



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ÍTZA AMARISIS RIBEIRO PINTO

**UTILIZAÇÃO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (i-PRF) COMO
SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS**

ÍTZA AMARISIS RIBEIRO PINTO

**UTILIZAÇÃO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS INJETÁVEL (i-PRF) COMO
SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL. Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Tit. Maria Aparecida Neves Jardimi

São José dos Campos

2025

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2025]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Pinto, Itza Amarisis Ribeiro

Utilização da Fibrina Rica em Plaquetas (i-PRF) como sistema de liberação de antimicrobianos. / Itza Amarisis Ribeiro Pinto. - São José dos Campos : [s.n.], 2025.
33 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2025.

Orientadora: Maria Aparecida Neves Jardim.

1. Teste in vitro. 2. Fibrina Rica em Plaquetas. 3. Sistema de liberação de drogas. 4. Antibacterianos. I. Jardim, Maria Aparecida Neves, orient. II. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP. IV. Universidade Estadual Paulista (UNESP). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A utilização do i-PRF como sistema de liberação de antimicrobianos tem um impacto significativo, especialmente no tratamento de infecções periodontais. Por ser uma matriz biológica autógena, o i-PRF permite a liberação localizada e sustentada de antimicrobianos, aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo efeitos colaterais sistêmicos. Essa abordagem combina os benefícios regenerativos do i-PRF com o controle de infecções bacterianas, oferecendo uma alternativa segura e inovadora. Os resultados podem abrir caminhos para novas aplicações clínicas, impulsionando tratamentos personalizados e avanços na medicina regenerativa.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The use of i-PRF as a drug delivery system for antimicrobials holds significant potential, particularly in the treatment of periodontal infections. As an autogenous biological matrix, iPRF enables localized and sustained release of antimicrobials, enhancing therapeutic efficacy while reducing systemic side effects. This approach combines the regenerative benefits of iPRF with effective infection control, offering a safe and innovative alternative. The findings of this research may pave the way for new clinical applications, promoting personalized treatments and advancements in regenerative medicine.

BANCA EXAMINADORA

Profª Tit. Maria Aparecida Neves Jardim (Orientador)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profª Tit. Cristiane Yumi Koga Ito

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profª Dra. Camila Lopes Ferreira

Universidade de Taubaté

Campus Taubaté

São José dos Campos, 06 de março de 2025.

DEDICATÓRIA

À Deus. Sem ele nada seria possível.

À minha mãe, Maria Lucy Ribeiro Pinto, minha maior apoiadora e incentivadora desde o início. Meu exemplo de força e resiliência. Ensinou a me reerguer diante das adversidades da vida. Se cheguei até aqui, foi tudo graças a ela. Muita gratidão e amor.

À meu pai, Norival Carlos Pinto (in memorian), que sonhou esse sonho comigo, me apoiou e me cuidou. Tenho certeza de que olha por mim de onde estiver. Sua lembrança me inspira e me faz persistir. Saudades eternas.

Aos meus irmãos pela cumplicidade, amor e compreensão. Em especial minha irmã Ísis, que me acompanhou e me deu suporte todos os dias na realização deste sonho.

À minha orientadora, pela paciência, dedicação e pelas inúmeras lições que me guiaram não apenas neste projeto, mas na vida acadêmica como um todo.

Aos meus amigos e ao meu namorado, pelos momentos inesquecíveis, alegrias e pelo suporte, principalmente em momentos de adversidades.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio, incentivo e colaboração de muitas pessoas, às quais dedico minha mais profunda gratidão.

Primeiramente, agradeço a Deus, por me dar força, saúde e coragem para enfrentar os desafios ao longo desta jornada.

À minha família e meu namorado, pelo amor incondicional, paciência e suporte emocional em todos os momentos. Vocês são minha base e minha maior motivação.

À minha orientadora, Maria Aparecida Neves Jardini, pela dedicação, sabedoria e orientação, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto. Suas palavras de incentivo e seus ensinamentos foram essenciais para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Aos colegas e amigos, por compartilharem momentos de aprendizado, apoio mútuo e por tornarem esta caminhada mais leve e significativa.

À equipe do laboratório Genoma, coordenado pela Profa Tit. Cristiane Koga Ito, pelo acolhimento e ensinamentos.

À instituição ICT Unesp e ao programa de pós-graduação CASB, por me proporcionarem um ambiente rico em conhecimento e por viabilizarem o desenvolvimento deste estudo.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu mais sincero obrigado. Este é um passo importante na minha jornada e sou profundamente grata a cada um de vocês.

"No fundo, todos temos necessidade de dizer quem somos e o que é que estamos a fazer e a necessidade de deixar algo feito, porque esta vida não é eterna e deixar coisas feitas pode ser uma forma de eternidade." José Saramago

RESUMO

Pinto IAR. Utilização da Fibrina Rica em Plaquetas Injetável (i-PRF) como sistema de liberação de antimicrobianos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2025.

O estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da Fibrina Rica em Plaquetas Injetável (i-PRF) como sistema de liberação de antimicrobianos, testando sua incorporação e atividade antimicrobiana contra *Porphyromonas gingivalis*. A preparação do i-PRF foi realizada a partir do sangue de um doador voluntário, seguido da incorporação de amoxicilina e metronidazol. Os grupos testados foram: i-PRF; i-PRF + Amoxicilina; i-PRF + Metronidazol. A incorporação dos fármacos foi monitorada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC) e a atividade antimicrobiana foi avaliada por meio de testes de difusão em ágar. Os resultados demonstraram que a amoxicilina e o metronidazol apresentaram rápida e eficaz incorporação ao i-PRF. Além disso, a Amoxicilina foi eficaz na inibição do crescimento bacteriano quando incorporada ao i-PRF, apresentando halos de inibição significativos. Em contrapartida, o metronidazol não mostrou efeito antimicrobiano sob as condições experimentais testadas. Portanto, i-PRF pode ser uma alternativa viável para a liberação localizada de amoxicilina, promovendo efeitos terapêuticos e regenerativos simultaneamente. No entanto, ajustes na formulação e novos testes são necessários para validar a aplicação do metronidazol no mesmo sistema.

