

**RODRIGO RAMALHO SEVERO**

**Liberação controlada de antibióticos para vaca pós-parto**

Departamento de Engenharia  
Metalúrgica e de Materiais  
Escola Politécnica da USP

**São Paulo**

**2018**

RODRIGO RAMALHO SEVERO

Liberação controlada de antibióticos para vaca pós-parto

Trabalho de Formatura apresentado à Escola  
Politécnica da Universidade de São Paulo para  
obtenção do diploma em Engenharia de Materiais

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elizabeth Grillo Fernandes

São Paulo  
2018

Departamento de Engenharia  
Metalúrgica e de Materiais da  
Escola Politécnica da USP

2895821  
TF 2018 Se 83rd  
H 2018 J

**DEDALUS - Acervo - EPMT**



31800009335

**Catálogo-na-publicação**

Severo, Rodrigo Ramalho

Deliberação controlada de antibióticos para vaca pós-parto / R. R. Severo –

São Paulo, 2018

X p.

Trabalho de Formatura – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia  
Metalúrgica e de Materiais

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha mãe, Maria do Carmo Ramalho, que me ajudou de todas as formas possíveis para que eu pudesse chegar até esse momento. Aos meus irmãos, Diego e Caroline, que também me apoiaram durante essa jornada, assim como minha namorada Valéria, que durante tantas vezes me acalmou nos momentos mais importantes e turbulentos. Aos meus primos-irmãos, tios e tias, que me mostraram o valor do laço familiar. Gostaria também de agradecer ao José Carlos e a Katia Liberal pelo apoio que me deram durante a minha jornada e me ajudaram muitas vezes para que esse dia chegasse e que serei eternamente grato. Aos meus grandes amigos Bruno e Paulo Brito, os quais tive a honra de conhecer e eu espero que a amizade dure eternamente. Aos irmãos Yussef e Mohammed Kadri, ao Leandro Nascimento e ao Flávio Rodrigues, pelos momentos alegres que passamos durante essa reta final, e que me ajudaram a passar com mais tranquilidade os períodos mais críticos. Aos meus amigos de faculdade e do PMT, especialmente ao Luiz Cotarelli, Fernando Aragon, Pedro Oliveira, Gustavo Curcio, Ricardo Arditti, Thyago Castelucci, Ricardo Lamberti, Lucas Uno, João Schweiser, André Pagotto, Vinícius Franca e Khalil de Castro, os quais contribuíram significativamente para o meu crescimento pessoal e profissional durante a graduação. À minha orientadora prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Fernandes, pela orientação zelosa e fundamental nesse trabalho.

Quero agradecer profundamente à Universidade de São Paulo e à Escola Politécnica, pois eu sei o quão fundamental a escolha que fiz foi determinante para o meu crescimento pessoal, intelectual e profissional. Foi um privilégio e uma honra estudar nessa escola durante esses anos. À AEP, a qual propiciou me manter durante os primeiros anos de graduação e que sempre terei o maior carinho e gratidão por essa associação, que cuida tão bem da comunidade politécnica.

Por fim quero agradecer a todos que de certa forma passaram pela minha vida durante esses anos, especialmente a minha família, a minha namorada e aos meus amigos, que me tornam uma versão melhor de mim mesmo a cada dia. Amo todos vocês.

“É que eu também passei  
por esses maus bocados,  
sofri, chorei largado”

Cristiano Araújo

## RESUMO

A utilização de métodos tradicionais para o combate a doenças causadas por bactérias depende da aplicação de agentes antibacterianos em intervalos regulares, para que haja eficiência no combate à infecção. A metrite é um tipo de doença causada por bactérias em bovinos, após o período pós-parto, atingindo o útero do animal. Geralmente, sua causa é devido a fatores como alimentação deficiente de determinados nutrientes, falta de higienização durante o parto, excesso de partos, dentre outros fatores. Os agentes bacterianos mais comuns em animais que sofrem essa enfermidade são: *Arcanobacterium pyogenes* e a *Escherichia coli*. Seu tratamento, geralmente, é feito através de antibióticos como a Tetraciclina, Sulfonamidas ou Aminoglicosídeos. Para diminuir o fator humano na aplicação desses medicamentos, visto que não são todas as pessoas capacitadas para administrar as doses exatas desses medicamentos, assim como no tempo correto, as indústrias farmacêuticas estão desenvolvendo dispositivos de liberação controlada de antibiótico a base de polímeros biodegradáveis. Considerando que a liberação controlada envolve o processo de difusão e a interação entre os componentes da formulação medicamentosa, o foco do presente trabalho foi o da previsão da interação do poli(ácido láctico) (PLA), Tetraciclina, e poli(etileno glicol) (PEG). Através do método de Hoftyzer e Van Krevelen, foi possível verificar os parâmetros de solubilidade entre os polímeros e a Tetraciclina, mostrando uma boa interação entre PLA com o antibiótico. A análise através do microscópio eletrônico de varredura (MEV) mostrou as diferenças nas dispersões dos componentes da formulação segundo as diferentes metodologias em que os filmes são produzidos. Esses resultados são promissores para a continuação do estudo para a produção do dispositivo polimérico de liberação controlada de Tetraciclina.

Palavras chave: tetraciclina; metrite; poli (ácido láctico) (PLA); poli (óxido de etileno) (PEO); parâmetro de solubilidade.

## ABSTRACT

The use of traditional methods in the treatment of diseases caused by bacteria depends on the application of antibacterial agents at regular intervals, so that there is efficiency in combating infection. Metritis is a type of disease caused by bacteria in cattle, after the postpartum period, reaching the uterus of the animal. Generally, the cause is due to factors such as deficient feeding of certain nutrients, lack of hygiene during childbirth, excessive partum, and others.

The most common bacterial agents in animals suffering from this disease are *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli*. Its treatment is usually through antithiotics such as Tetracycline, Sulfonamides or Aminoglycosides. To decrease the human factor in the application of these drugs, since not all people are able to administer the exact doses of these drugs, as well as in the correct time, pharmaceutical companies are developing controlled release devices for antibiotics based on biodegradable polymers. Considering that controlled release involves the diffusion process and the interaction between the components of the drug formulation, the focus of the present work was to predict the interaction of poly (lactic acid (PLA), Tetracycline, and poly (ethylene glycol) (PEG ). Using the method of Hoftyzer and Van Krevelen, it was possible to verify the solubility parameters between the polymers and Tetracycline, showing with a good interaction between PLA and the antibiotic. Scanning electron microscopy (SEM) analysis showed the differences in the dispersions of the formulation components according to the different methodology in which the films are produced. These results are promising for the continuation of the study to produce the controlled release polymer device of Tetracycline.

Key words: tetracycline; metritis; poly (lactic acid) (PLA); poly (oxyethylene) (PEO); solubility parameter.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Descarga uterina fétida .....	4
Figura 2: Urina com secreção purulenta .....	5
Figura 3: Presença de conteúdo purulento no interior do lúmen (esquerda); corpo lúteo remanescente no ovário (direita) .....	6
Figura 4: Biossíntese de Prostaglandina F2 $\alpha$ a partir do ácido araquidônico.....	10
Figura 5: (a) PLA; (b) PEG 6000; (c) tetraciclina; (d) metanol; (e) clorofórmio .....	17
Figura 6: Balança de precisão - Radwag (modelo WTB-2000) .....	19
Figura 7: Agitador magnético IKA (modelo C-MAG HS 4).....	19
Figura 8: Fratura do filme preparado pela metodologia do primeiro experimento. a) corte transversal amplificado 200x. b) Detalhe da região contendo a tetraciclina amplificada 2000x. c) Detalhe da região contendo PEG amplificada 500x. d) Detalhe da região contendo PEG amplificada 2000x .....	26
Figura 9: Análise da superfície das amostras da metodologia do primeiro experimento (a, c, e) e da metodologia do segundo experimento (b, d, f), escalas: 200x, 500x e 1000x. ....	27
Figura 10: Esquema ilustrativo diferenciando os tipos de micropartículas .....	28
Figura 11: Liberação controlada de Ellipticine em diferentes polímeros .....	29
Figura 12: Análise da superfície da amostra 3 em diferentes escalas: a) esquerda 200x e b) direita 500x.....	30
Figura 13: Análise da superfície da amostra 4 em diferentes escalas: a) esquerda 200x e b) direita 500x.....	30
Figura 14: Composição química da amostra 4, contendo Tetraciclina.....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de infecção uterina na vaca, época de ocorrência e sinais clínicos...	6
Tabela 2: Polímeros utilizados na indústria farmacêutica .....	12
Tabela 3: Fração molar, solubilidade, e desvio padrão da Tetraciclina.HCl em diferentes solventes a temperaturas de 288,15-310,15 K .....	16
Tabela 4: Cálculo das contribuições dos grupos no PLA .....	17
Tabela 5: Parâmetros de Solubilidade das moléculas estudadas .....	18
Tabela 6: Materiais e quantidades no primeiro experimento .....	18
Tabela 7: Materiais e quantidades no segundo experimento .....	20
Tabela 8: Valores calculados dos parâmetros de solubilidade .....	22
Tabela 9: Previsão de miscibilidade entre os pares de moléculas .....	23
Tabela 10: Comparação dos parâmetros de solubilidade calculados com os obtidos experimentalmente da literatura.....	24
Tabela 11: Características das amostras (1 a 4).....	25

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	1
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
3.1 Contaminação .....	2
3.2. Tipo de doenças.....	3
3.2.1. Metrite puerperal.....	3
3.2.2. Endometrite clínica .....	4
3.2.3. Endometrite subclínica .....	4
3.2.4. Piometra .....	5
3.3. Tratamentos convencionais .....	7
3.3.1. Metrite puerperal.....	8
3.3.2. Endometrites.....	8
3.4. Novos tratamentos: liberação controlada de antibióticos por meio de dispositivos poliméricos.....	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	13
4.1. Método do cálculo do parâmetro de solubilidade .....	13
4.2. Cálculo do parâmetro de solubilidade .....	15
4.3. Procedimento experimental.....	18
4.3.1. Primeiro experimento.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
5.1. Previsão da solubilidade e literatura .....	22
5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	24
6. CONCLUSÃO .....	32
7. REFERÊNCIAS .....	34

## **1. INTRODUÇÃO**

No final da gestação de bovinos, sejam leiteiros ou de corte, geralmente surgem infecções uterinas. Porém, o agravamento do quadro infeccioso depende de alguns fatores, como alimentação deficiente de determinados nutrientes, falta de higienização durante o parto, dentre outros fatores. No período pós-parto, o útero constitui ambiente extremamente favorável ao crescimento de microrganismos. A decomposição de restos das membranas fetais e a presença do lóquio fazem com que esse órgão torne-se excelente meio de cultura. Evidências comprovam que em 100% das vacas paridas, o útero sofre invasão de microrganismos infecciosos depois da expulsão do feto. As doenças mais comuns que atingem o útero das vacas leiteiras são: metrite puerperal, endometrite clínica, piometra e endometrite subclínica.<sup>1,2,3</sup>

