ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR Rachel Mary Osthues E APROVADA PELA COMISSÃO JULGADORA EM 04/06/2012

ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Rachel Mary Osthues

Desenvolvimento e Caracterização de Microesferas de Fosfato de Cálcio Bifásico

Campinas, 2012.

78/2012

Rachel Mary Osthues

Desenvolvimento e Caracterização de Microesferas de Fosfato de Cálcio Bifásico

Tese apresentada ao Curso de Doutorado da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Cecília Amélia de C. Zavaglia
Co-orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Osthues, Rachel Mary
Os7d Desenvolvimento e caracterização de microesferas de fosfato de cálcio bifásico / Rachel Mary Osthues. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientadora: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Coorientador: Sidney Nicodemos da Silva.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Microesferas. 2. Fosfato de cálcio. 3. Hidroxiapatita. 4. Emulsificação. 5. Porosidade. I. Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho, 1954-. II. Silva, Sidney Nicodemos da. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.

Título em Inglês: Development and characterization of biphasic calcium phosphate microspheres
Palavras-chave em Inglês: Microspheres, Calcium phosphate, Hydroxyapatite, Emulsification, Porosity
Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação
Titulação: Doutora em Engenharia Mecânica
Banca examinadora: Marcelo Henrique Prado da Silva, Marivalda de Magalhães Pereira, Maria Clara Filippini Ierardi, Vanessa Petrilli Bavaresco
Data da defesa: 04-06-2012
Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS

TESE DE DOUTORADO

Desenvolvimento e Caracterizaçao de Microesferas de Fosfato de Cálcio Bifásico

Autor: Rachel Mary Osthues
Orientador: Prof.ª Dr.ª Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Co-orientador: Prof. Dr.Sidney Nicodemos da Silva

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:

Prof.ª Dr.ª Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Presidente
Instituição: Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP

Prof. Dr. Marcelo Henrique Prado da Silva,
Instituição: Instituto Militar de Engenharia, IME

Prof.ª Dr.ª Marivalda de Magalhães Pereira,
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG

Prof.ª Dr.ª, Maria Clara Filippini Ierardi
Instituição: Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP

Prof.ª Dr.ª, Vanessa Petrilli Bavaresco
Instituição: Colégio Técnico de Campinas, UNICAMP

Campinas, 04 de junho de 2012.

Dedico este trabalho à Aneclaire, minha querida mãe.

AGRADECIMENTOS

Poucas são as coisas que fazemos sozinhos na vida... E este trabalho não teria sido realizado se não fosse o auxílio de várias pessoas. Assim, agradeço:

Em primeiro lugar, a Deus.

À minha querida mãe, minha maior incentivadora, pelo amor, carinho, apoio e presença constante.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG pela liberação para a realização deste curso, e ao CEFET/CAPES/SETEC pela concessão de bolsa.

À Inside Materiais Avançados Ltda. pela doação da matéria-prima, pelo acordo de cooperação técnica que permitiu a utilização de suas dependências e pela execução de alguns ensaios técnicos. A Lídia Campos pelo auxílio na obtenção da gentamicina.

À minha orientadora e ao meu co-orientador pelo acompanhamento e auxílio nesta jornada.

A Rita e Claudinete, do Departamento de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp pela realização dos ensaios iniciais de fluorescência de raios X e microscopia eletrônica de varredura.

A Vinícius Miranda Góes, da empresa BTI, pelas excelentes conversas que sempre acabavam me mostrando um caminho em uma área a ser descoberta.

A Claúdia Lima Caldeira, Ilda de Souza Batista, Cleuber Figueiredo Felix, Elke Lemos e Prof. Dr Wander Vasconcelos, do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG pela realização de

ensaios de análise de tamanho de partículas a laser, BET, FTIR.

A Antônio Valadão, Wanderson Marinho de Abreu, Antônio Alves Mendes Filho, da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, pelo apoio na realização das sinterizações das microesferas e a Cíntia pela obtenção de imagens por lupa dos *scaffolds*.

A Fernando Lameiras, da CDNT, pela realização da esterilização das microesferas para ensaios de citotoxicidade.

A Sílvia Ligório Fialho, da FUNED, pela realização dos ensaios de liberação de gentamicina.

A Bruno Cordeiro, do Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET-MG, pela realização de ensaios de fluorescência e difração raios X e pelas muitas horas de trabalho nas análises por microscopia eletrônica de varredura.

A Patrícia Santiago de Oliveira Patrício e Alisson Luiz Diniz Silva, do Departamento de Química do CEFET-MG, pela realização de ensaios de infravermelho por reflexão atenuada e análises termogravimétricas.

Aos amigos do Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET-MG Anselmo Paulo Pires, Rogério Felício dos Santos, Ivan José de Santana, Elaine Carballo S. Corrêa, Wanderlei Ferreira de Freitas, pelo empréstimo de equipamentos, pelas conversas que auxiliaram a encontrar soluções para alguns problemas, pelo apoio e amizade.

Ao chefe do Departamento de Engenharia de Materiais Prof. Dr. Ezequiel de Souza Costa Júnior pela cooperação na designação de meus encargos didáticos, me auxiliando na fase final deste trabalho.

A Deny de Freitas pelo auxílio na realização de alguns ensaios e trocas de informações.

A André Gustavo de Souza Galdino pelo apoio, companheirismo e amizade, que muito me auxiliou em Campinas.

Às minhas amigas Ana Maria, Andrea, Angela, Dinalva, Marivalda, Neuza, Adriana, Danielle, Lilian, Tânia, Sirléia que souberam me compreender durante este período de ausência e sempre estiveram por perto.

Aos amigos que mesmo estando fisicamente ausentes sempre estiveram comigo.

E finalmente a todas as pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho.

A todos vocês: muito obrigada!

"Não fiquem maravilhados diante do novo, nem assustados pelo que ontem vos era desconhecido. Não recuem diante do mistério, mas procurem enfrentá-lo e desvendá-lo... Não se considerem os únicos donos da verdade e do conhecimento, pois um diploma não faz o cientista. Somente assim poderão cumprir sua missão, ser úteis ao próximo... E façam tudo com amor, pois será um dia esplêndido aquele em que, dos progressos da ciência, participará também o coração". Louis Pasteur

RESUMO

A utilização de biocerâmicas a base de fosfato de cálcio encontra grande aceitação clínica na substituição de tecidos ósseos, e mesmo no preenchimento dérmico, devido à sua similaridade química com parte mineral de ossos e dentes. Em função desta similaridade, os fosfatos de cálcio apresentam, dentre outras propriedades importantes, elevada biocompatibilidade, e na maioria das vezes exibem bioatividade e/ou osteocondução. Estes materiais não induzem reações inflamatórias ou imunológicas, agudas ou crônicas, ou seja, causam mínima irritação, limitada ao local de contato, e mínimas reações alérgicas. Dentre os fosfatos de cálcio, as apatitas formam a maior parte das cerâmicas de interesse biológico e podem ser constituídas de hidroxiapatita e beta-fosfato tricálcico, mistura chamada de fosfato de cálcio bifásico. Classicamente, este material se encontra disponível em blocos cerâmicos, densos ou porosos, ou na forma de materiais particulados (grânulos, pós e colóides). Na forma de grânulos ou pós, o formato esférico é preferido por se conformar melhor em locais de implantação irregulares, além de apresentarem propriedades reológicas mais satisfatórias em produtos injetáveis. Vários métodos de produção de micropartículas têm sido relatados, alguns empregando equipamentos e matérias-primas de custos elevados, e outros apresentando o inconveniente de utilizar solventes orgânicos altamente tóxicos, em pelo menos uma etapa do processamento, que devem ser removidos. Neste estudo, foi desenvolvida uma rota de produção de biocerâmicas particuladas de fosfato de cálcio bifásico, com forma esférica, eliminando a utilização de equipamentos e matérias-primas de custos elevados, e de substâncias tóxicas, reduzindo, assim, o número de etapas e o custo do processo. O processamento foi baseado na imiscibilidade de líquidos, com formação de uma emulsão água/óleo, utilizando uma mistura de solução de gelatina e fosfato de cálcio bifásico (fase dispersa) e óleo de canola alimentício (fase contínua). As micropartículas obtidas foram caracterizadas física, química e biologicamente, e foram avaliadas quanto ao potencial de incorporação e de liberação de medicamentos. Os resultados mostraram que o método aprimorado produziu micropartículas polidispersas, sem resíduos das substâncias químicas utilizadas no processamento, com morfologia esférica e estrutura porosa. As microesferas produzidas não apresentaram efeitos citotóxicos para a linhagem celular estudada e apresentaram potencial para incorporação e liberação do antibiótico gentamicina.

Palavras Chave: Microesferas. BCP. Grânulos de HA+β-TCP. Liberação de medicamentos. Microesferas cerâmicas

ABSTRACT

The biphasic calcium phosphate is greatly applied in the replacement of osseous tissues and as dermal fillers due to its chemical similarity with the mineral part of bone and teeth. Due to this similarity, the calcium phosphates present, among other important properties, high biocompatibility, bioactivity and/or osteoconduction. They do not induce inflammatory or immune reaction, acute or chronic, causing minimal irritation that is limited to the local contact, and cause minimal allergies. Among the calcium phosphates, the apatites form the major part of the ceramics of biological interest, and can be composed of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate, namely biphasic calcium phosphate. This material is classically available in ceramic blocks, dense or porous, or in particulate form (granules, powders and colloids). Granules and powders with spherical shape are preferred because they conform better in irregular implantation sites, and offer more satisfactory rheological properties when used in injectable products. Several methods for microparticles production have been reported, some employing expensive equipments and raw materials, and other presents the disadvantage of using highly toxic organic solvents, in at least one processing step, which need to be removed. In this study a production route of particulate biphasic calcium phosphate bioceramics with spherical shape was developed, eliminating the use of equipment and raw materials of high cost and toxic substances, thereby reducing the number of process steps and cost. The process was based on liquid immiscibility, generating a water/oil emulsion, using a mixture of gelatin solution and biphasic calcium phosphate (dispersed phase) and food grade canola oil (continuous phase). The microparticles obtained were physically, chemically and biologically characterized, and their incorporation and drugs release potential was also evaluated. The results showed that the improved method produced polydisperse microparticles without residues of chemicals used in processing, spherical shape and porous structure. The microspheres produced showed no cytotoxic effects for the cell line studied and showed potential for drugs incorporation and release of the antibiotic gentamicin.

Key words: Microspheres. BCP. HA+β-TCP granules. Drug release. Ceramic microspheres.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema dos mecanismos de rompimento (a) e coalescimento (b) de partículas 29
Figura 2 – Representação esquemática da sinterização de três partículas esféricas: (a) contato inicial, (b) crescimento dos pescoços, (c) e (d) arredondamento do poro 46
Figura 3 - Fluxograma da fase inicial de desenvolvimento de microesferas de BCP.....56
Figura 4 – Difratogramas do BCP (85HA/15β-TCP) moído e das microesferas sinterizadas a 1190°C/1h 72
Figura 5 – Espectros de FTIR do BCP (85HA/15β-TCP) e de esferas sinterizadas a 1190°C/1h 73
Figura 6 – Estereomicrografia de microesferas de BCP (85HA/15β-TCP) sinterizadas, com diâmetros entre 150-425µm 75
Figura 7 – Imagens de MEV de microesferas de BCP (85HA/15β-TCP) utilizadas para incorporação e liberação de medicamentos 76
Figura 8 – Perfil de liberação do antibiótico gentamicina por microesferas porosas de BCP (85HA/15β-TCP) com diâmetros entre 150-425µm 79
Figura 9 - Estrutura porosa obtida em ensaio preliminar. Imagem de estereomicroscópio 80
Figura 10 – Imagens de lupa de áreas superficial (a) e transversal (b) do material resultante do segundo ensaio para a obtenção de um *scaffold*. Ampliação original: 9x 81
Figura 11 - Imagem de MEV da segunda estrutura obtida - superfícies transversais 81
Figura 12 – Imagem de estereomicroscopia de uma peça produzida a partir de microesferas 82
Figura 13 - Fluxograma da fase de aprimoramento do processo de produção de microesferas de BCP 84
Figura 14 – Difratograma de raios X do BCP e sua ficha de análise. (a) difratograma, (b) picos identificados no material, (c) picos das fichas de identificação das fases HA, β-TCP e α-TCP 94
Figura 15 - Comparação dos difratogramas do BCP e das microesferas sinterizadas nas diferentes condições 95
Figura 16 - Espectro vibracional de infravermelho com reflexão total atenuada do BCP e microesferas sinterizadas a 1200°C durante 3horas 98

Figura 17 - Análise termogravimétrica do BCP e das microesferas sinterizadas a 1200°C/3h 99
Figura 18- Análise termogravimétrica de microesferas verdes 100
Figura 19 – Microesferas verdes produzidas com velocidade de agitação de 500RPM. Ampliação original: 32x 101
Figura 20 - Estereomicrografia das microesferas com diâmetros superiores a 840µm sinterizadas nas diferentes condições. Ampliação original: 62x 102
Figura 21 - Estereomicrografia das microesferas com diâmetros entre 840 e 425µm sinterizadas nas diferentes condições. Ampliação original: 62x 103
Figura 22 - Estereomicrografia das microesferas com diâmetros entre 425 e 150µm sinterizadas nas diferentes condições. Ampliação original: 62x 104
Figura 23 - Estereomicrografia das microesferas com diâmetros entre 150-53µm sinterizadas nas diferentes condições. Ampliação original: 62x 105
Figura 24 - Estereomicrografia das microesferas com diâmetros entre 53 e 38µm sinterizadas nas diferentes condições. Ampliação original: 62x 106
Figura 25 - Estereomicrografia das microesferas com diâmetros inferiores a 38µm sinterizadas nas diferentes condições. Ampliação original: 62x 107
Figura 26 - Estereomicrografia das microesferas produzidas com diferentes velocidades de agitação, separadas granulometricamente. Ampliação original: 62x 109
Figura 27 - Imagens de MEV do BCP moído e das superfícies de microesferas verde e sinterizadas em diferentes temperaturas/tempo 111
Figura 28 - Imagem de MEV de microesferas sinterizadas a 1400°C/1h 113
Figura 29 - Imagens de MEV de microesferas com diâmetros inferiores a 38µm obtidas nas diferentes condições de sinterização 115
Figura 30 – Imagens de MEV de microesferas produzidas com velocidade de agitação de 500RPM 117
Figura 31 – Imagens de MEV de microesferas produzidas com velocidade de agitação de 1000RPM 118
Figura 32 – Imagens de MEV de microesferas produzidas com velocidade de agitação de 1500RPM 119
Figura 33 – Imagens de MEV de microesferas produzidas com velocidade de agitação de 2000RPM 120

Figura 34 – Imagens de MEV de microesferas aglomeradas produzidas com velocidade de agitação de 2000RPM 121
Figura 35 - Imagens de MEV das microesferas produzidas com diferentes velocidades de agitação, sinterizadas e separadas granulometricamente 122
Figura 36 – Imagens de MEV de microesferas com diâmetros inferiores a 38µm, produzidas com diferentes velocidades de agitação 127
Figura 37 – Imagem de MEV da superfície interna de uma microesfera sinterizada a 1200°C/3h 128
Figura 38 – Imagens de MEV de microesferas fraturadas com diâmetros ≥840µm, produzidas nas diferentes velocidades de agitação 129
Figura 39 – Imagens de MEV de microesferas fraturadas com diâmetros entre 840-425µm, produzidas com as diferentes velocidades de agitação 130
Figura 40 – Imagens de microesferas fraturadas produzidas com as velocidades de agitação de 500, 100 e 2000RPM, nas granulometrias de 425-150 e 150-53µm 131
Figura 41 - Gráfico da distribuição granulométrica das microesferas, separadas por peneiramento, obtidas com a mesma velocidade de agitação e com diferentes temperaturas de sinterização 133
Figura 42 - Gráfico da distribuição granulométrica das microesferas, separadas por peneiramento, obtidas com diferentes velocidades de agitação e sinterizadas na mesma condição, 1200°C/3h 136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Arranjos de materiais e métodos de produção para aplicação de material particulado 13

Tabela 2 - Técnicas utilizadas para microencapsulamento 26

Tabela 3 – Parâmetros de produção de microesferas utilizados nos artigos estudados 60

Tabela 4 – Bandas de absorção na região do infravermelho de BCP e de microesferas de BCP ..74

Tabela 5 – Distribuição percentual das microesferas de BCP (85HA/15β-TCP) por faixa granulométrica, de acordo com as aberturas das peneiras utilizadas 77

Tabela 6 - Condições de produção das microesferas 93

Tabela 7- Intensidades dos picos $I_{100\%}$ da hidroxiapatita, do β-TCP e do α-TCP presentes no BCP e nas microesferas sinterizadas nas diversas condições 96

Tabela 8 - % das fases presentes no BCP, microesferas verdes e sinterizadas nas diferentes condições 96

Tabela 9 - Distribuição granulométrica (% massa) das microesferas produzidas com diferentes condições de sinterização 133

Tabela 10 - Diâmetros médios de Sauter para as diferentes condições de sinterização 134

Tabela 11 - Distribuição granulométrica (% massa) das microesferas produzidas através de diferentes velocidades de agitação 135

Tabela 12 - Diâmetros médios de Sauter para as microesferas produzidas com diferentes velocidades de agitação 137

Tabela 13 - Distribuição granulométrica das microesferas com diâmetros < 425μm, produzidas com diferentes velocidades de agitação, medida por laser – CILAS, usando Triton X como dispersante 137

Tabela 14 - Volume de poros de algumas granulometrias obtidas com diferentes velocidades de agitação 138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Letras Latinas

d – densidade da água

D - diâmetro médio

Ds - diâmetro Médio de Sauter

FM - fração mássica

I_{100} - intensidade difratada, relativa a 100%, para planos que difratam construtivamente os raios X

V_p – volume de poros

w_1 – massa das microesferas secas

w_2 – massa das microesferas com água

••

Letras Gregas

ρ - densidade do fluido

••

Abreviações

α'-TCP – super-alfa- fosfato tricálcico ou α'-fosfato tricálcico

α-TCP – alfa-fosfato tricálcico

β-TCP - beta-fosfato tricálcico

γ-TCP – gama-fosfato tricálcico

ACP - fosfato de cálcio amorfo

ATR – *attenuated total reflectance* (reflexão total atenuada)

BCP – fosfato de cálcio bifásico

BET - (Brunauer-Emmett-Teller

CDHA - hidroxiapatita deficiente de cálcio

CMC – carboximetilcelulose

DCP - mono-hidrogênio fosfato de cálcio

DCPA - fosfato dicálcico anidro –

DCPD - mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado

DRX – difração de raios X

FA - fluorapatita

FRX – fluorescência de raios X

FTIR – *Fourier transform infrared spectroscopy* (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier)

HA - hidroxiapatita

HPLC - *high performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

IV – espectroscopia de infravermelho

JCPDS - *Joint Committee on Powder Diffraction Standards*

MCPA - fosfato monocálcico anidro

MCPM - fosfato monocálcico mono-hidratado

MEV – microscopia eletrônica de varredura

OCP - fosfato octacálcico

PBS - Phosphate buffered saline (solução salina tamponada com fosfato)

PCZ - ponto de carga zero

PIE - ponto isoelétrico

RPM – rotações por minuto

TCP - fosfato tricálcico

TTCP - fosfato tetracálcico

••

Siglas

CDTN - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

CEFET-MG – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

CETEC – Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

ONU – Organização das Nações Unidas

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

••

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 4

3 REVISÃO DA LITERATURA 5

3.1 Aspectos gerais 5

3.2 Fosfatos de cálcio 13

3.3 Hidroxiapatita 15

3.4 Beta fosfato tricálcico - β-TCP 18

3.5 Fosfato de cálcio bifásico – BCP 20

3.6 Produção de microesferas 21

3.6.1 Processos 24

3.6.2 Formação de microcápsulas por processo baseado em imiscibilidade de líquidos 28

3.6.3 Fatores de influência na produção de micropartículas pelo processo baseado na imiscibilidade de fases 32

3.6.3.1 Partículas sólidas 32

3.6.3.2 Concentração do polímero (ligante das partículas sólidas) 33

3.6.3.3 Fase contínua 36

3.6.3.4 Velocidade de agitação 37

3.6.3.5 Agente reticulante 38

3.6.3.6 pH 41

3.6.3.7 Acetona 43

3.6.3.8 Resfriamento 44

3.6.3.9 Secagem, calcinação e sinterização 44

3.6.4 Caracterização de microesferas 50

3.6.5 Incorporação e liberação de medicamentos 52

4 FASE INICIAL DO DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS 55

4.1 Metodologia 57
4.1.1 Materiais e equipamentos 57
4.1.2 Produção das microesferas 58
4.1.3 Caracterização físico-química dos materiais e das microesferas 65
4.1.3.1 Fluorescência de raios X (FRX))....65
4.1.3.2 Difração de raios X (DRX) 66
4.1.3.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 66
4.1.3.4 Estereomicroscopia 66
4.1.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 67
4.1.3.6 Distribuição granulométrica 67
4.1.3.7 Porosidade das microesferas....67
4.1.4 Caracterização biológica 68
4.1.5 Ensaios de incorporação e liberação de medicamentos 69
4.1.6 Obtenção e caracterização de *scaffolds* 70
4.2 Resultados e discussão 71
4.2.1 Caracterização físico-química dos materiais e das microesferas 71
4.2.1.1 Fluorescência de raios X (FRX))....71
4.2.1.2 Difração de raios X (DRX) 71
4.2.1.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 73
4.2.1.4 Estereomicroscopia 74
4.2.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 75
4.2.1.6 Distribuição granulométrica 77
4.2.1.7 Porosidade das microesferas....78
4.2.2 Caracterização biológica – citotoxicidade 78
4.2.3 Ensaios de incorporação e de liberação de medicamentos 78
4.2.4 Artigos publicados 79
4.2.5 Caracterização dos *scaffolds* 80

5 FASE DE APRIMORAMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO 83
5.1 Metodologia 85
5.1.1 Materiais e equipamentos 85

5.1.2 Produção das microesferas 85
5.1.2 1 Determinação da temperatura de sinterização 85
5.1.2.2 Determinação da influência da velocidade agitação 86
5.1.3 Caracterização físico-química do BCP e das microesferas 86
5.1.3.1 Fluorescência de raios X (FRX) 86
5.1.3.2 Difração de raios X (DRX) 87
5.1.3.3 Espectroscopia de infravermelho por reflexão total atenuada (ATR) 88
5.1.3.4 Análise termogravimétrica 88
5.1.3.5 Estereomicroscopia 88
5.1.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 89
5.1.3.7 Distribuição granulométrica 89
5.1.3.8 Porosidade das microesferas 90
5.2 Resultados e discussões 91
5.2.1 Produção das microesferas 91
5.2.2 Caracterização do material e das microesferas 93
5.2.2.1 Fluorescência de raios X (FRX) 93
5.2.2.2 Difração de raios X (DRX) 93
5.2.2.3 Espectroscopia de infravermelho por reflexão total atenuada (ATR) 97
5.2.2.4 Análise termogravimétrica 98
5.2.2.5 Estereomicroscopia 100
5.2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 110
5.2.2.7 Distribuição granulométrica 132
5.2.2.8 Porosidade das microesferas 138

6 CONCLUSÕES 139

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 140

REFERÊNCIAS 141

APÊNDICE A –. Cópias dos artigos e resumo.....151

ANEXO A – Relatório de ensaio de avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro*
.....168

1 INTRODUÇÃO

O aumento no número de doenças e traumas relacionados à estrutura óssea e articular tem relação direta com a expectativa de vida da população mundial, atividades físicas de alto impacto, acidentes de trabalho e rodoviários, dentre outros. Por conseguinte, a busca por uma melhor qualidade de vida, e por uma melhoria na aparência estética tem revolucionado os novos biomateriais de ministração injetáveis (minimamente invasivos) de uso ortopédico ou dermatológico.

As clínicas médicas e odontológicas, todos os anos apresentam inúmeros casos de defeitos ósseos complexos que necessitam de intervenções cirúrgicas para proporcionar correções e/ou regeneração terapêutica destes defeitos, muitas vezes com o uso de biomateriais. Em boa parte destes casos ou procedimentos, é imprescindível o uso de enxertos (autólogos, homólogos, xenólogos) que apresentam inconvenientes. Se retirados de outro osso do paciente, causam morbidade do local e são difíceis de serem obtidos na forma e tamanho necessários. Se forem utilizados enxertos de outros indivíduos, inclusive animais, apresentam a desvantagem de poder causar reações imunes e a possibilidade de transmissão de agentes patógenos. Assim, uma alternativa é a substituição de enxertos ósseos por materiais sintéticos (HSU; CHUEH; WANG, 1999; PATEL et al, 2008).

Muitos biomateriais têm sido propostos para reparar ou restaurar defeitos ósseos, das articulações e da pele. (GAUTHIER et al, 1999; COSTA, 2009). Biocerâmicas a base de fosfatos de cálcio encontraram grande aceitação na substituição de enxertos ósseos devido à sua similaridade química com a hidroxiapatita da parte mineral destes tecidos e também com o esmalte dentário e/ou com o complexo dentino-pulpar. Devido a esta similaridade, estes materiais apresentam alto grau de biocompatibilidade, não causam reações inflamatórias, imunológicas, de corpo estranho ou irritações. Eles apresentam ainda, na maioria das vezes, bioatividade /ou osteocondução, possuem habilidade de suportar o crescimento tecidual e a formação óssea, podendo, em muitos casos, ser misturados a enxertos autógenos para aumentar o comportamento osteogênico (GAUTHIER et al, 1999; COSTA et al, 2009; PAUL; SHARMA, 1997; CONZ;

GRANJEIRO; SOARES, 2005). A hidroxiapatita sintética em pH fisiológico é termodinamicamente estável, participando ativamente das ligações ósseas, formando forte ligação química com o tecido ósseo (FOOK, A.; APARECIDA; FOOK, M., 2010).

Devido a todas estas propriedades, estas biocerâmicas baseadas na família das apatitas vêm sendo bastante investigadas para confecção de matrizes sintéticas para implantação, liberação de medicamentos, engenharia de tecidos, preenchedores dérmicos, e para reparo articular (LACERDA; LAMEIRAS; SILVA, 2009; GAUTHIER et al, 1999; COSTA et al, 2009).

Estudos realizados para verificar a biodegradação de implantes de hidroxiapatita mostraram que este material apresenta uma lenta dissolução, mostrando que sua reabsorção começa, geralmente, após um período de até cinco anos de implantação. Sendo a reabsorção uma característica desejada nos biomateriais onde se deseja um processo de degradação concomitante com a reposição óssea, a utilização do beta-fosfato tricálcico juntamente com a hidroxiapatita tem sido uma alternativa para aumentar a velocidade de absorção, pois combina uma fase estável, a hidroxiapatita, com uma fase reabsorvível, o fosfato tricálcico, formando o material chamado de fosfato de cálcio bifásico (BCP). O desenvolvimento destas biocerâmicas permitiu um controle da bioatividade através da associação de quantidades adequadas de cada uma das fases (fração ou percentual), oferecendo uma combinação de estabilidade e biodegradabilidade. (GAUTHIER et al, 1999; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Com o desenvolvimento de novas técnicas para realização de cirurgias ortopédicas menos invasivas, utilizando instrumentação específica para acesso às estruturas danificadas sem abertura de grandes extensões de pele, tornou-se necessário o desenvolvimento de biomateriais adequados a estas novas indicações, como por exemplo, os substitutos ósseos injetáveis (TEMENOFF; MIKOS, 2000; RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2004). Esses materiais injetáveis consistem de partículas suspensas em veículos apropriados, geralmente uma biocerâmica em um material polimérico. A forma das partículas nestes sistemas determina suas características, sendo as esféricas mais adequadas para implantação, pois são mais bem conformadas em locais irregulares e apresentam propriedades de fluxo mais previsíveis durante a injeção (RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2006). Estas partículas podem, ainda, apresentar potencial de incorporar

medicamentos, como por exemplo, antibióticos, que podem ser aplicados *in situ*, na quantidade necessária, evitando que maiores quantidades sejam administradas para garantir que a dose adequada chegue ao local afetado (SIVAKUMAR; RAO, 2003).

Existem muitos métodos para a produção de micro e/ou nanopartículas. Alguns necessitam do uso de equipamentos e matérias-primas de custos elevados, e outros, mais utilizados, são baseados na obtenção de emulsões entre fases orgânica e aquosa, que apresentam o inconveniente de necessitar do uso de solventes orgânicos, altamente tóxicos, em pelo menos uma etapa da produção. As desvantagens do uso destas substâncias residem no longo tempo de processamento para suas remoções e na possibilidade de deixarem resíduos (SILVA; DUCHEYNE; REIS, 2007).

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma rota de produção de microesferas de fosfato de cálcio bifásico sem uso de equipamentos e matérias-primas de custos elevados e de substâncias tóxicas, assim como a caracterização das partículas produzidas.

