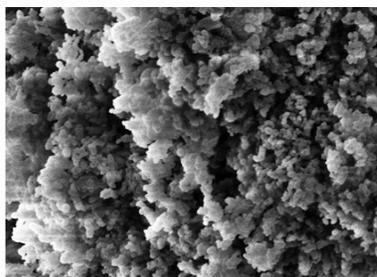
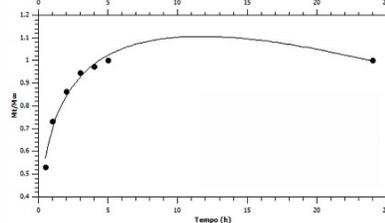


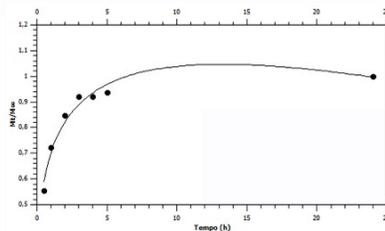
Precursor  
 $\text{CaCl}_2$

+  $\text{CO}_2$

OTC/  
hexano



Precursor  
 $\text{Ca}(\text{OH})_2$



COMUNICADO  
TÉCNICO

464

Colombo, PR  
Novembro, 2020

**Embrapa**

## Metodologia para a incorporação de oxitetraciclina em partículas de carbonato de cálcio

Washington Luiz Esteves Magalhães  
Soraia Zaiioncz  
Silvio Vaz Junior  
Érica Gonçalves Gravina

## Metodologia para a incorporação de oxitetraciclina em partículas de carbonato de cálcio

**Washington Luiz Esteves Magalhães**, Engenheiro Químico, doutor em Ciências e Engenharia de Materiais, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Soraia Zaioncz**, Química, doutora em Ciência e Tecnologia de Polímeros, consultora da Fundação Eliseu Alves, Brasília, DF; **Silvio Vaz Junior**, Químico, doutor em Química Analítica, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF; **Érica Gonçalves Gravina**, Química, doutora em Ciências Químicas, consultora da Fundação Eliseu Alves, Brasília, DF

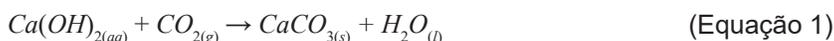
O carbonato de cálcio,  $\text{CaCO}_3$ , é um biomineral essencial presente em um grande número de organismos vivos, é o principal constituinte, por exemplo, de conchas e ossos. Pode ser usado em diversas aplicações na indústria, dentre elas: tintas, selantes, borrachas, papel e suplementação nutricional, para citar as mais comuns (Sun et al., 2018). Devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, porosidade, sensibilidade às variações de pH e lenta biodegradabilidade, micro e nanopartículas de  $\text{CaCO}_3$  vêm sendo utilizadas como carreadores de fármacos (Dizaj et al., 2016, 2017; 2019; Zhou et al., 2019).

Partículas de  $\text{CaCO}_3$  podem ser obtidas a partir de diversos métodos, dentre eles o método denominado sólido-líquido-gás, o qual se baseia na precipitação de  $\text{CaCO}_3$  a partir de uma suspensão de  $\text{Ca(OH)}_2$ , na presença de  $\text{CO}_2$ , de acordo com a Equação 1 apresentada adiante (Onimisi, 2018).

Este método é muito interessante do ponto de vista ambiental, visto que

o  $\text{CO}_2$  utilizado no processo pode ser proveniente de fontes poluidoras, tais como usinas termoelétricas, reduzindo a quantidade de gás que seria descartado na atmosfera.

A oxitetraciclina (OTC) é um antibiótico comum, amplamente utilizado em medicina veterinária, principalmente para o tratamento de infecções bacterianas causadas por organismos Gram-positivos e Gram-negativos em gado (Larbi-Bouamrane et al., 2016). A OTC também é utilizada de forma não terapêutica como promotora de crescimento (Ghanbari et al., 2019). Uma preocupação no uso de antibióticos tetracíclicos veterinários é que uma grande fração, entre 20% e 90%, não é absorvida pelo organismo animal e é excretada de forma inalterada na urina e nas fezes (Chee-Sandford et al., 2001). Esta baixa absorção pode promover resistência das bactérias a esses antibióticos. E, mais ainda, dependendo do seu transporte no solo, pode atingir o lençol freático e conferir resistência aos microrganismos



aquáticos, causando um grande problema ambiental (Vaz Junior, 2016).

