

Silvia Iovine Kobata

USO DO CIPROFLOXACINO EM  
DIFERENTES DOSES INCORPORADO EM  
DISPOSITIVO DE QUITOSANA NA  
PREVENÇÃO DA INFECÇÃO EM MODELO  
DE FRATURAS EXPOSTAS EM RATOS

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte, 2017**

Silvia Iovine Kobata

USO DO CIPROFLOXACINO EM  
DIFERENTES DOSES INCORPORADO EM  
DISPOSITIVO DE QUITOSANA NA  
PREVENÇÃO DA INFECÇÃO EM MODELO  
DE FRATURAS EXPOSTAS EM RATOS

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina.**

**Área de concentração: cicatrização**

**Linha de pesquisa: Estudo clínico e experimental dos defeitos da parede abdominal.**

**Orientadora: Profa. Dra. Ivana Duval de Araújo**

**Coorientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Moreira Teixeira**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte, 2017**

**Silvia Iovine Kobata**

**USO DO CIPROFLOXACINO EM DIFERENTES DOSES  
INCORPORADO EM DISPOSITIVO DE QUITOSANA NA  
PREVENÇÃO DA INFECÇÃO EM MODELO DE FRATURAS  
EXPOSTAS EM RATOS**

Dissertação apresentada e defendida perante Comissão  
examinadora constituída pelos Professores:

---

Profa. Dra. Ivana Duval de Araújo (Orientadora)

---

Prof. Dr.

---

Prof. Dr.

---

Suplente 1

Belo Horizonte, 18 de Setembro, 2017

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitor: Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-reitor de Pós-Graduação: Profa. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Dr. Ado Jório de Vasconcelos

### FACULDADE DE MEDICINA.

Diretor: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor: Prof. Dr. Humberto José Alves

### CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Armando Cunha de Marco

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

Coordenador: Prof. Dr. Túlio Pinho Navarro

Subcoordenador: Profa. Dra. Vivian Resende

Prof. Dr. Agnaldo Soares Lima

Prof. Dr. Marcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

Representante discente: Taíse Miriam Cruz Mosso Ramos

# AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Ivana Duval Araújo, por possibilitar a realização de um sonho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Luiz Eduardo Moreira Teixeira, pela paciência e todo o auxílio prestado.

À equipe de laboratório de radioisótopos, em especial à Profa. Dra. Simone Odilia Antunes Fernandes que sempre me apoiou, ensinou e tornou esse trabalho possível. Agradeço ainda as alunas da faculdade de farmácia, que tanto me ajudaram nesse percurso.

Ao Prof. Dr. André Augusto Gomes Faraco, pela colaboração com o material utilizado nos experimentos e pelo ombro amigo que incentivava o projeto.

À Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal, pela colaboração no trabalho e pela paciência salpicada com bom humor contagiante.

À equipe do Biotério da Faculdade, em especial à Flavia Pereira Santos e ao Marcelo Moreira de Jesus pela ajuda com os animais e pela amizade nessa longa jornada.

À Profa. Dra. Vivian Resende pela dedicação junto ao programa de pós-graduação.

Por fim agradeço minha família, meu esposo querido Costabile, meu filhote Eduardo e meu irmãozinho Marcio, pelo apoio incondicional na vida e no trabalho.

*À família que sempre me apoiou na  
sanidade e na loucura.*

# Resumo

Fraturas expostas são ocasionadas principalmente após traumatismos de alta energia e tem a osteomielite como complicação mais comum. O tratamento preconizado inclui debridamento da fratura exposta associado a altas doses de antibiótico sistêmico, sendo o ciprofloxacino um dos antibióticos utilizados na prática clínica. Apesar dos avanços no desenvolvimento de novos antimicrobianos, as taxas de infecção após fraturas expostas infectadas permanecem inalteradas nos últimos anos o que gera um alto custo econômico e social. A aplicação de dispositivo absorvível, impregnado com ciprofloxacino no material de síntese em fraturas expostas e infectadas poderia prevenir a necessidade de cirurgias adicionais, ao fornecer doses suficientes de antimicrobiano no tecido ósseo infectado para prevenção de osteomielite. Entretanto, não existe consenso na literatura sobre a dose ideal de antimicrobiano a ser aplicado diretamente no local da fratura exposta infectada. **Objetivo.** Avaliar a eficiência do ciprofloxacino incorporado em polímero absorvível em diferentes doses para controle da infecção óssea após modelo de fratura exposta infectada com *Staphylococcus aureus* em ratos. **Metodologia:** Foram utilizados 52 ratos Wistar adultos após cálculo amostral em que se optou por adotar nível de significância de 5% e poder do teste de 90%. Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos, foram submetidos a fratura padronizada, unilateral, da diáfise do fêmur. O foco de fratura foi então exposto e contaminado cirurgicamente através da inoculação de  $2,6 \times 10^6$  UFC de *Staphylococcus aureus*. Após 1 hora, a fratura foi estabilizada com implante intramedular de acordo com o grupo a qual pertencia: Grupo A (n=11), tratados apenas com a fixação interna; Grupo B (n=8), tratados com fixação interna e ciprofloxacino na dose de 10mg/kg por via intramuscular a cada 12 horas, durante 72 horas; Grupo C (n=8), tratados com fixação interna com implante impregnado com filme de quitosana; Grupo D (n=7), tratados com fixação interna com implante impregnado com filme de quitosana com 10% de ciprofloxacino; Grupo E (n=8), tratados com fixação interna e implante impregnado com filme de quitosana com

25% de ciprofloxacino; Grupo F (n=10), tratados com fixação interna e implante impregnado com filme de quitosana com 50% de ciprofloxacino. Após 4 semanas do tratamento cirúrgico, os animais foram submetidos a imagens cintilográficas utilizando radiofármaco com ceftizoxima marcada com tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ -CFT) para quantificação da infecção residual e, a seguir, avaliação macroscópica da área da fratura, mensuração do calo ósseo e avaliação histológica do foco de fratura. Para análise estatística foram utilizados teste ANOVA, t-Student e Kruskal Wallis para as variáveis quantitativas, e teste qui quadrado com correção de Fisher para as variáveis qualitativas. **Resultados:** Não houve diferença na formação do calo ósseo entre os grupos ( $p>0,05$ ), apesar da histologia mostrar retardo na formação da matriz óssea no grupo em que foi utilizado ciprofloxacino a 50%. Houve predomínio de matriz óssea em formação no grupo A ( $p<0,05$ ), enquanto no grupo F houve leve quantidade de matriz óssea em formação ( $p<0,05$ ). A avaliação da persistência da contaminação avaliada pela cintilografia com  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT não mostrou diferença significativa entre os grupos A e C ( $p>0,05$ ), demonstrando que a quitosana não apresentou efeito antibiótico significativo. Houve diferença quando comparados os grupos C e E ( $p<0,05$ ), mostrando que o dispositivo de quitosana com ciprofloxacino na concentração de 25% foi eficaz no controle da infecção óssea aguda, o que também foi visto no dispositivo de quitosana com ciprofloxacino na concentração de 50%, com diferença entre os grupos A e F ( $p<0,05$ ) e entre os grupos C e F ( $p<0,05$ ). **Conclusão:** o uso tópico do antibiótico ciprofloxacino a 25% e a 50% foi eficaz no tratamento da infecção óssea em fraturas expostas infectadas com *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, na dose de 50% de ciprofloxacino houve redução histológica na cicatrização, porém sem repercussão do ponto de vista macroscópico em termos de formação do calo ósseo após 4 semanas da fratura.

[Palavras Chave: Fraturas ósseas/complicações. Fratura exposta. Osteomielite/cintilografia. Osteomielite/tratamento.  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT.]

# Abstract

Open fractures are mainly caused by high-energy accidents. Osteomyelitis are the most common complication from open fractures and its treatment involves surgical treatment and high doses of systemic antibiotics. Despite all medical and pharmacological advances, infection rates after open fractures has not changed in the past 20 years, promoting high social and economic costs. A bio absorbable carrier for ciprofloxacin could prevent the need for additional surgical procedure when impregnated at osteo-fixation device; however, the exact concentration of ciprofloxacin that would prevent infection at the open fracture site remains controversial. **Objective.** Evaluate efficiency of local delivery treatment using different concentrations of ciprofloxacin incorporated at the fixation device using quitosana as carrier, a bio absorbable polymer, in order to prevent infection after open fracture contaminated with *S. aureus* in rats. **Methods.** 52 Wistar rats underwent to an established *S aureus* contaminated fracture model. All animals assigned to one of six groups after one hour of bacterial contamination. Group A underwent to fracture fixation using K-wire but no antibiotic treatment (control group). Group B after fracture fixation with K-wire had systemic ciprofloxacin treatment. Group C underwent to fracture fixation using K-wire impregnated with quitosana only. Group D had fracture fixation using K-wire with quitosana and 10% ciprofloxacin impregnated. Group E underwent to fracture fixation using K-wire with quitosana and 25% ciprofloxacin impregnated, and group F had fracture fixation using K-wire with quitosana and 50% ciprofloxacin impregnated. After 4 weeks, all animals underwent to an established <sup>99m</sup>Tc-ceftizoxima scintigraphy evaluation, callus formation measurement and histological analysis. ANOVA, t-Student and Kruskal Wallis were used for quantitative variables statistical analysis, whereas qui square and exact Fisher were used for qualitative variables. **Results.** Treatment using 25% and 50% of ciprofloxacin incorporated at the fracture fixation device were effective in preventing bone infection compared to control group ( $p < 0,05$ ). Quitosana were not effective in preventing bone infection when used alone compared to control group ( $p > 0,05$ ).

Histological findings demonstrated bone-healing delay with 50% of ciprofloxacin treatment. However, no difference in callus formation measurement were observed between groups ( $p>0,05$ ). **Conclusion.** Local delivery treatment for contaminated open fracture with *Staphylococcus aureus* using a bio absorbable polymer with ciprofloxacin impregnated is effective when ciprofloxacin concentration is above 25% in rats.

**[Key words:** Bone infection. Open fracture. Local antibiotics. Research. <sup>99m</sup>Tc-CFT]

# Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

$^{99m}\text{Tc}$	Tecnécio 99 metaestável
$^{99m}\text{Tc-CFT}$	Ceftizoxima marcada com tecnécio 99m
$^{99m}\text{Tc-MDP}$	Metileno Difosfato-tecnécio 99m
ANOVA	Análise de Variância
°C	graus Celsius
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEBIO	Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
CETEA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
CFT	Ceftizoxima
Ci	Currie
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
Fig	Figura
g	Grama
HE	Hematoxilina-Eosina
MBq	Megabecquerel
mCi	Milicurrie
ml	Mililitro
n (amostral)	Número que representa o tamanho da amostra a ser estudada
mm	Milímetro

mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado
Na <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub>	Pertecnetato de Sódio
Nm	Nanômetro
PR	Pureza radioquímica
®	Marca registrada
ROI	Região de interesse cintilográfica.
SPSS	Statistical Package of Social Sciences
TAB	Tabela
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
vs	Versus
%v/v	Porcentagem em relação ao volume por volume

# LISTA DE FIGURAS

<i>FIGURA 1 Animal limpo no qual foi realizado tricotomia da área de interesse, previamente ao ato cirúrgico. ....</i>	<i>29</i>
<i>FIGURA 2 Aparelho tipo guilhotina para realização de fratura padronizada no fêmur dos ratos. ....</i>	<i>30</i>
<i>FIGURA 3 Placa de Petri contendo Ágar com as cepas de Staphylococcus aureus. Em seu interior observa-se os retângulos de dimensões 2,5x5mm de lado. ....</i>	<i>31</i>
<i>FIGURA 4 Gama câmara com colimador de baixa energia utilizado para análise cintilográfica da radioatividade na região de interesse do estudo. ....</i>	<i>33</i>
<i>FIGURA 5 Imagem da captação da cintilografia após 6 horas da injeção de <sup>99m</sup>Tc-CFT. Área retangular demarcada sobre pata esquerda do animal demonstra a concentração do radiofármaco no fêmur infectado e ausência de concentração no fêmur contralateral. ....</i>	<i>34</i>
<i>FIGURA 6 Imagem da captação da cintilografia: ROI sobre pata direita do animal demonstrando a baixa concentração do rádio fármaco no fêmur infectado e ausência de concentração no fêmur contralateral. ....</i>	<i>34</i>
<i>FIGURA 7 Dissecção da pata de animal apresentando supuração evidente proveniente do foco de fratura. ....</i>	<i>35</i>
<i>FIGURA 8 Imagens cintilográficas de ratos após 6 horas da injeção de <sup>99m</sup>Tc-CFT, representativas de cada grupo de animais estudados: A – grupo sem tratamento; B – grupo de tratamento com ciprofloxacino sistêmico; C – grupo tratado com haste revestida por quitosana; D – grupo tratado com haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – grupo tratado com haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – grupo tratado com haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino. ....</i>	<i>40</i>
<i>FIGURA 9 Avaliação cintilográfica da infecção residual do fêmur após 4 semanas de fratura exposta e infecção com S. aureus. Estão representados a mediana e respectivos valores mínimos e máximos obtidos em cada grupo. ....</i>	<i>41</i>
<i>FIGURA 10 Avaliação prévia da radioatividade do rádio fármaco utilizado em cada grupo de tratamento. Estão representados os valores mínimos, máximos e respectivas médias. ....</i>	<i>42</i>
<i>FIGURA 11 Radioatividade residual da seringa utilizada nos animais em seus respectivos grupos. ....</i>	<i>43</i>

<i>FIGURA 12</i> Captação cintilográfica média obtida na região da fratura exposta previamente infectada com <i>S aureus</i> de acordo com o grupo de estudo. ....	44
<i>FIGURA 13</i> Avaliação macroscópica da consolidação óssea após 4 semanas de fratura exposta infectada com <i>S aureus</i> em estão representados os valores mínimos e máximos em centímetros e suas respectivas médias em relação ao calo ósseo mensurado.....	46
<i>FIGURA 14</i> Micrografia em hematoxilina e eosina da área de fratura do fêmur de ratos após quatro semanas. Presença de osteomielite com destruição das matrizes e trabéculas osseas de um lado (seta), do outro lado da lâmina evidencia-se processo cicatricial evidente pela presença de tecido conjuntivo em formação .....	47
<i>FIGURA 15</i> Micrografia em hematoxilina e eosina da área de fratura do fêmur de ratos após quatro semanas demonstrando processo inflamatório predominantemente neutrofílico de permeio a trabéculas ósseas necróticas (setas pretas). À esquerda (seta verde) observamos tecido conjuntivo em formação.....	47
<i>FIGURA 16</i> Avaliação histológica em relação a quantidade de infiltrado inflamatório encontrado local da fratura infectada por <i>Staphylococcus aureus</i> no fêmur de ratos .....	50
<i>FIGURA 17</i> Avaliação histológica em relação a angiogênese encontrada no local da fratura infectada por <i>Staphylococcus aureus</i> no fêmur de ratos. Estão representados os valores mínimos, máximos e suas respectivas médias. ....	51
<i>FIGURA 18.</i> Avaliação histológica em relação ao tecido conjuntivo denso (fibroplasia) encontrado no local da fratura infectada por <i>Staphylococcus aureus</i> no fêmur de ratos. Estão representados os valores mínimos, máximos e suas respectivas médias. ....	52
<i>FIGURA 19</i> Avaliação histológica em relação a matriz óssea em formação encontrada local da fratura infectada por <i>Staphylococcus aureus</i> no fêmur de ratos. Estão representados os valores mínimos, máximos e suas respectivas médias.....	53