2 OBJETIVOS

- Desenvolver uma rota de produção de biocerâmicas particuladas de fosfato de cálcio bifásico (BCP), de formato esférico, com porosidade e rugosidade elevadas, eliminando a necessidade de utilização de equipamentos e matérias-primas de custos elevados e de substâncias tóxicas;

- caracterizar física e quimicamente as partículas produzidas;

- avaliar o potencial de citotoxicidade *in vitro* destas partículas; e

- avaliar seu potencial de incorporação e liberação de fármacos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos gerais

O aumento da expectativa de vida da população mundial tornou as doenças relacionadas à estrutura óssea um problema de saúde público, levando a ONU a declarar, em 1999, a década de 2000 a 2010 como a "década dos ossos e das articulações". Os segmentos da ortopedia e da odontologia são dois setores de maior demanda, onde diversos autores alertam para a priorização de políticas públicas voltadas aos problemas maxilofaciais, osteoarticulares e decorrentes de traumatismos. Alertam, também, para a necessidade de aprimoramento de dispositivos existentes e desenvolvimento de novos materiais para a correção de lesões ou defeitos, possibilitando assim melhorar a qualidade de vida das pessoas (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

A cada ano, centenas de milhares de casos de grandes defeitos ósseos ocorrem como resultado de cura deficiente, inadequada ou mesmo de sua não ocorrência. Muitas razões são responsáveis pela inabilidade de regeneração, incluindo vascularização inadequada, infecções, micromovimentos e instabilidade no local do defeito. Em todos estes casos, intervenções cirúrgicas, frequentemente, são requeridas para proporcionar a cicatrização do defeito. As técnicas cirúrgicas mais drásticas são baseadas em autoenxertos, aloenxertos, xenoenxertos, todos apresentando seus inconvenientes. Os autoenxertos, retirados de outro osso do hospedeiro, são os mais adequados para regeneração óssea, porém causam morbidade do local doador e são difíceis de serem obtidos na forma e quantidade necessárias. Por outro lado, os aloenxertos e os xenoenxertos têm as desvantagens de causarem reações imunes e apresentarem a possibilidade de transmissão de agentes patógenos (HSU; CHUEH; WANG, 1999; PATEL et al, 2008). Assim, uma alternativa para a utilização de enxertos ósseos é sua substituição por materiais sintéticos.

Muitos biomateriais, como por exemplo, polimetil metacrilato, poliácido glicólico, hidroxiapatita, colágeno, biovidros, têm sido propostos para reparar ou restaurar defeitos ósseos, das articulações e da pele. Nas últimas décadas, um enorme avanço foi conseguido devido às pesquisas intensivas com biomateriais como, por exemplo, biocerâmicas de fosfatos de cálcio,

com o intuito de substituir o enxerto ósseo autógeno em cirurgias ortopédicas. (GAUTHIER et al, 1999; COSTA, 2009).

O início dos estudos sobre a utilização de materiais cerâmicos como biomateriais ocorreu em 1930, quando foi utilizada uma cerâmica de fosfato tricálcico para regeneração de um defeito ósseo, porém somente 50 anos depois é que começaram a aparecer diferentes tipos de cerâmicas de fosfato de cálcio como materiais implantáveis para aplicação na medicina e na odontologia. A grande aceitação destas biocerâmicas se deve ao seu alto grau de biocompatibilidade relacionada com sua similaridade química com os materiais normalmente encontrados no tecido ósseo, apresentando na maioria das vezes bioatividade e/ou osteocondução. Em alguns casos também apresenta biodegradabilidade no meio fisiológico. Assim, encontram aplicações como, por exemplo, na ortopedia como revestimento de próteses metálicas para promover uma ligação interfacial estável entre o implante e o tecido vivo, no tratamento de tumores como suporte de ação prolongada com liberação gradual do medicamento no organismo, na odontologia para evitar a perda óssea após extrações de elementos dentários e também para a recuperação de áreas com reabsorção óssea, como preenchedor dérmico e no reparo de articulações (GAUTHIER et al, 1999; COSTA et al, 2009). O uso de biomateriais para substituição de tecidos duros tem crescido como consequência do aumento de cirurgias reconstrutivas realizadas que requerem, na maioria dos casos, enxertos adjuvantes. De acordo com o Ministério da Saúde, o número de procedimentos cirúrgicos utilizando enxertos ósseos, no Brasil, mais que dobrou entre 2002 e 2003 (CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2005).

A hidroxiapatita, HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, principal constituinte dos tecidos ósseos e dentários, vem sendo bastante investigada para a confecção de matrizes sintéticas, devido ao seu potencial de uso em implantes, liberação de medicamentos, engenharia de tecidos, dentre outros. (LACERDA; LAMEIRAS; SILVA, 2009). A similaridade química com a hidroxiapatita da parte mineral de ossos sugere uma intrínseca biocompatibilidade (GROSS; BERNDT, 2002). Usar hidroxiapatita é vantajoso, uma vez que não causa reações inflamatórias, reações imunológicas, de corpo estranho ou irritação (PAUL; SHARMA, 1997). Enxertos sintéticos de HA podem ser escolhidos, especialmente quando grandes defeitos devem ser preenchidos. Esta biocerâmica é geralmente aceita por ser considerada osteocondutiva, por possuir habilidade de suportar o

crescimento tecidual e a formação óssea, podendo em muitos casos, ser misturada ao enxerto autógeno para aumentar o comportamento osteogênico (CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2005). É termodinamicamente estável em pH fisiológico e participa ativamente das ligações ósseas, formando forte ligação química com o tecido ósseo (FOOK, A.; APARECIDA; FOOK, M., 2010).

O material para enxerto ósseo pode ser reabsorvível ou não reabsorvível, sendo esta classificação relacionada à extensão de dissolução dos materiais de fosfato de cálcio. Os fatores que afetam as propriedades de dissolução dos fosfatos de cálcio são semelhantes aos que afetam a biodegradação ou biorreabsorção. Quanto maior a taxa de solubilidade do material cerâmico, mais pronunciado é o efeito do crescimento do tecido ósseo. Dentre vários fatores, a composição química, o tamanho das partículas e a cristalinidade são susceptíveis de afetar a solubilidade da cerâmica, e podem ser ajustados para a proposta desejada, pois diferentes aplicações requerem materiais com diferentes taxas de reabsorção, que podem ser reguladas pela mistura de diversas fases de fosfato de cálcio (CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2005).

Durante as duas últimas décadas, a hidroxiapatita foi o principal material escolhido para a reposição sintética de tecido ósseo, devido à sua similaridade química e estrutural com a fase mineral de ossos e dentes. Este material não apresenta toxicidade local e sistêmica, respostas inflamatórias e tem habilidade de se ligar ao tecido hospedeiro (tecidos duros, músculos e pele) (QIU; XIAO; LIU, 2008; GUASTALDI; APARECIDA, 2010). Porém, apesar das propriedades biológicas promissoras, seu baixo índice de bioatividade e taxa de degradação lenta, tornaram sua utilização clínica limitada. Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a HA começa a ser reabsorvida, gradualmente, após 4 a 5 anos de implantação. A reabsorção é uma característica desejada para biomateriais nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação. Assim, surgiu o interesse no conhecimento de propriedades e comportamentos biológicos de outros fosfatos de cálcio para serem empregados como biomateriais para reposição óssea. A utilização de fosfato tricálcico (TCP) juntamente com a HA tem sido uma alternativa viável para aumentar a velocidade de reabsorção (RAMAY; ZHANG, 2004; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

A maior parte das biocerâmicas comerciais de fosfatos de cálcio utilizada é constituída de uma fase estável, HA, e uma fase reabsorvível, o beta fosfato tricálcico - β-TCP, formando assim os chamados fosfatos de cálcio bifásico - BCP. (GAUTHIER et al, 1999). A presença de β-TCP promove a osteointegração mais rápida dos fosfatos de cálcio (BEHNAMGHADER et al, 2008). Assim, o desenvolvimento de biocerâmicas de BCP forneceu materiais cujas bioatividades podem ser determinadas pela associação de quantidades adequadas (frações ou percentual) das fases HA e β-TCP, controlando, assim, a degradação no meio fisiológico e, portanto, a taxa de liberação de cálcio, oferecendo uma combinação de estabilidade e biodegradabilidade (GAUTHIER et al, 1999).

A HA e o β-TCP são materiais particularmente atrativos para implantes de tecidos duros em cirurgias orais e plásticas ou para uso como preenchedores ósseos na forma de pós para preencher defeitos durante o reajuste de fraturas ósseas complicadas, com considerável perda de material ósseo, ou em caso de vazios formados devido à remoção de grandes tumores, etc. Assim, há uma grande necessidade de produção destes fosfatos de cálcio em formas apropriadas para uso clínico (RAO; ROOPA; KANNAN, 1997).

Biomateriais de fosfato de cálcio são classicamente disponíveis em blocos ou grânulos de cerâmica densa ou porosa. Blocos macroporosos são frágeis e difíceis de conformar mecanicamente (por desbaste ou outros processos de obtenção), e muitas vezes não se encaixam adequadamente à superfície dos defeitos ósseos, o que pode ser inconveniente, uma vez que o contato pré-existente é considerado a principal exigência para osteocondução. Também os grânulos destes biomateriais se mostraram difíceis de manusear no local de enxertia e de se manterem no local após implantação, sendo lixiviados para outras partes do corpo (GAUTHIER et al, 1999). Outra limitação destes materiais na forma de pó, grânulos ou blocos está relacionada com o local dos defeitos, quando não são facilmente acessíveis ou quando é preferível uma cirurgia percutânea (WEISS et al, 2005).

Cirurgias ortopédicas frequentemente são cirurgias muito invasivas, com abertura de grandes extensões da pele para acesso às estruturas danificadas, mas o aprimoramento de instrumentação específica e o uso de implantes biorreabsorvíveis para a regeneração de fraturas,

contribuíram para o desenvolvimento de técnicas não invasivas (percutâneas e laparoscopias) que levaram ao desenvolvimento de biomateriais adequados a estas indicações como os substitutos ósseos injetáveis proporcionando uma alternativa para o preenchimento de defeitos com menor desconforto para os pacientes (TEMENOFF; MIKOS, 2000; RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2004).

Uma variedade de materiais injetáveis compostos de materiais poliméricos e cerâmicos tem sido desenvolvida para várias aplicações ortopédicas. A combinação de partículas cerâmicas com matrizes poliméricas também tem sido pesquisada, numa tentativa de imitar o tecido ósseo que pode ser visto como um material complexo formado por componentes orgânicos e inorgânicos. Diferentes fases cerâmicas têm sido usadas, sendo a hidroxiapatita e o fosfato tricálcico as mais comuns, assim como muitas matrizes poliméricas de origem sintética ou natural, estas últimas incluindo colágeno, quitosana, gelatina e alginato, dentre outras. (RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2004). A maioria desses materiais injetáveis consiste de micro ou nanopartículas suspensas em veículos apropriados. A forma das micropartículas em tais sistemas determina suas características de empacotamento, sendo as partículas esféricas mais adequadas para implantação que os grânulos irregulares, uma vez que elas preenchem melhor os locais de implante irregulares. Além disso, partículas uniformes apresentam propriedades de fluxo mais previsíveis durante a injeção (RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2006). Estes materiais apresentam propriedades reológicas controladas, e têm a vantagem de combinar bioatividade, possibilidade de controle da degradação e algumas propriedades mecânicas. Além disso, micropartículas apresentam flexibilidade para preencher diversos tipos de defeitos com empacotamento adequado, permitindo o crescimento e a revascularização (angiogênese) através dos poros interconectados formados pelos espaços entre elas (SILVA; DUCHEYNE; REIS, 2007).

A eficiência de materiais usados na engenharia de tecidos ósseos pode ser muito melhorada se eles puderem, simultaneamente, atuar como sistema de liberação de medicamentos. Dependendo da especificidade da doença, agentes bioativos como, por exemplo, fatores de crescimento e outras proteínas, podem ser liberados e potencialmente acelerar o processo de regeneração (RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2004). Apresentar potencial de incorporar medicamentos é outra vantagem dos materiais particulados. Podem incorporar, por exemplo,

antibióticos, que podem ser aplicados *in situ* para o tratamento ou prevenção de infecção óssea, o que é uma importante alternativa, pois devido a pouca circulação sanguínea nestes tecidos, torna-se necessário o uso de grandes quantidades deste medicamento para garantir que a dose adequada chegue ao local afetado (SIVAKUMAR; RAO, 2003). A liberação de antibióticos no local do implante mostra ser uma forma apropriada de terapia antimicrobiana, que mantém a concentração do medicamento na quantidade desejada. Além disso, a liberação prolongada pelo compósito evita a toxicidade e efeitos sistêmicos adversos causados pela alta concentração de antibióticos no sangue, como ocorre na administração intravenosa (PAUL, SHARMA, 1997). Neste sentido, materiais porosos são vantajosos, uma vez que apresentam adicional área superficial, um importante parâmetro que influencia fortemente a capacidade de carregamento e a taxa de liberação que podem ser obtidas (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2006). Sendo a HA porosa mais reabsorvível e mais osteocondutiva do que a densa, existe grande interesse no desenvolvimento de materiais de hidroxiapatita sintética porosa para preenchimento de defeitos ósseos (FOOK, A.; APARECIDA; FOOK,M., 2010).

Ainda visando uma melhor qualidade de vida, deve ser lembrado que além de problemas osteoarticulares existem também os relacionados aos tecidos moles, pois muitas pessoas sofrem desfigurações resultantes de ferimentos, fenômenos congênitos, patologias ou efeitos pós-operatórios como, por exemplo, a remoção de tumores. Assim, a correção de defeitos e deficiências nos tecidos moles é um problema encontrado em cirurgias reconstrutivas e cosméticas (SOFT..., 2009).

Preenchedores dérmicos são parte integrante da restauração não cirúrgica. Eles podem ser classificados como bioestimuladores do preenchimento e preenchedores. Um exemplo de preenchedor combinado, que é um bioestimulador e preenchedor de espaços é a hidroxiapatita sintética na forma de esferas em suspensão em um gel aquoso, usado para correção de sinais de lipoatrofia em pessoas com o vírus da imonodeficiência humana (HIV), assim como para a correção estética de rugas (NARURKAR; LIZZUL, 2010).

Sabe-se que a textura superficial e a forma do implante afetam a resposta tecidual. Partículas mais lisas e arredondadas apresentam reações menores que partículas rugosas e

angulares. Verifica-se que um crescimento ósseo significativamente mais rápido ocorre em materiais com partículas arredondadas do que com partículas poligonais. Partículas esféricas são preferidas devido à sua característica única de empacotamento, pois quando juntas, formam uma matriz com poros uniformes entre elas e esta configuração promove uma eficiente condução óssea de partícula a partícula sem reações inflamatórias (PAUL; SHARMA, 1997, 1999).

Grânulos irregulares ou densamente empacotados frequentemente causam reações inflamatórias ou atrasam a formação óssea. Partículas esféricas uniformemente empacotadas com distribuição uniforme de poros aumentam a taxa de crescimento ósseo (SIVAKUMAR; RAO, 2003).

As técnicas de produção de biocerâmicas dependem muito da aplicação do biomaterial, se é para substituição de tecidos duros ou para integração com o tecido circunvizinho. Em geral, três tecnologias de processamento são empregadas: (1) emprego de um lubrificante ou líquido "colante" com os pós cerâmicos para conformação e subsequente queima; (2) aplicação de propriedades de autocura e autoendurecimento de pós moldados com água (cimentos); (3) fusão de materiais para formarem um líquido e obterem forma durante o resfriamento e solidificação. No caso dos fosfatos de cálcio, uma vez que são termicamente instáveis (fosfato monocálcico monoidratado - MCPM, fosfato monocálcico anidro -MCPA, fosfato dicálcico anidro – DCPA (monetita), fosfato dicálcico di-hidratado – DCPD (brushita), fosfato octacálcico - OCP, fosfato de cálcio amorfo - ACP, hidroxiapatita deficiente de cálcio - CDHA) ou possuem um ponto de fusão a temperaturas que ultrapassam 1400 °C (alfa fosfato tricálcico - α-TCP, beta fosfato tricálcico - β-TCP, hidroxiapatita - HA, fluorapatita - FA, fosfato tetracálcico - TTCP), apenas as duas primeiras formas são utilizadas. (DOROZHKIN, 2010).

Existem muitos métodos para a produção de micro e nanopartículas, mas os mais amplamente utilizados são baseados em emulsões, como polimerização por suspensão, evaporação de solvente e, em uma menor extensão, separação de fase orgânica (coacervação) e *spray-drying* (SILVA; DUCHEYNE; REIS, 2007).

A maioria dos métodos de produção de partículas baseados na criação de emulsões entre

fases orgânicas e aquosas, apresenta o inconveniente de necessitar de solventes orgânicos, como por exemplo, clorofórmio, em pelo menos uma etapa da produção. O teor residual deste solvente nas micropartículas deve ser removido após a preparação, o que consome muito tempo, e na maioria das vezes a presença destas substâncias pode levar à perda da atividade de medicamentos que podem ser incorporados ao sistema (SILVA; DUCHEYNE; REIS, 2007).

Deve-se ter cuidado na escolha do método de produção e avaliar cuidadosamente o risco do uso de um solvente orgânico ou usar condições com temperaturas elevadas, dois dos principais parâmetros que influenciam a atividade biológica de medicamentos utilizados (SILVA; DUCHEYNE; REIS, 2007).

Embora micro e nanopartículas possam ser produzidas usando um vasto arranjo de técnicas possíveis, algumas variáveis devem ser levadas em conta na escolha do material e método e incluem:

- tipo e quantidade do material usado;
- taxa de degradação do polímero;
- tipo e carga útil do agente bioativo a ser incorporado (no caso de aplicações de liberação de drogas);
- solvente orgânico a ser volatilizado;
- tipo e quantidade de surfactante dissolvido na fase aquosa;
- temperatura;
- pressão durante a evaporação do solvente;
- fração de volume do solvente orgânico/volume da fase aquosa.

Pela combinação desses parâmetros, pode ser usado um grande número de arranjos de materiais e métodos para várias aplicações. Alguns exemplos são mostrados na tabela 1. (SILVA; DUCHEYNE; REIS, 2007).

Aplicações dos fosfatos de cálcio, no caso a hidroxiapatita, não são restritas à área biomédica. Devido à sua grande afinidade por proteínas, a HA tem sido utilizada como adsorvente na cromatografia líquida, estando esta capacidade de adsorção relacionada à estrutura

do poro e à natureza físico-química da superfície do sólido. Na área ambiental, a HA vem sendo estudada como catalisador na decomposição de compostos orgânicos clorados, poluentes provenientes da indústria metalúrgica e da incineração do lixo industrial. Esta biocerâmica, também é um catalisador efetivo para desidratação e desidrogenação de alcoóis primários para aldeídos e cetonas a altas temperaturas. Ainda na área ambiental, a hidroxiapatita apresenta uma alta capacidade em remover metais pesados, não só de águas e solos contaminados, como também de dejetos industriais (COSTA et al, 2009).

Tabela 1 – Arranjos de materiais e métodos de produção para aplicação de material particulado.

Material	**Tipo**	**Método**	**Aplicação**	**Descrição**
Hidroxiapatita	Grânulos esféricos	Não determinado	Adsorção e liberação	Potencial para liberação de agentes bioativos de osso (citocroma c, por exemplo)
		Métodos úmidos	Recobrimentos	Plasma spray para recobrimentos de *scaffolds* para indução bioativa
	Grânulos	Não determinado	Adsorção e liberação	Potencial para liberação de agentes bioativos de osso (citocroma c, por exemplo)
	Partículas	Não determinado	Adsorção e liberação	Liberação de hormônio de crescimento, tetraciclina
	Nanocristais	Processos *In situ* e *ex situ*	Adsorção e liberação	Liberação de BSA (*bovine serum albumin*) (como modelo)
β-fosfato tricálcico (β-TCP)	Partículas	Não determinado	Preenchimentos	Aumento dos ossos maxilo-faciais.

Fonte: SILVA; DUCHEYNE; REIS, 2007.

3.2 Fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio, que são de interesse da área médica e odontológica, compõem a classe das apatitas e são o fosfato de cálcio amorfo (ACP), o fosfato dicálcico di-hidratado ou brushita (DCPD – $CaHPO_4.2H_2O$), o fosfato dicálcico anidro ou monetita (DCP – $CaHPO_4$), o

fosfato octacálcico (OCP–Ca_8H_2 $(PO_4)_6.5H_2O$), o fosfato de cálcio ou "whitlockita" $(Ca_3(PO_4))_2$, sendo que este fosfato normalmente apresenta magnésio associado (β-TCP) – $(Ca,Mg)_3(PO_4)_2$), e a hidroxiapatita – HA ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) (MENDES FILHO, 2006).

Materiais à base de fosfatos de cálcio podem ser encontrados na natureza, como a hidroxiapatita de corais, ou sintetizados por métodos utilizando reagentes químicos (CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2005).

Uma das propriedades mais importantes dos fosfatos de cálcio, a qual é explorada nas diversas aplicações e que pode predizer seu comportamento *in vivo*, é a solubilidade em água. De forma geral, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade. Dessa forma, em pH fisiológico, a solubilidade dos fosfatos de cálcio e, consequentemente, sua degradação *in vivo*, é dada pela seguinte ordem: fosfato monocálcico mono-hidratado - MCPM > alfa fosfato tricálcico - α-TCP > mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado - DCPD > mono-hidrogênio fosfato de cálcio -DCP > fosfato octacálcico - OCP > beta-fosfato tricálcico - β-TCP > hidroxiapatita - HA (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; RAMAY, ZHANG, 2004;).

A absorção ou biodegradação dos fosfatos de cálcio depende basicamente de três fatores: dissolução físico-química, desintegração física e fatores biológicos (OLIVEIRA, S.V. et al, 2009). E, a biodegradabilidade dessas cerâmicas é função das condições do meio fisiológico, da sua composição, dos tipos de fases agregadas, do grau de cristalinidade e de características microestruturais (LACERDA; LAMEIRAS; SILVA, 2009). Em meio ácido, a taxa de dissolução aumenta da hidroxiapatita cristalina para a apatita amorfa, com o fosfato tricálcico apresentando solubilidade média. A presença de magnésio ou carbonato na HA causa redução no tamanho do cristal e assim aumenta a dissolução das apatitas sintéticas. Para a mesma composição, a taxa de reabsorção aumenta com a diminuição da cristalinidade e do tamanho dos grãos e com o aumento da área superficial, ou seja, a reabsorção é função da composição, da porosidade (presença de micro e/ou macroporosidade) e da cristalinidade (considerando o tamanho dos cristais quando o tamanho das partículas é idêntico) (LEGEROS, 1988; OLIVEIRA, S.V. et al, 2009). A cristalinidade é altamente dependente da temperatura de sinterização, quanto maior a temperatura mais perfeito é o cristal e então, menor a taxa de degradação (CONZ; GRANJEIRO; SOARES,

2005).

As biocerâmicas de fosfatos de cálcio podem, também, ser classificadas de acordo com a sua reabsorção, ou seja, a taxa de degradação *in vivo*. Assim, a hidroxiapatita é descrita como não reabsorvível e o β-TCP como reabsorvível (LEGEROS, 1988).

Com o intuito de aumentar a degradabilidade em fluidos biológicos, uma mistura bifásica de hidroxiapatita e fosfato tricálcico é usada em vez de se usar hidroxiapatita pura. Outra forma de aumentar a taxa de reabsorção pelo aumento da área superficial é produzir grânulos porosos (CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2005).

As cerâmicas de fosfato de cálcio podem ser densas ou porosas, de acordo com a presença de micro ou macroporosidades. Um material é microporoso em consequência das condições de sinterização (temperatura e tempo) e é macroporoso devido ao processamento utilizado, por exemplo, adição de um componente orgânico, que é eliminado antes da sinterização (LEGEROS, 1988).

Apesar das limitações mecânicas, as biocerâmicas de ortofosfatos de cálcio estão disponíveis em várias formas como pós, partículas, grânulos, blocos densos, *scaffolds* (peças de biocerâmica porosa com elevada conectividade), formulações injetáveis, cimentos autocuráveis e concretos, revestimentos de implantes e compósitos de diferentes origens (natural, biológica ou sintética), frequentemente com formas específicas, como implantes, próteses ou dispositivos protéticos (DOROZHKIN, 2010).

3.3 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita natural é o constituinte mineral encontrado nos tecidos duros e representa de 30 a 70% da massa de ossos e dentes de todos os animais vertebrados. Nos ossos representa 55% da composição, nos dentes, 96% do esmalte dentário e 70% da dentina, representando 5% do peso total de um indivíduo adulto. A hidroxiapatita natural utilizada para implantes pode ser

obtida por desproteinização de tecidos ósseos ou por tratamento hidrotérmico de corais (COSTA et al, 2009; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

A hidroxiapatita sintética pode ser obtida por vários métodos, como precipitação de soluções aquosas (via úmida), reações no estado sólido (via seca), hidrotérmica e sol-gel, mas o método de precipitação por via úmida é o preferido, devido ao material produzido apresentar características semelhantes às dos tecidos ósseo e dentário. A escolha do método de síntese e seu posterior tratamento podem levar ao aparecimento de outras fases de fosfato de cálcio, que devem ser controladas em função do que se pretende obter. Isto se deve ao fato de cada fase possuir propriedades diferentes da hidroxiapatita, como resistência mecânica e solubilização, podendo comprometer suas características de osteocondução (OLIVEIRA, F.P.,2008; COSTA et al, 2009).

A hidroxiapatita apresenta fórmula química $Ca_5(PO_4)_3OH$ que também pode ser escrita como $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, indicando que existem duas unidades da fórmula em uma célula unitária. (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). Trata-se de um duplo sal de fosfato tricálcio e do hidróxido de cálcio, formada conforme a equação:

$$3\ Ca_3(PO_4)_2 + Ca(OH)_2 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \qquad (1)$$

Em meio fisiológico, a dissolução parcial da hidroxiapatita resulta na liberação de íons Ca^{2+}, PO_4^{3-}, HPO_4^{2-} e CO_3^{2-} e na supersaturação do meio com respeito aos íons de cálcio e fósforo (LACERDA; LAMEIRAS; SILVA, 2009). A hidroxiapatita estequiométrica apresenta fração Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável depois da fluorapatita (FA) e menos solúvel de todos, mas a razão estável pode ser estendida a aproximadamente 1,5 (COSTA et al, 2009). A fração atômica de Ca/P nos fosfatos de cálcio pode variar entre 1,5 e 2 para produzir compostos variando do tetrafosfato de cálcio $Ca_4P_2O_9$, hidroxiapatita (HA) - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, ao fosfato tricálcico (TCP) - $Ca_3(PO_4)_2$.

Outra propriedade apresentada pela hidroxiapatita é de adsorver proteínas em sua superfície. Proteínas com ponto isoelétrico superior a 8 são adsorvidas em sua superfície devido a interações elétricas entre os grupos PO_4^{-3} (fosfatos) da hidroxiapatita com os grupos NH_4^+

(amina) da proteína. No caso de proteínas ácidas a adsorção ocorre pela formação do complexo HA-Ca^{2+}... $^{-}$OOC-proteína (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

A hidroxiapatita pura se cristaliza na estrutura monoclínica, mas em temperaturas superiores a 250°C existe uma transição da estrutura monoclínica para hexagonal. A estrutura hexagonal, à temperatura ambiente, é obtida com a presença de algumas impurezas, como em substituições parciais de hidroxilas por fluoretos ou cloretos. Assim, só alguns cristais de HA sempre exibem o grupo espacial hexagonal que é a mais comum para aplicações biomédicas (KOUTSOPOULOS, 2002).

A hidroxiapatita pode ser apresentada em diferentes formas e com diferentes porosidades, tamanho de cristal, cristalinidade e defeitos cristalinos que interferem na biodegradabilidade e reabsorção do material pelo organismo. As propriedades mecânicas de cerâmicas a base de hidroxiapatita podem ser melhoradas através da modificação das técnicas de processamento dos pós, composição e condições experimentais, para a obtenção de partículas com morfologias definidas. Verifica-se que as propriedades dependem do processamento, temperatura e tempo de sinterização (OLIVEIRA, F.P., 2008).

Na obtenção de produtos de hidroxiapatita, outras fases de fosfato de cálcio podem estar presentes e os fatores que afetam o tipo e quantidade destas fases são a pureza, composição e tamanho de partículas e as condições de calcinação e sinterização (MENDES FILHO, 2006).

Recentemente, o rápido desenvolvimento na pesquisa de materiais nanométricos de HA, tem levado a um maior entendimento das características desse material e tem desenvolvido muitas novas formas de usá-lo, como na ortopedia, liberação de medicamentos, separação de biomoléculas, etc. A forma do cristal de HA pode afetar muitas de suas características, como as superficiais e bioatividade. Assim, se for possível controlar a forma dos cristais da HA nanométrica, como forma acicular, esférica ou em placas, etc., será possível expandir a sua aplicação (QIU; XIAO; LIU, 2008).

Uma alternativa para otimizar as características mecânicas da hidroxiapatita consiste na combinação desta cerâmica com outros materiais bioativos utilizados como recobrimento ou na preparação de materiais compósitos. Biopolímeros como colágeno, gelatina, quitosana e alginato, têm sido utilizados junto com a hidroxiapatita para melhorar suas características (OLIVEIRA, F.P., 2008).

A partir dos diferentes pós é possível a obtenção de diversas morfologias e formatos de materiais, de densos a porosos, por diversas técnicas de processamento tradicionais e avançadas. A hidroxiapatita na forma de grânulos pode ser obtida por diferentes métodos, o que permite prever comportamentos biológicos diferenciados. O grande interesse nesta morfologia é devido à sua ampla utilização na área ortopédica e traumatológica, medicina e odontologia. No entanto não existem materiais disponíveis no mercado nacional com qualidade e custo vantajosos (COSTA et al, 2009).

3.4 Beta fosfato tricálcico - β-TCP

O beta-fosfato tricálcico (β-TCP, β-$Ca_3(PO_4)_2$), cujo nome quimicamente correto é beta-fosfato de cálcio tribásico, não pode ser precipitado de soluções aquosas. É uma fase formada em alta temperatura, obtido a 800°C pela decomposição térmica da hidroxiapatita deficiente em cálcio ou pela reação em estado sólido de ortofosfatos de cálcio ácidos, por exemplo, o fosfato dicálcico não hidratado com óxido de cálcio. Além das rotas de preparação química, o β-TCP substituído ionicamente pode ser preparado pela calcinação de ossos, sendo ocasionalmente chamado de “cinza de ossos” (FERREIRA, 2009).

Atualmente, fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$, identificado por TCP, é um dos mais importantes biomateriais à base de fosfatos de cálcio devido à sua biocompatibilidade, bioatividade *in vivo*, por ser biorreabsorvível e osteocondutivo. (CARRODEGUAS et al, 2008). Na forma de implantes porosos ou materiais particulados, vem demonstrando ser um material adequado para recolocações de tecidos ósseos quando estes estão submetidos apenas a pequenas solicitações

mecânicas. Estes materiais, quando se degradam, formam sais de cálcio e fosfato, sendo muito utilizados como cimento para preenchimento de cavidades ósseas (OLIVEIRA, S.V. et al, 2009).