Palavras-chave: Testes in vitro; Fibrina Rica em Plaquetas; Sistema de liberação de drogas; Antibacterianos.

ABSTRACT

Pinto IAR. Use of injectable platelet-rich fibrin (i-PRF) as an antimicrobial delivery system [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2025.

*The study aimed to evaluate the efficacy of Injectable Platelet-Rich Fibrin (i-PRF) as a drug delivery system for antimicrobials, testing its incorporation and antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis*. The i-PRF was prepared from the blood of a voluntary donor, followed by the incorporation of amoxicillin and metronidazole. The tested groups were: i-PRF; i-PRF + Amoxicillin; i-PRF + Metronidazole. Drug incorporation was monitored using Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), and antimicrobial activity was assessed through agar diffusion tests. The results demonstrated that both amoxicillin and metronidazole were rapidly and effectively incorporated into the i-PRF. Moreover, amoxicillin was effective in inhibiting bacterial growth when incorporated into i-PRF, showing significant inhibition zones. In contrast, metronidazole did not exhibit antimicrobial effects under the tested experimental conditions. Therefore, i-PRF may represent a viable alternative for the localized delivery of amoxicillin, promoting both therapeutic and regenerative effects simultaneously. However, formulation adjustments and further testing are necessary to validate the application of metronidazole in the same system.*

Keywords: In vitro Techniques; Platelet Rich Fibrin; Drug delivery system; Antibacterials.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3 PROPOSIÇÃO	15
3.1 Objetivos gerais.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Aspectos éticos	16
4.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos Fármacos Amoxicilina e Metronidazol	16
4.3 Preparo da Fibrina Rica em Plaquetas Injetável (i-PRF) e Incorporação dos Antibióticos ao (i-PRF).....	17
4.4 Monitoramento de Incorporação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)	18
4.5 Análise do Efeito Antimicrobiano	19
5 RESULTADO	20
5.1 Determinação da MIC para o Fármaco Amoxicilina	20
5.2 Determinação da MIC para o Fármaco Metronidazol	21
5.3 Monitoramento de incorporação por RP-HPLC	22
5.4 Efeito Antimicrobiano	24
6 DISCUSSÃO	25
7 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS.....	28
ANEXO.....	31

1 INTRODUÇÃO

O tratamento clínico convencional para a periodontite tem como objetivo excluir as fontes infecciosas e diminuir a inflamação para interromper a progressão da doença (Ryder et al., 2018). As abordagens convencionais de tratamento periodontal começam com remoção mecânica e alisamento radicular e, em casos apropriados, procedimentos cirúrgicos podem se fazer necessários. No entanto, essa abordagem pode não ser completamente eficaz em garantir o sucesso do tratamento, com isso, a utilização adicional de antibióticos em conjunto com a terapia periodontal pode proporcionar benefícios clínicos adicionais em determinados grupos de pacientes. (Szulc et al., 2018; Arweiler et al., 2014; Cosgarea et al., 2021). Os antibióticos usados adjuvantes ao tratamento periodontal podem ser administrados tanto sistemicamente quanto localmente (Jepsen et al., 2016). Agentes antimicrobianos administrados localmente podem ser uma das estratégias utilizadas como complemento para o tratamento da doença periodontal (Hanes, Purvis, 2003). Eles apresentam algumas vantagens, como proporcionar alta concentração do medicamento na região alvo, não apresentar efeitos colaterais sistêmicos e resistência bacteriana. (Joshi et al., 2016) Os medicamentos administrados localmente parecem ser uma boa solução para o tratamento causal da periodontite, inclusive uma revisão de literatura demonstra que o metronidazol administrado localmente traz resultados significativos no tratamento da periodontite (Szulc et al., 2018).

A Fibrina Rica em Plaquetas Injetável (i-PRF) tem emergido como um inovador biomaterial na odontologia e medicina regenerativa, destacando-se por suas propriedades de liberação controlada de fatores de crescimento e antimicrobianos (Dohan, Ehrenfest et al., 2010). Outro aspecto relevante é biocompatibilidade do iPRF, que, sendo derivada do próprio sangue do paciente, reduz o risco de rejeição e reações adversas. Essa característica torna a i-PRF uma opção atraente para uso em diversas aplicações clínicas, desde o tratamento de infecções peri-implantares até a regeneração de tecidos moles e duros (Choukroun et al., 2006). Uma revisão feita por Miron, Zhang, 2018 proporcionou uma introdução ao uso da Fibrina Rica em Plaquetas Injetável (i-PRF) como potencial sistema para a liberação de várias biomoléculas. Com isso sua associação com agentes antimicrobianos pode ser uma

abordagem válida para o tratamento da periodontite.

O i-PRF é um material biológico eficiente que auxilia positivamente para a angiogênese, cicatrização de feridas, inflamação e processos de regeneração (Aydinyurt et al., 2021). Para exceder a rápida degradação do PRF, o PRF injetável (iPRF) foi desenvolvido por meio da diminuição da velocidade e do tempo de centrifugação, gerando uma concentração maior de fator de crescimento, em uma forma mais fluida que assegura uma liberação mais prolongada desses fatores (Varela et al., 2019). O i-PRF fica líquido por cerca de 15 minutos, podendo ser utilizado durante esse período (Lei et al., 2019). Depois de aplicado, o fibrinogênio líquido humano que está presente no i-PRF é transformado em um coágulo de PRF, que lentamente vai liberando fatores de crescimento em até 10 dias (Kyyak et al., 2020; Varela et al., 2019; Ucak et al., 2020).

Polak et al., 2019 publicaram um estudo onde destacaram a importância de se obter uma associação entre PRF e antibióticos. Os autores obtiveram um resultado promissor, confirmando a atividade antimicrobiana dessa associação por pelo menos 4 dias, sugerindo seu uso como agente antimicrobiano de liberação lenta.

Diante desses achados, o objetivo da presente pesquisa é avaliar os efeitos do i-PRF associado a antibióticos, buscando ampliar o entendimento sobre sua eficácia aplicação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Szulc et al., 2018 revisaram a literatura contemporânea sobre a administração local de medicamentos no tratamento da Periodontite, destacando que essa abordagem pode oferecer concentrações mais altas de agentes terapêuticos diretamente no local afetado, minimizando os efeitos colaterais sistêmicos e melhorando a eficácia clínica. Foi observada abordagens de entrega de medicamentos no tratamento da Periodontite, ressaltando a importância de sistemas de liberação controlada local para melhorar os resultados do tratamento (Joshi et al., 2016).

A Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) é um concentrado plaquetário autólogo de segunda geração amplamente utilizado na medicina regenerativa, especialmente na odontologia, devido ao seu potencial de promover cicatrização e reparo tecidual. Existem diferentes tipos de PRF, cada um com características específicas que influenciam suas aplicações clínicas. (Ghanaati et al., 2018)

O L-PRF (Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos) é obtido por meio da centrifugação do sangue sem a adição de anticoagulantes, resultando em uma matriz de fibrina tridimensional que contém plaquetas e leucócitos, além de fatores de crescimento, os quais desempenham um papel crucial na regeneração tecidual (Takamori et al., 2018).

O a-PRF (Fibrina Rica em Plaquetas Avançada) é uma modificação do L-PRF, obtida através de protocolos de centrifugação ajustados que visam aumentar a concentração de células e fatores bioativos na matriz de fibrina, potencializando a resposta regenerativa (Chellathurai et al., 2020).

Por sua vez, o i-PRF (Fibrina Rica em Plaquetas Injetável) é uma forma líquida do PRF, obtida por centrifugação em baixa velocidade, que mantém células e fatores de crescimento em suspensão, permitindo sua aplicação injetável em áreas de difícil acesso ou onde a aplicação de membranas sólidas não é viável (da Costa et al., 2022).

O T-PRF (Fibrina Rica em Plaquetas de Titânio) é uma variação do PRF obtida utilizando tubos de titânio no lugar dos tradicionais tubos de vidro ou plástico. Segundo Tunali et al., 2014, a utilização do titânio favorece uma melhor ativação plaquetária, resultando em uma matriz de fibrina mais densa e estável, com maior liberação de 13

fatores de crescimento ao longo do tempo, o que potencializa sua aplicação na regeneração tecidual. Além disso, conforme Miron et al. 2017, o T-PRF apresenta vantagens biológicas em comparação com outras formas de PRF, incluindo maior biocompatibilidade e melhor estrutura tridimensional da fibrina, tornando-se uma alternativa promissora para aplicações na odontologia regenerativa.

A incorporação de antibióticos ao PRF tem sido explorada como uma estratégia para melhorar seus efeitos antimicrobianos, com isso Szulc et al.; 2018 revisaram a literatura sobre a administração local de medicamentos no tratamento da periodontite, destacando que essa abordagem pode oferecer concentrações mais altas de agentes terapêuticos diretamente no local afetado, minimizando os efeitos colaterais sistêmicos e melhorando a eficácia clínica. Foi observada a importância dos sistemas de liberação controlada local para otimizar os resultados do tratamento da periodontite (Joshi et al., 2016).

A eficácia antimicrobiana do PRF tem sido amplamente investigada, foi avaliada a eficácia antimicrobiana comparativa do PRF e i-PRF contra cepas padrão de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, observando uma eficácia considerável do i-PRF (Kour et al.; 2018). Além disso, Miron e Zhang 2018 discutiram o i-PRF como um sistema inovador de liberação de medicamentos, destacando sua capacidade de liberar fatores de crescimento e agentes terapêuticos de forma controlada.

A associação de antibióticos ao PRF também tem demonstrado benefícios significativos, com isso Polak et al.; 2019 incorporaram antibióticos (Doxiciclina e Metronidazol) ao PRF, criando um dispositivo biológico de liberação lenta de antibióticos, mostrando-se promissor no combate à periodontite. No mesmo estudo, a incorporação desses antibióticos ao PRF apresentou maior efeito antibacteriano em comparação com a associação de esponja de colágeno com antibióticos.

Foi demonstrada a eficácia da Doxiciclina local combinada com terapia fotodinâmica antimicrobiana durante a terapia periodontal de suporte (Cosgarea et al., 2021). Ercan et al.; 2022 demonstraram que o T-PRF apresentou efeito antibacteriano consistente durante sete dias contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O estudo também concluiu que o T-PRF pode ser utilizado como um sistema de liberação prolongada de Doxiciclina, sendo útil no tratamento cirúrgico de defeitos ósseos peri-implantares e periodontais.

Outros estudos destacaram diferentes abordagens para a incorporação de antibióticos ao PRF, como o de Szulc et al. 2018, que demonstrou que a incorporação de Metronidazol e Tetraciclina ao PRF resultou na liberação de 25% dos medicamentos em 24 horas, enquanto o restante foi liberado conforme a degradação do PRF in vivo, sugerindo seu potencial como um sistema eficaz de liberação de fármacos. Straub et al. 2022 investigaram os efeitos antimicrobianos do PRF incorporado a Clindamicina, demonstrando liberação controlada e prolongada do antibiótico, com significativa atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*.

A possibilidade de utilizar o PRF como veículo para administração de antibióticos foi também explorada em um estudo de Rafiee et al. 2020, que conduziram um experimento in vitro para avaliar a liberação de Metronidazol, Ciprofloxacina e Minociclina a partir de um scaffold injetável de i-PRF. Os resultados mostraram que esse sistema proporcionou uma liberação controlada e sustentada dos agentes antimicrobianos, demonstrando potencial significativo para uso clínico na terapia periodontal.

Por fim, a produção de PRF após a administração oral de antibióticos, como amoxicilina associada ao Ácido Clavulânico, rendeu ao PRF uma atividade antibacteriana melhorada contra *Enterococcus faecalis* (Cieslik-Bielecka et al., 2007). Esse achado reforça a viabilidade da utilização do PRF e suas variações como sistemas inovadores de liberação controlada de fármacos no contexto da periodontia e regeneração óssea.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a incorporação do i-PRF (Fibrina Rica em Plaquetas Injetável) associado a diferentes agentes antimicrobianos e a sua capacidade de liberação desses agentes antimicrobianos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a incorporação dos agentes antimicrobianos Amoxicilina e Metronidazol incorporados à Fibrina Rica em Plaquetas Injetável (i-PRF) utilizando o teste de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC),

Avaliar a liberação desses agentes antimicrobianos

Avaliar a sua capacidade antimicrobiana contra *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* utilizando o teste de difusão em ágar

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi enviado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do ICT UNESP de São José dos Campos (Parecer nº: 4.217.367).

