



Estudo *ex vivo* do uso do ultrassom fisioterapêutico em pérolas de polimetilmetacrilato dopadas com azul de metileno como carreador de antibiótico

Ex vivo study of use of physiotherapy ultrasound in polymethylmethacrylate beads doped with methylene blue as an antibiotic carrier

Luigi Milanez Ávila Dias Maciel¹ , Sheila Canevese Rahal¹ , Alessandra Melchert¹ , Tulio Genari Filho¹ , Carlos Dias Maciel² , Ivan Felismino Charas dos Santos^{1*}

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

²Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP, Brasil

*Correspondente: ivansantos7@hotmail.com

Resumo

O cimento ósseo de polimetilmetacrilato é considerado um material padrão como carreador de antibiótico em cirurgias ortopédicas. A energia ultrassônica é um método capaz de gerar efeitos biológicos por mecanismos térmicos e não térmicos. Este estudo teve como objetivo analisar a dispersão de azul de metileno em pérolas de polimetilmetacrilato combinada com a exposição em campo acústico gerado por ultrassom não térmico. Foram utilizados 49 corpos-de-prova, cada um composto por uma pérola de polimetilmetacrilato (0,6 mm de diâmetro) dopada com azul de metileno e depositada em amostra de gelatina. Quarenta espécimes foram divididos em quatro grupos de 10 amostras com base nas intensidades de ultrassom (Grupo 1: 1,0 W/cm²; Grupo 2: 1,5 W/cm²) e profundidade (A - 2 cm; B - 3 cm) dos grânulos de polimetilmetacrilato na amostra de gelatina. Os outros nove espécimes constituíram o grupo controle. O grupo controle diferiu estatisticamente dos outros grupos. Todos os grupos irradiados com ultrassom apresentaram diferenças significativas, exceto os Grupos 2A e 2B. A dispersão de azul de metileno na gelatina entre os grupos foi: 1A > 1B; 2A > 1A; 2B > 1A; 2A > 1B; 2B > 1B. Ultrassom de baixa intensidade permitiu maior dispersão de azul de metileno com polimetilmetacrilato posicionado mais superficialmente, e não ocorreu influência da profundidade da pérola com ultrassom de alta intensidade. **Palavras chave:** fonoforese; ultrassom não termal; osteomielite; tratamento.

Abstract

Polymethylmethacrylate bone cement is a standard material used as antibiotic carrier in the orthopedic surgery. The ultrasonic energy method is capable of triggering biological effects based on both thermal and non-thermal mechanisms. The aim of the current study is to analyze methylene blue dispersion in polymethylmethacrylate beads, in association with the acoustic field generated by non-thermal ultrasound.

Recebido em
03 de março de 2021.
Aceito em
2 de junho de 2021.
Publicado
12 de julho de 2021.

www.revistas.ufg.br/vet

Como citar - disponível no site, na página do artigo.

Forty-nine specimens were used, and each specimen comprised one polymethylmethacrylate bead (0.6-mm diameter) doped with methylene blue and deposited in gelatin sample. Forty test specimens were divided into four groups comprising 10 samples, each, based on different ultrasound intensities (Group 1: 1.0 W/cm²; Group 2: 1.5 W/cm²) and polymethylmethacrylate bead depths (A - 2 cm; B - 3 cm) in gelatin sample. The control group comprised other nine specimens and statistically differed from the other groups. All groups irradiated with ultrasound have shown statistically significant differences in methylene blue dispersion, except for Groups 2A and 2B. Methylene blue dispersion in gelatin among groups was 1A > 1B; 2A > 1A; 2B > 1A; 2A > 1B; and 2B > 1B. Low-intensity ultrasound enabled the highest methylene blue dispersion when polymethylmethacrylate bead was positioned superficial; bead depth associated with high-intensity ultrasound did not influence methylene blue dispersion.

Keywords: phonophoresis; non-thermal ultrasound; osteomyelitis; treatment.