# LISTA DE TABELAS

<i>TABELA 1 – Frequência de supuração na ferida cirúrgica de ratos submetidos a fratura exposta do fêmur e contaminação com Staphylococcus aureus.....</i>	<i>39</i>
<i>TABELA 2 – Avaliação cintilográfica obtida 4 semanas após fratura exposta infectada com S aureus de acordo com cada grupo.....</i>	<i>45</i>
<i>TABELA 3 – Frequência de infiltrado inflamatório no local da fratura infectada por Staphylococcus aureus no fêmur de ratos .....</i>	<i>48</i>
<i>TABELA 4–Frequência de angiogênese encontrada no local da fratura infectada por Staphylococcus aureus no fêmur de ratos .....</i>	<i>48</i>
<i>TABELA 5– Frequência de fibroplasia (tecido conjuntivo denso) no local da fratura infectada por Staphylococcus aureus no fêmur de ratos.....</i>	<i>49</i>
<i>TABELA 6– Frequência de matriz óssea em formação no local da fratura infectada por Staphylococcus aureus no fêmur de ratos.....</i>	<i>50</i>

# Sumário

---

1	INTRODUÇÃO .....	18
2	OBJETIVO .....	23
2.1	OBJETIVO SECUNDÁRIO .....	23
3	RELEVÂNCIA .....	24
4	MÉTODO .....	26
4.1	PARECER ÉTICO.....	26
4.2	ANIMAIS UTILIZADOS E CUIDADOS DISPENSADOS .....	26
4.3	DESENHO DO EXPERIMENTO.....	27
4.4	ATO CIRÚRGICO.....	28
4.5	PREPARAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO .....	30
4.6	CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS .....	31
4.7	MARCAÇÃO DO RADIOFÁRMACO $^{99m}\text{Tc}$ -CFT.....	32
4.8	IMAGENS CINTILOGRÁFICAS COM $^{99m}\text{Tc}$ -CFT .....	32
4.9	AVALIAÇÃO DA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA .....	35
4.10	MORTE E DESTINAÇÃO DOS ANIMAIS.....	36
4.11	ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	36
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS.....	39
5.1	PÓS-OPERATÓRIO .....	39

5.2 CINTILOGRAFIA .....	39
5.3 MENSURAÇÃO DO CALO ÓSSEO .....	45
5.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA .....	46
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÃO .....	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
9 ANEXOS E APÊNDICE .....	66

# 1 INTRODUÇÃO

Fraturas expostas são ocasionadas principalmente após traumatismos de alta energia, podendo apresentar graus variáveis de acometimento dos tecidos adjacentes no qual a ruptura da barreira natural da pele e dos tecidos moles circundantes à fratura permite a comunicação do hematoma da lesão óssea com o meio externo. (1–4)

Diversas consequências podem advir da exposição do foco de fratura com o meio ambiente sendo a infecção a complicação mais frequente. O desenvolvimento de infecção depende tanto de fatores intrínsecos do hospedeiro quanto fatores locais: como grau da contaminação bacteriana, intensidade da desvitalização tecidual, insuficiência na cobertura cutânea e ocorrência de necrose tecidual. (5–12)

A infecção do tecido ósseo é denominada osteomielite, e em adultos o principal agente etiológico é o *Staphylococcus aureus*, enquanto bactérias gram-negativas são responsáveis por aproximadamente 20% dos casos. (13,14)

A erradicação da infecção óssea após ocorrência de fratura exposta ainda é um desafio; apesar do tratamento cirúrgico e terapia com antibiótico por via sistêmica guiada por culturas. A osteomielite aguda quando não controlada progride para cronicidade, o que gera destruição óssea, deformidade, dor, supuração crônica, necessita intervenções cirúrgicas e antibioticoterapia prolongada, o que aumenta custo tanto econômico quanto social. (3,8–10,15–17).

As fraturas expostas ocorrem em aproximadamente em 11,5 a cada 100 mil pessoas por ano.(18,19) E, em 80% dos casos a osteomielite tem origem pós traumática ou pós operatória através da inoculação direta da bactéria no tecido

ósseo desvitalizado, especialmente após fraturas expostas grau III segundo classificação de Gustilo e Anderson. (1,8,9,20)

Apesar dos avanços no conhecimento desta afecção, os tratamentos das fraturas expostas tiveram pouca alteração nos últimos 20 anos, sendo que as taxas de infecção se mantiveram as mesmas ao longo desse período.(1,8)

O ciprofloxacino é um dos antibióticos utilizados com frequência na prática clínica, especialmente devido ao aumento das taxas de infecções resistentes aos aminoglicosídeos, além de apresentar ótimas biodisponibilidade e penetração óssea.(10,21,12).

O cloridrato de ciprofloxacino é amplamente utilizado no tratamento das infecções ósseas, pertence à família das fluoroquinolonas, atua em um largo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. Age através do bloqueio de DNA girase, que é essencial para a reprodução do DNA da bactéria. Apresenta boa biodisponibilidade oral e penetração óssea, o que torna seu uso bastante frequente no tratamento da osteomielite. (24,32,36,43)

Apesar de não se ter observado efeito teratogênico na utilização do cloridrato de ciprofloxacino, seu emprego na forma oral pode causar efeitos colaterais tais como náuseas, vômitos, diarreias, dores abdominais, dores de cabeça, entre outros.

Portanto a incorporação de ciprofloxacino em biomateriais destinados a implantes no tratamento de fraturas expostas pode ser vantajosa ao minimizar esse tipo de desconforto para o paciente, uma vez que a droga poderá ser liberada em altas concentrações diretamente no local da infecção. (6,31,32,37,44).

Altas doses de antibiótico são necessárias para que o antibiótico sistêmico seja efetivo no controle bacteriano no local da fratura de modo a fornecer concentrações adequadas nos tecidos com suprimento vascular comprometido pelo trauma e ainda contaminado por bactérias patogênicas. Assim sendo, a presença de efeitos colaterais pela toxicidade sistêmica do antibiótico pode se apresentar como graves consequências a essa modalidade de tratamento. (14,22,23)

Estudo prévio utilizando modelo experimental em ratos para o tratamento de fraturas expostas demonstrou que animais tratados com debridamento da fratura exposta e utilização de antibiótico por via sistêmica na dose convencional ocasionou infecção em 50% dos casos, enquanto que os animais tratados com doses sistêmicas 5 vezes maiores obtiveram efetivo controle infeccioso da fratura exposta infectada com *Staphylococcus aureus*. (24)

A teoria mais recente para explicar a dificuldade na erradicação do patógeno do tecido ósseo se apoia no modelo do biofilme, onde uma camada multicelular complexa e organizada de bactérias se acumula embebida em uma matriz extracelular de polissacarídeos ou proteínas (1,25–28). Dessa maneira, as bactérias são capazes de se comunicar através de sinais bioquímicos, permitindo o comportamento coordenado, inclusive entre cepas de espécies diferentes de bactérias. Essa matriz oferece proteção mecânica, como uma barreira de difusão contra antibióticos, anticorpos ou células de defesa do organismo, o que pode reduzir a sensibilidade a antibióticos em até mil vezes. (25–27,29)

A formação do biofilme bacteriano inicia-se a partir da inoculação e pode ser combatida através da limpeza cirúrgica dos tecidos contaminados e pela utilização de altas doses de antibiótico endovenoso por pelo menos 72 horas (8–10,30)

Historicamente, Charnley em 1960 descreveu a utilização de cimento ósseo a base de polimetilmetacrilato para a fixação de implantes metálicos e em 1970 Buchholz e Engelbrecht avaliaram o potencial de utilização do cimento como carregador de antibiótico para o tratamento local da infecção. Entretanto, a utilização do cimento de polimetilmetacrilato apresenta algumas desvantagens como ser não absorvível e desta maneira requerer novas intervenções cirúrgicas para sua retirada, além de apresentar reação exotérmica durante sua utilização o que resulta liberação de radicais livres, necrose óssea adicional aos tecidos adjacentes. Estudos demonstram, ainda, que a liberação efetiva do antibiótico no tecido adjacente a sua colocação é de apenas 5 a 8% do antibiótico inicialmente impregnado no polimetilmetacrilato. (13,12,31,32)

Nesse contexto, a utilização de um polímero natural absorvível apresenta inúmeras vantagens sobre o polimetilmetacrilato como: facilidade na aplicação, biocompatibilidade e biodegradabilidade, dispensar a necessidade de novas intervenções cirúrgicas e fornecer doses controladas de antibióticos diretamente no tecido contaminado.(1,25,29,31)

A Quitosana é um heteropolímero natural, hidrofílico, derivado da quitina, e vem sendo estudada devido a sua versatilidade na capacidade de carregar fármacos de liberação controlada, facilitar regeneração celular, ser promotor de osteogênese, ter propriedades antibacterianas e pela possibilidade de se confeccionar membranas artificiais, géis e filmes. (25,29)

Um modelo de antibioticoterapia local se faz necessário para o efetivo controle da infecção óssea, porém a dose necessária para o tratamento da infecção após fraturas expostas contaminadas ainda permanece controversa.

A utilização de antibiótico com liberação controlada utilizando um veículo absorvível para o tratamento da fratura exposta infectada se apresenta como uma alternativa para o controle da infecção do tecido ósseo, possibilitando ainda minimizar problemas da toxicidade sistêmica e melhorar a concentração inibitória bacteriana na fratura com biofilme bacteriano. (5,9,30,31,33)

Portanto, este trabalho utiliza um modelo experimental com a finalidade de identificar quais as concentrações de ciprofloxacino impregnado em implante metálico utilizando a quitosana como carregador seria eficiente no controle da infecção ocasionada após fratura exposta infectada com *Staphylococcus aureus* no fêmur de ratos.

## 2 OBJETIVO

Identificar quais concentrações de ciprofloxacino associado a polímero absorvível impregnado em implante metálico seriam capazes de inibir a infecção óssea após fratura exposta infectada com *Staphylococcus aureus* em ratos.

### 2.1 OBJETIVO SECUNDÁRIO

Avaliar a cicatrização da área de fratura após emprego de implantes metálicos impregnados com quitosana associada com ciprofloxacino em diferentes concentrações.

### 3 RELEVÂNCIA

Aproximadamente 50% das fraturas expostas contaminadas evoluem com osteomielite. (10) Altas doses de antibiótico são necessárias para que o antibiótico sistêmico seja efetivo no controle bacteriano no local da fratura exposta de modo a fornecer concentrações adequadas nos tecidos com suprimento vascular comprometido pela lesão tecidual contaminada por bactérias patogênicas. Dessa maneira, diversos sistemas de liberação de drogas têm sido recentemente estudados no intuito de encontrar um veículo capaz de associar a liberação controlada de antibiótico, auxiliar na consolidação óssea, ser biodegradável, com baixo índice de indução de processo inflamatório para a prevenção e tratamento da osteomielite.(7,13,25,31,34,35)

O tratamento com antibiótico local através do uso do cimento ósseo em humanos tem sido amplamente utilizado devido ao seu custo menor em relação ao tratamento sistêmico tradicional apesar da necessidade de cirurgias adicionais para a sua retirada.(15) Entretanto, não existe um consenso sobre qual dose de ciprofloxacino seria eficaz para prevenção e tratamento da osteomielite quando utilizado diretamente no local da fratura exposta infectada ou as possíveis complicações *in vivo* do uso de altas doses de antimicrobiano diretamente sobre o tecido ósseo fraturado.

A literatura é controversa em termos da quantidade de antibiótico ideal a ser utilizada em cada indivíduo, muitas vezes baseando-se em estudos *in vitro*, que podem não corresponder a necessidade *in vivo* para o controle efetivo da infecção.

Além do mais, um dispositivo não absorvível tende a liberar concentração variável do medicamento dependendo da sua confecção.(12,16,17,32,36,37)

Doses abaixo da concentração inibitória mínima poderiam permitir o desenvolvimento de cepas resistentes, e altas doses poderiam comprometer a capacidade de cicatrização do tecido ósseo desvitalizado.(10,12,36,17)

Este estudo tem a finalidade de avaliar a eficácia de diferentes concentrações de ciprofloxacino impregnado em filme de quitosana no tratamento de fraturas expostas infectadas com cepas de *Staphylococcus aureus* em ratos com intuito de determinar a concentração de ciprofloxacino em que há capacidade de controle efetivo da osteomielite nesses animais utilizando, para tanto, quitosana como veículo absorvível.

## 4 MÉTODO

### 4.1 PARECER ÉTICO

O presente estudo foi avaliado e aprovado por um Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), sob as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), Lei 11794/08; registrado sob o protocolo nº 228/2014 em 24/09/2014. (Anexo 1)

### 4.2 ANIMAIS UTILIZADOS E CUIDADOS DISPENSADOS

Foram utilizados neste estudo 52 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) da linhagem Wistar, com 6 semanas de vida, peso entre 300 e 350 gramas, provenientes do biotério central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – CEBIO. Os animais foram mantidos no Núcleo de Experimentação animal da Faculdade de Medicina da UFMG em caixas de polipropileno contendo cama de maravalha de pinho branco autoclavada (121°C/30minutos). As caixas foram lavadas com água quente sob pressão e desinfetadas com hipoclorito de sódio (250ppm/2 horas). A alimentação foi baseada em ração padrão para ratos (Labina®) e água filtrada *as libitum*. As condições ambientais corresponderam aos seguintes padrões: ar com 15 renovações/hora à temperatura de 22± 2°C; umidade de 50% e apresentando foto período com 12 horas de claridade e 12 horas de escuro. O registro foi realizado

através da documentação do número da gaiola, espécie e linhagem, procedência, número, sexo e data de nascimento dos animais, início do experimento, final previsto, observação e identificação do pesquisador.