4.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos Fármacos Amoxicilina e Metronidazol

A determinação da MIC foi feita pela técnica do disco difusão de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2021). As soluções estoques dos fármacos Amoxicilina e Metronidazol, foram diluídas em DMSO (Dimetilsulfóxido) na concentração de 10 mg/ml, para o fármaco. Para determinação da concentração inibitória mínima para amoxicilina, foi utilizada a cepa de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), onde previamente antes da realização do teste, a cepa foi semeada em ágar sangue e incubada em jarra de anaerobiose a 37 °C por 10 dias. Após esse tempo, uma suspensão padronizada contendo 10⁷ células/ml foi preparada em solução salina estéril (NaCl 0,9%), com auxílio de espectrofotômetro (AJX-1600; Micronal), de acordo com os seguintes parâmetros: comprimento de onda (λ) de 660 nm e densidade óptica (DO) de 0,077.

Com o auxílio de um swab estéril, o inóculo foi espalhado na superfície do ágar BHI (Brain Heart Infusion Agar) suplementado Hemina + Menadiona na proporção de 1:1000 e as placas mantidas por 5 minutos sob câmara de fluxo laminar para secagem, onde em seguida, foram adicionados discos de papel de filtro estéril, contendo ambos os fármacos nas seguintes concentrações (mg/ml): 10, 5, 2,5 e 1,25 (Zhang et al., 2022). As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 37 °C por 10 dias, onde após este período, foi feita determinação da MIC, por meio de leitura visual da formação de halo de inibição em comparação ao crescimento do grupo

controle de crescimento, de acordo com a CLSI, 2021, com modificações. Os ensaios foram realizados em duplicata em 3 ocasiões diferentes (n=6).

4.3 Preparo da Fibrina Rica em Plaquetas Injetável (i-PRF) e Incorporação dos Antibióticos ao (i-PRF)

Um profissional capacitado fez a coleta do sangue de 1 doador voluntário. O voluntário doou 6 tubos de sangue. O voluntário foi proveniente do ICT Unesp, saudável sistemicamente (avaliado através de anamnese completa e detalhada sobre a condição de saúde sistêmica, histórico médico e dental, e através de hemograma completo que foi solicitado e conferido previamente aos procedimentos).

Para a preparação do i-PRF, tubos de plástico PET de 10 ml de sangue sem a adição de anticoagulante foram centrifugados a 300 mg por 5 minutos em temperatura ambiente usando uma centrífuga horizontal (Bio-PRF, EUA), como ilustrado na Figura 1. A camada líquida de i-PRF (aproximadamente 1 mL) foi coletada. Após a centrifugação, os agentes antimicrobianos foram adicionados ao iPRF usando uma seringa a 0,5 mg/mL de volume. Para incorporação no i-PRF, foi utilizada a concentração que foi mais efetiva no teste de disco difusão, trabalhando-se com 10x a MIC dos respectivos fármacos. A solução de antibiótico, preparada previamente ao teste, foi adicionada ao i-PRF (aproximadamente 1 mL) em ependorfs e agitado com pipeta, logo após a etapa de centrifugação.

Figura 1 – *Etapas da preparação da Fibrina Rica em Plaquetas*



Legenda: Produção de Fibrina Rica em Plaquetas Injetável. A) Centrífuga utilizada para produção de i-PRF; B) Material que foi utilizado para a coleta de sangue dos voluntários; C) Tubos de i-PRF logo após a centrifugação. Fonte: elaborado pela autora.

Os seguintes grupos experimentais foram testados:

- a) i-PRF
- b) i-PRF + Amoxicilina
- c) i-PRF + Metronidazol

4.4 Monitoramento de Incorporação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)

O monitoramento da associação/incorporação dos antibióticos ao i-PRF foi realizado por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Fase Reversa de Alta Eficiência (RP-HPLC), com o objetivo de otimizar as condições necessárias para a incorporação dos agentes farmacológicos ao i-PRF. As concentrações escolhidas para a Amoxicilina e o Metronidazol foram de 0,5 e 1,0 µg/mL, respectivamente, para ambos os antibióticos, incubados com preparações frescas de i-PRF humano à temperatura ambiente por períodos de 0, 15 e 30 minutos. Essas concentrações foram

selecionadas com base no valor de MIC₅₀, previamente determinado contra diferentes cepas de patógenos periodontais, conforme descrito por Lee et al. (2019). Posteriormente, decidiu-se seguir com a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e, com os resultados obtidos, ajustaram-se as concentrações dos agentes antimicrobianos utilizados.

4.5 Análise do Efeito Antimicrobiano

Para investigar os efeitos antimicrobianos do i-PRF incorporado com Amoxicilina e Metronidazol foram realizados testes de difusão em ágar com *Porphyromonas gingivalis*. O inóculo foi preparado conforme descrito anteriormente.