O fosfato tricálcico apresenta três fases polimórficas, a saber: a fase beta (β-TCP) estável até temperaturas próximas de 1180°C, com estrutura cristalina romboédrica, a fase alfa (α-TCP) estável na faixa de temperatura entre 1180 e 1430°C, com estrutura monoclínica, e uma fase de alta temperatura, acima de 1430°C, chamada de fase super-alfa ou alfa' (α'-TCP) (ELLIOT, 1984 apud OLIVEIRA, S.V. et al, 2009; RYU; YOUN; HONG; CHANG; LEE; CHUNG, 2002; RYU; YOUN; HONG; KIM; LEE; CHANG; LEE; CHUNG, 2002). Esta última não desperta muito interesse, pois só existe em temperaturas superiores a, aproximadamente, 1430°C e é revertida a α-TCP ao ser resfriada abaixo da temperatura de transição e que permanece até a temperatura ambiente. Existem divergências quanto à temperatura de transformação da fase beta para a fase alfa TCP, que segundo Carrodeguas et al (2008) ocorre em aproximadamente 1115±10°C. Oliveira, S. V. et al (2009), em sinterização a 1300°C, encontraram as fases α e β, e em temperaturas inferiores a esta, apenas a fase β-TCP, mostrando a influência da temperatura de transição na obtenção de fosfato tricálcico utilizado na área biomédica. Estas divergências ocorrem porque a temperatura exata da transformação da hidroxiapatita em outras fases depende de fatores como, por exemplo, técnica de síntese empregada, impurezas presentes, atmosfera de sinterização (KHON, 2002; BERNACHE-ASSOLLANT, 2003; WEINAND et al, 2006).

Guastaldi e Aparecida (2010) afirmam que o fosfato tricálcico pode ocorrer em quatro formas alotrópicas: fase beta (β-TCP) até 1120-1180°C, quando se transforma em alfa (α-TCP), sendo estável até 1430-1470°C e a partir desta temperatura aparece a fase α'-TCP. A quarta forma alotrópica, a gama (γ-TCP) só ocorre em altas pressões. As fases β-TCP e γ-TCP apresentam estrutura cristalina romboédrica, a fase α-TCP estrutura monoclínica e a estrutura cristalina da fase α'-TCP não é conhecida, devido à dificuldade de preparação. As fases α e β-TCP apresentam a mesma habilidade de osteocondução, porém a fase α-TCP apresenta maior bioatividade, sendo este fato atribuído ao arranjo estrutural desta fase que possibilita que uma maior quantidade de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} sejam trocados com o meio biológico.

Dentre estas fases, a que desperta maior interesse para utilização em implantes biocerâmicos é o β-TCP, pois é o que apresenta maior estabilidade química, resistência mecânica e taxa de bioabsorção mais adequada a este tipo de aplicações (ELLIOT, 1984 apud OLIVEIRA, S.V. et al, 2009; RYU; YOUN; HONG; CHANG; LEE; CHUNG, 2002; RYU; YOUN; HONG; KIM; LEE; CHANG; LEE; CHUNG, 2002). Porém, ambas as formas são de uso normal em muitas aplicações clínicas na odontologia, ortopedia e cirurgias maxilo-facial, sendo o β-TCP o componente de várias biocerâmicas comerciais mono e bifásicas e o α-TCP o maior constituinte de vários cimentos ósseos (CARRODEGUAS et al, 2008).

Durante a transformação polimórfica da fase beta para a fase alfa ocorre uma expansão da estrutura devido à mudança da estrutura romboédrica de densidade aproximadamente 3,07g/cm^3 para a estrutura monoclínica de densidade 2,87g/cm^3. Esta diferença de volume gera tensões na estrutura do material que podem ocasionar microtrincas na estrutura. Uma alternativa para evitar tal problema é sinterizar o β-TCP a temperaturas inferiores à transformação β-α, porém nestas temperaturas obtêm-se corpos cerâmicos com baixa resistência mecânica (OLIVEIRA, S.V. et al, 2009).

O alfa fosfato tricálcico, α-TCP (α-$Ca_3(PO_4)_2$), quimicamente denominado de alfa-fosfato tricálcico tribásico, normalmente é preparado a partir do β-TCP pelo aquecimento acima de 1125°C, e pode ser considerada uma fase de alta temperatura do β-TCP. Embora o α-TCP e o β-TCP tenham exatamente a mesma composição química, eles diferem na estrutura cristalina e solubilidade. A fase α-TCP é mais reativa em sistemas aquosos e tem maior energia específica (FERREIRA, 2009).

3.5 Fosfato de cálcio bifásico - BCP

Biocerâmicas de fosfato de cálcio bifásico (BCP) consistem de uma mistura de hidroxiapatita e beta-fosfato tricálcico com fração variável de HA/β-TCP. A hidroxiapatita praticamente não se degrada sob as condições fisiológicas e permanece dentro do tecido ósseo

regenerado. Por outro lado, o β-TCP, comparado com a hidroxiapatita, é vantajoso do ponto de vista da degradabilidade, mas sua alta taxa de biodegradação pode levar à insuficiente estabilidade biológica *in vivo*, além de ser, também, mais frágil (TAKAHASHI; YAMAMOTO; TABATA, 2005; TANIMOTO et al, 2009). Assim, os BCPs são os mais utilizados devido ao fato destas cerâmicas serem mais efetivas no reparo ou regeneração óssea que a hidroxiapatita e o β-TCP puros, e apresentarem uma taxa de degradação controlada pela quantidade de TCP utilizada (RAMAY; ZHANG, 2004; TANIMOTO et al, 2009; GUASTALDI; APARECIDA, 2010). O interesse na utilização do BCP é devido a esta dissolução controlada e devido à sua estrutura, que favorece o crescimento ósseo à custa da biocerâmica (DACULSI et al, 2003). Ramay e Zhang (2004) mostraram que implantes de fosfato de cálcio bifásico (BCP) apresentaram novos tecidos ósseos poucas semanas depois da implantação nos locais (RAMAY; ZHANG, 2004).

O BCP é obtido quando uma apatita, sintética ou biológica, deficiente de cálcio é sinterizada acima de 700°C. A extensão da deficiência de cálcio (Ca/P < 1,67) depende do método de preparação do material (precipitação, hidrólise ou mistura mecânica), do pH da reação e da temperatura de preparação da hidroxiapatita não sinterizada. A deficiência em cálcio determina a fração HA/β-TCP no BCP, e esta fração determina a reatividade do material: quanto menor a fração, maior a reatividade (expressa como a extensão da dissolução *in vitro* em uma solução tampão ácida). Porém, o controle preciso desta relação é difícil de ser obtido (TANIMOTO et al, 2009). O tamanho das partículas, as macro e microporosidades também são fatores que afetam a reatividade do BCP e são afetados pelas condições de sinterização (DACULSI et al, 2003).

O BCP, utilizando o fosfato tricálcico, nas formas α e β, juntamente com a hidroxiapatita encontra aplicações na ortopedia e odontologia, como material de preenchimento de cavidades e defeitos ósseos e de fixação de tecidos moles.

3.6 Produção de microesferas

Há muitos relatos sobre recobrimentos e materiais compósitos com HA. Entretanto há

poucos relatos sobre microesferas de HA, especialmente microesferas ocas. A hidroxiapatita nesta condição apresenta propriedades incomuns, como grande área superficial e boa fluidez, e tem recebido muita atenção devido à sua estrutura especial, propriedades mutáveis e ampla gama de aplicações (SUN; LU; CHEN, 2009).

Microesferas com fármacos incorporados têm sido propostas para o tratamento de doenças que necessitam de concentração constante de medicamento na corrente sanguínea possibilitando a redução de múltiplas administrações ou a atuação direta em células ou órgãos específicos. Assim, consegue-se uma alta concentração do medicamento no local, como por exemplo, agentes antitumorais aplicados diretamente na lesão. A respeito disto, uma relação direta entre a rota de administração do fármaco e o tamanho da partícula deve ser considerada (ESPOSITO; CORTESI; NASTRUZZI, 1996; CORTESI et al, 1999; PRADEESH et al, 2005). Dependendo do tamanho, as partículas encontram aplicação em procedimentos cirúrgicos dentais, periodontais, maxilo-faciais, ortopédicos, incluindo preenchimentos, reparos e aumento de tecidos (KOMLEV; BARINOV, KOPLIK, 2002). Por exemplo, microesferas com diâmetros na faixa de 20 a 100µm podem ser utilizadas para administração subcutânea ou intramuscular, uma vez que são retidas no tecido intersticial atuando como depósito para liberação controlada. Partículas menores têm sido propostas para o tratamento de infecções, alergias e artrite, devido à capacidade de serem utilizadas em locais mais delicados como olhos, pulmões e articulações (ESPOSITO; CORTESI; NASTRUZZI, 1996). Na odontologia grânulos com diâmetro médio de 425-600µm são recomendados para aplicações periodontais, com diâmetros entre 425-1000µm para cirurgias orais e entre 300-400µm para aumento do rebordo alveolar (PAUL; SHARMA, 1999). Gauthier et al (1999) relatam o uso de microesferas com diâmetros de 20-40µm e 200-500µm em substitutos ósseos injetáveis. Narurkar e Lizzul (2010) citam a utilização de microesferas de hidroxiapatita na faixa granulométrica de 25-45µm, suspensas em um gel aquoso para preenchimentos dérmicos.

Sistemas particulados para liberação e aplicação de medicamentos devem apresentar melhor biodisponibilidade, resposta terapêutica previsível, maior eficácia e segurança, e tempo de liberação controlada e/ou prolongada. Para esta finalidade, encapsulamento de fármacos em uma matriz biodegradável e sistemas baseados em cerâmicas porosas têm sido propostos, com

particular atenção no uso da hidroxiapatita como uma cerâmica constituinte do sistema, por ser largamente empregada na reparação de ossos, ser não tóxica e osteocondutiva. O desenvolvimento de sistemas particulados HA-medicamento, por exemplo, antibióticos, com liberação controlada, é um importante tendo em vista a taxa de infecção em cirurgias ósseas. Isto é especialmente importante no caso de uma distribuição deficiente do fármaco no local da infecção devido à limitada circulação sanguínea do tecido ósseo (KOMLEV; BARINOV; KOPLIK, 2002).

O comportamento das partículas no organismo depende de sua morfologia e microestrutura. Sabe-se que partículas com morfologia irregular causam reações inflamatórias, assim, grânulos arredondados e mais lisos são preferidos para preenchimento de defeitos teciduais. Sabe-se, também, que a cinética de liberação do medicamento é afetada pelo tamanho, quantidade e distribuição dos poros (KOMLEV; BARINOV; KOPLIK, 2002).

Uma estrutura porosa promove adesão celular, proliferação e diferenciação, e apresenta vias para transporte de fluidos biológicos. Consequentemente, uma alta porosidade, com estrutura de poros interconectados, geralmente favorece a regeneração tecidual (RAMAY; ZHANG, 2004).

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para produzir microesferas de HA, com dimensões variando de submicrométricas a micrométricas, para o uso em sistemas de liberação de medicamentos. As microesferas produzidas podem apresentar morfologia esférica sólida ou oca, densas ou porosas, partículas em forma de anéis, ou ainda, vazadas no centro (ESPOSITO; CORTESI; NASTRUZZI, 1996; SUN; LU; CHEN, 2009). A maioria destes métodos apresenta a desvantagem de usar solventes orgânicos ou óleos, necessitando então de vários estágios de lavagem para eliminá-los (RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2006).

Para a obtenção de formas particuladas, os primeiros registros de tentativas de aplicação da técnica de microencapsulamento datam de 1930. Desde então, técnicas vêm sendo estudadas e aplicadas em diversos setores industriais como o farmacêutico, permitindo o desenvolvimento de fórmulas de liberação controlada de medicamentos e apresentando a capacidade de liberar o agente ativo apenas no local ou órgão onde este deve agir. Estas técnicas encontram aplicação, também, no setor de agrotóxicos, diminuindo a toxicidade e contaminação ambiental com a

liberação controlada de defensivos agrícolas, além dos setores alimentícios, de cosméticos, pigmentos, adesivos, encapsulamento de células vivas, dentre outros (SUAVE et al, 2006).

Um aspecto de grande importância no micro encapsulamento de um produto é a escolha do material encapsulante, que deve ser selecionado em função das propriedades físico-químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método de formação das micropartículas. Micropartículas são subdivididas em microesferas e microcápsulas, segundo a sua estrutura. São denominadas microesferas quando constituídas por partículas compactadas, onde a substância ativa se encontra distribuída no seu estado sólido ou molecular. As microcápsulas são constituídas por um núcleo contendo o agente ativo recoberto por uma camada de espessura variável (SUAVE et al, 2006).

Na preparação de microesferas microestruturadas de hidroxiapatita parâmetros como quantidade de hidroxiapatita, tipo e concentração do estabilizador, velocidade de agitação e temperatura de preparação têm efeito sobre o tamanho e a forma das partículas obtidas, que por sua vez, influenciam na microestrutura sinterizada (PRADEESH et al, 2005). Medeiros (2009) acrescenta que o diâmetro médio das partículas depende, ainda, do tipo de equipamento empregado e da concentração do polímero. Em relação à utilização de polímeros, vários estudos têm sido realizados utilizando, por exemplo, gelatina, colágeno e quitosana para a preparação de microesferas de HA, como os apresentados por Paul e Sharma (1997, 1999), Hsu, Chueh e Wang (1999), Qiu, Ducheyne e Ayyaswamy (2000), Borden et al (2002), Komlev, Barinov e Koplik (2002), Krylova et al (2002), Sivakumar; Manjubala e Rao (2002), Sunny, Ramesh e Varma (2002), Sivakumar e Rao (2003), Wu et al (2004), Qiu, Xiao e Liu (2008), entre outros.

3.6.1 Processos

A formação de micropartículas é muito semelhante à formação de microcápsulas, assim o estudo da formação das segundas pode ser aplicado na produção das primeiras.

Existem vários métodos para produção de microcápsulas. A escolha do mais adequado é

feita dependendo da solubilidade do material do núcleo e do constituinte da casca; do tamanho de cápsula desejado; da espessura e da permeabilidade ideal da membrana, bem como da taxa e forma ideais de liberação. Os processos de microencapsulamento podem ser classificados em químicos e mecânicos, a saber:

• processos químicos: coacervação, incompatibilidade polímero-polímero, polimerização interfacial em interfaces líquido-líquido, polimerização *in situ*, evaporação de solvente, extrusão com bocal submergido;

• processos mecânicos: *spray drying*, leito fluidizado, polimerização interfacial em interfaces sólido-gás ou líquido-gás, extrusão com centrifugação, extrusão ou gotejamento em um banho de dessolvatação, separação por suspensão rotacional (*spinning disk*).

A coacervação pode ser controlada de modo a produzir vários diâmetros de microcápsulas/micropartículas e/ou espessuras de revestimento diferentes. O diâmetro da cápsula/partícula é função do tamanho do material a ser encapsulado. No caso de líquidos, o tamanho das gotas determina o tamanho das cápsulas. Os demais fatores que afetam o tamanho são:

• velocidade de agitação;
• teor de sólidos da fase orgânica;
• viscosidade da fase aquosa;
• viscosidade da fase orgânica;
• concentração e tipo de tensoativo;
• configuração do vaso e do agitador;
• quantidade de orgânicos e fase aquosa;
• perfil de temperatura durante a produção (SOUZA, 2010).

Segundo Jyothi et al (2009) existem várias técnicas para o encapsulamento de materiais. Basicamente os métodos podem ser divididos em três tipos: químicos, físico-químicos e físico-mecânicos, mostrados na tabela 2 a seguir.

Tabela 2 - Técnicas utilizadas para microencapsulamento

Processos químicos	**Processos físico-químicos**	**Processos físico-mecânicos**
Polimerização interfacial	Coacervação e separação de fases	*Spray drying* e congelamento
Polimerização *in situ*	Encapsulamento por sol-gel	Recobrimento por leito fluidizado
Policondensação	Microencapsulamento assistido por CO_2	*Pan coating*
		Evaporação de solvente

Fonte: JYOTHI et al, 2009.

A eficiência de encapsulamento de micropartículas ou microesferas ou microcápsulas depende de vários fatores distintos como concentração do polímero, solubilidade do polímero no solvente, taxa de remoção do solvente, solubilidade do solvente orgânico na água, etc. (JYOTHI et al, 2009).

Cortesi, Nastruzzi e Davis (1998) e Cortesi et al (1999) na preparação de microesferas de gelatina utilizaram um misturador mecânico para formar uma emulsão água/óleo sob condição laminar de agitação, e utilizaram acetona para desidratar e flocular as gotas coacervadas. A remoção do óleo residual foi realizada por lavagem das microesferas com acetona. Cortesi, Nastruzzi e Davis (1998) relataram que bons resultados foram obtidos usando recipientes com 50mm de diâmetro e misturador tipo rotor de turbina com três hélices de 35mm de diâmetro.

Quando o tamanho das partículas é inferior a 1µm são chamadas nanopartículas, nanocápsulas ou nanoesferas e partículas apresentando diâmetros entre 3 e 800µm são chamadas de micropartículas, microcápsulas ou microesferas e partículas maiores que 1000µm são conhecidas por macropartículas (JYOTHI et al, 2009).

As micropartículas produzidas podem ser estabilizadas por reticulação do polímero,

desolvatação ou tratamento térmico. Reticulação é a formação de ligações químicas entre cadeias moleculares para formar uma rede tridimensional de moléculas conectadas, tornando, assim, as micropartículas insolúveis.

Segundo Jyothi et al (2009) diferentes parâmetros afetam a eficiência de encapsulamento de micropartículas/microcápsulas/microesferas. Fatores como alta solubilidade do polímero no solvente orgânico, baixa solubilidade do solvente orgânico na água, baixa concentração do polímero, elevada fração fase dispersa/fase contínua e baixa taxa de remoção do solvente, levam a uma solidificação lenta de micropartículas, que levam a uma baixa eficiência de encapsulamento. Por outro lado, uma alta eficiência de encapsulamento é obtida quando ocorre rápida solidificação de micropartículas, o que é devido à baixa solubilidade do polímero no solvente orgânico, alta solubilidade do solvente orgânico na água, alta concentração do polímero, baixa fração fase dispersa/fase contínua e taxa de remoção do solvente rápida.

Yeom et al (2000) caracterizando o microencapsulamento descrevem que o tamanho das microcápsulas é dependente das seguintes condições de processamento: concentração do polímero na solução, teor do emulsificante, velocidade de agitação, teor do agente reticulante, solvente orgânico utilizado, etc.

Em relação ao processamento de materiais cerâmicos, a maioria envolve, em pelo menos uma de suas etapas, a obtenção de um fluido constituído por uma mistura de pós e líquidos. Estas misturas podem ser submetidas a processos de agitação, filtragem, bombeamento, dentre outros, e assim o controle das propriedades que influenciam a reologia do sistema se torna uma ferramenta indispensável. Dentre os fatores que influenciam a reologia do sistema podem ser destacados: concentração volumétrica de sólidos; características do meio líquido (como densidade); temperatura; características físicas das partículas (como distribuição granulométrica, densidade, morfologia, área superficial específica, etc.); tipo de interação entre as partículas (repulsão, atração); e quando utilizados dispersantes e aditivos, a concentração de moléculas de dispersante no meio líquido; peso molecular e conformação espacial da molécula de aditivos; espessura da camada de moléculas de dispersante adsorvidas em torno das partículas (BRITO; GOUVÊA; GANZELLA, 2007).

Existem muitos relatos sobre técnicas de desenvolvimento de grânulos de hidroxiapatita com geometria irregular ou esférica. Para a produção de grânulos esféricos e porosos de HA, Komlev, Barinov e Koplik, (2002) citaram uma produção por dispersão de uma mistura de HA/quitosana em um meio de dispersão composto de parafina líquida, com adição de glutaraldeído para reticulação e endurecimento das esferas, com aquecimento posterior para queima da quitosana. Porém, o exemplo citado apresenta o inconveniente de usar parafina e glutaraldeído. Assim, estes autores propuseram um método, para preparar grânulos porosos, que é simples, versátil e limpo, comparado com o descrito anteriormente, uma vez que não usa substâncias tóxicas para reticulação e usa óleo alimentício como meio de dispersão. O método proposto é baseado na imiscibilidade de líquidos. No estudo apresentado foi utilizada uma suspensão de hidroxiapatita/solução de gelatina dispersa em óleo, e produzidas microesferas com diâmetros na faixa de 50 a 2000μm, sendo o diâmetro médio e a distribuição de tamanho dependentes da velocidade de agitação e da fração HA/gelatina na suspensão inicial.

3.6.2 Formação de microcápsulas por processo baseado em imiscibilidade de líquidos

Quando dois líquidos imiscíveis são misturados, sob agitação, é formada uma dispersão onde simultaneamente ocorre um contínuo rompimento e coalescência de gotas formadas. Segundo Shinnar (1961 apud PINTO, 2006), o tamanho médio das gotas é dependente das condições de agitação que afetam a dispersão das seguintes formas: ocorre o rompimento das gotas em regiões de alto cisalhamento perto do agitador, a velocidade turbulenta e as variações de pressão ao longo da superfície de uma única gota podem causar o seu rompimento e, o escoamento turbulento pode acelerar ou diminuir a coalescência das gotas. A figura 1 mostra, esquematicamente, o mecanismo de rompimento de uma partícula deformada sob o efeito das forças de cisalhamento, e o mecanismo de coalescimento de partículas devido à colisão entre elas.

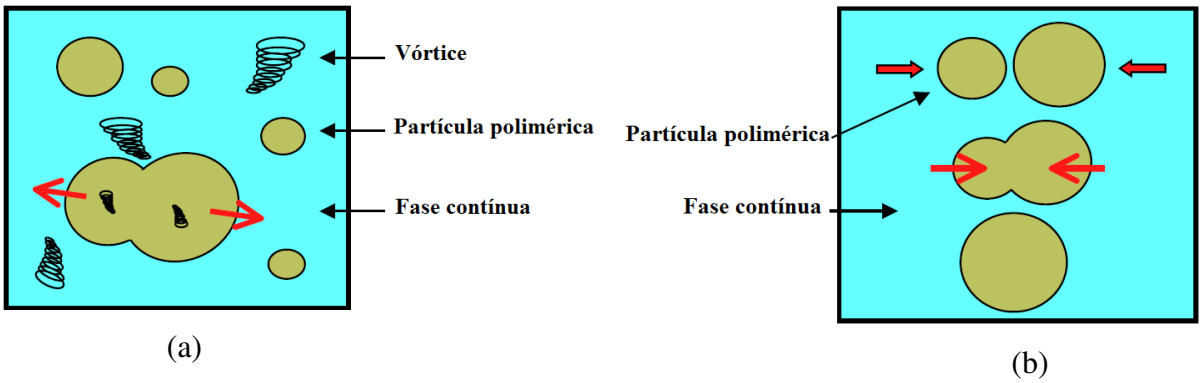


Figura 1 – Esquema dos mecanismos de rompimento (a) e coalescimento (b) de partículas.

Fonte: PINTO, 2006, p.13, 15.

Em uma dispersão os três processos ocorrem simultaneamente e o tamanho médio da gota da dispersão é determinado pelo que acontece no pequeno volume de fluido em torno de cada gota. Neste volume, a gota fica exposta às forças inerciais devido a flutuações da velocidade, e a forças viscosas de cisalhamento, ocorrendo uma deformação. Quando a deformação é grande, as gotas se tornam instáveis e se rompem em dois ou mais fragmentos. Mas para se tornar instável, a energia cinética de oscilação deve ser suficiente para prover o ganho na energia superficial devido ao rompimento. (PINTO, 2006).

De acordo com Narshiman et al (1980 apud PINTO, 2006), o rompimento das partículas pode ser classificado em:

a) rompimento erosivo, em que são geradas uma ou mais partículas filhas e uma ou mais partículas satélites, sendo que o volume de cada uma destas partículas satélites é muito menor que o da partícula filha;
b) rompimento completo, em que são geradas várias partículas filhas; e
c) rompimento binário, em que são geradas duas partículas, mas que raramente têm o mesmo volume.

Segundo Kumar et al (1992 apud PINTO, 2006) o rompimento de gotas não ocorre de uma só vez e sim em múltiplos estágios. Em um recipiente agitado, o rompimento é confinado em uma pequena região muito próxima ao agitador e no resto do recipiente ocorrem não somente

coalescência, mas também a recirculação de uma gota novamente para a região do agitador. Uma gota deformada pode relaxar na zona de circulação apenas parcialmente e entrar na zona do agitador em um estado deformado. Este processo pode continuar por muitos ciclos antes que a gota finalmente se quebre. Desta forma, para que ocorra o rompimento da gota, o recipiente com a dispersão, sob agitação, deve ser dividido em duas zonas, a zona de deformação e a zona de relaxamento.

Na zona de deformação, localizada na proximidade do agitador, a gota se deforma sobre a influência da tensão turbulenta, ocorrendo uma resistência à deformação devido à tensão interfacial e à tensão viscosa. A gota parcialmente deformada entra na zona de relaxamento, onde a tensão turbulenta é nula, e neste momento, a gota relaxa devido à tensão interfacial, ao mesmo tempo em que o relaxamento está sendo retardado pela tensão viscosa. O relaxamento continua durante o tempo de permanência da gota na zona de relaxamento e a gota parcialmente relaxada entra novamente na zona de deformação. Assim, há uma contínua recirculação das gotas entre as zonas de deformação e relaxamento. Este processo pode ocorrer por muitos ciclos antes que a gota se divida ou atinja uma situação onde a sua elongação em um ciclo seja exatamente balanceada por sua retração. Desta forma, o diâmetro máximo de uma partícula pode ser definido como o maior diâmetro da gota que entra na zona de deformação, sem deformação no começo do primeiro ciclo, e pode subsequentemente passar por infinitos ciclos de deformação e relaxamento sem se romper (PINTO, 2006).

Durante a agitação da dispersão, flutuações na velocidade local aumentam a taxa de colisão entre as gotas e a possibilidade de ocorrer de coalescência Porém, nem todas as colisões resultam em imediata coalescência, somente um pequeno número. Isto porque o filme líquido existente entre as gotas age como um elástico amortecedor. Quando duas gotas aderem uma à outra, a espessura deste filme decresce gradualmente devido à difusão. Entretanto, as flutuações de velocidade turbulenta podem dar energia suficiente para causar a separação das duas gotas antes da ocorrência da coalescência (PINTO, 2006).

Segundo Lowry et al (1986 apud PINTO, 2006)) a coalescência de partículas em uma dispersão pode ocorrer devido a três fatores:

a) movimento Browniano - com coalescência induzida pela energia térmica contida nas partículas coloidais, onde a intensidade de movimento é diretamente proporcional à temperatura e inversamente proporcional ao tamanho de partícula;
b) agitação do fluido pelo agitador – o movimento do fluido forma gradientes de velocidade que podem aumentar a força e frequência das colisões;
c) coagulação na interface ar-líquido - ocorre quando as partículas são adsorvidas nesta interface, mas este tipo de coagulação pode ser minimizado pelo controle da área superficial gás-líquido.

Um dos principais fatores que afetam a estabilidade de uma suspensão eletricamente carregada é a presença ou ausência da camada elétrica em torno das partículas suspensas. Durante a colisão de duas partículas suas camadas elétricas se sobrepõem. Se forem de mesmo sinal, estas tendem a se repelir, evitando a coalescência. A intensidade da inibição da coalescência é dada pela espessura das camadas elétricas. A espessura desta camada elétrica é muito sensível à força iônica da solução. Assim, a força iônica e o pH da reação têm de ser bem controlados, pois se esta precaução não for tomada, a estabilidade da emulsão é completamente destruída (PINTO, 2006).

Yeom et al (2000) afirmam que tamanho das cápsulas produzidas é determinado pelo tamanho das gotas formadas na emulsão e está associado com as forças cisalhantes viscosas desenvolvidas no sistema, e não é afetado pela cinética de reticulação. Assim, o tamanho das cápsulas é uma função direta da concentração do polímero, da quantidade do agente emulsificante e da velocidade de agitação. No trabalho desenvolvido, quando foram utilizadas baixa concentração de polímero e baixa velocidade de agitação, foram encontrados resíduos do polímero e cápsulas partidas, observados por microscopia eletrônica de varredura. Isto pode ser explicado em termos do balanço entre o tamanho das cápsulas produzidas e a espessura das suas paredes. As paredes das cápsulas formadas com baixa concentração de polímero podem ser mais finas enquanto que as de cápsulas formadas com baixa velocidade de agitação tendem a ser maiores. Portanto, as microcápsulas formadas com baixa concentração e baixa velocidade de agitação apresentam paredes tão finas que não podem manter a forma da cápsula e se rompem devido às forças cisalhantes do processo, por causa da baixa resistência mecânica. Entretanto,

quando a velocidade de agitação é suficientemente alta, as cápsulas podem ser formadas mesmo com baixa concentração de polímero, pois mesmo as cápsulas apresentando paredes finas, os diâmetros pequenos compensam o balanço entre tamanho e espessura das paredes, assim cápsulas menores podem ser obtidas nestas condições.

No trabalho de Pradeesh et al (2005) estudos da morfologia da fratura de microesferas contendo 50% de HA mostraram esferas densas e ocas, enquanto que microesferas preparadas com um teor maior de HA mostraram apenas esferas densas. No caso das microesferas preparadas com teor de HA até 50%, a maioria das microesferas maiores é oca, enquanto que as menores são densas. A formação das microesferas ocas, no caso das maiores, ocorre, principalmente, devido ao fato dos grânulos hidrofílicos de HA nas gotas terem a tendência de se mover em direção à superfície, enquanto que o polímero hidrofóbico se move da superfície para o centro. Assim, o centro das gotas apresenta uma concentração de polímero relativamente alta. Durante a retirada no polímero por tratamento térmico, o polímero é queimado e o centro das microesferas se torna um vazio. A superfície de cada gota se torna resistente apresentando uma alta concentração de HA. Porém, no caso de microesferas pequenas, a solidificação é rápida, restringindo o tempo de migração da HA para a superfície, mantendo assim uma distribuição uniforme na matriz polimérica. O polímero removido durante a sinterização deixa apenas os grânulos de HA uniformemente distribuídos pelas partículas, reduzindo as chances de formação de microesferas ocas.

