



Susana Lopes Gaspar

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Produção e Caracterização de
Microesferas Compósitas de
Quitossano/Fosfatos de Cálcio para
Aplicações Terapêuticas no Tecido
Ósseo**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Biomédica

Orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro Carvalho Silva

Arguente: Prof. Doutora Ana Isabel Nobre Martins Aguiar Oliveira Ricardo

Vogal: Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2011

Susana Lopes Gaspar
Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Produção e Caracterização de
Microesferas Compósitas de
Quitosano/Fosfatos de Cálcio para
Aplicações Terapêuticas no Tecido
Ósseo**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Biomédica

Orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro Carvalho Silva

Arguente: Prof. Doutora Ana Isabel Nobre Martins Aguiar Oliveira Ricardo

Vogal: Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges

Março 2012

Produção e Caracterização de Microesferas Compósitas de Quitosano/Fosfatos de Cálcio para Aplicações Terapêuticas no Tecido Ósseo

Copyright 2012. Susana Lopes Gaspar. Faculdade Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Quero deixar um **Obrigado** a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Ao meu orientador, **Professor João Paulo Borges**, pela disponibilidade demonstrada em iniciar este projeto, pelo incentivo, dedicação e preocupação, pela partilha de conhecimentos e pela revisão de todo o presente trabalho.

Ao **Grupo de Polímeros e Materiais Mesomorfos** do Departamento de Ciências dos Materiais, por me terem recebido e integrado da melhor forma possível e por toda a ajuda a nível laboratorial. Uma palavra especial ao Doutor **João Canejo** pela paciência e ajuda no suporte gráfico deste trabalho.

À Biotecnóloga **Ana Baptista** um Obrigado Gigante (inversamente proporcional ao seu tamanho) por todo o tempo dispensado e pela criatividade laboratorial, pela preocupação, pelas palavras de motivação nos momentos mais difíceis e pela partilha dos momentos vitoriosos.

Às minhas amigas e colegas de laboratório, **Rita Bicho, Rita Carvalho e Maria Inês Martins**, pela amizade, pelo convívio diário, pela partilha das alegrias e das desilusões que a investigação obriga a enfrentar e por todos os momentos em que *fizemos ciência* num ambiente de pura diversão.

A todos os *biocoleguinhas* que vão deixar saudades dos cinco anos de faculdade. Um agradecimento especial à **Milene Bação** e à **Sara Gil** pela amizade e apoio ao longo do meu percurso académico.

Às minhas *Bichinhas*, **Marta Caetano, Maria Alenquer, Vanessa Azougado e Telma Teles**, que são a prova de que a amizade é independente do tempo e da distância que por vezes nos separa.

A toda a minha **família** e em especial aos meus **pais e irmã**, por todos os sacrifícios ao longo destes anos, por todos os valores que me transmitiram e porque a eles devo o que sou hoje. É a eles que dedico este trabalho.

Resumo

Os fosfatos de cálcio são os principais constituintes da fase mineral do tecido ósseo e a sua utilização deve-se à sua bioatividade, biocompatibilidade e osteocondutividade. Os fosfatos de cálcio mais conhecidos são a hidroxiapatite e o fosfato de tricálcio. A utilização simultânea destes biocerâmicos permite uma aceleração da formação de novo osso devido à reabsorção do fosfato de tricálcio.

O quitosano é um polímero de origem natural, biocompatível, biodegradável, não tóxico, cuja natureza hidrofílica promove a adesão, proliferação e diferenciação celular.

Neste trabalho foram produzidas microesferas compósitas de quitosano/fosfatos de cálcio. Uma droga modelo, o ácido acetilsalicílico, foi encapsulada de forma a averiguar a eficácia terapêutica das microesferas. Os fosfatos de cálcio foram sintetizados via sol-gel e caracterizados por difração de raios-X, espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrónica de transmissão (TEM). As microesferas foram obtidas por microfluídica e caracterizadas relativamente à sua morfologia por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e microscopia ótica. Avaliou-se o grau de inchamento e a eficiência de encapsulamento das microesferas e o perfil de libertação do fármaco.

As microesferas de quitosano apresentaram um diâmetro médio de 337 μ m e uma superfície lisa. As microesferas compósitas apresentaram alguma rugosidade superficial associada à presença dos cerâmicos. As microesferas de quitosano apresentaram um grau de inchamento máximo de 300% e libertaram aproximadamente 40% do fármaco incorporado no primeiro dia. A abrupta libertação dos primeiros dias pressupõe um mecanismo de libertação superficial.

Palavras-chave: regeneração óssea, hidroxiapatite, β -TCP, sol-gel, microesferas quitosano, microfluídica, libertação controlada.

Abstract

Calcium phosphates are the main components of mineral phase of the bone and they are used due to their bioactivity, biocompatibility and osteoconductivity. The most popular calcium phosphates are hydroxyapatite and tricalcium phosphate. Simultaneous use of these bioceramics enables acceleration of the formation of new bone due to tricalcium phosphate resorption.

Chitosan is a natural polymer, biocompatible, biodegradable, non-toxic and its hydrophilic nature promotes adhesion, proliferation and cellular differentiation.

In this work chitosan/calcium phosphates composite microspheres were produced. Acetylsalicylic acid, a model drug, was encapsulated in the microspheres in order to determine the therapeutic efficacy of the microspheres. The calcium phosphates were synthesized by a sol-gel method and characterized by X-ray diffraction, Fourier transformer infrared spectroscopy (FTIR) and transmission electron microscopy (TEM). Microspheres were produced by microfluidics and characterized in terms of morphology by scanning electronic microscopy (SEM) and optical microscopy. Swelling, encapsulation efficiency and drug delivery profile were studied.

Chitosan microspheres with an average diameter of 337 μm and a smooth surface were obtained. The composite microspheres presented a rough surface due to the presence of the ceramics. The microspheres released about 40 % of the drug on the first day. The sudden release of the first days requires a surface release mechanism.

Key-words: bone regeneration, hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate, sol-gel, chitosan microspheres, microfluidics, drug delivery.

Índice

Agradecimentos	V
Resumo.....	VII
Abstract	IX
Objetivos	1
1 Introdução.....	3
1.1 Tecido Ósseo	3
1.1.1 Função e Composição	3
1.1.2 Desenvolvimento e Crescimento Ósseo, Modelação e Remodelação.....	4
1.1.3 Defeitos ósseos e necessidade de reparação.....	5
1.1.4 Fraturas e Processo de Reparação	6
1.2 Substitutos Ósseos	7
1.2.1 Biocerâmicos – Fosfatos de Cálcio	9
1.2.1.1 Hidroxiapatite.....	9
1.2.1.2 β -TCP	10
1.3 Sistemas de transporte e libertação controlada de fármacos (SLC)	11
1.3.1 Microesferas.....	14
1.3.2 Interesse dos polímeros como SLC.....	15
1.3.3 Quitosano	15
1.3.3.1 Composição química, estrutural e características principais.....	16
1.3.3.2 Reticulação do QS	17
1.3.3.3 Reticulação do QS com Glutaraldeído.....	18
1.3.4 Mecanismos de degradação polimérica.....	19
1.3.4.1 Degradação do QS.....	20
1.3.5 Mecanismos de incorporação do fármaco.....	21
1.3.6 Mecanismos de libertação	21
1.3.6.1 Mecanismos de libertação em microesferas de QS	24
1.3.7 Cinética de degradação/libertação do QS.....	24
1.3.8 Fármaco.....	26
1.4 Métodos de produção.....	27
1.4.1 Sol-gel	27
1.4.2 Microfluídica.....	29
2 Parte Experimental.....	33

2.1 Síntese de hidroxiapatite pelo método sol-gel	33
2.1.1 Materiais	33
2.1.2 Procedimento experimental	33
2.2 Síntese de β -TCP pelo método sol-gel com precipitação.....	34
2.2.1 Materiais	34
2.2.2 Procedimento experimental	34
2.3 Caracterização dos pós de HAp e β -TCP.....	35
2.3.1 Difração de Raios-X (DRX)	35
2.3.1.1 Procedimento experimental	36
2.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	36
2.3.2.1 Procedimento experimental	37
2.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	37
2.3.3.1 Procedimento experimental	38
2.4 Produção de microesferas.....	38
2.4.1 Materiais	38
2.4.2 Montagem Experimental	38
2.4.3 Procedimento experimental	39
2.4.3.1 Preparação das soluções.....	40
2.4.3.2 Técnica Experimental	41
2.5 Caracterização das microesferas.....	43
2.5.1 Análise Morfológica.....	43
2.5.1.1 Microscopia ótica (MO).....	43
2.5.1.2 Microscopia de varrimento eletrônico – SEM.....	43
2.5.2 Grau de inchamento (<i>Swelling</i>).....	43
2.5.3 Eficiência de encapsulamento.....	44
2.5.4 Liberação do fármaco	45
2.5.4.1 Obtenção de amostras de liberação ao longo do tempo	45
2.5.5 Quantificação do fármaco – Espectroscopia UV-Visível	46
2.5.5.1 Retas de Calibração	46
2.5.5.2 Determinação da absorvância das amostras obtidas nos estudos de EE e de liberação do fármaco	47
3 Apresentação e Discussão de Resultados	49
3.1 Caracterização dos pós de HAp e β -TCP.....	49
3.1.1 Difração de raios-X (DRX)	49
3.1.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	52
3.1.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	54

3.2 Parametrização da produção de esferas.....	55
3.2.1 Caudal da fase contínua	56
3.2.2 Caudal da fase dispersa.....	56
3.2.3 Percentagem de Reticulante e Tempo de reticulação	57
3.3 Análise morfológica das microesferas.....	60
3.3.1 Microesferas de quitosano.....	60
3.3.2 Microesferas Compósitas de QS/Cerâmicos	61
3.3.3 Microesferas de QS/AAS	63
3.4 Grau de inchamento (Swelling).....	64
3.5 Eficiência de Encapsulamento.....	65
3.5.1 Produção das microesferas de PCL	65
3.5.2 Extração do AAS e determinação da eficiência de encapsulamento	66
3.6 Estudo de Libertação do AAS	67
4 Conclusões e Perspetivas Futuras	69
5 Bibliografia	73
Anexos.....	77
Anexo A: Reta de Calibração para estudo da Eficiência de Encapsulamento	77
Anexo B: Reta de Calibração para estudo da Libertação do Fármaco em SBF	79

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Perfis de liberação controlada. (I) Taxa de liberação com queda exponencial com o tempo; (II) Taxa de liberação constante produzindo uma cinética de ordem zero, mantém a concentração de droga na corrente sanguínea a um nível ótimo de eficácia terapêutica; (III) Liberação de ordem zero com um ligeiro <i>delay</i> ; (IV) Liberação pulsátil com <i>delay</i> ; (V) Liberação múltipla constante com um <i>delay</i> constante entre elas. Adaptado de ^[21]	13
Figura 1.2 – Concentração de droga no plasma de um paciente em função do tempo de administração. Sistemas tradicionais de administração com uma (...) ou com administrações repetitivas (---); Sistemas de liberação controlada. Adaptado de ^[21]	13
Figura 1.3 – Esquema da reticulação de QS com GTA. Adaptado de ^[25]	19
Figura 1.4 – Mecanismos de erosão de polímeros. (A) Erosão volumétrica, (B) Erosão superficial. Adaptado de ^[19]	20
Figura 1.5 – Mecanismos de liberação a partir de uma matriz polimérica. Adaptado de ^[21]	22
Figura 1.6 – Estrutura do ácido acetilsalicílico (C ₉ H ₈ O ₄).....	26
Figura 1.7 – Esquema do dispositivo microfluídico utilizado. Representação do regime de gotejamento inerente ao processo. Adaptado de ^[36]	30
Figura 2.1- Montagem experimental utilizada na produção de microesferas. Legenda no texto 2.4.2.....	39
Figura 3.1 - Difratoograma da amostra de HAp obtida pelo método sol-gel.....	49
Figura 3.2 - Difratoograma da amostra de β-TCP obtida pelo método sol-gel.....	51
Figura 3.3 – Espectro FTIR da amostra de HAp.....	52
Figura 3.4 – Espectro FTIR da amostra de β-TCP.	53
Figura 3.5 – Imagem de TEM dos pós de HAp. (A) Morfologia e tamanho, (B) Aglomeração dos pós.....	54
Figura 3.6 – Imagem de TEM dos pós de β-TCP. (A) Morfologia e tamanho, (B) Aglomeração dos pós.....	54
Figura 3.7 – Efeito da variação do caudal da fase contínua no diâmetro das esferas produzidas.	56

Figura 3.8 - Efeito da variação do caudal da fase dispersa no diâmetro das esferas produzidas.	57
Figura 3.9 – Imagens de microesferas de QS obtidas para diferentes proporções óleo:25%GTA da fase coletora. (A) 0:100; (B) 60:40; (C) 70:30; (D) 75:25. Fluxos de fase contínua e dispersa de 4,5 e 0,1ml/h (1ml de solução de QS) e 24h de reticulação.	59
Figura 3.10 – Imagens de microesferas de QS para vários períodos de reticulação. (A) 1h; (B) 3h; (C) 6h; (D) 9h; (E) 12h; (F) 24h. Fluxos de fase contínua e dispersa de 4,5 e 0,1ml/h (1ml de solução de QS), fase coletora 70:30 (óleo:25%GTA).....	60
Figura 3.11 – Imagem de MO de uma microesfera de QS obtida nas condições descritas na Tabela 7. Ampliação 10x.	61
Figura 3.12 – Imagem de SEM de (A) microesfera de QS inteira, (B) microesfera de QS em corte.	61
Figura 3.13 – Imagens de MO de microesferas compósitas de QS/cerâmicos.	62
Figura 3.14 – Imagem de uma microesfera cuja composição (QS:cerâmicos) é de (80:20) e a proporção (HAp:β-TCP) é de (70:30).....	63
Figura 3.15 – Imagens de uma microesfera cuja composição (QS:cerâmicos) é de (80:20) e a proporção (HAp:β-TCP) é de (80:20).....	63
Figura 3.16 – Estudo do grau de inchamento das microesferas de QS reticuladas com GTA. ...	64
Figura 3.17 – Efeito do fluxo da fase contínua no diâmetro médio das esferas de PCL e PCL/AAS produzidas.....	65
Figura 3.18 – Imagem de MO de microesferas de (A) PCL e (B) PCL/AAS para fluxos de 3,0ml/h e 12,0ml/h das fases dispersa e contínua respetivamente.....	66
Figura 3.19 – Perfil de libertação <i>in vitro</i> do AAS a partir das microesferas de QS.	67

Índice de tabelas

Tabela 2.1 – Reagentes utilizados para a produção de HAp.	33
Tabela 2.2 - Reagentes utilizados para a produção de β -TCP.....	34
Tabela 2.3 - Reagentes utilizados para a produção de microesferas de QS.	38
Tabela 2.4 - Reagentes utilizados para a produção de microesferas de PCL.	38
Tabela 2.5 – Composição das microesferas produzidas.	40
Tabela 2.6 – Massas de cerâmicos utilizadas para cada dispersão em QS.	41
Tabela 2.7 – Parâmetros utilizados na produção das micropartículas.	42
Tabela 2.8 – Tempo de permanência das microesferas de QS em água ultrapura para a determinação do grau de inchamento das mesmas.	44
Tabela 3.3 – Processos de reticulação de esferas de QS descritos na literatura.	58

Lista de Abreviaturas e Siglas

AAS – Ácido Acetilsalicílico

Ca/P – razão entre os iões Cálcio de Potássio

CENIMAT/I3N – Centro de Investigação de Materiais da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

DRX – Difração de Raios X

EE – Eficiência de Encapsulamento

FC – Fosfatos de Cálcio

FTIR - *Fourier Transformer infrared Spectroscopy*

GD – Grau de Desacetilação

HAp – Hidroxiapatite

MO – Microscopia Ótica

PBS – *Phosphate Buffer Solution*

PCL - Policaprolactona

PM – Peso Molecular

PVA – Polivinil álcool

QS – Quitosano

SBF – *Simulated Body Fluid*

SEM – *Scanning Electron Microscopy*

SLC – Sistemas de Libertação Controlada

TEM – *Transmission Electron Microscopy*

β -TCP – Fosfato de tricálcio

Objetivos

Este trabalho visa a **Produção de microesferas compósitas de quitosano/fosfatos de cálcio para aplicações terapêuticas no tecido ósseo** tendo como principais objetivos:

- Produção de substitutos ósseos pelo método sol-gel;
- Produção de microesferas de quitosano e compósitas por microfluídica;
- Incorporação de um agente terapêutico em microesferas de quitosano;
- Caracterização dos substitutos ósseos produzidos;
- Caracterização morfológica das microesferas produzidas;
- Determinação da eficácia terapêutica das microesferas produzidas.

O trabalho apresentado foi desenvolvido no Grupo de Polímeros e Materiais Mesomorfos do Departamento de Ciências dos Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

A organização da presente dissertação compreende 4 capítulos.

O primeiro capítulo é um capítulo teórico onde se expõe a necessidade de reparação óssea e se descreve de forma breve a composição tecido ósseo e os processos de remodelação do mesmo. Neste capítulo são também apresentados os substitutos ósseos que se pretendem produzir neste trabalho e o sistema de transporte e libertação dos substitutos ósseos e do agente terapêutico (microesferas). As principais técnicas usadas (sol-gel e microfluídica) são descritas em detalhe no final do capítulo. No segundo capítulo são descritas as técnicas experimentais utilizadas para a produção e caracterização dos substitutos ósseos e das microesferas. No capítulo 3 são apresentados e discutidos os resultados obtidos. E o capítulo 4 finaliza a dissertação apresentando as conclusões principais e as perspetivas futuras para a continuação deste trabalho.

1 Introdução

1.1 Tecido Ósseo

O osso é um tecido conjuntivo complexo e extremamente organizado e especializado. É importante compreender a sua estrutura bem como as suas propriedades biológicas e biomecânicas, de forma a compreender o processo de reparação óssea e definir o tipo de substituto ósseo a adotar em situações de lesão. ^[1]

1.1.1 Função e Composição

Os ossos são o principal constituinte do sistema esquelético, cuja principal função é a manutenção estrutural do organismo. Têm como missão suportar tecidos moles e proteger órgãos vitais da cavidade torácica, craniana e pélvica; alojar a medula óssea; fixar músculos; armazenar minerais e regular o fluxo de iões participando ativamente na homeostasia do corpo. ^{[2],[3]}

Quimicamente, o osso é formado por duas componentes distintas: orgânica (35%) e mineral (65%). ^[3] A matriz orgânica é constituída por 90% de fibras de colagénio (tipo I) e 10% de proteínas não colagénicas e proteoglicanos. Desta componente derivam as características de flexibilidade e elasticidade típicas do osso. A fração mineral é formada por nanocristais (5x5x50 nm ^[4]) impregnados nas fibras de colagénio que lhe conferem dureza, rigidez e resistência a solicitações mecânicas. A componente mineral é também designada como apatite biológica, a qual é representada pela fórmula geral $(Ca, M)_{10}(PO_4, CO_3)_6(OH, F, Cl)_2$, onde *M* se refere a elementos metálicos (Na, K, Mg). As apatites biológicas são normalmente deficientes em cálcio devido a substituições estruturais em vários pontos da rede. Incorporados na rede cristalina ou absorvidos na superfície dos cristais é possível encontrar ainda magnésio, carbonatos, citratos ou fluoretos. ^[3] A organização microestrutural precisa do osso varia em função da idade, do tipo e da localização no osso. ^[4]

Dentro e em torno da matriz compósita localizam-se as células ósseas: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células osteoprogenitoras.^[5] As células osteoprogenitoras possuem capacidade mitótica e revestem a superfície externa (periósteo) e interna do osso (endósteo). Os osteoclastos têm como função destruir e reabsorver osso promovendo a renovação do mesmo. São responsáveis pela solubilização de ambas as componentes, mineral e orgânica, da matriz constituinte do osso. Os osteoclastos segregam íons H^+ para o espaço de reabsorção extracelular, reduzindo o pH sem limitar o ambiente necessário à reabsorção (cerca de 3,5). Estes íons, ao neutralizar as cargas negativas dos íons hidroxilo e PO_4^{3-} da hidroxiapatite, provocam a liberação de Ca^{2+} , HPO_4^{2-} e $H_2PO_4^-$ gerando a destruição da componente mineral. A digestão do colagénio deve-se à presença de enzimas proteolíticas.^[3] Os osteoblastos são células responsáveis pela formação de osso, sintetizam e segregam matriz óssea não mineralizada (osteóide), participam na calcificação e reabsorção do osso, regulam o fluxo de cálcio e fosfato dentro e fora do osso.^[3] São designadas células de revestimento ósseo os osteoblastos inativos que permanecem à superfície quando a formação de novo osso termina e que podem ser reativados como resposta a agentes químicos e/ou estímulos mecânicos. Os osteócitos são as células mais abundantes no osso maduro normal, são osteoblastos maduros ou envelhecidos, localizam-se nas lacunas da substância osteóide e podem ser ativados em caso de necessidade e assumir assim a função de osteoblastos. Participam em processos de morfogenéticos, homeostáticos e de reestruturação da massa óssea, que constituem a regulação mineral e da sua arquitetura. Podem estabilizar o mineral ósseo, mantendo um meio iónico local apropriado e em associação com células de revestimento podem controlar o fluxo de íons de cálcio; detetam microlesões; respondem a situações de tensão no tecido ósseo que influenciam o comportamento de modelação e remodelação através de interação célula-célula.^[3]

1.1.2 Desenvolvimento e Crescimento Ósseo, Modelação e Remodelação

Desenvolvimento e Crescimento Ósseo

A formação dos componentes esqueléticos é iniciada por processos de condensação celular – ainda no período fetal^[3] – nos quais células mesenquimais migram e proliferam ao mesmo tempo que se unem pela expressão de moléculas de adesão.^[2] O posterior desenvolvimento ósseo ocorre através de um dos dois mecanismos: ossificação intramembranosa (o osso é produzido diretamente por osteoblastos, o tecido ósseo forma-se no seio de uma região condensada de natureza conjuntiva, núcleos de ossificação, que se expandem e se juntam ao longo do tempo) ou ossificação endocondral (o tecido ósseo forma-se substituindo gradualmente um modelo cartilaginoso preexistente, a cartilagem é formada, calcificada e substituída por osso).^{[2],[3]} O método de crescimento do novo tecido ósseo depende de cada osso e está definido geneticamente.^[3] A maioria dos ossos longos ocorre via ossificação endocondral; nos ossos chatos, como crânio e mandíbula, ocorre ossificação

intramembranosa.^[2] Na idade adulta, este último processo é o responsável para formação do osso, a ossificação endocondral é inexistente. Contudo, em situações de fratura, para uma reparação mais rápida, é possível que ocorra osteogénese por ambos os processos.^[6]

Modelação

O processo de modelação envolve a reabsorção e formação óssea em regiões amplas ou superfícies ósseas separadas (remoção ou adição de osso não acopladas). Este processo controla o crescimento, forma, tamanho, força/rigidez e anatomia dos ossos e articulações, permitindo não só o desenvolvimento da arquitetura normal do osso durante o crescimento, mas também modulando a sua arquitetura e massa quando as condições mecânicas se alteram. É essencial para o crescimento longitudinal. A taxa de modelação é reduzida após a maturidade esquelética.^[3]

Este processo começa na vida uterina, ocorre durante toda a adolescência até à maturidade esquelética.

Remodelação

O processo de remodelação óssea produz e mantém o osso biomecânica e metabolicamente competente. A remodelação consiste na substituição de osso por reabsorção, seguida da formação de uma nova camada de osso. Na primeira etapa deste processo ocorre a substituição do osso primário (imaturo) durante a infância, por osso secundário; o qual é continua e periodicamente destruído e substituído por novas gerações de osso (reabsorção e formação óssea acopladas). Normalmente não afeta o tamanho e a forma do osso. Pode ter efeitos positivos ou negativos na qualidade do osso. Permite remover danos microscópicos, substituir a morte e hipermineralização do osso e permite adaptar a microarquitetura às tensões locais.^[3]

1.1.3 Defeitos ósseos e necessidade de reparação

A medicina regenerativa visa restaurar funções de tecidos e órgãos danificados, através da reparação, regeneração ou substituição dos mesmos. Pretende-se gerar ou induzir a formação de determinado tecido num local específico mediante manipulação celular, elaboração de matrizes e/ou estimulação biológica, o qual deverá imitar os tecidos viáveis estrutural, mecânica e funcionalmente.^[7]

Ao nível da cirurgia ortopédica a reparação e regeneração óssea são um desafio^[7] e as infeções associadas são um dos principais problemas a resolver.^[8]

O aumento da ocorrência de fraturas ósseas deve-se ao aumento da longevidade da população e à elevada incidência de traumas esporádicos.^[8] A osteoporose tem-se tornado um

dos mais comuns problemas médicos e conduz a uma elevada taxa de fraturas ósseas. A massa esquelética diminui até um ponto de instabilidade estrutural cuja deterioração torna o paciente suscetível a fraturas ósseas espontâneas.^{[3],[8]} Tumores ósseos são outra importante causa de fraturas. Estes modificam propriedades mecânicas e produzem concentrações de tensão no osso. Normalmente, a sua remoção aumenta o risco de fratura.^{[9],[6]} A qualidade da matriz óssea pode ainda ser afetada por desordens metabólicas, mutações em fatores de crescimento ou moléculas sinalizadoras (deleções genéticas).

1.1.4 Fraturas e Processo de Reparação

A ocorrência de fraturas é um sinal óbvio de que a capacidade funcional mecânica do esqueleto foi excedida. As fraturas são relativamente comuns e a fisiologia do esqueleto é bastante dirigida à sua prevenção. Prever e prevenir fraturas são ações importantes em ortopedia devido à sua elevada frequência, complicações cirúrgicas e impacto socioeconómico.