Introdução

Vários materiais biodegradáveis e não biodegradáveis têm sido estudados e usados como carreadores de antibióticos⁽¹⁻⁵⁾. O carreador local de antibiótico deve alcançar uma concentração maior comparado com a administração sistêmica, para maximizar a eficácia e minimizar a toxicidade, reduzindo assim o risco de resistência aos antibióticos⁽³⁾.

O cimento de polimetilmetacrilato (PMMA) é considerado um material padrão como carreador de antibiótico em cirurgias ortopédicas⁽⁶⁾, e tem sido aplicado em afecções ósseas e articulares^(3,4,7), podendo ser utilizado na forma de cimento ósseo, espaçador ou pérolas^(2,8). Esse produto consiste em um pó polimérico e um monômero líquido que se misturam para formar uma estrutura sólida^(1,8). As pérolas são produzidas misturando o pó de PMMA e o antibiótico, e o monômero líquido é adicionado imediatamente após a mistura se tornar pastosa e não viscosa, e podem ser colocadas em um fio de aço⁽⁹⁾. Por sua vez, as pérolas de PMMA são utilizadas para distribuição de altas concentrações de antibióticos no local da infecção e para preencher o espaço morto ósseo⁽²⁾.

Algumas desvantagens associadas ao uso do PMMA como base de administração local de antibióticos incluem a formação de biofilme na superfície das pérolas ou do PMMA e a diminuição da disponibilidade de antibiótico ao longo do tempo^(2,4,8). Desse modo, os níveis subterapêuticos prolongados aumentariam o risco de resistência bacteriana⁽⁶⁾. Além disso, o PMMA não é reabsorvível, sendo necessário um segundo procedimento cirúrgico para a sua remoção^(1,3). Apesar das controvérsias, as pérolas de PMMA com antibióticos têm fornecido bons resultados clínicos em casos de osteomielite crônica^(1,5,6,9). No entanto, diversos fatores podem influenciar na liberação do antibiótico do PMMA, como as características do antibiótico, as propriedades do cimento (composição, porosidade e quantidade do monômero), entre outros^(1,8).

Por sua vez, a energia do ultrassom é capaz de gerar efeitos biológicos por mecanismos térmicos e não térmicos^(10,11). Os métodos térmicos incluem a fisioterapia, hipertermia e ultrassom de alta intensidade; e o ultrassom pulsado não térmico e de baixa

intensidade é utilizado para estimular a consolidação óssea⁽¹¹⁾. Os mecanismos de terapia de ultrassom pulsado não térmico e de baixa intensidade são incertos devido a diversas variáveis que inclui a liberação de fármacos por permeabilização da pele⁽¹¹⁾. Um dos efeitos está associado à oscilação de partículas devido ao movimento da onda do ultrassom através dos diferentes tecidos⁽¹²⁾. Por outro lado, o aumento da permeabilização cutânea obtida por meio de terapias de ultrassons não térmicas induz a formação de bolhas de gás microscópicas, ou seja, a cavitação que induz a rompimento molecular da camada cutânea facilitando assim a penetração dos medicamentos⁽¹⁰⁻¹²⁾. Para a fonoforese é recomendado o uso do ultrassom de onda contínua devido à otimização do tempo de interação entre o ultrassom, fármaco e o tecido, contudo é mais frequente o uso do ultrassom pulsado com frequência fixa na rotina clínica^(11,12).

Nesse contexto, objetiva-se com o presente estudo analisar a dispersão de azul de metileno em pérolas de PMMA combinada com a exposição em campo acústico gerado por ultrassom não térmico. A hipótese era que o ultrassom poderia aumentar a dispersão do produto incorporado nas pérolas, de acordo com a intensidade e profundidade das pérolas.

Materiais e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (Unesp) (processo nº 59/2016).