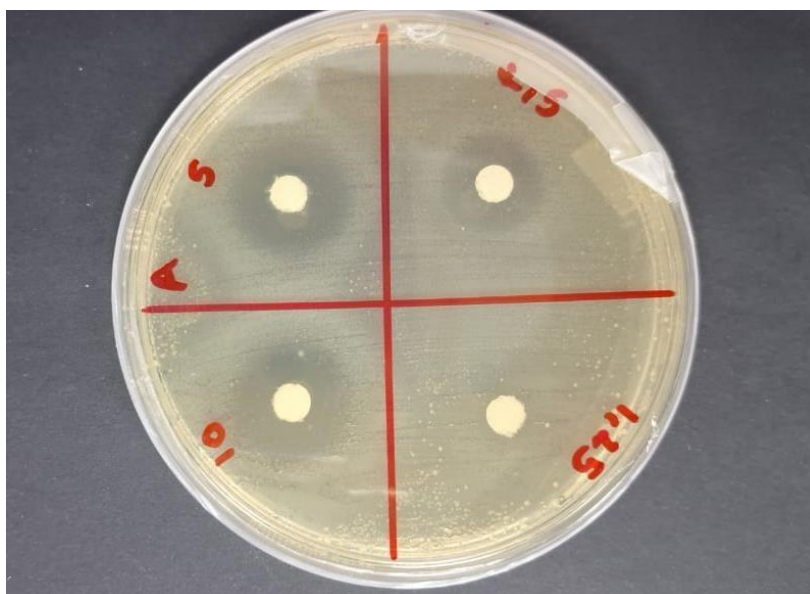
A suspensão foi semeada com o auxílio de um swab estéril sobre a superfície do ágar BHI (suplementado Hemina + Menadiona na proporção de 1:1000). As placas foram mantidas por 5 minutos no interior de câmara de fluxo laminar para secagem. Em seguida, foi feito um orifício padronizado no centro do ágar, com o auxílio de uma ponteira de 100 µL estéril. Alíquotas padronizadas do i-PRF foram obtidas com auxílio de um punch estéril e transferidas ao interior dos orifícios no ágar. Em seguida, as placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 37 °C por 10 dias. Após este período foi feita a leitura visual onde foi observado a formação de halo (indicativo de atividade antimicrobiana). Foi incluído ao teste um grupo controle de crescimento, que é o i-PRF sem incorporação de ambos os fármacos. Os ensaios foram realizados em triplicata em 3 ocasiões diferentes (n=6).

5 RESULTADO

5.1 Determinação da MIC para o Fármaco Amoxicilina

A média das medidas dos halos formados em cada concentração testada, foram apresentadas na Tabela 1. O valor de MIC encontrado para Amoxicilina, foi de 2,5 mg/mL, como ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Determinação da Concentração Mínima Inibitória para Amoxicilina



Legenda: Avaliação da Concentração Mínima Inibitória da amoxicilina frente a *Porphyromonas gingivalis*. Foram avaliadas as concentrações de 1,25 mg/mL; 2,5 mg/mL; 5 mg/mL e 10 mg/mL de amoxicilina. Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 1 - Média e Desvio Padrão da determinação da MIC

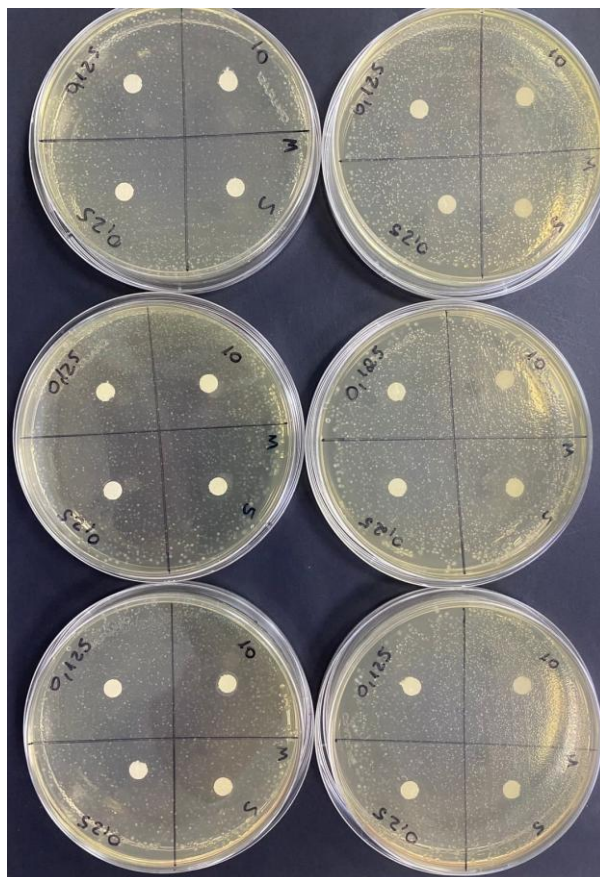
Concentração de Amoxicilina (mg/mL)	Média do Halo de Inibição (cm)	Desvio Padrão (cm)
1,25	0	0
2,5	1,5	0
5	1,6	0
10	1,7	0

Legenda: Tabela de Média e Desvio Padrão dos Halos de Inibição na determinação da Concentração Mínima Inibitória. mg/mL: miligramas por mililitro; cm: centímetros. Fonte: elaborado pela autora.

5.2 Determinação da MIC para o Fármaco Metronidazol

Conforme observado na figura 3, não houve formação de halo de inibição em nenhuma das concentrações testadas para o fármaco Metronidazol. Diante desse resultado, optou-se por não dar continuidade ao teste com *Porphyromonas gingivalis*, uma vez que não foi identificada atividade antimicrobiana significativa nas condições experimentais avaliadas.