O primeiro mecanismo de fratura óssea surge quando sobrecargas acidentais, incluindo tensões que excedem a gama para a qual o osso foi adaptado durante o seu crescimento e desenvolvimento (fratura traumática). Este tipo de fratura pode ter duas causas principais: impacto externo (queda) ou algo espontâneo (contração muscular). Por vezes estas fraturas são produzidas por cargas normais que atuam sobre o osso enfraquecido pela idade ou pela doença. A osteoporose é um fator de risco para a fratura óssea bem como a incapacidade dos tecidos moles em absorver a energia gerada numa queda ou mudança das variáveis cinemáticas da marcha. Estas fraturas são designadas como patológicas. O segundo tipo de fratura é produzido por uma deformação ou fadiga. Os ossos suportam cargas mais ou menos constantes por longos períodos de tempo e cargas cíclicas que podem produzir microdanos. A acumulação dos mesmos é mais rápida do que a sua reparação por remodelação. As microfendas podem multiplicar-se e produzir uma fratura. Estas são designadas por fraturas por tensão e ocorrem em indivíduos que aumentam a repetição de determinado tipo de atividade física (caso de atletas) ou quando os ossos já se encontram muito enfraquecidos pela osteoporose e a remodelação óssea é praticamente inativa.^[9]

Tal como as fraturas podem ocorrer naturalmente, também o processo de cicatrização é um fenómeno natural que pretende reconstituir o tecido lesado e recuperar a sua função e forma originais. É um processo complexo que envolve a participação coordenada da migração, diferenciação e proliferação de células inflamatórias que sintetizam e libertam substâncias bioativas dos componentes da matriz extracelular (colagénio e fatores de crescimento).^[9]

O processo de cura/cicatrização envolve a diferenciação de vários tecidos, cartilagem, osso, granulação segundo diferentes padrões que são diretamente influenciados pelo ambiente mecânico, o qual por sua vez é regulado pela carga aplicada e pela estabilidade do local de fratura. A cicatrização ativa respostas nos tecidos moles externos e no perióstio que forma um

calo externo que provoca um aumento da rigidez.^[6] O processo de cicatrização pode ser classificado como primário ou secundário. O primário ocorre em casos de extrema estabilidade e tamanho de fenda desprezível e envolve uma tentativa direta de formação de osso. O secundário ocorre quando não há estabilidade e o tamanho da fenda é moderado. A maioria das fraturas é reparada por cicatrização secundária.^[9] Esta pode ser dividida em três fases: inflamatória, reparadora e remodeladora. A fase inicial é a inflamatória e serve para imobilizar a fratura e ativar as células responsáveis pela reparação. A imobilização caracteriza-se por dor e inchaço, formação de um hematoma, vasodilatação e infiltração de células inflamatórias.^[6] A interrupção do fornecimento vascular normal do osso conduz à morte de osteócitos na matriz óssea. Na fase reparadora as células diferenciam-se em condrócitos, osteoblastos ou fibroblastos dependendo das condições biológicas e mecânicas e começam a sintetizar a matriz extracelular dos tecidos correspondentes. O tecido morto é removido por macrófagos e é gerado tecido de granulação para a migração de células indiferenciadas, originando um calo inicial de estabilização.^[9] O local de fratura exhibe algum grau de ossificação endocondral bem como formação óssea direta pelos osteoblastos. Esta é iniciada em cada lado da falha e avança para o centro do calo. No centro do calo é formada cartilagem por condrogênese, exceto na zona onde a estabilidade ainda é muito baixa devido à obstrução do processo de diferenciação celular nessa zona. Logo que o calo esteja totalmente composto por cartilagem, a ossificação começa a seguir uma sequência de eventos celulares como maturação e degradação da cartilagem, vascularização e osteogênese. A ossificação continua até que toda a cartilagem seja substituída por osso e até que se alcance a estabilização e rigidez necessárias.^[9] Na última fase do processo o osso partido é quase tão forte como o original. Contudo muitas vezes possui maior massa do que a original, sendo menos eficiente mecanicamente. A remodelação óssea do local da fratura restaura a forma e a estrutura interna do osso, tornando-o capaz de manter a sua força com menor massa o que aumenta a sua eficácia mecânica.^[6]

1.2 Substitutos Ósseos

Um substituto ósseo é “todo o material de origem humana, animal, vegetal ou sintético, destinado à implantação no homem com a perspectiva de uma reconstituição do capital ósseo, para o reforço de uma estrutura óssea ou para o preenchimento de uma perda de substância óssea de origem traumática ou ortopédica”.^[10]

Vários materiais têm sido usados como substitutos ósseos. Estes incluem:

- **Materiais osteogénicos.** São todos os materiais que possuam uma composição celular capaz de se diferenciar em tecido ósseo. Inclui tecido próprio do paciente, osso esponjoso autólogo, osso cortical autólogo e aspirado de medula óssea.^[10] A metodologia mais comum de reparação do tecido ósseo é o autoenxerto devido às

capacidades osteogênicas mas também osteocondutoras e osteoindutoras do material enxertado.^{[11],[10]} Contudo, exigem uma primeira cirurgia que permita obter osso do próprio paciente^[7] e, apesar de favorecerem a sua recuperação, a quantidade disponível é limitada^{[7],[8],[11]}.

- **Materiais osteoindutores.** São materiais que estimulam a diferenciação de células indiferenciadas em osteoblastos, os quais são responsáveis pela formação óssea como já foi referido. Aloenxertos, matriz óssea desmineralizada e fatores de crescimento são exemplos de materiais osteoindutores. Com os aloenxertos surgem riscos de resposta imunitária, infecção e transmissão de doenças infecciosas, a sua disponibilidade é limitada e o acesso a bancos de ossos é difícil.^{[10],[11]} Existem aloenxertos ósseos com uma grande variedade de formas físicas (gel, pó, fibras, pastas) e estão a ser desenvolvidas modificações químicas e físicas neste tipo de enxerto no sentido de obter formatos especiais, melhorias na revascularização da superfície (através da desmineralização) e na estimulação do crescimento ósseo (adição de fatores de crescimento).
- **Materiais osteocondutores.** São materiais que atuam como substrato favorável à migração celular e deposição óssea, sendo simultaneamente substituídos por novo tecido ósseo e não possuem a capacidade de induzir diferenciação celular. Materiais cerâmicos (vidros bioativos, fosfatos de cálcio como a hidroxiapatite e o fosfato tricálcio) e colagénio (como veículo de transporte para outros enxertos sintéticos) são materiais osteocondutores.

É difícil concentrar estas três propriedades num material sintético. No sentido de associar as propriedades físico-químicas de osteointegração com a resistência mecânica necessária ao desempenho de funções de suporte, têm-se desenvolvido materiais compósitos cujas propriedades são preferíveis às que resultariam da aplicação dos materiais individualmente.^[10] Uma forma de obter substitutos ósseos compósitos é produzir fosfatos de cálcio e dispersá-los em matrizes poliméricas.^[8]

A maioria dos implantes ortopédicos utiliza materiais na sua forma endurecida (cimentos de fosfatos de cálcio, por exemplo) o que dificulta o seu ajuste ao local cirúrgico devido à forma desejada. Esse ajuste pode conduzir a um aumento de perda de massa óssea, trauma no tecido circundante e maior tempo de intervenção cirúrgica.^[11] Para o preenchimento ósseo devido à deterioração e perda de massa óssea localizada é necessário recorrer a substitutos ósseos de pequenas dimensões e capazes de se adaptar ao local afetado.^[7] Materiais granulares e injetáveis têm sido produzidos neste sentido.

Os substitutos ósseos injetáveis podem ser utilizados para fins cirúrgicos minimamente invasivos e moldados para preencher defeitos ósseos extremamente irregulares. Devem ser moldáveis, devem ter boas propriedades mecânicas, biocompatíveis, não tóxicas e possui a

capacidade de integrar o osso ao mesmo tempo que este cresce e remodela. Os substitutos ósseos injetáveis requerem propriedades reológicas adequadas para assegurar a ligação da fase mineral *in situ* com boa permeabilidade celular.^{[8],[11]}

A terapia genética continua também a ser uma porta aberta de um universo de soluções para o problema da reparação dos defeitos ósseos.^[10]

1.2.1 Biocerâmicos – Fosfatos de Cálcio

Os cerâmicos são compostos policristalinos refratários, normalmente inorgânicos, que podem ou não conter elementos metálicos – silicatos, óxidos metálicos, carbonetos, fosfatos de cálcio e vários hidretos refratários (sulfuretos). Estes materiais são duros e frágeis, possuem elevadas temperaturas de fusão, baixas condutividades elétricas e térmicas.^[12]

Os materiais cerâmicos biocompatíveis são designados por biocerâmicos. A biocompatibilidade destes materiais resulta da sua composição química conter iões comuns com os constituintes do ambiente fisiológico (cálcio, potássio, magnésio, sódio) e iões de toxicidade muito limitada para os tecidos do corpo (alumínio e titânio).^[4] Mediante o mecanismo de interação biológica com o tecido vivo os biocerâmicos podem ser classificados como: bioinertes (interação mínima ou nula com o tecido circundante devido à formação de uma cápsula fibrosa em seu torno), bioativos (interação dinâmica com tecidos duros e por vezes com tecidos moles, formação de uma camada de apatite carbonatada biologicamente ativa, química e cristalograficamente equivalente à fase mineral do osso) ou bioreabsorvíveis (dissolução/reabsorção e substituição progressiva por tecido circundante quando colocado no interior do corpo humano).

Os biocerâmicos mais utilizados em ortopedia pertencem à família dos fosfatos de cálcio (FC). Como já foi referido, as apatites ósseas que compõem o osso natural são consideradas FC básicos.^[13] A principal diferença entre os vários fosfatos de cálcio reside na razão molar entre os iões cálcio e fósforo (Ca/P). Pós nanométricos de FC com a estequiometria adequada, elevada pureza e cristalinidade são procurados devido à sua maior densificação e às suas propriedades bioativas, de biocompatibilidade, osteocondução e osseointegração.^{[11],[14],[15]} Os FC são integrados no tecido ósseo pelos mesmos processos ativos na remodelação óssea saudável^[11] e originam novo osso graças à atividade dos osteoclastos e osteoblastos.^[7]

1.2.1.1 Hidroxiapatite

A HAp sintética é um biocerâmico da família das apatites, de fórmula química $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$. A principal diferença relativamente às apatites biológicas é a substituição do grupo fosfato pelo grupo carbonato. Exibe uma conformação hexagonal, os átomos de cálcio e fósforo formam um

arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de mais alta simetria. Possui uma elevada concentração de grupos hidroxilo e caracteriza-se por uma razão molar Ca/P de 5/3.^[12]

A HAp sintética é o fosfato de cálcio mais utilizado como substituto de ossos duros.^[16] Apresenta excelentes propriedades biocompatíveis e bioativas^[17]. É o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel em fluidos biológicos. Apesar da capacidade em permanecer estável em ambiente fisiológico^[4], pode sofrer ionização *in vivo*. A sua taxa de dissolução depende de vários fatores como, grau de cristalinidade (quanto maior a cristalinidade menor a taxa de dissolução), tamanho, forma e porosidade do cristalito e das condições de processamento (temperatura, pressão).^[18] A solubilidade da HAp depende ainda da presença de determinados compostos (aminoácidos, proteínas, enzimas) e aumenta com a adição de eletrólitos em solução. A solubilidade está diretamente relacionada com a biocompatibilidade da HAp com o tecido ósseo. A biocompatibilidade resulta de uma ligação química direta com os tecidos duros e da capacidade de incorporação dos osteoblastos na superfície da HAp, favorecendo a fixação, adesão e aumentando o crescimento e diferenciação celular e a deposição do tecido ósseo diretamente sobre a superfície do material.^[18]

A HAp tem captado especial atenção devido à sua afinidade com biopolímeros, proteínas e enzimas.^[16]

As desvantagens associadas à utilização da HAp devem-se à sua lenta reabsorção e remodelação óssea (pode ser mantida no organismo durante anos) e à dificuldade em manter os grânulos no local do defeito ósseo. O que levou à necessidade de criar compósitos de biofuncionalidade superior às dos seus constituintes individualmente.

1.2.1.2 β -TCP

Um outro fosfato de cálcio atrativo para aplicações ósseas é o fosfato de tricálcio (TCP). É representado pela fórmula química $Ca_3(PO_4)_2$ e possui quatro polimorfos: α , β , γ e super- α . As formas mais frequentes são o α e o β -TCP.^[4]

O β -TCP é um cerâmico altamente bioativo e bioreabsorvível. Tais características exigem um controlo do tamanho e morfologia do FC, bem como da estequiometria, pureza e cristalinidade de forma promover a osseointegração.^{[14],[16]}

O β -TCP pode ser produzido em várias formas: granular, pó, pasta, macroporosa ou em gel. A forma granular é a mais eficiente uma vez que o espaçamento entre os grânulos aumenta a porosidade da matriz e a superfície de contacto.^[10]

As taxas de solubilidade e de reabsorção do β -TCP são superiores às da HAp. A utilização da HAp e do β -TCP em simultâneo permite uma aceleração da formação do novo osso. Inicialmente ocorre a reabsorção do β -TCP associada a um crescimento rápido de novo osso

que por sua vez o substitui. A ligação direta da HAp ao osso ocorre de uma forma mais lenta, relativamente à taxa de formação de novo osso. Em aplicações nas quais a substituição por novo seja aceitável com uma reabsorção lenta do material implantado, a HAp pode ser aceitável. Como situações de cranioplastias. Contudo, em aplicações como reparação periodontal e elevação do seio maxilar, a capacidade do implante ser rapidamente substituído por osso é crucial, e portanto é exigido um comportamento de reabsorção rápida. ^{[4],[14]}

1.3 Sistemas de transporte e libertação controlada de fármacos (SLC)

Os sistemas tradicionais de fornecimento de fármacos baseiam-se na administração total e única de uma dose de droga definida no organismo, por via oral ou intravenosa. O efeito terapêutico não é baseado apenas na administração da droga. Requer a introdução de uma elevada dose da mesma no organismo para garantir que eventualmente atinge o local, mas requer também um intervalo de tempo durante o qual a droga permaneça em concentrações apropriadas. Por conseguinte, são efetuadas repetidas administrações para colmatar o rápido decréscimo da concentração da droga em cada administração. Por vezes, a elevada dose de droga associada às repetidas administrações conduzem a concentrações de droga no plasma próximas de concentrações tóxicas gerando reações adversas. ^[19]

Os sistemas de libertação de drogas são os componentes essenciais para a libertação controlada e prolongada de drogas. Com o intuito de ultrapassar as dificuldades associadas aos métodos de administração tradicionais, estes sistemas destinam-se a fornecer um agente terapêutico na quantidade, local e momento adequados, proporcionando uma ação terapêutica por um período prolongado de tempo, de forma a otimizar a sua eficácia e a minimizar os efeitos secundários. ^{[19],[20]}

Os sistemas de libertação controlada (SLC) podem ser classificados segundo o tipo de materiais utilizados, o estado físico, a via de administração, o tipo de agente terapêutico incorporado, a forma como se encontra imobilizado no sistema e a natureza do mecanismo que controla a sua libertação. Como sistemas de libertação controlada de drogas têm sido utilizados materiais de natureza lipídica, inorgânica e polimérica. Os polímeros são os materiais mais utilizados como SLC. Podem ser incorporadas moléculas de baixo peso molecular, proteínas ou material genético. Na literatura estão mencionadas membranas de difusão controlada (sistemas monolíticos ou reservatório) – lipossomas, micro e nanopartículas –, bombas osmóticas, implantes reabsorvíveis, hidrogéis, dendrímeros e até vírus utilizados como SLC. ^[20] Neste trabalho será estudado um sistema de libertação controlada a partir de microesferas.

O desenvolvimento de um sistema de liberação controlada envolve a integração de vários aspectos como as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco, a via de administração e as barreiras fisiológicas e bioquímicas a que o fármaco é sujeito, as propriedades físico-químicas, biocompatíveis e o comportamento *in vivo* dos materiais usados como SLC, a metodologia de produção e a sua interação com o fármaco. Estes tópicos serão desenvolvidos nos subcapítulos seguintes.

Os SLC apresentam as seguintes vantagens relativamente aos métodos tradicionais: ^{[19],[21],[22]}

- Taxa de liberação previsível e reprodutível. A taxa de liberação do fármaco pode ser adaptada às necessidades de uma aplicação específica.
Na Figura 1.1 estão representados alguns perfis utilizados: (I) Liberação prolongada mas não constante; (II) Liberação constante ou de ordem zero; (III) Fase de espera seguida de uma liberação constante; (IV) Fase de espera seguida por um impulso de liberação; (V) Múltiplos pulsos em períodos específicos. A liberação controlada (de ordem zero) está representada na Figura 1.2 é a mais aplicada comercialmente e a definição de liberação controlada adotada neste trabalho.
- Permitem uma proteção das drogas com curto tempo de meia-vida.
No caso das proteínas este é um fator importante uma vez que são rapidamente destruídas pelo corpo (ataques metabólicos e químicos).
- Permitem uma redução da frequência de administração do fármaco o que conduz a um aumento do conforto do paciente e, conseqüentemente, um aumento de adesão à terapêutica pelo paciente.
- Maior biodisponibilidade. A quantidade de fármaco pode até ser reduzida com o aumento da biodisponibilidade.

Contudo, estes sistemas ainda apresentam alguns problemas:

- Não se atinge de imediato o efeito desejado.
- O médico não tem a possibilidade de ajustar os regimes posológicos.
- São idealizados com base na semi-vida biológica de uma população normal. Se ocorrer alguma alteração na distribuição e metabolização do fármaco, o efeito terapêutico pode ser alterado.

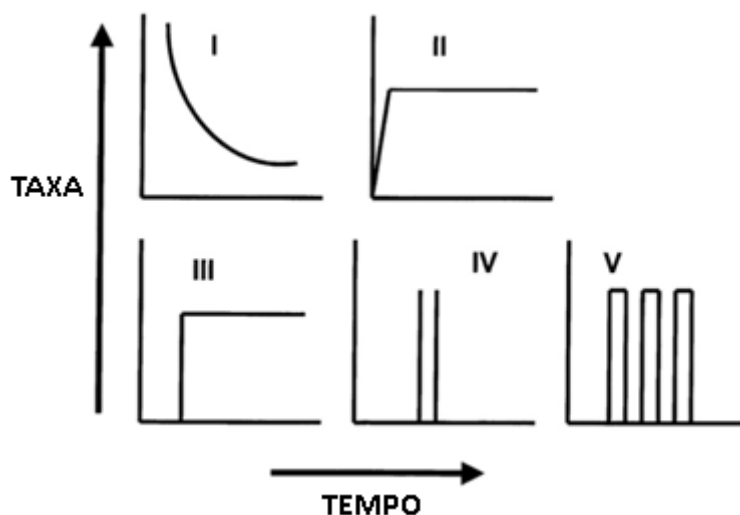


Figura 1.1 – Perfis de libertação controlada. (I) Taxa de libertação com queda exponencial com o tempo; (II) Taxa de libertação constante produzindo uma cinética de ordem zero, mantêm a concentração de droga na corrente sanguínea a um nível ótimo de eficácia terapêutica; (III) Libertação de ordem zero com um ligeiro *delay*; (IV) Libertação pulsátil com *delay*; (V) Libertação múltipla constante com um *delay* constante entre elas.

Adaptado de ^[21]

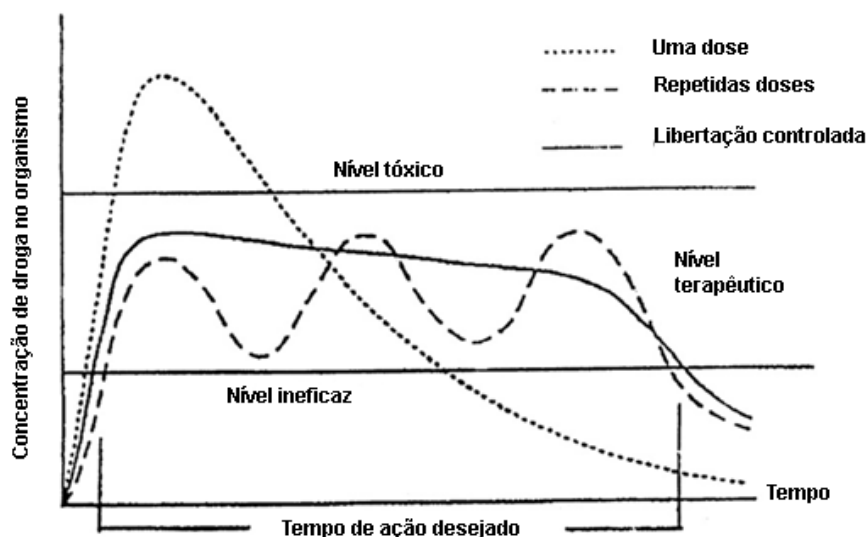


Figura 1.2 – Concentração de droga no plasma de um paciente em função do tempo de administração. Sistemas tradicionais de administração com uma (...) ou com administrações repetitivas (---); Sistemas de libertação controlada. Adaptado de ^[21].

1.3.1 Microesferas

As micropartículas possuem um tamanho variável entre 1 e 1000 μm ^[20] e podem apresentar variadas formas: *pellets*, lipoesferas, microcápsulas ou microesferas.

Estruturalmente, as micropartículas podem ser do tipo reservatório ou matriz. Os sistemas do tipo reservatório são dispositivos ocultos nos quais o material encapsulado (dissolvido, suspenso ou puro) está rodeado por uma membrana polimérica que controla a libertação para o meio externo. Os sistemas de reservatório esféricos designam-se microcápsulas. Nos sistemas de matriz (polimérica) o material encontra-se disperso ou dissolvido, uniformemente, na matriz polimérica. As matrizes podem ser hidrofílicas ou hidrofóbicas (inertes e lipídicas). A matriz deve ser escolhida mediante a sua capacidade para controlar a libertação do fármaco e/ou outros materiais incorporados e promover a ação terapêutica do mesmo.^[21] Matrizes poliméricas esféricas são designadas por microesferas. Nas microcápsulas ou microesferas de polímeros hidrofílicos é necessário algum tipo de reticulação das cadeias poliméricas de modo a evitar a sua dissolução em meio aquoso.

As microesferas permitem encapsular uma grande variedade de drogas (incluindo pequenas moléculas, proteínas e ácidos nucleicos) e a sua administração é simples (através da agulha de uma seringa). A principal vantagem da sua utilização é o facto de possuírem uma elevada área superficial específica que favorece a absorção relativamente a partículas de maiores dimensões. A área superficial específica é definida como a razão entre a área superficial e o volume do dispositivo que constitui o SLC. Nesta situação em que são utilizadas partículas esféricas a razão será dada pela expressão $(4\pi r^2)/(4/3 \pi r^3)$ onde r se refere ao raio da partícula. A sua dimensão permite-lhes permanecer mais tempo no local de tecido ósseo lesado e em locais de fratura de dimensão reduzida e proporcionam uma elevada biodisponibilidade.^[22] Contudo, em termos de produção em grande escala existem ainda dificuldades, pode ocorrer a inativação do material encapsulado durante a produção e há um baixo controlo sob as taxas de libertação.^[22] Numa tentativa de controlar estas taxas utilizam-se polímeros biodegradáveis na produção das microesferas.

O desenvolvimento de microesferas para libertação controlada tem sido aplicado em inúmeras aplicações importantes como libertação controlada de vacinas, estabilização do encapsulamento de proteínas terapêuticas e encapsulamento de ADN para problemas genéticos.^[22]

No presente trabalho foram estudadas microesferas de polímeros biodegradáveis para a libertação de uma droga modelo, o ácido acetilsalicílico.

1.3.2 Interesse dos polímeros como SLC

Um polímero é uma macromolécula formada por unidades moleculares que se repetem (meros) e que se encontram unidas através de ligações covalentes. O número de unidades repetitivas que formam o polímero designa-se grau de polimerização. Se o polímero for formado por um único tipo de monómeros designa-se homopolímero, se for formado por dois ou mais trata-se de um copolímero. A sequência das unidades repetitivas é variável, devido à quantidade de monómeros ligados e à sua reatividade. Relativamente à sua origem, existem polímeros naturais ou sintéticos. Os polímeros naturais têm sido cada vez mais usados como alternativa aos sintéticos devido à sua biodegradabilidade e atividade biológica.^[8] Entre os biopolímeros mais estudados estão o colagénio, a gelatina, alginato, quitina e o quitosano.^[15]

Os tecidos vivos são maioritariamente constituídos por polímeros naturais ou biopolímeros como proteínas e polissacarídeos.^[15] A aplicação de materiais poliméricos na área médica deve-se então à semelhança das suas propriedades físico-químicas com os tecidos vivos, nomeadamente com a fase orgânica presente no tecido ósseo.

Os polímeros são fáceis de sintetizar e de baixo custo, favorecem a osteointegração e reabsorção dos materiais compósitos do polímero natural. Contudo, apresentam algumas limitações relativas a aplicações de cargas e tensões elevadas e cíclicas.^[15]

Os polímeros biodegradáveis são amplamente usados como veículos de transporte de drogas, principalmente devido ao facto de eliminarem a necessidade de remoção cirúrgica. A taxa a que uma droga é libertada pode ter impacto na sua eficácia. A taxa de libertação a partir de dispositivos poliméricos biodegradáveis pode ser controlada pelo tamanho do dispositivo, cinética de degradação do polímero e pela variação de vários parâmetros usados no processo de formulação. O tamanho das microesferas de um polímero biodegradável é um fator determinante na degradação do polímero e portanto nas taxas de libertação.^[23]

No presente trabalho foi objeto de estudo o quitosano.

1.3.3 Quitosano

O interesse do quitosano no âmbito da regeneração óssea deve-se não só às suas características como biomaterial:

- Biocompatível. Não provoca reações alérgicas ou rejeição quando em contacto com o tecido vivo.
- Biofuncional. É capaz de se adaptar a uma função particular. Neste caso como veículo de transporte e libertação de fármaco e biocerâmicos.
- Facilmente moldável.
- Esterilizável.

- Não tóxico.
- Não cancerígeno.