3.6.3 Fatores de influência na produção de microesferas pelo processo baseado na imiscibilidade de fases

3.6.3.1 Partículas sólidas

A fração fase cerâmica/solução do polímero é um parâmetro crítico para as microesferas sinterizadas, devendo ser cuidadosamente selecionado. Microesferas com diferentes porosidades podem ser produzidas por este método, variando a granulometria e quantidade do pó cerâmico (RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2006).

A reologia de uma suspensão depende do estado de dispersão, ou seja, da concentração de sólidos e da distribuição de tamanho das partículas que a compõem. Em uma suspensão, pode-se considerar que parte do líquido presente seja utilizada para recobrir a superfície das partículas e ocupar os interstícios entre elas e parte fica disponível para promover a separação, formando uma camada de líquido entre as mesmas (ORTEGA; PILEGGI; PANDOLFELLI, 1999).

A análise da influência da distribuição granulométrica sobre a densidade de empacotamento e o grau de hidratação do sistema mostra que uma distribuição contínua de partículas leva a um melhor empacotamento, enquanto que uma distribuição heterogênea apresenta maior taxa de hidratação. Uma maior densidade de empacotamento, onde o grau de hidratação é menor, leva à formação de materiais com menor porosidade (CASTRO; PANDOLFELLI, 2009).

Para a obtenção de microestruturas homogêneas, puras e finas, pós puros com tamanhos pequeno, médio e grande devem ser usados. Entretanto, para um máximo empacotamento e mínima contração após a queima, uma mistura de aproximadamente 70% de partículas grosseiras e 30% de finas são sugeridas (DOROZHKIN, 2010).

Pradeesh et al (2005) citam que aumentando a quantidade de partículas sólidas de HA aumenta-se o diâmetro das microesferas, sendo este aumento do diâmetro devido, principalmente, à maior viscosidade da fase dispersa. E, devido a esta alta viscosidade, a quebra das gotas maiores em menores é difícil em velocidades mais baixas. Observaram, também, que a porosidade das microesferas decresce com o aumento da quantidade de HA, devido ao aumento na fração HA/polímero da fase dispersa. Aumentando o teor de HA aumenta o empacotamento dos grânulos nas microesferas o que por sua vez aumenta a sinterização e reduz o tamanho de poros/volume.

3.6.3.2 Concentração do polímero (ligante das partículas sólidas)

A eficiência do encapsulamento aumenta com o aumento da concentração do polímero (JYOTHI et al 2009).

Quando a concentração do polímero é muito baixa, microcápsulas não são obtidas por causa de uma parede muito fina formada. Por outro lado, quando o teor é muito alto, uma grande coesão ocorre e microcápsulas dispersas não são obtidas por causa da grande viscosidade das gotas formadas (YEOM et al, 2000).

O tamanho das microcápsulas é intensamente afetado pela concentração do polímero. Uma alta concentração resulta em cápsulas maiores e larga distribuição de tamanho. Esta tendência está associada com o aumento da viscosidade da solução polimérica devido ao aumento da concentração do polímero. Em geral, líquidos mais viscosos exibem uma maior resistência à quebra e deformação que fluidos com baixa viscosidade quando agitados. Consequentemente, eles formam gotas maiores e mais estáveis na emulsão comparados com os menos viscosos. É normal que à medida que a viscosidade da fase polimérica aumente, a distribuição de tamanho se torne mais larga e se desloque para diâmetros maiores (ESPOSITO; CORTESI; NASTRUZZI, 1996; TABATA, 1999; YEOM et al, 2000; ROKHADE et al, 2006).

Komlev; Barinov; Koplik (2002) produziram microesferas de hidroxiapatita utilizando gelatina como polímero ligante e observaram que a quantidade de poros abertos nos grânulos sinterizados depende da quantidade de gelatina utilizada na mistura inicial com o pó de hidroxiapatita e com a temperatura de sinterização. A porcentagem de contração dos grânulos depende da temperatura de sinterização e da quantidade de gelatina utilizada na solução. Na sinterização os ligantes orgânicos são removidos através de aquecimento em ar para oxidar as fases orgânicas em dióxido de carbono e água (DOROZHKIN, 2010).

Os polímeros naturais são preferidos por sua baixa toxicidade e biocompatibilidade, e dentre eles a gelatina é considerada uma boa matéria-prima devido à facilidade em formar filmes, nano e macro partículas, além de estar disponível em forma não pirogênica, um importante requisito para formulações injetáveis, poder ser utilizada em sistemas de liberação que requerem bioadesão, por ser biodegradável, não carcinogênica, e por apresentar baixo custo (ESPOSITO; CORTESI; NASTRUZZI, 1996; CORTESI et al, 1999, VANDELLI et al, 2004).

A gelatina é praticamente inodora e insípida. Normalmente é classificada de acordo com

sua força de gelificação, expressa em termos de *bloom*, que é a força em gramas que quando aplicada com um penetrador de 12,7mm de diâmetro produz uma depressão de 4mm de profundidade na gelatina gelificada contendo 6,66% de gelatina em água (% em peso). É insolúvel em acetona, clorofórmio, etanol (95%), éter e metanol. É solúvel em glicerina, ácidos e álcalis, embora ácidos fortes ou bases causem sua precipitação. Incha e amacia em água, gradualmente absorvendo 5 a 10 vezes seu próprio peso em água. É solubilizada em água quente e no resfriamento a 35-40°C forma um gel. Em temperaturas acima de 40°C o sistema existe como um sol. Um gel de alta viscosidade é formado em meios alcalinos comparado com os formados em meios ácidos. Quando reticulada forma uma membrana insolúvel em água (SINGH et al, 2002).

A gelatina é incluída na lista de ingredientes inativos pela FDA e no Reino Unido aparece na lista de fármacos licenciados e é descrita na maioria das farmacopéias (SINGH et al, 2002).

O principal inconveniente do uso da gelatina está na sua rápida solubilização em meios aquosos, o que resulta em perfis rápidos de liberação de medicamentos (CORTESI et al, 1999; VANDELLI et al, 2001). A solubilidade de proteínas é resultante de interações polares com o solvente aquoso, interações iônicas com os sais presentes e forças eletrostáticas de atração e repulsão, sendo também determinantes fatores como pH, temperatura e força iônica (COELHO; AMARAL, 2012). Este problema foi solucionado principalmente por procedimentos de reticulação. Os fatores que podem influenciar a taxa de reticulação da gelatina são seu peso molecular e ponto isoelétrico, as condições de reticulação, a temperatura e o pH (CORTESI et al, 1999; VANDELLI et al, 2001). O pH em que a gelatina apresenta carga neutra é definido como ponto isoelétrico da gelatina (pI), significando que as cargas positivas são iguais às cargas negativas. A gelatina, sendo uma proteína, exibe um comportamento anfótero, devido à presença de grupos funcionais de aminoácidos e de grupos terminais. Em meios ácidos, ou seja, na presença de altas concentrações de íons H^+, a gelatina é carregada positivamente e em meios alcalinos, ou seja, na presença de íons OH^-, a gelatina é carregada negativamente. No ponto isoelétrico as cargas positivas dos radicais NH^{3+} igualam-se às cargas negativas dos radicais COO^- (PONTO..., 2010).

A utilização de di ou polialdeídos como reticulantes aumenta a formação de produtos pouco solúveis ou insolúveis que podem retardar a liberação do medicamento encapsulado. Porém, a presença residual destes agentes de reticulação pode levar a efeitos tóxicos secundários, além de reações indesejáveis com o medicamento, o que pode resultar na formação de derivados tóxicos ou inativos. Para eliminar tais inconvenientes têm sido propostos outros processos para reticulação como tratamentos térmicos para endurecimento e o uso de agentes reticulantes naturais, como açúcar ou compostos derivados de açúcar a fim de conseguir uma liberação de medicamentos em longo prazo (CORTESI et al, 1999; VANDELLI et al, 2001).

Tabata et al (1999) prepararam microesferas de gelatina sem usar qualquer surfactante, usando a natural gelatinização da solução aquosa de gelatina com o abaixamento da temperatura. Adicionalmente ao abaixamento da temperatura, uma alta viscosidade do óleo previne a aglomeração das microesferas durante a preparação, sendo também, possível reticular a gelatina das microesferas devido à sua baixa solubilidade em água fria. Esta reticulação pode também ser realizada com o uso de substâncias químicas.

3.6.3.3 Fase contínua

Em relação à fração de fase dispersa/fase contínua, a eficiência de encapsulamento aumenta à medida que o volume da fase contínua aumenta (JYOTHI et al, 2009).

Tabata et al (1999) sugeriram usar óleo como uma alternativa para sistema de emulsão para a preparação de microesferas devido à sua alta viscosidade que pode prevenir a agregação.

No caso da utilização de um óleo como fase contínua, o tipo de óleo utilizado é importante para as dimensões das microesferas, para sua recuperação e para a prevenção de formação de aglomerados (ESPOSITO; CORTESI; NASTRUZZI, 1996).

A viscosidade do sistema aumenta com a concentração da fase que apresenta sólidos, porque com o aumento do teor de sólidos, diminui a distância média entre as partículas acelerando a formação de aglomerados. Quanto maior o teor de sólidos, mais difícil é a

estabilização da suspensão, uma vez que as forças repulsivas para superar a atração entre as partículas devem ser maiores que em suspensões com menor teor de sólidos (OLIVEIRA; SEPULVEDA; PANDOLFELLI, 1998).

Komlev, Barinov e Koplik (2002) na produção de microesferas encontraram maior quantidade de grânulos maiores com o uso de óleo em temperatura mais baixa. Na verdade os parâmetros envolvidos na determinação das dimensões são viscosidade e tensão superficial do óleo, que são afetados pela temperatura.

3.6.3.4 Velocidade de agitação

Na produção de grânulos esféricos de hidroxiapatita por um método baseado na imiscibilidade de líquidos, Komlev, Barinov e Koplik (2002) descrevem que ao ser adicionada a mistura contendo o material que se deseja conformar em esferas no meio de dispersão, a agitação resulta na formação de esferas devido às tensões superficiais. O método permite a produção de grânulos em uma larga faixa de dimensões, dependendo dos parâmetros utilizados. A distribuição de tamanho obedece a uma função de distribuição normal e a quantidade de grânulos grosseiros aumenta, geralmente, com a diminuição da velocidade de agitação e da temperatura do meio de dispersão. O tamanho médio e a distribuição de tamanho dos grânulos depende da velocidade de agitação e da fração HA/gelatina na suspensão inicial.

Na produção de microesferas Esposito; Cortesi; Nastruzzi, (1996), Tabata et al (1999) e Pradessh et al (2005), verificaram que um aumento na velocidade de agitação causa um decréscimo no tamanho das microesferas devido à quebra das gotas maiores da fase dispersa em gotas menores devido ao aumento da velocidade de agitação.

A taxa de agitação na suspensão é um dos fatores determinantes da distribuição do tamanho de partícula, já que é a principal causa da dispersão. A fase a ser dispersa está sujeita às flutuações turbulentas de pressão ou forças de cisalhamento viscosas, que forçam o seu rompimento em pequenas gotas, que assumem uma forma esférica sobre a influência da tensão interfacial. Estas gotas colidem com alta frequência e algumas destas colisões resultam em

coalescência. Caso não ocorra reação, após um determinado tempo é atingido um equilíbrio dinâmico, levando a um tamanho médio de partícula estacionário. As gotas individuais não permaneceriam com o mesmo tamanho, mas ficariam sob uma cinética contínua de rompimento e coalescência (PINTO, 2006).

Yeom et al (2000) demonstram que o tamanho médio das microcápsulas é reduzido com o aumento da velocidade de agitação. Demonstram, também, o efeito da taxa de agitação no tamanho das microcápsulas preparadas na ausência de emulsificante, que leva a uma distribuição de tamanho mais estreita e a um menor tamanho médio de partículas, estando este fenômeno diretamente relacionado com forças de cisalhamento. É postulado que a quebra da gota em campos turbulentos pode ser causado pelas forças cisalhantes viscosas, flutuações de pressão turbulenta e/ou flutuações da velocidade relativa. Entretanto, acima de certa velocidade, nenhuma variação significante da distribuição de tamanho é observada. É evidente que com o aumento da agitação, o tamanho das microcápsulas diminui acentuadamente até um valor limite.

3.6.3.5 Agente reticulante

A reticulação das cadeias poliméricas, também denominado de reação de entrecruzamento, é um tipo de modificação que visa unir suas cadeias poliméricas, ou ainda, ligar suas cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas híbridas (GONSALVES et al, 2011).

A utilização de agentes reticulantes visa principalmente à modificação de determinadas propriedades de um biopolímero, tais como, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, capacidade de imobilização de proteínas e células. Agentes de reticulação são substâncias que apresentam baixa massa molar e grupos funcionais reativos capazes de permitir a formação de ligações inter ou intracadeias poliméricas (GONSALVES et al, 2011).

O processo de reticulação sofre influência tanto de características físico-químicas do polímero quanto das condições reacionais adotadas. Aumentando-se o grau de reticulação, reduz-se a porosidade do material obtido, a permeabilidade à água e a difusão de possíveis substâncias aprisionadas nas redes poliméricas formadas (GONSALVES et al, 2011).

A reticulação de polímeros pode ser realizada através de métodos físicos ou químicos. Na reticulação física a dissolução é prevenida pelas interações físicas (iônicas) existentes entre diferentes cadeias poliméricas ou entre regiões do polímero e de um agente reticulante. Este tipo de reticulação apresenta um mecanismo reacional simples e o procedimento experimental é realizado em uma única etapa. Esta reticulação é sensível a alterações do pH e da força iônica do meio, demonstrando menor estabilidade, e é um processo reversível. A reticulação física pode ocorrer por interação iônica, por cristalização e por polissacarídeos hidrofobizados. Recentemente tem havido um crescente interesse na reticulação física. A principal razão é que o uso de agentes reticulantes pode ser evitado, pois, estes agentes não apenas afetam a integridade de substâncias a serem incorporadas, como, por exemplo, proteínas, células, mas estes agentes são frequentemente compostos tóxicos que devem ser removidos antes das micropartículas serem aplicadas (PATIL, 2010; GONSALVES et al, 2011).

Na reticulação química, ligações covalentes estão presentes unindo de forma permanente sítios reativos de cadeias poliméricas diferentes, através de ligações intermoleculares, ou regiões distintas de uma mesma cadeia por meio de ligações intramoleculares. A reticulação química é um método bastante versátil resultando em materiais com boa estabilidade mecânica. Fatores que afetam a reticulação química são tipo e concentração do agente reticulante, e tempo de reticulação. A alta concentração do agente reticulante induz uma rápida reticulação. Esta reticulação pode ocorrer pelos seguintes métodos: reticulação por polimerização, por aldeídos, por reação de adição e por reação de condensação (PATIL, 2010; GONSALVES et al, 2011).

O formaldeído e o glutaraldeído são duas substâncias normalmente usadas para a reticulação de microcápsulas/micropartículas utilizando gelatina, e devido à toxicidade, a remoção destas substâncias das formulações é crucial para aplicações médicas. Há vários métodos que podem remover esta substância, como usar nitrogênio gasoso para neutralizá-la e posteriormente lavar com água. Entretanto, estes tratamentos são caros e demorados. Assim como também são caros e demorados os processos de reticulação através da utilização de micro-ondas ou membranas de vidro microporosas. O uso de agentes reticulantes não tóxicos e/ou naturais parece ser a melhor alternativa para uso em microcápsulas/micropartículas alimentícias e farmacêuticas (HUANG et al, 2007).

No preparo de microcápsulas usando gelatina e goma arábica por coacervação Huang et al (2007) utilizaram a glicerina para reticulação em vez do agente formaldeído. Os autores observaram que as microcápsulas reticuladas com glicerina apresentaram uma parede mais permeável que as reticuladas com formaldeído, mas o tamanho das partículas não foi afetado pelos diferentes agentes reticulantes. A análise da distribuição de tamanho mostrou que as microcápsulas são multidispersas. Aumentando a quantidade do agente reticulante aumenta a capacidade de encapsulamento. Entretanto, resultados indicaram que acima de uma determinada quantidade esta habilidade diminui com o aumento do reticulante, devido à alteração do mecanismo e a inabilidade de integração na rede depois da adição de uma quantidade em excesso. A escolha da glicerina foi devido à sua segurança, vantagens econômicas e habilidade de aumentar a flexibilidade da gelatina pela redução das interações entre as cadeias. A glicerina é considera um material não tóxico e não irritante e é usada em uma grande variedade de formulações farmacêuticas, como produção de cápsulas flexíveis de gelatina, solventes em soluções orais e tópicas. Apesar disso, não existem muitas informações sobre os efeitos da glicerina em cápsulas de gelatina. A estabilidade das microcápsulas aumenta com o aumento no tempo de reticulação, entretanto após um tempo crítico a estabilidade decresce. Longos períodos de reticulação podem levar ao coalescimento e agregação. A determinação da quantidade do agente reticulante e do tempo de reticulação é essencial para a produção de microcápsulas/micropartículas (HUANG et al, 2007).

Segundo Vandelli et al (2001), a aparência superficial e o tamanho das microesferas não são afetados pelas condições de reticulação, isto é, tempo e concentração do agente reticulante.

A adição do agente reticulante só deve ser feita após as cápsulas estarem completamente formadas, assim, a quantidade do reticulante pouco afeta o tamanho e a distribuição de tamanho das microcápsulas, mesmo se adicionado em excesso. Abaixo da quantidade ideal as paredes das cápsulas não podem ser formadas, devido a reações de reticulação insuficientes decorrentes da baixa quantidade do agente no sistema. Reações de reticulação lentas podem levar à produção de microcápsulas deformadas, ou seja, não completamente esféricas. A distribuição de tamanho das partículas pode ser pouco afetada pela cinética da reação de reticulação, mas é afetada pelas forças de cisalhamento viscosas. Portanto, as forças cisalhantes associadas à velocidade de

agitação e à concentração do agente dispersante são fatores cruciais para a obtenção de microcápsulas de qualidade (YEOM et al, 2000).

Rokhade et al (2006) afirmam que o tamanho das partículas diminui com o aumento da quantidade do agente reticulante. Tabata et al (1999) explica que ocorre esta diminuição de tamanho devido ao aumento na concentração do agente reticulante aumentar a extensão das ligações cruzadas entre as moléculas do polímero, resultando na redução das distâncias entre as cadeias. O tempo de reticulação apresenta este mesmo efeito.

3.6.3.6 pH

Para controlar a reologia das suspensões concentradas há a necessidade de entender as forças entre as partículas e forças superficiais que ocorrem entre partículas cerâmicas vizinhas. Forças atrativas de Van der Waals entre partículas estão sempre presentes e induzem aglomeração. Forças eletrostáticas e /ou estéricas são os principais meios de induzir repulsão entre partículas. Forças eletrostáticas surgem de interações coulombianas, onde a força é repulsiva se ambas as partículas apresentarem a mesma carga e decresce com a raiz quadrada da distância entre partículas. O raciocínio por trás desta repulsão é que estas partículas carregadas atraem íons livres da solução, criando uma dupla camada elétrica que repele a dupla camada elétrica de outras partículas carregadas. Forças estéricas estão relacionadas com o tamanho das partículas que interagem onde duas esferas rígidas não podem chegar mais perto do que duas vezes seus raios (STUECKER; CESARANO III, 2011).

Quando se tratam de suspensões, um problema comum que ocorre é a aglomeração que leva à sedimentação. A aglomeração ou formação de estruturas tridimensionais de partículas ocorre pelas forças de atração existentes entre elas, forças de Van der Waals, originada pela interação entre dipolos elétricos, permanentes ou induzidos, presentes no interior das partículas. Apesar desta interação de dipolos ser bastante fraca, a somatória das forças atrativas de todos os dipolos elétricos das partículas resulta em uma força de atração relativamente alta. Como os dipolos elétricos são inerentes à matéria e as forças de Van der Waals são sempre atuantes, para evitar a aglomeração deve existir uma compensação por alguma força de repulsão. E como

durante uma emulsificação as partículas movem-se rápida e aleatoriamente, em decorrência do impacto das moléculas do líquido contra sua superfície, a estabilidade da suspensão depende então, do modo de interação das partículas durante a colisão. Quanto menor o tamanho das partículas, maior o efeito do impacto e maior a probabilidade de colisão entre elas (OLIVEIRA, Ivone R. et al, 2000).

A sedimentação é um processo natural que ocorre em misturas de partículas finas com um solvente decorrentes da instabilidade em função do tempo (MARCOS; CASTRO; GOUVÊA, 2001).

O comportamento na sedimentação, assim como o comportamento reológico, pode dar indicações qualitativas sobre o estado das suspensões, se floculada, defloculada ou coagulada. A floculação de partículas em uma suspensão ocorre quando as partículas são atraídas uma pelas outras, entrando em contato e assim permanecendo. Suspensões estáveis requerem partículas defloculadas, onde as forças repulsivas são elevadas. É possível deflocular partículas, entretanto em sistemas nos quais a dupla camada elétrica se torna comprimida e as partículas efetivamente se tocam, ocorre coagulação (STUECKER; CESARANO III, 2011).

Em suspensões dispersas as forças repulsivas devem ser maiores que as atrativas. As forças repulsivas originam-se através de mecanismos eletrostático, estérico e eletroestérico. No mecanismo eletrostático ocorre o desenvolvimento de cargas elétricas na partícula, em decorrência da interação da superfície com o meio. No mecanismo estérico, a adsorção superficial de polímeros de cadeias longas dificulta a aproximação das partículas por impedimento mecânico, e no mecanismo eletroestérico ocorre a adsorção específica de moléculas com grupos ionizáveis ou polieletrólitos, na superfície das partículas, na qual os íons provenientes da dissociação desses grupos ionizáveis somam uma barreira eletrostática ao efeito estérico (OLIVEIRA, Ivone R. et al, 2000).

As características eletrostáticas da superfície das partículas e das cadeias poliméricas dependem essencialmente do pH e da força iônica da suspensão, que determinarão o tipo de interação entre as cadeias e a superfície das partículas (ORTEGA et al, 1997; OLIVEIRA, Ivone

R. et al, 2000).

A carga de uma partícula em suspensão é dependente do meio circundante e do ponto isoelétrico da partícula (PIE). Em qualquer pH há sítios positivos, negativos e neutros na superfície das partículas. Entretanto, se o meio apresentar um pH mais elevado que o ponto isoelétrico da partícula, ela apresentará mais sítios negativos e a superfície da partícula ficará, relativamente, carregada negativamente. Um aumento no pH cria ainda mais sítios negativos e a superfície fica mais negativa. Inversamente, a diminuição do pH para valores inferiores ao ponto isoelétrico da partícula criará uma superfície de partícula relativamente positiva. O pH no qual o número de cargas positivas e negativas é igual é denominado ponto de carga zero (PCZ) e resulta em uma superfície neutra (ORTEGA et al, 1997; STUECKER; CESARANO III, 2011; OLIVEIRA, Ivone R. et al, 2000). Em sistemas livres de defloculantes, no ponto de carga zero, há ausência de repulsão eletrostática entre as partículas, o que permite que as forças de Van der Waals atuem livremente, provocando a floculação do sistema, e resultando em viscosidade máxima (ORTEGA et al, 1997).

A estabilização de suspensões em água é geralmente obtida através do controle do pH e pela adição de macromoléculas orgânicas ionizadas (polieletrólitos). Para suspensões aquosas, o pH final é função da ionização de grupos hidroxilas superficiais (MARCOS; CASTRO; GOUVÊA, 2001).

Huang et al (2007) escrevem que no processo de coacervação, o valor do pH de uma fase contínua com gelatina deve ser ajustado acima do seu ponto isoelétrico para formar gelatina carregada negativamente e assim ser possível criar gotas dispersas. Portanto, a distribuição de tamanho de partículas, ou seja, das gotas emulsificadas é afetada por fatores de ajuste de pH, especialmente pela taxa de adição de agentes acidificantes.

3.6.3.7 Acetona

A adição de solventes orgânicos, como acetona e álcool, a uma solução aquosa de proteínas diminui a sua solubilidade, diminuindo a atividade da água e assim aumentando a agregação por

interações eletrostáticas. Estes solventes devem ser usados somente em baixas temperaturas (inferiores a 0°C); para evitar a rápida desnaturação da maioria das enzimas. Outro aspecto a ser observado é que solventes como metanol, etanol e acetona são os mais comumente usados e são recuperáveis, porém como são inflamáveis, aspectos de segurança devem ser seriamente considerados (COELHO; AMARAL, 2012).

Na produção de microesferas de gelatina Cortesi; Nastruzzi; Davis (1998) e Cortesi et al (1999) utilizaram acetona para desidratar e flocular as gotas do coacervado e também para lavar as microesferas, eliminando o óleo residual da fase contínua que recobria as microesferas. Vandelli et al (2001); Vandelli et al (2004) e Kimura et al (2003) também utilizaram esta substância para lavar as microesferas produzidas.

3.6.3.8 Resfriamento

Reis et al (2006) resfriaram as gotas emulsificadas de solução de gelatina até uma temperatura inferior ao ponto de gelatinização, através de banho de gelo, para endurecimento das mesmas, que posteriormente foram reticuladas com formaldeído. Huang et al (2007) resfriaram a emulsão para separar as partículas coacervadas e Cortesi; Nastruzzi; Davis (1998), Cortesi et al (1999), Vandelli et al (2001; 2004) e Patel et al (2008) também baixaram a temperatura da emulsão durante o processamento das micropartículas.

3.6.3.9 Secagem, calcinação e sinterização

A secagem envolve remoção de água, subsequente contração do produto e variações locais do teor de água, podendo levar ao desenvolvimento de trincas e rachaduras durante este processo (DOROZHKIN, 2010).

A calcinação de microesferas, de materiais cerâmicos, produzidas por emulsificação é realizada para remoção, por degradação e queima, do material polimérico usado no processamento (Pradeesh et al 2005).

A sinterização é o tratamento térmico aplicado a cerâmicas verdes onde ocorre progressiva transição de partículas em simples justaposição para uma situação onde as partículas se encontram coesas. Durante este processo ocorrem várias modificações nas cerâmicas, como diminuição da área superficial, do volume, aumento da fase cristalina e das propriedades mecânicas. A diminuição do volume é consequência da densificação da cerâmica durante a sinterização que, por sua vez determina a porosidade do material. Pós mais finos resultam em materiais com menor porosidade, devido ao melhor empacotamento das partículas, pós mais grosseiros produzem maior porosidade. Foi observada uma relação inversa entre temperatura de sinterização e porosidade, mas nenhuma correlação entre o tempo de sinterização e porosidade. O aumento da temperatura de sinterização leva à redução da porosidade das amostras (ROSA; SHAREEF; NOORT, 2000).

A porosidade total é definida como a fração de volume de um corpo cerâmico que não é ocupado por matéria sólida. Esta característica não fornece informações sobre o tamanho de poros, sua distribuição e o grau de interconectividade. A porosidade é afetada pelos parâmetros microestruturais tamanho de grão, empacotamento, forma das partículas e distribuição de tamanho dos grãos. Quanto maior o tamanho dos grãos, menor a porosidade. Grãos não esféricos resultam em porosidade maior que grãos esféricos. A adição de partículas menores reduz a porosidade do corpo cerâmico porque podem preencher os interstícios entre as partículas maiores (GLOVER, 2011)

Durante o estágio inicial da sinterização, ocorre formação de empescoçamento ao longo de regiões de contato entre partículas adjacentes e, além disso, dentro de cada pescoço ocorre a formação de um contorno de grão, e cada interstício entre as partículas se torna um poro. À medida que o processo de sinterização progride, os poros se tornam menores e adquirem formas mais esféricas. Este processo é mostrado, esquematicamente, na figura 2, a seguir. Com a sinterização prolongada a porosidade é reduzida e o tamanho de grão aumentado (OLIVEIRA, F. P., 2008).

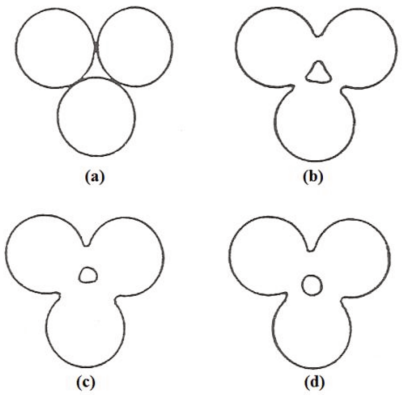


Figura 2 – Representação esquemática da sinterização de três partículas esféricas: (a) contato inicial, (b) crescimento dos pescoços, (c) e (d) arredondamento do poro.

Fonte: CHIAVERINI, 2001, p.106.

Segundo Kingery (1976 apud MENDES FILHO, 2006), durante a sinterização ocorrem mudanças devido à decomposição ou às transformações de fase, podendo-se destacar três grandes mudanças na microestrutura: aumento do tamanho de grão, mudança na forma dos poros e mudança de tamanho e número de poros e, consequentemente, diminuição da porosidade.

O tipo de material, tamanho das partículas, densidade inicial do corpo cerâmico compactado, atmosfera, temperatura, tempo e taxa de aquecimento são variáveis que influenciam o resultado final da sinterização (MENDES FILHO, 2006).

