e antes de serem eutanasiados e as amostras de sangue foram submetidas às técnicas de dosagem de IL-6, utilizando-se a Rat IL-6 ELISA Kit da marca: LEAC para quantificar a IL-6. A partir da dosagem de IL-6 encontrada em cada amostra obtida antes das cirurgias de implante do biomaterial e antes da eutanásia, foram obtidos os valores médios das dosagens e seus respectivos desvios-padrões, comparando estes valores, considerando um nível de significância estatística menor que 0,05 (YOON *et al.*, 2007).

4.3.7.9. Avaliação do aspecto macroscópico do material

Após a eutanásia dos animais, foram realizadas coleta das tíbias contendo osteomielite e, em seguida, foi observado e analisado os aspectos macroscópicos do material, principalmente, quanto a presença de cavidades e/ou fístulas, presença de secreção purulenta e presença de necrose óssea.

4.3.7.10. Avaliação do aspecto microscópico do material

Após realização da avaliação macroscópica das tíbias contendo osteomielite, a região da tíbia contendo infecção foi objeto de análise histológica. Para este fim, o material foi cortado seguindo o plano coronal e cobrindo o comprimento da região da lesão tibial contendo osteomielite. Com o auxílio de um microscópio calibrado, usando a luz microscópica incandescente, da marca: NIKON / modelo: E800, foram realizadas observações e análises histológicas do osso, procurando identificar: sinais de infecção, reação inflamatória, presença de necrose óssea e neoformação óssea decorrente da destruição óssea.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão apresentados os resultados físico-químico, microbiológico e *in vivo* obtidos até o momento no devido projeto.

5.1. Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros da espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de vancomicina (VAN), sinvastatina (SIN) e das membranas eletrofiadas de PLDLA-co-TMC, PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIM e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN são apresentados na Figura 5.

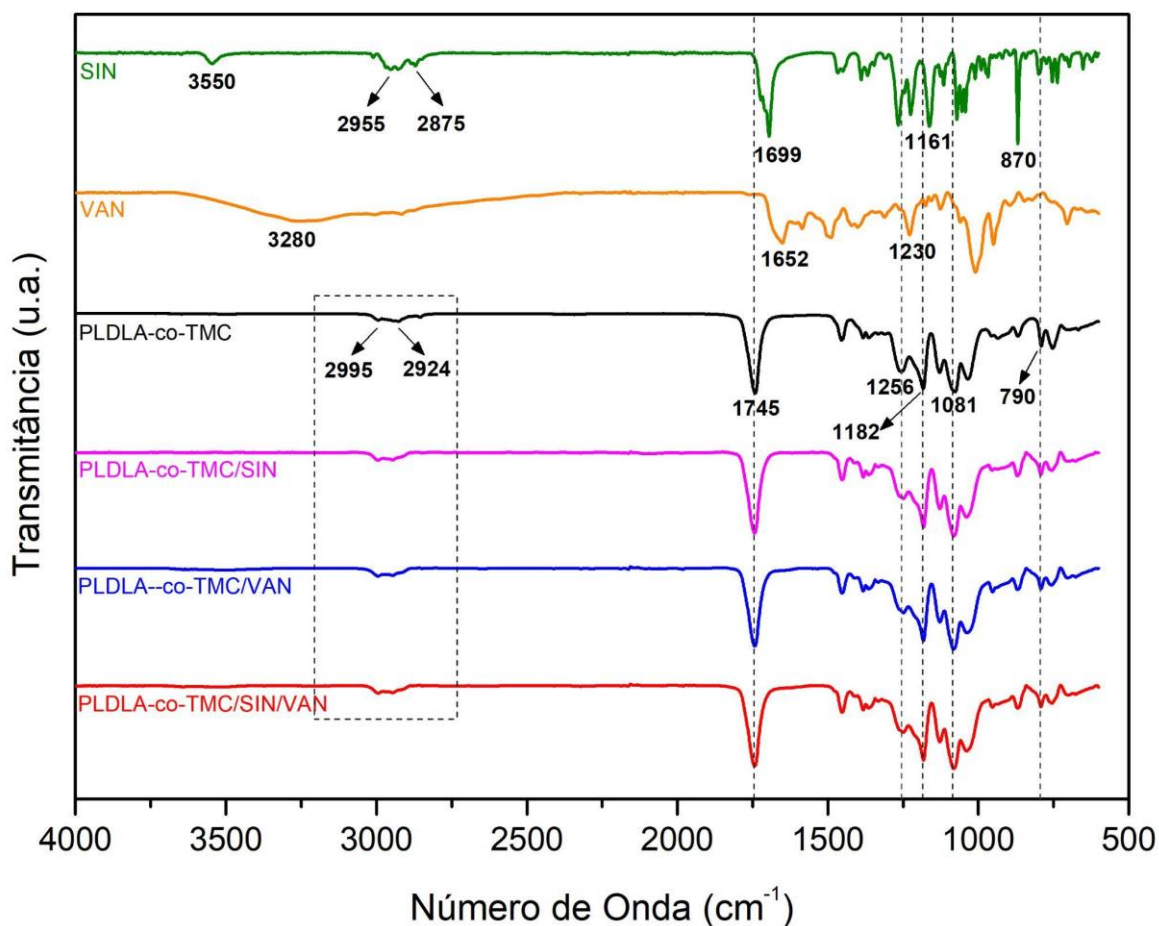


Figura 5. Espectro de FTIR de vancomicina (VAN), sinvastatina (SIN), PLDLA-co-TMC eletrofiado e das amostras eletrofiadas compostas por PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN.

O espectro de infravermelho de SIN apresentou os principais picos característicos atribuídos ao estiramento de hidroxilas em 3550 cm^{-1} , enquanto os picos em 2955 e 2875 cm^{-1} foram associadas a estiramento assimétrico e simétrico de C-H, respectivamente. Além disso, o pico presente em 1699 cm^{-1} foi atribuído ao estiramento de grupos carbonila C=O, 1161 cm^{-1} à vibração de grupos C-O-C e 870 cm^{-1} à vibração C-H de olefinas trissubstituídas (ALVES *et al.*,

2024; QIAN *et al.*, 2023; PAM; YANG; XU, 2022). Por sua vez, o espectro de VAN exibiu os principais picos em 3280, 1652 e 1230 cm^{-1} correspondentes aos estiramentos de hidroxilas (OH)/N-H, C=O de grupos amida e de ligação C-O, respectivamente (MAGI *et al.*, 2024).

Conforme observado na Figura 5, o espectro de infravermelho da membrana eletrofiada de PLDLA-co-TMC isenta de fármacos exibiu picos característicos de PLDLA e TMC. Deste modo, os principais grupos funcionais de PLDLA foram identificados em 2995 e 2924 cm^{-1} associados a estiramento de CH_3 e C-H, respectivamente. Os picos presentes em 1182 cm^{-1} foram atribuídos a estiramento de C-O-C, enquanto 1081 cm^{-1} a estiramento de C-O. Por outro lado, os picos associados à presença do TMC foram identificados em 1256 cm^{-1} atribuídos ao estiramento assimétrico de O-C-O e 790 cm^{-1} referente à deformação assimétrica de O=C-O. O pico presente em 1745 cm^{-1} foi associado ao estiramento de C=O de grupo éster presente tanto em PLDLA quanto TMC do PLDLA-co-TMC (PEDRINI *et al.*, 2024).

Os espectros de infravermelho das amostras de PLDLA-co-TMC eletrofiado com os fármacos individuais, PLDLA-co-TMC/VAN e PLDLA-co-TMC/SIN, bem como em conjunto, PLDLA-co-TMC/VAN/SIN, exibiram apenas o aparecimento dos principais picos identificados na membrana eletrofiada apenas por PLDLA-co-TMC. Esse fato pode estar associado a uma sobreposição dos picos de PLDLA-co-TMC em relação aos picos de ambos os fármacos ou a uma baixa concentração tanto de VAN, quanto de SIN na membrana eletrofiada de PLDLA-co-TMC. Além disso, a ausência da formação de novos picos nos espectros de PLDLA-co-TMC eletrofiado com VAN, SIN e VAN/SIN indica a ocorrência de apenas uma interação física entre esses componentes. Esse cenário é desejável, pois pode facilitar a liberação dos fármacos para o meio (KOMATSU *et al.*, 2017).

5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das mantas eletrofiadas de PLDLA-co-TMC, PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN foram apresentadas pela análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) na Figura 6.

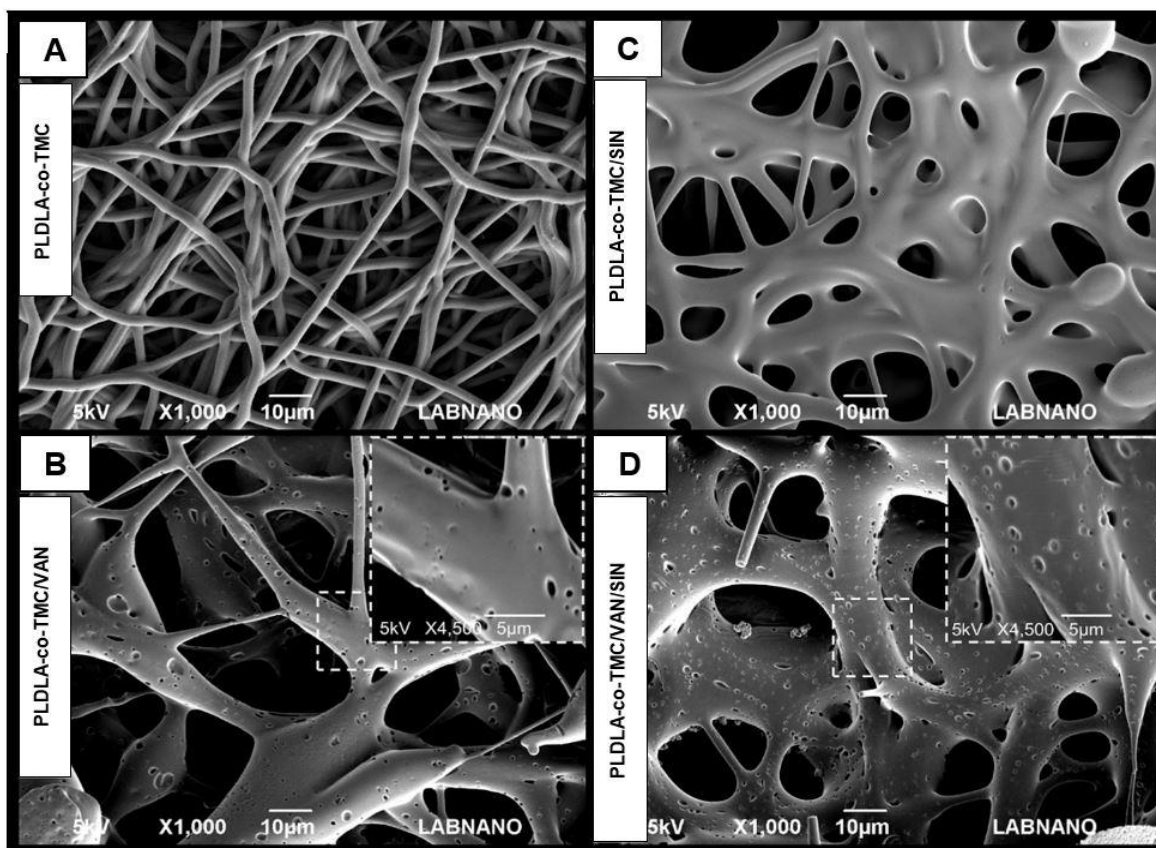


Figura 6. Imagens de MEV de PLDLA-co-TMC eletrofiado (A) e das amostras eletrofiadas de PLDLA-co-TMC/VAN (B), PLDLA-co-TMC/SIN (C) e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN (D).

Com base nas imagens das amostras de PLDLA-co-TMC obtidas pela análise por MEV, foi notada a presença de fibras uniformes do material e com diâmetros regulares, sendo possível a formação de uma rede emaranhada. Essa uniformização e morfologia regular das fibras pode estar associado à concentração do polímero (12%) o qual foi utilizado na eletrofiação. Segundo JEUN *et al.* (2007) quanto maior a massa utilizada do polímero (acima de 3 %) em relação a solução de eletrofiação, maior é a uniformização das fibras, ou seja, há uma estabilização da eletrofiação e consequentemente a solidificação das fibras quando utilizado maiores concentrações de material.