Mas também porque é um material

- Biodegradável.
- Promotor da adesão, proliferação e diferenciação celular graças à sua superfície hidrofílica.
- Capaz de manter a forma, após reticulação.
- Homeostático.
- Bactericida, antimicrobiano e capaz de absorver metais tóxicos como mercúrio, cádmio e chumbo. ^{[15],[24],[7]}

Como veículo de transporte de drogas para libertação controlada sob a forma de micropartículas o QS:

- Possui capacidade no controlo da libertação.
- Evita o uso de solventes orgânicos perigosos.
- É uma polimamina linear, contém grupos amina livres e disponíveis para reticulação, a sua natureza catiónica permite a reticulação iónica com aniões multivalentes.
- Tem carácter mucoadesivo (o que aumenta o tempo residual no local de absorção). ^[24]

1.3.3.1 Composição química, estrutural e características principais

O quitosano é um heteropolissacarídeo obtido a partir da N-desacetilação da quitina, o polissacarídeo natural mais abundante na Terra após a celulose. A diversidade de fontes naturais das quais pode ser extraída quitina é uma das vantagens da utilização destes biopolímeros. Os exosqueletos de crustáceos são as suas principais fontes comerciais. ^[25]

A nível químico, tanto a quitina como o quitosano são copolímeros, compostos por duas unidades estruturais aleatoriamente distribuídas (distribuição de Bernoulli). ^[15] As unidades 2-amino-2-deoxi-D-glucano (GlcN) e 2-acetamido-2-deoxi-D-glucano (GlcNAc) são unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$. A distinção entre a quitina e o quitosano baseia-se na proporção relativa destas unidades. Na quitina é a unidade GlcNAc que surge em maior proporção. Quando se obtém QS por N-desacetilação da quitina, os grupos acetamido ($-NHCOCH_3$) das unidades GlcNAc são convertidos em grupos amino ($-NH_2$) em variadas taxas, originando um polissacarídeo com determinado grau médio de substituição. ^[25]

O parâmetro que expressa o conteúdo médio de unidades GlcN nas cadeias do produto então obtido é definido como grau de desacetilação (GD). Denomina-se quitosano caso GD seja igual ou superior a 60%. ^[25] Os principais parâmetros que controlam as propriedades físico-químicas do QS são o GD e o peso molecular (PM). ^[26] O GD influencia as propriedades biológicas, como

biodegradabilidade e atividade imunológica, uma vez que atua sobre a sua solubilidade, hidrofiliabilidade, viscosidade em solução e capacidade de reticulação.^{[25],[26]}

O QS é insolúvel em água, solventes orgânicos e bases. A sua solubilidade ocorre na maioria das soluções de ácidos orgânicos de pH inferior a 6, como soluções de ácido acético ou fórmico. Podem efetuar-se dispersões de QS em ácidos inorgânicos diluídos, tais como, nítrico, clorídrico e fosfórico.^[25]

O QS é classificado como um polieletrólito catiónico e tem natureza hidrofílica. Quando diluído em meio ácido, os grupos amino livres tornam-se protonados ($-\text{NH}_3^+$) favorecendo a sua dissolução em água.^{[7],[24],[25]} Contudo, a hidrofiliabilidade e solubilidade do QS pode ser alterada pela reticulação das suas cadeias.^[26]

1.3.3.2 Reticulação do QS

A reticulação de cadeias poliméricas é uma modificação química que visa unir as cadeias do polímero ou ligá-las às de outros polímeros formando redes poliméricas híbridas.^[25] A adoção de processos de reticulação tem como objetivo melhorar ou modificar determinada propriedade do polímero: rigidez estrutural, estabilidade química e/ou térmica, permeabilidade, cor, capacidade de imobilização proteica ou celular.^[25]

Os processos de reticulação são influenciados pelo tipo de agente de reticulação usado e respetiva concentração; por características inerentes ao polímero a reticular: GD e PM no caso do QS; e pelas condições reacionais: temperatura e tempo de reação.^[25] Os agentes de reticulação apresentam baixa massa molar e grupos funcionais reativos de forma a permitir a formação de ligações inter ou intramoleculares entre as cadeias poliméricas.^[25] Apesar das vantagens da utilização de processos de reticulação apresentadas em termos de aplicação, os agentes reticulantes podem induzir reações químicas não desejadas com o agente ativo/fármaco e a remoção do reticulante que não reagiu pode ser uma tarefa difícil.^[24]

Quando se consegue uma elevada taxa de reticulação, a porosidade, em oposição, é reduzida, assim como a permeabilidade à água e a difusão de material encapsulado nas redes poliméricas formadas.^[25] O desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos requer matrizes permeáveis à água e capazes de encapsular, transportar e libertar os mesmos eficientemente.^[25] A presença de grupos hidroxilo, carboxilo e amino na estrutura dos polímeros confere-lhes uma elevada hidrofiliabilidade que, na presença e difusão dos fluidos corporais, faz com que aumentem o seu volume provocando uma libertação precoce do agente ativo transportado. Uma forma de contornar tal facto é recorrendo à reticulação do sistema.

Relativamente à reticulação do quitosano, as modificações estruturais ocorrem em sítios reativos específicos nas unidades GlcNAc e GlcN – grupos amino e hidroxilo.^[25] O formaldeído,

glioxal, glutaraldeído e a genipina (menor toxicidade) são reagentes que podem atuar como agentes reticulantes do QS, ligantes de grupos $-NH_2$.^[25]

Estão descritos alguns processos de reticulação das cadeias poliméricas do QS:

- Formação de ligações covalentes intermoleculares, que unem de forma permanente sítios reativos de cadeias poliméricas diferentes.
- Formação de ligações covalentes intramoleculares que unem de forma permanente regiões distintas de uma mesma cadeia.
- Reações radiculares induzidas por um iniciador fotoquímico ativado por luz ultravioleta. As cadeias poliméricas são reticuladas através da introdução de moléculas sintéticas entre as suas estruturas. O processo despende menos energia comparativamente à reticulação covalente, é realizado à temperatura ambiente, com redução do tempo reacional e obtém-se um produto final de maior qualidade.
- Interações iônicas. Formam-se atrações electrostáticas entre as regiões catiónicas do QS e as regiões aniónicas do agente reticulante. O processo apresenta uma elevada sensibilidade a variações de pH e de força iónica do meio e obtém-se um produto final de menor estabilidade. O procedimento experimental baseia-se na mistura do agente reticulante com o QS e a reticulação é reversível.^[25]

1.3.3.3 Reticulação do QS com Glutaraldeído

O glutaraldeído é um composto orgânico; mais precisamente um aldeído bifuncional. É miscível com água, álcool e benzeno. Apesar da sua utilização em aplicações biomédicas, é um composto tóxico.

A reticulação do QS com GTA classifica-se como reticulação covalente e ocorre via adição nucleofílica (Figura 1.3). A amina, grupo reativo do QS, atua como nucleófilo e atua sobre o grupo carbonilo do agente reticulante.^{[24],[25]} Subsequentemente, ocorre uma reação de eliminação com a produção de aldiminas ou bases de Schiff.^[25]

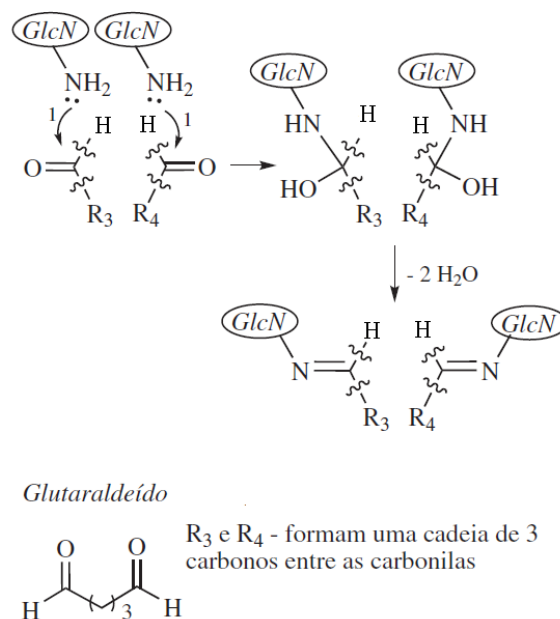


Figura 1.3 – Esquema da reticulação de QS com GTA. Adaptado de [25]

1.3.4 Mecanismos de degradação polimérica

A degradação polimérica é um processo químico que se caracteriza pela quebra de ligações das principais cadeias de um polímero. Neste processo são produzidos pequenos oligômeros, monómeros e/ou produtos de baixo peso molecular. Um polímero é considerado biodegradável quando a degradação se deve à ação ambiental, processos biocatalíticos (que envolvam bactérias, enzimas) ou processos químicos ou radiculares (hidrólise, oxidação, irradiação UV). A taxa de biodegradação afeta principalmente o peso molecular do polímero e é influenciada pela sua composição química, arquitetura molecular, morfologia (dimensão, geometria e porosidade) e por condições ambientais como o pH e a temperatura. Eventos como a perda de resistência mecânica e de cristalinidade, alterações do pH estão associados ao processo de degradação. [19]

Na liberação controlada, os polímeros biodegradáveis são tipicamente degradados por hidrólise e/ou por ação enzimática. A degradação hidrolítica está intimamente ligada com a capacidade do polímero em absorver água. Os polímeros hidrofílicos permitem a incorporação de grandes quantidades de água na sua estrutura o que, geralmente provoca uma degradação mais rápida do que em matrizes hidrofóbicas.

É importante fazer a distinção entre o processo químico de degradação e o fenômeno de erosão que também ocorre em polímeros biodegradáveis como o QS. [20] A erosão é a desintegração física da matriz polimérica como resultado da degradação e está dependente de processos de difusão e dissolução e pode ser classificada como superficial ou volumica (Figura

1.4). A erosão volúmica é caracterizada por uma penetração da água na matriz polimérica mais rápida do que a erosão da mesma. É também denominada por erosão homogénea uma vez que a perda de massa da microesfera (ou do dispositivo em questão) ocorre a uma taxa mais ou menos uniforme em toda a matriz; o volume do polímero permanece constante mas a microestrutura sofre mudanças consideráveis. Após um determinado grau de erosão, a microesfera colapsa. No processo de erosão superficial a entrada de água é lenta comparativamente ao processo de erosão e a perda de massa está limitada às camadas superficiais da estrutura polimérica o que leva a um decréscimo gradual da estrutura. Numa situação ideal, a taxa de erosão superficial deverá ser diretamente proporcional à área superficial externa. A extensão da erosão superficial ou volúmica varia com a estrutura química da cadeia principal do polímero. ^{[20], [22]}

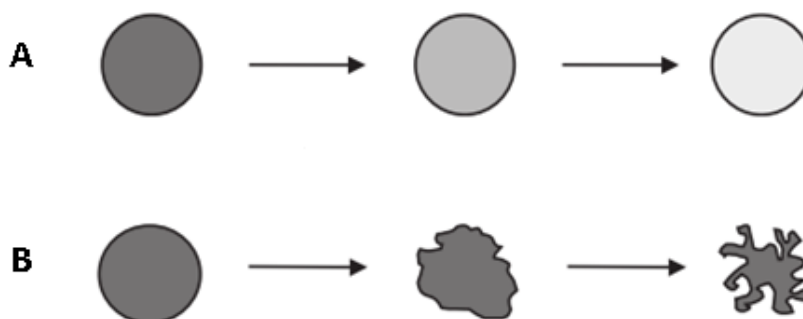


Figura 1.4 – Mecanismos de erosão de polímeros. (A) Erosão volúmica, (B) Erosão superficial. Adaptado de ^[19].

1.3.4.1 Degradação do QS

A degradação do QS, quando exposto a meio fisiológico natural ou simulado, envolve vários fatores: dissolução físico-química, ação enzimática e propriedades próprias da matriz polimérica. ^[15]

In vivo, o QS é metabolizado por enzimas hidrolíticas, nomeadamente lisozimas, que provocam a quebra das ligações $\beta(1\rightarrow4)$. A degradação por ação enzimática é reduzida sobre QS de elevado GD (superior a 80%), devido à sua preferência pelas ligações glicosídicas entre as unidades acetiladas do biopolímero. Assim, no QS de elevado GD não ocorrem alterações significativas de peso molecular e, conseqüentemente, os períodos de degradação são longos. ^[15] Estudos efetuados com a finalidade de obter uma biodegradação mais rápida recorrem a QS de baixo GD limitando, contudo, a adesão celular. ^[15] Da degradação do QS

resultam produtos inócuos (amino açúcares) os quais são totalmente absorvidos pelo organismo humano.^[24]

1.3.5 Mecanismos de incorporação do fármaco

A integração do fármaco no SLC depende do método de preparação do SLC e das propriedades físico-químicas do fármaco. Em sistemas de micropartículas existem dois métodos a partir dos quais é possível integrar o fármaco: incorporação ou incubação, durante ou após a preparação das partículas, respetivamente. Numa situação de incorporação, geralmente, é obtida uma maior eficiência de encapsulamento comparativamente a uma situação de incubação. Contudo, esta depende ainda dos parâmetros relativos ao processo de produção, como, método e a presença de aditivos.^[24]

Em sistemas de QS podem ser incorporadas fármacos hidrossolúveis ou lipossolúveis. Os hidrossolúveis podem ser misturados na própria solução de QS, formando uma mistura homogênea e a solução obtida poderá ser usada na produção das partículas. As concentrações iniciais do fármaco, do reticulante e a do próprio polímero exercem influência na eficiência de encapsulamento. Esta aumenta, quando a concentração do polímero aumenta. Os fármacos não solúveis em água e as drogas que precipitam em soluções ácidas são incorporados após a formação das partículas, por imersão numa solução saturada da droga. Neste método, a incorporação está extremamente dependente da capacidade de inchamento das partículas de QS em água. A percentagem de fármaco incorporado decresce com o aumento de reticulação devido ao decréscimo de inchamento. As drogas que não se dissolvem em água podem também ser incorporadas através de técnicas de emulsão múltipla. O procedimento consiste em preparar sequencialmente uma emulsão óleo-em-água e uma água-em-óleo. Na primeira emulsão, a droga é dissolvida num solvente apropriado e depois emulsificada numa solução de QS. Alternativamente, a droga pode ser apenas dispersa na solução de QS usando um surfactante para obter a suspensão. Na segunda emulsão, é utilizado o resultado da primeira o qual é emulsificado numa fase de óleo. Às partículas então formadas, é adicionado o agente reticulante para garantir a manutenção estrutural.^[24]

1.3.6 Mecanismos de libertação

Os principais mecanismos responsáveis pela libertação global de um agente terapêutico a partir de uma matriz polimérica biodegradável são a erosão polimérica, difusão através da matriz e dissolução da droga no meio circundante (Figura 1.5).^[19] As moléculas de fármaco

encapsuladas numa matriz polimérica são libertadas com a degradação do material por erosão da matriz pelos métodos já descritos. Simultaneamente, as moléculas de fármaco saem para o meio de dissolução por difusão. A difusão não é mais do que o movimento dessas moléculas a favor do gradiente de concentração. A difusão pode ser induzida pela penetração de água na matriz polimérica, a qual é regulada pelo grau de hidrofiliicidade da matriz. A libertação por difusão envolve três etapas: a água penetra no sistema de partículas provocando o inchamento da matriz. O polímero vítreo é convertido em “borracha” e finalmente ocorre a difusão da droga a partir da matriz “de borracha” inchada. A dissolução do fármaco pode ser um mecanismo importante na fase inicial da libertação devido à deposição de moléculas de fármaco sobre ou perto da superfície da matriz, as quais são rapidamente perdidas por dissolução.^{[19],[24]} A importância relativa de cada um destes mecanismos varia com as características do polímero e da matriz.

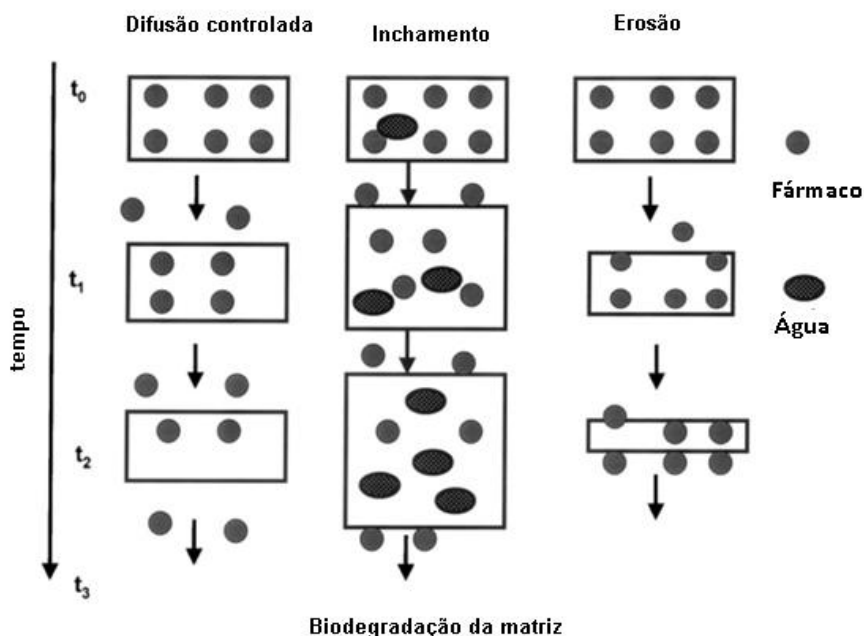


Figura 1.5 – Mecanismos de libertação a partir de uma matriz polimérica. Adaptado de ^[21]

Os mecanismos de libertação são influenciados por vários fatores que se podem agrupar em dois fundamentais: o tipo de SLC utilizado e o tipo de fármaco.

A taxa de libertação terapêutica depende do tipo de polímero (PM, hidrofiliicidade, flexibilidade, cristalinidade) e do seu modo de degradação, do método de produção do SLC, dos excipientes adicionados à formulação (para estabilização terapêutica por exemplo) e do tamanho, forma e porosidade das partículas que constituem o SLC.^{[19],[22],[24]}

A taxa de libertação está claramente relacionada com o polímero utilizado e a respetiva taxa de degradação. Quanto mais rápida for a degradação do polímero, mais rápida será a libertação

do fármaco da sua estrutura. O peso molecular do polímero, como já foi referido, pode afetar a degradação e, conseqüentemente, as taxas de libertação. Um aumento de peso molecular diminui o processo de difusão e conseqüentemente a taxa de libertação. Da degradação polimérica resultam produtos como monómeros e oligómeros solúveis que se podem difundir para o exterior da micropartícula. Em polímeros de menor peso molecular a formação destes produtos é mais rápida do que em polímeros de maior peso molecular e portanto as taxas de libertação que lhes estão inerentes serão maiores.^[22] A composição do copolímero pode também afetar as taxas de libertação. Quanto maior o conteúdo de um monómero de rápida degradação, maior a taxa de libertação. A taxa de libertação aumenta também com uma maior concentração de monómeros menores e/ou mais solúveis.^[22] Para estabilizar o material encapsulado durante a produção e/ou libertação podem ser adicionados vários excipientes no momento de produção das microesferas. Estes compostos podem estabilizar as emulsões e favorecer a distribuição uniforme do material nas microesferas, o que pode influenciar a taxa de libertação.^[22]

O tamanho das microesferas determina a área superficial específica, ditando assim a quantidade de superfície disponível para a libertação do material encapsulado por difusão. À medida que o tamanho diminui a razão área superficial/volume aumenta. Deste modo, a taxa de libertação através da microesfera, por massa de polímero, irá aumentar com o decréscimo do tamanho da partícula. Em partículas mais pequenas a penetração da água nas partículas pode ser mais rápida devido ao menor raio da partícula (a água atinge o centro da partícula mais rapidamente). Em polímeros pouco permeáveis à água (hidrofóbicos), a diminuição da área de superfície específica com o tamanho da partícula pode levar ao decréscimo da taxa de erosão e da taxa de libertação (por massa de polímero). Assim, a libertação também será mais rápida para esferas de polímeros hidrofóbicos de menores dimensões. O tamanho das esferas também pode afetar a distribuição da droga na matriz polimérica. Estudos relatam que em microesferas de menor dimensão, esta se encontra mais uniformemente distribuída.^[22]

Nos polímeros que sofrem erosão volúmica a matriz que constitui as microesferas degradada pela entrada de água na matriz polimérica. O perfil de libertação é descrito por uma fase inicial com uma abrupta libertação do material encapsulado seguida de uma fase de libertação lenta e controlada por difusão. Por vezes, existe uma terceira fase na qual o restante material é rapidamente libertado devido à degradação da matriz polimérica. Os polímeros que sofrem erosão superficial são normalmente compostos por monómeros hidrofóbicos, capazes de resistir à entrada de água enquanto degradam na interface polímero/água por hidrólise. Inicialmente, o material encapsulado é libertado principalmente na superfície, ao mesmo tempo que o polímero se decompõe. Se a droga estiver homogeneamente distribuída na microesfera, a maior taxa de libertação ocorre no início (*burst effect*^[24]). Uma forma de atenuar este efeito inicial é recorrer e/ou aumentar a reticulação do sistema.^[24] Com o decorrer do tempo, a área de superfície da esfera e a taxa de libertação decrescem assintoticamente.^[22]

A liberação do fármaco é também influenciada pelas propriedades físicas do fármaco, nomeadamente pelo seu PM e pela sua solubilidade em água. A difusão do fármaco através de uma barreira polimérica depende do tamanho das moléculas do fármaco, da sua distribuição na matriz polimérica e da solubilidade no polímero.^[19] A concentração do fármaco no plasma sanguíneo depende da quantidade libertada a partir do SLC e sua absorção é determinada pela solubilidade no tecido e pela disponibilidade de fluxo sanguíneo local. Mesmo que a concentração do fármaco no plasma permaneça razoavelmente constante, podem sempre ocorrer pequenas flutuações devido a fatores como atividade física, estimulação emocional, ações como comer ou dormir, etc.

É ainda importante considerar as condições ambientais no momento de liberação, como o pH e temperatura do meio circundante.

1.3.6.1 Mecanismos de liberação em microesferas de QS

A liberação de fármacos a partir de sistemas particulados de QS depende:^[24]

- Da morfologia, dimensão e densidade das partículas.
- Da extensão de reticulante.
- pH.
- Polaridade e presença de enzimas no meio de dissolução.

A liberação de drogas de sistemas particulados como microesferas de QS envolve vários mecanismos:^[24]

- a) Liberação pela superfície.
- b) Liberação devido à erosão volúmica do polímero.
- c) Difusão por inchamento da matriz.

Na maioria dos casos a liberação segue mais do que um destes mecanismos.

Estudos revelam que a taxa de liberação de microesferas preparadas com QS de elevado peso molecular é lenta em comparação com outras preparadas com QS de médio e baixo peso molecular. Uma razão poderá ser a menor solubilidade do QS de alto peso molecular e maior viscosidade da camada de gel formada em torno das partículas da droga.^[24]

1.3.7 Cinética de degradação/libertação do QS

Vários são os modelos que tentam interpretar o comportamento de liberação dos SLC. A liberação de um fármaco a partir de uma matriz polimérica é um processo complexo e envolve vários processos de difusão daí que o desenvolvimento de equações matemáticas que os

explicitem seja também um desafio. Por vezes, aparentemente, algumas das características físicas do fármaco incorporado e da matriz (solubilidade em água, densidade e porosidade da matriz inicial) não aparecem explícitas nos modelos desenvolvidos. As características de dissolução, solubilidade e velocidade de dissolução, devem receber especial atenção no caso de fármacos pouco solúveis em água. A libertação de fármacos a partir de sistemas matriciais pode ser descrita por um dos modelos seguidamente descritos.^[27]

O primeiro modelo baseia-se numa libertação a partir de uma matriz que não é erodida, designa-se por cinética de ordem zero e é expresso pela seguinte equação:

$$M_t/M_\infty = kt + b \quad \text{Equação 1}$$

Onde M_t é a quantidade de droga acumulada e M_∞ a quantidade total de fármaco incorporado no sistema polimérico em $t=0$, t o tempo e k constante cinética, b a quantidade inicial do fármaco no meio de dissolução (geralmente $b = 0$). Os sistemas que apresentam um perfil de libertação de ordem zero promovem uma libertação prolongada, sendo a velocidade de difusão do fármaco (do interior para o exterior da matriz) menor do que a velocidade de dissolução. Assim, forma-se uma solução saturada que induz a constante cedência do fármaco. Esta cinética é bastante difícil de se conseguir na prática e apresenta muitas limitações devido aos poucos fatores de ajuste do modelo. Descreve sistemas matriciais e osmóticos.^[27]

Outro modelo proposto baseia-se na equação de Higuchi:

$$M_t/M_\infty = k_H t^{1/2} + b \quad \text{Equação 2}$$

Onde k_H representa a constante de libertação de Higuchi. Este modelo descreve a libertação de fármacos com base na lei de Fick. A libertação depende da raiz quadrada do tempo. O principal problema desta modelo é o facto de excluir situações de inchamento da matriz polimérica, o que torna a sua aplicação insuficiente. Contudo, é mais realista do que o anterior e pode ser aplicado a matrizes unidimensionais pouco solúveis que não apresentem capacidade de inchamento, nas quais esteja incorporado um fármaco muito solúvel. Este sistema é usado para matrizes poliméricas de acetato de celulose e HPMC (hidroxipropilmetilcelulose).^[27]

O modelo mais utilizado para sistemas matriciais de difusão controlada é a equação empírica usada por Ritger e Peppas,^[24]

$$M_t/M_\infty = k_{RP} t^n \quad \text{Equação 3}$$

Onde k_{RP} é uma constante cinética (engloba características estruturais e geométricas^[27]) e n um parâmetro empírico característico do mecanismo de libertação. Esta equação é usada para interpretar situações de libertação quando o mecanismo que predomina não é bem conhecido ou quando resulta da combinação de mecanismos. Com base no expoente difusional (n) o

transporte do fármaco é classificado como: transporte Fickiano se obedecer às leis de Fick ($n=1/2$), transporte não Fickiano ou anômalo ($0,5 < n < 1$), transporte Caso II se prevalecem fenômenos de inchamento da matriz ($n=1$) ou super Caso II ($n > 1$).^[24] O transporte anômalo ou não Fickiano refere-se portanto à combinação dos processos.

S.G. Kumbar *et al.*^[28] estudaram a libertação de diclofenaco de sódio a partir de microesferas de 7%(p/p) QS reticuladas durante uma hora com 8%, 16% e 32%GTA relativamente à massa seca de QS. Como resultado obtiveram-se valores de expoente difusional (n) a variar entre 0,49 e 0,61 o que indica a combinação de fenômenos de libertação.

1.3.8 Fármaco

O ácido acetilsalicílico (AAS), comumente conhecido como aspirina, é um derivado do ácido salicílico, um ácido carboxílico orgânico cristalino. Em 1897, o AAS foi obtido pela primeira vez por *Felix Hoffman* um químico alemão.

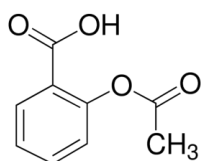


Figura 1.6 – Estrutura do ácido acetilsalicílico (C₉H₈O₄).

O AAS apresenta-se como um pó cristalino branco ou cristais incolores, inodoro ou quase inodoro com um gosto ligeiramente ácido.