Tem sido relatado que a estrutura da hidroxiapatita aquecida a altas temperaturas pode ser modificada por vários fatores, incluindo métodos e condições de síntese, quantidade e tipo de impurezas presentes, atmosfera de aquecimento, aditivos, tamanho da amostra, tamanho de partículas e taxa de aquecimento da amostra. Sabe-se que a hidroxiapatita apresenta dois tipos de água em sua estrutura, adsorvida e água estrutural. A água adsorvida tem como características reversibilidade, instabilidade térmica de 23 a 200°C, e perda de peso sem qualquer efeito nos parâmetros de rede. Já a água estrutural apresenta perda irreversível em temperaturas de 200-400°C, o que causa uma contração no parâmetro de rede *a* durante o aquecimento (LIAO et al, 1999).

Um amplo estudo sobre os efeitos da temperatura e tempo de sinterização nas propriedades das biocerâmicas de hidroxiapatita mostraram uma correlação entre estes parâmetros e densidade, porosidade, tamanho de grão e resistência. O grau de densificação pareceu ser dependente da temperatura de sinterização, enquanto que o grau de difusão foi governado pelo tempo de sinterização (DOROZHKIN, 2010). Isto quer dizer que aumentando a temperatura aumenta-se o grau de ligação entre as partículas, enquanto que um aumento no tempo de sinterização aumenta a quantidade de material transportado (CHIAVERINI, 2001).

Amostras sinterizadas a temperaturas mais baixas apresentam porosidade maior, porém, sinterizar HA a temperaturas inferiores a 1100°C resulta em cerâmicas não completamente sinterizadas e acima de 1250°C ocorre a decomposição da HA em outros produtos, portanto, a escolha da temperatura de sinterização deve ser cuidadosamente escolhida (ROSA; SHAREEF; NOORT, 2000).

Em temperaturas mais altas, a hidroxiapatita gradualmente se desidrata, o que leva à liberação de íons OH^- e então é transforma em oxi-hidroxiapatita (OAP). A desidratação da hidroxiapatita não ocorre instantaneamente, mas em uma grande faixa de temperatura, a qual tem sido descrita como dependente, principalmente, da pressão parcial de água durante o aquecimento. Se for aquecida em vácuo, a hidroxiapatita perde seus íons OH^- em baixas temperaturas, aproximadamente 850°C. Se for aquecida em atmosfera com vapor d'água sua estrutura é preservada até 1100°C. Para a existência de OAP isto não deve ocorrer, além disso, uma completa desidratação da HA pode causar destruição da rede cristalina, originando uma mistura de fosfatos tricálcico e tetracálcico. (LIAO et al, 1999).

A sinterização da hidroxiapatita é complicada devido ao fato de ser uma fase hidratada que se decompõe em fosfatos de cálcio anidros como o fosfato tricálcico (TCP) em 1200-1450°C. A decomposição resulta da desidroxilação que ocorre em um ponto crítico, ou seja, em uma determinada temperatura. Abaixo desta temperatura crítica a estrutura do cristal da HA é mantida apesar da desidroxilação e a HA re-hidrata durante o resfriamento. Se a temperatura crítica for ultrapassada, ocorre uma completa e irreversível desidroxilação, resultando no colapso da estrutura da HA e sua decomposição. Significante desidroxilação ocorre acima de

aproximadamente 800°C, e de 75-80% do total dos grupos hidroxila podem ser perdidos reversivelmente. O ponto crítico, referido como temperatura de decomposição, corresponde à temperatura na faixa de 1200-1450°C, o valor dependendo das características do pó de HA (RUYS et al, 1995).

Ruys et al (1995) utilizaram faixa de temperatura de 900-1400°C, uma vez que ela engloba toda a região de interesse, do início da sinterização (900°C) ao platô da curva sigmoidal de sinterização (1100-1300°C), e através da decomposição da estrutura da HA acima de 1350°C. Com o aumento da temperatura observa-se uma perda de peso correspondente ao percentual da água perdida pelas células cristalinas da hidroxiapatita. Quando se coloca em um gráfico a perda de peso relativa à perda da água estrutural *versus* temperatura de sinterização podem ser observadas duas regiões lineares, uma de 100-800°C, correspondendo a uma taxa de desidroxilação lenta, e outra de 800-1300°C, correspondendo a uma taxa de desidroxilação acelerada. Assim, a cinética indica que a HA desidroxila em quase todas as temperaturas elevadas, mas 800°C é um valor razoável para atribuir um valor nominal à temperatura de desidroxilação.

A temperatura e a atmosfera de sinterização afetam a resistência mecânica da HA e a temperatura elevada pode eliminar o grupo funcional OH, tendo como consequência a decomposição da HA em outros fosfatos de cálcio e microporos que podem estar associados a esta eliminação (WEINAND et al, 2006; BEHNAMGHADER et al, 2008).

Os resultados do trabalho de Weinand et al (2006) mostraram uma correlação direta da temperatura de sinterização com diminuição da porosidade e aumento da área de contato entre as partículas, indicando que as propriedades físico-químicas estão relacionadas à porosidade do material. A microestrutura foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura e correlacionada à densificação e porosidade. Foi observado que as temperaturas de 900 e 1000°C não proporcionam uma difusão que permite um crescimento de grão com redução de porosidade. Para as temperaturas de 1100 e 1200°C, foi observado que o tratamento térmico possibilitou uma maior densificação do material com consequente decréscimo da porosidade, além da temperatura

mais elevada produzir um crescimento de grão. A crescente densificação do material está associada com o crescente aumento dos processos de difusão e transporte de massa entre as partículas devido ao aumento da temperatura. Em nenhuma destas temperaturas foi observada decomposição da hidroxiapatita. (WEINAND et al, 2006). Arita et al (1995) também não verificaram decomposição da hidroxiapatita na sinterização a 1200°C.

O processamento da hidroxiapatita em temperaturas mais elevadas pode levar a um exagerado crescimento de grão e à decomposição, devido ao fato da HA se tornar instável em temperaturas superiores a 1300°C. A temperatura de decomposição de biocerâmicas de HA é função da pressão parcial do vapor de água. Além disso, o processamento sob vácuo leva a uma decomposição precoce da HA, enquanto que o processamento sob alta pressão parcial de água previne a decomposição. Por outro lado, a presença de água na atmosfera de sinterização foi relatada como fator inibidor para a densificação e acelerador para o crescimento de grão (DOROZHKIN, 2010).

A sinterização da HA normalmente é realizada em temperatura de 1200±100°C por períodos de até 3 horas. A taxa de densificação depende da atmosfera, decrescendo com a mudança do ambiente de vácuo para ar e para ar úmido. Em temperaturas elevadas a decomposição para fosfato tricálcico ou tetracálcico degrada as propriedades do material sinterizado. A temperatura exata depende da técnica de síntese empregada e das impurezas presentes (GROSS; BERNDT, 2002), além disso, o fosfato tricálcico é considerado pouco sinterizável (BEHNAMGHADER et al, 2008).

Pradeesh et al (2005) realizaram calcinação do material estudado e observaram que ocorreu ao redor de 500°C, eliminando o material polimérico e ficando apenas a hidroxiapatita. As esferas, então, foram sinterizadas a temperaturas superiores a 1000°C, ocorrendo a sinterização dos grânulos individuais de HA, porém, a forma das microesferas permaneceu intacta.

Paul e Sharma (1999) observaram uma diminuição no volume de poros com o aumento da temperatura de sinterização e com a duração do tratamento. Através da análise por microescopia eletrônica de varredura, ficou evidente que os poros internos não são uniformemente distribuídos

e que não ocorre uma variação significante no volume de poros em esferas com diferentes diâmetros.

No trabalho de Fonseca et al (2011), os resultados das amostras sinterizadas a 1100°C mostraram uma fraca consolidação não sendo obtidas cerâmicas completamente sinterizadas, enquanto que as sinterizadas a 1300°C apresentaram uma estrutura densificada, com poros muito pequenos e não interconectados. Entretanto, amostras sinterizadas a 1250°C revelaram uma estrutura com poros aproximadamente uniformes e interconectados.

3.6.4 Caracterização de microesferas

Conz, Granjeiro e Soares (2005) realizaram a seguinte caracterização do material: morfologia, faixa de tamanho e área superficial dos grânulos. Investigaram também a presença de outras fases, a cristalinidade e os grupos químicos presentes. Para avaliar a morfologia e a porosidade dos grânulos, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura. A faixa granulométrica foi determinada por peneiramento. A área superficial foi determinada por análise BET com estimativa da área realizada pela adsorção de nitrogênio. A identificação de fases, além da hidroxiapatita, e os parâmetros de célula unitária foram determinados por difração de raios X. A cristalinidade foi determinada a partir de dados obtidos por difração de raios X.

Oliveira, F.P. (2008) realizou análise de hidroxiapatita por espectroscopia de infravermelho (FTIR) para obtenção de informações como identidade, pureza, presença de grupos funcionais (HPO_4^{3-}, CO_3^{2-}, PO_4^{2-}, etc.) e efeito da incorporação de um elemento sobre a frequência de vibração de outro grupo funcional.

Segundo Costa et al (2009) dentre as diversas técnicas de caracterização de materiais as mais utilizadas para a caracterização de hidroxiapatita são: difração de raios X, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier e microscopia eletrônica de varredura.

Para a caracterização de pós de hidroxiapatita, Mendes Filho (2006) utilizou difração e fluorescência de raios X, espectroscopia de infravermelho, análise térmica diferencial e gravimétrica, espectrofotometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado, microscopia eletrônica de varredura, medida de área superficial pelo método BET (Brunauer-Emmett-Teller), picnometria a hélio e granulometria. A técnica de difração de raios X fornece informações sobre as fases presentes, cristalinidade e para a confirmação de ausência de impurezas oriundas do processamento. A fluorescência de raios X fornece informações sobre os elementos químicos presentes na amostra, sendo útil também para confirmar a ausência de resíduos presentes. A análise termogravimétrica foi utilizada para monitorar qualquer reação envolvendo fase gasosa, como oxidação ou desidratação. A espectroscopia de infravermelho determina os grupos de átomos presentes em uma amostra. A técnica BET foi realizada para determinação da área superficial específica, e a picnometria para a determinação da densidade. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para verificar a morfologia do material.

A determinação da porosidade pode ser realizada através do método de absorção. Neste método o material cerâmico é imerso e um fluido que o molhe até completa saturação. O material é pesado antes e após a imersão, e se a densidade (ρ) do fluido utilizado é conhecida, então a diferença nos pesos é ρV_p e o volume dos poros V_p podem ser calculados (GLOVER, 2011).

Para medição de tamanho de partículas, o método mais comumente utilizado é o peneiramento através de uma série de telas com aberturas padronizadas, devido à ampla faixa de tamanhos que esta técnica permite cobrir. (PINTO, 2006). Quando as partículas passam em cada peneira a amostra é dividida em duas frações, uma que atravessa a abertura e outra que fica retida. A sucessão deste procedimento é chamada de análise granulométrica. A distribuição do material normalmente, não é homogênea dentro das frações, desta forma, não há um percentual do material em cada fração com um determinado tamanho, e sim uma distribuição aleatória de tamanhos que é relacionada às características e propriedades do material, dentro daquela faixa. A análise granulométrica por peneiramento não fornece a informação do tamanho da maior partícula e nem da menor. A separação por tamanhos fornece um valor aproximado para o tamanho médio de partícula entre duas aberturas de peneiras. Esta análise também não diferencia as formas das partículas. Uma partícula de forma acicular pode passar através de certa abertura de

tela, ou ser retida, dependendo de sua orientação durante o peneiramento. A ampliação da abertura devido à erosão do fio de uma tela pode também causar discrepância. Para partículas pequenas, a aglomeração devido à eletricidade estática ou à umidade também pode ocorrer. (MOTTA, 2009).

Após a obtenção do percentual de massa retido em cada peneira, pode-se calcular o diâmetro médio de Sauter que é um diâmetro médio superficial - volumétrico, que é considerado um dos mais importantes, por ser diretamente relacionado com a área superficial por unidade de volume e com a fração volumétrica da fase dispersa. É calculado pela através da equação:

$$D_S = 1/\Sigma(FM/D) \quad (2)$$

Onde:

D_S é o Diâmetro Médio de Sauter;

FM - fração mássica = Retenção(%) / 100.

Retenção (%) = (Retenção(g) / Total de Retido(g)) x 100;

Retenção (g) – é o peso da amostra que ficou retida em cada peneira;

D - diâmetro médio - é a média aritmética entre a abertura de duas peneiras consecutivas (PINTO, 2006).

3.6.5 Incorporação e liberação de medicamentos

A tecnologia de liberação de medicamentos apresenta um desafio interdisciplinar interessante para as áreas farmacêutica, médica, de biomateriais e da engenharia química (SIVAKUMAR; RAO, 2003).

Devido à suas propriedades fisico-químicas e biológicas, os fosfatos de cálcio são considerados um material com potencial para serem utilizados em sistemas de liberação de medicamentos para tecidos ósseos. Este tipo de sistema, usando uma matriz bioativa, pode liberar um agente terapêutico *in situ* para produzir uma ação associada à osteocondutividade do material (SIVAKUMAR; RAO, 2003).

Osteomielite crônica e infecções em próteses são um problema considerável em cirurgias ortopédicas (VIGUIER et al, 2011). O uso de um sistema de liberação de antibióticos para tratamento e prevenção de infecção óssea é importante, pois a limitada circulação sanguínea nos tecidos ósseos torna necessário o uso de grande quantidade do medicamento, para garantir que a dose terapêutica adequada chegue à região afetada (SIVAKUMAR; RAO, 2003).

Para reduzir os riscos de infecção, profilaxia é realizada por injeções intravenosas de um antibiótico, 1 ou 2 horas antes da cirurgia. O objetivo é saturar os tecidos do paciente com antibiótico durante o tempo da cirurgia. Entretanto, como o tecido ósseo é pouco vascularizado e a cirurgia danifica a vascularização no local operado, a concentração local do medicamento é baixa, e bactérias podem se proliferar. A utilização de antibióticos em doses elevadas por períodos prolongados, para garantir concentração adequada no local necessário, pode causar toxicidade. Além disso, longos tratamentos podem levar ao aparecimento de bactérias resistentes ao medicamento. Isto é um grande problema em hospitais, e o tratamento deve levar em conta a preservação da eficiência dos antibióticos disponíveis. Estes problemas podem ser solucionados com o uso de sistemas de liberação local de antibióticos, que apresentam a vantagem de atingir uma alta concentração local do medicamento com baixo risco de toxicidade sistêmica (VIGUIER et al, 2011).

No tratamento de infecções bacterianas, em cirurgias ortopédicas, um antibiótico eficiente é a gentamicina, que além de ser um antibiótico de largo espectro, apresenta efeitos sinergéticos na associação com outros antibióticos. Substitutos ósseos, impregnados com gentamicina, podem ser uma opção profilática eficiente se combinada com injeções intravenosas de antibióticos. Injeções intravenosas permitem a proteção de tecidos moles vascularizados desde o início do procedimento cirúrgico e a gentamicina aumenta a eficácia da proteção no local e nos tecidos ósseos (VIGUIER et al, 2011).

A hidroxiapatita pode ser usada em sistemas de liberação, incorporada com medicamentos anticâncer, antibióticos ou proteínas ósseas morfogenéticas, para o tratamento de tumores ósseos malignos, osteomielite ou fraturas de difícil recuperação (PAUL; SHARMA, 1997). No caso de tumores, este material fornece suporte de ação prolongada, permitindo que a doença seja tratada

com liberação gradual do medicamento no organismo, combinando tratamento do tumor com neoformação de osso (OLIVEIRA, D., 2010).

4 FASE INICIAL DO DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS

Após a escolha do processo de obtenção de microesferas de BCP, várias tentativas de síntese, chamadas de ensaios preliminares, foram realizadas, até que fosse conseguida a produção de partículas esféricas e dispersas. Nesta etapa, foi realizada a determinação das quantidades de cada uma das matérias-primas necessárias e a escolha dos parâmetros de processamento. Foram feitas alterações nas concentrações de gelatina em solução, de glicerina em solução e na quantidade desta solução, na quantidade e temperatura de acetona utilizada durante o processo, na temperatura da solução de gelatina, na utilização ou não de banho de gelo. Também foi variada a velocidade de agitação da emulsificação. Ainda nesta etapa, foram realizados ensaios de sinterização, para escolha da temperatura e tempo que resultassem em esferas com resistência à manipulação.

Conseguida a estabilização do processo, iniciou-se a produção das microesferas que deram origem à chamada fase inicial do trabalho de tese. Esta fase inicial mostrou duas possibilidades de produção, uma de microesferas porosas e outra de fabricação de *scaffolds* (peças de biocerâmicas porosas com elevada conectividade), utilizando o processo de obtenção de microesferas com algumas variações. As etapas desta fase do trabalho podem ser vistas no fluxograma mostrado na figura 3.

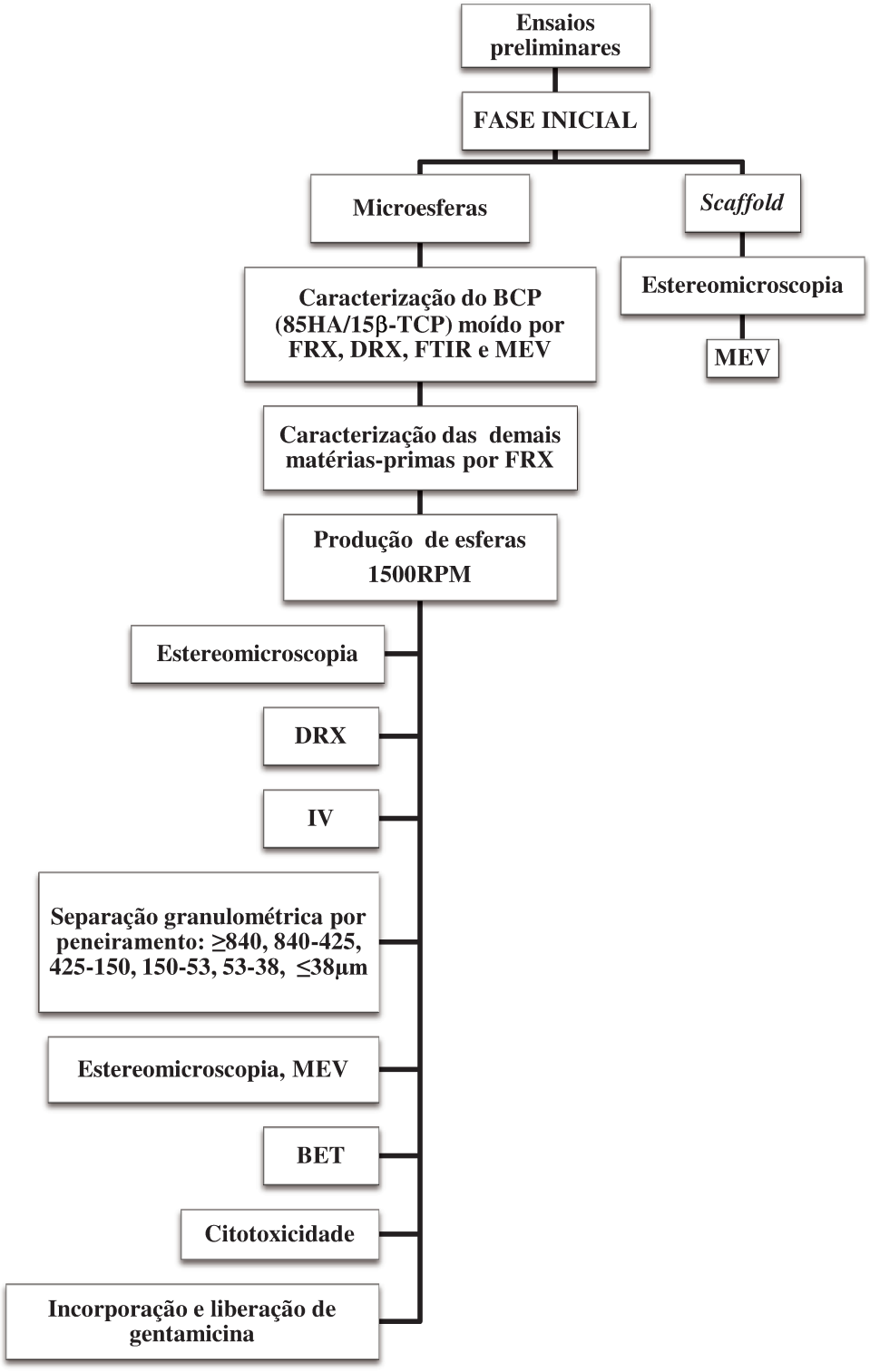


Figura 3 – Fluxograma da fase inicial de desenvolvimento de microesferas de BCP.

4.1 Metodologia

4.1.1 Materiais e equipamentos

Nos ensaios preliminares e nesta primeira fase do trabalho foi utilizado o fosfato de cálcio bifásico (BCP) fabricado e doado pela empresa Inside Materiais Avançados Ltda., com composição 85% de hidroxiapatita e 15% de β-TCP, e relação Ca/P de 1,65, segundo o fornecedor.

Foram também utilizados:

- gelatina bovina (Bloom 170-190; pH (10g/l) = 5-6) da Vetec Química Fina Ltda.,
- glicerina (P.A.) do laboratório Synth Ltda.,
- acetona (P.A.) dos laboratórios Synth Ltda, Ecibra (Cetus Ind. e Com. de Produtos Químicos Ltda.) e Alphatec,
- óleo de canola alimentício Purilev da Cargill Agrícola S.A.,e
- água deionizada - 1,3μS.

Na produção das microesferas foram utilizados os seguintes instrumentos ou acessórios de laboratórios:

- almofariz de porcelana,
- béqueres de vidro e plástico – capacidade 1000; 400 e 140mL,
- balança eletrônica Shimadzu Tipo BL3200H – capacidade de 3200g, sensibilidade de 0,01g,
- misturador mecânico: Fisatom 713 (rotação até 5000rpm) com agitador tipo hélice marinha de três pás,
- ebulidor elétrico,
- termômetro de mercúrio Incoterm – faixa de leitura de -10 a 250°C, sensibilidade 1°C (CEFET-MG),
- estufa: Sid Microeletrônica Ltda. CDTI/2 Coel,
- cadinhos de porcelana,

- peneiras com tela em aço inoxidável, caixilho também em aço inoxidável de dimensões 8”x2”, aberturas de 840, 425, 150, 53 e 38μm – Pavitest – Contenco Indústria e Comércio Ltda,
- peneirador Pavitest - Contenco Indústria e Comércio Ltda, I-1016 (A – base vibratória e B – controlador),
- condutivímetro PHTEK – CD-203; 0-1999μS; precisão ±2% escala completa,
- forno tipo mufla: Oga Indústria e Comércio Ltda.; modelo 400; potência 4400w Coel HW 4900,
- forno tipo mufla Brasimet – Tipo EGM 20/30 - 1200°C (CEFET – MG),
- forno com resistência de siliceto de molibdênio, Analógica Instrumentação e Controle NA-1600, com unidade de controle NA-2312 (CETEC),
- forno tubular Lindberg $T_{máx.}$1500°C (CETEC),
- pHmetro Hanna Instruments, modelo pHep+ HI98108.

Todos os instrumentos pertencentes à empresa Inside foram devidamente calibrados, devido ao certificado de boas práticas de fabricação da empresa.

Na caracterização dos materiais e das microesferas foram utilizados:

- estereomicroscópio Wild/Leitz
- câmera fotográfica digital Sony Cyber-Shot, 7,2 Mega Pixels, zoom óptico 5x
- espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier e no modo transmitância - Shimadzu
- difratômetro de raios X - Shimadzu
- espectrômetro de fluorescência de raios X - Shimadzu
- microscópio eletrônico de varredura - Shimadzu

4.1.2 Produção das microesferas

O método utilizado para a produção baseia-se no processo de imiscibilidade de líquidos,

onde um líquido é emulsificado em outro, e foi desenvolvido após estudo dos trabalhos de Cortesi, Nastruzzi e Davis (1998), Cortesi et al (1999), Paul e Sharma (1999), Yeom et al (2000), Vandelli et al (2001), Komlev, Barinov e Koplik (2002), Kimura et al (2003), Vandelli et al (2004), Huanga et al (2007), e Patel et al (2008). A tabela 3 mostra os parâmetros de produção de microesferas utilizados por estes autores, e nos quais o processamento desenvolvido foi baseado.

Tabela 3 – Parâmetros de produção de microesferas utilizados nos artigos estudados.

Parâmetro	Artigo									
	1	**2**	**3**	**4** (2 2mulaões)	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Tamanho das microesferas (µm)	80-126	80-120	212-1000	5-55	~40	50-2000	60-130	15-85	0,4-5	50-100
Quantidade de HA (g)	-	-	20	-	-	50	-	-	-	-
Solução de gelatina:			quitosana	polímero						
Gelatina (g)	15% (p/v)	15% (p/v)	2%	0,5-10%	6	10	1	9	e acácia 5-10%	5
Água (ml)	10	5	~40	10	20	100	10	30	?	45
Fração gelatina/água	-	-	-	-	0,3	0,1	0,1	0,3	-	0,11
Temperatura da solução (°C)	80	80	-	-	-	39	40	60	-	-
Fase contínua – óleo	soja	parafina	parafina	?	semente de algodão	colza	oliva	semente de algodão	gergelim	oliva
Quantidade (ml)	200	20g	500	100	40	500	375	60	?	200
Temperatura do óleo (°C)	-	80	-	-	60	15-30	40	60	65	-
Fração solução de gelatina/óleo	0,05 0,21 bom resultado	?	?	0,1	0,5	0,2	0,25	0,5	0,2	0,225
Emulsificante										
Tipo	-	-	SPAN 80	SPAN 80	-	-	-	-	polissorbato 80	-
Quantidade (ml)	-	-	0,4mg	0,5-15	-	-	-	-	0,1-1	-

Tabela 3 (continuação) – Parâmetros de produção de microesferas utilizados nos artigos estudados.

Parâmetro	Artigo									
	1	**2**	**3**	**4** (2 2mulaões)	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Fração emulsificante/gelatina	-	-	-	a) fase contínua (solvente orgânico) 15 b) SPAN/ sol.gel. = 150	-	-	-	-	emulsi-ficante/ óleo = 0,1	-
Agente reticulador	glucose frutose sacarose	dextran	gluta-raldeí-do	sol. de gluta-raldeí-do (25%)	a) sol. de acetona b) glice-raldeí-do	-	sol. aquosa de gluta-raldeí-do (25% peso)	-	sol. de formal-deído ou sol. de glice-rol	a) sol. de gluta-raldeí-do 10 e 40M (pernoi-te) b) glicina
Quantidade	5% (p/p)	0,375g	?	0,5-5mL	a) 60 (40aceto-na/20água b)0,5; 1; 2% (p/v) a 5ºC	-	0,025 mL	-	6%	a) ? b) 1,125g
Fração reticulador/sol. gel. (g/ml)	0,02	0,075	?	0,05	?	-	0,0025 (mL/mL)	-	?	0,025

Tabela 3 (continuação) – Parâmetros de produção de microesferas utilizados nos artigos estudados.

Parâmetro	Artigo									
	1	**2**	**3**	**4** (2 2mulaões)	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Adição de outras substâncias										
Tipo	acetona	acetona	-	-	acetona (5ºC)	-	acetona	acetona	-	-
Quantidade (mL)	150	30	-	-	60	-	100	90 (15min)	-	-
Fração sol.gel./substância	0,07	0,17	-	-	0,33	-	0,1	0,33	-	-
Velocidade de agitação (RPM)	fluxo laminar	fluxo laminar	400	?	800	200-500	420	1000	11000-16000	500
Tempo de agitação (min)	5	5	5	?	60 24h	2	24h (25ºC)	10	10 a 20	90
Resfriamento a (°C)	15	15	-	-	5 banho de gelo	-	-	5 banho de gelo sob agitação (10mim)	<10	10
Lavagem										
Substância	acetona	acetona	a) acetona b) éter	?	acetona (5ºC)	a) acetona b) ácool	aceto-na (5x)	aceto-na	-	aceto-na
Quantidade (mL)	250	80 (3x)	?	?	?	?	?	25	?	?
Tipo de filtragem	filtro de vidro	filtro de vidro	? 30min após adição do glutaral-deído	?	?	cone Buechner	centri-fuga-ção	?	?	à vácuo

Tabela 3 (continuação) – Parâmetros de produção de microesferas utilizados nos artigos estudados.

Parâmetro	Artigo									
	1	**2**	**3**	**4** (2 2mulaões)	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Secagem **Temperatura (°C)**	?	?	60	?	rápida	ao ar	-	à vácuo (10mm Hg)	?	liofili-zação (e peneira mento)
Tempo (h)	?	?	3	?	?	?	-	2 dias	?	?
Calcinação da gelatina **Temperatura (°C)**	-	-	500	-	-	500	-	-	-	-
Tempo (min)	-	-	60	-	-	30	-	-	-	-
Sinterização **Temperatura (°C)**	-	-	1100	-	-	1000-1200	-	-	-	-
Tempo (min)	-	-	60	-	-	120-60	-	-	-	-
2ª Lavagem – substância	-	-	água destila-da	-	acetona (rapida-mente)	água destila-da	- glicina (100ml de sol. 10mM contendo Tween 80 (0,1%p) agitado, a 37°C/1h) - água bidestila da (2x)	-	-	-

Tabela 3 (continuação) – Parâmetros de produção de microesferas utilizados nos artigos estudados.

Parâmetro	Artigo									
	1	**2**	**3**	**4** (2 2mulaões)	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
2ª Secagem Temperatura (°C)	-	-	200	-	? (a vácuo)	180	Centri-fugação - Freeze-drying	-	-	-
Tempo (h	-	-	24	-	24	2	-	-	-	-
Estocagem	disse-cador (8% umida-de)	disse-cador (8% umida-de)	-	-	-	-	-	-	-	-

1) CORTESI; NASTRUZZI; DAVIS (1998); **2)** CORTESI et al (1999); **3)** PAUL; SHARMA (1999); **4)** YEOM; RHIM; LEE (2000); **5)** VANDELLI et al (2001); **6)** KOMLEV; BARINOV; KOPLIK (2002); **7)** KIMURA (2003); **8)** VANDELLI et al (2004); **9)** HUANG et al (2007); **10)** PATELet al (2008).