Pérolas de PMMA

Inicialmente, foi desenvolvido um molde de silicone (Siloc[®], ITW Polymers, São Paulo, Brasil) utilizando uma placa de Petri (23 cm de diâmetro) como base do molde. A sua superfície interna foi revestida com vaselina para evitar aderência^(2,13-15). O silicone foi distribuído proporcionalmente em toda a placa de Petri, e 50 pérolas sintéticas (0,6 mm de diâmetro) embebidas em vaselina foram distribuídas em duas placas, totalizando 25 pérolas em cada placa (Figura 1 e 2).

A segunda camada foi retirada após o período de secagem e as pérolas sintéticas foram removidas. Na etapa seguinte, as pérolas de PMMA foram preparadas misturando aproximadamente 5 g de pó de polímero para 2,5 mL de monômero líquido (Cimento ósseo Baumer Osteo Class[®], Baumer, São Paulo, Brasil) (proporção de 2: 1) e 0,02 g de azul de metileno. A mistura foi submetida à polimerização e depositada na base do molde de silicone. Em seguida, a segunda camada do molde foi colocada e mantida até a finalização da polimerização, totalizando 10 minutos. Por fim, as pérolas de PMMA (0,6 mm de diâmetro) dopadas com azul de metileno foram removidas do molde de silicone^(2,15).

Corpos de prova à base de gelatina

Os corpos de prova foram produzidos por meio da mistura de 40 g de pó de gelatina sem sabor (Gelatina em pó Fleischmann[®], Fleischmann, São Paulo, Brasil) e 400 mL de água em um copo limpo. O copo foi colocado num agitador magnético (75° C - 85° C) até se obter uma mistura uniforme e transparente. A mistura foi distribuída em cinco frascos plásticos de 180 mL e submetida à gelificação em temperatura ambiente (22° C)⁽¹⁵⁾.

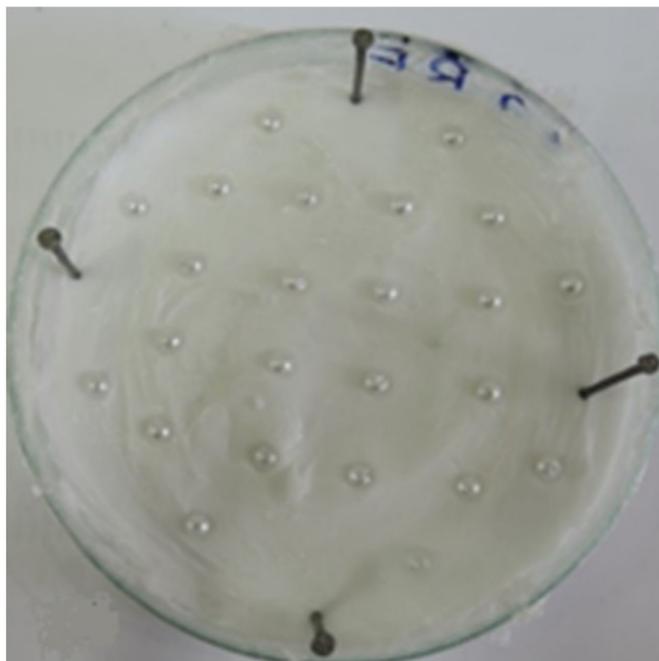


Figura 1. Molde de silicone com as pérolas sintéticas (0,6 mm de diâmetro) embebidas em vaselina e distribuídas pela placa de Petri.