#### 4.3 DESENHO DO EXPERIMENTO

O cálculo do n amostral foi realizado utilizando site [www.lee.dante.br](http://www.lee.dante.br), no qual optou-se por adotar nível de significância de 5%, com poder do teste de 90%, que resultou em 6 grupos de 8 animais. Foram selecionados 52 ratos Wistar adultos distribuídos aleatoriamente em 6 grupos. Todos os animais foram submetidos a fratura por concussão unilateral do fêmur aleatoriamente escolhido e contaminação cirúrgica através da inoculação de cepas *Staphylococcus aureus*. A fratura foi estabilizada com implante intramedular preparado de acordo com o grupo de tratamento ao qual pertencia segundo distribuição de grupos a saber:

Grupo A (controle da infecção) – fratura exposta infectada com ágar contendo *Staphylococcus aureus* e tratados com fixação interna. (n= 11)

Grupo B (controle do tratamento) – fratura exposta infectada com ágar contendo *Staphylococcus aureus* e tratados com fixação interna e antimicrobiano sistêmico, ciprofloxacino, na dose de 10mg/kg por via intramuscular a cada 12 horas, durante 72 horas. (n=8)

Grupo C (controle do veículo) – fratura exposta infectada com ágar *Staphylococcus aureus* e tratada com fixação e uso de filme de quitosana. (n=8)

Grupo D (ciprofloxacino a 10%) - fratura exposta infectada com ágar contendo *Staphylococcus aureus* e tratada com fixação e uso de filme de quitosana com 10g por 100 mg de quitosana. (n=7)

Grupo E (ciprofloxacino a 25%) – fratura exposta infectada com ágar contendo *Staphylococcus aureus* e tratada com fixação e uso de filme de quitosana com 25g por 100 mg de quitosana. (n=8)

Grupo F (ciprofloxacino a 50%) - fratura exposta infectada com ágar contendo *Staphylococcus aureus* e tratada com fixação e uso de filme de quitosana com 50g por 100 mg de quitosana. (n=10)

#### 4.4 ATO CIRÚRGICO

Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com cetamina na dose de 60 mg/Kg e Xilasina a 10 mg/Kg. A seguir, eles foram submetidos a limpeza e tricotomia da região a ser estudada (Figura 1), posicionados em dispositivo limpo com álcool 70%, composto por aço cirúrgico de forma a expor o fêmur dos ratos, promover sua estabilização e imobilização, e realizar a fratura da diáfise do osso, que ocorre de forma contusa mimetizando uma guilhotina com a ponta romba (Figura 2), capaz de produzir fraturas padronizadas seguindo-se a metodologia de estudos como Vialle et al , Pedroni e Mussi Filho et al (21,24,26,38,39)

O animal foi posicionado em mesa cirúrgica com campos esterilizados e trocados após cada procedimento. O membro inferior do animal foi então submetido a limpeza com iodo a 1%, para a seguir realizar incisão cirúrgica longitudinal na coxa do animal e dissecação longitudinal entre as fibras musculares do quadríceps e então inocular com o ágar contendo cepas cultivadas de *Staphylococcus aureus*, utilizando retângulos de 2,5 x5 mm de dimensões, retirados da Lamina de Petri utilizando bisturi com lâmina 15 e gentilmente colocados no foco da fratura.

Após 1 hora da exposição da fratura ao agente bacteriano, os animais foram então submetidos à estabilização da fratura utilizando fio de aço estéril (fio de Kirschner 1.0), posicionado dentro do canal medular sob visualização direta. O fio de aço utilizado apresentava-se envolvido ou não com o filme de quitosana com as diferentes concentrações de ciprofloxacino de acordo com o grupo de estudo a que pertencia. A ferida cirúrgica foi suturada por planos. Os animais do grupo B receberam a primeira dose do antimicrobiano no pós-operatório imediato após osteossíntese.



FIGURA 1 Animal limpo no qual foi realizado tricotomia da área de interesse, previamente ao ato cirúrgico.



FIGURA 2 Aparelho tipo guilhotina para realização de fratura padronizada no fêmur dos ratos. (fonte: autor)

#### 4.5 PREPARAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO

Para a preparação do inóculo bacteriano foi utilizada suspensão contendo cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* multissensível (ATCC6538–P). O cultivo das colônias bacterianas foi realizado utilizando Agar antibiótico nº 1. A seguir, as colônias de bactérias foram suspensas em solução salina, e sua concentração foi ajustada utilizando espectrofotometria apresentando 11% de transmitância a 580 nm, correspondendo a  $1 \times 10^9$  UFC/ml. Uma alíquota de 1ml dessa suspensão, a qual foi homogeneizada com 9ml de ágar soja tripticaseína e distribuída em placa de Petri com 80mm de diâmetro e área de aproximadamente  $5024\text{mm}^2$ . Dessa maneira, no dia do procedimento cirúrgico, o fundo da placa de Petri pode ser delimitado com retângulos de 5mm por 2,5 mm de lado, o que corresponde a área de  $12,5\text{mm}^2$ . Sabendo que a área de cada retângulo corresponderia a

aproximadamente 1/400 da área total da placa, obtivemos  $2,6 \times 10^6$  UFC a serem inoculadas em cada animal.

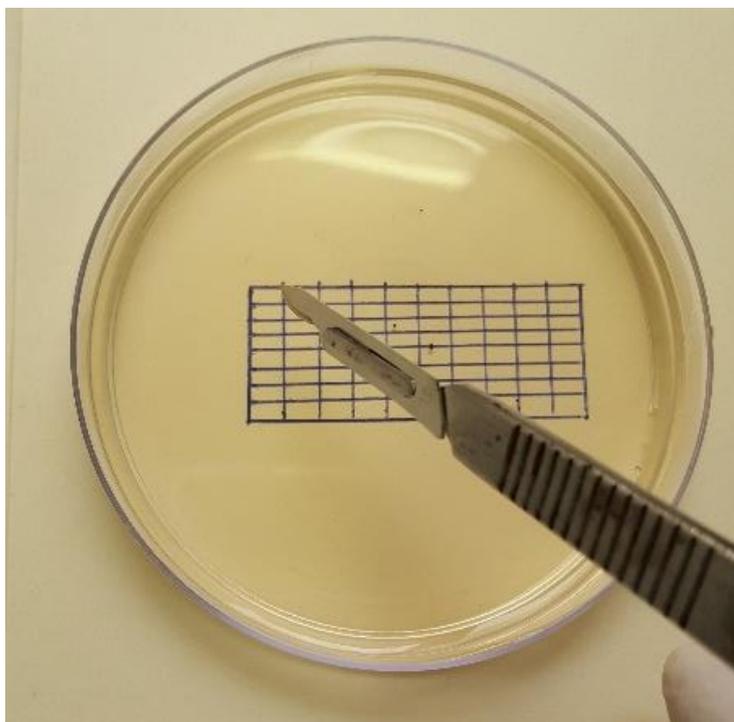


FIGURA 3 Placa de Petri contendo Ágar com as cepas de *Staphylococcus aureus*. Em seu interior observa-se os retângulos de dimensões 2,5x5mm de lado

#### 4.6 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Após a cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas coletivas, devidamente identificados e tratados com solução oral de acetaminofeno na dose de 2mg/ml na água do bebedouro durante as 48 horas seguintes. A água e a ração foram deixadas para livre demanda. Os animais tiveram boa evolução pós-operatória, voltando a ingerir água após 6 horas do término da anestesia e o alimento após 8 horas.

#### **4.7 MARCAÇÃO DO RADIOFÁRMACO $^{99m}\text{Tc}$ -CFT**

O procedimento de marcação da ceftizoxima com tecnécio-99m e a análise da pureza radioquímica (PR) foram realizados de acordo com protocolo descrito por DINIZ et al, 2005 e foi realizado no Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG. Brevemente, a CFT foi marcada com 1,2 mL de Solução de Pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ) eluída do gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m ( $^{99}\text{Mo}/^{99}\text{Tc}$ ; IPEN/CNEN), contendo atividade de 444 MBq (12  $\mu\text{Ci}$ ). O radiofármaco foi incubado por 10 minutos em banho fervente a  $100^\circ\text{C}$  e, posteriormente resfriado em água corrente por 5 minutos. Após o resfriamento a solução foi filtrada em membrana de éster de celulose (0,22 mm) e reservada em um recipiente a vácuo.(40,41). A PR foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD).

#### **4.8 IMAGENS CINTILOGRÁFICAS COM $^{99m}\text{Tc}$ -CFT**

Na quarta semana após a cirurgia, os animais foram transportados para o Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG e submetidos a sedação com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg) administradas intraperitonealmente. Após sedação, 0,1 ml de  $^{99m}\text{Tc}$ - CFT) foi injetada na veia da cauda dos animais após averiguação e padronização da radioatividade. Todas as seringas utilizadas foram também analisadas em termos de quantidade de radiação residual após a injeção em cada animal.

Após 360 minutos, os animais foram sedados novamente para a realização das imagens cintilográficas, em decúbito dorsal sob gama-câmara equipada com um colimador de baixa energia (Figura 4) de forma a adquirir imagens estáticas

planares através de matriz de 256 x 256 pixels (Nuclide™ TH22, Mediso® ,Hungria). As imagens foram analisadas através da quantificação da radioatividade da região de interesse (ROI) em todo o fêmur do animal. A radioatividade foi calculada de acordo com a contagem total obtida em 10 minutos de exposição. (21,40–42). As figuras 5 e 6 demonstram o posicionamento do animal, bem como a região de interesse com área de captação do radiofármaco.



FIGURA 4 Gama câmara com colimador de baixa energia utilizado para análise cintilográfica da radioatividade na região de interesse do estudo. (fonte: autor)

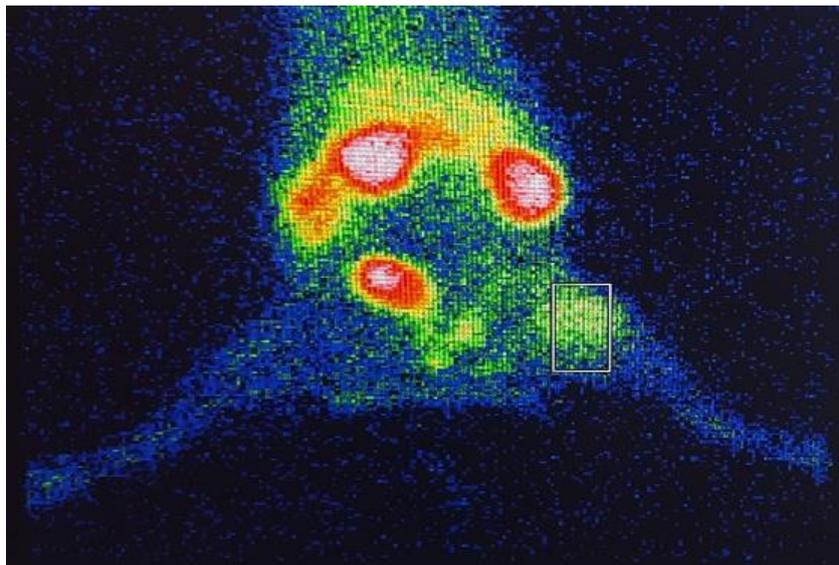


FIGURA 5 Imagem da captação da cintilografia após 6 horas da injeção de  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT. Área retangular demarcada sobre coxa esquerda do animal demonstra a concentração do radiofármaco no fêmur infectado e ausência de concentração no fêmur contralateral

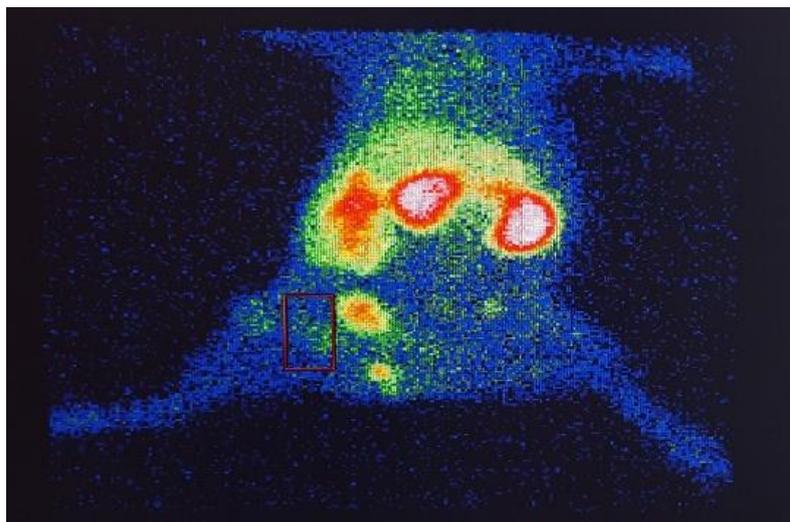


FIGURA 6 Imagem da captação da cintilografia: ROI sobre coxa direita do animal demonstrando a baixa concentração do rádio fármaco no fêmur infectado e ausência de concentração no fêmur contralateral.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA CONSOLIDAÇÃO ÓSSEA

Após 4 semanas da fratura exposta ter sido infectada com cepas de *Staphylococcus aureus* e avaliados utilizando cintilografia, os animais foram submetidos a eutanásia para avaliação macroscópica de presença de supuração no local da fratura (Figura 7), e identificação da presença de consolidação da fratura através da mensuração em milímetros do maior diâmetro do calo ósseo formado utilizando um paquímetro. Nesse momento foi coletado o material para subsequente análise histológica com intuito de avaliar o estágio da cicatrização tecidual.



FIGURA 7 Dissecção da coxa direita do animal apresentando supuração evidente proveniente do foco de fratura.

#### **4.10 MORTE E DESTINAÇÃO DOS ANIMAIS**

Os animais foram mortos utilizando-se superdose de barbitúrico por via intraperitoneal e a seguir autoclavados para posterior descarte em lixo biológico destinado a incineração.

#### **4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA.**

A análise histológica foi realizada nas amostras de tecido ósseo, periosteal e de partes moles da região da fratura infectada com o objetivo de identificar o tipo celular predominante, bem como características do estágio da cicatrização tecidual. As amostras teciduais foram identificadas com código alfa numérico de forma cega, em que o patologista não sabia a qual grupo de estudo pertencia cada amostra tecidual.