Quimicamente, este composto é solúvel em água (AAS da Sigma utilizado: 10mg/ml a 37°C ou 3mg/ml a 25°C), possui uma massa molecular de 108,16g/mol, densidade 1,40g/ml e uma temperatura de fusão de 135°C. Relativamente a propriedades espectrais, manifesta absorção máxima para comprimento de onda de 275nm.

A sua aplicação terapêutica deve-se às suas propriedades analgésicas, antipiréticas, não esteroides e anti-inflamatórias.^[29] A aspirina é prescrita para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, acidente vasculares cerebrais e desordens associadas com a agregação de plaquetas. Quaisquer tecidos cujo metabolismo celular seja afetado podem ser órgãos alvo à sua aplicação. O AAS é hidrolisado no estomago e no sangue em ácido salicílico e ácido acético e o tempo de semi-vida biológico é de 15 a 20 minutos (para molécula intacta).

A administração da aspirina baseia-se principalmente numa dosagem oral, geralmente diária e por longos períodos de tempo. Ensaio clínico sugerem que uma libertação controlada da aspirina pode contribuir para um aumento da eficácia terapêutica da droga. A aspirina possui baixa solubilidade em água e é facilmente decomposta por hidrólise o que a torna uma droga modelo relevante para estudos de transporte e libertação, garantindo baixos custos.^[30]

1.4 Métodos de produção

1.4.1 Sol-gel

Existem inúmeras técnicas de produção de cerâmicos como métodos químicos húmidos onde se incluem o sol-gel e a precipitação direta a partir de soluções aquosas, síntese mecanoquímica, processos hidrotérmicos, emulsões, reações do estado sólido.^{[17],[31]}

No presente trabalho produziram-se fosfatos de cálcio pelo método sol-gel. O objetivo foi obter produtos finais à escala nanométrica e de elevada reatividade típicos deste método.

O método sol-gel divide-se em duas fases fundamentais: a formação do sol e a formação do gel. Posteriormente pode haver um período de envelhecimento do gel, seguido de uma fase de remoção do solvente por secagem e finalmente, o gel seco é submetido a um tratamento térmico (sinterização).

Formação do sol

Um sol é uma suspensão coloidal de partículas sólidas num líquido. As partículas que constituem a fase dispersa são de dimensões tão reduzidas que a força gravitacional é desprezável e as interações são dominadas por forças de van der Waals.^[32] O sol pode ser obtido a partir de vários sistemas químicos o que conduz a diferentes características do gel produzido.^[33] No processo sol-gel os precursores (compostos iniciais) usados na preparação do colóide constam num elemento metálico ou semi-metálico rodeado de vários ligandos (não metálicos).^[32] Na síntese de HAp são frequentemente usados sais metálicos ou alcóxidos como precursores de cálcio ou fósforo numa quantidade estequiométrica adequada (fosfito de trietileto com nitrato de cálcio, fosfato de trietileno – menos reativo – com acetato de cálcio).^[34] O sol é formado graças a reações de hidrólise e condensação que ocorrem entre os precursores.^[33] Pode ser adicionado um catalisador para acelerar as reações no sol.^[34]

Formação do gel

O gel é uma rede tridimensional constituída por uma estrutura sólida na qual está englobada uma fase líquida.^{[32],[33]} A formação do gel ocorre devido a reações químicas entre os precursores, alterações químicas no sol ou evaporação do solvente e conduz a um aumento da viscosidade da solução. Podem ser produzidos géis coloidais ou géis poliméricos, os quais resultam da formação de agregados com base nas partículas coloidais pela modificação apropriada das condições físico-químicas da suspensão ou da formação de estruturas tridimensionais através de ligações covalentes estabelecidas entre cadeias poliméricas lineares, respetivamente.^[33] Os géis podem ainda resultar de reações de precipitação e agregação simultânea a partir de soluções homogêneas dos precursores.^[33] As ligações nos sistemas particulados podem ser reversíveis (redispersos por agitação), no caso dos sistemas poliméricos são permanentes.^[32] Contudo, a formação de ligações não termina na gelificação.

Envelhecimento

O termo envelhecimento é aplicado à mudança na estrutura e propriedades após a gelificação. Esta etapa pode envolver fenómenos de condensação, dissolução e (re)precipitação de monómeros ou oligómeros, transformação de fases e ocorre o início da libertação do solvente do interior dos poros do gel.^[32]

Secagem

O processo de secagem consiste na remoção do solvente da estrutura do gel. Alguns géis exibem uma contração espontânea e conseqüente deformação da rede devido à formação de ligações/atração entre partículas que induzem a contração da rede e a expulsão do solvente dos poros do gel.^[32] Quando a remoção do solvente é feita por extração do solvente obtém-se um aerogel, se ocorrer por evaporação natural obtém-se um xerogel.^[33] No decorrer do processo de secagem o gel começa por contrair numa proporção igual ao volume do líquido que é removido, depois torna-se rígido e os poros próximos da superfície exterior ficam cheios de ar. O ar ao entrar nos poros induz o movimento de um filme líquido para o exterior permitindo a continuação da sua evaporação à superfície. Ao mesmo tempo, ocorre difusão do vapor de dentro do material para o exterior.^[33]

Sinterização

A sinterização é um processo de densificação conduzido pela energia interfacial. O material move-se por difusão ou fluxo viscoso de maneira a eliminar porosidade e reduzir a área interfacial sólido-vapor. Nos géis esta área é enorme, e então a força motriz é suficientemente grande para produzir sinterização a baixas temperaturas onde o processo de transporte é relativamente lento.^[32] A sinterização é um tratamento térmico no qual não ocorre a fusão completa das partículas^[33] e que pode modificar as propriedades texturais e conformacionais do produto final. A cinética de densificação dos géis envolve processos complexos de

desidroxilação e relaxação estrutural, que permite uma densificação a uma temperatura mais baixa através de um aquecimento mais rápido.^[32] A altas temperaturas os géis tendem a degradar-se.

O processo sol-gel possui algumas vantagens relativamente aos outros processos mencionados. A nível atómico, durante a preparação do sol, garante uma mistura molecular homogénea do cálcio e do fósforo;^[31] as reações de hidrólise e condensação podem ser catalisadas por ácidos ou bases mas a sua neutralização é fácil e nunca são atingidos valores de pH extremos; não exige temperaturas de processamento muito elevadas; os pós produzidos possuem elevada reatividade o que permite uma sinterização a temperaturas mais baixas e evita a ocorrência de fenómenos de degradação que surgem para temperaturas elevadas; o produto final apresenta um elevado grau de pureza.

No entanto alguns procedimentos sol-gel requerem um longo tempo de iniciação/hidrólise que depende da natureza química dos precursores, controlo rigoroso de pH e elevada velocidade de agitação da solução. As principais desvantagens associadas a este processo são o elevado custo dos alcóxidos quando usados como precursores, o baixo controlo de contaminações químicas e da qualidade do produto final uma vez que a temperatura de sinterização influencia as fases presentes no produto obtido.^{[14],[17],[31],[33]} De acordo com a estabilidade térmica da fase gerada antes da sinterização, poder-se-ão formar fases cristalinas, fases cristalinas metaestáveis e fases não-cristalinas devido a mecanismos de decomposição ou desidroxilação. Uma das fases frequentemente presente no produto final é o óxido de cálcio (CaO).

É ainda importante referir que a bioatividade dos fosfatos de cálcio depende de vários fatores inerentes à sua síntese como os reagentes precursores usados, conteúdo de impurezas, tamanho e morfologia dos cristais, concentração e ordem de mistura dos reagentes, pH e temperatura.^[31]

No processamento da HAp o método de sol-gel adotado não exigiu controlo de pH nem um tempo de hidrólise longo (muito inferior às 24h descritas em muitos processos).^[17] Na síntese do β -TCP o método de sol-gel baseia-se na precipitação por controlo de pH.^[14] Em nenhum dos processos se utilizou catalisador.

1.4.2 Microfluídica

A microfluídica é a manipulação e análise de fluidos em estruturas à microescala. Os dispositivos microfluídicos permitem trabalhar com pequenos volumes de reagentes, possibilitam um menor tempo de reação e operações em paralelo. O seu maior potencial é a utilização da física à microescala para criar sistemas ou dispositivos funcionais.^[35]

À microescala diferentes forças tornam-se dominantes e é necessário adaptar o *design* dos dispositivos de forma a retirar proveito das mesmas. Os efeitos que se tornam dominantes na microfluídica incluem:

- Fluxo laminar.
- Difusão.
- Resistência fluídica.
- Relação área de superfície:volume.
- Tensão superficial/interfacial.^[35]

Neste trabalho utilizou-se um dispositivo microfluídico baseado no trabalho de Sung-Wook Choi e seus colaboradores^[36], que permite a produção de microesferas de tamanho uniforme e tem como vantagens a simplicidade e os custos efetivos de fabricação. O dispositivo é constituído por um tubo de PVC, uma agulha de seringa e um capilar de vidro (figura 1.7).

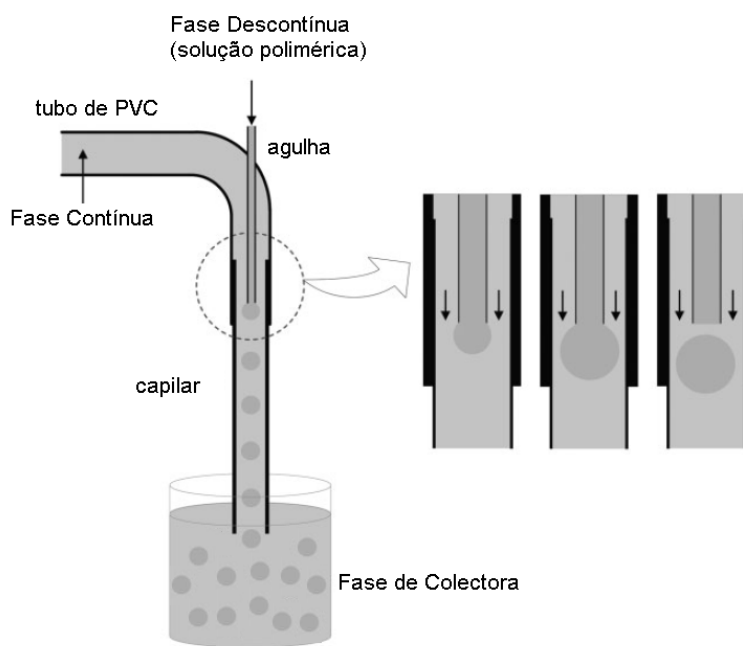


Figura 1.7 – Esquema do dispositivo microfluídico utilizado. Representação do regime de gotejamento inerente ao processo. Adaptado de ^[36]

Segundo este método a produção de microesferas baseia-se na formação de emulsões estáveis, óleo em água ou água em óleo. Estas emulsões são obtidas através da separação uniforme de uma corrente/fluído de fase descontínua induzida por um fluxo capilar através de um orifício. Técnicas semelhantes induzem a separação da corrente por focagem hidrodinâmica ou força elétrica e permitem a obtenção de emulsões duplas. Esta técnica de microfluídica surge como opção aos métodos de emulsão por ação de uma força mecânica, nos quais se produzem esferas por emulsão de duas fases imiscíveis com um

homogeneizador. A força mecânica utilizada gera normalmente esferas com uma ampla distribuição de tamanhos o que limita o seu valor prático. Na microfluídica as gotículas de emulsão são formadas por um dos modos: gotejamento ou jacto. No modo de gotejamento a emulsão é formada na ponta do orifício ou agulha enquanto que no modo de jacto é formada a uma distancia da ponta (do orifício ou agulha) e a força motriz é a instabilidade capilar. À medida que o jacto se torna instável, a sua área superficial deve ser reduzida sob a ação da tensão superficial, o que conduz à segmentação em pequenos fragmentos, os quais, em seguida, encolhem em gotas esféricas de maneira a minimizar a área de superfície. Cada comportamento pode ser caracterizado por dois parâmetros adimensionais: o número capilar (C_a) e o número de Weber (W_e). O número capilar da fase contínua ($C_a = \mu_c v_c / \gamma$ onde μ_c , v_c e γ são a viscosidade, velocidade da fase contínua e a tensão interfacial entre as duas fases respetivamente) descreve o efeito da força de corte viscosa relativamente à tensão interfacial e o número de Weber da fase descontínua ($W_e = \rho_d d_{tip} v_d^2 / \gamma$ onde ρ_d , d_{tip} , v_d são a densidade, diâmetro interno do capilar/agulha e a velocidade da fase descontínua e γ a tensão interfacial) descreve o efeito da força de atrito do líquido interior (solução polimérica) relativamente à tensão interfacial. Geralmente, quando o caudal e a viscosidade são baixos (W_e e C_a pequenos), a tensão superficial domina, conduzindo a um comportamento de gotejamento. As condições opostas conduzem a um comportamento de jacto. O sistema adotado deve funcionar em regime de gotejamento.

Os materiais utilizados neste sistema podem ser orgânicos ou inorgânicos, hidrofóbicos ou hidrofílicos consoante o fim a que se propõem. Os autores não limitam a utilização da técnica à seleção de materiais apresentados no seu trabalho (policaprolactona, ECA, gelatina) e propõem-na como estratégia eficaz para uma produção contínua e extensa de microesferas a partir de materiais procurados para aplicações como encapsulamento de drogas ou outros materiais e para engenharia de tecidos.

Relativamente ao processo em si, duas fases (contínua e dispersa) são continuamente introduzidas utilizando duas seringas e duas bombas infusoras com caudais ajustáveis e independentes, que permitam o contacto entre o final da agulha para formar as emulsões. Numa fase inicial, quando o tamanho da gota é mais pequeno do que o diâmetro da agulha, a força aplicada na gota pela fase contínua é desprezável. A força aumenta com o aumento do tamanho da gota e finalmente a gota deixa a ponta da agulha. A fase descontínua é totalmente rodeada pela fase contínua evitando a formação de detritos do polímero. Em alguns casos, os canais podem tornar-se permeáveis ou entupir com detritos de polímero devido a caudais elevados e/ou ao contacto físico entre a fase descontínua e as paredes do canal, daí o interesse em colocar o capilar de vidro na zona de formação das gotas.

A formação das gotículas de emulsão é afetada por vários parâmetros: viscosidade de cada fase, o caudal de cada fase, a densidade, a tensão superficial e a geometria o canal. O

tamanho das partículas produzidas pode ser ajustado variando: a concentração de polímero da fase dispersa, o caudal de cada uma das fases, a dimensão (diâmetro) do orifício (agulha).

Concentração do polímero na fase dispersa

Uma diminuição da concentração do polímero conduz a uma redução do tamanho das partículas. A diminuição da concentração do polímero implica uma redução do conteúdo de polímero em cada gota formada e, conseqüentemente, o tamanho das esferas formadas diminui. Contudo, associada à variação da concentração estão alterações simultâneas na tensão superficial e na viscosidade da solução polimérica que também podem contribuir para variações do tamanho das esferas produzidas. A viscosidade da solução depende da concentração da solução e do peso molecular do polímero. Quanto maior a concentração polimérica, maior a viscosidade da solução e quanto maior o peso molecular, ainda maior será a viscosidade da solução, o que conduzirá a esferas de maiores dimensões.

Caudal da fase contínua

O aumento do caudal da fase contínua conduz a uma redução do tamanho das partículas. A força de corte imposta sobre a gotícula aumenta devido ao aumento do caudal da fase contínua e a separação da gotícula da ponta da agulha ocorre mais cedo e para uma menor quantidade de solução polimérica acumulada na ponta da agulha. Acima de um determinado valor, a força que atua sobre a gotícula em formação é tão elevada que a separa e deforma. A partir desse valor a produção de esferas deixa de ser viável.

Caudal da fase descontínua

A variação do tamanho das esferas com o caudal da fase descontínua está muito dependente do caudal fixo da fase contínua. Se a força que atua sobre a gotícula em formação for fraca, o tamanho das partículas praticamente não será afetado. Se a força for relevante, então o aumento do caudal da fase contínua permite que se acumule maior quantidade de solução polimérica na ponta da agulha. Assim, as gotículas formadas terão maior dimensão e portanto as esferas obtidas serão maiores. Acima de um determinado valor, o caudal é tão rápido que se deixam de se formar gotículas e o caudal passa a ser “contínuo” tornando o processo inútil.

Diâmetro da agulha

O diâmetro interno da agulha é determinante no tamanho das esferas produzidas. Quanto maior o diâmetro da gotícula formada, maior a força da fase contínua necessária para provocar a sua separação da ponta da agulha. Quanto maior o diâmetro interno da agulha, maior o tamanho da gotícula formada.

2 Parte Experimental

2.1 Síntese de hidroxiapatite pelo método sol-gel

2.1.1 Materiais

Para a síntese da HAp foram utilizados os seguintes reagentes:

Tabela 2.1 – Reagentes utilizados para a produção de HAp.

Reagente		Características	Marca/Fornecedor
Etanol	C_2H_5OH	PA, M=46.07g/mol	Panreac
Nitrato de Cálcio Tetra-hidratado	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	PA, M=236.15g/mol	Panreac
Pentóxido de Fósforo	P_2O_5	PA, M=141.94g/mol	Sigma-Aldrich

2.1.2 Procedimento experimental

A hidroxiapatite foi produzida pelo método sol-gel seguido por Feng *et al.*^[17] com ligeiras modificações de otimização do tempo de envelhecimento.

1. Preparou-se uma solução de 10ml de P_2O_5 a 1M em etanol, vertendo cuidadosamente o solvente devido ao seu carácter exotérmico.
2. Preparou-se uma solução de igual volume de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ a 3,34M em etanol, de forma a obter uma mistura final de rácio molar Ca/P de 1,67.
3. Após a homogeneização de cada solução, adicionou-se a solução $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ /etanol à solução de P_2O_5 /etanol. A mistura permaneceu sob agitação magnética durante 10 minutos, à temperatura ambiente.
4. Simultaneamente preparou-se um banho de glicerina a 65°C, onde foi colocada a mistura durante 5h. No decorrer da reação obteve-se num gel branco transparente.
5. Deixou-se envelhecer o gel durante 48h à temperatura ambiente, devidamente selado com parafilme.
6. Secou-se o gel a 80°C numa estufa (*MEMMERT*) durante 48h.

7. O gel seco foi sinterizado a 700°C. No processo de sinterização o gel foi submetido a um incremento de temperatura a uma taxa de 10°C/min até 700°C (*Nabertherm*). Permaneceu a esta temperatura durante 30 minutos. E, posteriormente, arrefeceu até à temperatura ambiente.
8. Os produtos de sinterização foram esmagados com um pilão num almofariz de forma a obter pós de dimensão reduzida.

2.2 Síntese de β -TCP pelo método sol-gel com precipitação

2.2.1 Materiais

Para a síntese de β -TCP foram utilizados os seguintes reagentes:

Tabela 2.2 - Reagentes utilizados para a produção de β -TCP.

Reagente		Características	Marca/Fornecedor
Nitrato de Cálcio Tetra-hidratado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	PA, M=236.15g/mol	Panreac
Di-hidrogenofosfato de potássio	KH_2PO_4	PA, M=136.09g/mol	Sigma-Aldrich
Amoníaco	NH_3	PA, solução 25% M=17.03g/mol	Pronolab
Água destilada	-	-	-

2.2.2 Procedimento experimental

A produção de β -TCP foi baseada essencialmente no método de sol-gel descrito por Sanosh et al.^[14].

1. Preparou-se uma solução aquosa de 10ml de KH_2PO_4 a 1M.
2. Preparou-se uma solução aquosa de 10ml de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 1,5M. A solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ revelou-se saturada e foi necessário diluir ambas as soluções aquosas para metade.
3. Após a homogeneização de cada solução, adicionou-se a solução aquosa de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ à solução aquosa de KH_2PO_4 , gota-a-gota, sob agitação, à temperatura ambiente.
4. A mistura resultante foi homogeneizada durante 10 minutos sob agitação magnética à temperatura ambiente.
5. Registou-se o pH da solução.
6. Sob agitação e à temperatura ambiente, foi adicionada, gota-a-gota, a solução de amoníaco de forma a induzir a formação de um precipitado branco.

7. Adicionou-se a solução básica de amoníaco até se atingir um pH de 10. Verificou-se o fenômeno de precipitação com o aumento da basicidade da solução.
8. A solução com o precipitado foi mantida em agitação durante uma hora.
9. Retirou-se da agitação e deixou-se a envelhecer durante 48h.
10. Lavou-se o precipitado repetidamente com água destilada morna. O processo de lavagem foi efetuado segundo a seguinte sequência: distribuição do precipitado formado em tubos de ensaio, adição de água destilada morna em cada um deles, centrifugação, desprezo do sobrenadante; adição de água destilada morna e repetição de todo o processo até o odor a amoníaco se tornar impercetível.
11. Secou-se o precipitado numa estufa (MEMMERT) a 40°C durante 72h.
12. Esmagou-se o resultante num almofariz.
13. Sinterizou-se a 800°C. No processo de sinterização o precipitado foi submetido a um incremento de temperatura a uma taxa de 10°C/min até 800°C num forno (*Nabertherm*). Permaneceu durante 30 minutos a 800°C e arrefeceu até à temperatura ambiente.

2.3 Caracterização dos pós de HAp e β -TCP

Os pós de HAp e β -TCP produzidos foram caracterizados por difração de raios-X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrónica de transmissão (TEM).

2.3.1 Difração de Raios-X (DRX)

A difração de raios-X é uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, orgânicos ou inorgânicos.

Os raios-X são radiação de natureza eletromagnética. Quando atingem um material, podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos eletrões do átomo (dispersão). Após a colisão, a trajetória dos eletrões é alterada mas adquire a energia e fase do fóton incidente, ou seja, a radiação é absorvida pelo eletrão e reemitida. Cada eletrão funciona como um centro de emissão de raios-X. Numa estrutura cristalina, os átomos estão arrançados de maneira sistemática e apresentam entre eles distâncias características. Se o comprimento de onda incidente for próximo das distâncias entre os átomos verifica-se uma periodicidade das relações de fase entre as dispersões e observam-se os efeitos da difração dos raios-X em vários ângulos. Considerando dois ou mais planos da estrutura cristalina, as condições para que ocorra difração de raios X (interferência construtiva ou onda em fase) vão depender do caminho percorrido pelos raios-X e do comprimento de onda da radiação incidente. Esta condição é expressa pela lei de Bragg (radiação monocromática):

$$n\lambda = 2d\sin(\theta) \quad \text{Equação 4}$$

Onde n é a ordem de difração, λ o comprimento de onda da radiação incidente, d a distância interplanar (para o conjunto hkl – índices de Miller do plano) e θ o ângulo de incidência dos raios-X (entre o feixe incidente e os planos cristalinos). A intensidade depende do número de elétrons no átomo e do plano cristalino.

Os planos de difração, as respectivas distâncias interplanares e a densidade de átomos (elétrons) em cada plano cristalino são características próprias e únicas de cada substância cristalina e portanto cada substância terá um padrão difratométrico único. Por comparação com informações cristalográficas de bancos de dados é possível identificar uma substância pelo seu difratograma.

Os difratogramas obtidos neste trabalho foram adquiridos num difratômetro disponibilizado pelo CENIMAT/I3N (*X-ray diffraction PANalytic XPert PRO*).

2.3.1.1 Procedimento experimental

As amostras dos pós de HAp e β -TCP produzidos foram analisadas por difração de raios-X de forma a identificar as fases cristalinas presentes na sua estrutura.

Os pós foram moídos num almofariz e colocados em porta amostras de sólidos.

Na difração a fonte utilizada foi uma ampola de cobre ($Cu K\alpha$), sob um potencial de aceleração 45kV e um feixe de corrente de 40mA. O varrimento foi feito entre os 20° e os 60° a uma taxa de varrimento de 1 segundo por cada passo de 0,0(3)°.

2.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria. O espectro infravermelho (IV) de um composto químico é uma das suas propriedades físico-químicas mais características e, portanto, é extensamente usado na identificação de compostos. No espectro eletromagnético a região correspondente ao IV é constituída pelo IV longínquo ou de baixa frequência (200-600 cm^{-1}), região fundamental ou IV médio (400-4000 cm^{-1}) e a região de alta frequência (4000 cm^{-1} até à região visível).

Na região do infravermelho estão situadas as transições vibracionais. A absorção no infravermelho ocorre quando a radiação eletromagnética incidente tem uma componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais. As vibrações moleculares podem ser classificadas como deformação axial (ou estiramento) e deformação angular (no plano ou fora do plano) e podem ser simétricas ou assimétricas.

O funcionamento dos espectrômetros de FTIR baseia-se no interferómetro de Michelson. Neste sistema a radiação de uma fonte é dividida em dois feixes. Cada um dos feixes atinge um espelho, um fixo e outro móvel. Parte de cada um desses feixes é refletida e atinge um detetor. A posição relativa dos espelhos induz a fase dos feixes e conduz a diferentes fenómenos de interferência. Quando a interferência é construtiva (feixes em fase) a energia que atinge o detetor é máxima. À medida que o espelho móvel percorre determinada distância forma-se um interferograma. Como a informação contida no interferograma na prática não é útil a informação é convertida num espectro que relaciona as intensidades com as respetivas frequências através da transformada de Fourier.

Esta técnica foi utilizada com o intuito de identificar as espécies químicas presentes nos pós de HAp e β -TCP.

As medições foram realizadas num espectrómetro *FT-IR Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation* (CENIMAT/I3N).

2.3.2.1 Procedimento experimental

Preparam-se pastilhas de brometo de potássio (KBr) para a análise. Produziu-se uma pastilha apenas de KBr para utilizar como “branco” e preparam-se pastilhas de cerâmico:KBr na proporção 1:200 com os pós previamente secos. Os pós foram misturados e colocados num molde, o qual foi sujeito a uma pressão de 200bar numa prensa, durante 15 minutos para formar a pastilha. Repetiu-se o processo para os dois cerâmicos. Cada pastilha foi colocada num suporte e obteve o registo da variação da radiação transmitida em função do número de onda radiação incidente na amostra.

2.3.3 Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM)

A microscopia eletrónica de transmissão baseia-se na transformação da intensidade eletrónica em intensidade luminosa num alvo, sendo posteriormente registada.

É gerado um feixe de eletrões a partir de um filamento de tungsténio aquecido, que incide numa amostra e interage enquanto a atravessa. Os eletrões transmitidos através da amostra com uma distribuição de intensidade e direção controladas produzem uma imagem ampliada e focada que é detetada por um sensor com uma câmara CCD (*charge coupled device*).