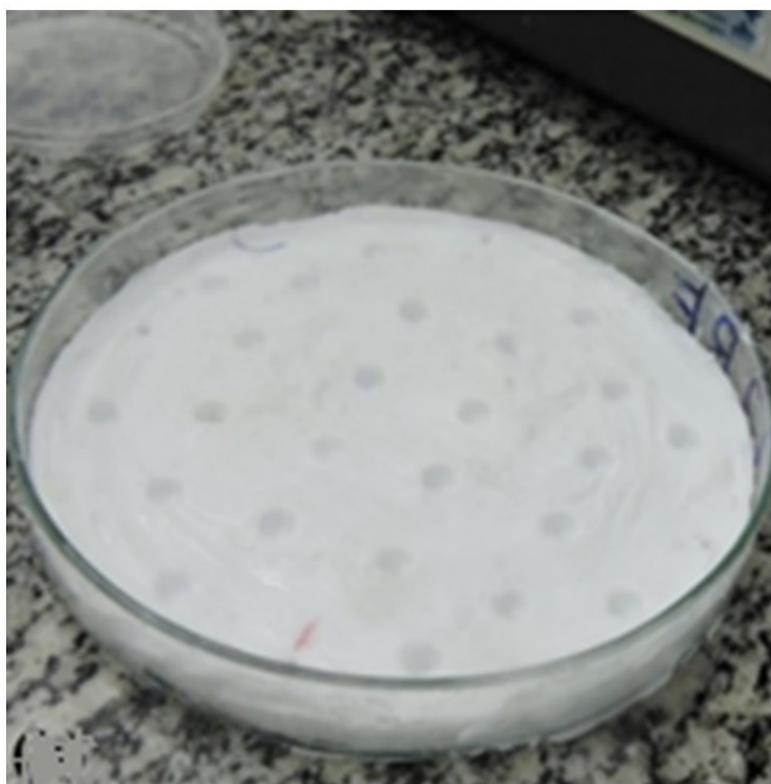


Figure 2. Aparência do molde de silicone após a secagem.

Amostras

Cada amostra foi composta por uma pérola de PMMA (0,6 mm de diâmetro) dopada com azul de metileno e colocadas no corpo de prova a base de gelatina. Para tal, foi realizado um orifício no centro de cada amostra de gelatina com profundidade de 2 ou 3 cm, utilizando uma espátula aquecida (5 mm de largura). A pérola de PMMA dopada com azul de metileno foi depositada no orifício e, em seguida, foi realizada a cobertura do orifício com a gelatina preparada conforme mencionado acima. Os corpos de prova (n = 48) foram mantidos em geladeira por 12 horas para posterior realização do teste de dispersão.

Teste de dispersão

Quarenta amostras foram divididas em quatro grupos com mesmo número de amostras, de acordo com as intensidades do ultrassom (Grupo 1: 1,0 W/cm²; Grupo 2: 1,5 W/cm²) e profundidade (A - 2 cm; B - 3 cm) das pérolas de PMMA embebidas em azul de metileno na gelatina (Tabela I). As restantes amostras (n = 8) compuseram o grupo controle e não foram irradiadas com ultrassom. O uso do grupo controle teve como objetivo verificar a existência ou não da dispersão passiva do azul de metileno das pérolas de PMMA dopados no agente gelificante⁽¹⁵⁾.

Tabela I. Grupos das amostras (pérolas de PMMA dopadas com azul de metileno em agente gelificante) para os testes de dispersão

Grupo 1 (1.0 W/cm²)	Grupo 2 (1.5 W/cm²)
Grupo 1A (n=10) - 2 cm profundidade	Grupo 2A (n=10) - 2 cm profundidade
Grupo 1B (n=10) - 3 cm profundidade	Grupo 2B (n=10) - 3 cm profundidade

A irradiação pelo ultrassom foi realizada em modo contínuo e aplicação estacionária por cinco minutos utilizando o equipamento de ultrassom de baixa potência (1 MHz) (Sonacel Expert[®], Bioset, São Paulo, Brasil). Após a aplicação do ultrassom, os corpos de prova foram mantidos por uma hora na geladeira (5° C). Em seguida, as amostras foram retiradas dos frascos e seccionadas ao meio para serem fotografadas com uma máquina digital (Sony Digital Camera[®], Osaka, Japão). As fotografias digitais foram ajustadas ao tamanho real e a dispersão do azul de metileno foi medida por meio de ferramenta gráfica computacional (Adobe Illustrator[®], Adobe, Texas, EUA).