As amostras, ossos do fêmur previamente fraturados e infectados retirados de todos os animais, foram fixadas em formalina 10% (v/v) seguida de desmineralização em solução de ácido fórmico 10%, em pH 4,5, sob vácuo moderado por 10 dias. A seguir foram lavadas com água corrente, desidratadas em soluções crescentes de álcool, diafanização em xilol e incluídas em bloco de parafina. Secções histológicas de 5 micrômetros foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas por microscopia ótica (Olympus AX70 microscope™, Alemanha)

O mesmo patologista analisou todas as lâminas coradas em HE, utilizando 5 campos de visualização, de modo a identificar em cada amostra a fase da cicatrização tecidual em que se encontrava: inflamação, reparação e remodelação.

Para tanto, foram analisados a quantidade do infiltrado inflamatório, o tipo do infiltrado inflamatório encontrado (monócitos, neutrófilos ou misto), o grau de reparação tecidual encontrada (neoformações de vasos, tecido de granulação e matriz óssea em formação), e o grau de remodelação óssea (pela presença de tecido conjuntivo denso e matriz óssea formada).

Para padronização da leitura foi utilizado amostra de tecido ósseo sem lesões prévias.

O infiltrado inflamatório graduado como leve apresentava amostra de tecido com células raras e esparsas com grandes áreas de tecido livres do tipo celular, e no grau intenso pela presença de agregados celulares em toda a amostra.

A angiogênese foi considerada leve nas amostras em que não se observaram vasos neo formados ou pela sua presença de forma esparsa (até 5 por campo) e considerado intenso quando haviam mais de 5 vasos por campo.

A remodelação tecidual foi considerada leve na ausência de tecido conjuntivo denso ou na presença de fibras colágenas espessas esparsas, e intenso quando identificado matriz óssea e colágeno espesso sem áreas de tecido conjuntivo frouxo.

#### **4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para os dados qualitativos foi feita a comparação entre grupos, dois a dois usando teste de qui-quadrado com correção de Fisher. Foram considerados valores significativos valores de  $p$  menores que 0,05. Para os dados quantitativos foi utilizado o teste ANOVA, t-Student, e Kruskal Wallis considerando as diferenças para  $p$  menores que 0,05. Os dados foram analisados utilizando software de análise estatística SPSS™ (Statistical Package of Social Sciences) da IBM™ (International

Business Machines). O teste para averiguação prévia de normalidade utilizado foi o de Shapiro Wilk.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PÓS OPERATÓRIO

A ferida operatória apresentou supuração em 7 animais (13,46 %) sendo que os animais dos grupos B e F não apresentaram, na ferida operatória, processo supurativo evidente à macroscopia (Tabela 1).

TABELA 1 – Frequência de supuração na ferida cirúrgica de ratos submetidos a fratura exposta do fêmur e contaminação com *Staphylococcus aureus*

Grupos (n)	Presença de supuração	
	n	%
A (n=11)	3	27,0
B (n= 8)	0	0
C (n= 8)	2	25,0
D (n= 7)	1	14,0
E (n= 8)	1	12,5
F (n=10)	0	0
TOTAL (n=52)	7	13,5

$p = 0,3591$ ; A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

### 5.2 CINTILOGRAFIA

A pureza radioquímica da CFT marcada com tecnécio-99m foi da ordem de 93%. Na avaliação qualitativa das imagens, observou-se alta captação do radiofármaco na região de interesse aos 360 min, e baixa captação no fêmur contralateral. A contagem da radioatividade no foco de fratura foi mensurada após 360 minutos da injeção endovenosa. Os valores encontrados variaram de 163 a

5152, com média de 2010 e desvio padrão de 1109 na região da fratura infectada. (Figuras 8 e 9)

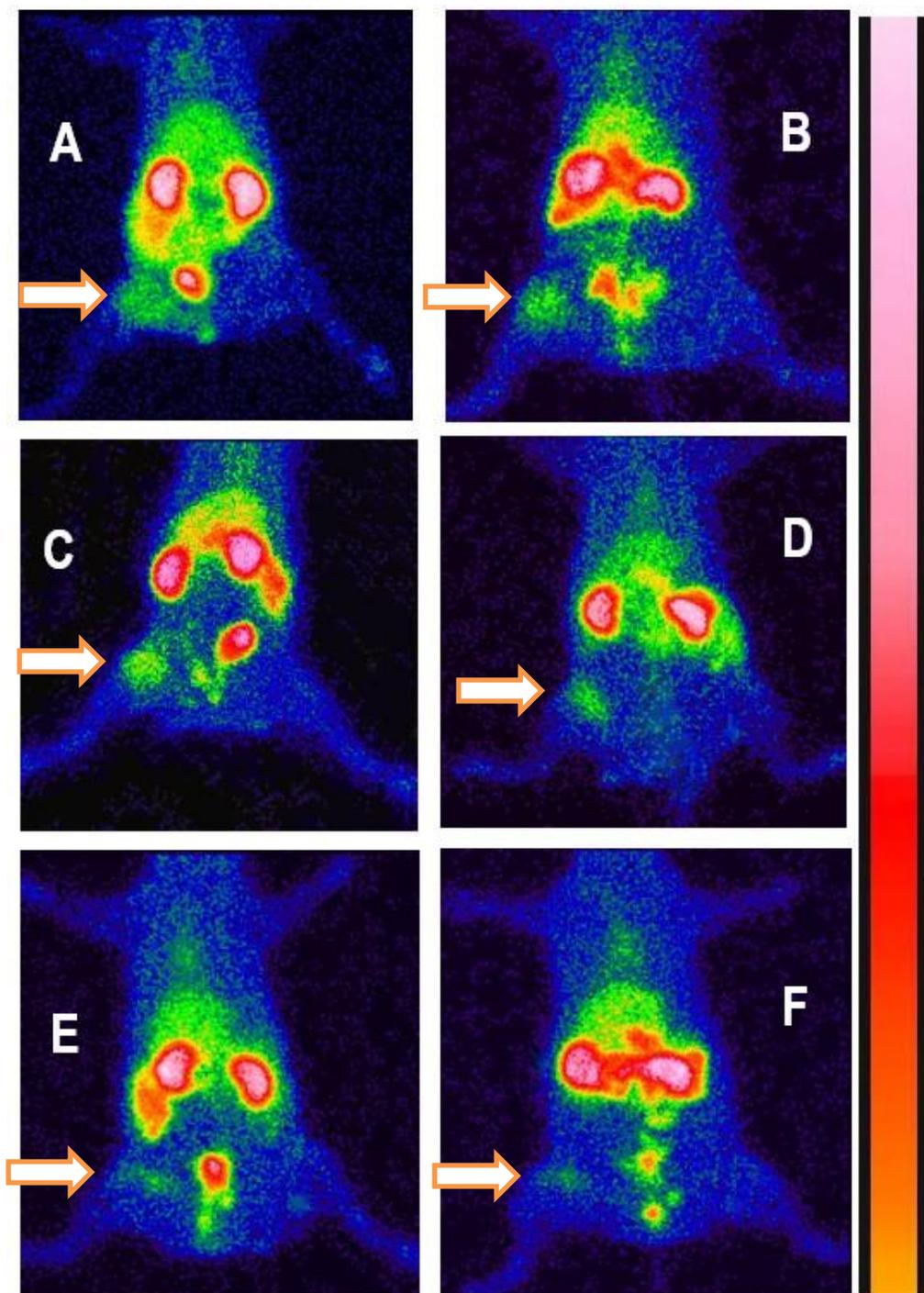
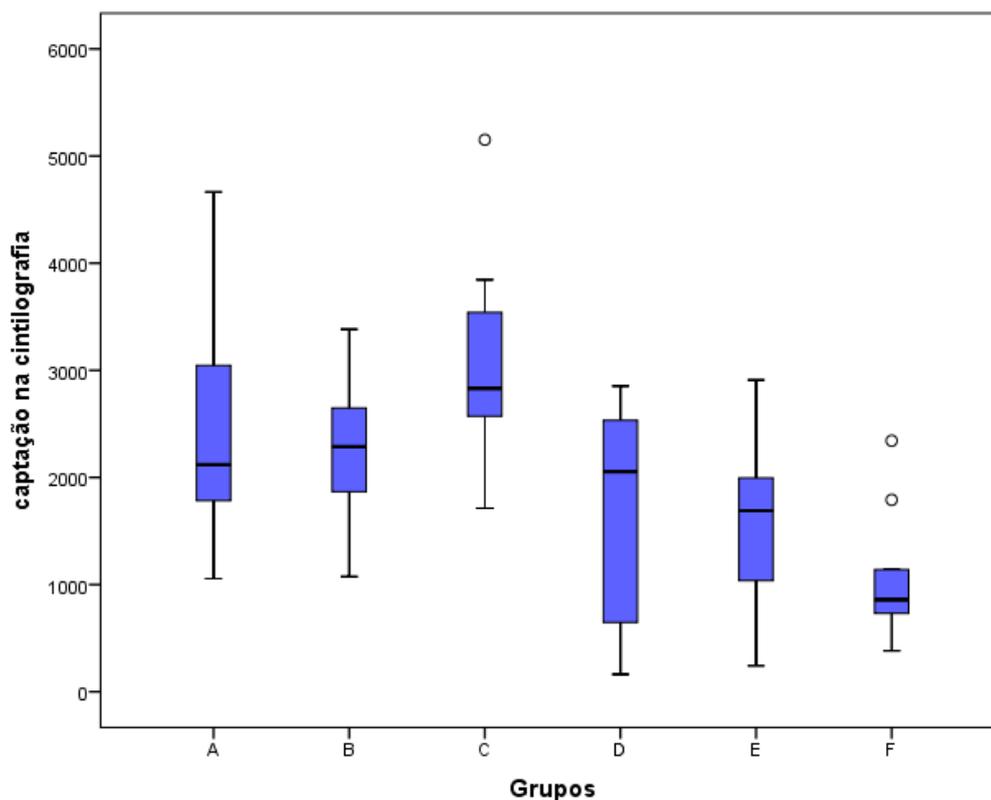


FIGURA 8 Imagens cintilográficas de ratos após 6 horas da injeção de  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT demonstrando captação do radiofármaco na coxa direita dos animais (setas), representativas de cada grupo de animais estudados: A – grupo sem tratamento; B – grupo de tratamento com ciprofloxacino sistêmico; C – grupo tratado com haste revestida por quitosana; D – grupo tratado com haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – grupo tratado com haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – grupo tratado com haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

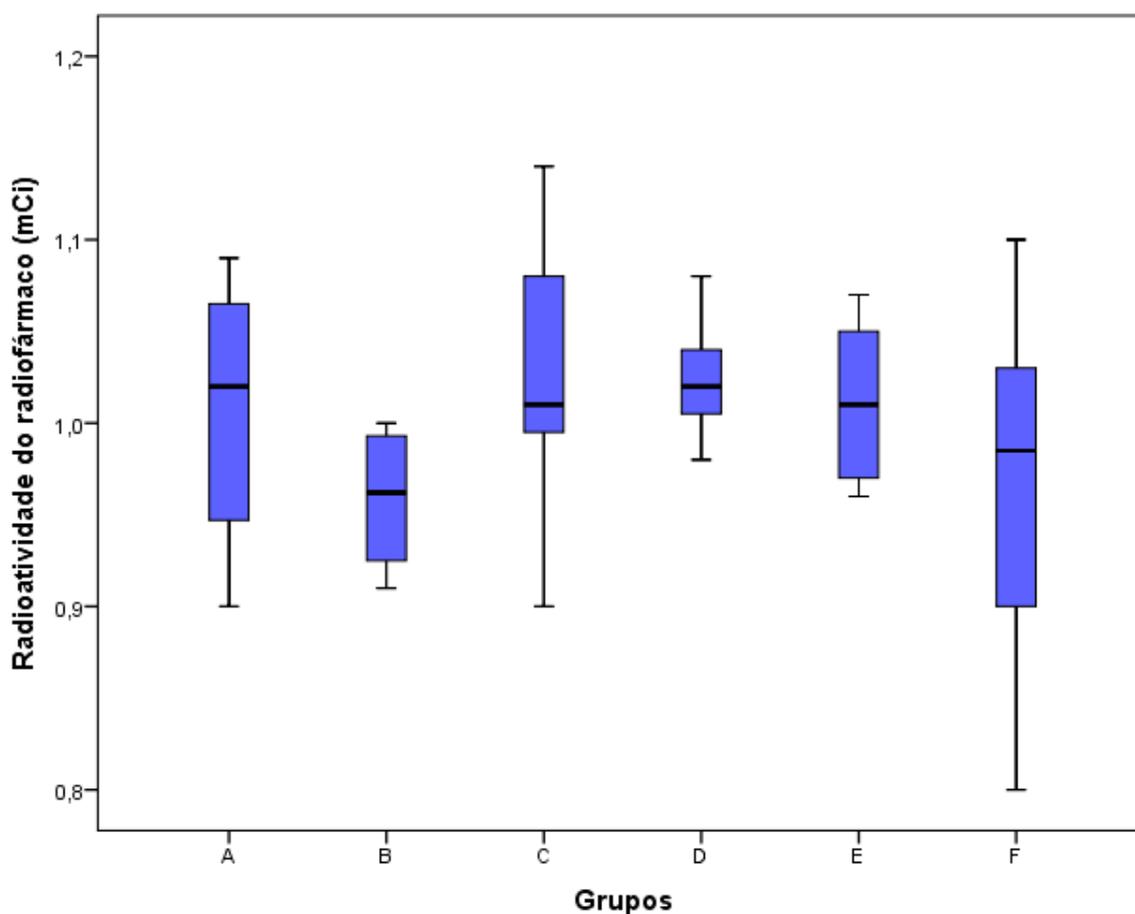
FIGURA 9 Análise quantitativa da captação da radioatividade da infecção residual do fêmur após 4 semanas de fratura exposta e infecção com *S. aureus*. Estão representados a mediana e respectivos valores mínimos e máximos obtidos em cada grupo