Figura 3 - Determinação da Concentração Mínima Inibitória para Metronidazol

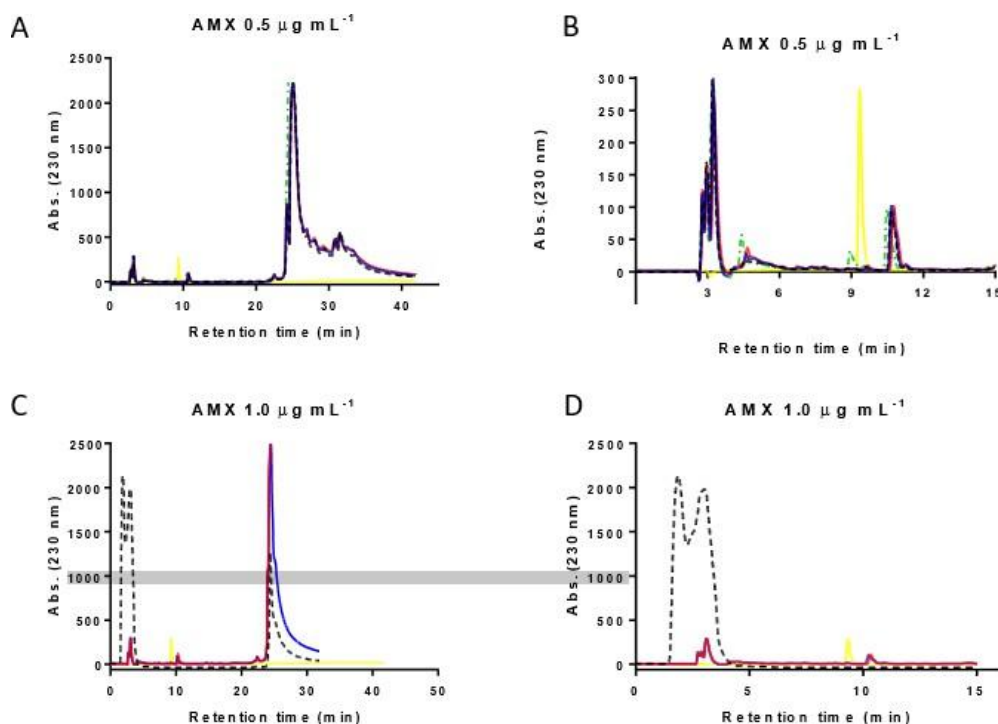


Legenda: Avaliação da Concentração Mínima Inibitória do metronidazol frente a *Porphyromonas gingivalis*. Foram avaliadas as concentrações de 1,25 mg/mL; 2,5 mg/mL; 5 mg/mL e 10 mg/mL de amoxicilina. Fonte: elaborado pela autora.

5.3 Monitoramento de incorporação por RP-HPLC

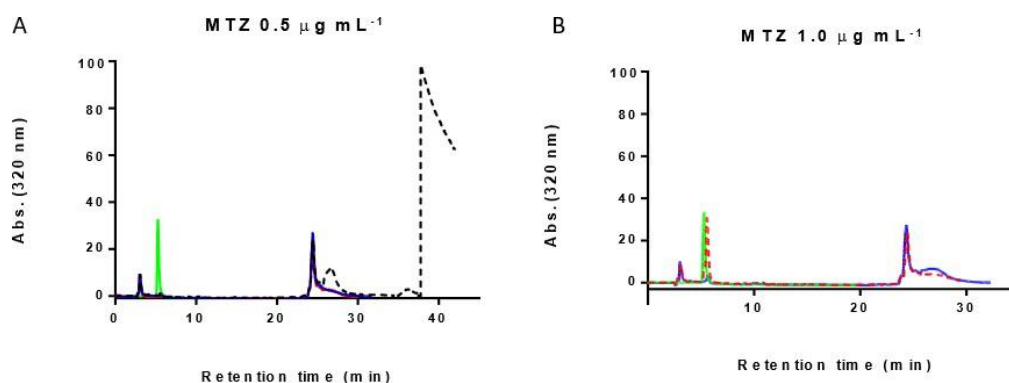
Para a Amoxicilina, podemos verificar na Figura 4 que nas condições de incubação empregadas o antibiótico foi consumido ou que sua incorporação ao i-PRF foi rápida e eficiente. Para o Metronidazol também se observou na Figura 5 uma incorporação rápida e eficiente ao i-PRF.

Figura 4 - Monitoramento por RP-HPLC da Amoxicilina



Legenda: Monitoramento por RP-HPLC da incubação de i-PRF humano com Amoxicilina (AMX) nas concentrações de (A e B) 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (C e D) 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Solução de AMX (0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) co-injetada com a solução residual de AMX (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) após 30 min de A Solução AMX a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (amarelo). B: incubação (verde). Tempos de incubação: t = 0 min (preto), t = 15 min (vermelho) e t = 30 min (azul).
Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5 – Monitoramento por RP-HPLC do Metronidazol



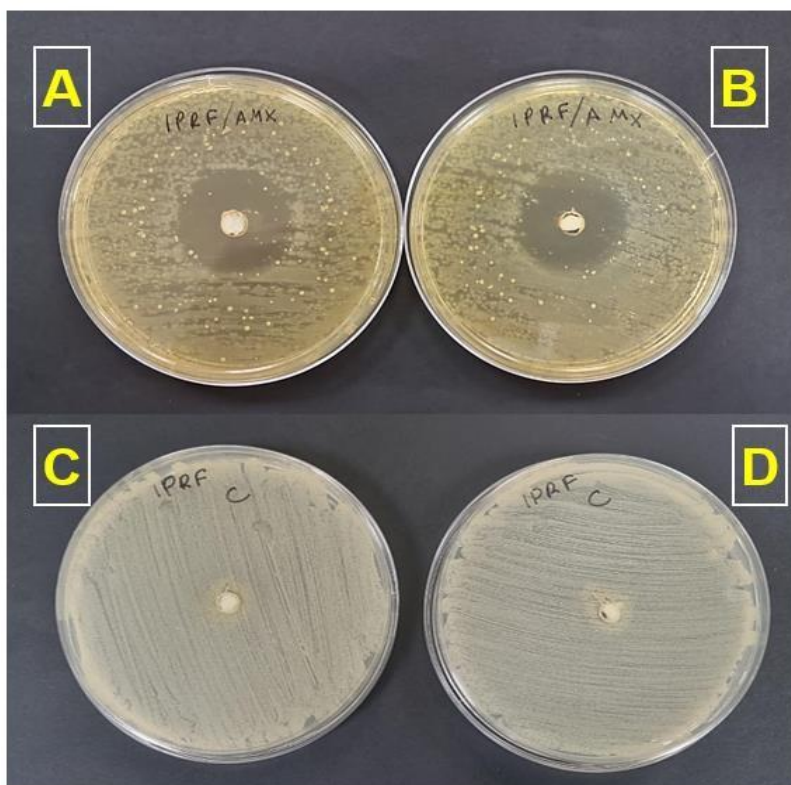
Legenda: Monitoramento por RP-HPLC da incubação de i-PRF humano com Metronidazol (MTZ) nas concentrações de (A) 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (B) 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o gel de fibrina. Entretanto, as análises das

amostras relacionadas ao Metronidazol (MTZ) na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram altamente indicativas de que Solução de Metronidazol (MTZ) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (verde). Tempos de incubação: $t = 0$ min (preto), $t = 15$ min (vermelho) e $t = 30$ min (azul). Fonte: elaborado pela autora