No momento da adição de sinvastatina (SIN) na eletrofiação do PLDLA-co-TMC, foi observado um inchamento das fibras, deixando-as com diâmetros maiores e mais unidas, diferentemente da eletrofiação do PLDLA-co-TMC isento de SIN. O inchamento das fibras pode ser devido à presença da SIN eletrofiada conjuntamente com o PLDLA-co-TMC. Estudos de WENG *et al.* (2022) mostraram que os diâmetros das fibras de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) com SIN eletrofiadas variaram conforme a proporção de PLGA e SIN incorporado. Além

disso, os autores relataram que essas estruturas contendo nanofibras entrelaçadas e diversificadas proporcionam uma liberação sustentada da SIN.

No entanto, as imagens por MEV das amostras de PLDLA-co-TMC/VAN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN apontaram inúmeros poros ao longo das superfícies das fibras, evidenciando uma morfologia alterada na presença da vancomicina (VAN), uma vez que a amostra de PLDLA-co-TMC apenas com SIN não apresentou alteração de morfologia. De acordo com FATHI *et al.* (2020), a VAN solubilizada em polímeros hidrofílicos e eletrofiados posteriormente apresentaram fibras sem alterações morfológicas, ou seja, não apresentando agregação do fármaco na superfície das fibras. Sendo assim, a VAN, por ter sido misturado junto ao clorofórmio da solução de PLDLA-co-TMC, a qual é insolúvel em clorofórmio, a mesma pode ter se agregado na superfície das fibras após a eletrofiação, formando poros ao longo dos filamentos. Tal característica corrobora com ensaio de liberação *in vitro* o qual obteve uma maior liberação de VAN nos primeiros dias, evidenciando a rápida liberação do fármaco agregado nas superfícies das fibras.

5.3. Termogravimetria (TG)

O comportamento térmico dos distintos fármacos: sinvastatina (SIN) e vancomicina (VAN), bem como das membranas eletrofiadas compostas por PLDLA-co-TMC, PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN foi investigado utilizando termogravimetria (TG), Figura 7A, e sua derivada (DTG), Figura 7B. As curvas de TG forneceram informações sobre a estabilidade térmica e os processos de decomposição dos materiais analisados, enquanto as curvas de DTG ajudaram a identificar as temperaturas nas quais ocorrem as perdas de massa mais significativas. Estes dados foram essenciais para compreender a compatibilidade térmica dos fármacos nas membranas eletrofiadas e para otimizar suas propriedades para aplicações biomédicas.

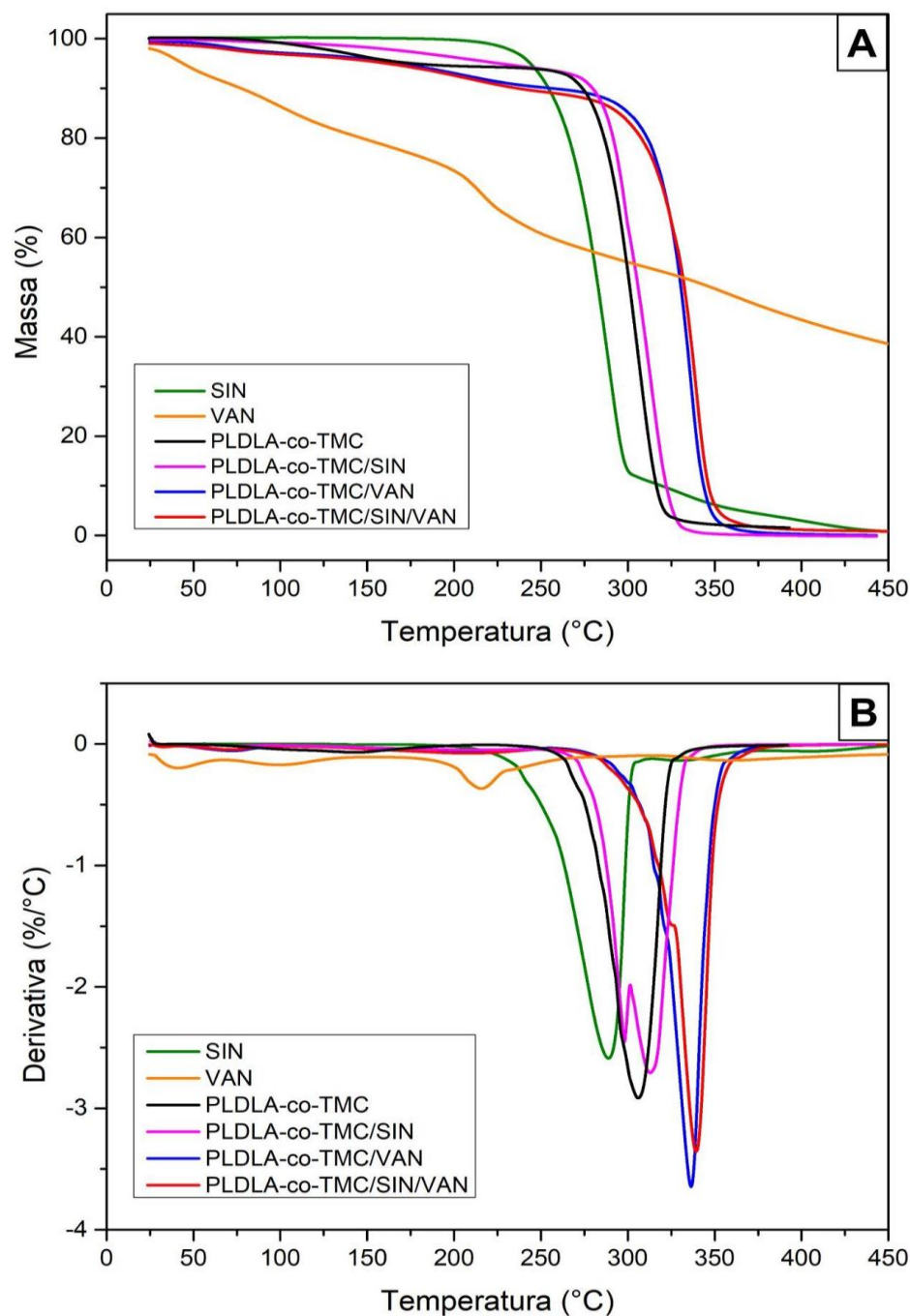


Figura 7. Curvas de TG (A) e DTG (B) de vancomicina (VAN), sinvastatina (SIN), PLDLA-co-TMC eletrofiado e das amostras eletrofiadas compostas por PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN.

A análise de TG das amostras de SIN e VAN revelou distintos perfis de decomposição térmica. A SIN apresentou um único estágio de perda de massa de 99% entre 259-299°C, com a temperatura onde a perda de massa foi máxima (T_{max}) em 288°C, indicando sua degradação térmica

(MAHMOOD *et al.*, 2023). Em contraste, a VAN exibiu quatro eventos consecutivos de perda de massa. O primeiro e o segundo estágios ocorreram entre um intervalo de temperatura entre 28 e 142°C e foram atribuídos à perda de água residual e estruturalmente ligada, devido à sua natureza higroscópica (FATHI *et al.*, 2020; MARTÍN *et al.*, 2021). O terceiro e quarto evento apresentaram início de perda de massa (T_{onset}) em 154°C e 306°C, com T_{max} em 215°C e 392°C, respectivamente. Esses eventos foram associados à decomposição térmica da VAN (MARTÍN *et al.*, 2021). De acordo com estudos de MARTÍN *et al.*, (2021), a decomposição térmica de VAN ocorre por meio de várias etapas consecutivas de perda de massa, conforme observado neste estudo.

As curvas de TG, Figura 7A, e DTG, Figura 7B, mostraram que a amostra composta apenas por PLDLA-co-TMC eletrofiado apresentou um único e acentuado evento de perda de massa entre 275-317°C. A T_{max} ocorreu em 305°C e foi atribuída à degradação térmica do material polimérico, conforme evidenciado por estudos de PEDRINI *et al.* (2024), envolvendo o uso de PLDLA-co-TMC na proporção 70/30. Similarmente, a amostra de PLDLA-co-TMC eletrofiado com SIN exibiu um único evento de perda de massa entre 285-325°C. No entanto, esse evento apresentou dois estágios consecutivos de decomposição térmica, com T_{max} em 298 °C e 313 °C, atribuídos à degradação térmica de SIN e PLDLA-co-TMC, respectivamente. Por outro lado, a membrana eletrofiada por PLDLA-co-TMC com VAN exibiu três estágios de perda de massa, conforme resumido na Tabela 3. A primeira e não muito significativa perda de massa (2%) ocorreu entre 35-110°C com T_{max} em, aproximadamente, 73°C. Este evento foi atribuído a perda de umidade associada a VAN presente no material eletrofiado. O segundo evento, por sua vez, exibiu uma T_{onset} em 119°C com T_{max} em 202°C atribuído à decomposição térmica de VAN. Por fim, o terceiro evento exibiu uma T_{onset} em 309°C com T_{max} em 336°C, foi associado a decomposição de VAN, bem como de PLDLA-co-TMC presente em PLDLA-co-TMC/VAN, corroborando com os achados da literatura (MARTÍN *et al.*, 2021). Assemelhando-se ao comportamento térmico observado para a amostra de PLDLA-co-TMC/VAN, a amostra composta por PLDLA-co-TMC/VAN/SIN eletrofiada, também, apresentou três estágios distintos de perda de massa. Assim, a primeira perda de massa (2%) associada a perda de umidade da VAN, ocorreu entre 42-100°C com T_{max} em 72°C. O segundo e o terceiro estágio de perda de massa exibiram uma T_{onset} em 120 e 303°C, bem como T_{max} de 208 e 338°C, atribuído à decomposição térmica de VAN e bem como a degradação térmica de VAN e do PLDLA-TMC (PLDLA-TMC/VAN) e PLDLA-TMC/SIM (PLDLA-TMC/SIM/VAN). Conforme observado, os resultados indicam que a eletrofição de

PLDLA-TMC em conjunto com os distintos fármacos resultou em um incremento tanto na T_{onset} quanto na T_{max} de PLDLA-TMC. Os resultados mostram que a presença dos fármacos influencia o comportamento térmico das membranas eletrofiadas.

Tabela 3. Propriedades térmicas determinadas por TG e DTG de PLDLA-co-TMC eletrofiado e das amostras eletrofiadas compostas por PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN.

AMOSTRAS	EVENTOS	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)	PERDA DE MASSA (%)
SIN	1	259	288	99
	1	28	37	4
VAN	2	57	95	10
	3	154	215	22
	4	306	392	23
	1	275	305	98
PLDLA-co-TMC	1	285	298/313	99
PLDLA-co-TMC/SIN	1	35	73	2
	2	119	202	6
	3	309	336	90
PLDLA-co-TMC/VAN	1	42	72	2
	2	120	208	7
	3	303	338	88
PLDLA-co-TMC/VAN/SIN	3	303	338	88

5.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos fármacos individuais, sinvastatina (SIN) e vancomicina (VAN), bem como das membranas eletrofiadas por PLDLA-co-TMC, PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN, são apresentados na Figura 8.