$P < 0,05$ . Grupos: A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino

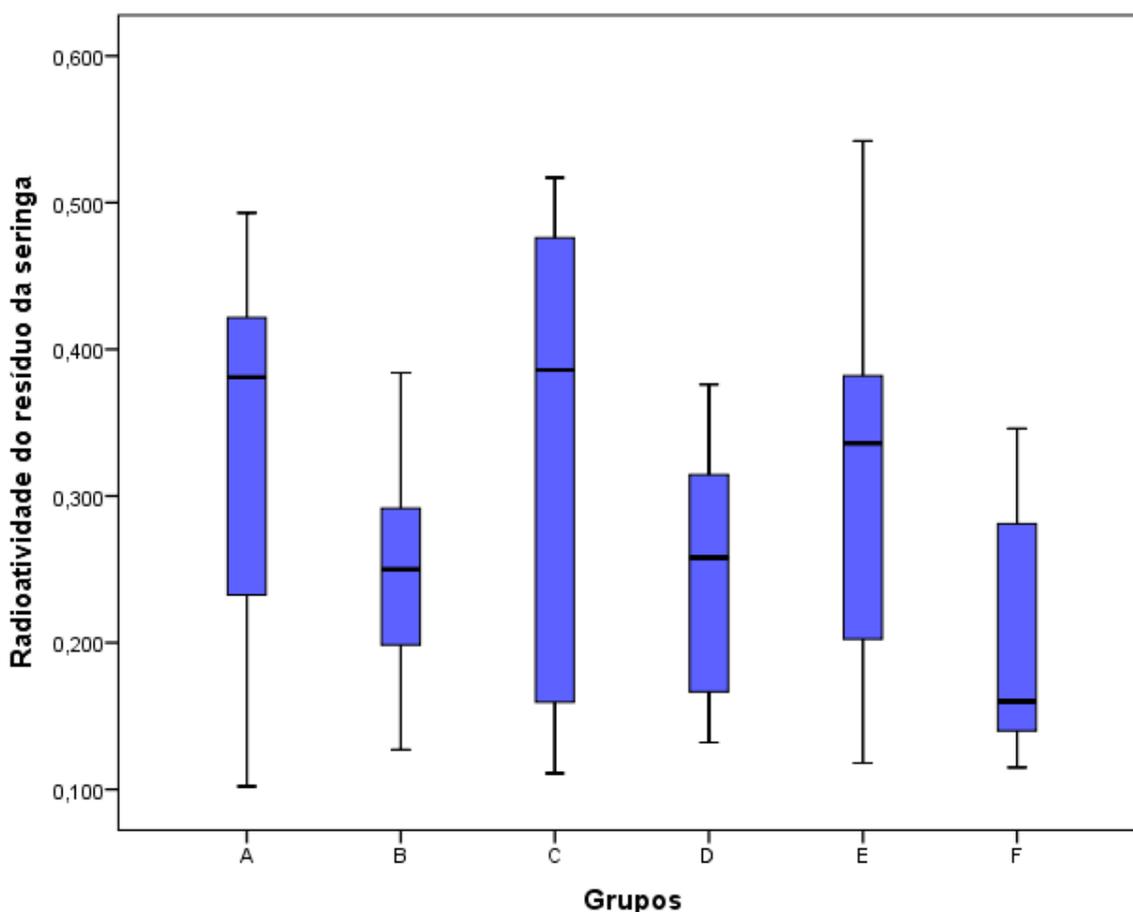
Não houve diferença significativa entre os valores de radiação que efetivamente foi injetada nos animais ( $p=0,177$ , figura 10) ou em relação ao resíduo de material radioativo remanescente nas seringas após a injeção nos animais ( $p=0,114$ , figura 11)

FIGURA 10 Avaliação prévia da radioatividade do radiofármaco utilizado em cada grupo de tratamento. Estão representados os valores mínimos, máximos e respectivas médias.



$p>0,05$ . Grupos: A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino

FIGURA 11 Radioatividade residual da seringa utilizada nos animais em seus respectivos grupos

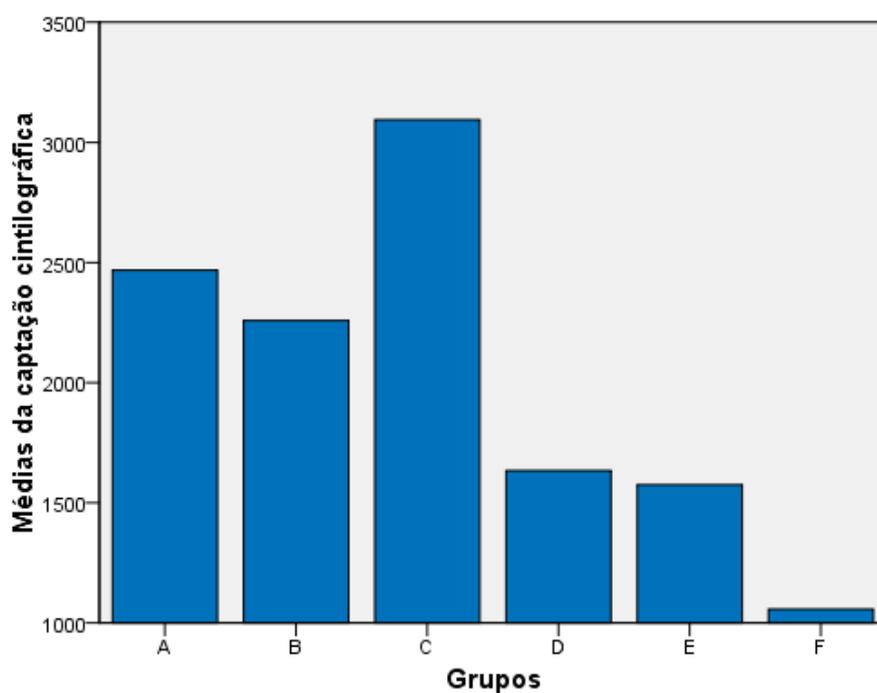


$p > 0,05$ . Grupos: A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

A média da captação cintilográfica na área de interesse foi de  $2468,0 \pm 1127,550$  no grupo A,  $2258,0 \pm 698,733$  no grupo B,  $3094,0 \pm 1031,037$  no grupo C,  $1633,57 \pm 2055,0$  no grupo D,  $1574,5 \pm 832,736$  no grupo E e  $1057,3 \pm 587,013$  no grupo F (Tabela 2 e Figura 12). Foi observado, pelo teste de Anova, a presença de diferença estatística entre as médias das captações da cintilografia dentro dos grupos ( $p = 0,000$ ). Para determinar quais grupos apresentaram médias significativamente diferentes foi realizado teste de comparações múltiplas

(Apêndice 2). Houve diferença quando comparados os grupos A e F ( $p=0,015$ ), C e E ( $p=0,028$ ) e os grupos C e F ( $p=0,000$ ).

FIGURA 12 Captação da radioatividade média obtida na região da fratura exposta previamente infectada com *S aureus* de acordo com o grupo de estudo.



$P < 0,05$ . Grupos: A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino

TABELA 2 – Avaliação da contagem da radioatividade obtida na cintilografia 4 semanas após fratura exposta infectada com *S aureus* de acordo com cada grupo

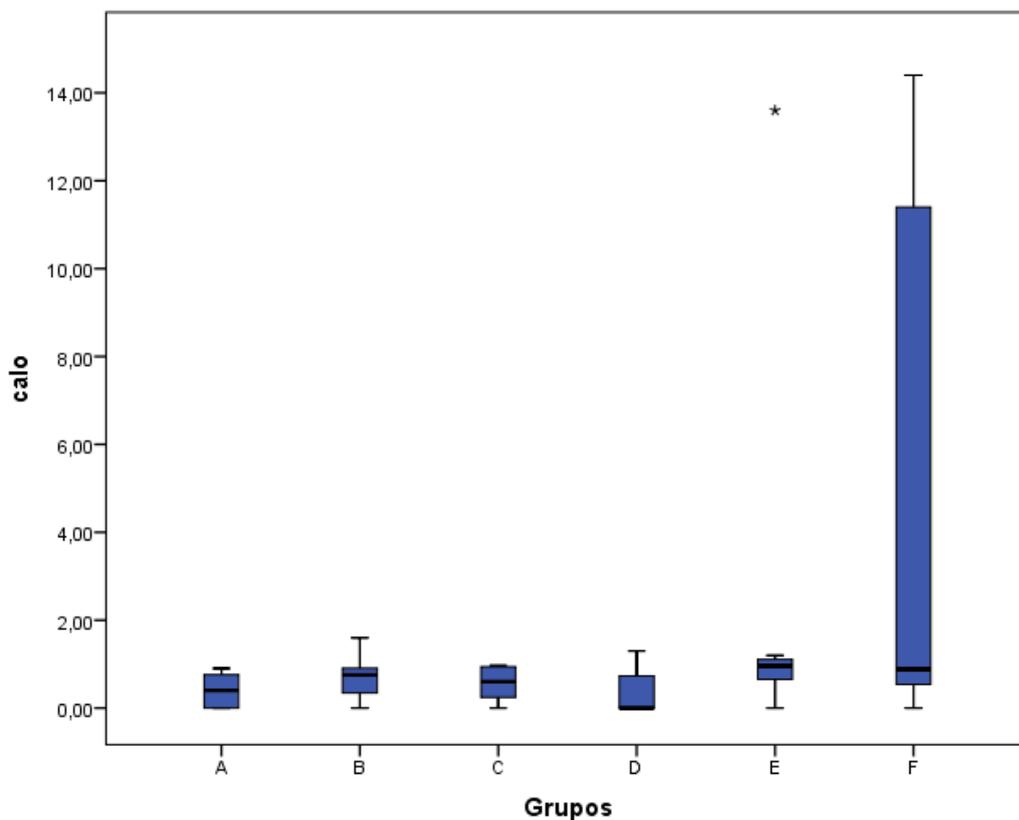
Grupos (n)	Avaliação cintilográfica	
	Média	Desvio padrão
A (n=11)	2468,0	1127,6
B (n= 8)	2258,0	698,7
C (n= 8)	3094,0	1031,0
D (n= 7)	1633,6	1119,2
E (n= 8)	1574,5	832,7
F (n=10)	1057,3	587,0

$P < 0,05$ ; A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

### 5.3 MENSURAÇÃO DO CALO ÓSSEO

A média da medida do calo ósseo em centímetros foi de  $0,3845 \pm 0,3896$  no grupo onde não foi feita nenhuma intervenção (A),  $0,7013 \pm 0,5191$  no grupo tratado com ciprofloxacino sistêmico (B),  $0,5675 \pm 0,39507$  no grupo onde a haste de fixação foi revestida com quitosana somente (C), e  $0,3943 \pm 0,54659$ ,  $2,38 \pm 4,55015$  e  $4,2990 \pm 5,91925$ , respectivamente, nos grupos onde a haste de fixação foi revestida de quitosana com 10% (D), 25% (E) ou 50% (F). Não se observou diferença significativa entre os grupos analisados ( $p=0,088$ ), apesar do valor médio do calo ósseo ser maior nos grupos tratados com antibiótico a 25% e 50% em relação aos animais do grupo A. (FIGURA 13)

FIGURA 13 Avaliação macroscópica da consolidação óssea após 4 semanas de fratura exposta infectada com *S aureus* em estão representados os valores mínimos e máximos em centímetros e suas respectivas médias em relação ao calo ósseo mensurado.



$p > 0,05$ . Grupos: A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

#### 5.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A análise histológica do local da fratura infectada não mostrou diferença entre os grupos quanto ao infiltrado inflamatório (Figuras 14 e 15), angiogênese ou tecido conjuntivo denso, como demonstrado nas tabelas 3, 4 e 5, e figuras 16, 17 e 18.

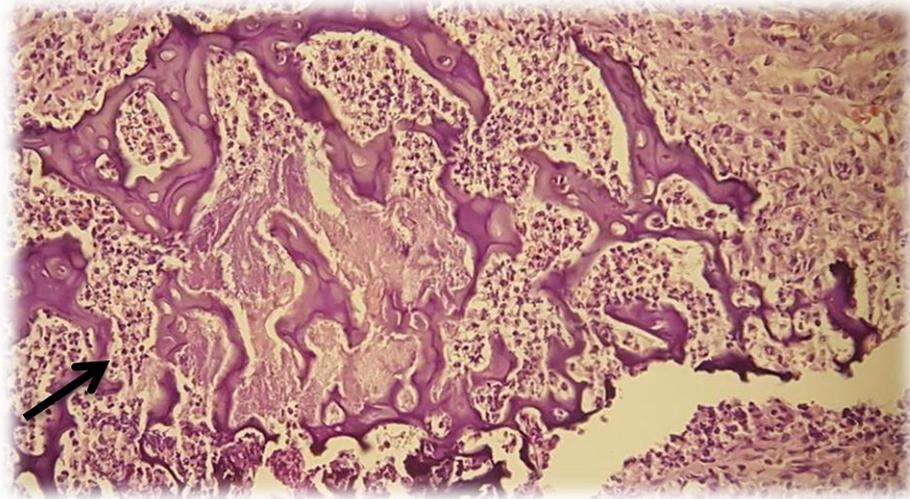


FIGURA 14 Micrografia em hematoxilina e eosina da área de fratura do fêmur de ratos após quatro semanas. Presença de osteomielite com destruição das matrizes e trabéculas ósseas de um lado (seta), do outro lado da lâmina evidencia-se processo cicatricial evidente pela presença de tecido conjuntivo em formação

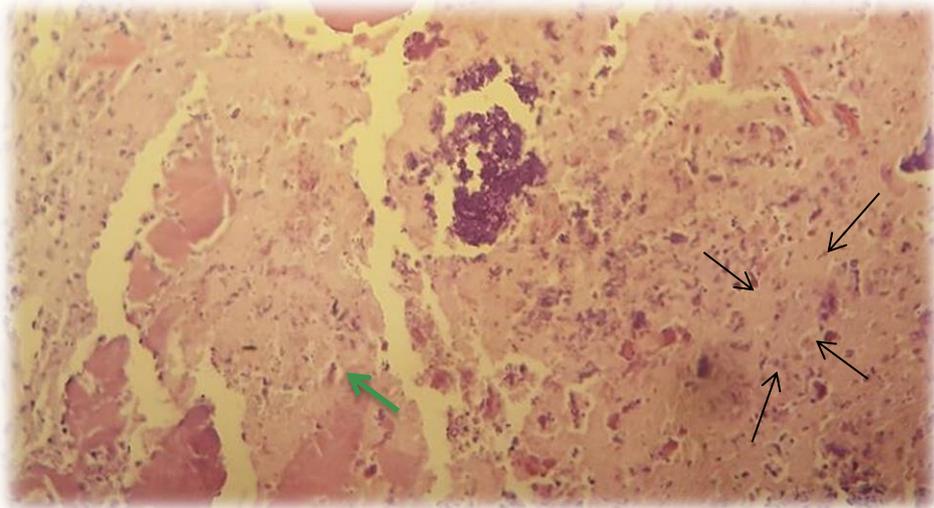


FIGURA 15 Micrografia em hematoxilina e eosina da área de fratura do fêmur de ratos após quatro semanas demonstrando processo inflamatório predominantemente neutrofílico de permeio a trabéculas ósseas necróticas (setas pretas). À esquerda (seta verde) observamos tecido conjuntivo em formação

TABELA 3 – Frequência de infiltrado inflamatório no local da fratura infectada por *Staphylococcus aureus* no fêmur de ratos