Análise estatística

Após o teste de Kolmogorov-Smirnov avaliar a normalidade dos dados, a comparação entre os grupos foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA One way) para amostras independentes. As diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad InStat (7Prism - GraphPad Software[®], Texas, EUA).

Resultados

Não foi identificada nenhuma complicação durante o estudo. A tabela II descreveu os valores de dispersão do azul de metileno de acordo com os grupos. O grupo controle diferiu estatisticamente dos demais grupos ($p < 0,0001$).

Todos os grupos irradiados com ultrassom apresentaram diferenças significativas, exceto os Grupos 2A e 2B (Tabela III). A dispersão do azul de metileno entre os grupos irradiados foi a seguinte: 1A > 1B; 2A > 1A; 2B > 1A; 2A > 1B; 2B > 1B.

Tabela II. Média, desvio padrão (DP), mediana e intervalo de confiança (IC) da dispersão do azul de metileno nas amostras gelificantes após irradiação pelo ultrassom baseado na intensidade do ultrassom (G1 - 1.0 W/cm²; G2 - 1.5 W/cm²) e profundidade das pérolas de PMMA (A - 2 cm; B - 3 cm), e Grupo controle

Grupos	Média ± DP	Mediana	95% IC
Grupo 1A	4,712 ± 0,18	4,712	4,581 - 4,844
Grupo 1B	4,268 ± 0,21	4,275	4,117 - 4,419
Grupo 2A	5,227 ± 0,25	5,236	5,048 - 5,406
Grupo 2B	5,127 ± 0,33	5,138	4,891 - 5,363
Grupo Controle	3,915 ± 0,06	3,914	3,872 - 3,958

Tabela III. Comparação da dispersão do azul de metileno nas amostras gelificantes entre os grupos após irradiação baseado na intensidade do ultrassom (G1 - 1.0 W/cm²; G2 - 1.5 W/cm²) e profundidade das pérolas de PMMA (A - 2 cm; B - 3 cm), e Grupo controle

Grupos	Valor de p
1A versus 1B	< 0,01
1A versus 2A	< 0,001
1A versus 2B	< 0,01
1B versus 2A	< 0,001
1B versus 2B	< 0,001
2A versus 2B	> 0,05

Discussão

Este estudo pesquisou o potencial do ultrassom na dispersão do azul de metileno em pérolas de PMMA, com o intuito de utilizá-lo para aumentar o transporte de fármacos, principalmente antibióticos, incorporados à resina. Além disso, o ultrassom não térmico tem sido usado como uma ferramenta para a administração transdérmica de medicamentos, embora o mecanismo de ação não seja totalmente esclarecido⁽¹⁵⁾.

A hipótese do estudo foi parcialmente alcançada visto que foi identificada maior dispersão do azul de metileno nas pérolas de PMMA posicionado mais superficial quando utilizado o ultrassom de baixa intensidade (1,0 W/cm²). Este estudo destaca o fato de que a comparação entre o Grupo 2A e o Grupo 2B não mostrou diferença significativa na dispersão do azul de metileno, sugerindo que a posição da pérola de PMMA não é influenciada pelo ultrassom com maior intensidade (1,5 W/cm²).