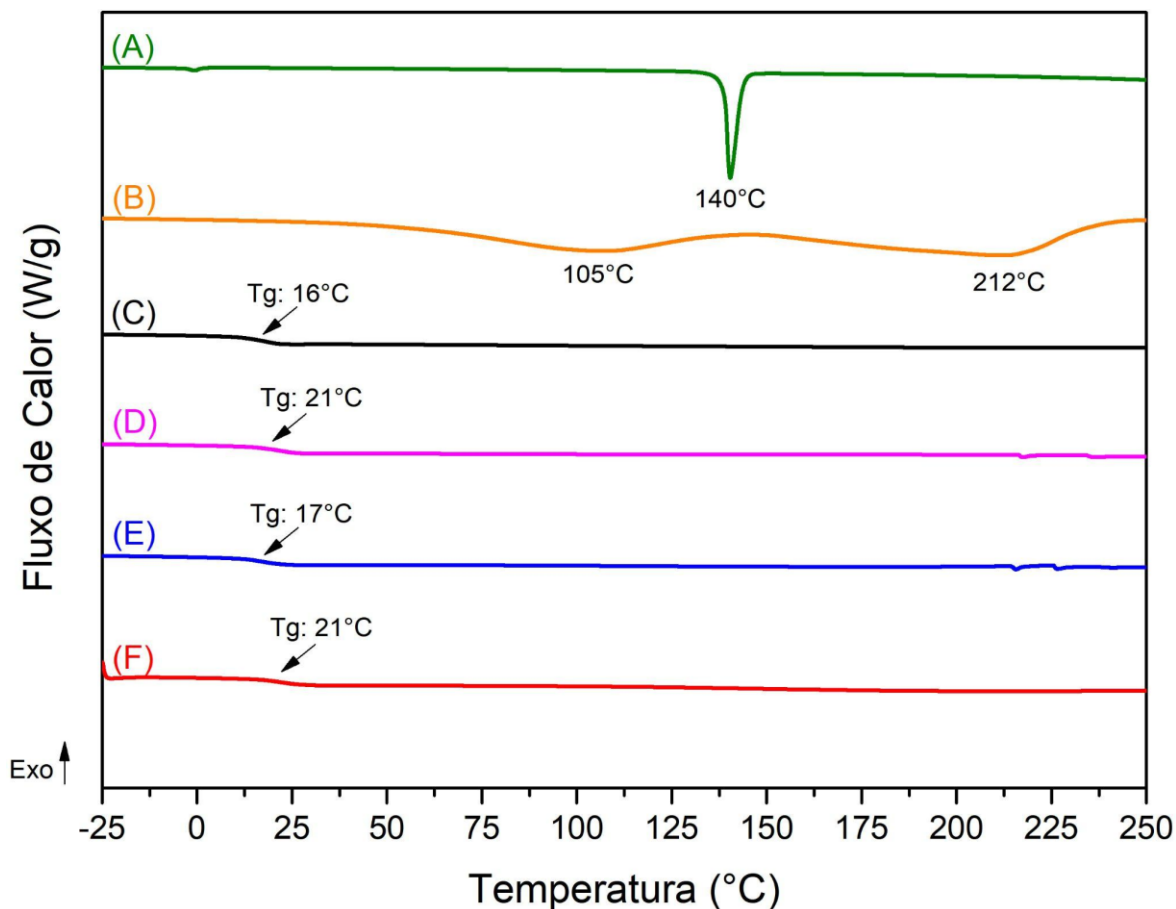


Figura 8. Curvas de DSC dos fármacos sinvastatina (A), vancomicina (B) e das membranas eletrofiadas por PLDLA-co-TMC (C), PLDLA-co-TMC/SIN (D), PLDLA-co-TMC/VAN (E) e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN (F).

A curva de DSC de SIN, Figura 8A, exibiu o aparecimento de apenas um único evento endotérmico em 140°C, associado a fusão do fármaco (WENG *et al.*, 2022; ZAFAR *et al.*, 2022; MAHMOOD *et al.*, 2023). Por sua vez, a VAN, Figura 8B, apresentou dois eventos endotérmicos amplos, em aproximadamente 105°C e 212°C, associados à decomposição térmica e ponto de fusão da estrutura amorfa de VAN (ZHOU *et al.*, 2011; AHMED *et al.*, 2023).

A segunda rampa de aquecimento de DSC de PLDLA-co-TMC eletrofiado, Figura 8C, exibiu o aparecimento de um único evento associado a temperatura de transição vítrea (T_g) em 16°C, indicando sua natureza amorfa (MOTTA; DUEK, 2014). Similarmente, as amostras de PLDLA-co-TMC/SIN, Figura 8D, PLDLA-co-TMC/VAN, Figura 8E, e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN, Figura 8F, apresentaram uma única T_g próxima a T_g identificada para PLDLA-co-TMC, Figura 8C, isento de fármaco. Assim, as amostras eletrofiadas por PLDLA-co-TMC/SIN, PLDLA-co-TMC/VAN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN exibiram valores de T_g de 21°C, 17°C e

21°C, respectivamente. Conforme observado, a eletrofição dos distintos fármacos (SIN e VAN), tanto individualmente, quanto em conjunto, causaram apenas um ligeiro aumento da T_g de PLDLA-co-TMC, mantendo as suas propriedades térmicas inerentes. O ligeiro aumento observado na T_g do PLDLA-co-TMC eletrofiado com os distintos fármacos está de acordo com os achados de SUNER *et al.* (2022), que também identificaram o mesmo comportamento térmico após a eletrofição de ácido polilático (PLA) com diferentes antibióticos obtidos comercialmente.

Nenhum outro evento associado à presença de ambos os fármacos foi identificado na curva de DSC de PLDLA-co-TMC eletrofiado com SIN, VAN e SIN/VAN. De acordo com estudos de MAHMOOD *et al.* (2023), a incorporação de SIN em membranas poliméricas refletiu no desaparecimento da T_g de SIN, indicando que a natureza cristalina de SIN foi transformada em fase amorfa após a sua adição ao polímero. Por sua vez, DELAN *et al.* (2022), apontam que o desaparecimento do pico endotérmico de SIN em nanofibras eletrofiadas está associada ao encapsulamento completo de SIN na matriz polimérica eletrofiada, corroborando com os achados deste estudo para PLDLA-co-TMC/SIN, Figura 8D. Da mesma forma, o material PLDLA-co-TMC/VAN, Figura 8E, não apresentou eventos endotérmicos atribuídos à presença de VAN, o que indica a sua incorporação bem-sucedida na membrana eletrofiada. Este achado corrobora com os achados obtidos nos estudos de SUNER *et al.* (2022) e GHAFAR *et al.* (2019). Sendo assim, os resultados apontam que a amostra composta por PLDLA-co-TMC/SIN/VAN, Figura 8F, teve comportamento similar, resultando em um aprisionamento de ambos os fármacos na matriz eletrofiada.

5.5. Estudo microbiológico das membranas de PLDLA-co-TMC eletrofiado com Vancomicina e Sinvastatina

Para iniciar a avaliação das membranas no estudo *in vitro*, primeiramente, realizou-se o corte das membranas de 15x15 cm em quadrados de 1x1 cm de lado, após isso, foi feito estudo microbiológico do material, conforme protocolo estabelecido neste projeto.

Deste modo, as Figuras 9A e 9B mostram o antibiograma do disco estéril sem a presença de solvente e fármaco (1), o disco estéril incorporado com sinvastatina (2), a membrana de PLDLA-co-TMC sem fármaco (3), a membrana de PLDLA-co-TMC com vancomicina (4), a membrana de PLDLA-co-TMC com sinvastatina (6) e, por fim, os discos controles contendo os antibióticos

gentamicina (GEN) e vancomicina (VAN). Todas as amostras foram previamente secas para a realização do antibiograma.

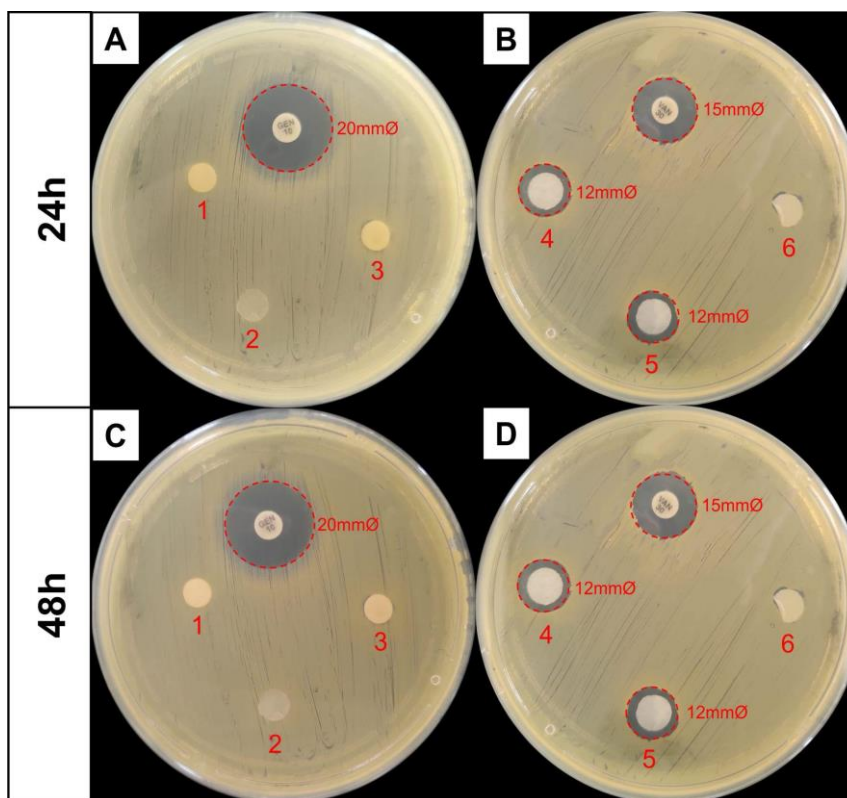


Figura 9. O estudo microbiológico foi realizado em dois períodos de incubação: 24 horas (Figuras 9A e 9B) e 48 horas (Figuras 9C e 9D). Nas Figuras 9A e 9C, são apresentados os seguintes grupos: disco estéril sem fármaco (1), membrana de PLDLA-co-TMC sem fármaco (2), disco estéril incorporado com sinvastatina (3) e disco controle com gentamicina (GEN). Já nas Figuras 9B e 9D, são mostrados: membrana de PLDLA-co-TMC com vancomicina (4), membrana de PLDLA-co-TMC com vancomicina e sinvastatina (5), membrana de PLDLA-co-TMC com sinvastatina (6) e disco controle com vancomicina (VAN).

De acordo com o resultado do ensaio microbiológico, como observado nas Figuras 9C e 9D, após 48 horas de incubação, os discos vazio e incorporado com SIN não formaram halos, os discos de gentamicina (GEN) e vancomicina (VAN) formaram, respectivamente, halos de 20 e 15 mm de diâmetro. Já as membranas de PLDLA-co-TMC sem fármaco e com SIN não formaram halos e, por fim, as membranas de PLDLA-co-TMC com VAN e com VAN e SIN formaram, respectivamente, halos de 12,6 e 12,3 mm de diâmetro. Esses dados mostraram que o material sem fármaco e aquele que continha apenas SIN não apresentaram atividade de inibição do crescimento bacteriano, entretanto, o material que continha VAN e VAN com SIN apresentaram atividade de

inibição do crescimento bacteriano, provando que as membranas com antibiótico apresentavam uma quantidade adequada de antibiótico em sua composição e este medicamento estava ativo. No entanto, conforme manual de antibiograma da empresa Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. / CNPJ: 76.619.113/0001-31 de 2011, para o estudo microbiológico pela técnica disco-difusão, o *S. aureus* para ser considerada sensível a vancomicina, o diâmetro do halo formado ao redor do disco deve ser maior que 15 mm, porém não é muito recomendado que o antibiograma da vancomicina seja realizado pela técnica de disco-difusão e sim por outras técnicas, como, por exemplo, de determinação da concentração inibitória mínima, devido ao aumento do número de cepas de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) e resistentes à vancomicina (VRSA).

Neste projeto, optou-se por realizar o ensaio com cristal violeta como ensaio complementar ao antibiograma descrito anteriormente. Dito isso, inicialmente, foi cultivado quatro tubos contendo cultura de *S. aureus* do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo / FCMS PUC-SP, diluídas até a concentração final próxima à escala 0,5 de Mc Farland, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC. Logo em seguida, foram colocados as membranas sem fármaco, com VAN, com SIN e com VAN e SIN, uma em cada tubo, incubando-se, por 24-48 horas a 37°C em aerobiose, para, no final, transferir as soluções dos quatro tubos para doze poços divididos igualmente entre as quatro amostras, para realizar o ensaio em triplicata, e acrescentar o cristal violeta, como mostrado na Figura 10B, para efetuar, através de um leitor de microplacas, utilizando um comprimento de onda de 595 nm, a aferição das concentrações finais de biofilme bacteriano que, indiretamente, indica as concentrações finais de crescimento bacteriano, como mostrado na Figura 10A (PINTO *et. al.*, 2023).