Os cerâmicos foram observados no *Hitachi H-8100 Electron Microscope* com a acoplação de um detetor EDS para elementos leves da *ThermNoran* nas instalações do Instituto Superior Técnico. Para obter as imagens foi utilizada uma câmara CCD.

2.3.3.1 Procedimento experimental

Os pós foram mergulhados em etanol e utilizou-se uma agulha polimérica para efetuar a sua deposição no porta amostras. Foi utilizada uma tensão de aceleração de 200kV e o filamento utilizado foi Lab6.

2.4 Produção de microesferas

2.4.1 Materiais

Para a síntese das microesferas foram utilizados os seguintes reagentes:

Tabela 2.3 - Reagentes utilizados para a produção de microesferas de QS.

Reagente		Características	Fornecedor
Quitosano	$C_{12}H_{24}N_2O_9$	PM: 471000g/mol	Aldrich
Óleo de cozinha			
Glutaraldeído	$HCO(CH_2)_3CHO$	Solução 25%(peso) em água	Aldrich
Ácido Acetilsalicílico	$C_9H_8O_4$	≥99.0% cristalino	Sigma

Tabela 2.4 - Reagentes utilizados para a produção de microesferas de PCL.

Reagente		Características	Fornecedor
PCL	$C_{6}H_{10}O_2$	PM 70 000-90 000	Aldrich
PVA		PM: 95 000 95%hydrolyzed	Acros-OrganiQS
Diclorometano	CH_2Cl_2	Analytical reagent	Lab-Scan

2.4.2 Montagem Experimental

As microesferas foram produzidas utilizando a montagem da figura 3.1.

O sistema de microfluídica utilizado é constituído pelos seguintes componentes:

- A- Bombas infusoras – *KD SCIENTIFIC 100*.
- B- Seringa B.BRAUN Injekt de 1ml de volume e agulha de calibre 23G (diâmetro interno 0,33mm e diâmetro externo 0,65mm).
- C- Seringa B.BRAUN Injekt de 5ml de volume e agulha de calibre 21G.
- D- Tubo de PVC (Isoflex Kartell, diâmetro interno: 0,8mm e diâmetro externo: 2,4mm)
- E- Tina
- F- Agitador orbital (*IKA-VIBRAMAX-VRX*)

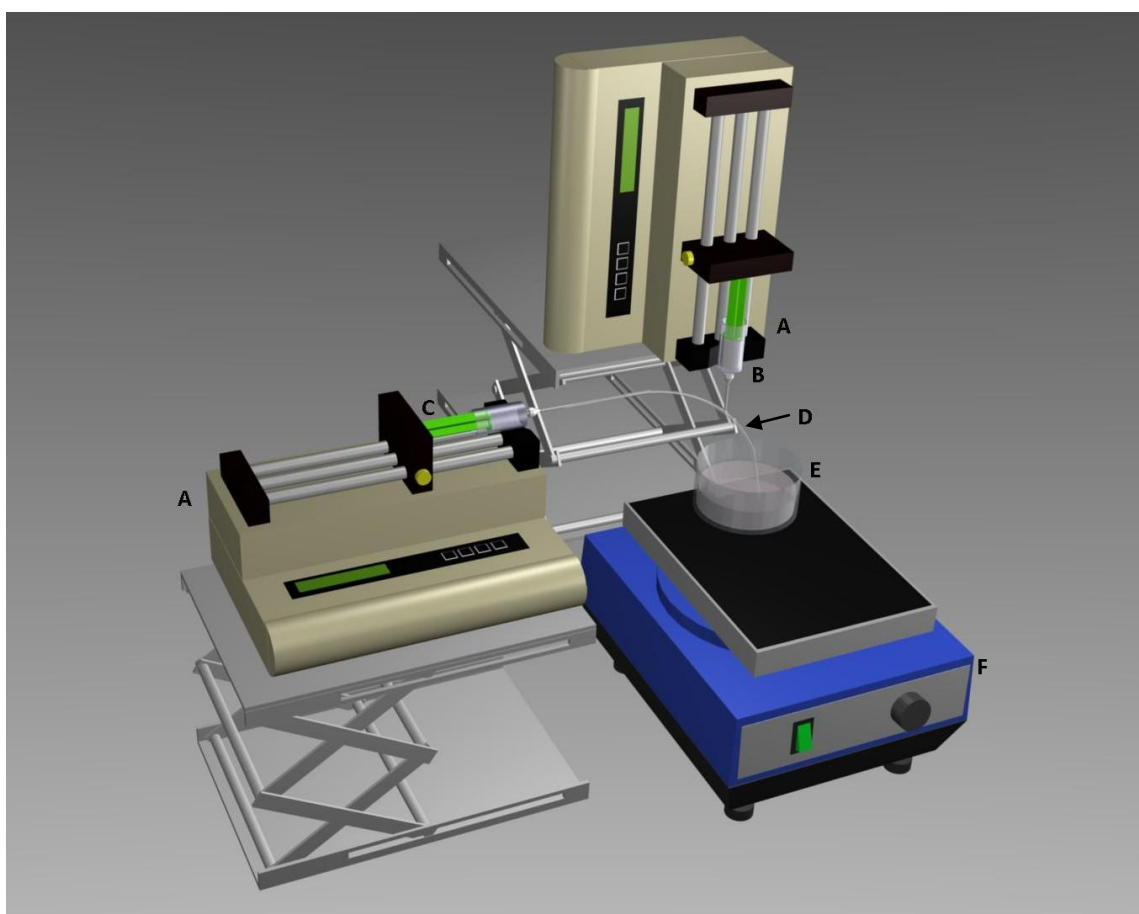


Figura 2.1- Montagem experimental utilizada na produção de microesferas. Legenda no texto 2.4.2.

2.4.3 Procedimento experimental

Produziram-se microesferas de diferentes composições: I) microesferas de quitosano, II) microesferas de quitosano com cerâmicos em suspensão (HAp e β -TCP), III) microesferas de quitosano com incorporação de um fármaco modelo, o AAS. A tabela 2.5 resume a composição das esferas produzidas.

Tabela 2.5 – Composição das microesferas produzidas.

Microesferas	QS/Ácido Acético	QS: Cerâmicos	HAp:β-TCP	QS:AAS
I) QS	1%(p/p)	-	-	-
II) QS/Cerâmicos	1%(p/p)	60:40	100:0	-
			90:10	-
			80:20	-
			70:30	-
			0:100	-
		70:30	90:10	-
			80:20	-
			70:30	-
		80:20	90:10	-
			80:20	-
			70:30	-
		90:10	100:0	-
90:10	-			
80:20	-			
70:30	-			
0:100	-			
III) QS/AAS	1%(p/p)	-	-	10:3

2.4.3.1 Preparação das soluções

1. Preparou-se uma solução aquosa de ácido acético a 2%(v/v).
2. As soluções usadas para produzir as microesferas foram preparadas a partir das da solução referida em 1., de acordo com os seguintes protocolos.

I) Microesferas de QS

Preparou-se uma solução de QS a 1%(p/p) dissolvendo, sob forte agitação e à temperatura ambiente, 1g de QS na solução de ácido acético até perfazer 100g. No processo de dissolução do QS formaram-se bolhas de ar. Após a dissolução total do polímero, foi necessário deixar a solução em repouso até que todas as bolhas migrassem para a superfície.

II) Microesferas de QS /Cerâmicos

Preparam-se várias soluções de QS a 1%(p/p) dissolvendo 0,1g de QS na solução de ácido acético previamente preparada até perfazer 10g. As soluções foram homogeneizadas sob forte agitação à temperatura ambiente. Após a dissolução total do QS deixaram-se em repouso para eliminar as bolhas de ar formadas. Adicionou-se uma massa determinada de cerâmico de forma a obter misturas de QS:(HAp:β-TCP) conforme as proporções mássicas apresentadas na tabela 2.6. As misturas obtidas foram submetidas a forte agitação magnética, de forma a gerar suspensões tão homogêneas quanto possível.

Tabela 2.6 – Massas de cerâmicos utilizadas para cada dispersão em QS.

QS: Cerâmicos	Proporção	Massa (mg)	
	Cerâmicos HAp:β-TCP	Cerâmico HAp β-TCP	
60:40	100:0	66,7	0,0
	90:10	60,0	6,7
	80:20	53,3	13,4
	70:30	46,7	20,0
	0:100	0,0	66,7
70:30	90:10	38,6	4,3
	80:20	34,3	8,6
	70:30	30,0	12,9
80:20	90:10	22,5	2,5
	80:20	20,0	5,0
	70:30	17,5	7,5
90:10	100:0	11,1	0,0
	90:10	10,0	1,1
	80:20	8,9	2,2
	70:30	7,8	3,3
	0:100	0,0	11,1

III) Microesferas de QS/AAS

Pesaram-se 60mg de AAS, as quais foram dissolvidas em 19,74g de ácido acético. Homogeneizou-se a solução por agitação magnética à temperatura ambiente. Adicionaram-se 0,2g de QS que se dissolveram sob agitação vigorosa. Após a dissolução total do QS deixou-se a solução em repouso para eliminar as bolhas de ar formadas.

2.4.3.2 Técnica Experimental

Produção das microesferas

1. A fase dispersa foi introduzida na seringa de 1 ml (B).
2. Colocou-se a seringa de 1ml na bomba infusora vertical.
3. Fez-se variar o caudal desta fase de acordo com a Tabela 2.7.
4. Na seringa de 5 ml (C) foi introduzido óleo de cozinha, o qual atuou como fase contínua.
5. Colocou-se a seringa de 5ml na bomba infusora horizontal.
6. Fez-se variar o caudal desta fase de acordo com a Tabela 2.7.
7. Numa tina preparou-se a fase coletora constituída por óleo de cozinha e GTA (25%) na razão volúmica 70:30 (óleo:GTA). Neste caso usaram-se 14ml de óleo e 6ml de GTA.
8. Colocou-se a tina com a mistura, previamente homogeneizada, no agitador orbital.
9. Iniciaram-se as bombas infusoras.
10. Visualizou-se a formação de pequenas gotículas na ponta da agulha da seringa vertical, e a sua deslocação por arrasto da fase contínua.

11. Deixou-se decorrer o processo até ser consumida toda a solução da fase dispersa (1ml).
12. Desligaram-se as bombas infusoras.
13. As gotículas formadas permaneceram a reticular. (Tempos de reticulação na tabela 2.7)

Tabela 2.7 – Parâmetros utilizados na produção das micropartículas.

Microesferas	Parâmetros				
	QS: Cerâmicos	HAp:β-TCP	Caudal da Fase Contínua ml/h	Caudal da Fase Dispersa ml/h	Tempo de reticulação
I) QS	-	-	4,5	0,1	24h
II) QS/Cerâmicos	60:40	100:0	4,5	0,1	48h
		70:30			
		80:20			
		90:10			
		0:100			
	70:30	70:30	4,5	0,1	48h
		80:20			
		90:10			
	80:20	70:30	4,0	0,08	24h
		80:20			
		90:10			
	90:10	100:0	4,5	0,1	72h
70:30					
80:20					
90:10					
0:100					
III) QS/AAS	-	-	4,5	0,1	24h

Lavagem e Secagem das microesferas

As microesferas obtidas, após reticulação, foram lavadas e secas de acordo com o seguinte protocolo:

1. Filtraram-se as esferas sob vácuo com o intuito de as separar do óleo vegetal.
2. Lavaram-se as esferas com metanol de forma a remover o óleo vegetal e o excesso de GTA que não reagiu no processo de reticulação.
3. Secaram-se as esferas à temperatura ambiente sob vácuo até se verificar peso constante.
4. Lavaram-se as esferas com PBS (*phosphate buffered solution*) 1X para garantir o seu carácter neutro.

2.5 Caracterização das microesferas

2.5.1 Análise Morfológica

As microesferas produzidas foram caracterizadas morfológicamente por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varrimento (SEM – *scanning electronic microscopy*).

2.5.1.1 Microscopia ótica (MO)

A microscopia ótica permite obter imagens ampliadas numa representação 2D das estruturas observadas através de sistemas de lentes convergentes (ocular e objetiva).

As microesferas foram observadas no microscópio ótico *Nikon Eclipse Tapon LV100* cedido pelo CEFITEC. Foi usada a mesma ampliação em todas as visualizações, 10x.

2.5.1.2 Microscopia de varrimento eletrônico – SEM

As imagens de SEM são obtidas através do sinal gerado pela detecção de elétrons secundários resultantes da colisão de um feixe de elétrons incidente com a amostra em análise. O feixe de elétrons incidente provém de um filamento de tungstênio aquecido, que quando acelerado é projetado sobre a amostra.

A análise foi efetuada no microscópio *Zeiss DSM-962* disponibilizado pelo CENIMAT/I3N.

As amostras foram fixadas num disco metálico com fita-cola dupla face de carbono, devidamente espaçadas. Estabeleceu-se um contacto elétrico entre as amostras e o disco metálico. As amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro-paládio de forma a melhorar o contraste da imagem.

2.5.2 Grau de inchamento (*Swelling*)

Determinou-se o grau de inchamento das esferas de QS (reticuladas com GTA durante 24h).

O grau de inchamento foi determinado segundo o seguinte procedimento:

1. Colocou-se a mesma massa conhecida de microesferas de QS ($m_0=10\text{mg}$) em vários gobelés.
2. A cada gobelé adicionaram-se 5ml de água ultrapura (pH 7).
3. As microesferas permaneceram em água durante os intervalos de tempo apresentados na tabela 2.8.

Tabela 2.8 – Tempo de permanência das microesferas de QS em água ultrapura para a determinação do grau de inchamento das mesmas.

Gobelé	Tempo (t)
1	5 minutos
2	15 minutos
3	30 minutos
4	1 hora
5	2 horas
6	4 horas
7	6 horas
8	24 horas
9	48 horas

4. No final de cada intervalo de tempo, filtraram-se as microesferas e foi removido o excesso de água da sua superfície. Foi registada a massa das microesferas inchadas em cada tempo t (m_t).
5. O grau de inchamento/swelling foi determinado pela equação 4,

$$GI(\%) = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

2.5.3 Eficiência de encapsulamento

Para determinar a eficiência de encapsulamento (EE) é necessário extrair e quantificar o fármaco incorporado nas microesferas de QS. A quantificação do fármaco no presente trabalho foi efetuada através de espectroscopia UV-Visível (descrita em 2.5.5).

O procedimento ideal para extrair o fármaco incorporado seria (I) dissolver as esferas num solvente no qual o fármaco não fosse solúvel ou (II) utilizar um solvente com o qual o fármaco tivesse uma elevada afinidade e no qual o polímero não fosse solúvel.

Colocou-se a hipótese de dissolver as microesferas numa solução ácida (ácido acético). A afinidade do AAS com a água levaria à solubilização quer do polímero, quer do fármaco. Nesta situação, a quantificação do fármaco seria difícil uma vez que os comprimentos de onda de absorção UV-visível do QS e do AAS são próximos e podem tornar-se coincidentes ($\lambda_{cS}=230-250\text{nm}$ e $\lambda_{cS}=296\text{nm}$).

Assim, foi efetuado um estudo em paralelo onde se determinou a EE de microesferas de PCL nas quais foi incorporado o mesmo fármaco. Obviamente, este procedimento introduz erros já que o fármaco irá interagir com o quitosano, por pontes de hidrogénio^[37], o que não acontece com o PCL. Contudo, a quantidade de AAS encapsulada deverá ser mais influenciada pelo tamanho das microesferas e pela razão polímero:fármaco. O tamanho das microesferas é determinado, fundamentalmente, pelas condições usadas no processo de microfluídica e não pelo polímero usado.

A produção das microesferas de PCL, tal como as de QS, baseou-se no trabalho de Sung-Wook Choi *et al*^[36]. A montagem e o procedimento experimental foram os mesmos, como fase dispersa foi utilizada uma solução de 5% de policaprolactona (PCL) em diclorometano e como fase contínua (e coletora) foi utilizada uma solução aquosa de 2% de polivinil álcool (PVA). O PCL é um polímero biocompatível e biodegradável mas ao contrário do QS é sintético e hidrofóbico. O PVA atuou como surfactante neste processo e as microesferas solidificaram devido à evaporação e extração do solvente (uma noite).

Manteve-se o caudal da fase dispersa fixo (3ml/h) e fez-se variar o caudal da fase contínua (12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 e 54ml/h) de forma a obter e escolher as microesferas de tamanho semelhante às de QS. Produziram-se microesferas de PCL/AAS com a mesma proporção polímero:fármaco (10:3) das microesferas de QS a fim de se efetuar uma possível comparação em termos de EE.

O processo de extração do fármaco das microesferas de PCL obtidas foi o seguinte:

1. Dissolveram-se 20mg de esferas em 10ml de diclorometano.
2. Removeu-se o diclorometano por evaporação (ponto de ebulição de 40°C).
3. Adicionaram-se 5ml de água destilada ao precipitado obtido e deixou-se em agitação durante uma hora.
4. Repetiu-se o procedimento para 5 amostras de esferas com a mesma massa.

A solução aquosa de AAS formada foi analisada por espectroscopia UV-visível (*T90+ UV/Vis Spectrometer – PG Instruments Ltd*).

2.5.4 Libertação do fármaco

2.5.4.1 Obtenção de amostras de libertação ao longo do tempo

A libertação do AAS a partir das microesferas de QS foi estudada segundo o seguinte procedimento:

1. Numa tina, foram colocadas 50mg de microesferas de QS/AAS.
2. Adicionaram-se 150ml de uma solução de SBF (*Simulated Body Fluid*) previamente preparada. Este instante de tempo foi designado como t_0 (0min decorridos após a adição da solução de SBF).
3. Decorridos 30 minutos (t_1), agitou-se manualmente o meio e pipetou-se uma amostra de 2,5ml evitando incluir microesferas.
4. A amostra foi imediatamente analisada por espectroscopia UV-visível (*T90+ UV/Vis Spectrometer – PG Instruments Ltd*).
5. Voltou a colocar-se a amostra na tina, mantendo o volume inicial constante até à medição seguinte.

6. As medições restantes seguiram o mesmo processo e efetuaram-se de hora a hora durante as primeiras 6h e diariamente até 18 dias após t_0 .

2.5.5 Quantificação do fármaco – Espectroscopia UV-Visível

O procedimento baseia-se na capacidade que determinadas substâncias têm para absorver radiação. A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso nas regiões UV, visível e IV do espectro eletromagnético. E é dada por,

$$A = \log \frac{I_0}{I} = ebc \quad \text{Equação 5}$$

Onde A é a absorvância, I_0 a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra, I a intensidade da radiação que emerge da amostra, e o coeficiente de absorção molar característica da espécie absorvente, b a distancia percorrida pelo feixe através da amostra e c a concentração da amostra. A lei deixa de ser válida para concentrações elevadas.

A relação linear entre a concentração e a absorvância é a base do uso da espectroscopia para determinar a concentração de substâncias em química analítica. Através de amostras padrão, amostras de concentrações conhecidas de uma substancia (AAS por exemplo), é possível determinar a absorvância de cada uma delas e deduzir a relação linear entre a absorvância e a concentração. Essa relação permite, efetuar o processo inverso: determinação de concentrações desconhecidas de amostras através da leitura da absorvância e aplicando a relação linear determinada anteriormente.

2.5.5.1 Reta de Calibração

A. Preparação das soluções padrão

A.1. Para o estudo de EE:

Preparou-se uma solução de AAS em água destilada de 250 μ g/ml, dissolvendo 12,5mg de AAS em 50ml de água destilada. A partir desta solução preparam-se soluções de 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25 e 5 μ g/ml por diluição.

A.2. Para o estudo de libertação do fármaco:

Preparou-se uma solução de AAS em SBF de 50 μ g/ml, dissolvendo 2500 μ g de AAS em 50ml de SBF. A partir desta solução preparam-se soluções de 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 e 5 μ g/ml por diluição.

B. Determinação da absorvância das soluções padrão

B.1. Para o estudo de EE:

Numa *cuvette* de quartzo colocaram-se 2,5ml de água destilada, colocou-se a *cuvette* no suporte do espectrofotômetro e definiu-se a *baseline*. Retirou-se a água destilada da *cuvette* e colocaram-se 2,5ml da solução padrão menos concentrada (5µg/ml) e obteve-se o espectro de absorvância para comprimentos de onda entre 250 e 400nm. Repetiu-se o processo para as restantes concentrações.

B.2. Para o estudo de libertação:

Numa *cuvette* de quartzo colocaram-se 2,5ml de solução de SBF, colocou-se a *cuvette* no suporte no espectrofotômetro e definiu-se a *baseline*. Removeu-se a solução e colocaram-se 2,5ml da solução padrão menos concentrada (5µg/ml) e obteve-se o espectro de absorvância para comprimentos de onda entre 250 e 400nm. Repetiu-se o processo para as restantes concentrações.

2.5.5.2 Determinação da absorvância das amostras obtidas nos estudos de EE e de libertação do fármaco

O procedimento foi o mesmo que se efetuou para a determinação da absorvância das soluções padrão.

Para o estudo de EE utilizaram-se as 5 amostras obtidas em 2.5.3. Obtiveram-se os espectros de absorvância para um varrimento de 250-400nm, utilizando para *baseline* água destilada.

Para o estudo de libertação do fármaco utilizaram-se as amostras recolhidas nos vários instantes de libertação. Obtiveram-se os espectros de absorvância para um varrimento de 250-400nm, utilizando para *baseline* a solução de SBF.

3 Apresentação e Discussão de Resultados

3.1 Caracterização dos pós de HAp e β -TCP

O processo de sinterização conduziu à formação de pós e agregados sólidos de HAp e β -TCP. Seguidamente são apresentados os resultados da análise DRX, FTIR e TEM.

3.1.1 Difração de raios-X (DRX)

As amostras de HAp e β -TCP preparadas pelo método sol-gel foram analisadas por DRX de forma a identificar as fases cristalinas presentes na sua estrutura. As posições dos picos (segundo 2θ) e as suas intensidades relativas permitiram a identificação das fases presentes por comparação com as Fichas JCPDS (JCPDS: #09-0432, #09-0169 e #37-1497).

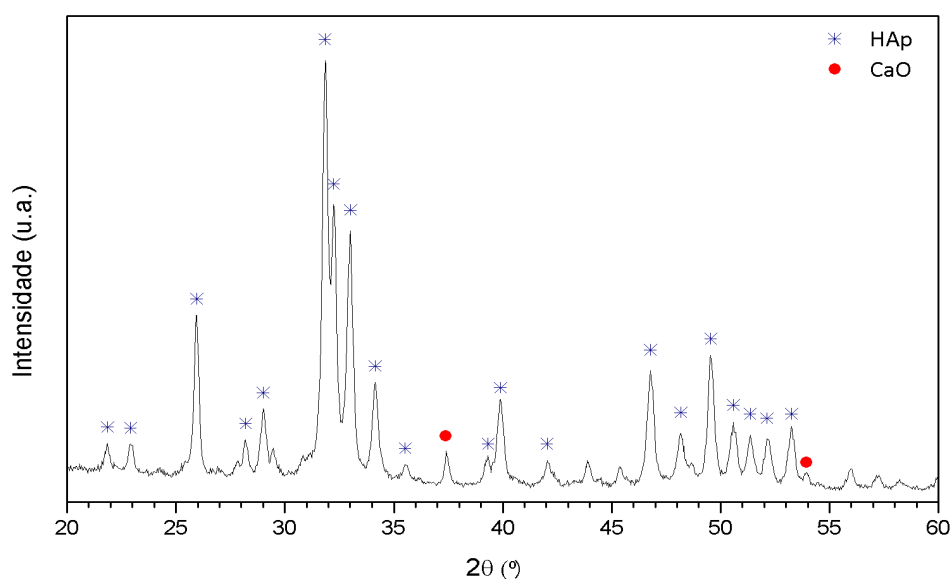
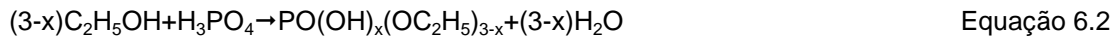
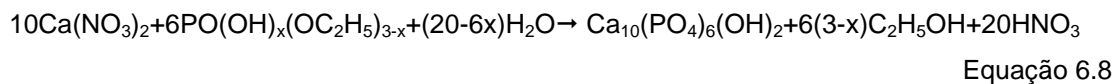


Figura 3.1 - Difratograma da amostra de HAp obtida pelo método sol-gel.

No difratograma da amostra de HAp houve uma boa correspondência em termos de intensidade e posição dos picos de difração relativamente à informação descrita da ficha da HAp (JCPDS #09-0432). Os picos mais intensos foram facilmente identificados ($2\theta=31,84^\circ$; $32,24^\circ$; $33,01^\circ$; $25,95^\circ$). Contudo, observou-se um pico de intensidade considerável em $2\theta=37,39^\circ$ que não correspondeu ao padrão da HAp. Este pico é característico da espécie CaO (óxido de cálcio – JCPDS #37-1497). A presença de CaO numa amostra de HAp pode resultar da reação entre os precursores utilizados no processo de síntese e/ou da decomposição da HAp.^{[17],[33]} O mecanismo reacional de síntese da HAp de onde o CaO pode surgir como subproduto é o seguinte^[33]:



Para temperaturas acima de 200°C ,



Segundo a maioria da literatura a HAp decompõe-se em CaO e β -TCP para temperaturas superiores ou iguais a 800°C .^[17] Neste trabalho foi utilizada uma temperatura de sinterização de 700°C para obter HAp pura porém, a presença de CaO na amostra obtida sugere que a decomposição na realidade se inicia a temperaturas mais baixas (a partir dos 600°C ^[38]).