Para a produção das microesferas, foi preparada uma solução aquosa de gelatina a 55°C, e a esta solução adicionou-se o fosfato de cálcio bifásico (BCP) moído, agitando manual e suavemente até a formação de uma mistura homogênea. Esta pasta foi vertida em um recipiente contendo óleo de canola sob agitação, formando uma emulsão e assim as microesferas. Após a formação das microesferas adicionou-se à mistura uma solução aquosa de glicerina, com a finalidade de reticular a gelatina e, assim, melhorar a resistência das microesferas produzidas e prevenir a aglomeração. Decorrido o tempo necessário para a reticulação, adicionou-se acetona resfriada, com o objetivo de desidratar as microesferas. Posteriormente, cubos de gelo foram adicionados ao redor do recipiente, para o endurecimento da gelatina, devido ao abaixamento da temperatura. Estes procedimentos foram realizados para evitar a aglomeração, uma vez que não era desejado o uso de emulsificantes. Foi mantida a agitação durante todo o processo, e a velocidade utilizada foi de 1500RPM. Terminado o processo, o líquido foi escorrido, as microesferas recolhidas, lavadas com acetona e, deixadas para secagem ao ar, a temperatura ambiente pelo período mínimo de 12 horas. As microesferas foram, então, calcinadas a 500°C e resfriadas até a temperatura ambiente, posteriormente foram sinterizadas, e separadas granulometricamente por peneiramento, utilizando-se peneiras com aberturas de 840, 425, 150, 53 e 38μm.

4.1.3 Caracterização físico-química dos materiais e das microesferas

Os ensaios de caracterização físico-química foram realizados em laboratórios do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET/MG, da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, da Faculdade de Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG e da Inside Materiais Avançados Ltda.

4.1.3.1 Fluorescência de raios X (FRX)

Os ensaios de fluorescência de raios X foram realizados no Laboratório de Caracterização de Materiais do CEFET-MG em equipamento Shimadzu, modelo EDX-720. Foram analisadas todas as matérias-primas utilizadas e as microesferas sinterizadas. As análises das matérias-

primas: BCP, gelatina, glicerina, acetona, óleo de canola e água deionizada foram realizadas com o intuito de verificar a presença de contaminantes, e a das microesferas para verificar a presença de resíduos dos materiais utilizados na produção.

4.1.3.2 Difração de raios X (DRX)

Foram realizados ensaios de difração de raios X no BCP utilizado e nas esferas sinterizadas. O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu, modelo Lab.XRD 6000, pertencente ao Laboratório de Difratometria de raios X do setor de Análises Químicas do CETEC. Na realização dos ensaios foram utilizadas as seguintes condições: tubo de cobre; voltagem de 40kV, corrente de 30mA, faixa de varredura de 4-80° (2θ), velocidade de 2°/min, passo 0,02°.

Os ensaios foram realizados para identificação das fases presentes no BCP e para verificar se a temperatura de sinterização havia provocado o aparecimento de nova fase além da hidroxiapatita e do β-TCP.

4.1.3.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Foram realizados ensaios de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) no BCP moído e nas microesferas, em um equipamento Nicolet 380 – Thermo Scientific, utilizando cristal de seleneto de zinco (ZnSe), com varredura de 500 a 4000cm^{-1}, pertencente à UFMG.

Estes ensaios foram realizados para confirmar os resultados das análises de difração de raios X, verificando nas microesferas sinterizadas a presença de resíduos das matérias-primas utilizadas no processo de obtenção.

4.1.3.4 Estereomicroscopia

A caracterização das microesferas por estereomicroscopia foi realizada na empresa Inside

Materiais Avançados Ltda., em equipamento da marca Wild Heerbrugg Typ 327615 – com ampliações na faixa de 8 a 62 vezes.

Esta análise foi realizada sempre após a obtenção de microesferas, e após a sinterização e separação granulométrica, para verificar a morfologia e a existência de aglomeração.

4.1.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização do BCP moído, das microesferas verdes e sinterizadas nas diferentes condições e faixas granulométricas, por MEV, foi realizada no Laboratório de Caracterização de Materiais do CEFET-MG, em equipamento da marca Shimadzu, modelo SSX-550, com voltagem de 15kV.

Durante esta primeira fase do trabalho a caracterização por MEV acompanhou a evolução do processo de obtenção das microesferas, verificando a morfologia, superfícies e a presença de poros.

4.1.3.6 Distribuição granulométrica

A distribuição granulométrica das microesferas produzidas foi realizada por peneiramento, utilizando peneiras com aberturas de 840, 425, 150, 53 e 38µm. Inicialmente o material foi peneirado utilizando-se um peneirador com base vibratória e, em sequência, peneiramento manual, que se mostrou mais rápido e eficiente.

4.1.3.7 Porosidade das microesferas

A determinação da porosidade foi realizada no Laboratório de Caracterização de Sólidos Particulados do Departamento de Engenharia Metalúrgica da Escola de Engenharia da UFMG. Foram utilizadas microesferas na faixa granulométrica de 150-425µm, e volume e diâmetro médio dos poros e área superficial das microesferas foram avaliados através do método BET, em equipamento Quantachrome – Nova Station A, utilizando o gás nitrogênio.

Adicionalmente, o volume dos espaços internos das microesferas,ou seja, poros, foi estimado através de um processo descrito em um trabalho de Paul e Sharma (1999). Para a determinação do volume de poros, foi medida a massa das microesferas secas e, em seguida, as microesferas foram imersas em água deionizada, a temperatura ambiente, durante 24 horas. Após este tempo, as microesferas foram removidas, levemente secas com papel filtro, e novamente foram determinadas suas massas. O volume de água incorporada ou o volume dos poros foi determinado usando a equação:

$$V_p = (w_2 - w_1)/w_1.d \quad (3)$$

onde:

w_1 – massa das microesferas secas,

w_2 – massa das microesferas com água, e

d – densidade da água.

4.1.4 Caracterização biológica

Ensaio de citotoxicidade

Ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram realizados em microesferas na faixa granulométrica de 150 a 450µm, previamente esterilizadas.

A esterilização das microesferas de BCP foi realizada no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN, classificado como Irradiador Panorâmico Multipropósito de Categoria II, fabricado pela MDS Nordion do Canadá, Modelo/número de série IR-214 e tipo GB-127, equipado com uma fonte de Cobalto-60, estocada a seco, com atividade máxima de 2.200TBq ou 60.000Ci. A dose otimizada para a realização da esterilização foi de 15 a 30 kGy, sendo selecionada a dose 25 kGy.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi realizado pelo Laboratório de Análises Científicas MEDLAB, usando o método de difusão em agar, linhagem celular NCTC Clone 929, células de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL1). As amostras foram testadas em quadruplicatas,

em placas separadas. Referências bibliográficas utilizadas foram *ASTM F895-84: 1984-Standard test method for Agar diffusion cell culture*, *ISO 10993.5:2009-Biological evaluation for medical devices test for Cytotoxicity, in vitro methods* e *US Pharma*copeia *32*, *2009, -Biological reactivity tests in vitro*. O controle positivo foi realizado em fragmento de látex tóxico e o controle negativo em discos de papel de filtro atóxico.

4.1.5 Ensaios de incorporação e liberação de medicamentos

Visando a utilização das microesferas como carreadores de medicamentos, foi realizado um estudo para avaliar a capacidade de incorporação e o perfil de liberação. Foram utilizadas microesferas com diâmetros entre 150 e 425µm, que é o tamanho mais utilizado no preenchimento de defeitos ósseos. O medicamento utilizado foi o sulfato de gentamicina, do fornecedor Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., escolhido por ser um antibiótico de largo espectro e o mais utilizado em cirurgias ósseas.

Os ensaios de encapsulamento e liberação da gentamicina foram realizados na Fundação Ezequiel Dias – FUNED, localizada na cidade de Belo Horizonte, Minas gerais.

A determinação da concentração do sulfato de gentamicina incorporado nas esferas e liberado no meio, em ensaios *in vitro,* foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid cromatography* – HPLC) usando método adaptado da *United States Pharmacopeia* (*U.S. Pharmacopeia 32, 2009*). O cromatógrafo usado é equipado com amostrador automático e foi fabricado pela Merck. Foi utilizada uma bomba e uma vazão constante de 1,5mL/min. Uma coluna de fase reversa C-18 (4,6mm x 125mm) preenchida com octadecil silano quimicamente ligado à sílica porosa foi utilizada. A fase móvel foi composta por heptanosulfonato de sódio (0,5% w/v) solubilizada em uma mistura de metanol, água ultra-filtrada e ácido acético glacial (70:25:5). Um detector de ultravioleta (Merck, EUA) foi usado em um comprimento de onda de 330nm. A validação do método mostrou a ausência de interferência dos compostos da solução tampão com o sulfato de gentamicina, descartando o risco de superestimação.

Incorporação da gentamicina nas microesferas:

100mg de microesferas foram imersas em 10mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4 contendo 100mg de sulfato de gentamicina, a temperatura ambiente por 24h. As microesferas foram separadas por centrifugação realizada três vezes a 2500xg por 15 minutos, secas a temperatura ambiente por 48h e em estufa por 24h, um lote em cada condição.

A quantidade de gentamicina encapsulada foi calculada indiretamente, através da medição da diferença de concentração do medicamento no meio antes e após a colocação das microesferas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Estudo *in vitro* da liberação da gentamicina pelas microesferas:

O estudo de liberação foi realizado em 10mL de PBS (pH 7,4) sob condições de imersão, em banho-maria mantido à temperatura constante de 37°C acoplado a uma placa de agitação. 100mg de microesferas com sulfato de gentamicina foram adicionados a pequenos frascos de vidro individuais, que foram mantidos sob agitação durante todo o estudo. Em intervalos de tempo definidos (2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 84 horas), 1,0 mL do meio de incubação foi retirado e 1,0 mL de meio fresco foi imediatamente adicionado a cada frasco de amostra. As amostras coletadas foram analisadas por cromatografia, conforme descrito anteriormente. O experimento foi realizado em triplicata. Ambos lotes de microesferas, secas à temperatura ambiente e em estufa foram avaliados para comparação.

4.1.6 Obtenção e caracterização de *scaffolds*

Durante a realização dos ensaios preliminares foi identificada a possibilidade de produzir *scaffolds* a partir do processo de produção das microesferas. Isto pode ser feito deixando as microesferas produzidas se aglomerarem e controlando o tratamento térmico posterior. Foram realizados testes utilizando duas metodologias diferentes para este tratamento, porém os dois processos serão estudados futuramente, sendo apresentada aqui apenas a viabilidade da produção.

A caracterização dos primeiros *scaffolds* obtidos foi realizada através da observação por lupa, esteromicroscópio e microscopia eletrônica de varredura. A observação por lupa foi realizada em laboratório do Setor de Tecnologia Metalúrgica da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, por estereomicroscópio na empresa Inside Materiais Avançados Ltda. utilizando um equipamento Wild Heerbrugg Typ 327615 e a microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de Caracterização de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG, em um equipamento Shimadzu, modelo SSX-550.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Caracterização físico-química dos materiais e das microesferas

4.2.1.1 Fluorescência de raios X (FRX)

Os ensaios de fluorescência de raios X realizados no BCP e nas esferas sinterizadas mostraram a presença de cálcio e fósforo como elementos majoritários, de silício como elemento minoritário e traços de potássio, estrôncio, enxofre, ferro, cobre e zircônio. Os ensaios das demais matérias-primas mostraram ausência de contaminantes.

4.2.1.2 Difração de raios X (DRX)

A análise da difração de raios X indica que as partículas não apresentam impurezas cristalinas distinguíveis e mostra a presença de picos característicos da fase β-TCP. Os difratogramas do BCP moído e das microesferas, mostrados na figura 4, diferem em intensidade, mas apresentam os mesmos picos. Isto mostra que o processo de obtenção das microesferas não deixa resíduo e que a cristalinidade aumentou com a sinterização.

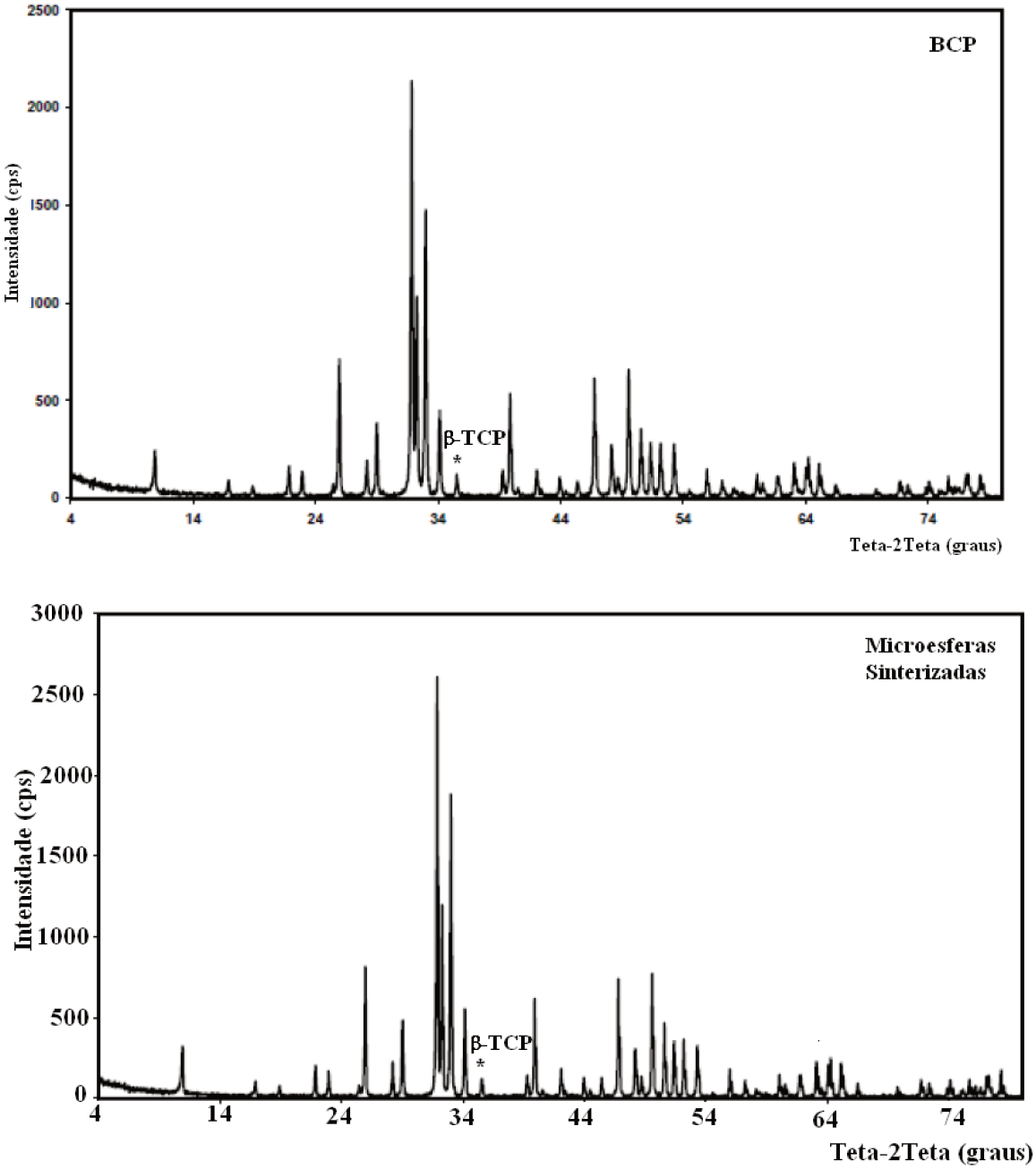


Figura 4– Difratogramas do BCP (85HA/15β-TCP) moído e das microesferas sinterizadas a 1190°C/1h.

4.2.1.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR do BCP e das microesferas sinterizadas são mostrados na figura 5. Os espectros apresentam as bandas características do material e confirmam os resultados da difração e fluorescência, mostrando que não existe a presença de contaminantes. nas microesferas produzidas. As bandas de absorção encontradas neste trabalho estão de acordo com as encontradas com diversos autores, como citado na tabela 4.

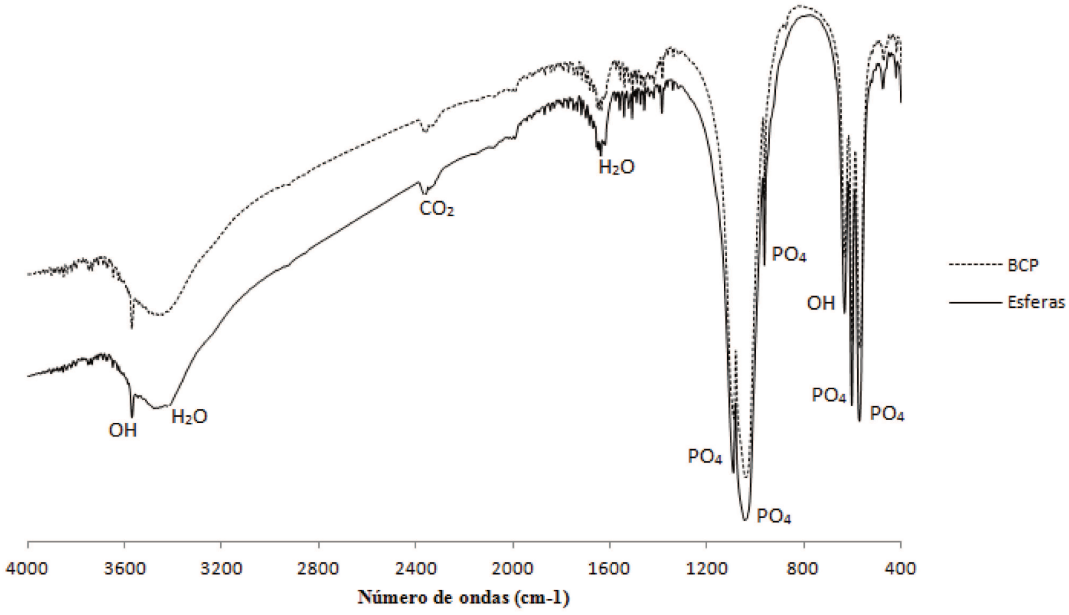


Figura 5 – Espectros de FTIR do BCP (85HA/15β-TCP) e de esferas sinterizadas a 1190°C/1h.

Tabela 4 – Bandas de absorção na região do infravermelho de BCP e de microesferas de BCP.

	Região de absorção (cm^{-1})	**Designação da banda**	**Referências**
BCP	472, 571, 601, 962 e 1089	PO_4	PAUL; SHARMA, 1999; TOYAMA et al, 2010; FOOK, A.; APARECIDA; FOOK, M., 2010; OLIVEIRA, F.P., 2008; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2005; RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007; QIU; XIAO; LIU, 2008;
Microesferas	473, 570, 601, 962, 1044 e 1090		
BCP	632, 3572	OH	PAUL; SHARMA, 1999; OLIVEIRA, F. P., 2008; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2005; RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007; NATH; BISWAS; BASU, 2008;
Microesferas	632, 3571		
BCP	1624, 3446	H_2O	OLIVEIRA, F. P., 2008; PAUL; SHARMA, 1999; TOYAMA et al, 2010; FOOK, A.; APARECIDA; FOOK, M., 2010; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2005; QIU; XIAO; LIU, 2008
Microesferas	1636, 3486		
BCP	875	CO_3	RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007; QIU; XIAO; LIU, 2008; TOYAMA et al, 2010; FOOK, A.; APARECIDA; FOOK, M., 2010; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2005
Microesferas	-		

4.2.1.4 Estereomicroscopia

A figura 6 é uma estereomicrografia de microesferas utilizadas no estudo de avaliação da

capacidade de incorporação e liberação de medicamentos, onde pode ser visto que as microesferas produzidas apresentam morfologia esférica.

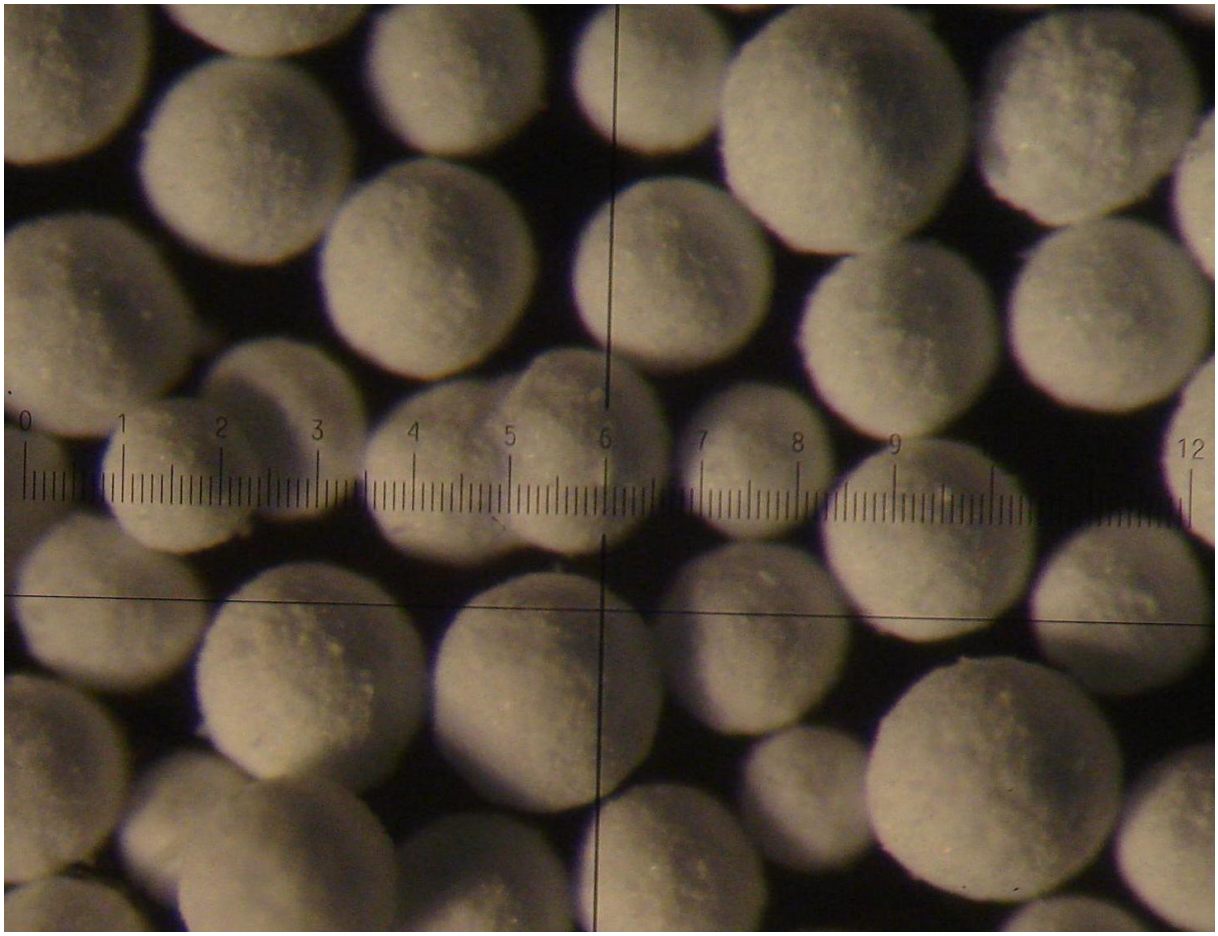
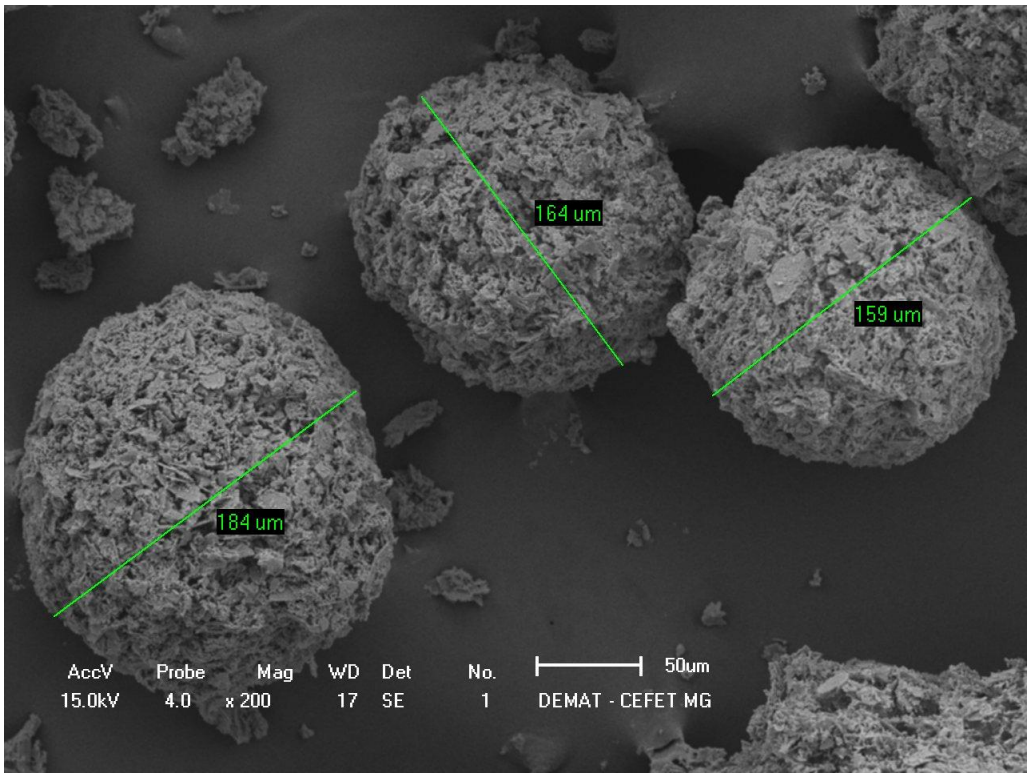


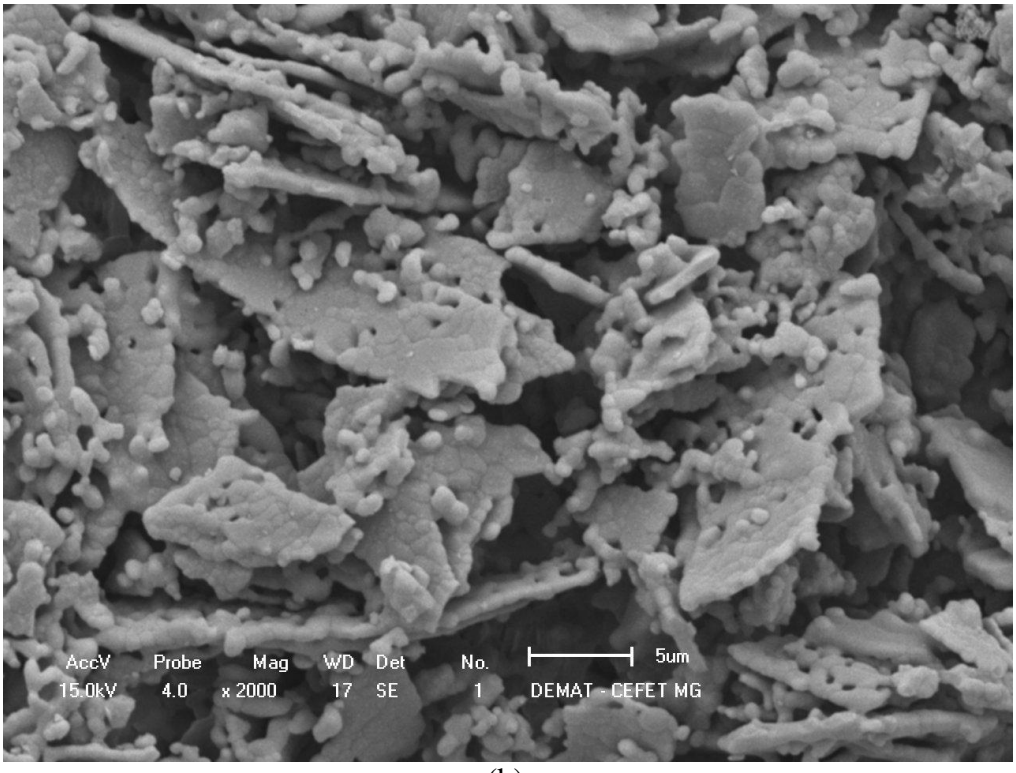
Figura 6 – Estereomicrografia de microesferas de BCP (85HA/15β-TCP) sinterizadas, com diâmetros entre 150-425µm.

4.2.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia e a superfície das microesferas são mostradas na figura 7, onde pode ser observada a superfície rugosa das microesferas e a presença de poros nas partículas sinterizadas.



(a)



(b)

Figura 7 – Imagens de MEV de microesferas de BCP (85HA/15β-TCP) utilizadas para incorporação e liberação de medicamentos.

4.2.1.6 Distribuição granulométrica

A distribuição granulométrica das microesferas produzidas é mostrada na tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição percentual das microesferas de BCP (85HA/15β-TCP) por faixa granulométrica, de acordo com as aberturas das peneiras utilizadas.

Diâmetro das microesferas (µm)	**Quantidade obtida (%)**
≥840	2
840 > Ø ≥ 425	24
425 > Ø ≥ 150	19
150 > Ø ≥ 53	31
53 > Ø ≥ 38	20
< 38	4

As microesferas separadas granulometricamente tiveram aplicações diversas. Algumas foram cedidas para a realização de trabalhos de mestrado do Curso de Mestrado em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG, que utilizaram diferentes faixas granulométricas. As microesferas com granulometria acima de 425µm foram utilizadas na dissertação intitulada "Desenvolvimento de novos materiais para uso no craqueamento catalítico de combustíveis nos motores de combustão interna". As microesferas com diâmetros entre 150 e 53µm foram utilizadas no "Estudo da biocompatibilidade de compósito de carboximetilcelulose (CMC) e biocerâmicas (fosfato de cálcio bifásico – BCP) de uso injetável para reparação da cartilagem articular". As microesferas com diâmetros na faixa granulométrica de 53-38µm foram cedidas para um trabalho de mestrado relativo ao desenvolvimento de um preenchedor dérmico. E, as microesferas com diâmetros entre 425-150µm foram utilizadas nesta fase inicial do trabalho, na avaliação do potencial de incorporação e liberação de medicamentos, visando a utilização na reparação/regeneração de tecidos ósseos.