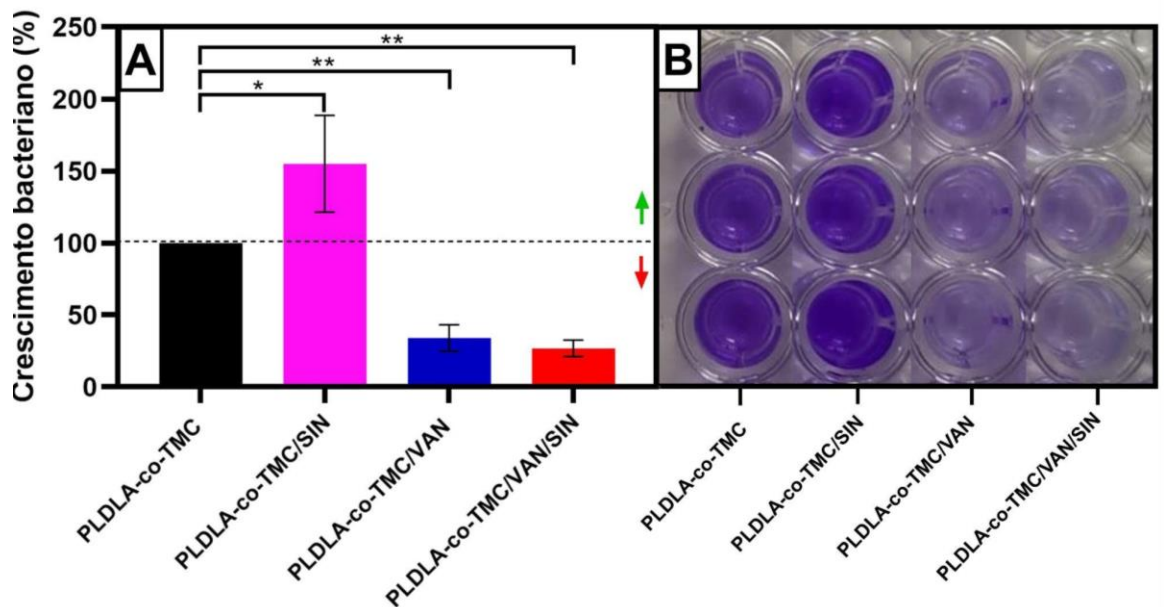


Figura 10. Imagem A representa o gráfico obtido do ensaio com cristal violeta, mostrando os quatro grupos: membrana de PLDLA-co-TMC, membrana de PLDLA-co-TMC/VAN, membrana de PLDLA-co-TMC/SIN e membrana de PLDLA-co-TMC/VAN/SIN e a produção de biofilme bacteriano em %, sendo que (*) representa $p < 0,05$. Imagem B representa os doze poços, divididos entre os quatro grupos, contendo o cristal violeta em triplicata.

Analisando os poços com cristal violeta da Figura 10B, observou-se que os poços contendo membranas de PLDLA-co-TMC sem fármaco e com SIN apresentavam soluções mais turvas do que os poços contendo as membranas de PLDLA-co-TMC com VAN e VAN e SIN, além disso, observou-se, também, que, no gráfico obtido no final do estudo mostrado na Figura 10A, as amostras com PLDLA-co-TMC com SIN apresentaram a maior taxa de produção de biofilme bacteriano, 154,9% em relação às amostras de PLDLA-co-TMC, seguido das amostras com PLDLA-co-TMC com VAN e VAN e SIN, 34% e 26,7%, respectivamente, em relação às amostras de PLDLA-co-TMC, demonstrando que as amostras de PLDLA-co-TMC com SIN tiveram uma grande produção de biofilme bacteriano, ou seja, tiveram um aumento da proliferação bacteriana e os grupos PLDLA-co-TMC com VAN e VAN e SIN que são as amostras que continham antibiótico tiveram uma pequena produção de biofilme bacteriano, ou seja, tiveram uma inibição da proliferação bacteriana, provando que este fármaco está presente, ativo e *S. aureus* é sensível a este antibiótico (PINTO *et. al.*, 2023).

5.6. Análise do perfil de liberação controlada de fármacos das membranas de PLDLA-co-TMC

Dando seguimento às avaliações das membranas no estudo *in vitro*, foi analisado o perfil de liberação de fármacos das membranas de PLDLA-co-TMC, sendo avaliada a concentração dos fármacos lixiviados no meio de liberação. Os ensaios foram realizados em triplicata e foram analisadas três amostras de membranas eletrofiadas: membrana PLDLA-co-TMC com vancomicina, membrana PLDLA-co-TMC com sinvastatina, membrana PLDLA-co-TMC com e sinvastatina.

Para determinar as concentrações de fármacos no meio de liberação, foram utilizadas as curvas de calibração da vancomicina (VAN) e sinvastatina (SIN). Na Figura 11, é apresentada a curva de calibração obtida com concentrações de VAN de 112,5; 75; 56; 37; 19 e 4,75 µg/ml em relação às absorvâncias obtidas. A equação de linearidade desta curva é expressa por $y = 0,0232x + 0,0864$ com um coeficiente de linearidade $R = 0,9952$. Na Figura 12, é apresentada a curva de calibração obtida com concentrações de SIN de 30; 25; 20; 15; 10 e 5 µg/ml, também, em relação às absorvâncias. A equação de linearidade desta curva é representada pela equação $y = 0,0443x + 0,0164$ com um coeficiente de linearidade $R = 0,9991$.

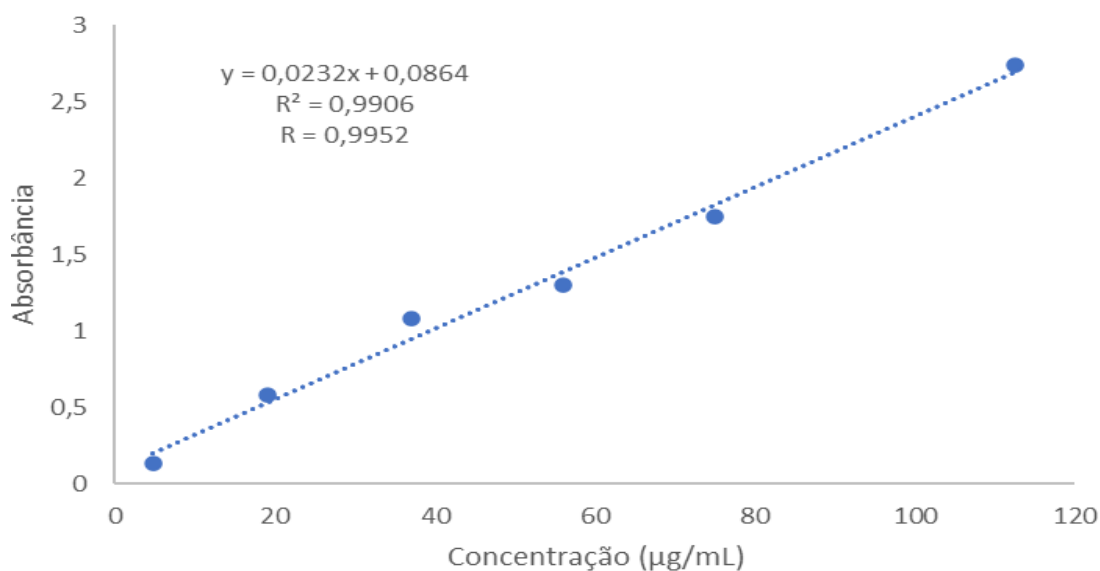


Figura 11. Curva de calibração da vancomicina: absorvâncias X concentrações (112,5; 75; 56; 37; 19 e 4,75 µg/ml).

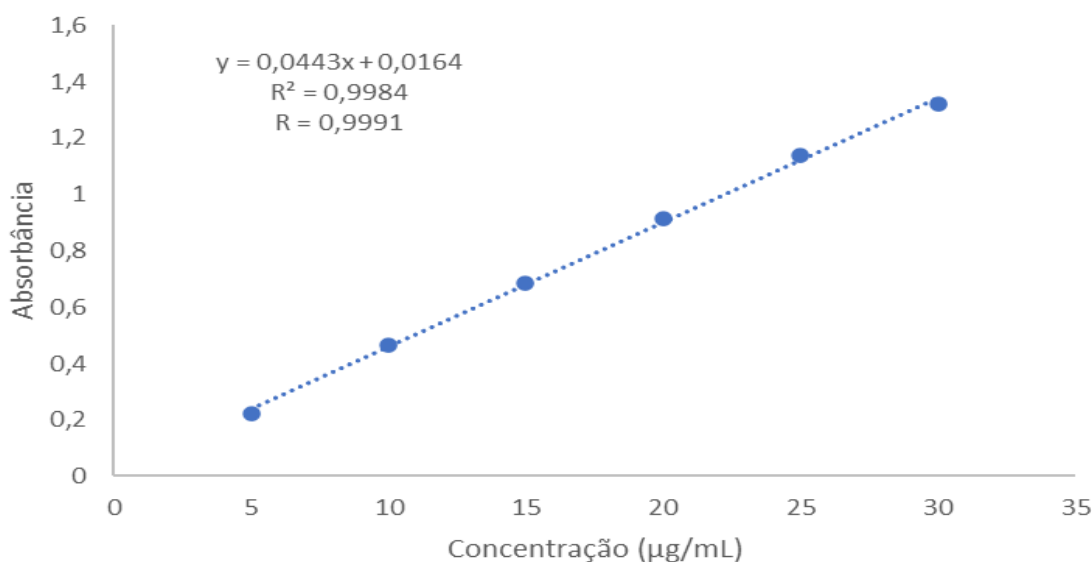


Figura 12. Curva de calibração da sinvastatina: absorbâncias X concentrações (30; 25; 20; 15; 10 e 5 µg/mL).

Com base na absorbância medida para cada alíquota, foram determinadas as concentrações de VAN e SIN liberadas em cada tempo para as três amostras, como mostrado na Figura 13.

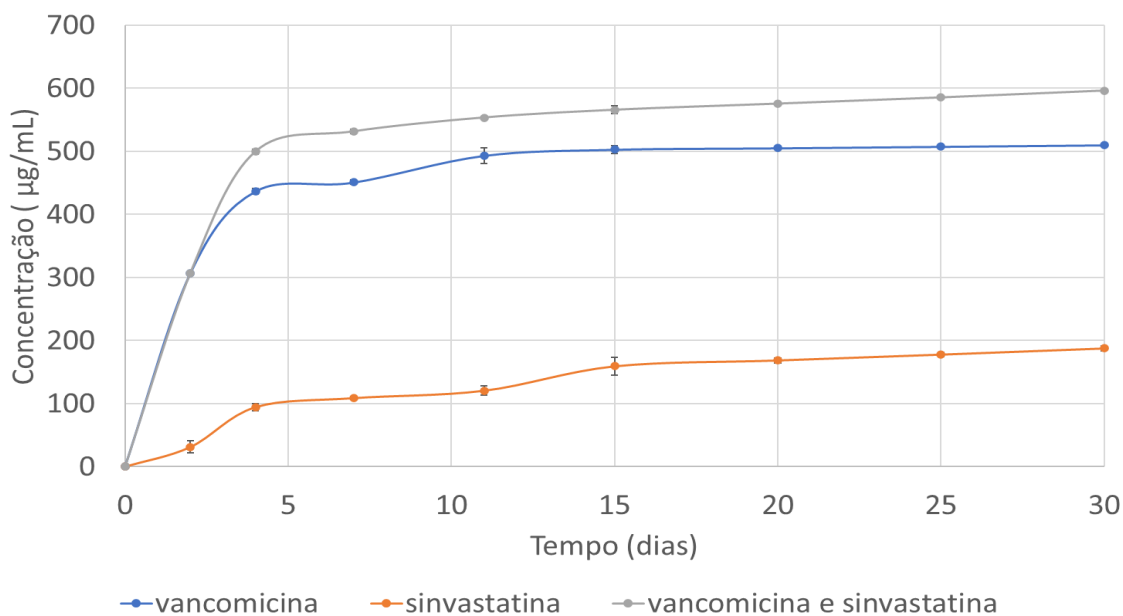


Figura 13. Gráfico obtido do ensaio de liberação controlada de fármaco das membranas PLDLA-co-TMC com vancomicina (azul), membrana de PLDLA-co-TMC com sinvastatina (laranja) e membrana de PLDLA-co-TMC com vancomicina e sinvastatina (verde) em relação ao tempo.

Diante desses resultados, foram utilizados diferentes modelos matemáticos, como, por exemplo, ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin, para analisar

a liberação dos fármacos pelas membranas eletrofiadas de PLDLA-co-TMC com vancomicina, como mostrado na Figura 14, e membranas eletrofiadas de PLDLA-co-TMC com sinvastatina, como mostrado na Figura 15. Ao examinar os resultados, o modelo Peppas-Sahlin apresentou maior destaque por ser mais eficaz em descrever esse processo, com base no coeficiente de determinação (R^2).