As infecções bacterianas necessitam de um tratamento por meio de antibióticos, que precisam ser ministrados nos tempos determinados pelos médicos-veterinários para que se impeça o ciclo reprodutivo das bactérias. Ou seja, é necessário que o responsável pela aplicação do medicamento esteja ciente o suficiente da importância dos intervalos de aplicação. Geralmente, grandes e médios pecuaristas possuem recursos o suficiente para fazer de modo adequado o tratamento do animal, seja na preparação do funcionário que irá aplicar o medicamento, seja na compra do medicamento em si. Contudo, pequenos produtores podem não possuir recursos financeiros e mão-de-obra o suficiente para realizar o tratamento de forma eficiente, o que impactaria diretamente no ciclo ovariano e por consequência reduziria significativamente a qualidade de vida do animal.<sup>1,4</sup>

## **2. OBJETIVOS**

Este trabalho tem como objetivo avaliar a miscibilidade de algumas combinações comuns de antibióticos utilizados em veterinária e um polímero a ser o veículo da liberação controlada por meio do método de contribuição de grupo de Van Krevelen.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Contaminação

O puerpério é o intervalo do período pós-parto necessário para que os órgãos genitais da vaca voltem às condições pré-parto. Nesse período, o ambiente uterino se torna frágil a bactérias provenientes do ambiente, da pele de animais ou das fezes. Além disso, eventos como retenção de placenta, abortos e intervalos curtos entre períodos de gestação podem promover quadros de infecção bacteriana uterina.<sup>5,6</sup>

O ambiente uterino, na maioria das vezes é infectado por bactérias, que geralmente são eliminadas no período de involução uterina regular. A involução uterina completa corresponde ao processo de normalização das características fisiológicas do útero similares ao do período pré-parto. Este processo corresponde aos seguintes eventos, simultaneamente: redução do tamanho dos cornos, perda tecidual, ausência do conteúdo uterino e contração do tecido muscular da cérvix.<sup>5,6</sup> Desta maneira, o próprio sistema imunológico da vaca consegue eliminar tais agentes infecciosos quando os mesmos estão devidamente equilibrados. Isto quer dizer que quando há um equilíbrio entre os agentes infecciosos e os anticorpos do animal, a infecção é combatida e dentro de 28 a 35 dias após o parto a quantidade de bactérias presentes no ambiente uterino cai drasticamente até os níveis encontrados no pré-parto.<sup>1</sup>

Durante o processo de involução uterina, nos primeiros 10 dias, é possível detectar a maioria das bactérias presentes no útero, independentemente da presença de doenças ou não. Em um processo normal de involução, as principais bactérias coletadas durante uma biópsia uterina ou uma coleta via cotonete são: *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. Em vacas com esse tipo de flora bacteriana intrauterina, não é possível verificar sinais de metrite puerperal.<sup>1</sup> Contudo, caso haja um desequilíbrio entre o sistema imunológico e os agentes bacterianos, o combate às bactérias exógenas não ocorre de maneira eficiente e o processo de infecção se agrava, dando origem as doenças anteriormente citadas, como: metrite puerperal, endometrite clínica, piometra e endometrite subclínica. A evolução do quadro de infecção e seu consequente agravamento tem como fatores o ambiente uterino, a imunidade inata e adquirida e por fatores genéticos.

Geralmente, as bactérias coletadas neste tipo de situação, durante o procedimento de biópsia uterina ou coleta via cotonete são: *Arcanobacterium pyogenes* (*A. pyogenes*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*), *Prevotella* spp. e *Bacteroides* spp. Os efeitos deletérios no ciclo reprodutivo das vacas leiteiras não possuem um fator patogênico específico, porém estudos afirmam que, principalmente, a bactéria *A. pyogenes* sozinha ou combinada consegue promover as patologias citadas. Tal estudo também relata que a *A. pyogenes* possui um efeito sinérgico quando combinada com as demais bactérias, promovendo um agravamento das doenças uterinas.<sup>1,5</sup>

A deficiência de vitaminas E, A, de selênio e de  $\beta$ -caroteno podem prejudicar os mecanismos de autodefesa do organismo, o que aumente o nível de riscos de desenvolvimento de metrite. Além disso, quanto mais velha a vaca for e quando maior o número de partos ocorre uma diminuição nas contrações do miométrio, o que aumentam os riscos de agravamento do quadro infeccioso. Estudos afirmam que as baixas condições de higienização agravam o quadro infeccioso e que são mais frequentes em grandes propriedades leiteiras do que nas pequenas propriedades. Isso se deve ao fato de que em grandes propriedades a vaca fica confinada o ano inteiro e pari em um celeiro continuamente usado.<sup>1</sup>

As contrações miométricas funcionam um mecanismo de autodefesa, pois elas são responsáveis por eliminar conteúdos intrauterinos que possam promover um quadro infeccioso, tais como: lochia (sangue, mucosa e tecido uterino) e pequenos aglomerados de leucócitos, placentas e restos fetais.<sup>1</sup>

## **3.2. Tipo de doenças**

### **3.2.1. Metrite puerperal**

Essa doença está geralmente associada a partos difíceis, gemelares, ou a retenção de placenta. Nesse quadro infeccioso, é possível notar alguns sintomas, como: sinais de toxemia ou septicemia, febre alta, depressão, anorexia com queda severa da produção de leite, urina aquosa e fétida (vermelho-acastanhada) conforme a Figura 1.<sup>2,6</sup>

Figura 1: Descarga uterina fétida



Fonte: Correa, Rafael (2016)

### **3.2.2. Endometrite clínica**

A literatura veterinária não possui um consenso em relação a essa doença em bovinos. Geralmente, os sintomas dessa enfermidade são: descarga uterina purulenta ou de diâmetro cervical superior a 7,5 cm após 20 dias de pós-parto ou uma descarga muco purulenta após 26 dias de pós-parto.<sup>2,6</sup> Geralmente, o método utilizado para o diagnóstico dessa doença na maioria das vacas é o de palpação retal, com possível observação da descarga vaginal. Procedimentos como biópsia e de histopatologia, apesar de serem os ideais, são invasivos, caros e demandam tempo.<sup>2,6</sup> Na Figura 2, pode-se observar a excreção de urina purulenta em uma vaca com endometrite clínica.

### **3.2.3. Endometrite subclínica**

A endometrite subclínica é uma patologia que se caracteriza por uma inflamação do endométrio e que, diferente da endometrite clínica, não apresenta um material purulento vaginal. Seu diagnóstico é feito, geralmente, via citologia endometrial.<sup>2,6</sup> Esse quadro infeccioso possui ausência de sintomas clínicos diagnosticáveis e sua citologia endometrial possui uma proporção de neutrófilos superior ou igual a 5%, após 40 a 60 dias pós-parto.<sup>2,6,8</sup>

Figura 2: Urina com secreção purulenta



Fonte: Correa, Rafael (2016)

#### 3.2.4. Piometra

A piometra é uma doença específica em vacas no pós-parto. Tal enfermidade é caracterizada pela presença de acúmulo de exsudatos purulentos ou mucopurulentos no útero, mediante a presença de corpo lúteo. Essa doença possui uma incidência de cerca de 4% em vacas em período de lactação.<sup>2</sup> A infecção consegue inibir a produção e liberação de prostaglandina do endométrio, impossibilitando a regressão natural do corpo lúteo. Devido a não regressão do corpo lúteo, há uma contínua produção de progesterona, causando o fechamento da cérvix, implicando em uma distensão da mucosa uterina, o que promove um aumento do exsudato no interior do lúmen.<sup>6,9,10</sup> A Figura 3 apresenta um útero de vaca com a presença de corpo lúteo resistente e de acúmulo de conteúdo purulento no lúmen uterino.

A Tabela 1 exhibe um resumo das principais infecções uterinas, período de ocorrência e sinais clínicos. Estudos mostram que cerca de 2 a 37% das vacas podem desenvolver metrite, cerca de 37-35% desenvolvem endometrite citológica e até 5% podem vir a desenvolver piometra.<sup>7</sup>

Figura 3: Presença de conteúdo purulento no interior do lúmen (esquerda); corpo lúteo remanescente no ovário (direita)



Fonte: Correa, Rafael (2016)

Tabela 1: Tipos de infecção uterina na vaca, época de ocorrência e sinais clínicos.

Tipo de infecção uterina	Período ocorrência	Sinais clínicos
Metrite puerperal	Tem início na primeira semana e pode persistir até o final da segunda semana pós-parto.	Os sintomas estão associados à retenção de placenta, distocias, abortos ou partos gemelares. Verificam-se secreção vaginal sanguinopurulenta com odor fétido e sinais sistêmicos, como febre (temperatura retal $>39,5^{\circ}\text{C}$ ), desidratação, anorexia, depressão e queda na produção de leite.
Metrite clínica	Entre 14 e 21 dias pós-parto.	Aumento de volume anormal do útero, presença de secreção purulenta ( $>50\%$ de pus) e ausência de sinais sistêmicos.
Endometrite clínica	Pode ocorrer além de 21 dias pós-parto.	Secreção vaginal purulenta além de 21 dias após o parto, ou presença de conteúdo mucopurulento na vagina além de 26 dias pós-parto.
Endometrite subclínica	Após o período voluntário de espera.	Somente é identificada por meio da contagem de neutrófilos presentes no conteúdo uterino: mais de $18\%$ de neutrófilos em relação às células epiteliais do endométrio, entre 21 e 33 dias pós-parto, ou mais de $10\%$ entre 34 e 47 dias pós-parto.
Piometra	Em qualquer fase do puerpério.	Retenção de conteúdo purulento ou mucopurulento no útero e cervix fechada, mais comum em animais com rápido retorno da ciclicidade pós-parto (presença de corpo lúteo).

Fonte: A.P. Marques Júnior, T.M. Martins, Á.M. Borges, 2011.