4.2.1.7 Porosidade das microesferas

Os ensaios de porosidade através do método BET das microesferas na faixa granulométrica de 150-425µm apresentaram os seguintes resultados: área superficial das microesferas de 1.11m^2/g, volume de poros de 0.003cm^3/g e diâmetro médio igual a 0.18µm.

A análise adicional usando a equação 3 mostrou um volume de poros de 0.12cm^3/g.

A diferença entre este resultado e o resultado do ensaio BET parece ser devido à grande afinidade da hidroxiapatita e água, assim a água adsorve melhor nas esferas que o nitrogênio utilizado no primeiro ensaio.

4.2.2 Caracterização biológica - citotoxicidade

Para as células NCTC Clone 929, de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL1) utilizadas, as amostras não apresentaram efeitos tóxicos.

O relatório de ensaio da avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro* elaborado pela empresa Medlab é mostrado no Anexo A.

4.2.3 Ensaios de incorporação e de liberação de medicamentos

Incorporação

A porcentagem de gentamicina incorporada foi de 41,2±2,0 e 45,1±1,5 para as amostras secas a temperatura ambiente e em estufa, respectivamente.

Liberação de gentamicina

O ensaio *in vitro* de liberação de gentamicina pelas microesferas de BCP mostrou que em 82 horas aproximadamente 85% do medicamento foram liberados, como pode ser visto na figura 8. Este resultado mostra que as microesferas produzidas apresentam potencial para uso na

reparação e regeneração óssea, quando se necessita de uma liberação prolongada. Isto porque o tempo indicado para tratamentos profiláticos é de 48h, no máximo.

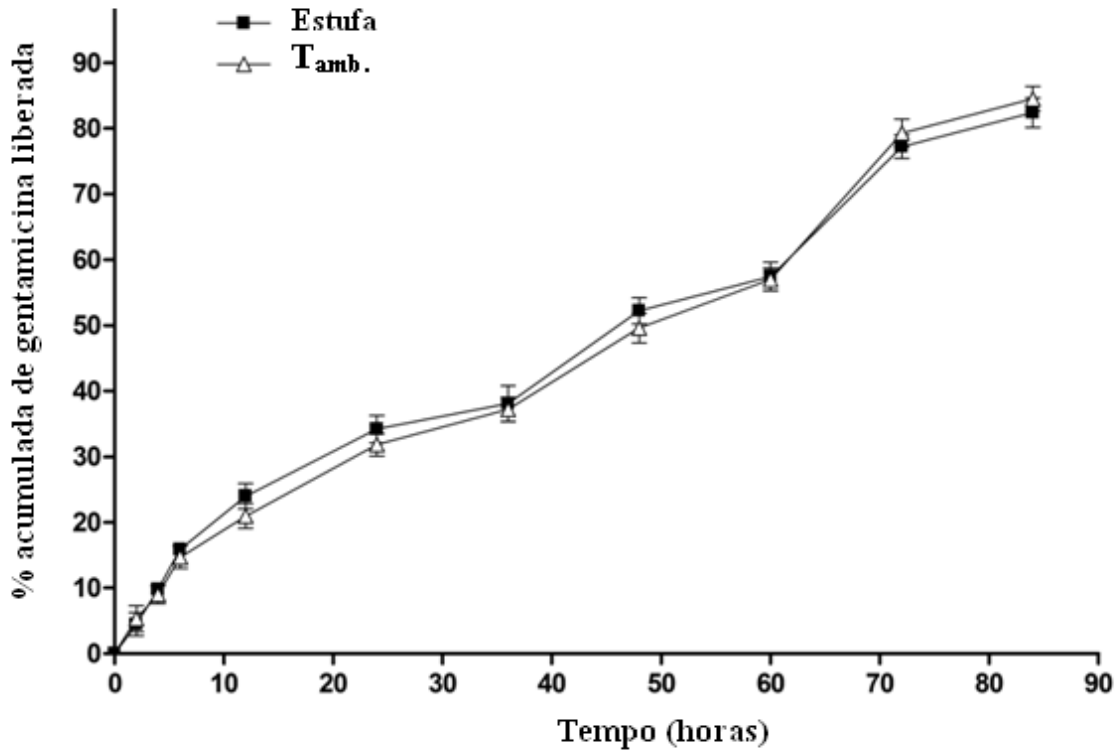


Figura 8 – Perfil de liberação do antibiótico gentamicina por microesferas porosas de BCP (85HA/15β-TCP) com diâmetro entre 150-425μm.

4.2.4 Artigos publicados

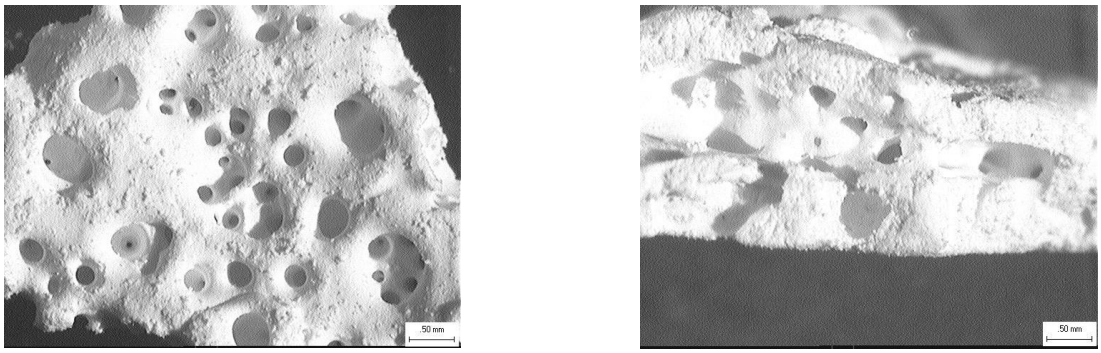
Foram publicados dois artigos e um resumo. Os dois artigos foram apresentados no 23rd Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine (ISCM) - Bioceramics 23, e publicados na revista Key Engineering Materials – KEM (Scientific.Net – Materials Science and Engineering), publicada no sítio http://www.scientific.net/KEM. O resumo foi apresentado no XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise –

CSBMM 2011: Multidisciplinaridade na Microscopia. Estes trabalhos são mostrados no APÊNDICE A.

4.2.5 Caracterização dos *scaffolds*

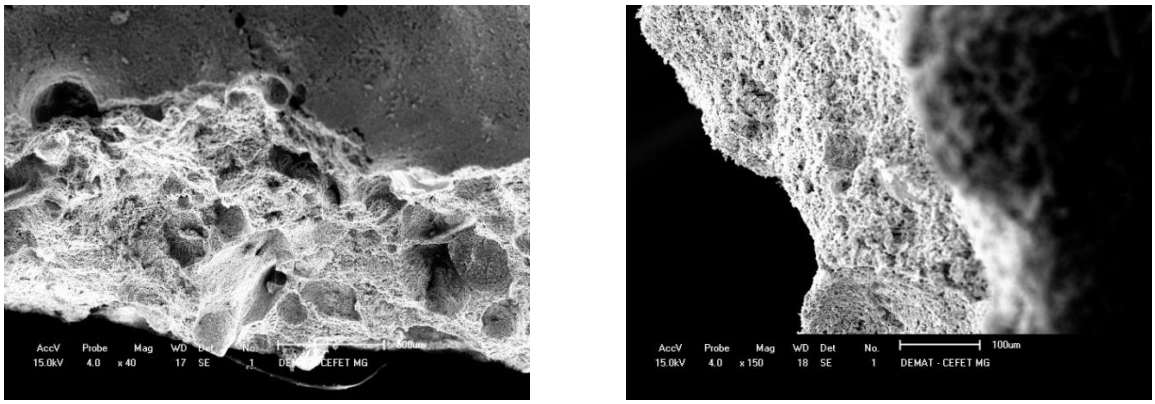
A figura 9 apresenta a primeira estrutura porosa obtida, que indicou a possibilidade de obtenção de *scaffolds* pelo mesmo processo de obtenção das microesferas, porém com algumas alterações nas etapas intermediárias. A imagem obtida em estereomicroscópio mostra uma estrutura macroporosa, com indícios de poros interconectados. A figura 10 mostra imagens das áreas superficial e transversal, respectivamente, obtidas através de lupa, de outro ensaio para obtenção de *scaffolds*, onde podem ser vistos macroporos. Através de imagens de microscopia eletrônica de varredura, figura 11, de superfícies transversais desta segunda estrutura produzida, pode-se observar a presença de macro e microporos.

Figura 9 - Estrutura porosa obtida em ensaio preliminar. Imagem de estereomicroscópio.



(a) (b)

Figura 10 – Imagens de lupa de áreas superficial (a) e transversal (b) do material resultante do segundo ensaio para a obtenção de um *scaffold*. Ampliação original: 9x



(a) (b)

Figura 11 – Imagem de MEV da segunda estrutura obtida - superfícies transversais.

Através de uma segunda forma de produção de *scaffolds*, obteve-se a estrutura apresentada na figura 12. A estrutura mostra que o empacotamento produz poros interconectados, resultantes dos espaços entre as microesferas. A estrutura apresentada mostra apenas a possibilidade de obtenção de *scaffolds* pelo método, não tendo sido realizado nenhum controle sobre o tamanho de microesferas utilizadas, desta forma, não se controlando também o tamanho dos poros. O material foi submetido apenas ao tratamento de calcinação.

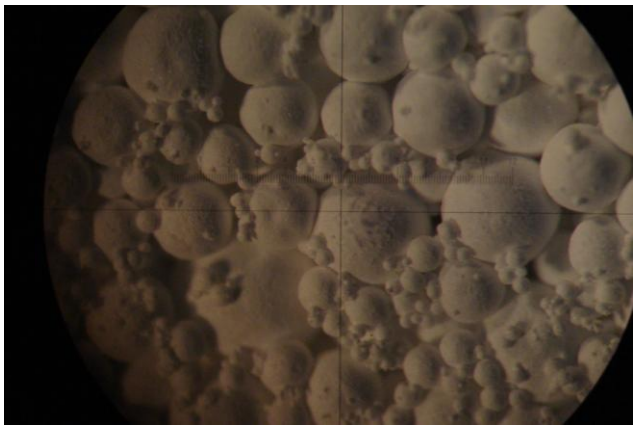


Figura 12 – Imagem de estereomicroscopia de uma peça produzida a partir de microesferas.

5 FASE DE APRIMORAMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO

Na etapa inicial foi detectada a necessidade de melhorar a resistência à manipulação das microesferas, o que levou à necessidade de produção de mais material. Com o término do lote fosfato de cálcio bifásico (BCP 85HA/15β-TCP) utilizado, novo lote foi produzido pela empresa Inside, apresentando nova proporção de fases cristalinas (BCP 90HA/10β-TCP). A partir deste ponto do estudo, somente foi utilizado este segundo BCP.

Esta fase do trabalho consistiu na seleção de parâmetros de produção de microesferas buscando aperfeiçoar, basicamente, a resistência mecânica e morfologia. Isto foi feito através de determinação das condições de sinterização (temperatura/tempo), velocidade de agitação, métodos de separação das fases líquidas, dentre outros.

As etapas desta fase de aprimoramento do processo de produção das microesferas de BCP produzidas podem ser vistas através do fluxograma mostrado na figura 13, a seguir.

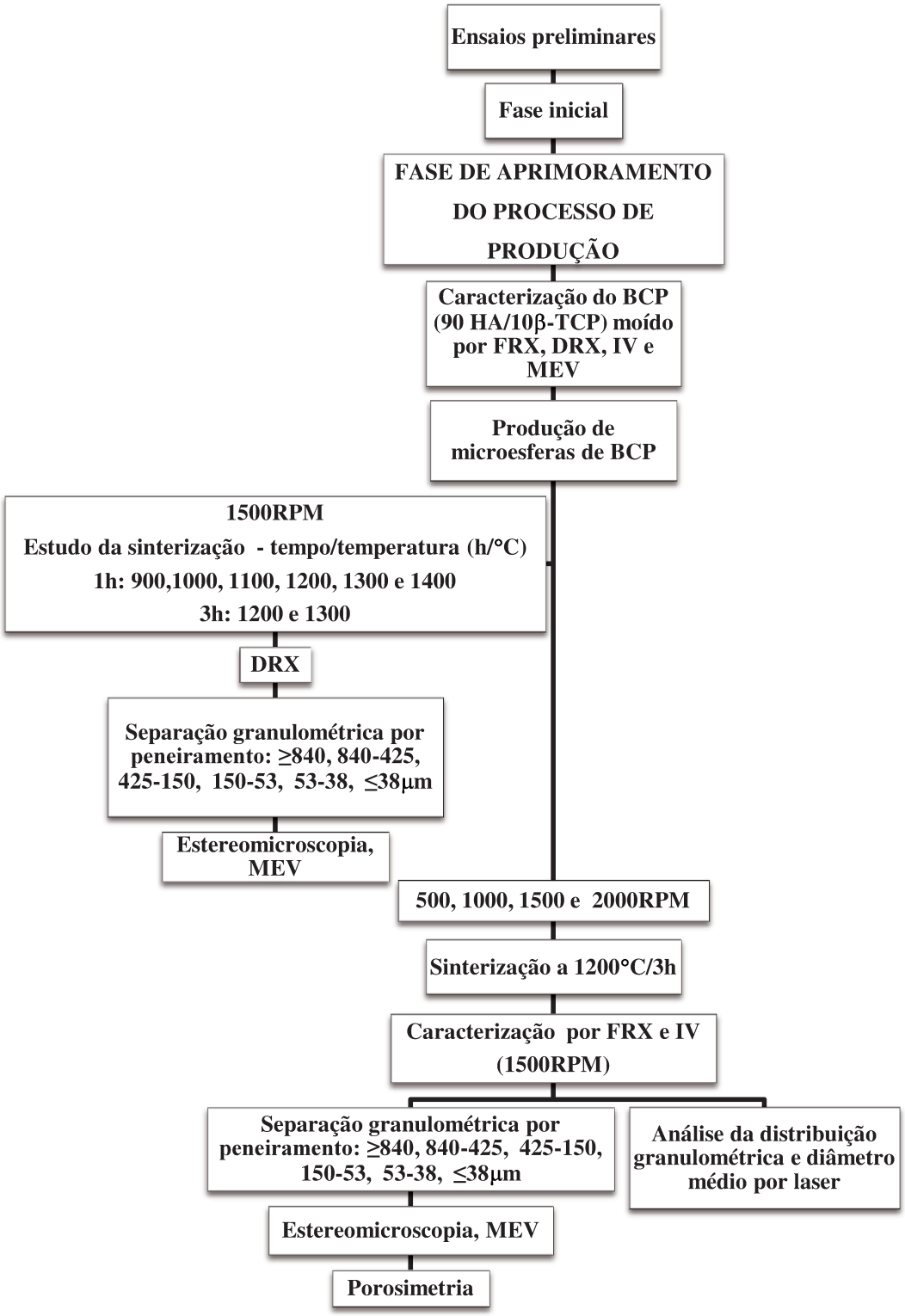


Figura 13 - Fluxograma da fase de aprimoramento do processo de produção de microesferas de BCP.

5.1 Metodologia

5.1.1 Materiais e equipamentos

O BCP utilizado nesta etapa do trabalho também foi doado pela empresa Inside Materiais Avançados Ltda. (Neomatrix), e apresentou, em sua composição, 90% de hidroxiapatita e 10% de β-TCP.

Os demais materiais e equipamentos foram os mesmos utilizados na fase inicial de desenvolvimento de microesferas e são listados na seção 4.1.1.

5.1.2 Produção das microesferas

A produção das microesferas foi realizada nos laboratórios da empresa Inside Materiais Avançados Ltda. e as sinterizações, em laboratórios da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC.

A metodologia utilizada para a produção de microesferas, descrita na seção 4.1.2, sofreu ajustes nos parâmetros de processamento, como por exemplo, quantidade e temperatura de acetona adicionada e inclusão de duas etapas no processamento. Assim, após a sinterização e antes do peneiramento, as microesferas foram lavadas com água deionizada e secas em estufa, a 180°C, por duas horas, visando eliminar partículas soltas de BCP, que poderiam ficar aderidas às microesferas, devido a forças eletrostáticas.

5.1.2 1 Determinação da temperatura de sinterização

Foi realizado um estudo para determinação dos parâmetros de sinterização, temperatura e tempo, que resultassem em microesferas com adequada resistência à manipulação. A condição de sinterização escolhida foi utilizada no processamento das microesferas a serem utilizadas na avaliação da influência da velocidade de agitação.

As condições foram as seguintes: temperaturas de 900, 1000, 1100, 1200, 1300 e 1400°C por 1 hora e 1200 e 1300°C por 3 horas. Os resfriamentos foram realizados dentro e junto com o forno.

As sinterizações nas temperaturas de 900 a 1200°C foram realizadas no Laboratório de Materiais Óticos e Eletrônicos, em forno tubular Lindberg, com temperatura máxima de 1500°C. Já as sinterizações nas temperaturas de 1300 e 1400°C foram realizadas no Laboratório de Materiais Cerâmicos, em forno com resistência de siliceto de molibdênio, marca Analógica Instrumentação e Controle, modelo NA-1600, com unidade de controle NA-2312. Os dois laboratórios são da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC.

5.1.2.2 Determinação da influência da velocidade agitação

Foram produzidas microesferas conforme a metodologia já citada, porém variando a velocidade de agitação do processamento, para verificar a influência deste parâmetro nas microesferas obtidas. As velocidades utilizadas neste estudo foram 500, 1000, 1500 e 2000RPM.

5.1.3 Caracterização físico-química do BCP e das microesferas

Os ensaios de caracterização físico-química foram realizados em laboratórios do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET/MG, da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, da Faculdade de Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG e da Inside Materiais Avançados Ltda.

5.1.3.1 Fluorescência de raios X (FRX)

Os ensaios de fluorescência de raios X foram realizados no Laboratório de Caracterização de Materiais do Departamento de Materiais do CEFET-MG, em um equipamento da marca Shimadzu, modelo Ray Ny – EDX-720. Foram analisados o pó do BCP utilizado na produção das

microesferas e as microesferas sinterizadas. Os ensaios visaram determinar a presença ou não de impurezas no BCP e resíduos das matérias-primas nas microesferas produzidas.

5.1.3.2 Difração de raios X (DRX)

Os ensaios de difração de raios X do BCP moído, das microesferas verdes e das sinterizadas, em todas as condições citadas no item 3.2.1, foram realizados no Laboratório de Caracterização de Materiais do Departamento de Materiais do CEFET-MG. As amostras particuladas foram moídas em almofariz de ágata e então preparadas para análise. O equipamento utilizado é da marca Shimadzu, modelo XRD-7000 – Maxima. Os ensaios foram realizados utilizando-se tubo de Cu, kα de 1,54Å, com monocromador com abertura de 1mm, fenda divergente de 1mm, nas seguintes condições: voltagem de 30kV, corrente de 30mA, faixa de varredura de 20-50° (2θ), passo de 0,02°.

A identificação das fases foi realizada utilizando as fichas JCPDS 09-0432 (hidroxiapatita), 09-0169 (β-TCP) e 09-0348 (α-TCP). Já a determinação do percentual das fases HA, β-TCP e/ou α-TCP presentes foi realizada através do cálculo da razão entre a intensidade de determinados picos do difratograma da amostra. O método leva em consideração os picos identificáveis e a proporção relativa destes picos com o pico de maior intensidade da fase hidroxiapatita (majoritária), cuja quantidade foi calculada pela subtração do percentual das fases encontradas do percentual total.

$$\% \text{ de } \beta\text{-TCP} = I_{100} \text{ do } \beta\text{-TCP} / I_{100} \text{ da HA} \quad (3)$$

$$\% \text{ de } \alpha\text{-TCP} = I_{100} \text{ do } \alpha\text{-TCP} / I_{100} \text{ da HA} \quad (4)$$

$$\% \text{ de HA} = 100 - (\% \text{ de } \beta\text{-TCP} + \% \text{ de } \alpha\text{-TCP}) \quad (5)$$

Behnanghader et al (2008) utilizaram um método semi-quantitativo, por comparação da intensidade de picos do difratograma do material estudado, para determinar a quantidade das fases HA, β-TCP e α-TCP presentes.

5.1.3.3 Espectroscopia de infravermelho por reflexão total atenuada (ATR)

O BCP e as microesferas sinterizadas foram analisadas por espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada empregando-se um espectrômetro Shimadzu, modelo IR Prestige21, com varredura de 400 a 4000cm^{-1}, no Laboratório de Caracterização de Materiais do Departamento de Química do CEFET-MG. Esta análise foi realizada para confirmação dos grupos químicos presentes no BCP, e assim confirmar a presença ou não de resíduos das matérias-primas utilizadas no processo de obtenção nas microesferas produzidas.

5.1.3.4 Análise termogravimétrica

Análises termogravimétricas do BCP, microesferas verdes e microesferas sinterizadas foram realizadas em um equipamento Shimadzu, DTG-60H do Laboratório de Caracterização de Materiais do Departamento de Química do CEFET-MG. Os ensaios foram realizados utilizando atmosfera de nitrogênio com vazão de 50mL/min., na faixa de temperatura de 18 a 1400°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min. As análises foram realizadas com o objetivo de determinar a estabilidade térmica do BCP e das microesferas produzidas, observando a variação de massa em função do aumento da temperatura e, no caso das microesferas verdes para verificar a temperatura de calcinação da gelatina utilizada no processo.

5.1.3.5 Estereomicroscopia

A caracterização das microesferas por estereomicroscopia foi realizada na empresa Inside Materiais Avançados Ltda., em equipamento Wild Heerbrugg Typ 327615, com ampliações da ordem de 8 a 70 vezes e utilizando uma câmera fotográfica digital Sony Cyber-Shot, 7,2 Mega Pixels, zoom óptico 5x, encostada na ocular do estereomicroscópio para obtenção das imagens, uma vez que o equipamento não apresenta câmera acoplada.

Esta análise foi realizada nas partículas verdes para observar sua morfologia e verificar a existência de aglomerados no material obtido. A análise também foi realizada nas microesferas sinterizadas nas diversas condições e nas esferas produzidas com diferentes velocidades de agitação, sinterizadas na condição escolhida e separadas granulometricamente. Desta forma,

puderam ser analisadas, qualitativamente, mudanças na morfologia, nos aspectos superficiais e dimensionais das microesferas, avaliando assim a influência dos parâmetros temperatura e tempo de sinterização e da velocidade de agitação.

5.1.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Caracterização por microscopia eletrônica de varredura foi realizada no BCP moído, nas microesferas verdes, nas sinterizadas nas diferentes condições e nas produzidas por diferentes velocidades de agitação e separadas por faixas granulométricas. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Caracterização de Materiais do Departamento de Materiais do CEFET-MG, em equipamento da marca Shimadzu, modelo SSX-550, com voltagem de 15kV. As amostras foram recobertas com camada de ouro em um equipamento Quick Coater – SC701, marca Sanyu Electron, utilizando corrente elétrica que variou de 5 a 10mA, por períodos de 7 a 10 minutos, utilizando como atmosfera ar ambiente.

Análise por MEV foi realizada no BCP, para observação do tamanho das partículas, e nas microesferas sinterizadas, para verificar o grau de sinterização obtido. A análise do grau de sinterização, juntamente com a resistência à manipulação apresentada pelas microesferas, determinou qual condição de sinterização seria utilizada no processo. Foram, também, obtidas imagens das microesferas verdes e das produzidas com diferentes velocidades de agitação, para observação da morfologia, do aspecto superficial e no caso das sinterizadas, ainda para observação de poros existentes.

5.1.3.7 Distribuição granulométrica

Para avaliar a influência do parâmetro velocidade de agitação no processo de obtenção das microesferas, foi realizada a separação granulométrica, verificando assim o percentual de microesferas em cada faixa de tamanho, em função da velocidade de agitação. Também foi determinado o tamanho médio das microesferas produzidas. Os ensaios de distribuição granulométrica foram realizados nas dependências da empresa Inside e em laboratório da UFMG.

A distribuição granulométrica e determinação do diâmetro médio foram realizadas de duas formas: por peneiramento e por espalhamento de luz. O peneiramento, escolhido por sua praticidade, rapidez e baixo custo, foi executado em laboratórios da empresa Inside. Inicialmente o material foi peneirado mecanicamente, utilizando uma base vibratória Pavitest - Contenco Indústria e Comércio Ltda., I-1016 (A – base vibratória e B – controlador) durante 15 minutos. Em seguida, para completar o processo, foi realizado um peneiramento manual, a seco, utilizando peneiras Pavitest – Contenco Indústria e Comércio Ltda. com tela e caixilho em aço inoxidável de dimensões 8"x2", com aberturas de 840, 425, 150, 53 e 38µm. Segundo Pinto (2006), isto se faz necessário devido à saturação das peneiras por partículas que podem ficar concentradas em uma determinada abertura e não permitir a passagem total das partículas de menor tamanho. A qualidade do peneiramento foi avaliada visualmente. Foi determinada a massa das microesferas em cada faixa granulométrica e determinado o percentual relativo de cada faixa.

O diâmetro médio das microesferas produzidas com cada uma das velocidades de agitação foi determinado através do diâmetro médio de Sauter, utilizando a equação 2, descrita na seção 3.6.4.

As análises de tamanho de partículas por espalhamento de luz foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Sólidos Particulados do Departamento de Engenharia Metalúrgica da Escola de Engenharia da UFMG. O analisador de tamanho de partículas a laser utilizado é da marca Cilas, modelo 1064L. O ensaio foi realizado com dispersão via úmida, utilizando água e o agente dispersante Triton X. Foram determinados os tamanhos médios e as distribuições granulométricas das microesferas obtidas pelas diferentes velocidades de agitação.

5.1.3.8 Porosidade das microesferas

A avaliação da porosidade das microesferas foi realizada segundo a equação 3, descrita na seção *4.1.3.7.*

5.2 Resultados e discussões

5.2.1 Produção das microesferas

O processo desenvolvido, melhor dizendo, aprimorado, é baseado na imiscibilidade de líquidos. Ele foi escolhido por ser um processo simples quando visto pela ótica tecnológica, pois, em termos de equipamentos utiliza apenas um misturador mecânico. Ele também utiliza poucas substâncias químicas e apresenta a vantagem destas substâncias não serem tóxicas. Porém, é um processo bastante complexo quando se analisa a quantidade de operações ou variáveis envolvidas. Algumas variáveis estão relacionadas com a obtenção de microesferas não aglomeradas, outras relacionadas com características morfológicas, dimensionais e de porosidade e outras relacionadas com as duas características simultaneamente. As variáveis relacionadas à obtenção de microesferas são quantidade e temperatura da acetona, pH e resfriamento do sistema. As variáveis relacionadas à morfologia, dimensões e porosidade são: tipo de pá do agitador, distância do agitador ao fundo do recipiente, diâmetro do recipiente, fração gelatina/água, formação de bolhas na dissolução da gelatina, temperatura do óleo, velocidade de agitação, temperatura e velocidade de aquecimento na calcinação, temperatura e tempo de sinterização. E as variáveis relacionadas às duas características são quantidade de gelatina, fração de BCP/solução de gelatina, quantidade do óleo, tempo de agitação para a formação das microesferas, quantidade do agente reticulante, fração agente reticulante/água, fração agente reticulante/solução de gelatina, tempo de atuação do agente reticulante. A maioria destas variáveis foi testada durante as fases preliminar e inicial, outras foram constantes desde o início como tipo de pá do agitador, diâmetro do recipiente e distância do misturador ao fundo do recipiente.

Pequena quantidade de gelatina não promove ligação suficiente das partículas do BCP para a obtenção das microesferas. Por outro lado, quantidade excessiva dificulta a formação das microesferas por causa da elevada viscosidade da mistura HA/solução de gelatina.

A quantidade do agente reticulante e o tempo de reticulação foram modificados até que fossem obtidas microesferas não aglomeradas. Quantidade insuficiente do agente reticulante

levou à formação de microesferas deformadas e tempo insuficiente levou à aglomeração.

A quantidade de acetona e sua temperatura foram ajustadas para manter o pH do sistema acima do ponto isoelétrico da gelatina, para obtenção de microesferas dispersas, caso contrário ocorria aglomeração.

A utilização do banho de gelo, ou seja, o resfriamento do sistema favoreceu a formação de microesferas dispersas, devido ao endurecimento da gelatina.

A velocidade de calcinação escolhida foi ser tal que, a velocidade de saída das substâncias a eliminadas não afetou a integridade das microesferas.

As microesferas produzidas para a determinação dos parâmetros de sinterização foram obtidas com velocidade de agitação de 1500RPM. Para cada condição de temperatura/tempo foi produzido um lote de microesferas, e todos utilizando os mesmos parâmetros de obtenção. Após este estudo, a condição de sinterização selecionada para os demais estudos foi: temperatura de 1200°C durante 3 horas, escolhida por apresentar boa resistência à manipulação. Esta resistência foi avaliada qualitativamente, pela observação da integridade das microesferas durante o peneiramento e a preparação das amostras para microscopia.

Também foram produzidos lotes de microesferas utilizando diferentes velocidades de agitação, mantendo as outras variáveis sem alteração. As condições de produção das microesferas são mostradas na tabela 6, a seguir.