GRUPOS (n=52)	INFILTRADO INFLAMATÓRIO			
	Leve		Acentuado	
	N	%	n	%
A (n=11)	8	72,7	3	27,3
B (n= 8)	7	87,5	1	12,5
C (n= 8)	5	62,5	3	37,5
D (n= 7)	4	57,1	3	42,9
E (n= 8)	4	50,0	4	50,0
F (n=10)	7	70,0	3	30,0

$p = 0,675$ ; A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

TABELA 4 – Frequência de angiogênese encontrada no local da fratura infectada por *Staphylococcus aureus* no fêmur de ratos

GRUPOS (n=52)	ANGIOGÊNESE			
	Leve		Acentuada	
	N	%	N	%
A (n=11)	9	81,8	2	18,2
B (n= 8)	4	50,0	4	50,0
C (n= 8)	5	62,5	3	37,5
D (n= 7)	5	71,4	2	28,6
E (n= 8)	5	62,5	3	37,5
F (n=10)	6	60,0	4	40,0

$p = 0,802$ ; A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

TABELA 5– Frequência de fibroplasia (tecido conjuntivo denso) no local da fratura infectada por *Staphylococcus aureus* no fêmur de ratos

GRUPOS (n=52)	FIBROPLASIA			
	Leve		Acentuada	
	N	%	n	%
A (n=11)	5	45,5	6	54,5
B (n= 8)	7	87,5	1	12,5
C (n= 8)	6	75,0	2	25,0
D (n= 7)	3	42,9	4	57,1
E (n= 8)	5	65,2	3	37,5
F (n=10)	5	50,0	5	50,0

$p > 0,05$ ; A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

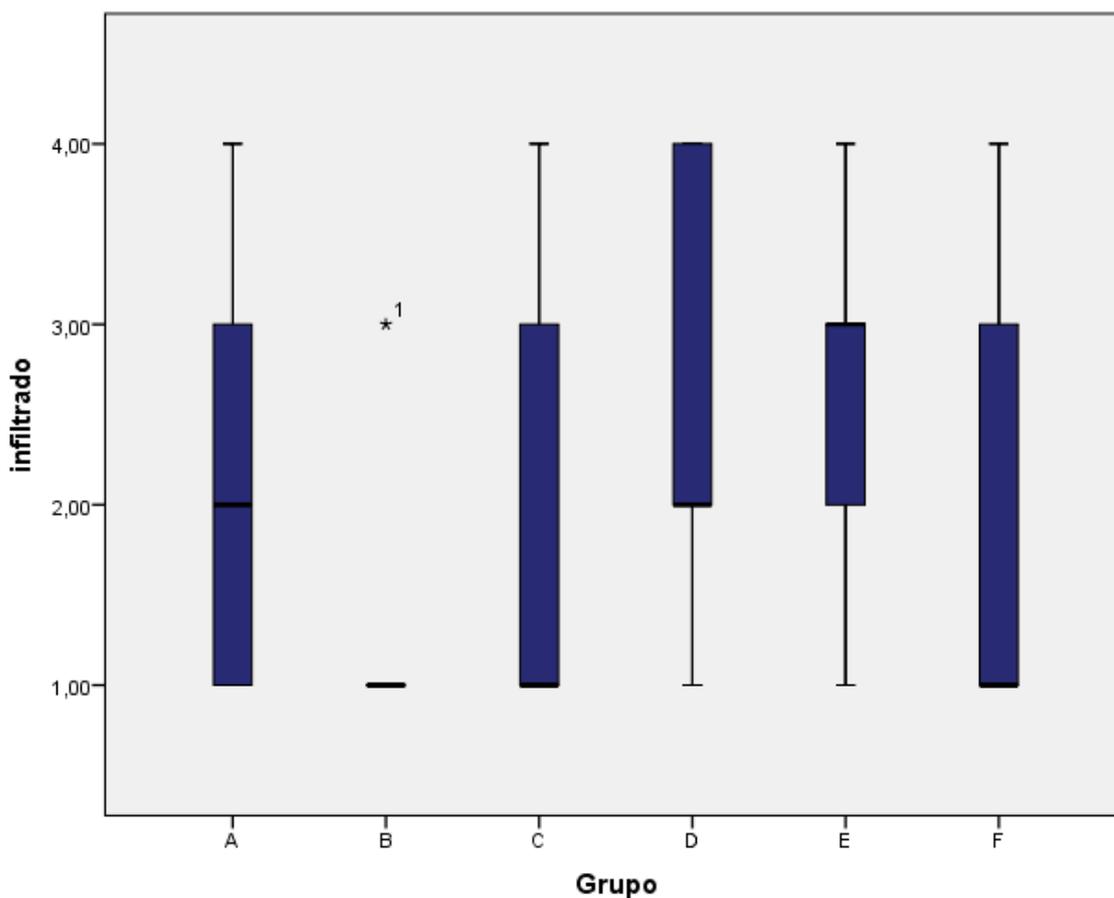
Foi observada diferença significativa entre os grupos A e F quando analisada a matriz óssea em formação, como demonstrado na tabela 6 e figura 19. O grupo A apresentou significativamente maior presença de matriz óssea em formação categorizada como intensa, enquanto no grupo F predominou a presença de matriz óssea classificada como leve. ( $p=0,023$ )

TABELA 6– Frequência de matriz óssea em formação no local da fratura infectada por *Staphylococcus aureus* no fêmur de ratos

GRUPOS (n=52)	MATRIZ ÓSSEA			
	Leve		Acentuada	
	N	%	n	%
A (n=11)	4	36,4	7	63,6
B (n= 8)	7	87,5	1	12,5
C (n= 8)	6	75,0	2	25,0
D (n= 7)	4	57,1	3	42,9
E (n= 8)	6	75,0	2	25,0
F (n=10)	10	100,0	0	0,0

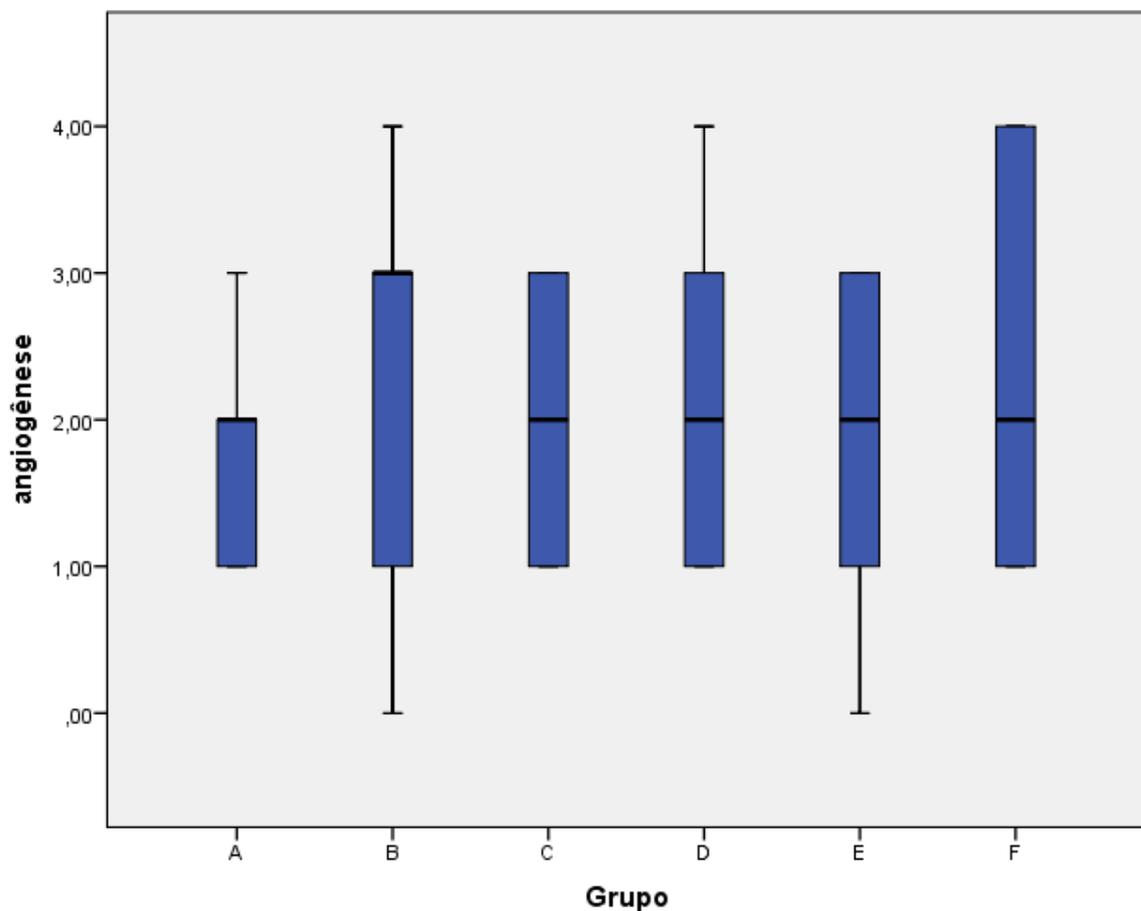
$p < 0,05$ ; A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

FIGURA 16 Avaliação histológica em relação a quantidade de infiltrado inflamatório encontrado local da fratura infectada por *Staphylococcus aureus* no fêmur de ratos



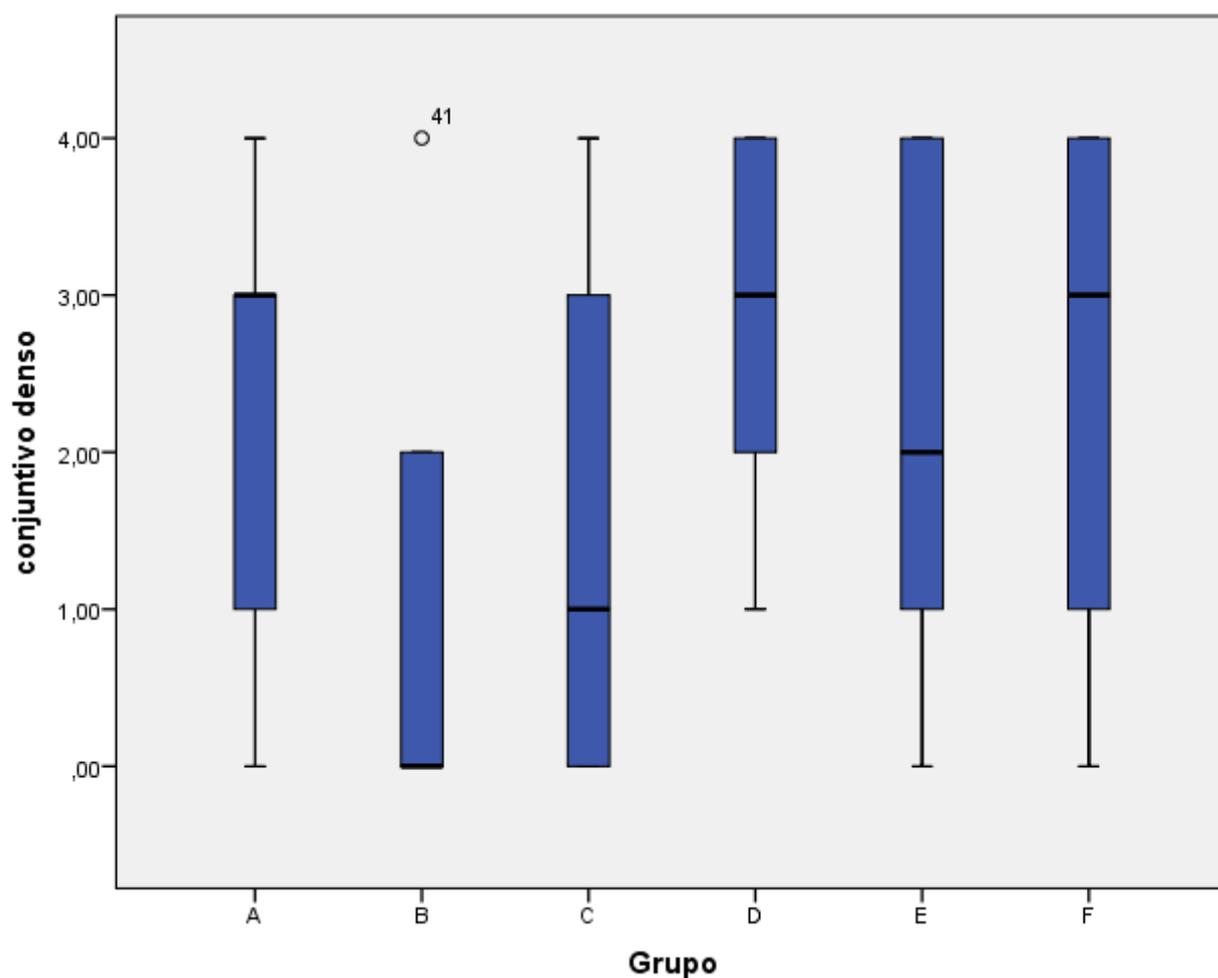
$p > 0,05$ . A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

FIGURA 17 Avaliação histológica em relação a angiogênese encontrada no local da fratura infectada por *Staphylococcus aureus* no fêmur de ratos. Estão representados os valores mínimos, máximos e suas respectivas médias.