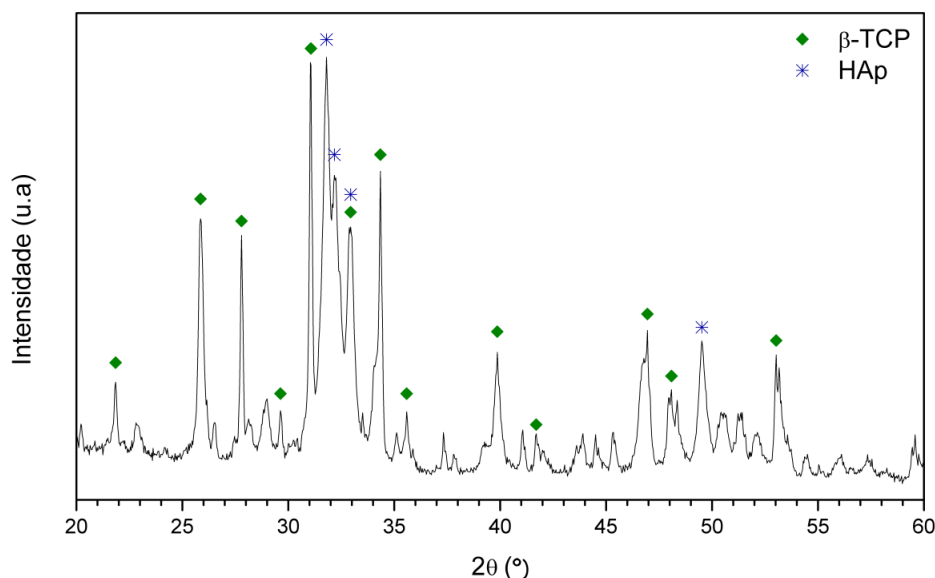
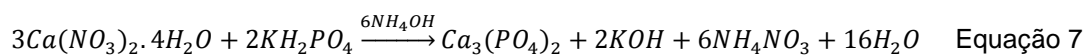


Figura 3.2 - Difratoograma da amostra de β -TCP obtida pelo método sol-gel.

No difratograma da amostra de β -TCP foram identificados picos os principais picos de difração do β -TCP em concordância com a ficha (JCPDS #09-0169). O pico de maior intensidade em $2\theta=31,04^\circ$ é extremamente bem definido e indica uma elevada cristalinidade. Foram também identificados picos de difração correspondentes a fases cristalinas da HAp, nomeadamente o pico de maior intensidade em $2\theta=31,81^\circ$. Isto revela que o β -TCP obtido não é totalmente puro. A reação que descreve a formação de β -TCP é expressa pela seguinte expressão^[14]:



As semelhanças dos difratogramas obtidos e a presença de picos de difração de ambos os compostos devem-se à sua semelhança estrutural e ao facto da razão Ca/P que os distingue ser bastante próxima.

Os picos de difração bem definidos e estreitos em ambos os difratogramas indicam uma elevada cristalinidade dos produtos obtidos.

O tamanho médio da cristalite (T_c) foi determinado através da equação de Scherrer^[14]:

$$T_c = \frac{0,89\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad \text{Equação 8}$$

Onde λ é o comprimento de onda ($Cu K\alpha$), β é a largura do pico de difração de maior intensidade (a meia altura) e θ o ângulo de difração correspondente ao pico de maior intensidade.

Tabela 3.1 – Tamanho da cristalite dos pós de HAp e β -TCP.

	Tc (nm)	Literatura
HAp	35,33nm	35nm ^[38]
β -TCP	85,3nm	83 \pm 6nm ^[14]

Os resultados obtidos de tamanho de cristalite dos pós de HAp e β -TCP foram concordantes com os observados na literatura (Tabela 3.1).

3.1.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise FTIR teve como objetivo fundamental identificar os grupos funcionais característicos da HAp e do β -TCP.

O espectro de FTIR das amostras de HAp e β -TCP encontram-se apresentados nas figuras 3.3 e 3.4, respetivamente, e os modos de vibração estão identificados na tabela 3.2.

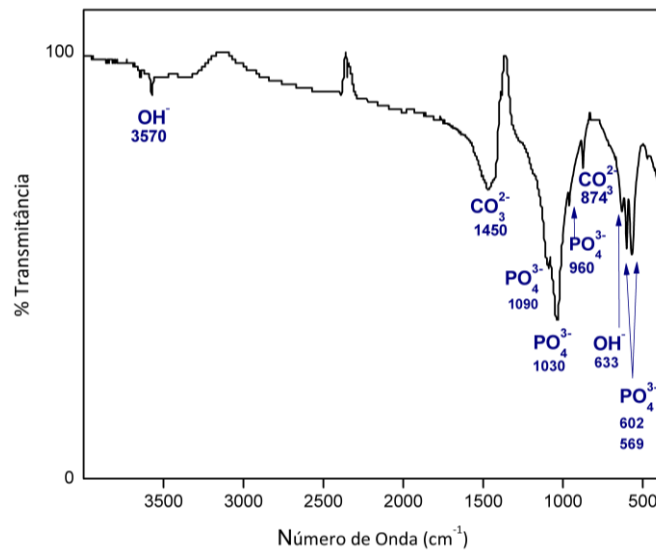


Figura 3.3 – Espectro FTIR da amostra de HAp.

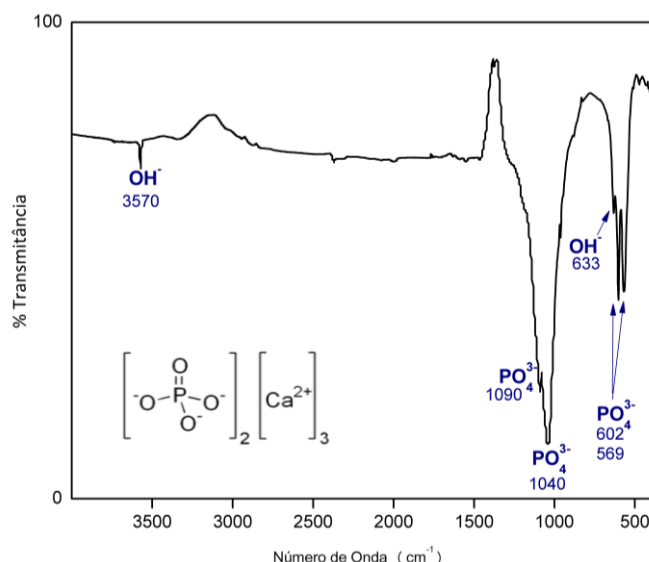


Figura 3.4 – Espectro FTIR da amostra de β -TCP.

Tabela 3.2 – Modos de vibração identificados para a amostra de HAp.

Número de onda (cm^{-1})		Grupos funcionais
HAp	β -TCP	
569	569	PO_4^{3-} - deformação angular.
602	602	PO_4^{3-} - deformação angular.
633	633	OH^- - deformação angular.
874	-	CO_3^{2-} - sugere a carbonatação da HAp.
960	-	PO_4^{3-} - deformação simétrica.
1030	1040	PO_4^{3-} - deformação assimétrica.
1090	1090	PO_4^{3-} - deformação assimétrica.
1450	-	CO_3^{2-} - sugere a carbonatação da HAp.
3570	3570	OH^- - deformação simétrica.

O espectro de FTIR da figura 3.3 apresenta todos os picos de absorção característicos da HAp. A banda ampla localizada entre cerca de 1000cm^{-1} e 1100cm^{-1} é uma característica da estrutura apatítica e o pico mais intenso de entre os modos de vibração do grupo fosfato identificado na região $1100\text{-}950\text{cm}^{-1}$. Nesta região as bandas (1090 e 1030cm^{-1}) estão associadas à deformação axial antissimétrica das ligações P–O (tripla degeneração)^[14]. A banda $955\text{-}965\text{cm}^{-1}$ corresponde à deformação axial simétrica e os picos 569cm^{-1} e 602cm^{-1} correspondem a deformações angulares dos iões PO_4^{3-} . A banda a 3570cm^{-1} pertence à deformação axial dos grupos OH. No espectro surgem ainda os modos de vibração de iões carbonato (874 e 1450cm^{-1}) que sugerem que a amostra de HAp seja carbonata. Seria de esperar que surgissem bandas características das ligações Ca–O (427 e 533cm^{-1}) uma vez que esta espécie foi identificada na análise DRX. Um pico ténue é identificado a 474cm^{-1} poderá ser atribuído ao CaO.^{[14],[16], [39]}

O espectro de FTIR do β -TCP (figura 3.4) é muito semelhante ao da hidroxiapatite contudo não apresenta as bandas correspondentes aos íons carbonato. O ar atmosférico é uma fonte primária de íons CO_3^{2-} , que no caso da HAp substituem o íon PO_4^{3-} . A sua presença não se verifica na amostra de β -TCP. Porém, uma vez que os carbonatos são constituintes das estruturas ósseas a sua presença pode melhorar a bioatividade dos substitutos ósseos produzidos em vez de ser um motivo de alarme.^[14] A presença de bandas atribuídas aos grupos OH no espectro do β -TCP revela a presença de HAp na sua composição como já tinha sido evidenciado nos resultados de DRX.

3.1.3 Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM)

Os pós de HAp e β -TCP foram caracterizados morfologicamente por TEM (figuras 3.5 e 3.6 respetivamente). A dimensão dos pós foi determinada com recurso ao *software ImageJ*.

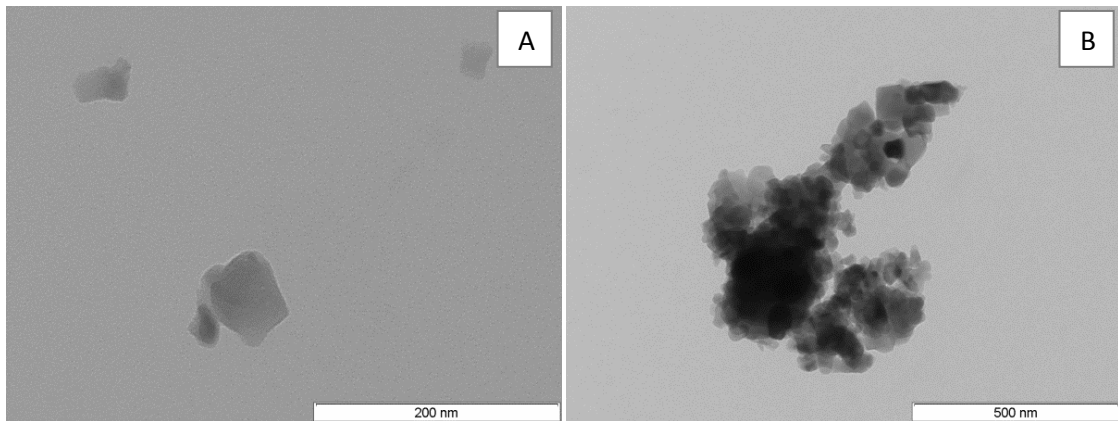


Figura 3.5 – Imagem de TEM dos pós de HAp. (A) Morfologia e tamanho, (B) Aglomeração dos pós.

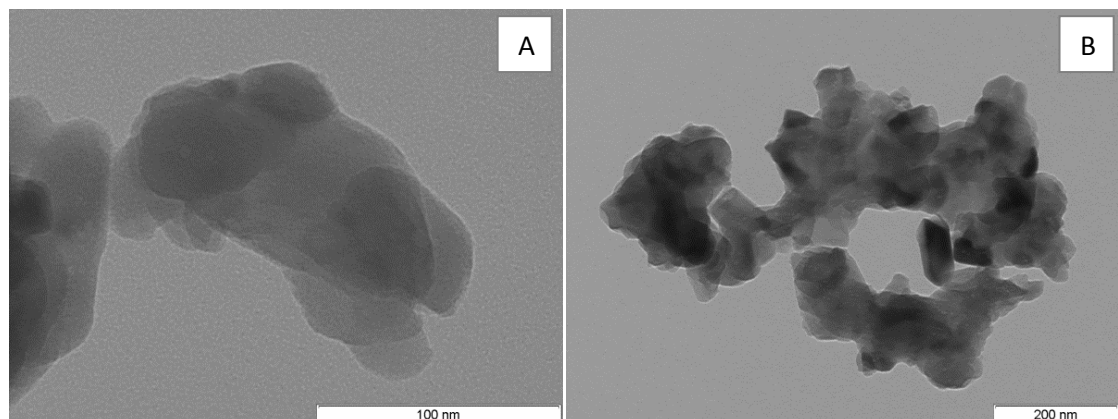


Figura 3.6 – Imagem de TEM dos pós de β -TCP. (A) Morfologia e tamanho, (B) Aglomeração dos pós

Os pós de HAp apresentaram uma morfologia nanométrica semelhante a elipses. Os pós não apresentaram uma boa dispersão e observou-se a formação de agregados. Segundo o descrito na literatura o tempo de envelhecimento influencia o tamanho dos pós, contribui para o seu crescimento e para a formação de aglomerados.^[17] Para um tempo de envelhecimento de 48h obtiveram-se grãos de HAp de diâmetro menor do que 70nm, ligeiramente acima do descrito na literatura (15-25nm^[17], 30nm^[38]).

Os pós de β -TCP apresentaram uma forma esferoidal (alongada numa direção não vertical) e também se formaram aglomerados. Segundo a literatura^[14], com a diminuição da razão Ca/P ocorre um aumento dos parâmetros de rede na direção dos eixos-a e uma redução na direção dos eixos-c. A aglomeração das partículas deve-se à sua natureza nanométrica (grande área superficial e energia). A temperatura (de sinterização) é um fator importante no crescimento das partículas e formação de aglomerados. O mecanismo de nucleação-agregação-aglomeração descreve em simples etapas o que acontece com as partículas de β -TCP: (I) nucleação e crescimento para formar as nanocristalites, (II) agregação dos nanocristais devido a atrações moleculares de diferentes forças nanométricas/coloidais que causam uma minimização da energia de superfície livre, (III) crescimento adicional dos cristais e formação de aglomerados.^[14] Os grãos de β -TCP apresentaram um diâmetro menor do que 70nm o que corresponde ao observado na literatura^[14] e os aglomerados formados não ultrapassam os 300nm.

3.2 Parametrização da produção de esferas

A produção de microesferas através da microfluídica requer o ajuste de vários parâmetros como foi referido no capítulo introdutório deste trabalho. O primeiro objetivo na produção de esferas foi a determinação de parâmetros que permitissem obter micropartículas de forma esférica. A forma das micropartículas depende das características das fases, dos parâmetros inerentes ao processo e neste caso da reticulação.

A concentração da solução polimérica (fase dispersa) foi mantida constante, bem como a viscosidade da fase contínua (óleo de cozinha). Variou-se o caudal da fase dispersa, o caudal da fase contínua, o diâmetro da agulha da fase dispersa, a percentagem de reticulante e o tempo de reticulação.

Foram obtidas imagens por microscopia ótica das microesferas que permitiram avaliar a dimensão das esferas através do *software ImageJ*.

3.2.1 Caudal da fase contínua

A avaliação do efeito da variação do caudal da fase contínua fez-se mantendo constante o caudal da fase dispersa (0,1ml/h), o diâmetro da agulha (23G equivalente a um diâmetro interno de 0,33mm), a quantidade de reticulante na fase coletora (6ml de 25%GTA em 20ml) e 24h de reticulação.

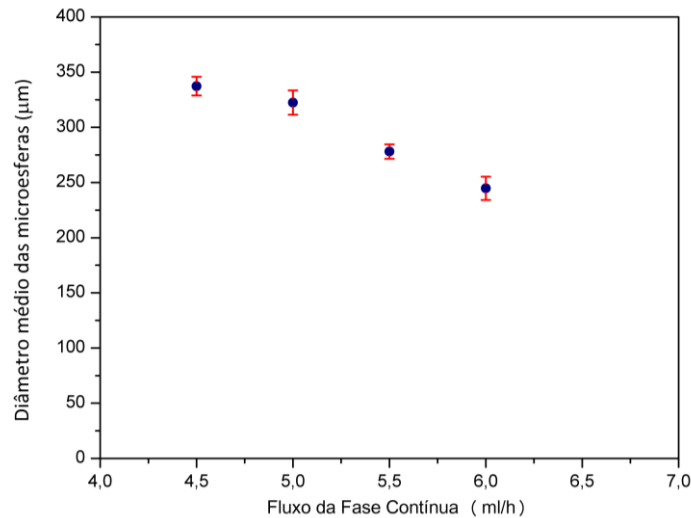


Figura 3.7 – Efeito da variação do caudal da fase contínua no diâmetro das esferas produzidas.

Pela análise do gráfico da figura 3.7, verificou-se um decréscimo do tamanho médio das esferas formadas com o aumento do fluxo da fase contínua, tal como verificado na literatura^[36]. Para valores crescentes da velocidade da fase contínua, a força que atua sobre a gotícula em formação na ponta da agulha aumenta e provoca a sua separação quando menor quantidade de solução de QS se acumulava. Para um caudal de 6,5ml/h da fase contínua verificou-se uma grande dispersão nos tamanhos das esferas e o resultado não foi contabilizado no gráfico apresentado nem para valores acima do mesmo.

3.2.2 Caudal da fase dispersa

A avaliação do efeito da variação do caudal da fase dispersa fez-se mantendo constante o caudal da fase contínua (4,5ml/h), o diâmetro da agulha (23G equivalente a um diâmetro interno de 0,33mm), a quantidade de reticulante na fase coletora (6ml de 25%GTA em 20ml) e 24h de reticulação.

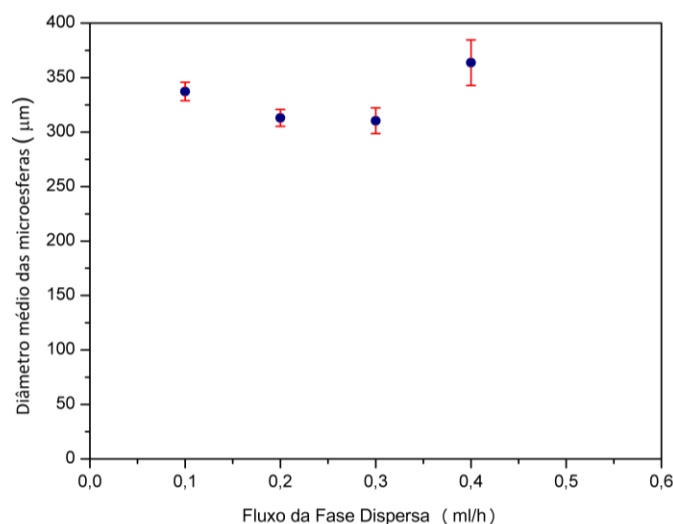


Figura 3.8 - Efeito da variação do caudal da fase dispersa no diâmetro das esferas produzidas.

Mediante os resultados apresentados no gráfico da figura 3.8 não foi possível descrever o efeito da variação do caudal da fase dispersa no diâmetro das esferas produzidas. Seria de esperar um aumento gradual do diâmetro das microesferas com o aumento do fluxo da fase dispersa. A força que atuou sobre a gotícula em formação para as três primeiras condições apresentadas (0,1; 0,2 e 0,3ml/h) não foi significativa e o tamanho das partículas praticamente não foi afetado. Para o fluxo de 0,4ml/h o diâmetro médio das partículas aumentou, contrariando a aparente tendência das restantes condições e a dispersão de tamanhos aumentou para cerca do dobro.

Pelos resultados apresentados os fluxos de fase contínua e dispersa que garantem a formação de micropartículas perfeitamente esféricas e que foram usados nas etapas seguintes deste trabalho foram de 4,5ml/h e 0,1ml/h respetivamente.

3.2.3 Percentagem de Reticulante e Tempo de reticulação

Uma das maiores dificuldades no processo de produção das microesferas de QS foi a determinação experimental da percentagem de reticulante a usar e respetivo tempo de reticulação.

Na tabela 3.3 estão apresentados alguns procedimentos de reticulação de microesferas de QS com GTA descritos na literatura. Em cada trabalho foram usadas concentrações e tempos de reticulação próprios dependentes dos materiais utilizados como fase contínua.

Tabela 3.39 – Processos de reticulação de esferas de QS descritos na literatura.

Literatura	%GTA e tempo de reticulação
I. Genta <i>et al</i> ^[40]	GTA saturado em tolueno Concentrações: 5, 7, 10, 15, 25%(v/v) Volume: 15ml Tempo de reticulação: 1h a 38°C Fase contínua: 225ml óleo de girassol com 2% Span 80 (emulsificante) Razão fase interna/externa constante: 1/1.5 (v/v) Concentração QS: 1, 2, 3%
K.C.Gupta <i>et al</i> ^[26]	GTA Concentração: 2-12%(p/p) Tempo de reticulação: 6h a 25°C Fase contínua: 250ml solução metanólica de NaOH (0,1M), 30 minutos; lavadas com água destilada; reticulação com GTA numa solução de pH neutro Concentração QS: 2%(p/p)
K.C.Gupta <i>et al</i> ^[41]	Coacervação Concentração: 6%(p/p) Tempo reticulação: 6h Fase contínua: 100ml solução metanólica de NaOH (1M) Concentração QS: 2,5%(p/p)
S.R.Jameela <i>et al</i> ^[42]	GTA saturado em tolueno Concentração: Volume: 1,6ml durante 5minutos, após 15minutos mais 1,6ml durante, após 30 minutos mais 0,8ml. 1,5h (para uma massa de solução de QS de 6g) Fase contínua: mistura de parafina líquida e éter de petróleo Concentração QS: 4%(p/p)
S.G.Kumbar <i>et al</i> ^[28]	GTA Concentração: 8, 16,32% em relação à massa seca de QS, Tempo de reticulação: 4h Fase contínua: mistura de parafina líquida e 1% solução Tween 80 (estabilizador) Concentração QS: 7%(p/p)
I.Y.Kimura <i>et al</i> ^[43]	GTA Precipitação Concentração: 2,5%(m/v) Tempo de reticulação: 24h Volume GTA/massa de microesferas: 1,5ml/1g Fase contínua: solução de NaOH 2M; lavagem com água destilada; reticulação com GTA Concentração QS: 2,5%(p/p)

Como se pode constatar, não está estabelecida uma relação entre a concentração de polímero e reticulante e o tempo de reticulação está dependente da aplicação. Nos processos descritos formaram-se emulsões por ação mecânica e que estão sujeitas a agitações fortes que permitem uma distribuição eficaz do reticulante sob a amostra a reticular. No presente trabalho as esferas produzidas por microfluídica não podem ser sujeitas a uma forte agitação magnética, permanecendo apenas sujeitas a um ténue movimento orbital. Aparentemente, todas as gotículas formadas apresentam uma forma esférica quando produzidas, contudo após o processo de lavagem as microesferas tendem a perder a forma se não se encontrarem efetivamente reticuladas. A quantidade de GTA na fase coletora, necessária para reticular uma massa de esferas obtida a partir de 1ml da solução de QS foi estudada. Estabeleceram-se

várias proporções de 25%GTA na mistura constituinte da fase coletora (100%, 50%, 40%, 30%, 25%). Na figura 3.9 está representada a evolução do estudo efetuado para um tempo de reticulação de 24h. O tempo de reticulação foi também estudado fazendo variar a permanência das esferas na fase coletora durante vários períodos de tempo (1h, 3h, 6h, 9h, 12h e 24h). Na figura 3.10 está representada a evolução do estudo efetuado para uma mistura da fase coletora com 30% de solução de 25%GTA.

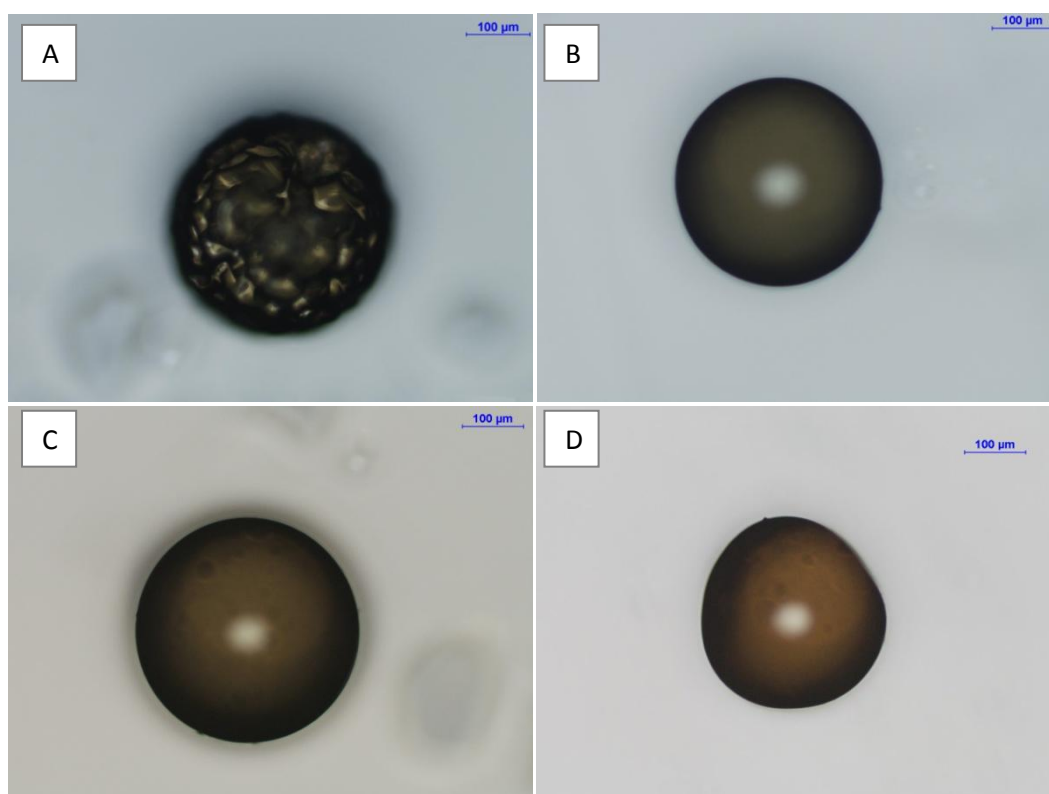
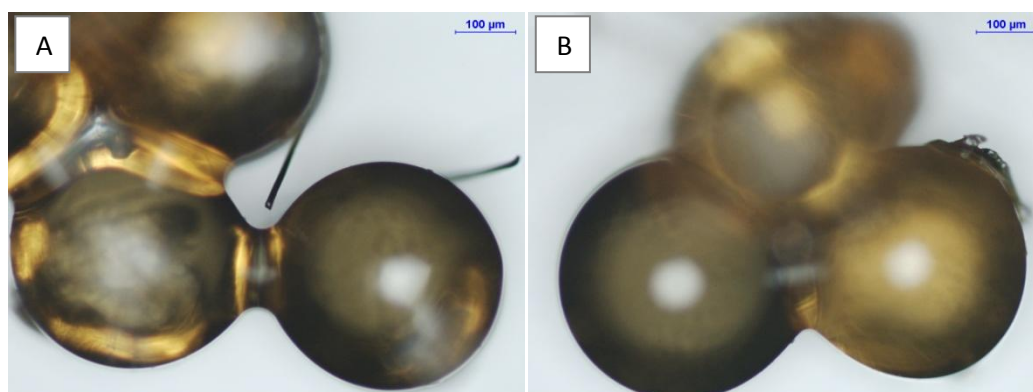


Figura 3.9 – Imagens de microsferas de QS obtidas para diferentes proporções óleo:25%GTA da fase coletora. (A) 0:100; (B) 60:40; (C) 70:30; (D) 75:25. Fluxos de fase contínua e dispersa de 4,5 e 0,1ml/h (1ml de solução de QS) e 24h de reticulação.