O uso de nanopartículas para a liberação de fármacos, mais especificamente de antibióticos, tem mostrado algumas vantagens na liberação lenta dos princípios ativos, aumento do tempo de meia vida do fármaco, e eventualmente responsiva a estímulos como pH e temperatura. Isso é devido às propriedades únicas das nanopartículas, em função do seu tamanho reduzido, grande área superficial disponível e propriedades de adesão às membranas das bactérias (Liu et al., 2018). Estes fatores atuam no aumento da eficácia do tratamento e na redução da dose aplicada (Idris et al., 2020).

Aqui é mostrada uma metodologia apropriada para o carregamento do antibiótico OTC em nanopartículas de carbonato de cálcio provenientes da precipitação de gás carbônico em solução de hidróxido de cálcio. A incorporação de oxitetraciclina (OTC) em partículas de carbonato de cálcio, neste caso, é feita por adsorção física.

## Síntese das partículas de $\text{CaCO}_3$

As partículas de  $\text{CaCO}_3$  foram sintetizadas na Embrapa Agroenergia, utilizando o método de precipitação na presença de  $\text{CO}_2$ . Neste trabalho foram utilizadas duas amostras: a amostra 1 foi sintetizada a partir de uma solução 0,1 mol/L de  $\text{CaCl}_2$ , por 120 minutos, e

a amostra 2 foi sintetizada a partir de uma suspensão de  $\text{Ca(OH)}_2$  em água 0,7% (m/V), por 60 minutos. Em ambos os casos foi borbulhado  $\text{CO}_2$  a uma taxa de 7 L/min, sob agitação mecânica de 1.000 rpm. Ao final da reação, a suspensão foi centrifugada a 4.700 rpm. por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e o sedimento foi seco em estufa com circulação de ar à temperatura de 70 °C.

## BET para medida da área superficial específica

A determinação da área superficial das amostras foi obtida por meio de medidas de adsorção gasosa, utilizando o método de Brunauer-Emmet-Teller (BET), em equipamento Quantachrome Nova 1200e. Inicialmente, as amostras foram submetidas a um processo de degasagem, sob temperatura de 300 °C, durante três horas, sob vácuo dinâmico. Em seguida, as amostras foram submetidas à adsorção de  $\text{N}_2$  em uma faixa de P/P0 de 0 a 0,99.

## Incorporação de oxitetraciclina (OTC)

Duas amostras de carbonato de cálcio com diferentes valores de área superficial específica foram usadas para a incorporação de OTC (Supelco, 99,8%), via adsorção física. A amostra 1, com área superficial específica igual a

13,6 m<sup>2</sup>/g e a amostra 2, com área superficial específica igual a 32,5 m<sup>2</sup>/g.

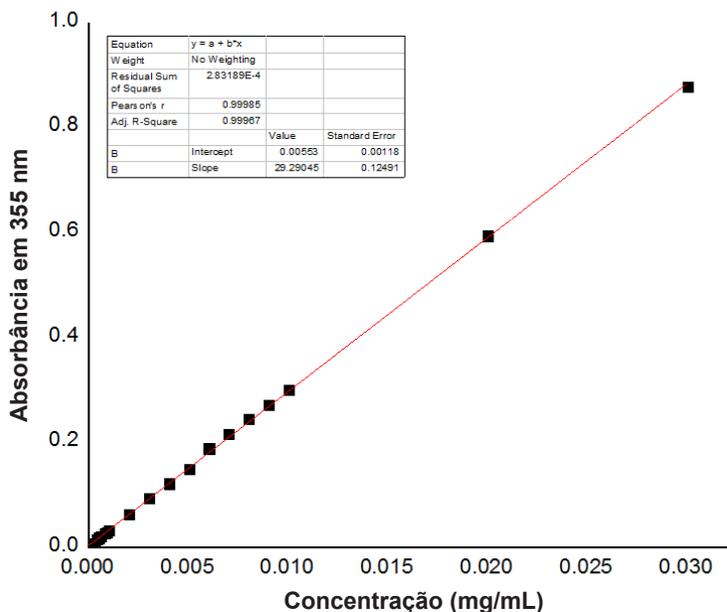
A um tubo do tipo Falcon de 50 mL de capacidade, foram adicionados o carbonato, a OTC e 15 mL de hexano (Alphatec, PA ACS), mantendo a proporção de 5% (m/m) de OTC em relação ao carbonato. As amostras foram submetidas ao moinho de bolas, utilizando elementos esféricos de zircônia de 4 mm, onde permaneceram pelo período de seis horas. Ao final do processo, a amostra era uma suspensão branco amarelada, leitosa e homogênea. A suspensão foi centrifugada mediante 3.000 rpm, durante dez minutos, para a separação do solvente e da OTC não incorporada. Em seguida, os sobrenadantes de volume conhecido (aproximadamente 15 mL) foram submetidos a um processo de extração líquido-líquido, ao abrigo da luz, utilizando água ultrapura do tipo 1, para a extração da fração de OTC presente no meio. O sobrenadante foi transferido para um funil de separação de 125 mL, seguido da adição de igual volume de água ultrapura, sendo os líquidos homogeneizados e, em seguida, deixados em repouso até a completa separação