### 3.3. Tratamentos convencionais

Para que haja uma tomada de decisão quanto ao melhor manejo do rebanho, é necessário que o diagnóstico da enfermidade seja feito o quanto antes. Em grandes propriedades de leite, contudo, é complicado realizar um diagnóstico precoce devido à grande quantidade de vacas e devido a uma mão-de-obra incapaz de fiscalizar todo o rebanho eficientemente.<sup>6</sup> Devido a incapacidade de se fiscalizar de maneira eficiente todo o rebanho utilizando funcionários *in loco*, tais propriedades se utilizam de sistemas modernos de monitoramento, pois dessa maneira, é possível diminuir a manifestação de tais doenças e, caso elas já existam, diagnosticá-las o quanto antes e começar rapidamente seu tratamento. Com isso, é possível evitar maior dano ao rebanho e a produção de leite.<sup>6</sup>

Os métodos de prevenção de doenças uterinas devem levar em consideração seus fatores de risco e seus mecanismos de atuação, que possuem relação com as respostas imunológicas, inflamatórias e com a regulação endócrina do ambiente uterino.<sup>6</sup>

As principais medidas preventivas para evitar o surgimento de doenças infecciosas uterinas são:<sup>6</sup>

- Controlar a ocorrência de abortos;
- Controlar a ocorrência de gestações gemelares;
- Controlar a ocorrência de cesarianas;
- Controlar a ocorrência de retenção de placenta;
- Selecionar os reprodutores/sêmen adequadamente;
- Dietas adequadas no período seco e no início da lactação;
- Cuidados com a sanidade do rebanho;
- Higiene do ambiente durante parto;
- Diminuição da assistência durante o parto;

O sucesso do tratamento depende de alguns fatores como a quantidade de conteúdo no útero, estado fisiológico do animal, da sensibilidade dos patógenos aos medicamentos e da concentração dos medicamentos no ambiente uterino.<sup>6</sup>

É fundamental para a escolha do tratamento mais adequado responder a perguntas importantes sobre o estado do animal doente, como:<sup>6</sup>

- I. Qual é a doença manifestada?
- II. O animal está ingerindo água e alimentos sólidos?
- III. O animal encontra-se com quantos dias pós-parto?
- IV. Qual é a condição do ovário?
- V. Qual é a sua taxa de produção?
- VI. O animal apresenta síndrome toxêmica-febril?

### **3.3.1. Metrite puerperal**

Para o tratamento de metrite puerperal, além das perguntas que devem ser respondidas previamente ao tratamento, deve-se possuir informações confiáveis em relação ao comportamento do animal, sua condição uterina e sua temperatura retal.<sup>6</sup>

Os estudos, em sua maioria, indicam a adoção de antibioticoterapia sistêmica para vacas que tenham metrite puerperal, além de indicarem também antitérmicos e fluidoterapia oral. Os principais antibióticos utilizados são: oxitetraciclinas de longa duração, cefalosporinas, para animais que apresentam uma baixa taxa de produção e de animais que apresentam uma elevada taxa de produção, respectivamente. As oxitetraciclinas exigem o descarte do leite produzido pela vaca, já as cefalosporinas não o exigem.<sup>6</sup>

Ressalta-se, que para se verificar a eficácia de tais tratamentos, utiliza-se, com mais frequência, o monitoramento do aspecto e odor da secreção cérvicovaginal.<sup>6</sup>

### **3.3.2. Endometrites**

O tratamento via intrauterina é o mais utilizado para endometrites, porém sua eficácia é discutível. Tal procedimento possui como desvantagens a possível ocorrência de lesões endometriais quando se utiliza drogas irritantes, tais como a oxitetraciclina, ou quando há uma difusão inadequada do medicamento na parede uterina. Outra desvantagem é fato de haver a necessidade de descarte do leite

contaminado com resíduos de antibióticos.<sup>6</sup> Dessa maneira, devido as desvantagens do tratamento via intrauterina, recomenda-se a utilização de antibioticoterapia sistêmica, com o uso dos mesmos medicamentos utilizados no tratamento de metrite puerperal. Diversos autores estão de acordo em relação a não obrigatoriedade do tratamento de endometrites, visto que a maioria dos animais apresentam recuperação espontânea. O tratamento de animais que apresentam um quadro de infecção até a terceira semana pós-parto, pode vir a ser desnecessário devido a involução uterina e a regeneração do endométrio.<sup>6</sup>

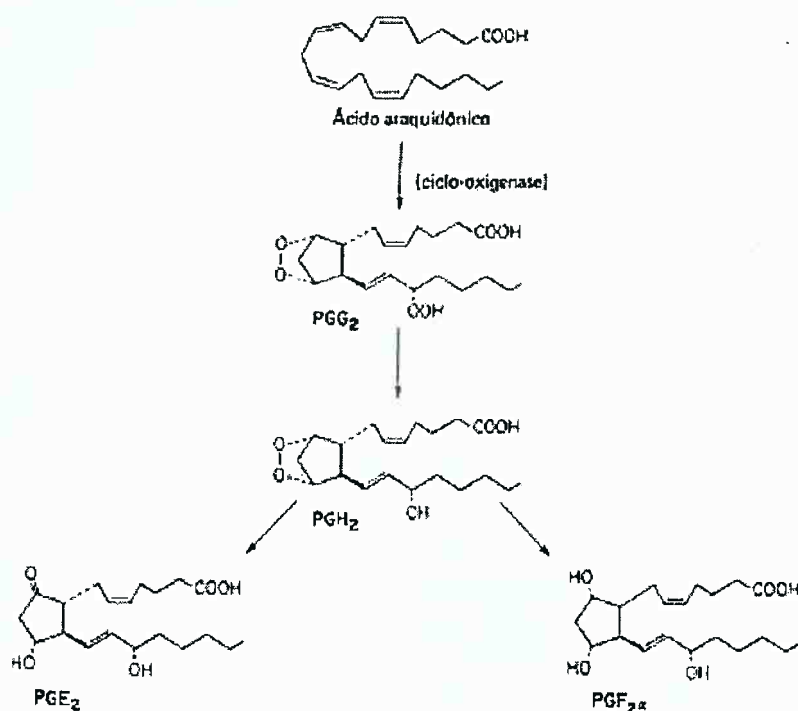
Estudos recentes mostram que 74,7% das vacas que manifestaram endometrite antes de 60 dias após o parto, se recuperaram espontaneamente. Porém, 25,3% dos animais tiveram manutenção do quadro infeccioso entre 61 e 150 dias pós-parto. Por isso, recomenda-se o tratamento de animais que apresentem endometrite clínica, visto que em casos mais graves o animal não possui a possibilidade de recuperação espontânea e dependendo do dano causado ao endométrio pode diminuir a fertilidade da vaca.<sup>6</sup>

### **3.3.3. Piometra**

Quando há um quadro de corpo lúteo resistente, que é mais frequente em quadros de piometra, recomenda-se o uso de prostaglandina F<sub>2α</sub> como tratamento para esse tipo de enfermidade. A função da prostaglandina F<sub>2α</sub> (Figura 4) é promover a dissolução do corpo lúteo, induzir o estro (cio), contribuir para o aumento natural da concentração de estrógeno e normalizar a função imunológica. Tais eventos possibilitam um aumento da habilidade do útero em lidar de maneira apropriada com os agentes patogênicos.<sup>6,9,10</sup>

As prostaglandinas são ácidos graxos de 20 átomos de carbono que apresentam em sua estrutura básica o ácido prostanóico, o qual apresenta um anel de ciclopentano e duas cadeias laterais (Figura 4). Também apresentam um grupo hidroxila na posição 15 e uma dupla ligação entre os carbonos 13 e 14 na posição trans. A partir do ácido araquidônico é possível realizar a biossíntese da Prostaglandina F<sub>2α</sub>.<sup>9</sup>

Figura 4: Biossíntese de Prostaglandina F<sub>2</sub> α a partir do ácido araquidônico



Fonte: Adriana Frizzo, 2002.

### 3.4. Novos tratamentos: liberação controlada de antibióticos por meio de dispositivos poliméricos

Esse trabalho tem como finalidade propor um novo tipo de tratamento para as doenças uterinas, na medida em que os tratamentos convencionais necessitam de mão-de-obra qualificada para que seja capaz de observar os sinais de infecção e de aplicar a medicação na vaca durante os intervalos de tempo pré-estabelecidos pelo médico veterinário e nas doses corretas. Sabe-se que é fundamental seguir estritamente as prescrições médicas, pois caso o intervalo entre as doses, ou a dose, não estejam corretos, haverá uma variação na concentração do antibiótico no organismo o que pode levar a uma seleção de bactérias mais resistentes e com isso agravar o quadro infeccioso.<sup>4,6</sup>

Em grandes propriedades, sistemas de monitoramento conseguem observar os sintomas nos animais doentes, porém ainda necessitam de mão-obra qualificada para aplicar a medicação nos intervalos de tempo correto e nas doses estabelecidas pelo profissional competente. Já em pequenas propriedades, que não possuem

vastos recursos financeiros e dependem, na maioria dos casos, de uma mão-de-obra escassa e/ou pouco qualificada, os quadros infecciosos podem surgir com maior frequência.<sup>6</sup> Dessa maneira, ao se utilizar dispositivos poliméricos que possibilitem a liberação controlada de antibióticos nas doses corretas e nos intervalos de tempo corretos, é possível reduzir drasticamente o fator humano durante do tratamento de tais doenças, além disso, é possível diminuir a toxicidade do medicamento no organismo, devido a uma maior precisão durante a aplicação. Esse novo método de tratamento pode ser de vital importância para os pequenos produtores, que além de não possuírem mão-de-obra o suficiente para cuidar de todo o rebanho, não detém recursos financeiros para qualificá-las, na maioria das vezes.

O benefício terapêutico de diversas drogas tradicionais pode ser limitado devido a propriedades físico-químicas (solubilidade) e toxicológicas das mesmas ou até devido a barreiras fisiológicas. Através do desenvolvimento de dispositivos poliméricos de liberação controlada é possível modificar a estrutura da cápsula que irá carregar o medicamento de forma que ela se adapte da melhor maneira ao ambiente ao qual ela irá atuar. Ou seja, a manipulação das propriedades físico-químicas ou toxicológicas contribuem para a maior eficácia do medicamento.<sup>11</sup>

#### **3.4.1. Exemplo de uso de liberação controlada de medicamento**

Um exemplo de utilização de dispositivos poliméricos se encontra no estudo de Shu-Huei Yu *et al.* (2005, v. 98, n. 2, p. 538-549). Nesse artigo, o autor explica, primeiramente, a importância do hidrogel preparado a partir biopolímeros, como os polissacarídeos, na obtenção de materiais de cura de feridas, ou seja, curativos ou capsulas que pudessem ser impregnados de determinados antibióticos com intuito de acelerar o processo de cura. O hidrogel pode ser obtido a partir de um complexo eletrólito, composto de quitosano e alginato, derivados de biopolímeros marinhos. A partir de determinados processos, formam-se eletrólitos catiônicos e aniônicos, que juntos, se tornam estáveis e dão origem ao complexo polieletrólito quitosano-alginato (PEC). A partir da composição e da estrutura de tal complexo é possível obter materiais que tenham como habilidade a liberação controlada de medicamentos antibacterianos, que tem como intuito evitar uma infecção não

desejada durante o processo de cura de determinado ferimento. Nesse estudo, o autor relata a habilidade de liberação controlada do antibiótico sulfadiazina de prata (AgSD) presente na esponja de PEC e a eficiência antimicrobiana *in vitro versus Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.<sup>12</sup>

Os autores observaram que dependendo do tipo de razão de mistura, variação de pH e tempo de reticulação iônica, através do método de homogeneização, pode-se formar materiais adequados ao combate bacteriano. A quitosana em baixo valor de pH reagiu mais completamente com alginatos de valores de pH elevados, produzindo uma amostra de estrutura tipo-escada e mais estável.