5.4 Efeito Antimicrobiano

Em relação à incorporação da Amoxicilina ao i-PRF, com base nos testes anteriores para determinação da MIC, observou-se que a incorporação de 10 vezes o valor da MIC (25 mg/mL), apresentou atividade antimicrobiana, quando comparada ao grupo controle onde não houve incorporação do fármaco, conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6 – Teste do Halo de Inibição



Legenda: Teste de halo de inibição. Em A e B: amoxicilina incorporada ao i-PRF; C e D: Controle (sem incorporação do fármaco). Fonte: elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a eficácia do i-PRF como um sistema promissor de liberação controlada de antimicrobianos, destacando diferenças importantes entre os agentes testados. A amoxicilina incorporada ao i-PRF demonstrou liberação controlada e atividade antimicrobiana significativa contra *Porphyromonas gingivalis*, corroborando estudos anteriores, como os de (Polak et al. 2019), que destacaram o PRF como um dispositivo biológico de liberação lenta com eficácia comprovada no combate a patógenos periodontais. A combinação de alta biocompatibilidade, ausência de reações adversas e capacidade regenerativa torna o i-PRF uma ferramenta valiosa para o manejo de tratamento de periodontite e a promoção de reparo tecidual, como na periodontia e implantodontia.

Por outro lado, o metronidazol, embora tenha sido rapidamente incorporado ao i-PRF, não demonstrou atividade antimicrobiana sob as condições avaliadas. Esses achados estão em concordância com estudos que apontam variabilidade na eficácia do metronidazol dependendo do sistema de liberação (Szulc et al., 2018). A falta de resultados significativos pode estar relacionada à estabilidade do fármaco, à sua concentração efetiva para inibição de *Porphyromonas gingivalis*, ou até mesmo à interação com a matriz do i-PRF. Esses fatores indicam a necessidade de estudos adicionais para explorar possíveis melhoras no protocolo experimental, como ajustes na concentração do antimicrobiano, métodos de incorporação ou condições de liberação.

A capacidade do i-PRF de sustentar a liberação de antimicrobianos é um ponto crucial para sua aplicação clínica. Estudos como os de Miron e Zhang 2018 destacaram o PRF como uma matriz fluida altamente versátil, capaz de liberar fatores bioativos por até 10 dias, favorecendo tanto o controle de infecções quanto a regeneração tecidual. Esses benefícios são particularmente relevantes no tratamento da periodontite, onde a combinação de eliminação bacteriana e estímulo regenerativo é essencial para o sucesso do tratamento.

Além disso, a aplicação do i-PRF como sistema de liberação pode reduzir os efeitos adversos associados ao uso sistêmico de antimicrobianos, como resistência bacteriana e toxicidade. Ao permitir concentrações locais elevadas de fármacos, o i-

PRF melhora a eficácia terapêutica enquanto minimiza os impactos sistêmicos (Polak et al., 2019; Rafiee et al., 2020). No entanto, a limitação observada no presente estudo com relação ao metronidazol ressalta a necessidade de caracterizar melhor os fatores que influenciam a eficiência da liberação e a atividade antimicrobiana de diferentes agentes.

Os achados *in vitro* deste estudo representam um passo inicial para futuras investigações *in vivo*, permitindo a validação da eficácia e segurança dessa abordagem em modelos animais. Testes nesses modelos poderiam fornecer informações essenciais sobre a estabilidade, tempo de degradação e comportamento do i-PRF como transportador de antimicrobianos em tecidos vivos. Posteriormente, ensaios clínicos controlados seriam necessários para confirmar sua eficácia e se existe viabilidade na prática clínica. Se comprovado seguro e eficaz, o uso do i-PRF como sistema de liberação de antimicrobianos pode ser uma nova abordagem terapêutica de infecções periodontais, proporcionando uma alternativa localizada, menos invasiva e com menor risco de efeitos adversos sistêmicos.

Portanto, este trabalho contribui para o avanço no entendimento sobre o uso do i-PRF como sistema de liberação de antimicrobianos, evidenciando seu potencial no manejo da periodontite, especialmente com a amoxicilina. No entanto, a falta de resultados promissores do metronidazol nas condições avaliadas destaca a importância de investigações adicionais para validar sua utilização. Estudos futuros podem conduzir ajustes no protocolo de incorporação, testes com diferentes microrganismos e investigações mais detalhadas sobre a liberação de antimicrobianos no i-PRF. Assim, este estudo abre caminhos para novas abordagens terapêuticas que associam a regeneração tecidual e controle antimicrobiano, promovendo avanços significativos na medicina regenerativa e na periodontia.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a incorporação da amoxicilina e do metronidazol ao i-PRF ocorreu de forma rápida e efetiva. Além disso, a amoxicilina incorporada ao i-PRF apresentou liberação consistente do fármaco e atividade antimicrobiana comprovada contra *Porphyromonas gingivalis*. No entanto, para o metronidazol, os resultados indicam a necessidade de estudos adicionais para melhor compreender sua eficácia quando incorporado ao i-PRF e seu potencial antimicrobiano em condições experimentais específicas.

REFERÊNCIAS

Arweiler NB, Pietruska M, Pietruski J, Skurska A, Dolińska E, Heumann C, et al. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. *Clin Oral Investig.* 2014;18(9):2129–35. doi: 10.1007/s00784-014-1193-6.

Aydinyurt HS, Sancak T, Taskin C, Basbugan Y, Akinci L. Effects of injectable platelet-rich fibrin in experimental periodontitis in rats. *Odontology.* 2021;109(2):422–32. doi: 10.1007/s10266-020-00557-1.

Chellathurai BNK, Ganesh B, Rajaram V. Advanced Platelet-Rich Fibrin in Periosteal Inversion Technique for Root Coverage: A Case Report. *Clin Adv Periodontics.* dezembro de 2020;10(4):181–5.

Cieslik-Bielecka A, Gazdzik TS, Bielecki TM, Cieslik T. Why the platelet-rich gel has antimicrobial activity? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2007;103(3):303–5. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.08.034.

Cosgarea R, Eick S, Batori-Andronescu I, Jepsen S, Arweiler NB, Rößler R, et al. Clinical and microbiological evaluation of local doxycycline and antimicrobial photodynamic therapy during supportive periodontal therapy: A randomized clinical trial. *Antibiotics.* 2021;10(3):1–12. doi: 10.3390/antibiotics10030277.