O modelo Peppas-Sahlin considera que a liberação de fármacos de dispositivos poliméricos segue uma dinâmica exponencial que considera tanto os processos de difusão e relaxamento da cadeia polimérica quanto do mecanismo de liberação. O modelo matemático propõe uma metodologia para analisar de forma abrangente o comportamento de liberação em sistemas de liberação controlada, utilizando um modelo que integra os processos de difusão e relaxamento (PEPPAS-SAHLIN, 1989).

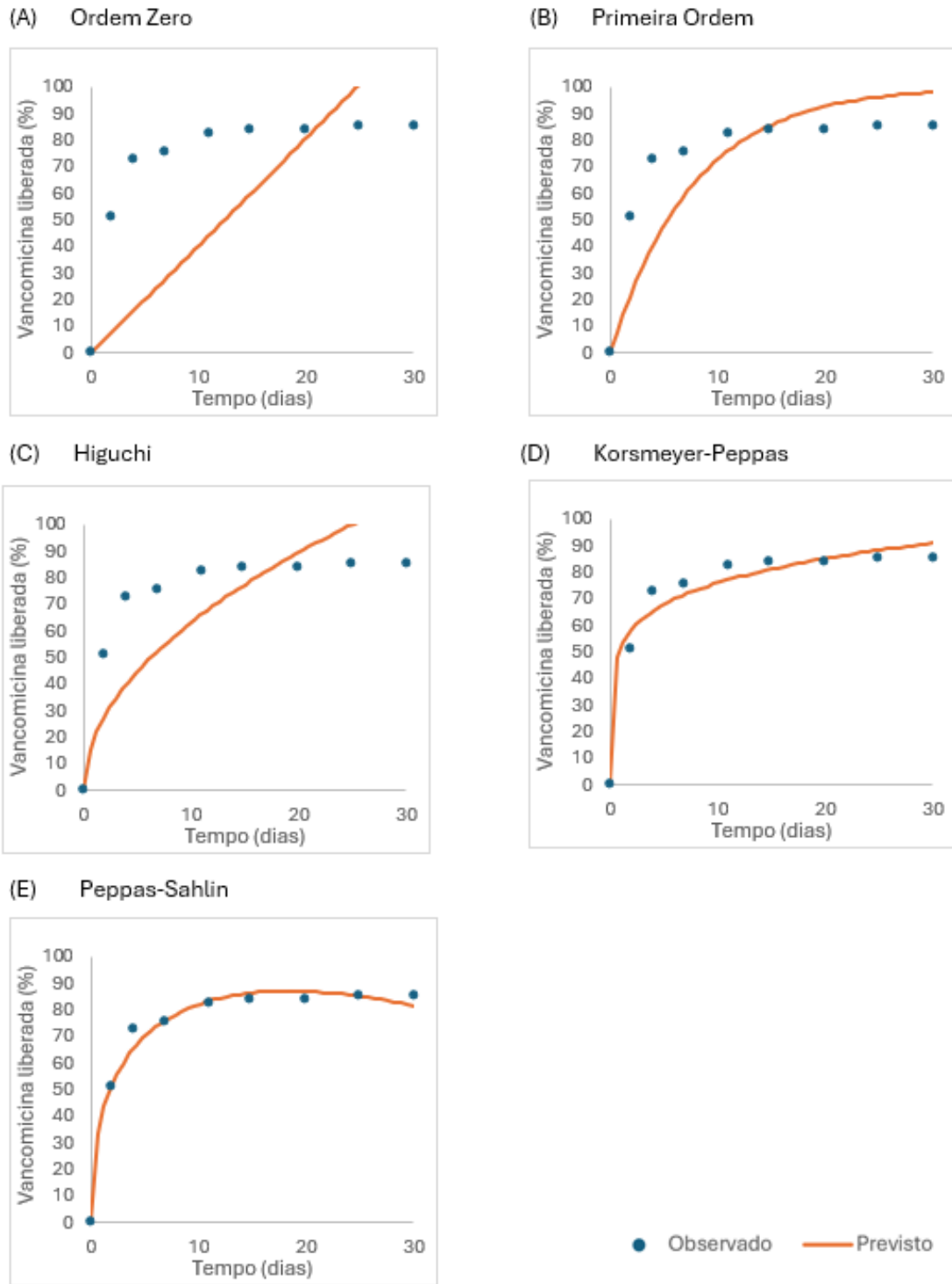


Figura 14. Gráficos obtidos com a aplicação dos modelos matemáticos de cinética de liberação da membrana de PLDLA-co-TMC com vancomicina.

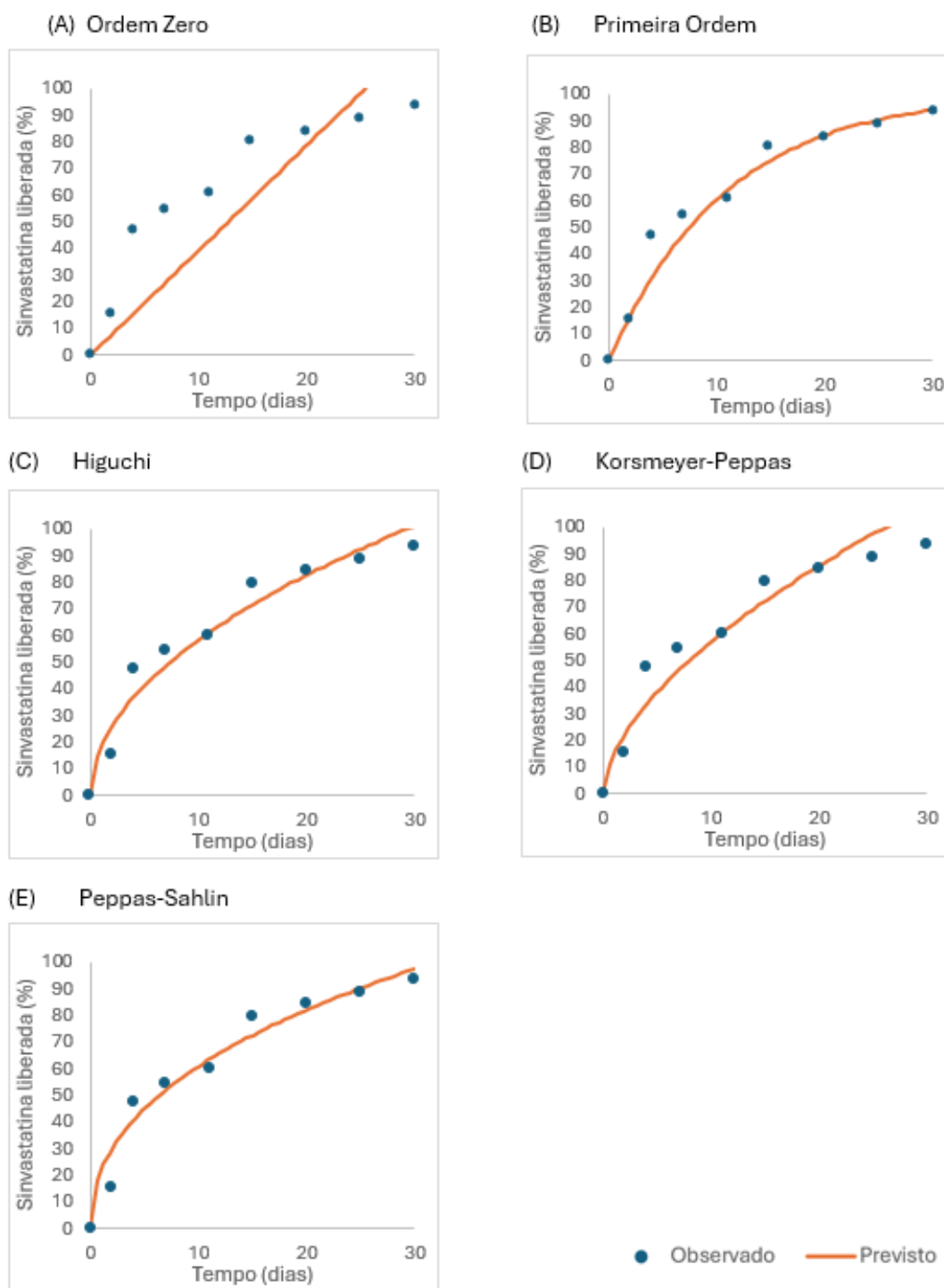


Figura 15. Gráficos obtidos com a aplicação dos modelos matemáticos de cinética de liberação da membrana de PLDLA-co-TMC com simvastatina.

Com base nos resultados experimentais e nos coeficientes de determinação (R^2), mostrados na Tabela 4, ambas as membranas eletrofiada de PLDLA-co-TMC contendo vancomicina ou sinvastatina demonstra um melhor ajuste ao modelo de Peppas-Sahlin.

Tabela 4. Valores dos coeficientes de correlação (R^2) para os modelos matemáticos de cinética de liberação da membrana de PLDLA-co-TMC com vancomicina e sinvastatina.

Modelo Cinético	Ordem Zero	Primeira Ordem	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin
Coefficiente de Determinação (R^2) da liberação de vancomicina	-0,726	0,605	0,481	0,967	0,987
Coefficiente de Determinação (R^2) da liberação de sinvastatina	0,631	0,960	0,955	0,927	0,961

Ao analisar os parâmetros k_1 e k_2 , em que k_1 representa o coeficiente de contribuição de Fick e k_2 o coeficiente de contribuição de relaxamento, quando o valor de k_1 é maior que o valor de k_2 , isso sugere que a contribuição da difusão é dominante no processo de liberação do fármaco. Para a VAN, os valores dos parâmetros são $k_1=47,021$ e $k_2=-6,351$, enquanto, para a SIN, temos $k_1=22,450$ e $k_2=-0,299$. Esses resultados indicam que, tanto para a vancomicina quanto para a sinvastatina, a difusão desempenha um papel significativo no processo de liberação, com uma influência menos marcante do efeito de relaxamento.

A ciência e tecnologia empregadas no avanço relacionado à liberação de fármacos ou outras substâncias bioativas a partir de sistemas, incluindo os lipossomas, as bombas osmóticas, os revestimentos entéricos, os sistemas transdérmicos, os pró-fármacos, os sistemas matriciais poliméricos, entre outros, sofreram um incremento notório na tentativa de melhorar as vantagens inerentes às formas farmacêuticas de liberação controlada (DAS; DAS, 2004).

A utilização de sistemas matriciais poliméricos, eles são uma opção interessante, sendo uma das estratégias mais empregadas quando do desenvolvimento de um sistema de liberação modificado devido às vantagens inerentes a ele: baixo custo de produção, fabricação que recorre a equipamentos e técnicas convencionais, versatilidade e eficácia. Além disso, pode-se acrescentar que a utilização desses sistemas permite a incorporação de quantidades relativamente elevadas de fármacos (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Em particular, o polímero PLDLA-co-TMC é classificada como polímero hidrofóbico, sendo assim, matrizes produzidas com esse polímero realizam a liberação de substância ativa essencialmente por mecanismos de difusão através dos poros ou por erosão, prevalecendo um ou outro mecanismo de acordo com as propriedades do excipiente e do fármaco incorporado (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Dito isso, notou-se que as membranas de PLDLA-co-TMC apresentaram um padrão de liberação de fármaco que, de acordo com a Figura 14, iniciou uma liberação rapidamente crescente nos primeiros 5 dias, seguido do aparecimento de um platô até, aproximadamente, o sétimo dia, voltando a crescer de forma gradual e sustentada até completar o trigésimo dia e, por fim, voltando a tornar-se um platô, sendo que a concentração, ao final de 30 dias, da vancomicina foi de 510,01 µg/ml, da sinvastatina foi de 187,63 µg/ml e de ambos os fármacos de 595,10 µg/ml, demonstrando que as membranas, por serem hidrofóbicas, realizaram a liberação dos fármacos por difusão através, principalmente, da erosão do material, por isso, a liberação apresentou o padrão do tipo crescimento intercalado com platô, pois os períodos de crescimento representam a degradação do material e aumento da liberação do fármaco e os períodos de platô representam a inércia do material e a constância da liberação do fármaco. Já, avaliando o padrão de liberação de medicamentos das membranas, elas liberam de forma gradual e sustentada, características importantes para uma matriz usada em tratamento de doenças que tendem a ter duração de semanas a meses como, por exemplo, a osteomielite.

5.7. Estudo *in vivo*

5.7.1. Dosagem de IL-6 nos ratos e análise estatística

A dosagem de interleucina-6 (IL-6) foi realizada nos cinco grupos previstos neste projeto: controle negativo (CTRL-, somente infecção), controle positivo (infecção com membrana eletrofiada de PLDLA-co-TMC) e os grupos das membranas eletrofiadas com fármacos (infecção com membrana eletrofiada de PLDLA-co-TMC com vancomicina (VAN), com sinvastatina (SIN) e com ambos os fármacos (VAN/SIN), no sétimo dia após indução da osteomielite e no décimo quarto dia após implantação do biomaterial (Figura 16).