### 3.4.2. Outros exemplos

A Tabela 2 apresenta demais casos nos quais os polímeros são utilizados como dispositivos de liberação controlada de medicamentos em seres humanos, visto que em animais o uso de tal dispositivo ainda está em fase de pesquisa.

Tabela 2: Polímeros utilizados na indústria farmacêutica

Polímero	Medicação (Princípio ativo)	Enfermidade	Conclusão	Ref.
PEVA	Progestasert ® (Progesterona)	Evitar gravidez	Eficaz	[13] [14]
PLGA	Zoladex ® LA (Acetato de goserelina)	Câncer de próstata	Eficaz	[13] [15]
MMA e MA	Septopal ® (Sulfato de gentamicina)	Infecção óssea Tecidos moles	Eficaz	[13] [16]

Fonte: VILLANOVA, Janaina CO; ORÉFICE, Rodrigo L.; CUNHA, Armando S., 2010

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Método do cálculo do parâmetro de solubilidade

Existem classes de antibióticos que já são utilizados regularmente para combater as infecções causadas pelas metrites em gados leiteiros no pós-parto. Entre eles estão: Tetraciclinas, Sulfonamidas e Aminoglicosídeos, os quais são aprovados pela FDA (Agência Federal Americana que regula a administração de drogas aos alimentos).<sup>17</sup>

Esse trabalho tem como finalidade estudar a interação da tetraciclina com o PLA, visto que esse antibiótico já é utilizado largamente no tratamento de doenças bacterianas em gados. Um fator importante na liberação controlada de medicamentos em matrizes poliméricas é a interação entre eles. Além disso, o processo de preparação do sistema droga-polímero e a sua dispersão na matriz é outra variável a ser levada em consideração. Desta maneira, o trabalho está voltado as avaliações preliminares através de uma metodologia que seja indicativa e útil para a elaboração de novas formulações e processos.

O sistema de partida a ser considerado é o do poli (ácido láctico) (PLA) com a Tetraciclina, o qual também será utilizado no desenvolvimento das misturas entre eles e sua capacidade de formar filmes homogêneos. Para isso, serão analisados os parâmetros de solubilidade,  $\delta$ , do polímero e de algumas moléculas de antibiótico. Esse cálculo é necessário, pois pela termodinâmica, sabe-se que quanto menor a energia livre de mistura, maior a possibilidade de solubilização entre duas substâncias.

A energia livre de Gibbs da mistura ( $\Delta G_M$ ), por definição, é dada pela Equação 1:<sup>18</sup>

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M \quad (1)$$

Onde:  $\Delta H_M$  é a entalpia da mistura e  $\Delta S_M$  é a entropia da mistura.

De acordo com Hildebrand, a entalpia da mistura pode ser calculada através da Equação 2:<sup>18</sup>

$$\Delta h_M = \frac{\Delta H_M}{V_S} = \varphi_1 \varphi_2 (\delta_1 - \delta_2)^2 \quad (2)$$

Onde:  $\Delta h_M$  é a entalpia da mistura por unidade de volume,  $\varphi_1$  e  $\varphi_2$  são as frações volumétricas da mistura e  $\delta_1$  e  $\delta_2$  são os parâmetros de solubilidade dos componentes 1 e 2 que compõem a mistura.

O  $\Delta S_M$  geralmente é positivo, e isto leva a existência de um determinado valor de  $\Delta H_M$ , o qual favorece a solubilização entre os componentes da mistura.<sup>18</sup> Os estudos teóricos têm mostrado que quanto mais próximos forem os valores parâmetros de solubilidade dos componentes, menor será o valor de  $\Delta G_M$ , o que termodinamicamente indica a solubilidade entre os componentes.

O parâmetro de solubilidade pode ser definido de acordo com a Equação 3:<sup>18</sup>

$$\delta = \left( \frac{E_{coh}}{V} \right)^{1/2} \quad (3)$$

Onde:  $E_{coh}$  é a energia coesiva da substância (definida como o aumento da energia interna ( $\Delta U$ ) de uma substância caso todas as forças intermoleculares fossem eliminadas) e  $V$  é o volume molar da substância.

Posteriormente, o modelo do cálculo do parâmetro de solubilidade foi refinado por Hansen em 1976, considerando a divisão da  $E_{coh}$  em três partes, conforme Equação 4:<sup>18</sup>

$$E_{coh} = E_d + E_p + E_h \quad (4)$$

Onde:  $E_d$  é a contribuição das forças de dispersão (Van der Waals),  $E_p$  corresponde à contribuição das forças polares e  $E_h$  corresponde às pontes de hidrogênio.

A equação do parâmetro de solubilidade correspondente também desmembra em 3 contribuições de acordo com o tipo de interação intermolecular, conforme Equação 5:<sup>18</sup>

$$\delta = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} \quad (5)$$

Onde:  $\delta_d$  é o parâmetro de solubilidade da contribuição das forças de dispersão,  $\delta_p$  é o parâmetro de solubilidade da contribuição das forças polares e  $\delta_h$  é o parâmetro de solubilidade da contribuição das pontes de hidrogênio.

Para a análise da solubilidade entre as substâncias deste trabalho, foram calculados os parâmetros de solubilidade de Hansen, através do método de contribuição de grupos de Hoftyzer e Van Krevelen, que considera as contribuições das forças de dispersão ( $F_{di}$ ), das forças polares ( $F_{pi}$ ) e das pontes de hidrogênio ( $E_h$ ) para cada grupo molecular, de acordo com valores previamente tabelados.<sup>18</sup>

Pode-se encontrar na literatura, diversos artigos que utilizam a análise dos parâmetros de solubilidade para analisar a solubilidade de determinada molécula com princípio terapêutico em determinado solvente. Por exemplo, no trabalho de Kitak, et al. (2015, 21549-21568), eles analisaram a dissolução do Ibuprofeno com diversos polímeros, utilizando o método de Hoftyzer e Van Krevelen para a determinação dos parâmetros de solubilidade.<sup>19</sup>

## 4.2. Cálculo do parâmetro de solubilidade

No artigo Varanda, et al (2006, 6368-6374), analisou a solubilidade da Tetraciclina em diferentes solventes, conforme a Tabela 3:<sup>20</sup>

A partir desses dados, optou-se pelo uso do metanol como solvente da tetraciclina, o qual provavelmente solubilizará melhor do que o etanol, devido ao aumento da sua polaridade pela diminuição de carbonos na estrutura.

Tabela 3: Fração molar, solubilidade, e desvio padrão da Tetraciclina.HCl em diferentes solventes a temperaturas de 288,15-310,15 K

solvent	mole fraction, x	solubility, S (mg antibiotic/mL solution)	standard deviation, sd
<i>T</i> = 288.15 K			
water	$4.82 \times 10^{-4}$	12.7	0.03
ethanol	$8.89 \times 10^{-4}$	7.3	0.022
2-propanol	$0.724 \times 10^{-4}$	0.5	0.050
acetone	$0.142 \times 10^{-4}$	0.1	0.005
<i>T</i> = 293.15 K			
water	$6.80 \times 10^{-4}$	17.8	0.01
ethanol	$9.57 \times 10^{-4}$	7.86	0.03
2-propanol	$0.819 \times 10^{-4}$	0.515	0.033
acetone	$0.144 \times 10^{-4}$	0.095	0.005
<i>T</i> = 313.15 K			
water	$1.03 \times 10^{-3}$	26.9	0.030
<i>T</i> = 232.15 K			
water	$1.54 \times 10^{-3}$	39.5	0.030
ethanol	$1.18 \times 10^{-3}$	9.56	0.041
2-propanol	$0.09 \times 10^{-3}$	0.581	0.04
acetone	$0.016 \times 10^{-3}$	0.103	0.008
<i>T</i> = 232.15 K			
water	$2.83 \times 10^{-3}$	70.8	0.03

Fonte: Varanda, et al (2006, 6368-6374).

Um exemplo do cálculo dos parâmetros de solubilidade para o PLA (Figura 5) e as contribuições de cada grupo da molécula é apresentado na Tabela 4 conforme as Equações 6-8 relativas ao parâmetro de solubilidade total ( $\delta$ ) e as Forças de Van de Waals ( $\delta_d$ ), Dipolo-Dipolo ( $\delta_p$ ), Pontes de Hidrogênio ( $\delta_h$ ), e respectivamente, através do método de Hoftyzer e Van Krevelen:

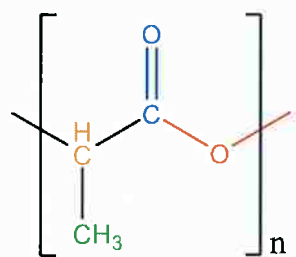
$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{V} \quad (6)$$

$$\delta_p = \frac{\sqrt{\sum F_{pi}^2}}{V} \quad (7)$$

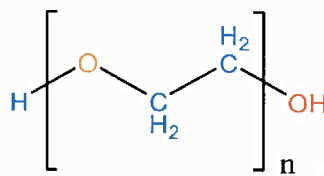
$$\delta_h = \frac{\sqrt{\sum E_{hi}}}{V} \quad (8)$$

As fórmulas estruturais das demais moléculas a serem estudadas, ou seja, Tetraciclina, Metanol, polietileno glicol 6000 (PEG) e Clorofórmio, são também mostradas na figura 5:

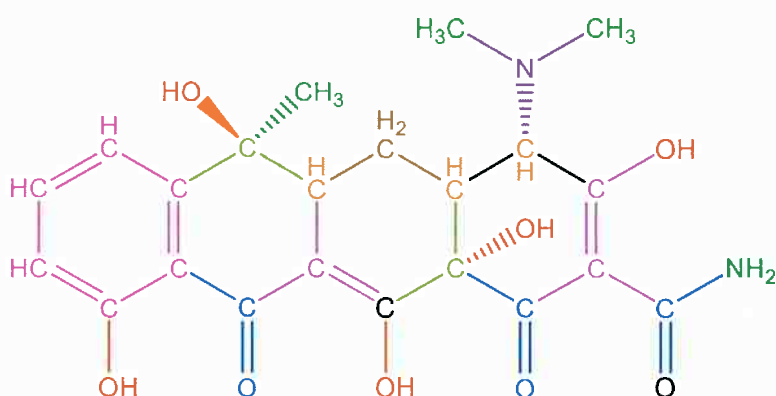
Figura 5: (a) PLA; (b) PEG 6000; (c) tetraciclina; (d) metanol; (e) clorofórmio



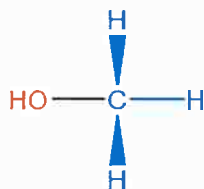
(a)



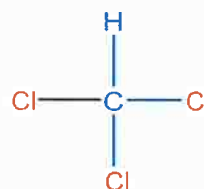
(b)



(c)



(d)



(e)