O PMMA é o padrão ouro na manutenção de níveis elevados de administração de antibióticos em infecções ortopédicas e com alta biocompatibilidade, porém é um material não absorvível, sendo necessário removê-lo por meio de um segundo procedimento cirúrgico^(1,2). Por outro lado, materiais biodegradáveis como as proteínas (ex. colágeno, gelatina, trombina e coágulo de sangue autólogo), materiais de enxerto ósseo (ex. sulfato de cálcio e enxerto ósseo esponjoso) e polímeros sintéticos (ex. ácido polilático, polilactídeo-co-glicolídeos, polihidroxicanoatos, policaprolactona, polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato e polidimetilsiloxano reticulado) podem ser considerados uma alternativa na manutenção de antibiótico^(1,3). A principal vantagem do uso de materiais biodegradáveis inclui a diminuição da necessidade de reconstrução de defeitos ósseos, permite a modificação das variáveis na liberação precisa das quantidades de medicamentos ao longo de um tempo específico, não espalha os antibióticos nos tecidos circunvizinhos e evita a fixação de bactérias nesses materiais absorvíveis⁽¹⁻⁵⁾. A desvantagem está associada ao seu alto custo e ausência da aprovação pelo Food and Drug Administration (FDA) para seu uso como veículos de antibióticos⁽¹⁾.

O azul de metileno foi usado como um identificador indireto da dispersão de drogas por meio das pérolas de PMMA usando o ultrassom, contudo mais estudos são necessários para determinar a viabilidade desse método usando antibióticos como a gentamicina. Este antibiótico é comumente incluído nas pérolas de PMMA devido ao amplo espectro de atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, solubilidade em água e alta termoestabilidade^(2,8). O método de imunoensaio foi utilizado para avaliar espécimes (480 mg de sulfato de gentamicina em pó misturado com 40 g de cimento ósseo) imersos em solução salina tamponada por 28 dias⁽¹⁷⁾. Os autores identificaram que a alta quantidade de antibióticos estava presente por pelo menos 14 dias. Nessa perspectiva, o ultrassom poderia ser usado para manter a liberação do antibiótico; entretanto, essa hipótese deve ser melhor avaliada. Outros antibióticos como a tobramicina e vancomicina foram utilizados em pérolas de PMMA⁽²⁾.

Os corpos de prova a base de gelatina foram escolhidos devido à velocidade de propagação da onda do ultrassom nesse meio ser similar a velocidade de propagação em tecidos moles, sem significativa atenuação da onda do ultrassom, corroborando com a literatura^(13,14,18-20). O uso desses tipos de espécimes que simulam tecidos biológicos foram utilizados em pesquisas de terapias de ultrassom devido à sua homogeneidade acústica, alto poder de gelificação em baixas concentrações, baixa viscosidade e velocidade de propagação da onda de ultrassom semelhante aos tecidos biológicos^(13,14). Por outro lado, a fonoforese pode ser influenciada por promotores

de permeabilidade física como gel, cremes ou compostos com hidrocortisona⁽¹⁵⁾, e a aparência do silicone oferece baixa atenuação e baixo poder de transmissão das ondas do ultrassom⁽²¹⁾. Estudo realizado por Benson e McElney⁽²²⁾ avaliou diversos produtos tópicos com efeitos anti-inflamatórios e concluiu que a capacidade de transmissão das ondas do ultrassom é uma característica particular da formulação de cada produto, podendo aumentar com alta frequência do ultrassom, porém pode causar alterações na composição desses produtos.

As pérolas de PMMA utilizados no estudo foram padronizados quanto à composição, homogeneização e tamanho e exigindo a produção de um molde de silicone. Porém, quando elas são preparadas pelos cirurgiões podem apresentar algumas desvantagens que incluem a mistura inadequada de antibióticos no material e pérolas com tamanhos diferentes, o que pode induzir menor disponibilidade do antibiótico⁽²⁾. As intensidades utilizadas no presente estudo foram baseadas em pesquisas relacionadas com os parâmetros físicos do campo ultrassônico na fonoforese⁽¹⁵⁾. O tempo de aplicação do ultrassom foi o mesmo para todos os grupos, contudo com variação da intensidade do ultrassom e da profundidade. Grupos submetidos ao ultrassom de baixa intensidade (1,0 W/cm²) apresentaram maior dispersão de azul de metileno nas pérolas de PMMA colocadas mais superficial (Grupo 1A) em comparação com as pérolas em região mais profunda (Grupo 1B). No contexto clínico, esse fato representa um viés, uma vez que a liberação de baixo nível do antibiótico pode ocorrer nas pérolas de PMMA colocados mais profundamente.