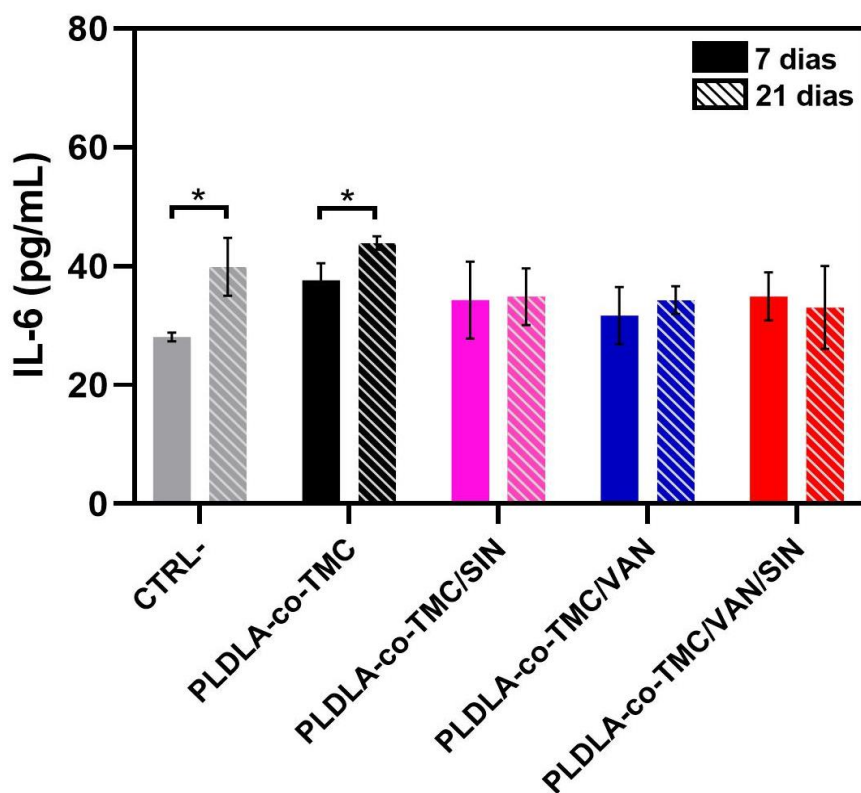


Figura 16. Gráfico obtido da análise da dosagem de IL-6 com 7 e 21 dias dos grupos controle (somente infecção), PLDLA-co-TMC, PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN, sendo que (*) representa $p < 0,05$.

No gráfico obtido da análise da dosagem de IL-6, foi observado que todos os grupos estudados apresentaram níveis de IL-6 elevados, acima de 20 pg/ml, com sete dias após indução de osteomielite e quatorze dias após implantação do biomaterial (correspondente a vinte e um dias após indução da osteomielite), considerando que o valor de referência do nível de IL-6 está abaixo de 20 pg/ml (GAO *et al.*, 2021). Avaliando-se os dados do gráfico detalhadamente, foi observado que, apenas nos grupos controle negativo e controle positivo, houve aumento dos níveis de IL-6 entre as dosagens realizadas com sete dias após indução de infecção e quatorze dias após implantação da membrana com significância estatística ($p < 0,05$) e o restante dos grupos mantiveram estáveis os níveis de IL-6, comparando-se os dois intervalos de tempo, demonstrando que as membranas de PLDLA-co-TMC com a presença de fármacos VAN e SIN conseguiram controlar o processo inflamatório decorrente da infecção óssea induzida nos animais do projeto.

Isso pode ser explicado, pois a condição de osteomielite está associada ao aumento dos níveis das proteínas pró-inflamatórias: proteína C reativa (PCR), interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6

(MICHAIL *et al.*, 2013, GAO *et al.*, 2023), portanto, todos os ratos que passaram pelo processo de indução da osteomielite estavam com níveis de IL-6 elevados, sendo que os grupos controles negativo e positivo não conseguiram controlar a inflamação, porque a dosagem de IL-6 com quatorze dias após iniciar tratamento, em comparação com sete dias após indução da doença, aumentou significativamente ($p < 0,05$), mostrando que esses grupos não estavam inibindo o crescimento bacteriano e, conseqüentemente, a concentração plasmática de IL-6 foi maior no decorrer do tempo. Já os grupos das membranas com fármacos, conseguiram controlar o processo inflamatório, porque a dosagem de IL-6, comparando-se os dois intervalos de tempo da análise, não apresentou aumento estatisticamente significativo, mostrando que esses grupos estavam inibindo o crescimento bacteriano ou imunomodulando a resposta inflamatória dos ratos e, conseqüentemente, a concentração plasmática de IL-6 manteve-se, praticamente, inalterada no decorrer do tempo. Isso se deve ao fato de que a vancomicina se liga à porção terminal D-alanyl-D-alanine do precursor peptídico dos peptidoglicanos, composto essencial para síntese de parede bacteriana. Essa ligação fármaco-peptídeo resulta em uma mudança conformacional que impede a incorporação do precursor nas cadeias de peptidoglicanos, subsequente transpeptidação, resultando em esmontagem da parede celular e, por fim, lise bacteriana das bactérias gram-positivas, como *S. aureus* (CUNHA; BAIENSE, 2023). Já a sinvastatina apresenta efeito anti-inflamatório. VALADARES (2022) demonstrou, por estudo *in vitro*, a modulação pelas estatinas (sinvastatina e atorvastatina) sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas, IL-6, em que a sinvastatina e a atorvastatina promoveram a redução dos níveis de todas as citocinas avaliadas com significância estatística, com a ressalva que a IL-6 só teve seus níveis reduzidos apenas com a sinvastatina. Esses achados descritos por VALADARES (2022) sugerem um efeito imunomodulador dos inibidores da HMG-CoA redutase (GONÇALVES, 2017).

Por fim, conclui-se que as membranas eletrofiadas com medicamentos se mostraram boas carreadoras de fármacos, pois nota-se a presença e ação da VAN e SIN, na análise da dosagem de IL-6, nos animais que foram submetidos ao tratamento com a membrana contendo fármacos, na tentativa de combater a infecção, pela VAN, e imunomodular a resposta inflamatória dos ratos durante o percurso da doença, pela SIN.

5.7.2. Avaliação dos aspectos macroscópicos e microscópicos do material

A avaliação macroscópica e microscópica das amostras de metáfises proximais da tíbia dos ratos foi realizada de forma comparativa a uma tíbia não infectada, conforme representada em detalhes em diversos aumentos para ressaltar as estruturas histológicas, Figura 17. Os cinco grupos estipulados no trabalho: controle negativo (lesão com infecção), controle positivo (lesão com infecção e membrana eletrofiada de PLDLA-co-TMC), PLDLA-co-TMC/VAN, PLDLA-co-TMC/SIN e PLDLA-co-TMC/VAN/SIN estão descritos na Figura 18.

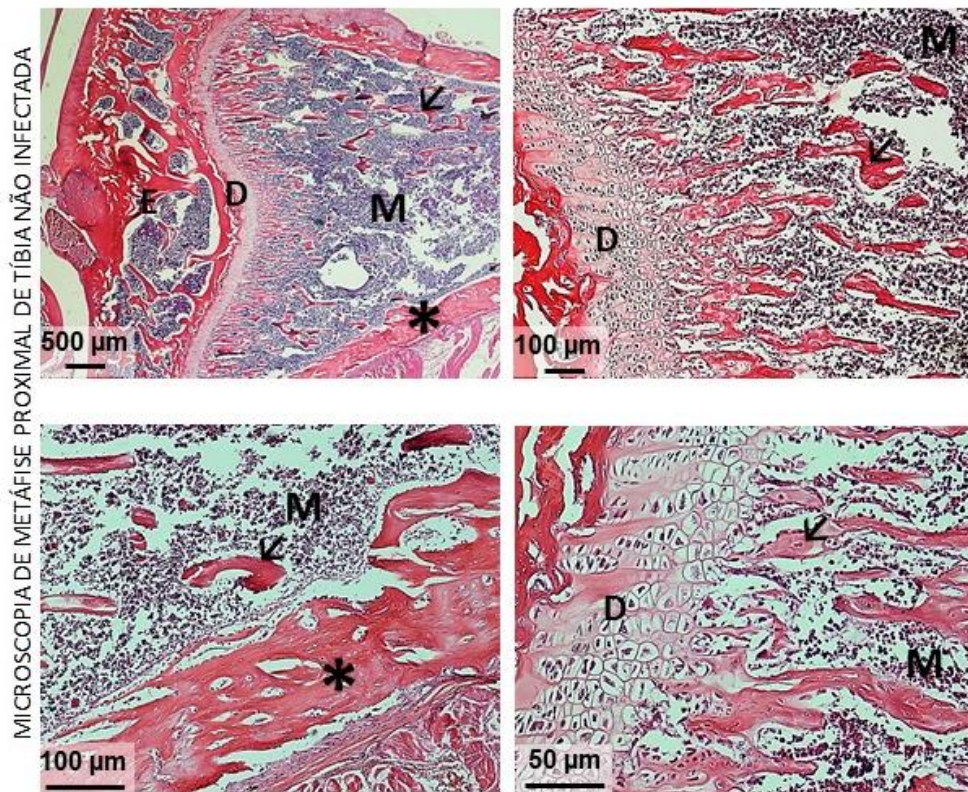


Figura 17. Micrografia de metáfise proximal de tíbia não infectada nos aumentos de 2x, 10x, 20x e 40x. Sendo que (*) representa osso cortical, (→) osso medular, (M) medula óssea, (D) disco epifisário e (E) epífise proximal tibial.

A porção proximal da tíbia em sua apresentação não infectada evidencia as estruturas típicas histológicas desta região. A estrutura do osso cortical é contínua e rica em sistemas vasculares (canais de Havers e Volkmann), o qual se inserem trabéculas ósseas em direção a medula óssea. Nesta região, se identifica hiperplasticidade de células hematopoiéticas e numerosos sinusóides venosos, além de raros adipócitos. Já o disco epifisário se encontra delimitando área de

transição entre metáfise e epífise e é formado por tecido cartilaginoso com condrócitos dispostos de forma linear em processo de calcificação que geram trabéculas ósseas (GENESER, 2003).