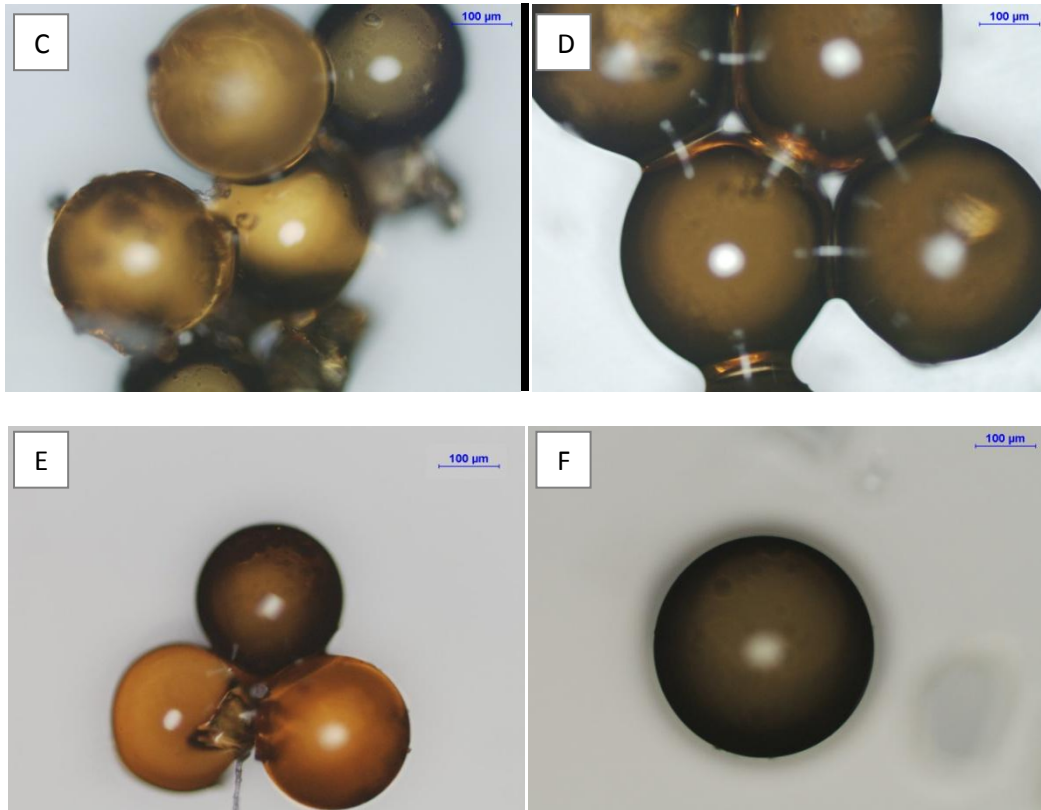


Figura 3.10 – Imagens de microesferas de QS para vários períodos de reticulação. (A) 1h; (B) 3h; (C) 6h; (D) 9h; (E) 12h; (F) 24h. Fluxos de fase contínua e dispersa de 4,5 e 0,1ml/h (1ml de solução de QS), fase coletora 70:30 (óleo:25%GTA).

O melhor resultado foi obtido para uma fase coletora constituída por uma mistura óleo/GTA numa proporção de 70/30 durante 24h, como se pode observar pelas imagens das figuras 3.9 e 3.10. Estas condições foram aplicadas nas etapas seguintes deste trabalho.

3.3 Análise morfológica das microesferas

3.3.1 Microesferas de quitosano

Segundo os parâmetros determinados foram obtidas micropartículas de QS perfeitamente esféricas de diâmetro médio ($337,27 \pm 10,09$) μm pelo método microfluídico usado. As microesferas apresentaram uma estrutura densa e uma superfície lisa como se pode observar pelas imagens de MO e SEM apresentadas (figuras 3.11 e 3.12). A densa estrutura indica um elevado grau de reticulação. No entanto, segundo descrito na literatura a reticulação de microesferas de QS com GTA gera microesferas com superfícies rugosas.^[44] Neste trabalho tal facto verificou-se apenas na situação em que o GTA foi o único constituinte da fase coletora

(figura 18A). Uma forma de reduzir a rugosidade superficial das esferas, caso existisse, seria a utilização de uma solução GTA saturada em tolueno.^[44]

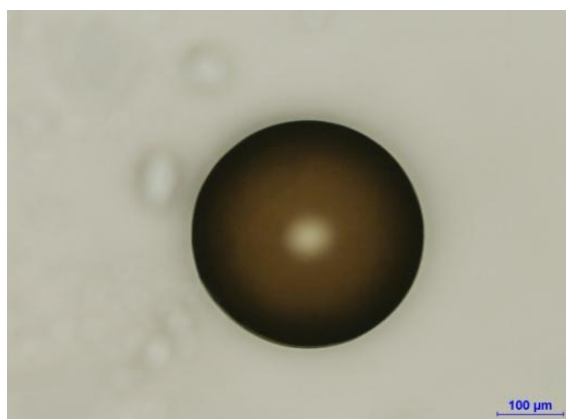


Figura 3.11 – Imagem de MO de uma microesfera de QS obtida nas condições descritas na Tabela 7. Ampliação 10x.

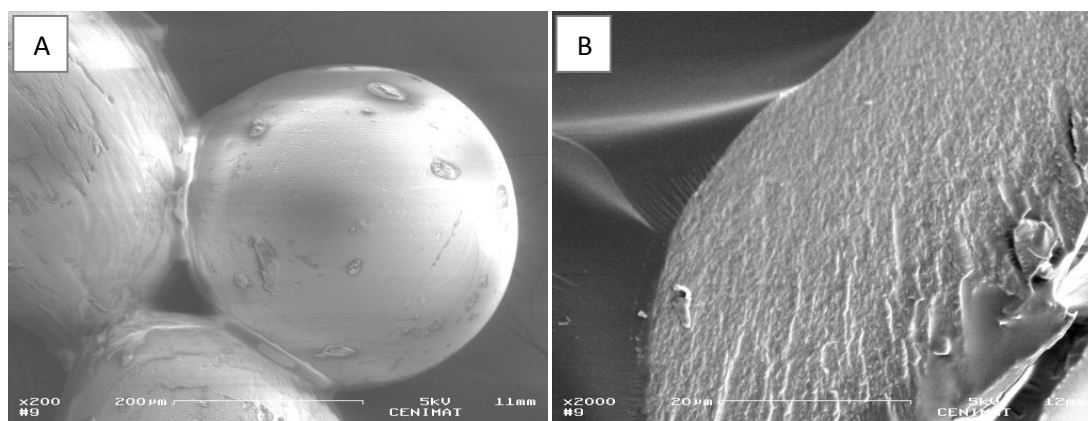


Figura 3.12 – Imagem de SEM de (A) microesfera de QS inteira, (B) microesfera de QS em corte.

3.3.2 Microesferas Compósitas de QS/Cerâmicos

As microesferas compósitas apresentaram uma morfologia idêntica às microesferas de QS (figura 3.13), contudo, nas imagens de SEM (figuras 3.14 e 3.15) visualizou-se alguma rugosidade na sua superfície associada à presença dos cerâmicos. Observou-se também uma distribuição não uniforme dos cerâmicos nestas microesferas e a formação de agregados cerâmicos. Os aglomerados cerâmicos já estavam presentes nos pós produzidos, portanto a sua presença nas microesferas não foi uma surpresa. Nas microesferas, os aglomerados formados apresentaram maiores dimensões, possivelmente devido à associação dos pós nanométricos de HAp e β -TCP. A distribuição indica uma ineficiente homogeneização das soluções QS/Cerâmicos. Tal como referido na literatura esta é uma das maiores dificuldades associadas à produção de dispersões na produção de microesferas. Desta forma, não foi

possível estabelecer uma relação entre a proporção de biocerâmicos incorporados e o diâmetro e morfologia das esferas produzidas.

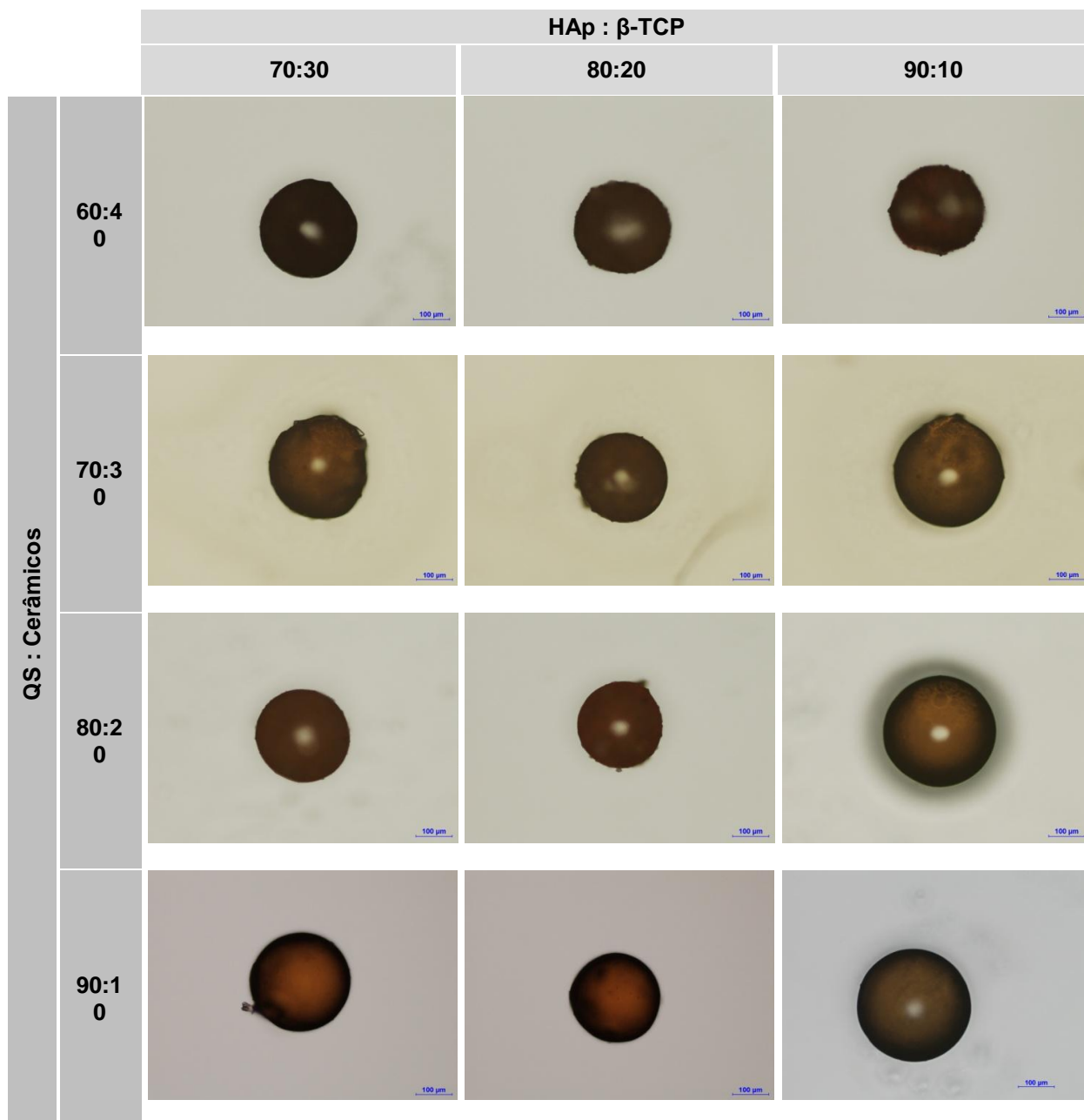


Figura 3.13 – Imagens de MO de microesferas compósitas de QS/cerâmicos.

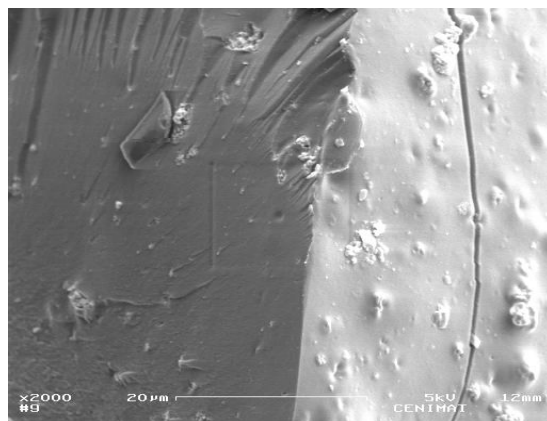


Figura 3.14 – Imagem de uma microesfera cuja composição (QS:cerâmicos) é de (80:20) e a proporção (HAp:β-TCP) é de (70:30).

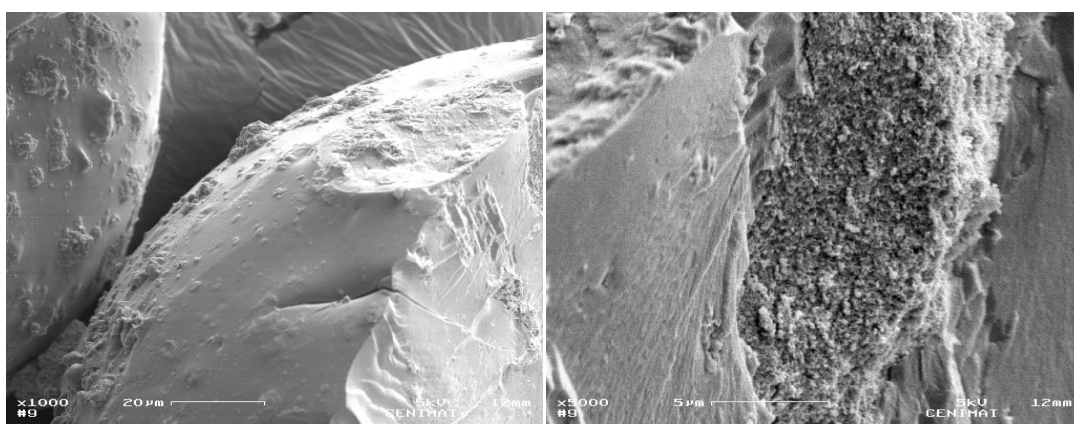


Figura 3.15 – Imagens de uma microesfera cuja composição (QS:cerâmicos) é de (80:20) e a proporção (HAp:β-TCP) é de (80:20).

3.3.3 Microesferas de QS/AAS

As microesferas de QS com incorporação de AAS exibiram exatamente as mesmas características das microesferas de QS. O encapsulamento do fármaco não afetou a dimensão das esferas nem as condições de produção (caudais e tempo de reticulação).

3.4 Grau de inchamento (Swelling)

O grau de inchamento das microesferas da QS reticuladas com 25%GTA foi avaliado e o resultado encontra-se apresentado na figura 3.16. As microesferas exibiram um grau de inchamento máximo de cerca de 300% num período de 24h. Até às 48h verificou-se um equilíbrio do inchamento máximo sem qualquer degradação ou dissolução da estrutura polimérica.

A hidrofobicidade e o grau de reticulação das microesferas produzidas controlam o grau de inchamento, o qual, por sua vez, irá controlar o perfil de libertação do fármaco. Um elevado grau de inchamento em microesferas reticuladas com GTA deve-se à sua baixa hidrofobicidade. O grau de inchamento está também relacionado com o GD do polímero. Em microesferas produzidas com QS de baixo GD, a disponibilidade de grupos amino para estabelecer ligações com o GTA é baixa e, conseqüentemente, o grau de reticulação é baixo. O que possibilita uma elevada absorção de água por parte da estrutura polimérica e conduz a um elevado grau de inchamento.

Noutros trabalhos descritos na literatura obtiveram-se graus de inchamento máximos para microesferas de QS de 290-150% para diferentes graus de reticulação (%GTA(p/p) 2-12%) em 40h.^[26]

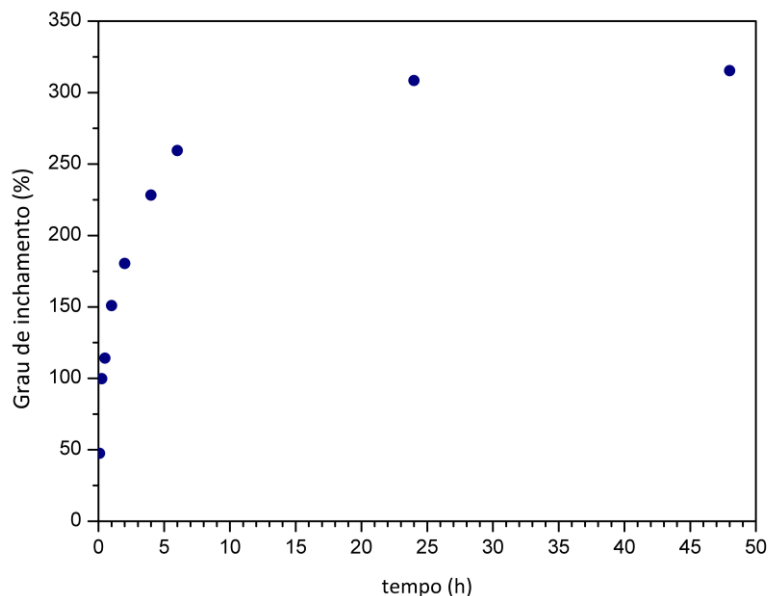


Figura 3.16 – Estudo do grau de inchamento das microesferas de QS reticuladas com GTA.

3.5 Eficiência de Encapsulamento

A eficiência de encapsulamento do AAS foi estudada em microesferas de PCL como já foi referido.

3.5.1 Produção das microesferas de PCL

Na figura 3.17 está representado o efeito da variação do fluxo da fase contínua (2%PVA) no diâmetro médio das esferas de PCL e PCL/AAS produzidas. Tal como para as microesferas de QS verificou-se um decréscimo do tamanho médio das esferas formadas com o aumento do fluxo da fase contínua devido ao aumento da força que atua sobre a gotícula em formação na ponta da agulha. Como se pode constatar pela análise dos gráficos da figura 3.17 os diâmetros médios das esferas de PCL e PCL/AAS possuem valores semelhantes para fluxos mais baixos da fase contínua. Para todas as condições de processamento obtiveram-se micropartículas esféricas. A condição de processamento que reuniu os fluxos 3,0ml/h e 12ml/h das fases dispersa e contínua respetivamente permitiu obter microesferas de PCL de diâmetro médio $(312,89 \pm 6,73) \mu\text{m}$ e microesferas de PCL/AAS de $(309,73 \pm 7,43) \mu\text{m}$ (Figura 3.18). Estas foram as condições utilizadas para a produção das amostras sob as quais foi determinada a EE uma vez que foram os diâmetros mais próximos dos das esferas de QS.

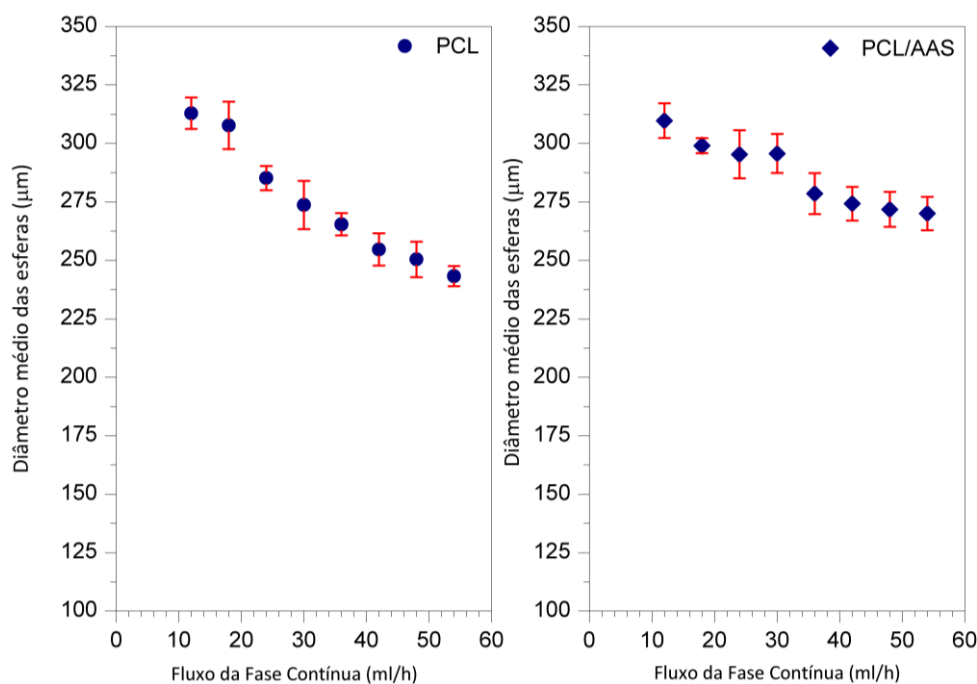


Figura 3.17 – Efeito do fluxo da fase contínua no diâmetro médio das esferas de PCL e PCL/AAS produzidas.

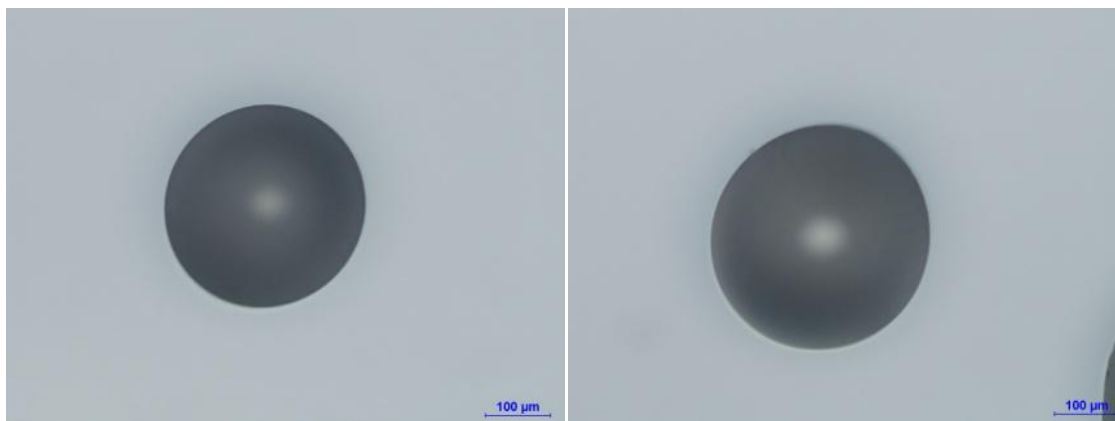


Figura 3.18 – Imagem de MO de microesferas de (A) PCL e (B) PCL/AAS para fluxos de 3,0ml/h e 12,0ml/h das fases dispersa e contínua respectivamente.

3.5.2 Extração do AAS e determinação da eficiência de encapsulamento

Para determinar a quantidade de fármaco em cada amostra de microesferas de PCL, após a sua dissolução em diclorometano e evaporação do solvente, procedeu-se à dissolução do AAS precipitado em água destilada. Cada solução aquosa resultante foi analisada por espectroscopia UV-visível e determinou-se a quantidade de AAS efetivamente encapsulado com base na média de cinco amostras de microesferas de PCL.

Obteve-se uma eficiência de encapsulamento de AAS em microesferas de 5%PCL de $(19,47 \pm 3,12)\%$.

É difícil prever se um resultado semelhante ocorreria no caso do encapsulamento das microesferas de QS. A eficiência de encapsulamento depende da razão polímero:fármaco a qual foi idêntica na formulação de ambos os tipos de esferas, contudo as soluções usadas como fase contínua e dispersa apresentaram concentrações e viscosidades completamente distintas. A concentração da solução de QS utilizada foi menor (1%) o que geralmente conduz a uma menor EE, porém a viscosidade da solução de 1%QS é bastante maior do que a da solução de 5%PCL o que impede que os cristais de fármaco escapem da esfera formada no processo de lavagem.^[44] Outros fatores como o peso molecular e a estrutura química dos polímeros também influenciam a EE. Contudo, tal como já foi referido, é de esperar que seja a razão polímero:fármaco e o tamanho das microesferas que mais influenciam a EE.

Microesferas de QS com cisplatina, agente antineoplásico, apresentaram um conteúdo de fármaco de cerca de 21%^[44]; S.R. Jameela et al.^[42] obtiveram uma EE de 28%-40% para microesferas de QS com mitoxandrona (agente antineoplásico) reticuladas com GTA saturado em tolueno; I.Genta et al.^[40] obtiveram valores de EE de 9,26-12,50% para microesferas de QS com teofilina (antiasmático) com diferentes graus de reticulação; W. Ajun et al.^[37] obtiveram

uma EE de AAS na ordem dos 60-70% para microsferas onde foram incorporados dois fármacos (AAS e Probuco, agente hipolipidémico).

3.6 Estudo de Libertação do AAS

As propriedades das microsferas de QS enquanto sistemas de libertação controlada foram investigadas através de estudos de libertação *in vitro*.

A figura 3.19 ilustra o perfil de libertação obtido. A massa de fármaco libertada ao longo do tempo encontra-se representada em termos de fração mássica libertada acumulada.

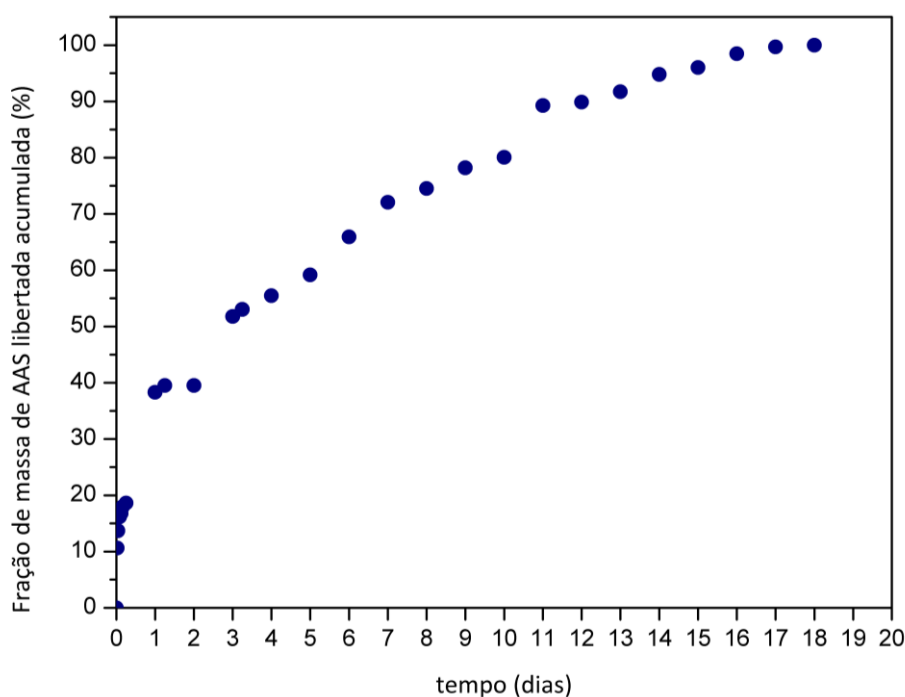


Figura 3.19 – Perfil de libertação *in vitro* do AAS a partir das microsferas de QS.