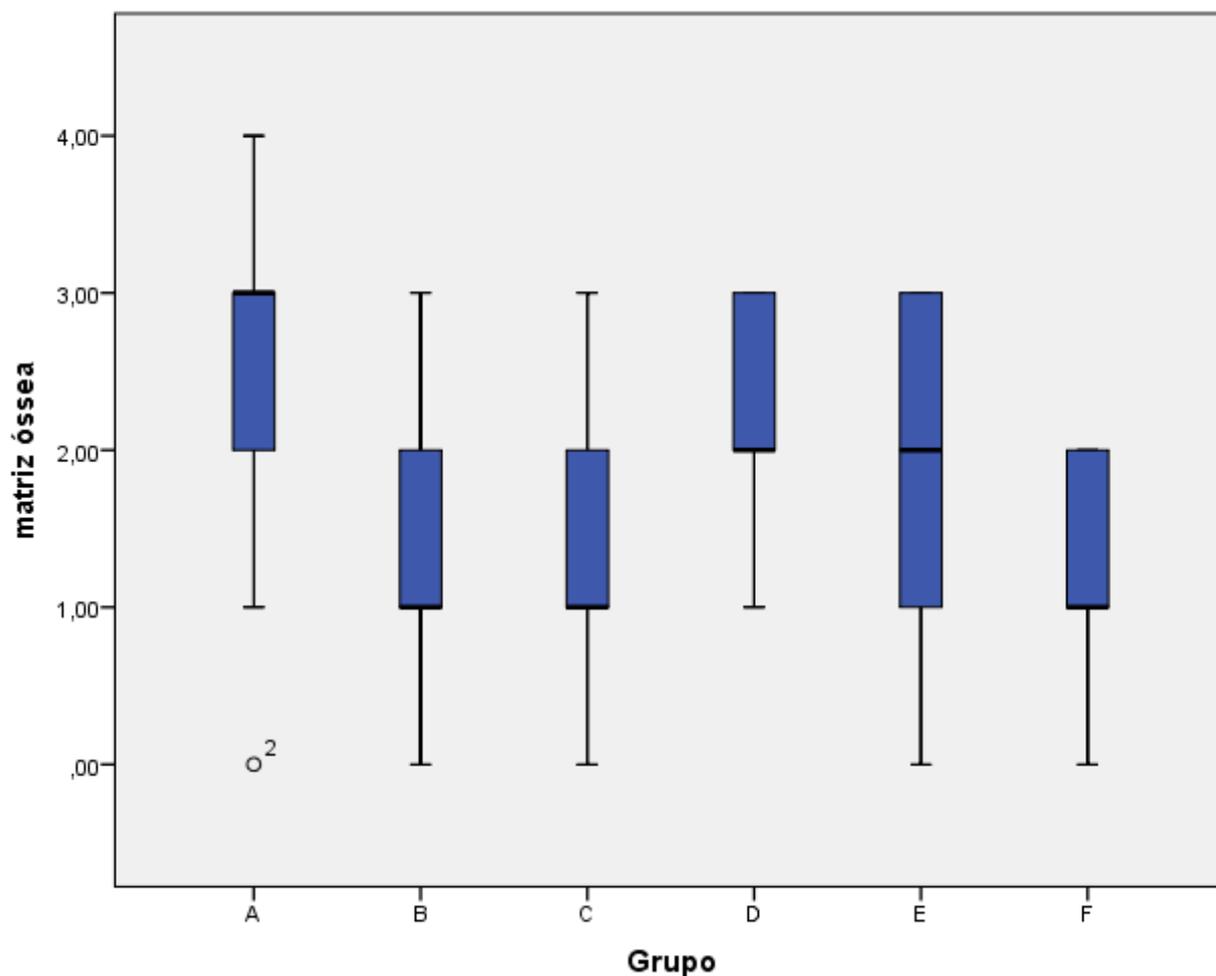
$P > 0,05$ . A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

FIGURA 18. Avaliação histológica em relação ao tecido conjuntivo denso (fibroplasia) encontrado no local da fratura infectada por *Staphylococcus aureus* no fêmur de ratos. Estão representados os valores mínimos, máximos e suas respectivas médias.



$p > 0,05$ . A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

FIGURA 19 Avaliação histológica em relação a matriz óssea em formação encontrada local da fratura infectada por *Staphylococcus aureus* no fêmur de ratos. Estão representados os valores mínimos, máximos e suas respectivas médias



$p < 0,05$ . A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo experimental teve o objetivo de identificar em quais concentrações de ciprofloxacino (10%, 25% ou 50%) incorporado em polímero absorvível de quitosana, utilizado no tratamento local de fraturas expostas infectadas com *Staphylococcus aureus* em ratos, seriam capazes de inibir a infecção óssea com menos efeitos deletérios locais.

Estudos prévios *in vitro* demonstraram que a concentração de 1g do antibiótico ciprofloxacino em 40g de cimento de polimetilmetacrilato (PMMA) foram suficientes para manter níveis acima da concentração inibitória mínima (5mcg/ml) necessária para erradicar a maioria dos patógenos por 28 dias. (25,32,39)

O uso de altas concentrações de antibióticos em cimentos ósseos poderia causar toxicidade celular e retardar a consolidação da fratura. A aplicação do cimento ósseo implica em reação exotérmica que origina necrose tecidual adjacente a sua aplicação e liberação de radicais livres, prejudicando o processo cicatricial do osso fraturado. O antimicrobiano é dispensado em altas doses logo após a introdução do cimento, porém sua liberação diminui com o tempo e depende da porosidade do cimento para sua biodisponibilidade, sendo que o antibiótico contido no interior do material sintético dificilmente atuaria no tecido infectado, gerando imprevisibilidade na verdadeira concentração do antimicrobiano a ser utilizada com materiais não absorvíveis. Além disso, a alta concentração do antimicrobiano liberado inicialmente pelo cimento poderia apresentar citotoxicidade, como demonstrado em alguns estudos *in vitro* nos quais o uso de ciprofloxacino acima de 100 microgramas/ml quando aplicado diretamente sobre

osteoblastos induziria toxicidade celular aos osteoblastos, o que poderia alterar a consolidação *in vivo*.(6,31,32,37,39,45)

A utilização da quitosana, segundo trabalhos anteriores, apresentaria inúmeras vantagens sobre o polimetilmetacrilato como facilidade na aplicação, biocompatibilidade e biodegradabilidade, dispensar a necessidade de novas intervenções cirúrgicas, apresentar propriedade bactericida e fornecer doses controladas de antibióticos diretamente no tecido contaminado.(1,25,29,31)

Os resultados deste estudo mostraram presença de supuração no local da fratura em 7 animais (13,46 %) sendo que os grupos B e F não apresentaram nenhum animal com processo supurativo evidente na avaliação macroscópica, o que comprova efetividade no controle da infecção local ainda que a diferença estatística não tenha sido obtida. Dados da medida da infecção pela cintilografia mostraram que a quitosana não apresentou efeito antibiótico significativo, em conformidade com estudo de Costa et al, que também não havia identificado propriedade antibiótica significativa da quitosana no tratamento local de fraturas expostas infectadas com *S. aureus*(21). Outros trabalhos, entretanto, haviam observado ação bactericida da quitosana em ferimentos superficiais e profundos (29,21,46,47)

Para a quantificação da infecção residual foi utilizado cintilografia utilizando o antibiótico ceftizoxima marcado com tecnécio-99m. Esse método foi escolhido pela capacidade de diferenciar entre a infecção e a inflamação do osso alvo como demonstrado em estudos prévios (40,41) A maior captação do radiofármaco no local da fratura indica quantitativamente a presença de infecção regional, pois existe interação específica do  $^{99m}\text{Tc}$ - CFT com as bactérias, o que proporciona a retenção do antibiótico radiomarcado nos tempos tardios após sua administração

no foco infeccioso. Estudos prévios demonstram que este radiofármaco apresenta-se estável por 6 horas, e atua como agente específico para identificação de focos infecciosos por ser capaz de diferenciar inflamação de infecção.

Nos grupos onde foi empregado o ciprofloxacino, observou-se que as concentrações de 25% e 50% foram eficazes no controle da infecção óssea em fraturas expostas infectadas com *Staphylococcus aureus*. Já o emprego da concentração de 10% não foi eficaz no tratamento da infecção óssea, resultado semelhante ao encontrado no estudo de Paiva Costa et al.

Não houve diferença significativa entre os grupos de animais tratados com ciprofloxacino de forma sistêmica e o grupo controle infeccioso ( $p > 0,05$ ), o que pode demonstrar a baixa eficácia do uso isolado do antimicrobiano por via sistêmica de forma similar a alguns trabalhos clínicos como o de Greenberg et al onde cerca de 60% dos pacientes com osteomielite tratados com ciprofloxacino sistêmico não obtiveram controle efetivo da infecção, e experimentais como o de Paiva Costa et al e Penn-Barwell et al que não demonstraram controle da infecção em modelo de infecção óssea em ratos utilizando ciprofloxacino por via sistêmica. (2,21,12,24,30,43) Entretanto, embora não houvesse diferença significativa, pudemos observar que a média de captação na cintilografia foi menor no grupo B em relação aos grupos A e C, e talvez a diferença estatística não tenha sido atingida devido ao número insuficiente de animais estudados. (21,36,33)

A consolidação óssea ocorre em um processo contínuo, mas pode ser dividido em 3 fases: inflamação, reparação e remodelação. A fase inflamatória inicia-se após o traumatismo do tecido ósseo gerando hematoma e propiciando migração das células inflamatórias através de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento. A fase de reparação é caracterizada pela presença de

angiogênese, migração de células mesenquimais e fibroblastos, típicos do calo mole. Já a fase de remodelação é aquela na qual o colágeno se torna denso através da substituição da cartilagem através da ossificação endocondral, gerando o chamado calo duro. Apesar do osso do rato ser de estrutura lamelar não Harversiana, a base fisiológica da remodelação é semelhante à do humano, podendo ser utilizado para o estudo do comportamento da cicatrização do tecido ósseo.(24,36,39)

O valor médio do calo ósseo foi maior nos grupos tratados com antibiótico a 25% e 50%, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos. Observou-se ainda maior variabilidade nos tamanhos do calo ósseo mensurado no grupo F, essa diferença não foi observada em outros estudos experimentais similares, e pode ser atribuída a resposta heterogênea da consolidação óssea nos animais tratados com ciprofloxacino a 50%. Entretanto, verificou-se na análise histológica que a presença de matriz óssea encontrada foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle. Esses resultados parecem indicar que o uso concentração de 50% de ciprofloxacino pode retardar significativamente o processo histológico de cicatrização do tecido ósseo *in vivo*. Estudos prévios, de forma similar, demonstraram que o calo ósseo formado após 6 semanas de fraturas expostas infectadas em ratos não sofreu alteração em termos de resistência da consolidação óssea quando utilizado ciprofloxacino por via sistêmica, porém também apresentou alterações histológicas similares a este estudo, o que poderia ter afetado o osso formado. (21,39) Outros estudos confirmam esses achados, como o de Paiva Costa et al, que observaram predomínio significativo de sinais tardios de reparação tecidual no grupo com infecção óssea sem tratamento com antimicrobiano, e de Antoci et al, que também identificaram toxicidade de alguns

antimicrobianos em relação aos osteoblastos *in vitro*.(21,37,36) Podemos inferir, dessa maneira, que apesar da cronicidade da infecção, o tecido ósseo ainda mantém capacidade de regeneração tecidual e que o uso de altas concentrações do ciprofloxacino exercem interferência no processo de formação de matriz óssea, porém o calo macroscopicamente mensurado pode não apresentar alteração significativa em ratos.

Mais estudos devem ser realizados com intuito de identificar se a influência negativa em termos de formação de matriz óssea ocasionado por altas doses de ciprofloxacino de fato não causa efeito deletério no tratamento das fraturas infectadas.

## 7 CONCLUSÃO

O uso de implante metálico impregnado com quitosana associada a ciprofloxacino com pelo menos 25% de concentração foi eficaz no tratamento da infecção de fraturas expostas em ratos. Por outro lado, na dose de 50% de ciprofloxacino houve redução histológica na cicatrização, porém sem repercussão do ponto de vista macroscópico em termos de formação do calo ósseo após 4 semanas da fratura.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rand BCC, Penn-Barwell JG, Wenke JC. Combined local and systemic antibiotic delivery improves eradication of wound contamination: An animal experimental model of contaminated. *Bone Jt J.* 2015;97B(10):1423–7.
2. Hansen S. Rockwood & Green's Fractures in Adults. In: *The Journal of Bone & Joint Surgery.* 2005. p. 2293–334.
3. Neubauer T, Bayer GS, Wagner M. Open fractures and infection. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2006 Oct;73(5):301–12.
4. Grote S, Polzer H, Prall WC, Gill S, Shafizadeh S, Banerjee M, et al. Prevention of infection in the current treatment of open fractures: an evidence-based systematic analysis. *Orthopade.* 2012 Jan;41(1):32–42.
5. Antoci V, Adams CS, Hickok NJ, Shapiro IM, Parvizi J. Antibiotics for Local Delivery Systems Cause Skeletal Cell Toxicity In Vitro. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;
6. DiCicco M, Duong T, Chu A, Jansen SA. Tobramycin and gentamycin elution analysis between two in situ polymerizable orthopedic composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003;65(1):137–49.
7. Sørensen JH, Lilja M, Sørensen TC, Astrand M, Procter P, Fuchs S, et al. Biomechanical and antibacterial properties of Tobramycin loaded hydroxyapatite coated fixation pins. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2014;102(7):1381–92.
8. Hauser CJ, Adams CA, Eachempati SR. Prophylactic Antibiotic Use in Open Fractures: An Evidence-Based Guideline. *Surg Infect (Larchmt).*

- 2006;7(4):379–405.
9. Gustilo RB. Use of antimicrobials in the management of open fractures. *Arch Surg.* 1979 Jul;114(7):805–8.
  10. Otchwemah R, Grams V, Tjardes T, Shafizadeh S, B??this H, Maegele M, et al. Bacterial contamination of open fractures - Pathogens, antibiotic resistances and therapeutic regimes in four hospitals of the trauma network Cologne, Germany. *Injury.* 2015;46:S104–8.
  11. Anderson A, Miller AD, Brandon Bookstaver P. Antimicrobial prophylaxis in open lower extremity fractures. *Open Access Emerg Med.* 2011;3:7–11.
  12. Gomes D, Pereira M, Bettencourt AF. Osteomyelitis: An overview of antimicrobial therapy. *Brazilian J Pharm Sci.* 2013;49(1):13–27.
  13. Belt H van de, Neut D, Schenk W, Horn JR van, Mei HC van der, Busscher HJ. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements: A review. *Acta Orthop Scand.* 2001;72(6):557–71.
  14. Neut D, Van De Belt H, Van Horn JR, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials.* 2003;24(10):1829–31.
  15. Wright BA, Roberts CS, Seligson D, Malkani AL, McCabe SJ. Cost of antibiotic beads is justified: a study of open fracture wounds and chronic osteomyelitis. *J Long Term Eff Med Implants.* 2007;17(3):181–5.
  16. Campoccia D, Montanaro L, Speziale P, Arciola CR. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials.* 2010;31(25):6363–77.
  17. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials.*