Tabela 4: Cálculo das contribuições dos grupos no PLA

Grupo	$F_{di}$ ((MJ/m <sup>3</sup> ) <sup>1/2</sup> ·mol <sup>-1</sup> )	$F_{pl}^2$ ((MJ/m <sup>3</sup> ) <sup>1/2</sup> ·mol <sup>-1</sup> )	$E_{hi}$ (J/mol)	$V$ (cm <sup>3</sup> /mol)
1 -CH <sub>3</sub>	1 x 420	(1 x 0) <sup>2</sup>	0	1 x 33,5
1 >CH-	1 x 100	(1 x 0) <sup>2</sup>	0	1 x (-1)
1 -O-	1 x 100	(1 x 400) <sup>2</sup>	3.000	1 x 3,8
1 -CO-	1 x 290	(1 x 770) <sup>2</sup>	2.000	1 x 10,8
Σ	<b>910</b>	<b>752.900</b>	<b>5.000</b>	<b>47,1</b>

Aplicando as Equações de 6 a 8 os parâmetros de solubilidade resultantes são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros de Solubilidade das moléculas estudadas

<b>Molécula</b>	$\delta_d ((\text{MJ}/\text{m}^3)^{1/2})$	$\delta_p ((\text{MJ}/\text{m}^3)^{1/2})$	$\delta_h ((\text{MJ}/\text{m}^3)^{1/2})$	$\delta ((\text{MJ}/\text{m}^3)^{1/2})$
PLA	18,9	18,4	10,3	28,3
PEG 6000	17,8	11,1	9,1	22,9
Tetraciclina	21,6	13,4	11,6	27,9
Metanol	14,5	11,5	21,4	28,3
Clorofórmio	20,1	23,2	2,4	30,8

### 4.3. Procedimento experimental

#### 4.3.1. Primeiro experimento

As quantidades das substâncias utilizadas no primeiro experimento, assim como as suas respectivas quantidades (teórica e experimental) estão elencadas na Tabela 6:

Tabela 6: Materiais e quantidades no primeiro experimento

<b>Materiais</b>	<b>m (g) – teórica</b>	<b>V (mL) – teórica</b>	<b>m (g) – exp.</b>	<b>V (mL) – exp.</b>
PLA	2,00	—	2,02	—
Tetraciclina	0,05	—	0,05	—
Metanol	—	5,00	—	5,00
Clorofórmio	—	10,00	—	10,00
PEG 6000	0,50	—	0,52	—

Primeiramente, foram pesados o PLA, o PEG e a Tetraciclina, com o auxílio de uma balança de precisão, marca Radwag, modelo WTB-2000 (Figura 6).

Figura 6: Balança de precisão - Radwag (modelo WTB-2000)



O PLA pesado foi adicionado ao erlenmeyer de 50 mL, seguindo-se 10 mL de clorofórmio. Em seguida, o erlenmeyer foi levado ao agitador magnético da marca IKA, modelo C-MAG HS 4 (figura 7).

Figura 7: Agitador magnético IKA (modelo C-MAG HS 4)



As substâncias ficaram em agitação magnética, em uma temperatura de 40°C até a dissolução aparente do PLA no clorofórmio e em seguida deixou-se a solução em repouso durante 24 horas.

O procedimento com o PEG 6000 em metanol e contendo a Tetraciclina foi semelhante. Neste caso, primeiramente o PEG 6000 foi solubilizado na metade do volume (5 mL) de metanol sob agitação magnética, e a temperatura de 40°C. Em outro erlenmeyer foi solubilizada a Tetraciclina com a outra metade do volume de metanol, a qual foi adicionado ao erlenmeyer contendo a mistura PEG/metanol mantendo a agitação magnética, porém a uma temperatura de 30°C, até que a solução se mostrou transparente. Em seguida, deixou-se a solução em repouso durante 24 horas.

Terminado o tempo de repouso das duas soluções poliméricas, adicionou-se a mistura Tetraciclina/metanol/PEG 6000 na de PLA/clorofórmio, sob agitação magnética e a solução resultante foi vazada em uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro e tampada. Para um maior controle da evaporação dos solventes o sistema foi isolado usando uma cuba de pirex vedada com fita crepe; este cuidado teve como objetivo evitar a formação de bolhas no filme e de certa forma a sua qualidade.

O mesmo procedimento foi realizado para o filme de controle sem o antibiótico.

#### 4.3.2. Segundo experimento

Neste experimento a preparação do filme foi em camadas; isto é, vazou a solução de PLA em clorofórmio, esperar a evaporação do solvente, para só então adicionar a solução Tetraciclina/PEG 6000/Metanol.

Na Tabela 7 são elencadas as massas e os volumes (teóricos e experimental) utilizados.

Tabela 7: Materiais e quantidades no segundo experimento

<b>Materiais</b>	<b>m (g) – teórica</b>	<b>V (mL) – teórica</b>	<b>m (g) – exp.</b>	<b>V (mL) – exp.</b>
PLA	2,00	—	2,03	—
Tetraciclina	0,05	—	0,05	—
Metanol	—	5,00	—	5,00
Clorofórmio	—	10,00	—	10,00
PEG 6000	0,50	—	0,51	—

Os mesmos procedimentos de pesagem, preparação das soluções e tempo de repouso foram iguais aos do primeiro experimento. Nesse caso, a diferença é que não haverá a mistura da solução de Tetraciclina/PEG 6000/Metanol com aquela de PLA/Clorofórmio.

Adicionou-se primeiramente a solução de PLA/clorofórmio à placa de Petri, isolando-a hermeticamente, a fim de controlar o ambiente de evaporação, como mencionado precedentemente. Após 3 dias de evaporação do solvente (clorofórmio) adicionou-se no filme de PLA a solução de Tetraciclina/PEG 6000/Metanol.

Novamente a placa de Petri foi isolada hermeticamente, e mantido no sistema até que todo o solvente fosse evaporado. O mesmo procedimento foi realizado para o filme de controle sem o antibiótico.

Finalmente, uma amostra, foi preparada sem um controle efetivo de velocidade de evaporação do solvente; neste caso, a camada do filme de PLA mostrou poros visíveis e fraturas.

#### **4.3.3. Caracterização**

As morfologias das superfícies e fraturas criogênicas das amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) FEI Quanta 450 FEG com detector de elétrons secundários e retroespalhados.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Previsão da solubilidade e literatura

Considerações termodinâmicas levaram Bagley et al. (1971) para a conclusão de que os efeitos de  $\delta_d$  e  $\delta_p$  mostram similaridade próxima, enquanto o efeito de  $\delta_h$  é de natureza bastante diferente

Para prever a solubilidade entre as substâncias, foi utilizado o método gráfico 2D, a partir da Equação 5. Neste gráfico considera-se a similaridade dos efeitos de  $\delta_d$  e  $\delta_p$ , portanto introduzindo um novo parâmetro,  $\delta_v$  (Equação 9). Desta forma, a Equação 5 modificada utiliza este novo parâmetro e o  $\delta_h$  que causa um efeito de natureza distinta dos demais (Equação 10):<sup>18</sup>

$$\delta_v = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2} \quad (9)$$

$$\delta = \sqrt{\delta_v^2 + \delta_h^2} \quad (10)$$

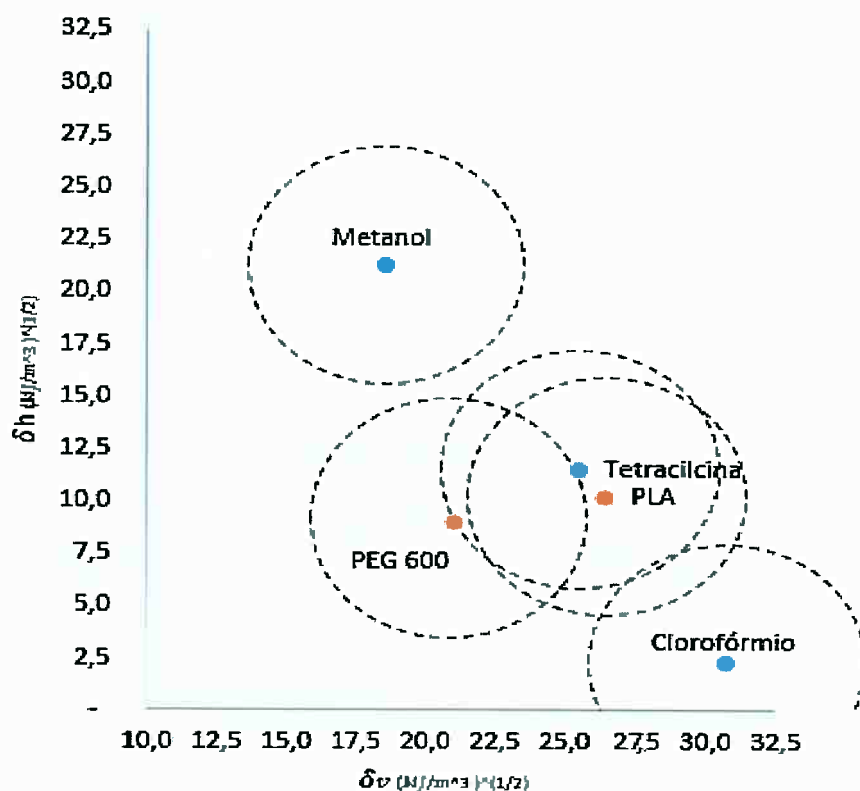
Através da Equação 9 e dos valores da Tabela 7, foram obtidos os valores de  $\delta_v$  e  $\delta_h$  indicados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores calculados dos parâmetros de solubilidade

Molécula	$\delta_h$ ((MJ/m <sup>3</sup> ) <sup>1/2</sup> )	$\delta_v$ ((MJ/m <sup>3</sup> ) <sup>1/2</sup> )
PLA	10,3	26,4
Tetraciclina	11,6	25,4
Metanol	21,4	18,5
PEG 600	9,1	21,0
Clorofórmio	2,4	30,7

Para prever a solubilidade entre as substâncias, os valores de  $\delta_v$  x  $\delta_h$  foram relacionados no Gráfico 1. Para sistemas de polímeros com liberação controlada de medicamento, recomenda-se que a diferença dos valores de  $\sqrt{\delta_v^2 + \delta_h^2} \leq 5 \left(\frac{\text{MJ}}{\text{m}^3}\right)^{1/2}$ , para que haja solubilidade entre eles.<sup>19,23</sup>

Gráfico 1 - Previsão de solubilidade entre solventes e polímeros



Fonte: Autor

Através da análise do Gráfico 1, foi prevista a solubilidade entre os componentes das misturas (Tabela 9).

Tabela 9: Previsão de miscibilidade entre os pares de moléculas

	Metanol	Clorofórmio	Tetraciclina
Tetraciclina	Pouco Solúvel	Solúvel	Solúvel
PLA	Pouco Solúvel	Solúvel	Solúvel
PEG 6000	Pouco Solúvel	Pouco Solúvel	Solúvel

Pode-se verificar que esse método de previsão de solubilidade é viável, na medida em que durante os procedimentos experimentais, os solventes dissolveram os polímeros/Tetraciclina. Além disso, na formulação final, ou seja, no filme pronto, observa-se que PLA/Tetraciclina são solúveis, o que contribui para a estabilidade do filme pós evaporação dos solventes.