Dos Santos Corso da Costa AL, Thiemann A, Oliveira VMM, Fontana AL, Werneck V, Nóbrega A. Aplicação Clínica da Fibrina Rica em Plaquetas Injetável (I-PRF) na Odontologia. *Aesthetic Orofacial Science.* 2022;3(1):68–76. doi: 10.51670/aos.v3i1.85.

Ercan E, Suner SS, Silan C, Yilmaz S, Siddikoglu D, Sahiner N, et al. Titanium platelet-rich fibrin (T-PRF) as high-capacity doxycycline delivery system. *Clin Oral Investig.* 2022;26(8):5429–38. doi: 10.1007/s00784-022-04510-0.

Ghanaati S, Herrera-Vizcaino C, Al-Maawi S, Lorenz J, Miron RJ, Nelson K, et al. Fifteen years of platelet rich fibrin in dentistry and oromaxillofacial surgery: How high is the level of scientific evidence? *Journal of Oral Implantology.* 2018;44:471–92. doi: 10.1563/aaid-joi-D-17-00179.

Hanes PJ, Purvis JP. Local Anti-Infective Therapy: Pharmacological Agents. A Systematic Review. vol. 8. 2003.

Jepsen K, Jepsen S. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. 2016.

Joshi D, Garg T, Goyal AK, Rath G. Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug Deliv.* 2016;23(2):363–77. doi: 10.3109/10717544.2014.935531.

Kour P, Pudakalkatti PS, Vas AM, Das S, Padmanabhan S. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin, and injectable platelet-rich fibrin on the standard strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Contemp Clin Dent*. 2018;9(6):S325–30. doi: 10.4103/ccd.ccd_367_18.

Kyyak S, Blatt S, Pabst A, Thiem D, Al-Nawas B, Kämmerer PW. Combination of an allogenic and a xenogenic bone substitute material with injectable platelet-rich fibrin – A comparative in vitro study. *J Biomater Appl*. 2020;35(1):83–96. doi: 10.1177/0885328220914407.

Lei L, Yu Y, Ke T, Sun W, Chen L. The application of three-dimensional printing model and platelet-rich fibrin technology in guided tissue regeneration surgery for evere bone defects. *Journal of Oral Implantology*. 2019;45(1):35–43. doi: 10.1563/aaid-joi-D-17-00231.

Miron RJ, Zhang Y. Autologous liquid platelet rich fibrin: A novel drug delivery system. *Acta Biomater*. 2018;75:35–51. doi: 10.1016/j.actbio.2018.05.021.

Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Invest*. novembro de 2017;21(8):2619–27. Polak D, Clemer-Shamai N, Shapira L. Incorporating antibiotics into platelet-rich fibrin: A novel antibiotics slow-release biological device. *J Clin Periodontol*. 2019;46(2):241–7. doi: 10.1111/jcpe.13063.

Rafiee A, Memarpour M, Taghvamanesh S, Karami F, Karami S, Morowvat MH. Drug Delivery Assessment of a Novel Triple Antibiotic-Eluting Injectable Platelet-Rich Fibrin Scaffold: An In Vitro Study. *Curr Pharm Biotechnol*. 2020;22(3):380–8. doi: 10.2174/1389201021666200605110250.

Ryder MI, Couch ET, Chaffee BW. Personalized periodontal treatment for the tobacco- and alcohol-using patient. *Periodontol 2000*. 2018;78(1):30–46. doi: 10.1111/prd.12229.

Straub A, Vollmer A, Lãm TT, Brands RC, Stapf M, Scherf-Clavel O, et al. Evaluation of advanced platelet-rich fibrin (PRF) as a bio-carrier for ampicillin/sulbactam. *Clin Oral Investig*. 2022;26(12):7033–44. doi: 10.1007/s00784-022-04663-y.

Szulc M, Zakrzewska A, Zborowski J. Local drug delivery in periodontitis treatment: A review of contemporary literature. *Dent Med Probl*. 2018;55(3):333–42. doi: 10.17219/DMP/94890.

Takamori ER, Teixeira MVT, Menezes K, Carias RBV, Borojevic R. Fibrina rica em plaquetas: preparo, definição da qualidade, uso clínico. *Vigilância Sanitária Em Debate*. 2018;6(1):118. doi: 10.22239/2317-269x.01044.

Tunali M, Özdemir H, Küçükodaci Z, Akman S, Yaprak E, Toker H, et al. A novel platelet concentrate: Titanium-prepared platelet-rich fibrin. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi: 10.1155/2014/209548.

Varela HA, Souza JCM, Nascimento RM, Araújo RF, Vasconcelos RC, Cavalcante RS, et al. Injectable platelet rich fibrin: cell content, morphological, and protein characterization. *Clin Oral Investig*. 2019;23(3):1309–18. doi: 10.1007/s00784-018-2555-2.

Xing R, Witso IL, Jugowiec D, Tiainen H, Shabestari M, Lyngstadaas SP, et al. Antibacterial effect of doxycycline-coated dental abutment surfaces. *Biomedical Materials (Bristol)*. 2015;10(5). doi: 10.1088/1748-6041/10/5/055003.

Zhang M, Seleem MN, Cheng JX. Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing by Stimulated Raman Scattering Imaging of Deuterium Incorporation in a Single Bacterium. *Journal of Visualized Experiments*. 2022;2022(180). doi: 10.3791/62398.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA - CAMPUS DE
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -
UNESP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: UTILIZAÇÃO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS INJETÁVEL (I-PRF) COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PARA O TRATAMENTO DE DEFEITOS DE FURCA: estudo in vivo e in vitro.

Pesquisador: VICTORIA CLARA DA SILVA LIMA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 32732920.3.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.217.367

Apresentação do Projeto:

O projeto está apresentado de forma clara e explicativa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos nobres que muito enriquecerão a ciência.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o solicitado pela Plataforma Brasil.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora atendeu todas as pendências, que deixam mais adequado o projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos encontram-se de acordo com as exigências.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do(a) Relator(a).

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br