de fases. A fase inferior aquosa foi recolhida em um béquer de 50 mL e a fase superior (hexano) pode ser recuperada para uma nova incorporação, evitando desperdícios. A extração líquido-líquido foi possível devido à imiscibilidade do hexano em água. Em seguida, o líquido foi concentrado, por meio da evaporação da água em evaporador rotatório (TA Instruments; 35 °C; 100 rpm), ao abrigo da luz. As amostras concentradas foram transferidas para um balão volumétrico de 5 mL e tiveram o volume completado com H<sub>2</sub>O ultrapura do tipo 1. As soluções foram analisadas por espectroscopia UV-Vis na faixa de 190 nm a 600 nm. O processo de incorporação está esquematizado na Figura 1.

A quantidade de OTC que não foi adsorvida na superfície das partículas foi avaliada por meio de espectroscopia UV-Vis, a partir de uma curva de calibração que relaciona a absorbância medida em 355 nm com a concentração da solução. A curva de calibração foi obtida a partir de sucessivas diluições de uma solução estoque de OTC em H<sub>2</sub>O, na faixa de concentrações de 0,03 mg/mL a 0,0003 mg/mL e é apresentada na Figura 2.



**Figura 1.** Descrição gráfica do processo de incorporação da OTC nas partículas de CaCO<sub>3</sub>.



**Figura 2.** Variação da absorbância em 355 nm, em função da concentração de uma solução representativa de OTC em H<sub>2</sub>O.

## Cálculo da quantidade de OTC adsorvida nas amostras

Para calcular a quantidade de antibiótico adsorvido nas partículas de CaCO<sub>3</sub>, faz-se a diferença entre o total de antibiótico adicionado à solução de hexano e a quantidade presente na solução sobrenadante. A eficiência de incorporação é calculada usando a Equação 2.

Os valores da eficiência de incorporação obtidos são apresentados na Tabela 1.

As duas amostras tiveram uma porcentagem de encapsulação/incorporação superior a 99%, usando tempo total de processo de seis horas (Tabela 1).

A alta eficiência de incorporação, independentemente da área superficial das partículas, se deve à boa interação do antibiótico com a superfície das

$$\text{Eficiência de incorporação (\%)} = \frac{(m \text{ OTC adicionada} - m \text{ OTC sobrenadante})}{(m \text{ OTC adicionada})} \times 100$$

(Equação 2)

**Tabela 1.** Amostras de carbonato de cálcio utilizadas e as eficiências de incorporação do antibiótico oxitetraciclina (OTC).