O perfil de libertação do AAS caracteriza-se por uma rápida libertação inicial na qual cerca de 40% do fármaco foi libertado ao fim de um dia.

A libertação de uma percentagem significativa do fármaco encapsulado nos instantes seguintes ao sistema de libertação controlada ter sido mergulhado no meio de libertação (*burst release*) é frequentemente observado em SLC formados quer por polímeros hidrofílicos quer por hidrofóbicos e foi verificado no estudo de libertação de AAS a partir de nanoesferas de QS de W. Ajun et al.^[37] Pode estar relacionado com a elevada concentração de fármaco na superfície das microsferas. O AAS é hidrofílico e interage ionicamente com o QS. O AAS é fisicamente incorporado nas partículas de QS podendo ficar no seu interior ou à superfície, devido às interações electrostáticas entre os grupos amino do QS e os carboxilo do AAS (OH...O=C ou HNH...O=C). Entre o fármaco e o QS ocorrem as seguintes interações iónicas: reticulação

iônica entre o íon amônio (NH_3^+) do QS e o íon carboxilo (COO^-) do AAS (constitui a ligação mais forte); pontes de hidrogénio entre o H^+ do grupo carboxilo do AAS e o OH^- do QS; e pontes de hidrogénio entre o H^+ do QS e o OH^- do grupo carboxilo do AAS.^[37] A porosidade da estrutura das microesferas poderia ser um outro fator a considerar. Em estruturas porosas o meio de libertação preenche rapidamente os poros e dissolve o fármaco. Contudo, as microesferas obtidas são densas e portanto esta hipótese torna-se inviável.

O valor expoente difusional obtido $n = 0,322 \pm 0,013 < 1/2$ que indica uma tendência para o transporte Fickiano, ou seja, o mecanismo de difusão é controlado pelo gradiente de concentração, o que está de acordo com a rápida libertação superficial inicial.

A porção de fármaco que não se encontra à superfície liberta-se posteriormente de forma mais lenta e controlada. Esta fase é influenciada pelo inchamento do polímero. Dos resultados dos testes de inchamento sabe-se que as microesferas incham rapidamente nas primeiras horas e atingem o seu inchamento máximo ao fim do primeiro dia. As ligações por pontes de hidrogénio formadas entre o AAS e o QS são afetadas pela interação com as moléculas de água que penetram na rede polimérica quando o polímero incha. A difusão do fármaco ocorre assim que as ligações entre o fármaco e o polímero são quebradas e é dissolvido no meio de libertação.

Relativamente a alguns estudos de libertação realizados a partir de microesferas de QS, S.R. Jameela et al.^[42] obtiveram uma libertação de 25% de mitoxandrona (um agente antineoplásico) em 36 dias para microesferas altamente reticuladas e para reticulações GST obtiveram-se libertações de cerca de 15-60% em 20 dias e exibiram um efeito *burst* inicial. I.Genta et al.^[40] obtiveram libertações de 30-70% de teofilina (antiasmático) em 100h para deferentes graus de reticulação com GTA.

4 Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste trabalho foram produzidas e caracterizadas microesferas de diferentes composições: microesferas de QS, microesferas compósitas de QS/FC e microesferas de QS/AAS.

Para a preparação das microesferas compósitas de QS/FC foi necessário produzir pós de fosfatos de cálcio para utilizar como substitutos ósseos.

Relativamente à produção dos fosfatos de cálcio (HAp e β -TCP), foi possível concluir que:

- Produziram-se com sucesso pós de HAp e β -TCP e ambos os métodos sol-gel utilizados na sua produção utilizaram percursos de baixo custo e não exigiram elevadas velocidades de agitação. Na produção de β -TCP, contudo, foi necessário um controlo rigoroso de pH.
- O tempo de envelhecimento (48h) e a temperatura de sinterização (700°C para a HAp e 800°C para o β -TCP) influenciaram as fases presentes nos FC produzidos e os tamanhos de cristalite obtidos (resultados de DRX).
- Obtiveram-se pós de HAp e β -TCP com cerca de 70nm (pela análise de TEM), dimensões que permitem a sua integração em microesferas.

Relativamente ao processo de produção das microesferas:

- A microfluídica revelou ser um processo muito simples de produção de microesferas de tamanho uniforme. Produziram-se microesferas de QS, microesferas compósitas (QS/FC) e microesferas com incorporação de AAS com uma dispersão inferior a 5%. Produziram-se também microesferas de PCL e microesferas de PCL com incorporação de AAS com uma dispersão inferior a 4%.
- A produção das microesferas de QS revelou ser um processo de produção muito lento (caudais típicos da fase contínua e dispersa de 4,5ml/h e 0,1ml/h, respetivamente). Num trabalho futuro dever-se-ão ajustar estes parâmetros de forma a obter uma produção de microesferas em grande escala de uma forma mais rápida.
- A determinação das condições de reticulação das microesferas de QS foi um processo difícil e conduziu à obtenção de microesferas extremamente reticuladas e, portanto,

densas. Em estudos futuros, o ajuste destes parâmetros será interessante se o objetivo passar por obter microesferas porosas.

Relativamente à morfologia das microesferas obtidas:

- As micropartículas de QS e de QS/AAS obtidas apresentaram uma estrutura perfeitamente esférica e densa e uma superfície lisa.
- As microesferas compósitas apresentaram uma estrutura esférica e densa e uma superfície rugosa associada à presença dos cerâmicos. Os cerâmicos formaram aglomerados e distribuíram-se aleatoriamente nas microesferas. É necessário que em trabalhos futuros se ultrapasse a dificuldade associada à dispersão de FC em soluções poliméricas. A dispersão por agitação magnética não foi suficiente. Os pós devem ser esmagados e peneirados por tamanho e só os de menor dimensão devem ser utilizados na dispersão. Esta deve ser realizada com recurso a um sonicador. Um outro problema associado à má distribuição dos pós está relacionado com a montagem experimental utilizada. A solução QS/FC é colocada numa seringa posicionada na vertical o que conduz à sedimentação dos pós, devido ao lento processo de produção.

É necessário ultrapassar esta dificuldade para se produzirem microesferas de QS/FC/AAS e sua estudar a eficiência terapêutica. A eficiência terapêutica deve englobar duas fases distintas. Numa primeira fase a libertação do fármaco anti-inflamatório que contribui para a primeira fase do processo de reparação/cicatrização de fratura óssea e numa segunda fase a libertação dos FC bioativos e osteocondutores que facilitarão o processo efetivo de reparação do local lesado atuando como substrato favorável à migração celular e deposição óssea.

No presente trabalho estudou-se o mecanismo de libertação do AAS a partir das microesferas de QS. As seguintes conclusões foram deduzidas:

- O perfil de libertação do AAS caracterizou-se por uma rápida libertação inicial na qual cerca de 40% do fármaco foi libertado ao fim de um dia.
- O AAS é um fármaco hidrofílico que interage ionicamente com o QS. O AAS pode ser incorporado fisicamente nas partículas de QS (no interior ou à superfície), devido às interações electroestáticas entre os grupos amino do QS e os carboxilo do AAS. A libertação de uma percentagem significativa do fármaco encapsulado nos instantes iniciais no meio de libertação (*burst release*) foi associada ao AAS absorvido na superfície das microesferas.
- O ajuste efetuado ao perfil de libertação do AAS obtido indicou uma tendência para o transporte Fickiano, ou seja, o mecanismo de difusão foi preferencialmente controlado pelo gradiente de concentração, o que está de acordo com a rápida libertação superficial inicial.

- A porção de fármaco incorporado no interior das microesferas libertou-se posteriormente de forma mais lenta e controlada. Esta fase foi influenciada pelo inchamento do polímero e pelas ligações iónicas formadas entre o AAS e o QS. A interação com as moléculas de água que penetram na rede polimérica quando o polímero incha, induz a quebra das ligações entre o fármaco e o polímero (pontes de H) e permite a difusão e dissolução do fármaco no meio de libertação.

5 Bibliografía

- [1] A. Nather, *Bone grafts and bone substitutes: basic science and clinical applications*. World Scientific Publishing, 2005.
- [2] M. Vunjak-Novakovic, Gordana; Fröhlich, Mirjam; Grayson, Warren; Wan, Leo; Marolt, Darja; Drobnic, "Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, Tissue Culture and Clinical Relevance," *Cell Research*, vol. 3, no. 4, pp. 254-264, 2009.
- [3] S. C. Cowin, *Bone Mechanics Handbook*, 2nd ed. 2001.
- [4] H. Teoh, *ENGINEERING MATERIALS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS*. World Scientific Publishing, 2004, pp. 8-4.
- [5] C. Soundrapandian, B. Sa, and S. Datta, "Organic – Inorganic Composites for Bone Drug Delivery," *AAPS PharmSciTech*, vol. 10, no. 4, pp. 1158-1171, 2009.
- [6] N. A. Martin, R. Bruce; Burr, David B.; Sharkey, *Skeletal Tissue Mechanics*. Springer, 1998, pp. 66-71.
- [7] R. a. a. Muzzarelli, "Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration," *Carbohydrate Polymers*, vol. 83, no. 4, pp. 1433-1445, Feb. 2011.
- [8] X. Cai, H. Tong, X. Shen, W. Chen, J. Yan, and J. Hu, "Preparation and characterization of homogeneous chitosan-poly(lactic acid)/hydroxyapatite nanocomposite for bone tissue engineering and evaluation of its mechanical properties.," *Acta biomaterialia*, vol. 5, no. 7, pp. 2693-703, Sep. 2009.
- [9] M. Doblaré, J. M. García, and M. J. Gómez, "Modelling bone tissue fracture and healing: a review," *Engineering Fracture Mechanics*, vol. 71, no. 13-14, pp. 1809-1840, Sep. 2004.
- [10] M. Gutierrez, M. A. Lopes, N. S. Hussain, A. T. Cabral, and L. Almeida, "Substitutos Ósseos Conceitos Gerais e Estado Actual," *Arquivos De Medicina*, no. 9, 2006.
- [11] K. L. Low, S. H. Tan, S. H. S. Zein, J. a Roether, V. Mouriño, and A. R. Boccaccini, "Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials.," *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, vol. 94, no. 1, pp. 273-86, Jul. 2010.
- [13] M. Vallet-Regí, "Evolution of bioceramics within the field of biomaterials," *Comptes Rendus Chimie*, vol. 13, no. 1-2, pp. 174-185, Jan. 2010.
- [14] K. P. Sanosh, M.-C. Chu, a. Balakrishnan, T. N. Kim, and S.-J. Cho, "Sol-gel synthesis of pure nano sized β -tricalcium phosphate crystalline powders," *Current Applied Physics*, vol. 10, no. 1, pp. 68-71, Jan. 2010.
- [15] C. Peniche, Y. Solís, N. Davidenko, and R. García, "Chitosan/hydroxyapatite-based composites," vol. 31, no. 5, 2009.
- [16] B. Chen, K. Chen, M. Ho, H. Chen, W. Chen, and C. Wang, "Synthesis of calcium phosphates and porous hydroxyapatite beads prepared by emulsion method," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 113, no. 1, pp. 365-371, Jan. 2009.

- [17] W. Feng, L. Musen, L. Yupeng, and Q. Yongxin, "A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders," *Materials Letters*, vol. 59, no. 8-9, pp. 916-919, Apr. 2005.
- [18] J. Park, *Bioceramics - Properties, Characterizations and Applications*. 2008.
- [19] U. Edlund and A. Albertsson, "Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery," *Polymer*, vol. 157, pp. 67-112, 2002.
- [20] R. M. Mainardes and L. P. Silva, "Drug delivery systems: past, present, and future.," *Current drug targets*, vol. 5, no. 5, pp. 449-55, Jul. 2004.
- [21] a. K. Bajpai, S. K. Shukla, S. Bhanu, and S. Kankane, "Responsive polymers in controlled drug delivery," *Progress in Polymer Science*, vol. 33, no. 11, pp. 1088-1118, Nov. 2008.
- [22] K. K. Kim and D. W. Pack, "Microspheres for Drug Delivery," *Most ?*, 2006.
- [23] C. Berkland, K. K. Kim, and D. W. Pack, "PLG Microspheres Size Controls Drug Release Rate through Several Competing Factors," *Pharmaceutical Research*, vol. 20, no. 7, 2003.
- [24] S. a Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, and T. M. Aminabhavi, "Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery.," *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, vol. 100, no. 1, pp. 5-28, Nov. 2004.
- [25] C. Gonsalves, Arlan; Araújo, "Diferentes estratégias para a reticulação da quitosana," *Quim.Nova*, vol. 34, no. 7, pp. 1215-1223, 2011.
- [26] K. C. Gupta and F. H. Jabrail, "Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman.," *Carbohydrate research*, vol. 341, no. 6, pp. 744-56, May 2006.
- [27] C. M. Lopes, J. Manuel, S. Lobo, and P. Costa, "Formas farmacêuticas de liberação modificada : polímeros hidrofílicos," vol. 41, 2005.
- [28] S. G. Kumbar, a R. Kulkarni, and M. Aminabhavi, "Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent.," *Journal of microencapsulation*, vol. 19, no. 2, pp. 173-80, 2002.
- [29] A. Semalty, M. Semalty, D. Singh, and M. S. M. Rawat, "Development and Characterization of Aspirin-Phospholipid Complex for Improved Drug Delivery ABSTRACT :," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, no. 2, pp. 940-947, 2010.
- [30] B. Hazer and E. B. Denkbaz, "Acetylsalicylic Acid Loading and Release Studies of the PMMA-g-Polymeric Oils / Oily Acids Micro and Nanospheres," *Polymer*, 2010.
- [31] a. Farzadi, M. Solati-Hashjin, F. Bakhshi, and a. Aminian, "Synthesis and characterization of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation," *Ceramics International*, vol. 37, no. 1, pp. 65-71, Jan. 2011.
- [33] U. N. D. E. Lisboa, "Produção de Fibras de Hidroxiapatite por Electrofiação - Tese de Mestrado," 2009.
- [34] D.-M. Liu, T. Troczynski, and W. J. Tseng, "Aging effect on the phase evolution of water-based sol-gel hydroxyapatite.," *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 1227-36, Feb. 2002.

- [35] D. J. Beebe, G. a Mensing, and G. M. Walker, "Physics and applications of microfluidics in biology.," *Annual review of biomedical engineering*, vol. 4, pp. 261-286, Jan. 2002.
- [36] S.-W. Choi, I. W. Cheong, J.-H. Kim, and Y. Xia, "Preparation of uniform microspheres using a simple fluidic device and their crystallization into close-packed lattices.," *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, vol. 5, no. 4, pp. 454-9, Apr. 2009.
- [37] W. Ajun, S. Yan, G. Li, and L. Huili, "Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study," *Carbohydrate Polymers*, vol. 75, no. 4, pp. 566-574, Feb. 2009.
- [38] M. H. Fathi and a. Hanifi, "Evaluation and characterization of nanostructure hydroxyapatite powder prepared by simple sol-gel method," *Materials Letters*, vol. 61, no. 18, pp. 3978-3983, Jul. 2007.
- [39] P. Q. Franco, J. Silva, and J. P. Borges, "Produção de fibras de hidroxiapatite Por electrofiação," vol. 22, pp. 57-64, 2010.
- [40] I. Gentaa, M. Costantinib, A. Asti, B. Conti, and L. Montanarib, "Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres," *Carbohydrate Polymers*, vol. 36, pp. 81-88, 1998.
- [41] K. C. Gupta and F. H. Jabrail, "Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled release of centchroman.," *Carbohydrate research*, vol. 342, no. 15, pp. 2244-52, Nov. 2007.
- [42] S. R. Jameela and A. Jayakrishnan, "Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle : studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle," *Biomaterials*, vol. 16, no. 10, pp. 769-775, 1995.
- [43] I. Y. Kimura, A. C. G. Jr, J. Stolberg, and M. C. M. Laranjeira, "Efeito do pH e do Tempo de Contato na Adsorção de Corantes Reativos por Microesferas de Quitosana," *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, pp. 51-57, 1999.
- [44] V. R. Sinha et al., "Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs.," *International journal of pharmaceutics*, vol. 274, no. 1-2, pp. 1-33, Apr. 2004.

Anexos

Anexo A: Reta de Calibração para estudo da Eficiência de Encapsulamento

Por espectroscopia UV-visível obtiveram-se os espectros de absorvância das amostras padrão de AAS em água destilada e apurou-se o comprimento de onda correspondente à absorção máxima do AAS e que melhor permitisse verificar a linearidade da Lei de Lambert-Beer. A relação entre a concentração do AAS em cada amostra e respetiva absorvância foi estabelecida para o comprimento de onda de 296nm.

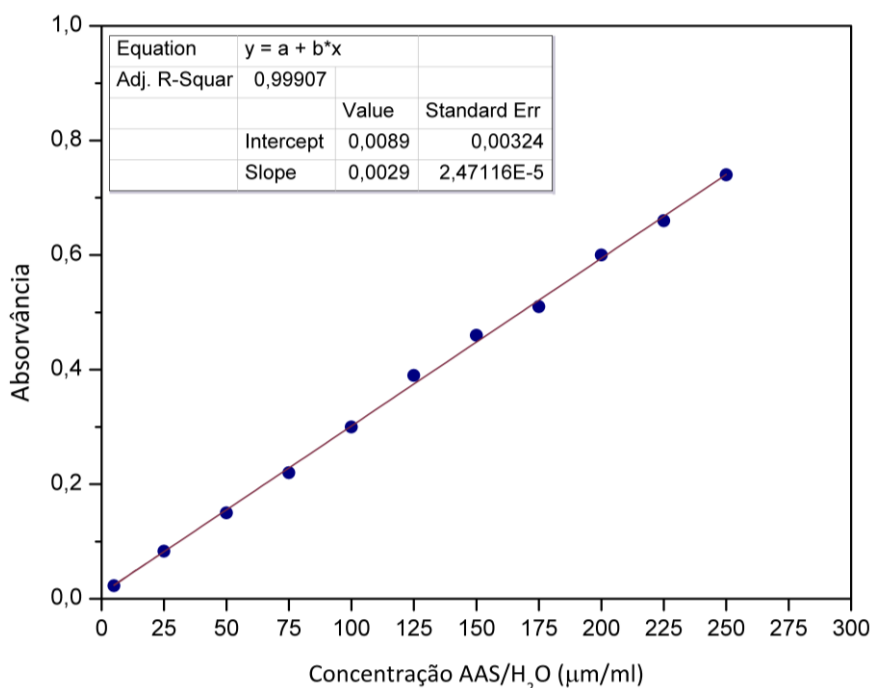


Figura A.1 – Reta de calibração para estudo de eficiência de encapsulamento. Absorvância para comprimento de onda de 296nm em função da concentração de AAS em água destilada (µg/ml).

Pela análise do gráfico apresentado na figura A1 verifica-se uma relação de linearidade entre a concentração e a absorvância do AAS que pode ser descrita pela seguinte expressão:

$$\text{Absorvância} = 0,0029 \times \text{Concentração} + 0,0089 \quad \text{Equação A1}$$

Para determinar a quantidade de fármaco em cada amostra de microesferas de PCL, após a sua dissolução em diclorometano, procedeu-se à dissolução do AAS precipitado em água destilada. Cada solução aquosa resultante foi analisada por espectroscopia UV-visível. Dos espectros resultantes extraiu-se o valor da absorvância para o comprimento de onda de 296nm e aplicou-se a equação A1 de forma a obter o valor da concentração de AAS. Conhecido o volume da amostra usado, determinou-se a massa de AAS encapsulado e comparou-se com o valor usado na solução inicial.

Anexo B: Retas de Calibração para estudo da Liberação do Fármaco em SBF

Por espectroscopia UV-visível obtiveram-se os espectros de absorvância das amostras padrão de AAS em SBF e apurou-se o comprimento de onda correspondente à absorção máxima do AAS e que melhor permitisse verificar a linearidade da Lei de Lambert-Beer. A relação entre a concentração do AAS em cada amostra e respetiva absorvância foi então estabelecida para o comprimento de onda de 296nm.

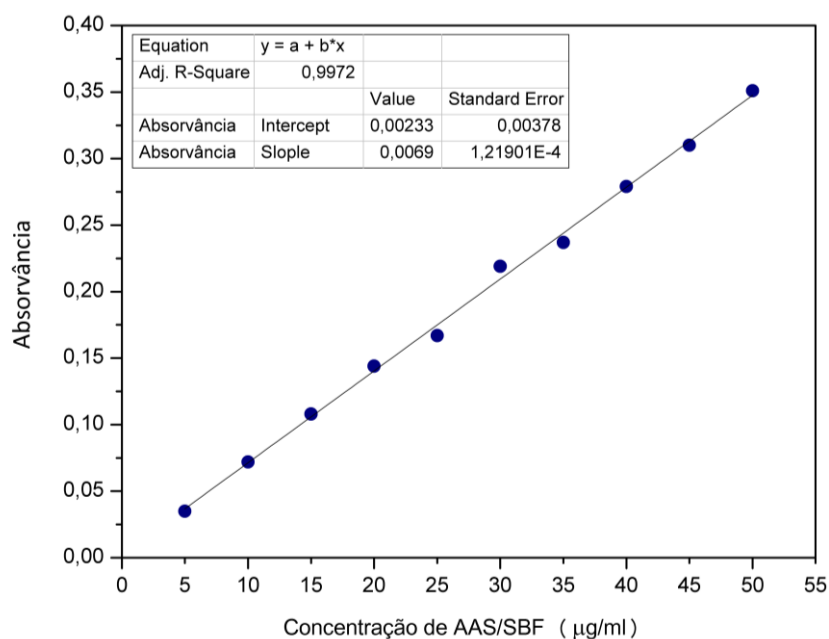


Figura B1 – Retas de calibração para estudo de liberação *in vitro*. Absorvância para comprimento de onda de 296nm em função da concentração de AAS em SBF (µg/ml).

Pela análise do gráfico apresentado na figura B1 verifica-se uma relação de linearidade entre a concentração e a absorvância do AAS que pode ser descrita pela seguinte expressão:

$$\text{Absorvância} = 0,069 \times \text{Concentração} + 0,00233 \quad \text{Equação B1}$$

Para determinar o perfil de liberação de AAS libertado de uma amostra de 50mg de microesferas de QS num volume de 150ml de SBF, obtiveram-se espectros de amostras de 2,5ml para diferentes intervalos de tempo. De cada espectro extraiu-se o valor da absorvância para o comprimento de onda de 296nm e aplicou-se a equação B1 de forma a obter o valor da concentração de AAS libertado para o meio até esse instante.

Anexo C: Determinação do expoente difusional característico do perfil de liberação de fármaco

O expoente difusional (n) característico do perfil de liberação do fármaco incorporado nas microesferas de quitosano no presente trabalho foi determinado com base na Equação 3, segundo os critérios estabelecidos por Peppas e Ritger:

$$\ln(M_t/M_\infty) = \ln(k_{RP}t^n) = \ln(k_{RP}) + \ln(t^n) = \ln(k_{RP}) + n \times \ln(t) \quad \text{Equação C1}$$

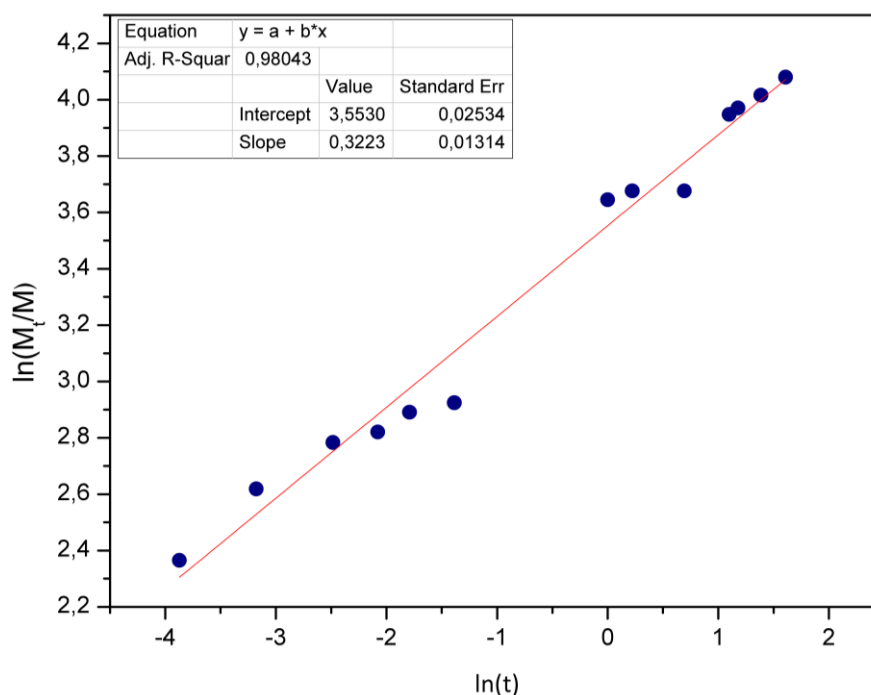


Figura C1 – Determinação do expoente difusional através da regressão linear ao gráfico obtido da relação logarítmica entre a fração de fármaco libertado acumulado na solução de SBF e o tempo de liberação. Equação obtida: $\ln(M_t/M_\infty) = 3,553 + 0,322 \times \ln(t)$.

Graficamente representou-se a relação obtida através da Equação C1 e através de uma regressão linear deduziu-se o valor de expoente difusional do perfil de liberação: $n = 0,3223 \pm 0,0131$.