A irradiação pelo ultrassom foi realizada de forma contínua e estacionária por cinco minutos para minimizar um possível sobreaquecimento da cabeça do ultrassom, conforme a literatura⁽¹⁵⁾. Por outro lado, a variação quanto à intensidade e frequência do ultrassom não permite uma padronização efetiva da técnica^(2,15). De acordo com os autores, nenhum estudo usou o ultrassom para determinar a profundidade de penetração do fármaco, entretanto, os postulados teóricos a despeito da irradiação do ultrassom adotam que quanto maior a intensidade do ultrassom maior sua ação⁽²⁰⁾.

A comparação entre o Grupo 1A e o Grupo 2A demonstrou que a maior dispersão do azul de metileno nas pérolas de PMMA ocorreu com o ultrassom de maior intensidade (Grupo 2A), estando ambos os grupos com as pérolas colocadas mais superficial nos corpos de prova. Comparando o Grupo 1A e o Grupo 2B, o ultrassom utilizado em maior intensidade (1,5 W/cm²) também permitiu maior dispersão do azul de metileno independente da profundidade das pérolas, uma vez que o Grupo 1A estava localizado a 2 cm de profundidade e o Grupo B a 3 cm de profundidade. A comparação entre o Grupo 1B e o Grupo 2A demonstrou que a maior dispersão também ocorreu com o ultrassom de maior intensidade mesmo com as pérolas do Grupo 1B na profundidade de 3 cm, e as pérolas do Grupo 2A na profundidade de 2 cm. A importância da intensidade do ultrassom ficou mais evidente na comparação entre o Grupo 1B e o Grupo 2B, ambos com as pérolas colocadas a 3 cm de profundidade, sendo que a maior dispersão foi no Grupo 2B (1,5 W/cm²). Diferenças estatísticas foram identificadas no Grupo Controle

com os demais grupos, demonstrando a influência do ultrassom na dispersão do azul de metileno nas pérolas de PMMA, corroborando com a literatura^(15,16). Esses autores relataram que a intensidade e o tempo de aplicação do ultrassom desempenharam um papel importante na aplicação transdérmica. Por outro lado, a intensidade do ultrassom deve ser limitada para evitar danos à pele e pode ser utilizada em geral entre 0,008 e 50 W/cm²(15).

Conclusão

O ultrassom de baixa intensidade permite maior dispersão do azul de metileno em perlas de polimetilmetacrilato (PMMA) posicionadas mais superficialmente, e não há influência da profundidade da pérola com o ultrassom de alta intensidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES e ao CNPq (Processo número: 01585/2017-2).

Conflitos de interesses

Os autores declaram não terem conflitos de interesses.

Referências

1. Gogia JS, Meehan JP, Di Cesare PE, Jamali AA. Local antibiotic therapy in osteomyelitis. *Seminars in Plastic Surgery*. 2009. 23(2): 100-107. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1214162>.
2. Gomes D, Pereira M, Bettencourt AF. Osteomyelitis: an overview of antimicrobial therapy. *Brazilian Journal of Pharmacology Science*. 2013. 49(1): 13-27. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502013000100003>.
3. Mihok P, Murray J, Williams R. Novel antibiotic delivery and novel antimicrobials in prosthetic joint infection. *Journal of Traumatology and Orthopedics*. 2016. 4(1): 52-54. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.82502013000100003>.
4. Dorati R, Detrizio A, Modena T, Conti B, Benazzo F, Gastaldi G, GENTA I. Biodegradable scaffolds for bone regeneration combined with drug-delivery systems in osteomyelitis therapy. *Pharmacology (Basel)*. 2017. 10(4): 1-21. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ph10040096>.
5. Ford CA, Cassat JE. Advances in the local and targeted delivery of anti-infective agents for management of osteomyelitis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2017. 15(9): 851-860. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1372192>.
6. McLaren AC. Alternative materials to acrylic bone cement for delivery of depot antibiotics in orthopaedic infections. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2004. 427: 101-106. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/01.blo.0000143554.56897.26>.
7. Cui Q, Mihalko WM, Shields JS, Ries M, Saleh KJ. Antibiotic-impregnated cement spacers for the treatment of infection associated with total hip or knee arthroplasty. *Journal of Bone Joint Surgery American*. 2007. 89: 871-882. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.E.01070>.