Amostra	Abs em 355 nm	Concentração correspondente (mg/mL)	Quantidade OTC (mg) em 5 mL	Quantidade OTC (mg) adicionada	Eficiência de incorporação (%)
Amostra 1 - CaCO <sub>3</sub> (área superficial = 13,6 m <sup>2</sup> /g)	0,014	0,00035	0,0017	5,5	99,97 (±1,0%)
Amostra 2 - CaCO <sub>3</sub> (área superficial = 32,5 m <sup>2</sup> /g)	0,010	0,0003	0,0015	5,6	99,97 (±0,8%)

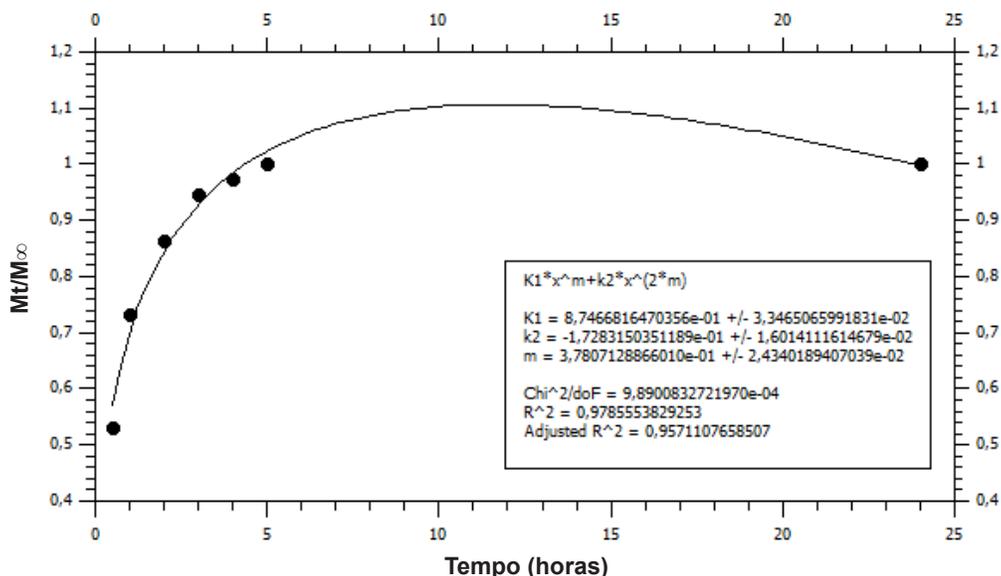
partículas e à baixa solubilidade da OTC em hexano, que promove a migração do soluto para a superfície das partículas. É possível que, se a proporção de OTC em relação à massa de CaCO<sub>3</sub> for aumentada para valores superiores a 5% (m/m), como aquela usada neste trabalho, a eficiência de incorporação seja menor, pois assim a superfície das partículas estaria completamente recoberta com o antibiótico. O excesso de OTC pode ainda gerar múltiplas camadas do antibiótico sobre as partículas, causando uma liberação mais rápida do princípio ativo.

### Liberação da OTC suportada em CaCO<sub>3</sub>

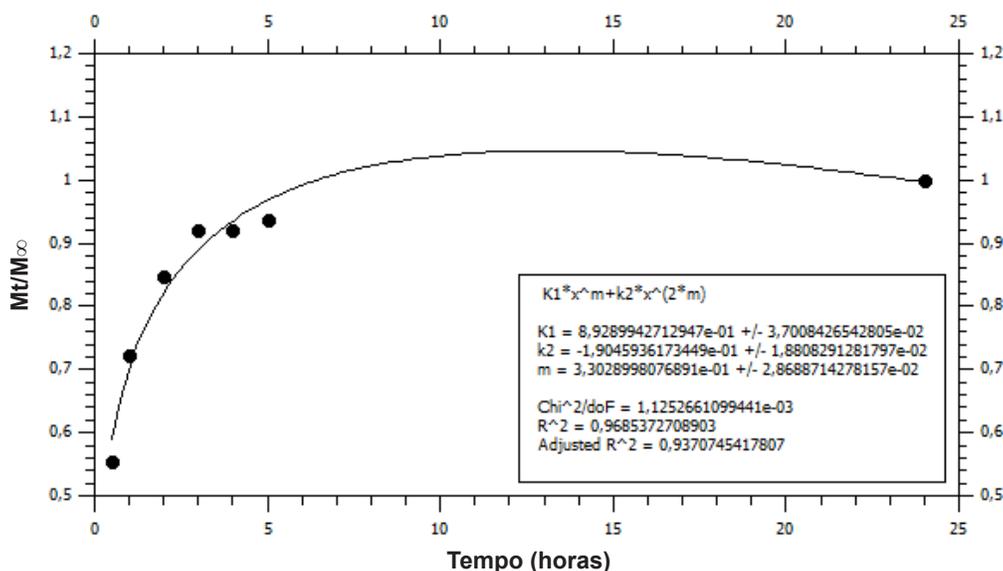
A liberação em água da OTC incorporada às partículas de carbonato de cálcio foi avaliada em intervalos de tempo pré-definidos. Em cada intervalo de tempo foi retirada uma alíquota da solução e avaliada por espectroscopia