As diferenças encontradas entre a constatação de solubilidade ou não quanto aos valores experimentais podem ser explicadas devido ao método de cálculo dos parâmetros de solubilidade, visto que de acordo com o tipo de arranjo, é possível obter valores distintos de  $F_{di}$ ,  $F_{pi}$  e  $E_{hi}$ , e com isso valores diferentes de  $\delta_d$ ,  $\delta_p$ ,  $\delta_h$  e  $\delta$ . Além disso, os valores encontrados dos parâmetros de solubilidade na literatura variam em relação aos parâmetros de solubilidade calculados nesse trabalho, conforme tabela 10, a seguir:

Tabela 10: Comparação dos parâmetros de solubilidade calculados com os obtidos experimentalmente da literatura.<sup>18,22</sup>

	$\delta_d$ Calc.	$\delta_d$ Lit.	Erro (%)	$\delta_p$ Calc.	$\delta_p$ Lit.	Erro (%)	$\delta_h$ Calc.	$\delta_h$ Lit.	Erro (%)	$\delta$ Calc.	$\delta$ Lit.	Erro (%)
PLA	18,9	17,5	7,4	18,4	9,5	48,4	10,3	7,3	29,1	28,3	20,2	28,6
Tetraciclina	21,6			13,4			11,6			27,9		
Metanol	14,5	15,1	4,1	11,5	12,3	7,0	21,4	22,3	4,2	28,3	29,6	4,6
Clorofórmio	20,1	17,8	11,4	23,2	3,1	86,6	2,4	5,7	137,5	30,8	19,0	38,3
PEG 600	17,8	17,8	—	11,1	11,1	—	9,1	9,1	—	22,9	22,9	—

## 5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

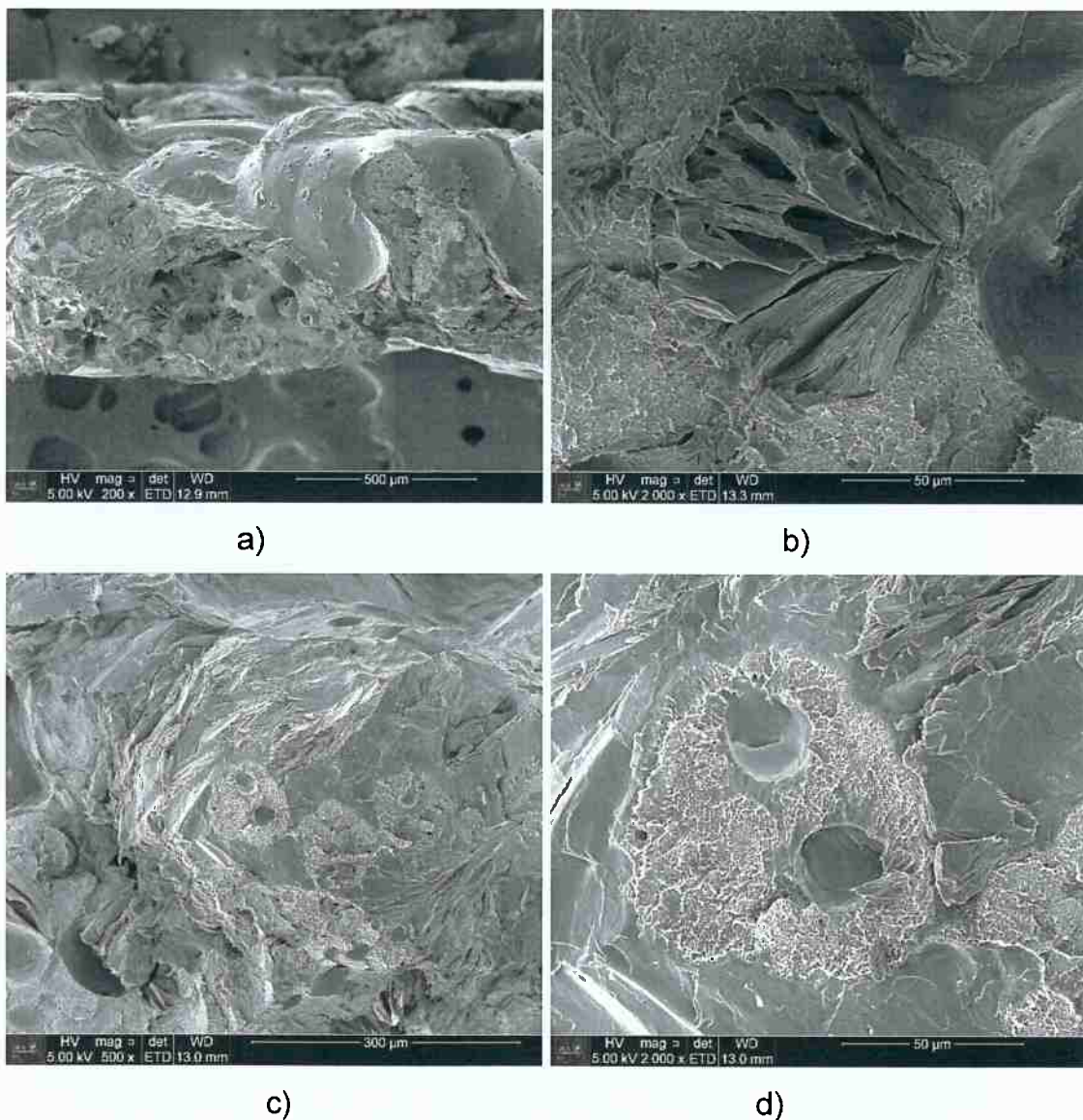
A tabela 11 relaciona o número da amostra (1 a 4) com as respectivas composições, metodologia (1 ou 2) e finalidade (tetraciclina ou controle).

Os filmes obtidos foram fraturados transversalmente com o objetivo de se observar a morfologia interna e as interações entre os componentes da formulação. Na Figura 8 além do corte transversal tem-se uma ideia da superfície que sugere o tipo casca de laranja. Os filmes mostraram poros e a tetraciclina mostra-se na forma esférica laminar.

Tabela 11: Características das amostras (1 a 4)

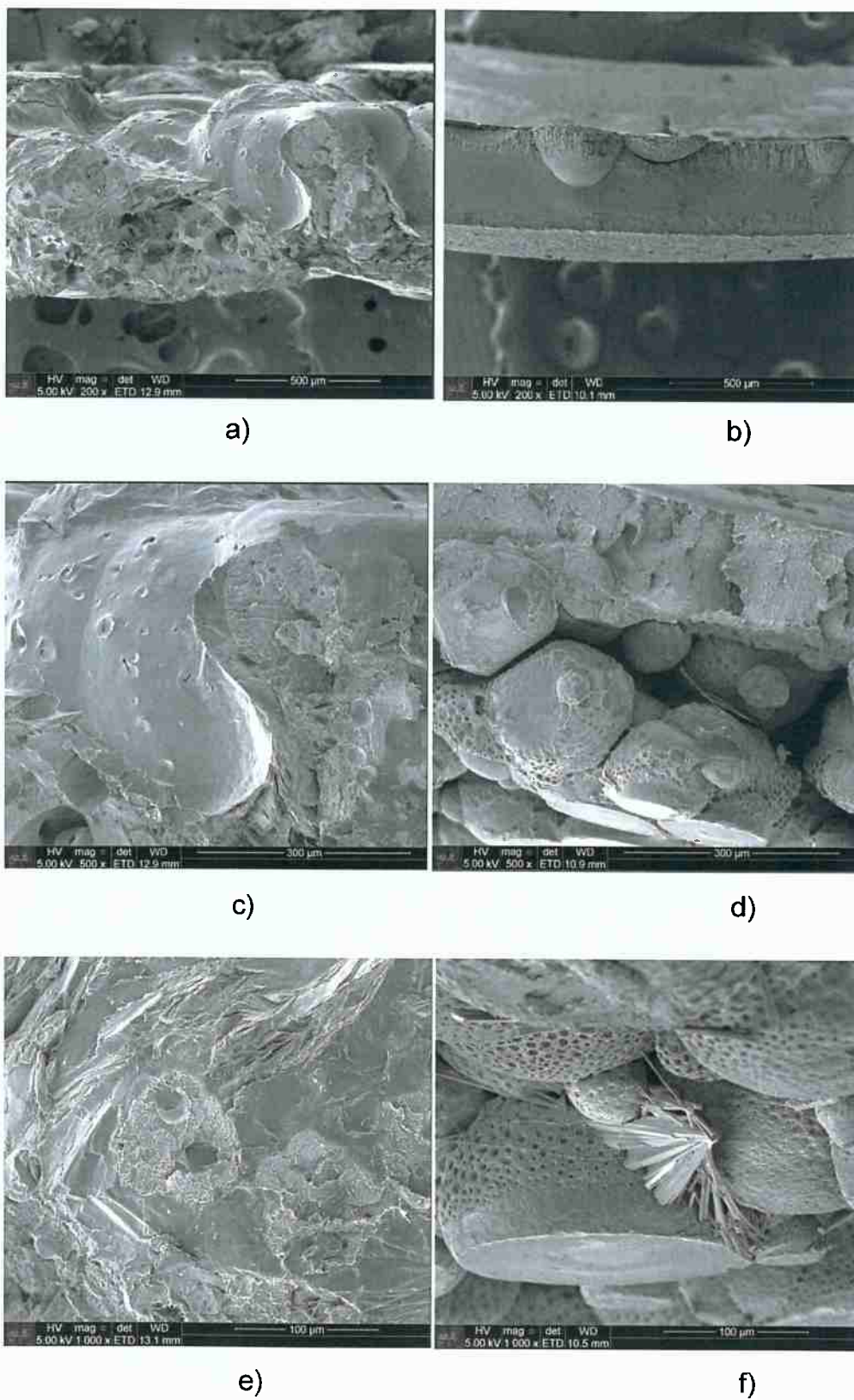
N° Amostra	Composição	Metodologia	Finalidade
1	20% PLA em Clorofórmio 10% PEG 6000 em Metanol 1% Tetraciclina em Metano	1	Tetraciclina
2	20% PLA em Clorofórmio 10% PEG 6000 em Metanol 1% Tetraciclina em Metano	2	Tetraciclina
3	20% PLA em Clorofórmio 10% PEG 6000 em Metanol	2	Controle
4	20% PLA em Clorofórmio 10% PEG 6000 em Metanol 1% Tetraciclina em Metano	2	Tetraciclina

Figura 8: Fratura do filme preparado pela metodologia do primeiro experimento. a) corte transversal amplificado 200x. b) Detalhe da região contendo a tetraciclina amplificada 2000x. c) Detalhe da região contendo PEG amplificada 500x. d) Detalhe da região contendo PEG amplificada 2000x



A figura 9 abaixo, mostra as análises das superfícies das amostras 1 e 2, com diferentes escalas:

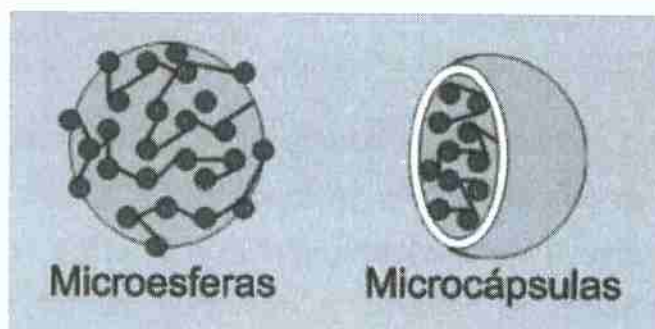
Figura 9: Análise da superfície das amostras da metodologia do primeiro experimento (a, c, e) e da metodologia do segundo experimento (b, d, f), escalas: 200x, 500x e 1000x.