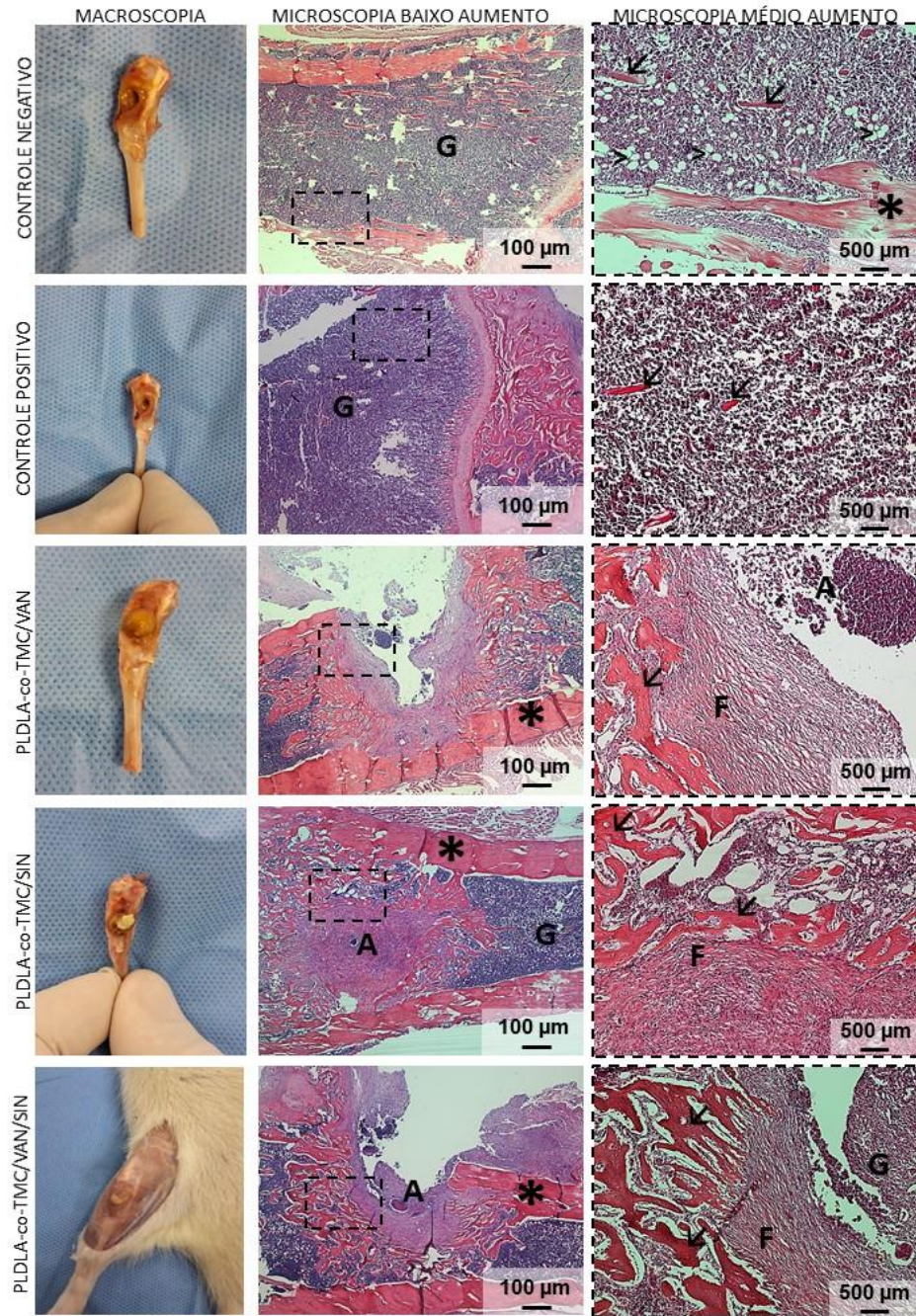


Figura 18. Imagens de macroscopia e microscopia das amostras das metáfises proximal de tíbia dos ratos que melhor identificam cada grupo analisado. Sendo que (*) representa osso cortical, (→) osso medular, (G) tecido de granulação, (F) cápsula fibrosa de abscesso, (A) abscesso e (>) tecido adiposo.

Ao avaliar cada grupo do trabalho, foi identificado que o controle negativo, macroscopicamente, apresenta lesão óssea persistente, sem indícios de regeneração e com extravasamento de exsudato para os tecidos adjacentes ao osso. Na microscopia, observa-se perda da organização cortical compacta do osso com extravasamento da medula e extenso infiltrado inflamatório, além de aumento da quantidade de células adiposas e redução da quantidade de trabéculas no osso medular. O controle positivo se apresentou em igual proporção comparativamente em relação ao controle negativo.

No grupo que recebeu tratamento com membrana de PLDLA-co-TMC/VAN, a macroscopia revelou um tampão formado por abscesso que ocluiu o defeito ósseo realizado, enquanto, a microscopia identificou a porção do defeito, contendo volumoso tecido inflamatório, contornado por delicada cápsula fibrosa, sendo esta rodeada por trabéculas ósseas primárias, ricas em osteoblastos em suas superfícies. A descontinuidade do osso cortical foi evidente apenas na região do defeito, sendo preservada na região oposta ao defeito. Já no grupo que recebeu tratamento com membrana de PLDLA-co-TMC/SIN, foi observado estruturas semelhantes ao grupo anteriormente descrito, no entanto, com expressiva neoformação óssea e aumento da vascularidade medular, contornando toda a área do abscesso. Por fim, no grupo que recebeu tratamento com membrana de PLDLA-co-TMC/VAN/SIN, foi evidenciado, além das mesmas estruturas descritas nos grupos anteriores, maior incremento de massa óssea primária e vascularização.

Todos os grupos que receberam tratamento com membrana contendo os fármacos vancomicina (VAN) e/ou sinvastatina (SIN) apresentaram resultados semelhantes, no entanto, com diferenças singulares em relação à formação de massa óssea. É fato que o tratamento não reverteu completamente a osteomielite, haja vista, não houve uma terapia coadjuvante sistêmica para incrementar a eficácia do tratamento, conforme preconizado na prática clínica (MUNER; BROLEZZE DE MORAES; DAMASCENO DE OLIVEIRA, 2022). No entanto, não era objetivo deste projeto potencializar a terapêutica com tratamento sistêmico, pois poderia mascarar os resultados do efeito direto das membranas no tratamento *in situ*. Sendo assim, os resultados identificaram o real efeito de cada grupo no processo de osteomielite experimental infectada com *S. aureus*, portanto, é importante ressaltar que em trabalhos clínicos que visem realizar uma terapêutica eficaz contra a osteomielite, em razão da grande invasividade infecciosa, fatores de virulência, e condição imunológica do paciente, não deve ser recomendado um tratamento exclusivamente tópico, sendo este, um tratamento coadjuvante para incrementar o tratamento sistêmico. PARK *et*

al. (2016) mostrou, em um estudo com 314 pacientes com osteomielite microbiana, que 31 pacientes (9,9%) apresentaram recidiva após completar pelo menos 4 semanas de terapia antibiótica sistêmica. O tempo médio para recidiva após o tratamento foi de 41 dias (com variação alta entre 10 a 866 dias). Ainda neste estudo, 24 pacientes (77,4%) tiveram recidiva microbiológica e 7 (22,6%) tiveram recidiva clínica. Segundo VULIN *et al.* (2018), a recorrência da osteomielite representa uma questão clínica de alta significância por ser uma condição multifatorial somatizada de condições como resistência a antibióticos e a extensão da infecção. Em 2019, o mesmo grupo de pesquisadores (VULIN *et al.*) mostrou danos severos ao tecido ósseo infectado, como a desmineralização, o qual ocorreu devido aos subprodutos ácidos de *S. aureus*.

Neste trabalho, a característica de perda das trabéculas ósseas, é bem evidente nos achados histológicos de ambos os controles, os quais evidenciam a diminuição da quantidade de trabéculas ósseas além do acometimento da cortical óssea, conforme relatado por VULIN *et al* (2019). Ademais, observou-se que quando contendo VAN, SIN ou VAN/SIN ocorreu uma relativa neoformação óssea adjacente ao núcleo do ponto da infecção, mostrando que, embora *S. aureus* não tenha sido erradicada do sítio infeccioso, ocorreu um estímulo de neoformação óssea minimizando o processo de desmineralização. No tratamento com a membrana com VAN, a infecção se manteve no mesmo compasso que o tratamento com SIN, embora ambos tenham incremento da neoformação óssea. É provável que tal aumento tenha ocorrido pela contenção do processo infeccioso pela VAN, o qual favoreceu a neoformação óssea local, no entanto, como a sinvastatina já é descrita por realizar o aumento da atividade osteoblástica, o aumento da osteogênese no tratamento com a SIN gerou o incremento ósseo esperado.

O maior diferencial, neste trabalho, é identificar, no grupo da membrana contendo VAN/SIN, um aumento muito maior da neoformação óssea adjacente ao núcleo da infecção. No entanto, tal aumento, provavelmente, se deve ao efeito aditivo de ambos os fármacos liberados neste sistema *in situ* de tratamento.

6. CONCLUSÃO

Este projeto concluiu que as membranas eletrofiadas de poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato) (PLDLA-co-TMC) mostrou-se ser biocompatível, moldável, biorreabsorvível e uma excelente carreadora de fármacos, devido à disposição das fibras do material que formam muitos espaços vazios. Quando elas estão associadas aos medicamentos vancomicina e sinvastatina, há apenas interação física entre a membrana e os fármacos, o que facilita a liberação controlada dos mesmos de forma eficiente e duradoura. Além do exposto, a vancomicina mostrou-se um bom antibiótico para tratamento de osteomielite por *S. aureus* e a sinvastatina mostrou-se um bom imunomodulador e fármaco indutor da osteogênese, o que melhora a eficácia das membranas eletrofiadas de PLDLA-co-TMC no tratamento da osteomielite.

7. REFERÊNCIAS

- AHMED, E. T. M. et al. Controlling the evolution of selective vancomycin resistance through successful ophthalmic eye-drop preparation of vancomycin-loaded nanoliposomes using the active-loading method. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 6, p. 1636, 2023.
- AMERSTORFER, F. et al. Superficial vancomycin coating of bone cement in orthopedic revision surgery: a safe technique to enhance local antibiotic concentrations. *The Journal of Arthroplasty*, v. 32, n. 5, p. 1618–1624, 2017.
- ASAMI, J. et al. Poly(L-co-D,L lactic acid-co-Trimethylene Carbonate) 3D printed scaffold cultivated with mesenchymal stem cells directed to bone reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 36, n. 9, p. 1550-1566, 2022. doi: 10.1177/08853282211066246. Epub 2022 fev 7. PMID: 35130780.
- BRINKMAN, C. L. et al. A novel rat model of foreign body osteomyelitis for evaluation of antimicrobial efficacy. *Journal of Experimental and Applied Animal Sciences*, v. 3, n. 1, p. 7, 2019.
- BRUNTON, L. L.; ed. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012. 2084 p.
- BUCHHOLZ, H. W.; ENGELBRECHT, H. Uber die Depotwirkung einiger Antibiotika bei Vermischung unter den Kunstharz Palacos. *Chirurg*, v. 41, p. 511-515, 1970.
- BURY, D. C.; ROGERS, T. S.; DICKMAN, M. M. Osteomyelitis: diagnosis and treatment. *American Family Physician*, v. 104, n. 4, p. 395–402, 2021.
- CABRERA, A. R. E.; DUEK, E. A. R. Processamento, caracterização e desempenho in vivo de arcabouço biorreabsorvível de PLDLA-co-TMC. Repositório - UNICAMP. Acesso em: 24 set. 2022. Disponível em: http://lreferencia.info/vufind/Record/BR_b9d73e5a96125038f036faede5709fa3.
- CHAMANI, S. et al. The role of statins in the differentiation and function of bone cells. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 51, n. 7, 2021.
- CHEN, S.; JOHN, J. V.; MC CARTHY, A.; XIE, J. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 8, p. 3733, 2020.
- CIAMBELLI, G. S. et al. Characterization of Poly (L-co-D,L Lactic Acid) and a Study of Polymer-tissue Interaction in Subcutaneous Implants in Wistar Rats. 2013.
- CONTERNO, L. O.; TURCHI, M. D. Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2013, n. 9, 2013.

CUNHA, H. P.; BAIENSE, A. S. R. Uso de vancomicina no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, v. 9, n. 4, p. 9242–9258, 2023.

DAS, N. G.; DAS, S. K. Controlled-release of oral dosage forms. *Formulation, Fill & Finish – a Technology Primer 2003 – a supplement to Pharm. Tec*, v. 27, p. 10-16, 2003.

DELAN, W. K. et al. Investigating the bone regeneration activity of PVA nanofibers scaffolds loaded with simvastatin/chitosan nanoparticles in an induced bone defect rabbit model. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 222, p. 2399-2413, 2022.

DUEK, E. A. R. et al. Curativo a base de poli(l-co-d,l-ácido láctico-co-tmc) (pldla-tmc) (70/30) com aroeira aplicado ao tratamento de queimaduras. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v. 19., 2018.

ERSHLER, W. B. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. *J Am Geriatr Soc.*, v. 41, p. 176-181, 1993.

ELSADEK, N. E. et al. Electrospun nanofibers revisited: an update on the emerging applications in nanomedicine. *Materials*, v. 15, n. 5, 2022.

FATHI, H. A. et al. Electrospun vancomycin-loaded nanofibers for management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced skin infections. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 586, 119620, 2020.

FRAIMOW, H. S. Systemic antimicrobial therapy in osteomyelitis. *Seminars in Plastic Surgery*, v. 23, n. 2, p. 90, 2009.

FUKUSHIMA, N. et al. Establishment of rat model of acute staphylococcal osteomyelitis: relationship between inoculation dose and development of osteomyelitis. *Arch Orthop Trauma Surg.*, v. 125, p. 169–176, 2005.

GAO, L. et al. Combination of kaempferol and azithromycin attenuates *Staphylococcus aureus*-induced osteomyelitis via anti-biofilm effects and by inhibiting the phosphorylation of ERK1/2 and SAPK. *Pathogens and Disease*, v. 79, p. ftab048, 2021.

GAO, L. et al. Myricetin exerts anti-biofilm activity and attenuates osteomyelitis by inhibiting the TLR2/MAPK pathway in experimental mice. *Microbial Pathogenesis*, v. 182, p. 106165, 2023.