8. Magnan B, Bondi M, Maluta T, Samaila E, Schirru L, Dall'Oca C. Acrylic bone cement: current concept review. *Musculoskeletal Surgery*. 2013. 97: 93-100. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12306-013-0293-9>.
9. Mohanty SP, Kumar MN, Murthy NS. Use of antibiotic-loaded polymethyl methacrylate beads in the management of musculoskeletal sepsis — a retrospective study. *Journal of Orthopedic Surgery*. 2003. 11(1): 73-79. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/230949900301100115>.
10. Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Physics Therapy*. 2001. 81(7): 1351-1358. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/ptj/81.7.1351>.
11. Miller DL, Smith NB, Bailey MR, Czarnota GJ, Hynynen K, Makin IR. Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *Journal of Ultrasound Medical*. 2012. 31(4): 623-634. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3810427/>.
12. Ter Haar G. Therapeutic ultrasound. *European Journal of Ultrasound*. 1999. 9:3-9. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0929-8266\(99\)00013-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0929-8266(99)00013-0).
13. Goldstein A. The effect of acoustic velocity on phantom measurements. *Ultrasound Medical Biology*. 2000. 26(7): 1133-1143. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-5629\(00\)00248-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-5629(00)00248-9).
14. Beard M. Guided wave inspection of embedded cylindrical structures. 2002. *Engineering*. 11 (2): 233-236.
15. Cárnio PB. Variação dos parâmetros físicos do campo ultra-sônico em fonoforese com diclofenaco gel. 2006. 76p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.11606/D.82.2006.tde-30072007-160907>.
16. Escobar-Chávez JJ, Bonilla-Martínez D, Villegas-González MA, Rodríguez-Cruz IM, Domínguez-Delgado CL. The use of sonophoresis in the administration of drugs throughout the skin. *Journal of Pharmacology Science*. 2009. 12(1): 88-115. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18433/J3C30D>.
17. Azi ML, Kfuri Junior M, Martinez R, Paccola CAJ. Bone cement and gentamicin in the treatment of bone infection: background and in vitro study. *Acta Orthopedics*. 2010. 18(1): 31-34. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-78522010000100006>.
18. Goldstein A. The effect of acoustic velocity on phantom measurements. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2000. 26(7): 1133-1143. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-5629\(00\)00248-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-5629(00)00248-9).
19. Culjat MO, Goldenberg D, Tewari P, Singh RS. A review of tissue substitutes for ultrasound imaging. *Ultrasound Medicine and Biology*. 2010. 36(6): 861-873. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.02.012>.
20. Low L, Reed A. *Eletroterapia explicada: princípios e prática*. 2001. 3 ed. São Paulo, Manole, 131p.
21. Balmaseda Junior MT, Fatehi MT, Koozekanani SH, Lee AL. Ultrasound therapy: a comparative study of different coupling media. 1986. *Archive of Physic and Medice Rehabilitation*. 67: e14750. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9993\(86\)90052-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9993(86)90052-3).
22. Benson HAE, McElnay JC. Topical non-steroidal anti-inflammatory products as ultrasound couplants: their potential in phonophoresis. 1994. *Physiotherapy*. 80(2): 74-76. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9406\(10\)61010-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9406(10)61010-3).