- 2006;27(11):2331–9.
18. Court-Brown CM, Bugler KE, Clement ND, Duckworth AD, McQueen MM. The epidemiology of open fractures in adults. A 15-year review. *Injury*. 2012;43(6):891–7.
  19. Court-Brown CM, Rimmer S, Prakash U, McQueen MM. The epidemiology of open long bone fractures. *Injury*. 1998;29(7):529–34.
  20. Giannoudis P V., Faour O, Goff T, Kanakaris N, Dimitriou R. Masquelet technique for the treatment of bone defects: Tips-tricks and future directions. *Injury*. 2011;42(6):591–8.
  21. Paiva Costa L, Moreira Teixeira LE, Maranhão Lima GS, Mendes Ferreira M, de Andrade MA, Teixeira Vidigal PV, et al. Effectiveness of Chitosan Films Impregnated With Ciprofloxacin for the Prophylaxis of Osteomyelitis in Open Fractures: An Experimental Study in Rats. *Arch Trauma Res*. 2016;5(3).
  22. Olson SA, Schemitsch EH. Open fractures of the tibial shaft: an update. *Instr Course Lect*. 2003;52:623–31.
  23. Thomas DB, Brooks DE, Bice TG, DeJong ES, Lonergan KT, Wenke JC. Tobramycin-impregnated Calcium Sulfate Prevents Infection in Contaminated Wounds. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;441(NA):366–71.
  24. Penn-Barwell JG, Rand BCC, Brown K V., Wenke JC. A versatile model of open-fracture infection: a contaminated segmental rat femur defect. *Bone Jt Res*. 2014;
  25. Gürsel I, Korkusuz F, Türesin F, Gürdal Alaeddinoğlu N, Hasirci V. In vivo application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis. *Biomaterials*. 2001;22(1):73–80.
  26. Williams DL, Haymond BS, Woodbury KL, Beck JP, Moore DE, Epperson RT,

- et al. Experimental model of biofilm implant-related osteomyelitis to test combination biomaterials using biofilms as initial inocula. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2012;100 A(7):1888–900.
27. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95–108.
  28. Boari CA, Alves MP, Maximiliano V, Tebaldi R, Savian TV, Piccoli RH. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciência e Tecnol Aliment*. 2009;2008(3244):886–95.
  29. Caetano GF. Biomembrana de quitosana - alginato na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos Biomembrana de quitosana - alginato na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos. Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.
  30. Bowen TR, Widmaier JC. Host Classification Predicts Infection after Open Fracture. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;NA;(433):205–11.
  31. Penn-Barwell JG, Murray CK, Wenke JC. Local Antibiotic Delivery by a Bioabsorbable Gel Is Superior to PMMA Bead Depot in Reducing Infection in an Open Fracture Model. *J Orthop Trauma*. 2014;28(6):370–5.
  32. Dimaio FR, O'Halloran JJ, Quale JM. In vitro elution of ciprofloxacin from polymethylmethacrylate cement beads. *J Orthop Res*. 1994;12(1):79–82.
  33. Tiainen J. Bioresorbable plain and ciprofloxacin-releasing self-reinforced PLGA 80/20 implants' suitability for craniofacial surgery. Histological and mechanical assessment. 2007.
  34. Zimmerli W, Sendi P. Orthopaedic biofilm infections. *APMIS*. 2017 Apr;125(4):353–64.
  35. Rand BCC, Penn-Barwell JG, Wenke JC. Combined local and systemic

- antibiotic delivery improves eradication of wound contamination: An animal experimental model of contaminated fracture. *Bone Joint J.* 2015 Oct;97–B(10):1423–7.
36. Rathbone CR, Cross JD, Brown K V., Murray CK, Wenke JC. Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity. *J Orthop Res.* 2011;
  37. Miclau T, Edin ML, Lester GE, Lindsey RW, Dahners LE. Effect of ciprofloxacin on the proliferation of osteoblast-like MG-63 human osteosarcoma cells in vitro. *J Orthop Res.* 1998;
  38. P. W, Worlock P, Slack R, Harvey L, Mawhinney R. The prevention of infection in open fractures: An experimental study of the effect of fracture stability. *Injury.* 1994;25(1):31–8.
  39. kupczik, fabiano; vialle, luiz roberto gomes; nobre, leonardo oliveira; vieira, lucas de almeida; fernandes andre eugenio omine. Influência da Ciprofloxacina na consolidação. *Acta Ortop Bras.* 2009;17(4):228–31.
  40. Od S, Diniz LIAF. Técnico-99m na diferenciação de processos. Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
  41. MOTA LDG. Avaliação da potencialidade do Técnico-99m-DTPA e do Técnico-99m-Fitado de sódio, livres e encapsulados em lipossomas na identificação de processos inflamatórios. Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.
  42. Henrique P, Costa N, Henrique P, Costa N. avaliação da cera de osso como cofator na colonização de esternotomia em ratos. Universidade Federal de Minas Gerais; 2013.
  43. Greenberg RN, Kennedy DJ, Reilly PM, Luppen KL, Weinandt WJ, Bollinger

- MR, et al. Treatment of bone, joint, and soft-tissue infections with oral ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(2):151–5.
44. Kumar Giri T, Thakur A, Alexander A, Badwaik H, Krishna Tripathi D. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. *Acta Pharm Sin B* . 2012;2(5):439–49.
45. C Rand BC, Penn-Barwell JG, Wenke JC, Registrar O, Fellow R, Area Director T. Combined local and systemic antibiotic delivery improves eradication of wound contamination An animal experimental model of contaminated fracture. *Bone Jt J.* 2015;9797(10):1423–7.
46. Bhattarai, Narayan; Gunn, jonathan; zhang M. Chitosan base hydrogels for controlled, localized drug delivery.pdf. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62:83–99.
47. Giri TK, Thakur A, Alexander A, Ajazuddin, Badwaik H, Tripathi DK. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. *Acta Pharm Sin B.* 2012;2(5):439–49.

# 9 ANEXOS E APÊNDICE

## ANEXO 1



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 228 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Uso de ciprofloxacino tópico em diferentes concentrações incorporado em dispositivo de quitosana na prevenção de infecções em fraturas expostas”, que tem como responsável Ivana Duval de Araujo, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 24/09/2014.

Este certificado expira-se em 24/09/2019.

### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 228 / 2014, related to the Project entitled “Use of topical ciprofloxacin in different concentrations incorporated into chitosan device to prevention of open fractures infection in rats”, under the supervision of Ivana Duval de Araujo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 24/09/2014. This certificate expires in 24/09/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 24/09/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

APÊNDICE 1 Cálculos estatísticos referentes às médias dos valores das doses de radiofármaco captadas durante a cintilografia, efetivamente injetadas e sobras na seringa nos seis grupos estudados

PARAMETRO		SOMA DOS QUADRADOS	GL	QUADRADO DA MÉDIA	P
Captação da cintilografia	Entre grupos	23785383,878	5		0,000
	Dentro dos grupos	39043959,814	46	4757076,776	
	Total	62829343,692	51	848781,735	
Atividade da radiação injetada	Entre grupos	0,032	5		0,177
	Dentro dos grupos	0,183	46	0,006	
	Total	0,215	51	0,004	
Sobras da seringa	Entre grupos	0,137	5	0,027	0,114
	Dentro dos grupos	0,668	46	0,015	
	Total	0,806	51		

APÊNDICE 2 Tabela contendo os cálculos estatísticos referentes às médias da captação cintilográfica na área da fratura de ratos submetidos a fratura exposta do fêmur e contaminação com *Staphylococcus aureus*.

Captação cintilográfica		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	95% Intervalo de Confiança	
(I) Grupo (J) Grupo	Limite inferior				Limite Superior	
A	B	210,000	428,088	1,000	-1115,47	1535,47
	C	-626,000	428,088	1,000	-1951,47	699,47
	D	834,429	445,440	1,000	-544,77	2213,63
	E	893,500	428,088	,637	-431,97	2218,97
	F	1410,700 <sup>†</sup>	402,542	,015	164,32	2657,08
B	A	-210,000	428,088	1,000	-1535,47	1115,47
	C	-836,000	460,647	1,000	-2262,28	590,28
	D	624,429	476,815	1,000	-851,92	2100,77
	E	683,500	460,647	1,000	-742,78	2109,78
	F	1200,700	437,008	,128	-152,39	2553,79
C	A	626,000	428,088	1,000	-699,47	1951,47
	B	836,000	460,647	1,000	-590,28	2262,28
	D	1460,429	476,815	,055	-15,92	2936,77
	E	1519,500 <sup>†</sup>	460,647	,028	93,22	2945,78
	F	2036,700 <sup>†</sup>	437,008	,000	683,61	3389,79
D	A	-834,429	445,440	1,000	-2213,63	544,77
	B	-624,429	476,815	1,000	-2100,77	851,92
	C	-1460,429	476,815	,055	-2936,77	15,92
	E	59,071	476,815	1,000	-1417,27	1535,42
	F	576,271	454,018	1,000	-829,49	1982,03
E	A	-893,500	428,088	,637	-2218,97	431,97
	B	-683,500	460,647	1,000	-2109,78	742,78
	C	-1519,500 <sup>†</sup>	460,647	,028	-2945,78	-93,22
	D	-59,071	476,815	1,000	-1535,42	1417,27
	F	517,200	437,008	1,000	-835,89	1870,29
F	A	-1410,700 <sup>†</sup>	402,542	,015	-2657,08	-164,32
	B	-1200,700	437,008	,128	-2553,79	152,39
	C	-2036,700 <sup>†</sup>	437,008	,000	-3389,79	-683,61
	D	-576,271	454,018	1,000	-1982,03	829,49
	E	-517,200	437,008	1,000	-1870,29	835,89

A – sem tratamento; B – ciprofloxacino sistêmico; C – haste revestida por quitosana; D – haste revestida com quitosana e 10% de ciprofloxacino; E – haste revestida com quitosana e 25% de ciprofloxacino; F – haste revestida com quitosana e 50% de ciprofloxacino.

APÊNDICE 3 Quadro dos resultados obtidos no experimento com todos os animais em seus respectivos grupos em relação à radiação do radiofármaco mensurada antes da sua inoculação nos animais (radiofármaco), a radiação residual obtida na seringa após inoculação do radiofármaco nos animais (seringa), a concentração do radiofármaco obtida através da cintilografia do fêmur tratado (captação), o valor mensurado do calo ósseo formado e a observação de supuração quando presente no fêmur tratado (calo/pus), o grau do infiltrado inflamatório encontrado na histologia do fêmur tratado (infiltrado), o grau da angiogênese observada na histologia do fêmur tratado (angiogênese) e o grau da fibroplasia observada na histologia do fêmur tratado (fibroplasia)

Grupo	Radio fármaco (mCi)	Seringa	Captação	Calo/pus	Infiltrado	Angiogênese	Matriz óssea	Fibroplasia
A	0,9	0,139	2035	0,72	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO	LEVE
A	0,97	0,2	4068	0, pus	ACENTUADO	LEVE	LEVE	LEVE
A	0,91	0,102	1055	0,4	ACENTUADO	LEVE	LEVE	LEVE
A	0,94	401	1343	0,9	LEVE	LEVE	LEVE	LEVE
A	1,03	381	1992	0	LEVE	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO
A	1,09	0,46	3068	0,81	LEVE	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO
A	1,07	0,493	2120	0,8	ACENTUADO	LEVE	LEVE	LEVE
A	1,08	0,441	4664	0	LEVE	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO
A	1,06	0,283	1573	0	LEVE	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO
A	1,02	0,402	2209	0,6, pus	LEVE	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO
A	0,954	0,265	3021	0, pus	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO	ACENTUADO
B	0,944	0,25	2239	0,81	LEVE	ACENTUADO	LEVE	LEVE
B	0,91	0,25	1075	0,7	LEVE	LEVE	LEVE	ACENTUADO
B	0,91	0,197	3383	0,91	LEVE	ACENTUADO	LEVE	LEVE
B	1	0,127	2417	0	ACENTUADO	LEVE	LEVE	LEVE
B	0,98	0,256	1747	0,9	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO	LEVE
B	0,94	0,384	2335	0,69	LEVE	LEVE	LEVE	LEVE
B	0,996	0,2	2880	0	LEVE	LEVE	LEVE	LEVE
B	0,99	0,327	1988	1,6	LEVE	ACENTUADO	LEVE	LEVE
C	0,9	0,165	1712	0, pus	ACENTUADO	LEVE	LEVE	LEVE
C	1	0,154	3845	0	LEVE	ACENTUADO	LEVE	ACENTUADO
C	1	0,111	3236	0,49	LEVE	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO
C	1,14	0,444	5152	0,97	LEVE	ACENTUADO	LEVE	LEVE
C	1,1	0,334	2693	0,96	ACENTUADO	LEVE	ACENTUADO	LEVE
C	0,99	0,508	2815	0,6	LEVE	ACENTUADO	LEVE	LEVE
C	1,06	0,438	2847	0,6, pus	ACENTUADO	LEVE	LEVE	LEVE
C	1,02	0,517	2452	0,92	LEVE	LEVE	LEVE	LEVE
D	0,98	160	709	0, pus	ACENTUADO	LEVE	LEVE	LEVE
D	1,05	173	587	0	ACENTUADO	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO
D	1,02	132	163	1,3	LEVE	LEVE	LEVE	LEVE
D	1	311	2853	0	LEVE	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO

D	1,01	318	2055	0	LEVE	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO
D	1,03	258	2292	0,48	LEVE	ACENTUADO	LEVE	LEVE
D	1,08	0,376	2776	0,98	ACENTUADO	ACENTUADO	LEVE	ACENTUADO
E	0,98	118	1442	0,9	LEVE	LEVE	LEVE	ACENTUADO
E	1,02	135	243	1,2	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO	LEVE
E	1	270	632	0,41	ACENTUADO	LEVE	LEVE	ACENTUADO
E	1,05	328	2013	1,36	ACENTUADO	LEVE	LEVE	LEVE
E	1,05	407	1770	1,01	ACENTUADO	ACENTUADO	LEVE	LEVE
E	0,96	357	2909	0, pus	ACENTUADO	LEVE	LEVE	LEVE
E	0,96	344	1609	0,98	LEVE	LEVE	ACENTUADO	ACENTUADO
E	1,07	0,542	1978	0,94	LEVE	ACENTUADO	LEVE	LEVE
F	1	0,199	2343	1,14	ACENTUADO	ACENTUADO	LEVE	ACENTUADO
F	0,9	0,134	919	1,44	LEVE	LEVE	LEVE	ACENTUADO
F	0,9	0,16	381	0,97	ACENTUADO	LEVE	LEVE	LEVE
F	0,8	0,16	669	0,8	ACENTUADO	ACENTUADO	LEVE	LEVE
F	0,97	140	731	1,3	LEVE	LEVE	LEVE	ACENTUADO
F	1,03	115	1139	0	LEVE	LEVE	LEVE	LEVE
F	1,03	140	736	0,37	LEVE	ACENTUADO	LEVE	LEVE
F	1,1	294	800	0,54	LEVE	ACENTUADO	LEVE	LEVE
F	0,97	346	1791	0, 61	LEVE	LEVE	LEVE	ACENTUADO
F	1,02	281	1064	1,26	LEVE	LEVE	LEVE	ACENTUADO