GEEVARGHESE, R. et al. Biodegradable and non-biodegradable biomaterials and their effect on cell differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 24, 2022.

GENESER, F. Tecido esquelético. In: GENESER, F. *Histologia*. 3. ed. São Paulo: Editora Médica Panamericana, p. 212-231, 2003.

GHAFFAR, I. et al. Synthesis of chitosan coated metal organic frameworks (MOFs) for increasing vancomycin bactericidal potentials against resistant *S. aureus* strain. *Materials Science and Engineering: C*, v. 105, p. 110-111, 2019.

GOGOLEWSKI, S. Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery. *Injury*, v. 31, Supl. 4, 2000.

GONÇALVES, R. S. G. Avaliação da atividade imunomoduladora de estatinas em pacientes portadores de esclerose sistêmica. Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

GOODMAN, L. S. et al. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 14. ed. New York: McGraw-Hill, 2022.

GOPAL, R.; KAUR, S.; MA, Z. W.; CHAN, C.; RAMAKRISHNA, S.; MATSUURA, T. Electrospun nanofibrous filtration membrane. *Journal of Membrane Science*, v. 281, n. 1-2, p. 581-586, 2006.

GU, F. et al. Preparation and characterization of simvastatin/DM β CD complex and its pharmacokinetics in rats. *Acta Pharmaceutica*, v. 68, n. 2, p. 145-157, 2018.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Processos de separação com membranas, Rio de Janeiro: COPPE / UFRJ, 1997.

HEITZMANN, L. G. et al. Osteomielite crônica pós-operatória nos ossos longos – o que sabemos e como conduzir esse problema. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 54, n. 6, p. 627-635, 2019.

JEUN, J. P. et al. Electrospinning of Poly(L-lactide-co-D, L-lactide). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 13, n. 4, p. 592-596, 2007.

JIN, H. et al. Simvastatin-Incorporated Drug Delivery Systems for Bone Regeneration. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 7, n. 6, p. 2177–2191, 2021.

JORGE, L. S.; CHUEIRE, A. G.; ROSSIT, A. R. B. Osteomyelitis: a current challenge. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 14, n. 3, p. 310–315, 2010.

JUNIOR, A. R. S.; WADA, M. L. F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. *Polímeros*, v. 17, p. 308-317, 2007.

JUNIOR, J. A. R.; PINHEIRO, A. L. B.; ALMEIDA, P. F. Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) associada ou não a fototerapia LASER em osteomielite induzida por *Staphylococcus aureus*: estudo microbiológico e histológico. 2019. Tese (Doutorado em Odontologia) — Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

KAI, D.; LIOW, S. S.; LOH, X. J. Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, v. 45, p. 659–670, 2014.

KOMATSU, D. et al. Development of a membrane of poly (L-co-D, L lactic acid-co-trimethylene carbonate) with aloe vera: an alternative biomaterial designed to improve skin healing. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 32, n. 3, p. 311-320, 2017.

KESHVARDOOSTCHOKAMI, M. et al. Electrospun nanofibers of natural and synthetic polymers as artificial extracellular matrix for tissue engineering. *Nanomaterials*, v. 11, n. 1, p. 1–23, 2021.

Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. Manual para antibiograma: difusão em disco (Kirby e Bauer). Site do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, 2011.

LAWRENCE, N. D.; HICKEY, M. W.; IYER, M. Storage of ultrafiltration membranes: effect of various chemicals on performance. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 52, p. 63-64, 1997.

LEAL, C. V. et al. Characterization and in vitro evaluation of electrospun aligned-fiber membranes of poly (L-co-D, L-lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, v. 136, n. 24, p. 47657, 2019.

LIMA, A. L. L. M.; ZUMIOTTI, A. V. Aspectos atuais do diagnóstico e tratamento das osteomielites. *Acta Ortop Bras.*, v. 7, n. 3, p. 135–142, 1999.

LIU, Z.; RAMAKRISHNA, S.; LIU, X. Electrospinning and emerging healthcare and medicine possibilities. *APL Bioengineering*, v. 4, p. 030901, 2020.

LLEWELLYN, A. et al. Imaging tests for the detection of osteomyelitis: a systematic review. *Health Technology Assessment*, v. 23, n. 61, p. 1–128, out. 2019.

LOPES, C. M. et al. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas*, v. 41, n. 2, p. 167–175, jun. 2005. Portugal.

MAGI, M. S. et al. Novel Dry Powder of Hyaluronic Acid-Vancomycin Complex for Inhalation Useful on Pulmonary Infections Associated to Cystic Fibrosis. *Preprints.org*, 2024.

MAHMOOD, H. et al. Design of a multifunctional carrageenan-tannic acid wound dressing co-loaded with simvastatin and geranium oil. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 79, p. 104080, 2023.

MAKAROV, C. et al. Vancomycin release from bioresorbable calcium phosphate–polymer composites with high ceramic volume fractions. *Journal of Materials Science*, v. 45, p. 6320–6324, 2010.

MARTÍN, S. A. et al. Hosting of the antibiotic Vancomycin by bentonite: Characterization and slow release study. *Applied Clay Science*, v. 202, p. 105965, 2021.

MARTINDALE: *The Complete Drug Reference*. 32. ed. Clinical Pharmacokinetics, 1999.

MATTHEWS, J. A. et al. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, v. 3, n. 2, p. 232–238, 2002.

- MENDES JÚNIOR, D. et al. Study of mesenchymal stem cells cultured on a poly(lactic-co-glycolic acid) scaffold containing simvastatin for bone healing. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, v. 15, n. 2, p. e133–e141, 2017.
- MICHAIL, M. et al. The performance of serum inflammatory markers for the diagnosis and follow-up of patients with osteomyelitis. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, v. 12, n. 2, p. 94–99, 2013.
- MOTTA, A. C. et al. Estudo inicial da degradação "in vitro" de poli (L-co-DL ácido láctico) sintetizado em laboratório. *Matéria - Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia*, v. 13, 2008.
- MOTTA, A. C. et al. Synthesis and characterization of a novel terpolymer based on L-lactide, D,L-lactide and tri-methylene carbonate. *Materials Research*, v. 17, p. 619–626, 2014.
- MOUSTAFA, M. A. et al. Silica-Coated Magnetic Nanoparticles for Vancomycin Conjugation. *ACS Omega*, v. 7, n. 34, p. 30161–30170, 2022.
- MUNER, M. et al. Osteomielite: revisão de literatura. *Ensaíos USF*, v. 6, n. 1, p. 31–40, 2022.
- OLIVEIRA, A. C. S. et al. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis: a case report. *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)*, v. 52, n. 5, p. 625–627, 2017.
- PANTELI, M. et al. Chronic osteomyelitis: what the surgeon needs to know. *EFORT Open Reviews*, v. 1, n. 5, p. 128, 2016.
- PARHAM, S. et al. Antioxidant, antimicrobial and antiviral properties of herbal materials. *Antioxidants (Basel)*, v. 9, n. 12, p. 1309, dez. 2020.
- PARK, K. H. et al. Optimal Duration of Antibiotic Therapy in Patients With Hematogenous Vertebral Osteomyelitis at Low Risk and High Risk of Recurrence. *Clinical Infectious Diseases*, v. 62, n. 10, p. 1262–1269, 2016.
- PATEL, R. et al. An overview of bone cement: Perioperative considerations, complications, outcomes and future implications. *Journal of Perioperative Practice*, 2023.
- PATEL, S. et al. Vancomycin. *StatPearls*, 2023.
- PAULA, A. P. Aderência à terapêutica com antimicrobianos administrados por via oral em adultos com osteomielite. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- PEDRINI, F. M. et al. Poly(L-co-D,L-lactic acid-co-trimethylene carbonate) for extrusion-based 3D printing: comprehensive characterization and cytocompatibility assessment. *Polymer*, v. 290, p. 126585, 2024.

PÊGO, A. P. et al. In vivo behavior of poly(1,3-trimethylene carbonate) and copolymers of 1,3-trimethylene carbonate with D,L-lactide or epsilon-caprolactone: degradation and tissue response. *J Biomed Mater Res A*, v. 67, n. 3, p. 1044-1054, 2003.

PINTO, M. F. et al. Development of co-electrospun membrane composed of poly(L-co-D,L-lactic acid) and natural rubber with potential application in dermal dressing. *Journal of Applied Polymer Science*, e55573, 2024.

PINTO, M. F. et al. Electrospun membrane based on poly(L-co-D,L lactic acid) and natural rubber containing copaiba oil designed as a dressing with antimicrobial properties. *Antibiotics*, v. 12, p. 898, 2023.

QUEIROZ, R. M. et al. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis exhibiting predominance of periosteal reaction. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 63, n. 4, p. 303-306, 2017.

RASHIDI, H. et al. Simvastatin release from poly(lactide-co-glycolide) membrane scaffolds. *Polymers*, v. 2, p. 709-718, dez. 2010.

SANDERS, J.; MAUFFREY, C. Long bone osteomyelitis in adults: fundamental concepts and current techniques. *Orthopedics*, v. 36, n. 1, p. 368-375, 2013.

SAMBRI, A. et al. Bone and joint infections: the role of imaging in tailoring diagnosis to improve patients' care. *Journal of Personalized Medicine*, v. 11, n. 12, 2021.

SANTOS, J. C. et al. Osteomielite: análise epidemiológica da doença no Brasil entre 2009 a 2019. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v. 54, n. 3, e-174862, 2021.

SCHMITT, S. K. Osteomyelitis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 31, n. 2, p. 325–338, 2017.

SMITH, M. et al. Implantable drug delivery systems for the treatment of osteomyelitis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 48, n. 10, p. 511–527, 2022.

SUNER, S. C. et al. Antibiotic loaded electrospun poly (lactic acid) nanofiber mats for drug delivery system. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 71, p. 103263, 2022.

TAO, F. et al. Chitosan-based drug delivery systems: from synthesis strategy to osteomyelitis treatment – a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 251, p. 117063, 2021.

TARDÁGUILA-GARCÍA, A. et al. Medical versus surgical treatment for the management of diabetic foot osteomyelitis: a systematic review. *Journal of Clinical Medicine*, v. 10, n. 6, p. 1–10, 2021.

TOKER, H. et al. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Archives of Oral Biology*, v. 57, n. 11, p. 1545-1550, 2012.

TRAMPUZ, A.; ZIMMERLI, W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury*, v. 37, Suppl 2, p. S59–66, 2006.

VALADARES, L. D. A. Avaliação da eficácia da sinvastatina na modulação de resposta inflamatória na esclerose sistêmica: um ensaio clínico randomizado. 2022. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

VULIN, M. et al. Evolving concepts in bone infection: redefining “biofilm”, “acute vs. chronic osteomyelitis”, “the immune proteome” and “local antibiotic therapy”. *Bone Research*, v. 7, p. 20, 2019.

VULIN, C. et al. Prolonged bacterial lag time results in small colony variants that represent a sub-population of persisters. *Nature Communications*, v. 9, p. 4074, 2018.

XIE, J. et al. Effects of PMMA spacer loaded with varying vancomycin concentrations on bone regeneration in the Masquelet technique. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2022.

WENG, C. J. et al. Simvastatin-loaded nanofibrous membrane efficiency on the repair of Achilles tendons. *International Journal of Nanomedicine*, v. 17, p. 1171-1184, 2022.

WOO, J. et al. Compactin suppresses bone resorption by inhibiting the fusion of pre-fusion osteoclasts and disrupting the actin ring in osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 15, n. 4, p. 650-662, 2000.

WU, S. et al. Therapeutic strategies targeting biofilm and bone infections: a mini review. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022.

YOON, E. et al. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Engineering*, v. 13, n. 3, p. 619-627, 2007.

ZAFAR, N. et al. Simvastatin loaded dissolvable microneedle patches with improved pharmacokinetic performance. *Micromachines*, v. 13, n. 8, p. 1304, 2022.

ZHONG, C. et al. Advances in the antimicrobial treatment of osteomyelitis. *Composites Part B: Engineering*, v. 249, p. 110428, 2023.

ZHOU, J. et al. Silk coating on poly (ϵ -caprolactone) microspheres for the delayed release of vancomycin. *Journal of Microencapsulation*, v. 28, n. 2, p. 99-107, 2011.

ZUCAIF et al. Simvastatin loaded dissolvable microneedle patches with improved pharmacokinetic performance. *Micromachines (Basel)*, v. 13, n. 8, p. 1304, 2022.