UV-Vis, correlacionando a absorbância medida em 355 nm com a concentração da solução correspondente. A taxa de liberação de OTC em função do tempo, para as amostras 1 e 2, está representada nas Figuras 3 e 4, respectivamente. É possível observar que a amostra 1 liberou aproximadamente 34% da OTC incorporada nas primeiras cinco horas, permanecendo constante após 24 horas. A amostra 2 também liberou aproximadamente 34% da OTC nas primeiras cinco horas, chegando ao valor de 37% após 24 horas. Aparentemente, em 24 horas o equilíbrio foi atingido na liberação do fármaco.

As curvas de liberação foram ajustadas de acordo com o modelo matemático proposto por Peppas e Sahlin (1989), que introduziram um segundo termo na equação de Korsmeyer-Peppas, numa tentativa de quantificar as contribuições relativas dos dois fenômenos responsáveis pela liberação, a difusão (transporte Fickiano) e o relaxamento (transporte não Fickiano), usando a Equação 3.



**Figura 3.** Ajuste ao modelo Peppas-Sahlin (1989), para a liberação em água de oxitetraciclina (OTC) suportada em partículas de carbonato de cálcio oriundas do precursor cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e área específica de  $13,5 \text{ m}^2/\text{g}$ .



**Figura 4.** Ajuste ao modelo Peppas-Sahlin (1989), para a liberação em água de oxitetraciclina (OTC) suportada em partículas de carbonato de cálcio oriundas do precursor hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) e área específica de  $32,5 \text{ m}^2/\text{g}$ .

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

$M_t$  = a quantidade de fármaco liberada no tempo  $t$ .

$M_\infty$  = a quantidade de fármaco liberado quando o equilíbrio é atingido (aqui supõe-se que o equilíbrio foi atingido em 24 horas).

$K_1$  e  $K_2$  = representam as contribuições relativas do mecanismo de difusão Fickiana e do mecanismo de erosão/relaxamento.

Coeficiente  $m$  = expoente de difusão Fickiana da formulação.

Os ajustes conseguidos permitem sugerir que a liberação da OTC das partículas de  $\text{CaCO}_3$  é controlada pelo mecanismo de difusão Fickiana, pois os valores das constantes  $K_1$  são maiores que  $K_2$ .

## Conclusões

A incorporação de 5% (m/m) de OTC em partículas de  $\text{CaCO}_3$  utilizando moinho de bolas, hexano e um tempo de processo igual a seis horas pode ser feita por adsorção física, com eficiências de encapsulação/incorporação superiores a 99%. Cerca de 34% da OTC incorporada foi liberada nas primeiras cinco horas, para as duas amostras de carbonato. As partículas provenientes do precursor  $\text{CaCl}_2$  estabilizou a liberação em 24 horas, entretanto a amostra

que utilizou  $\text{Ca(OH)}_2$  mostrou uma taxa de liberação pequena, porém diferente de zero, no período entre 5 e 24 horas.

## Agradecimento

Ao pesquisador Leonardo Valadares (Embrapa Agroenergia) pelas micrografias apresentadas nesta publicação.