A figura 9 (a, b, c, d, e, f), nas diferentes escalas, mostram uma evidente diferença entre a metodologia 1 (sem formação de camadas) e a metodologia 2 (produção de filmes em camadas), visto que nas imagens da esquerda, observa-se uma estrutura mais heterogênea, com por maiores e menos homogêneos. A figura 11 mostra com clareza a formação das distintas camadas durante a metodologia 2. Era previsto esse resultado visto que durante a elaboração dessa etapa do procedimento experimental foi constatado a formação clara do filme de PLA.

Observando apenas as microestruturas das amostras de diferentes metodologias, não é possível verificar qual é mais eficaz para a produção de um composto que contenha um medicamento eficaz para o tratamento das metrites, como o caso da Tetraciclina. Será necessário verificar qual metodologia é mais eficiente na produção de microesferas ou microcápsulas, principalmente o último método, que possui larga aplicação industrial e que vem sendo utilizado para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas. A diferença morfológica entre os tipos diferentes de micropartículas, microesferas e microcápsulas, pode ser observada na figura 10:<sup>25</sup>

Figura 10: Esquema ilustrativo diferenciando os tipos de micropartículas



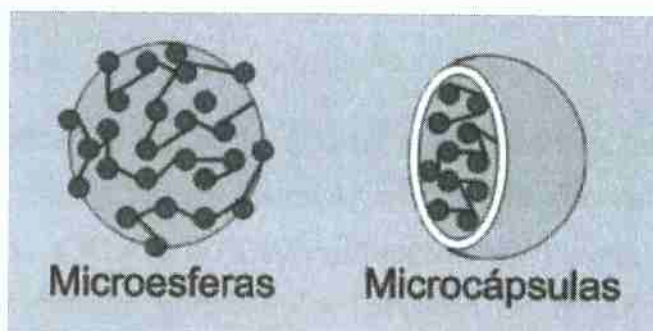
Fonte: PIMENTEL, Lúcio; et al (2007).

Para que haja o sucesso na liberação do medicamento no organismo enfermo, independente da produção de microesferas ou microcápsulas, será necessário verificar a taxa de liberação do medicamento no organismo. Pois para que o dispositivo possua de fato uma liberação controlada do medicamento, ele deve ter uma taxa de liberação o mais constante possível, para que se mantenha a

A figura 9 (a, b, c, d, e, f), nas diferentes escalas, mostram uma evidente diferença entre a metodologia 1 (sem formação de camadas) e a metodologia 2 (produção de filmes em camadas), visto que nas imagens da esquerda, observa-se uma estrutura mais heterogênea, com por maiores e menos homogêneos. A figura 11 mostra com clareza a formação das distintas camadas durante a metodologia 2. Era previsto esse resultado visto que durante a elaboração dessa etapa do procedimento experimental foi constatado a formação clara do filme de PLA.

Observando apenas as microestruturas das amostras de diferentes metodologias, não é possível verificar qual é mais eficaz para a produção de um composto que contenha um medicamento eficaz para o tratamento das metrites, como o caso da Tetraciclina. Será necessário verificar qual metodologia é mais eficiente na produção de microesferas ou microcápsulas, principalmente o último método, que possui larga aplicação industrial e que vem sendo utilizado para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas. A diferença morfológica entre os tipos diferentes de micropartículas, microesferas e microcápsulas, pode ser observada na figura 10:<sup>25</sup>

Figura 10: Esquema ilustrativo diferenciando os tipos de micropartículas



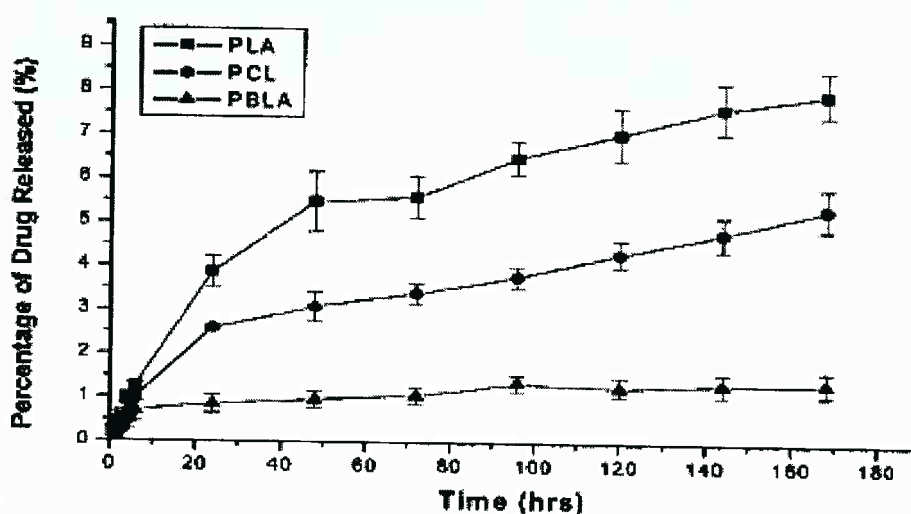
Fonte: PIMENTEL, Lúcio; et al (2007).

Para que haja o sucesso na liberação do medicamento no organismo enfermo, independente da produção de microesferas ou microcápsulas, será necessário verificar a taxa de liberação do medicamento no organismo. Pois para que o dispositivo possua de fato uma liberação controlada do medicamento, ele deve ter uma taxa de liberação o mais constante possível, para que se mantenha a

concentração do medicamento correta no organismo, de acordo com a prescrição do profissional competente, neste caso o médico veterinário.

No artigo de Liu et al (2004, Vol. 93, Nº 1), foi realizado um experimento com a ellipticine (agente anti-câncer) onde se foi medido a liberação controlada do medicamento através de filmes de diferentes polímeros, entre eles o PLA, que é um dos polímeros abordados nesse trabalho. O resultado do experimento está exposto na figura 11 a seguir:

Figura 11: Liberação controlada de Ellipticine em diferentes polímeros

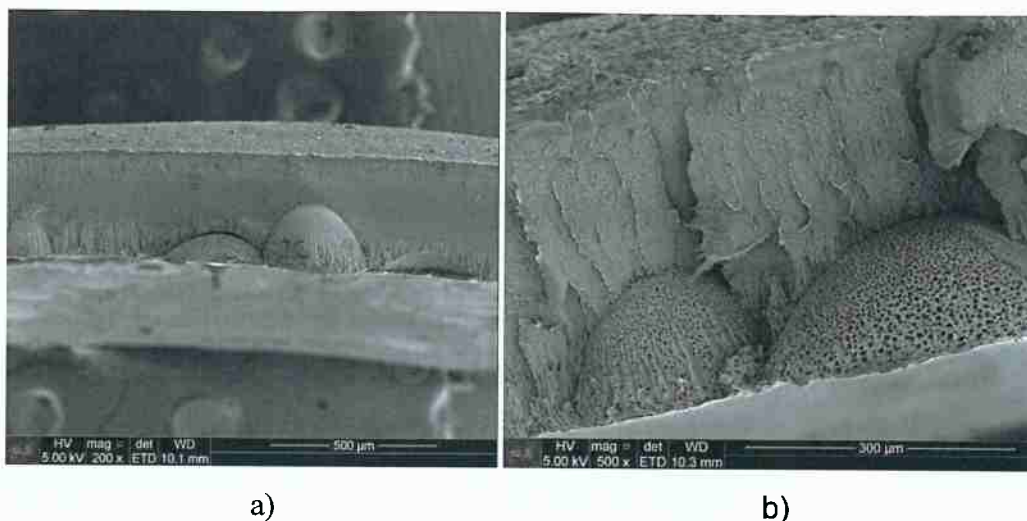


Fonte: LIU; Juba et al; 2007

Pode-se verificar da figura 11 que os medicamentos mais promissores para elaboração de um dispositivo de liberação controlada são os que possuem como matrizes poliméricas o PLA e o PCL (Policaprolactona), visto que o PBLA (Poli- $\beta$ -benzil-L-aspartato) mantém constante a liberação de droga, ou seja, ele não é eficiente para liberar o medicamento tanto quanto o PLA e o PCL.

A microscopia da amostra 3, em diferentes escalas está exibida na figura 12, a seguir:

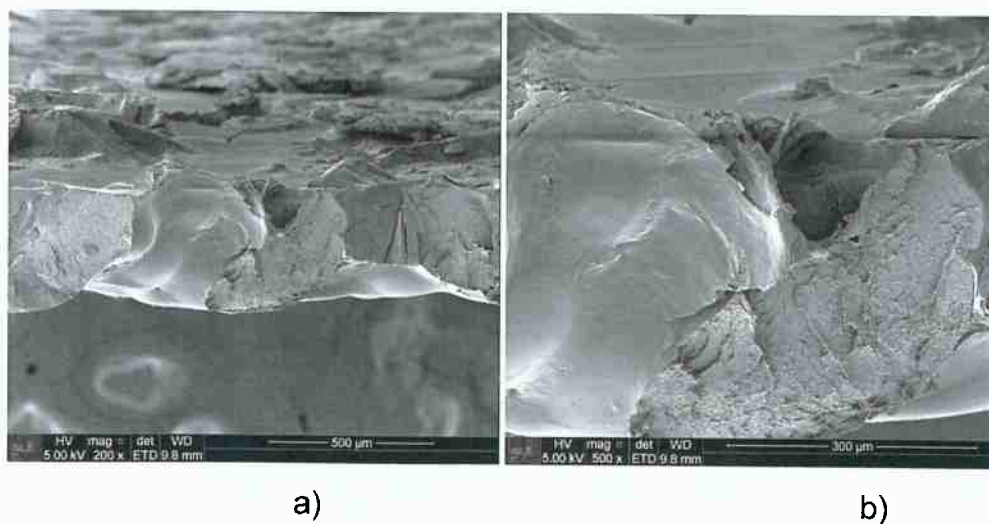
Figura 12: Análise da superfície da amostra 3 em diferentes escalas:  
a) esquerda 200x e b) direita 500x



A figura 12, amostra 3, a qual se produziu o filme polimérico com ausência do antibiótico tetraciclina, pode se observar os pequenos poros do lado direito da imagem, o que é positivo, visto que os poros formados são responsáveis pelo controle da liberação do medicamento no organismo, ou seja, é necessário que a microestrutura seja adequada para que a liberação do medicamento atenda ao objetivo, que é a eliminação do agente infeccioso. E o controle da porosidade é fundamental para tal propósito.

A análise da amostra 4, em diferentes escalas encontra-se na figura 13, a seguir:

Figura 13: Análise da superfície da amostra 4 em diferentes escalas:  
a) esquerda 200x e b) direita 500x

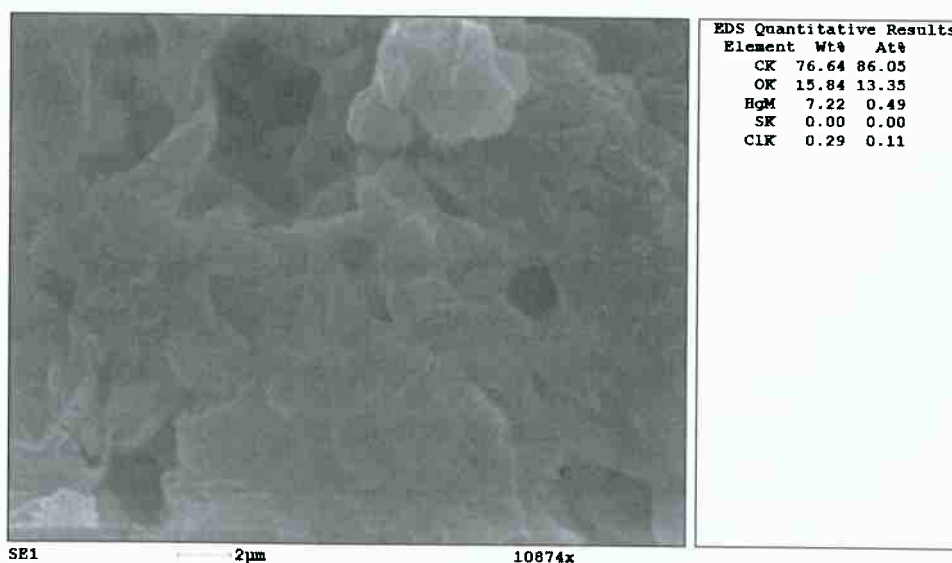


Ao analisar a figura 13, que apresenta a amostra 4, a qual não obteve sucesso na formação do filme, pode se observar em ambas as escalas uma superfície irregular, com fraturas e deformidades, o que inviabiliza a deposição de tetraciclina através da metodologia de camadas (metodologia 2), visto que é necessário a formação de uma camada homogênea de PLA para que haja sucesso na deposição da Tetraciclina, ou seja, que haja pouca difusão entre uma camada e a outra, o que significa uma maior concentração do antibiótico em sua camada de origem, aplicada posteriormente após a deposição da camada de PLA.

Uma das explicações para a formação de um filme de PLA pouco homogêneo é o controle da velocidade de evaporação, visto que nessa amostra, o controle de evaporação dos solventes não foi o suficiente para evitar a formação de bolhas e de fraturas decorrentes desse processo.

Utilizando a técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), se obteve a composição química da amostra 4, que contém a composição completa para a formação do filme, propósito do trabalho em questão. O percentual em massa (% wt) e o percentual atômico (% at) dos elementos químicos encontrados encontram-se na figura 14:

Figura 14: Composição química da amostra 4, contendo Tetraciclina



Através da técnica de EDS é possível verificar que cerca de 92% em massa (%wt) corresponde a Carbono (C) e ao Oxigênio (O), assim como quase 100% em partículas (At%) em relação aos mesmos elementos químicos anteriormente citados. Na mesma análise é possível verificar que a amostra resultante é composta praticamente de elementos pertencentes ao PLA e a Tetraciclina. Uma quantidade pouco significativa de Cloro (Cl), menos que 1% tanto em massa quanto em partículas também foi encontrada. Esse resultado era esperado, visto que este elemento é encontrado no clorofórmio (solvente que sofreu evaporação após sua diluição no PLA) e na tetraciclina. Contudo, a presença de Mercúrio (Hg), mesmo que em pequenas quantidades, sinaliza que durante o preparo, a amostra foi contaminada, visto que em nenhum momento durante o procedimento experimental entrou-se em contato com tal metal pesado e tóxico.

## 6. CONCLUSÃO

A utilização do método de contribuição de grupo para a previsão de solubilidade de Hoftyzer e Van Krevelen é uma alternativa para verificar a possibilidade de criação de um novo composto, pois apesar dos desvios em relação a literatura encontrada, ela previu a solubilidade do PLA no Clorofórmio, o que de fato ocorreu durante o trabalho, assim como pelo gráfico construído, verifica-se que o metanol tem mais afinidade pelo PEG 6000 do que pelo Clorofórmio, devido as interações por ponte hidrogênio.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que a metodologia 2 de produção dos filmes produz uma estrutura mais homogênea, com a formação de micro poros mais homogêneos. Isto indica que é importante controlar a velocidade de evaporação dos solventes durante a preparação do filme.

Apesar de não ter sido feito uma análise por EDS nas amostras que passaram pelo método 1, isto é, o filme polimérico sem a espera de 24 horas para que houvesse a deposição separada das soluções de PLA e de Tetraciclina na placa de Petri, observou-se que no método 2 que utilizou-se do intervalo de 24 horas para a deposição da camada de Tetraciclina após àquela de 20% p/v de PLA em clorofórmio, ocorreu uma baixa incidência de cloro residual do solvente (previsto,

pois o cloro também está incluso na molécula de tetraciclina), o que significa que a evaporação foi bem sucedida.

Como sugestão, será necessário realizar procedimentos experimentais com as bactérias mais comuns encontradas nas metrites a serem tratadas com esse antibiótico, tais como *Arcanobacterium pyogenes* e *Escherichia coli*, para que se possa analisar a eficiência do medicamento no tratamento e também para verificar se a taxa de liberação controlada do medicamento atende as normas do ponto de vista clínico, para que de fato o medicamento reduza o fator humano na aplicação do antibiótico, visto que ele é um dos fatores de não eficácia do tratamento terapêutico, seja pela não regularidade da aplicação do medicamento, respeitando os horários estabelecidos pelo médico veterinário, quando pela ausência de mão-de-obra disponível para tal procedimento.

## 7. REFERÊNCIAS

- [1] FÖLDI, J. et al. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Animal reproduction science*, v. 96, n. 3, p. 265-281, 2006.
- [2] <https://www.milkpoint.com.br/radartecnico/reproducao/classificacaodasinfeccoes-uterinas-das-vacas-leiteiras-30546n.aspx>, acessado em 23/01.
- [3] <http://www.revistaveterinaria.com.br/2012/12/03/doencas-puerperais-em-vacas-seus-sintomas-e-consequencias/>, acessado em 23/01.
- [4] <http://biologianet.uol.com.br/saude-bem-estar/importancia-uso-correto-antibioticos.htm>, acessado em 23/01.
- [5] MARTINS, T. M.; BORGES, A. M. Avaliação uterina em vacas durante o puerpério. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 433-443, 2011.
- [6] JÚNIOR, AP Marques; MARTINS, T. M.; BORGES, Á. M. Abordagem diagnóstica e de tratamento da infecção uterina em vacas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 2, p. 293-298, 2011.
- [7] <https://www.ourofinosaudeanimal.com/ourofinoemcampo/categoria/artigos/doencas-do-trato-reprodutivo-de-bovinos-leiteiros/> acessado em 03/07/2018
- [8] <https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/reproducao/incidencia-de-endometrite-subclinica-em-vacas-holandesas-secas-e-vazias-74726n.aspx>, acessado em 24/01.
- [9] [https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/PG\\_reprod.pdf](https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/PG_reprod.pdf),  
Dissertação Adriana Frizzo, 2002, acessado em 24/01.
- [10] RAYMUNDO, Camila de Moraes. Aplicação de prostaglandina como rotina no pós-parto de vacas leiteiras, Dissertação, Lavras-MG, 2010.
- [11] DE ARAÚJO, Daniele Ribeiro et al. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. *Rev Bras Anesthesiol*, v. 53, n. 5, p. 663-671, 2003.
- [12] YU, Shu-Huei et al. Antibacterial activity of chitosan–alginate sponges incorporating silver sulfadiazine: Effect of ladder-loop transition of interpolyelectrolyte complex and ionic crosslinking on the antibiotic release. *Journal*

Bof applied polymer science, v. 98, n. 2, p. 538-549, 2005.

- [13] VILLANOVA, Janaina CO; ORÉFICE, Rodrigo L.; CUNHA, Armando S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. Polímeros: Ciência e tecnologia, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.
- [14] ALLEN JR, Loyd V.; POPOVICH, Nicholas G.; ANSEL, Howard C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos-9. Artmed Editora, 2013.
- [15] <http://www.medicinanet.com.br/bula/5587/zoladex.htm>, acessado em 25/01.
- [16] <http://www.medicinanet.com.br/bula/4679/septopal.htm>, acessado em 25/01.
- [17] Smith, Billy I., and C. A. Risco. "Therapeutic and management options for postpartum metritis in dairy cattle." *Compendium* 24 (2002): 92-100.
- [18] Van Krevelen, Dirk Willem, and Klaas Te Nijenhuis. *Properties of polymers: their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions*. Elsevier, 2009.
- [19] Kitak, Teja, et al. "Determination of solubility parameters of ibuprofen and ibuprofen lysinate." *Molecules* 20.12 (2015): 21549-21568.
- [20] Varanda, Fatima, et al. "Solubility of antibiotics in different solvents. 1. Hydrochloride forms of tetracycline, moxifloxacin, and ciprofloxacin." *Industrial & engineering chemistry research* 45.18 (2006): 6368-6374.
- [21] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/polyllactide1234598765?lang=pt&region=BR>, acessado em 28/07.
- [22] Batista, Matheus Maciel. "Determinação dos parâmetros de solubilidade de óleos vegetais, biodieseis, diesel e blendas biodiesel-diesel." (2014).
- [23] Udipi, Kishore, et al. "Biocompatible controlled release coatings for medical devices and related methods." U.S. Patent No. 8,088,404. 3 Jan. 2012.
- [24] Liu, Jubo, Yuehua Xiao, and Christine Allen. "Polymer–drug compatibility: a guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, ellipticine." *Journal of pharmaceutical sciences* 93.1 (2004): 132-143.
- [25] Pimentel, Lúcio Figueira, et al. "Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária." (2007).