## Referências

- CHEE-SANDFORD, J. C.; AMINOV, R. I.; KRAPAC, I. J.; GARRIGUES-JEAN, N.; MACKIE, R. I. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1494–1502, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1494-1502.2001>.
- DIZAJ, S. M.; LOTFIPOUR, F.; BARZEGAR-JALALI, M.; ZARRINTAN, M.-H.; ADIBKIA, K. Physicochemical characterization and antimicrobial evaluation of gentamicin-loaded  $\text{CaCO}_3$  nanoparticles prepared via microemulsion method. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 35, p. 16-23, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.05.004>.
- DIZAJ, S. M.; LOTFIPOUR, F.; BARZEGAR-JALALI, M.; ZARRINTAN, M.-H.; ADIBKIA, K. Ciprofloxacin HCl-loaded calcium carbonate nanoparticles: preparation, solid-state characterization, and evaluation of antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus*. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 535-543, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1161637>.
- DIZAJ, S. M.; SHARIFI, S.; AHMADIAN, E.; EFTEKHARI, A.; ADIBKIA, K.; LOTFIPOUR, F. An update on calcium carbonate nanoparticles as cancer drug/gene delivery system. **Expert**

**Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 4, p. 331-345, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1587408>.

GHANBARI, M.; KLOSE, V.; CRISPIE, F.; COTTER, P. F. The dynamics of the antibiotic resistome in the feces of freshly weaned pigs following therapeutic administration of oxytetracycline. **Scientific Reports**, v. 9, article number 4062, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40496-8>.

IDRIS, S. B.; KADIR, A. A.; ABDULLAH, J. F. F.; RAMANOON, S.-Z.; BASIT, M. A.; ABUBAKAR, M. D. Z. Pharmacokinetics of free oxytetracycline and oxytetracycline loaded cockle shell calcium carbonate-based nanoparticle in BALB/c mice. **Frontiers in Veterinary Science**, 16 June 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00270>.

LARBI-BOUAMRANE, O.; BAL, Y.; ALIOUCHE, D.; COTE, G.; CHAGNES, A. Preparation and characterization of cross-linked chitosan microcapsules for controlled delivery of oxytetracycline. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, n. 6, p. 715-724, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000175>.

LIU, M.-C.; LIU, B.; CHEN, X.-L.; LIN, H.-C.; SUN, X.-Y.; LU, J.-Z.; LI, Y.-Y.; YAN, S.-Q.; ZHANG, L.-Y.; ZHAO, P. Calcium carbonate end-capped, folate-mediated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@mSiO<sub>2</sub> core-shell

nanocarriers as targeted controlled-release drug delivery system. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 32, n. 8, p. 1090-1104, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/0885328217752994>.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release: III: coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutic**, v. 2, p. 169-172, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2).

SUN, R.; ZHANG, P.; BAJNOĆZI, E. G.; NEAGU, A.; TAI, C.-W.; PERSSON, I.; STRØMME, M.; CHEUNG, O. Amorphous calcium carbonate constructed from nanoparticle aggregates with unprecedented surface area and mesoporosity. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, p. 21556-21564, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.8b03939>.

VAZ JUNIOR, S. Sorption behavior of the oxytetracycline antibiotic to two Brazilian soils. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 3, article number 6, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0056-6>.

ZHOU, L.; PENG, T.; SUN, H.; GUO, X.; FU, D. The characterization and amoxicillin adsorption activity of mesopore CaCO<sub>3</sub> microparticles prepared using rape flower pollen. **Minerals**, v. 9, n. 4, 254, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/min9040254>.

Exemplares desta edição  
podem ser adquiridos na:

**Embrapa Florestas**

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,  
Caixa Postal 319  
83411-000, Colombo, PR, Brasil  
Fone: (41) 3675-5600  
[www.embrapa.br/florestas](http://www.embrapa.br/florestas)  
[www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

**1ª edição**

Versão digital (2020)



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA  
BRASIL  
GOVERNO FEDERAL

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Florestas

Presidente

*Patrícia Póvoa de Mattos*

Vice-Presidente

*José Elidney Pinto Júnior*

Secretária-Executiva

*Elisabete Marques Oaida*

Membros

*Annete Bonnet*

*Cristiane Aparecida Fioravante Reis*

*Guilherme Schnell e Schühli*

*Krisle da Silva*

*Marcelo Francis Arco-Verde*

*Marcia Toffani Simão Soares*

*Marilice Cordeiro Garrastazu*

*Valderés Aparecida de Sousa*

Supervisão editorial/Revisão de texto

*José Elidney Pinto Júnior*

Normalização bibliográfica

*Francisca Rasche*

Projeto gráfico da coleção

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica

*Neide Makiko Furukawa*

Fotos capa:

*Leonardo Valadares (esquerda)*

*Soraia Zaiioncz (direita)*

CGPE