Tabela 6 - Condições de produção das microesferas

Velocidade de agitação (RPM)	Temperatura de sinterização (°C)	Tempo de sinterização (h)
1500	900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400	1
	1200, 1300	3
500 1000 1500 2000	1200	3

5.2.2 Caracterização do material e das microesferas

5.2.2.1 Fluorescência de raios X (FRX)

As análises de fluorescência do BCP 90HA/10β-TCP e das microesferas produzidas mostraram cálcio e fósforo como elementos majoritário, silício como elemento minoritário (teores entre 2-1%) e traços de potássio, enxofre, estrôncio e ferro. As análises mostraram também, que não existe presença de elementos contaminantes no material e nem resultante do processo de obtenção nas microesferas. Análises dos demais materiais utilizados no processo, realizadas na fase inicial do trabalho, apresentaram o mesmo resultado.

5.2.2.2 Difração de raios X (DRX)

A figura 14, a seguir, mostra: (a) o difratograma do BCP utilizado, (b) os picos identificados pelo equipamento e (c) os picos das fases HA, β-TCP e α-TCP apresentados pelas fichas de identificação. A identificação das fases no difratograma foi realizada por comparação com os picos das fichas.

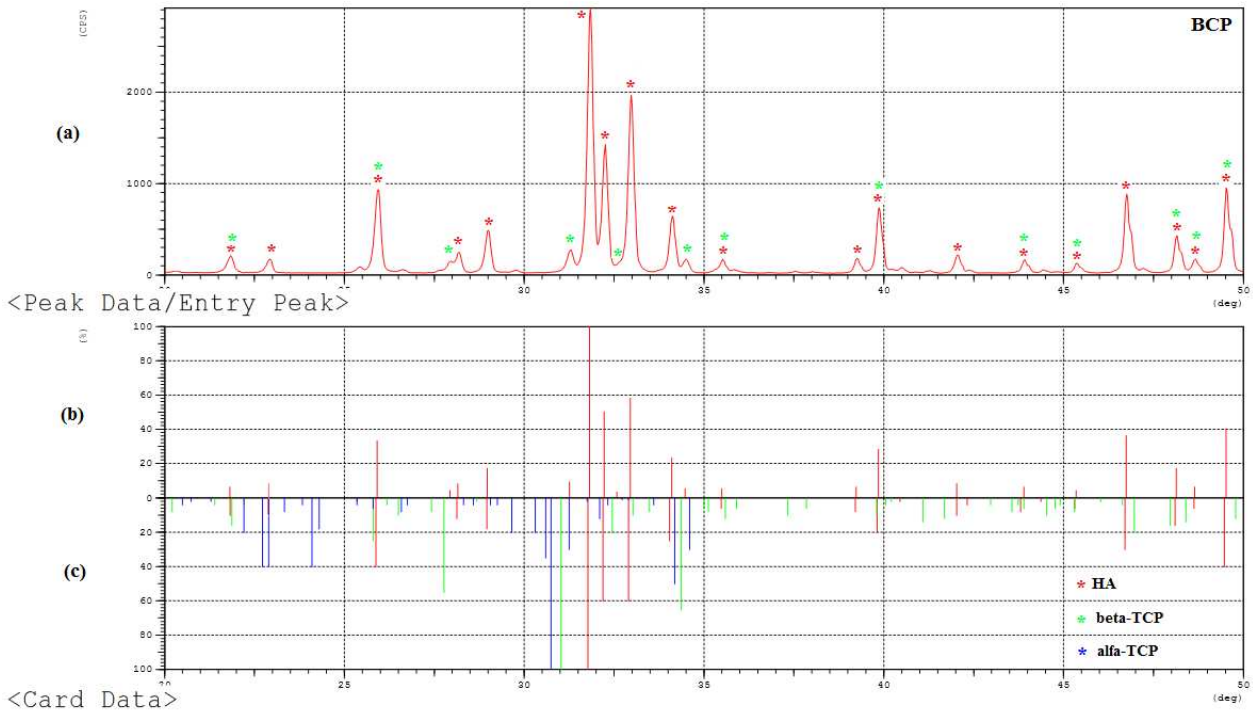


Figura 14 – Difratograma de raios X do BCP e sua ficha de análise. (a) difratograma, (b) picos identificados no material, (c) picos das fichas de identificação das fases HA, β-TCP e α-TCP.

A figura 15 mostra a comparação dos difratogramas do BCP e das microesferas sinterizadas nas diferentes condições.

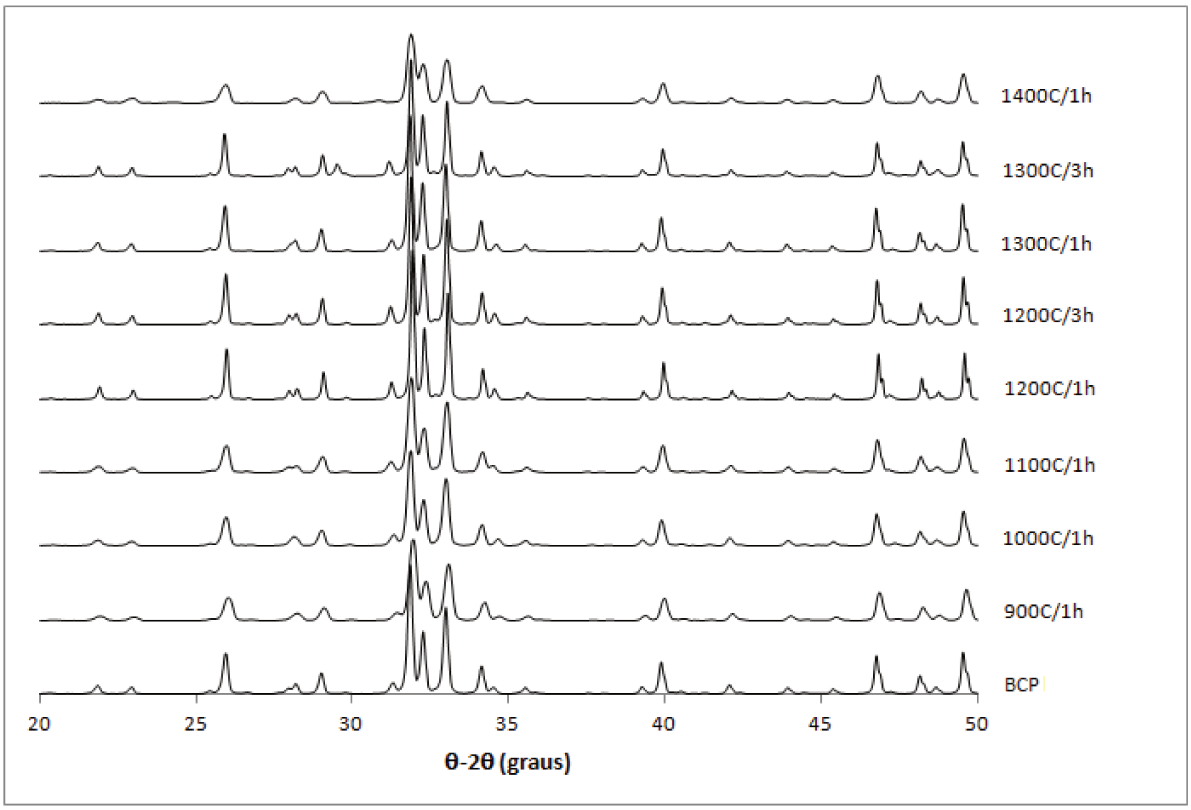


Figura 15 - Comparação dos difratogramas do BCP e das microesferas sinterizadas nas diferentes condições.

A determinação das fases presentes identificadas pela posição e intensidade relativa dos picos foi realizada utilizando-se as fichas JCPDS. Foram identificadas as fases hidroxiapatita (majoritária), β-TCP e α-TCP.

A análise dos difratogramas mostra que as microesferas que apresentaram maior cristalinidade foram as sinterizadas a 1200°C durante 1 e 3 horas, e pela análise dos dados foi determinada que a maior cristalinidade ocorre na sinterização com duração de uma hora. A tabela 7, a seguir mostra as intensidades dos picos $I_{100\%}$ da HA, do β-TCP e do α-TCP das amostras analisadas.

Tabela 7- Intensidades dos picos $I_{100\%}$ da hidroxiapatita, do β-TCP e do α-TCP presentes no BCP e nas microesferas sinterizadas nas diversas condições.

$I_{100\%}$ (cps)	Amostras								
	BCP	**900/1**	**1000/1**	**1100/1**	**1200/1**	**1200/3**	**1300/1**	**1300/3**	**1400/1**
HA	35076	22104	26332	25856	40346	40284	36902	32252	19116
β-TCP	3336	2406	3318	3198	4908	5200	3372	4368	-
α-TCP	-	-	-	-	-	-	-	-	1114

Com os dados da tabela 7 foram calculadas as quantidades das fases presentes, e os resultados são mostrados na tabela 8.

Tabela 8 - % das fases presentes no BCP, microesferas verdes e sinterizadas nas diferentes condições.

Material	**% Fases**		
	HA	**β-TCP**	**α-TCP**
BCP	90,5	9,5	traços
900°/1h	89,0	11,0	traços
1000°/1h	87,0	13,0	traços
1100°/1h	88,0	12,0	traços
1200°/1h	88,0	12,0	traços
1200°/3h	86,0	12,5	traços
1300°/1h	89,5	8,5	traços
1300°/3h	75,0	13,5	traços
1400°/1h	94,2	traços	5,8

Observa-se que à medida que a temperatura de sinterização aumenta até a 1200°C, aumenta a quantidade da fase β-TCP. Aumentando-se a temperatura de sinterização a porcentagem da fase β-TCP tende a diminuir até que na temperatura de 1400°C existem apenas traços desta fase. A

diminuição desta fase é devido à transformação para a fase α-TCP. Embora no difratograma do material sinterizado a 1300°C por 1 hora não apareçam picos característicos da fase α-TCP, a diminuição da quantidade da fase beta nesta condição com posterior aumento na sinterização à mesma temperatura por tempo superior, parece indicar que a fase alfa começa a aumentar, ainda que em quantidades pequenas.

Trabalhos de Carrodeguas et al (2008), Elliot (1984 apud OLIVEIRA, S.V. et al, 2009); Ryu, Youn, Hong, Chang, Lee e Chung (2002), Ryu, Youn, Hong, Kim, Lee, Chang, Lee e Chung (2002) e Guastaldi e Aparecida (2010), indicam que a temperatura de aparecimento da fase alfa situa-se em 1115±10°C, no primeiro e 1180°C nos dois últimos. Oliveira et al (2009) encontraram a fases α apenas em sinterizações acima de 1300°C, Arita et al (1995) e Weinand et al (2006) não observaram a decomposição de hidroxiapatita em sinterizações até a temperatura de 1200°C. Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com estes últimos. Estas divergências na temperatura de transformação da fase β para a α-TCP se devem a fatores como: técnica de síntese empregada, presença de impurezas, atmosfera de sinterização (KHON, 2002; BERNACHE-ASSOLLANT, 2003; WEINAND et al, 2006).

5.2.2.3 Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada (ATR)

Os espectros vibracionais de infravermelho por reflexão total atenuada do BCP utilizado e das microesferas sinterizadas a 1200°C durante 3horas são mostrados na figura 16.

Os resultados estão de acordo com os trabalhos de vários autores, dentre eles o de Mendes Filho (2006).

Através desta análise confirmou-se que não existem resíduos do processo, uma vez que as bandas apresentadas são as características da hidroxiapatita e fosfato tricálcico. No espectro completo, não foi observada a banda típica de água em torno de 3500cm^{-1}, em função do uso da técnica da reflexão total atenuada (ATR).

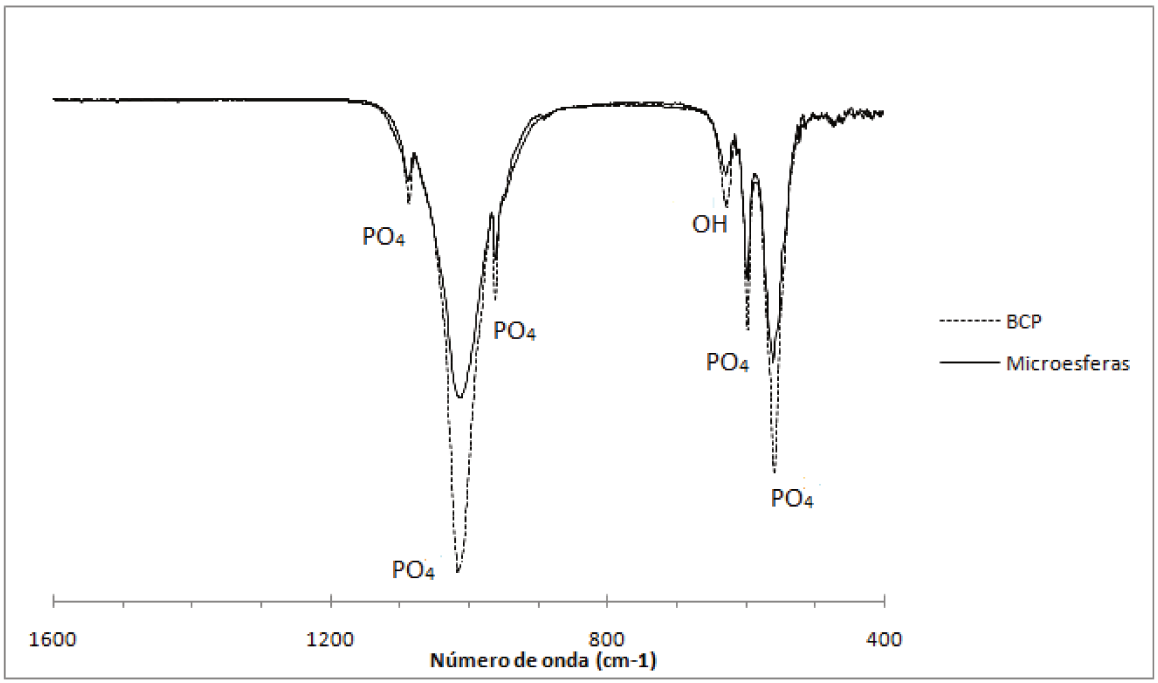


Figura 16 - Espectro vibracional de infravermelho com reflexão total atenuada do BCP e microesferas sinterizadas a 1200°C durante 3horas.

5.2.2.4 Análise termogravimétrica

As figuras 17 e 18 apresentam os resultados das análises termogravimétricas do BCP utilizado na produção das microesferas e das microesferas sinterizadas a 1200°C durante 3 horas, e das microesferas verdes, respectivamente.

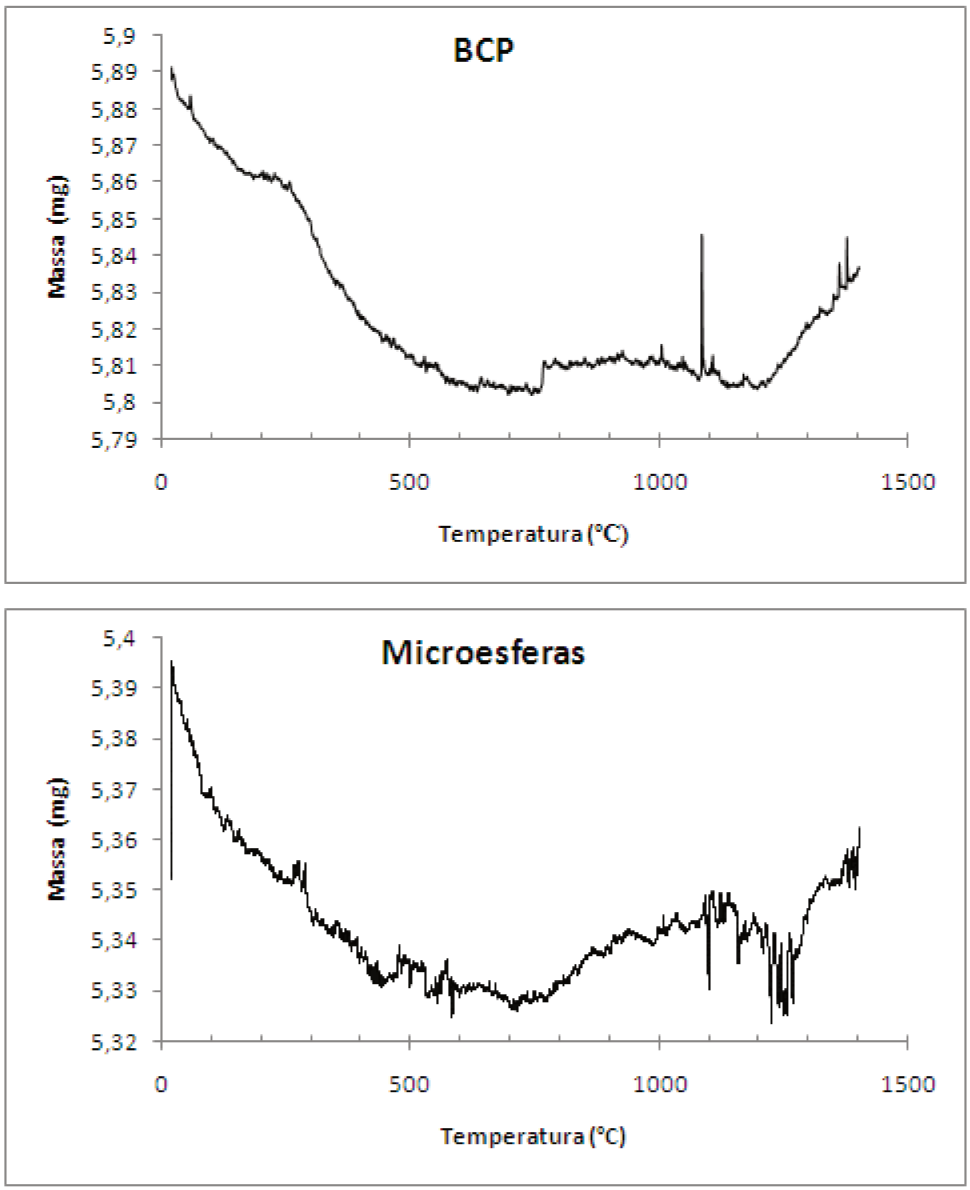


Figura 17 - Análise termogravimétrica do BCP e das microesferas sinterizadas a 1200°C/3h.

A perda de massa total para o BCP foi de 1,4% da massa total, na faixa de temperatura de aproximadamente 20 a 750°C. Para as microesferas a perda até a temperatura de 700°C foi de 1,2% da massa total. Estas perdas estão associadas à eliminação da água, adsorvida e estrutural, presente no material.

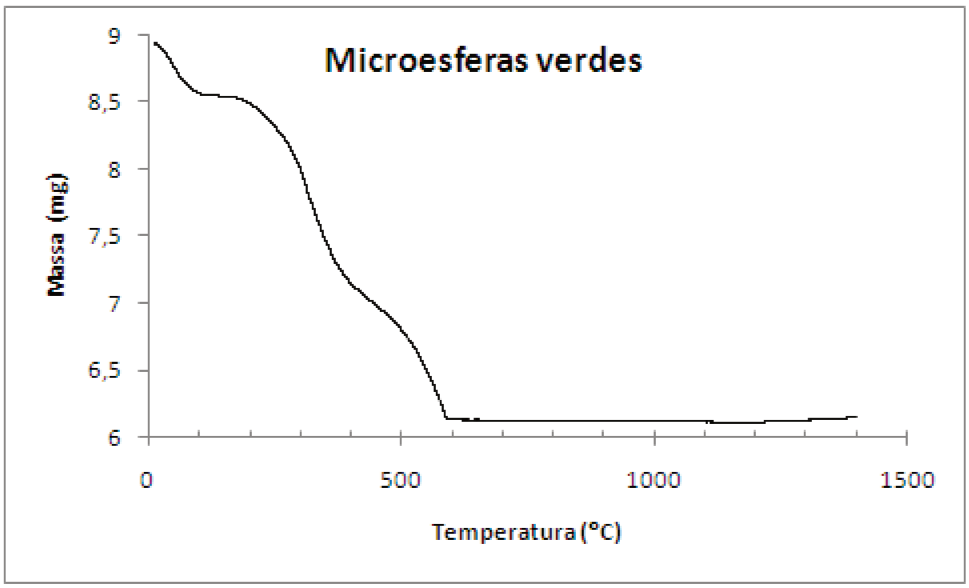


Figura 18- Análise termogravimétrica de microesferas verdes.

A perda de massa total para as microesferas verdes foi de 31,3% da massa total, na faixa de temperatura de aproximadamente 20 a 600°C, correspondendo à pirólise da gelatina utilizada no processo, e à perda de água existente no BCP.

5.2.2.5 Estereomicroscopia

Foram obtidas imagens de microesferas verdes e de microesferas sinterizadas e separadas granulometricamente.

A figura 19 mostra um exemplo de microesferas verdes que foram produzidas com velocidade de agitação de 500RPM. Nesta imagem, pode ser observada a morfologia esférica das partículas obtidas, a formação de microesferas polidispersas e a presença da fase polimérica.

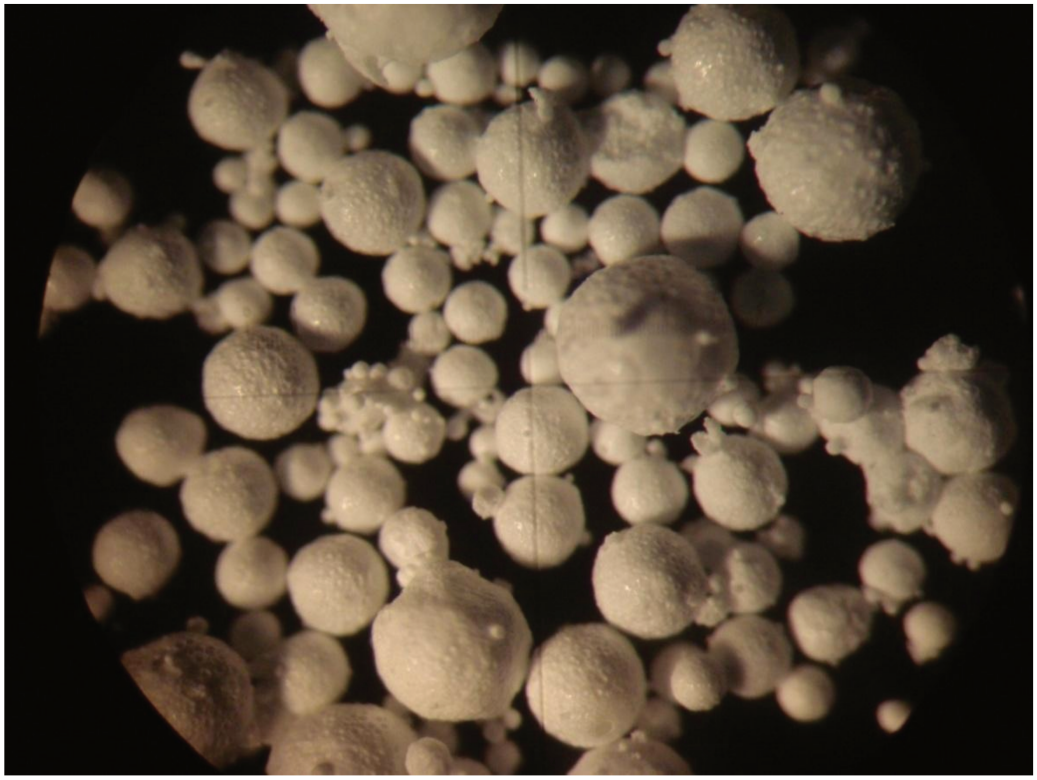
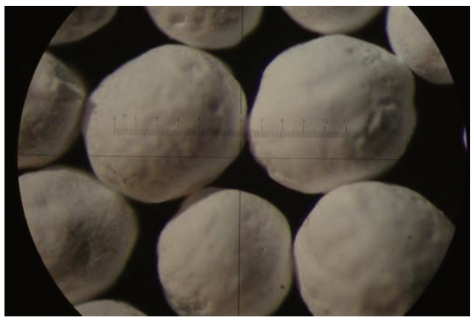


Figura 19 – Microesferas verdes produzidas com velocidade de agitação de 500RPM. Ampliação original: 32x.

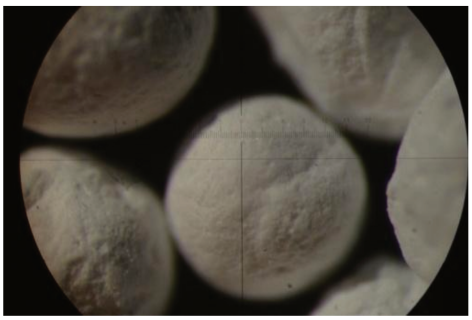
A) Microesferas produzidas para estudo de sinterização

As figuras 20 - 25 mostram microesferas sinterizadas nas diversas condições e separadas granulometricamente.

Verifica-se que no tratamento a 1400°C por 1 hora ocorreu a sinterização não apenas entre as partículas do BCP que formam as microesferas, mas entre as microesferas, produzindo um bloco do material, não sendo possível separá-las granulometricamente.



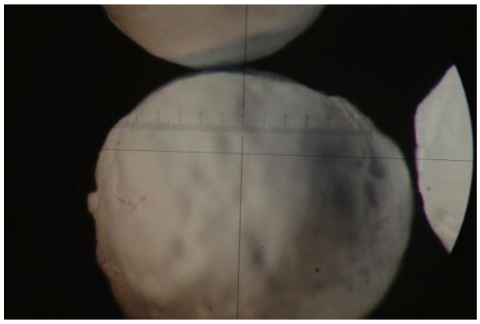
(a) 900°C/1h



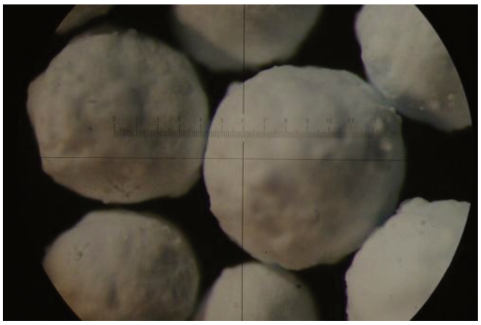
(b) 1000°C/1h

(c) 1100°C/1h

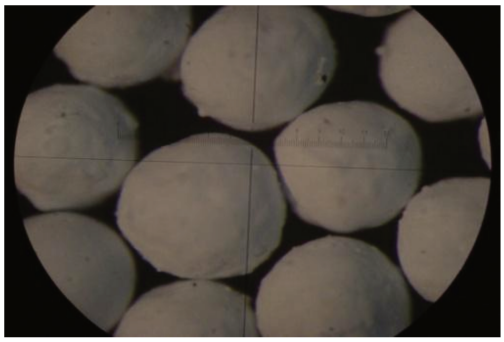
(d) 1200°C/1h



(e) 1200°C/3h



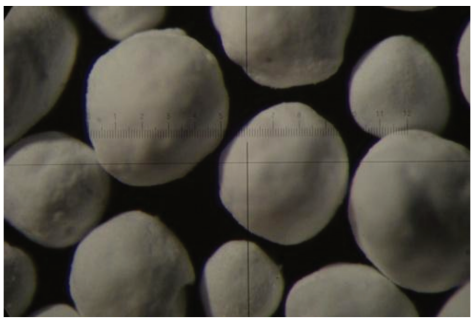
(f) 1300°C/1h



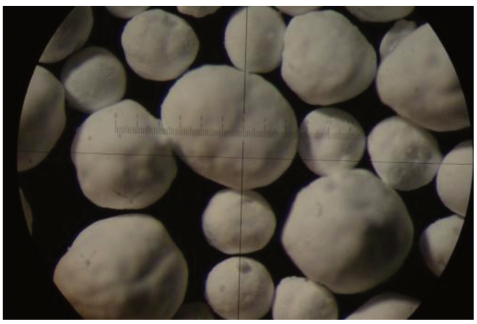
(g) 1300°C/3h

(h) 1400°C/1h

Figura 20 - Estereomicrografia das microesferas com diâmetros superiores a 840µm sinterizadas nas diferentes condições. Ampliação original: 62x.

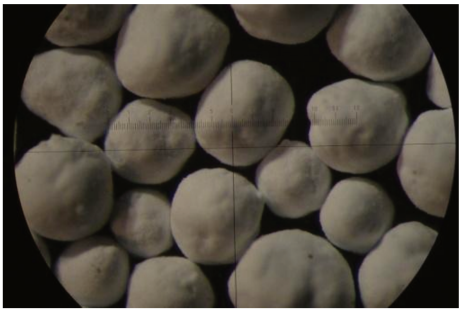


(a) 900°C/1h

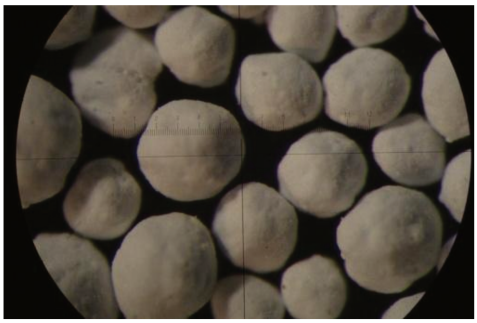


(b) 1000°C/1h

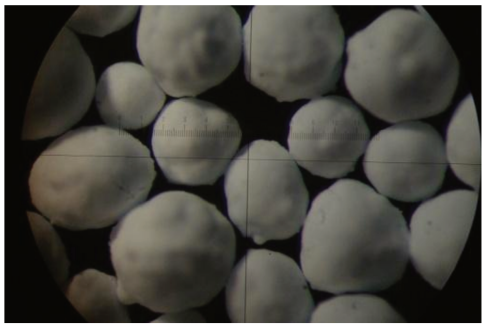
(c) 1100°C/1h



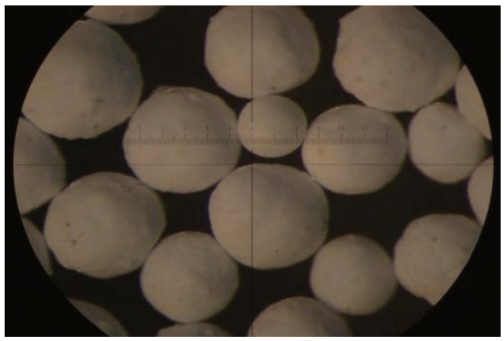
(d) 1200°C/1h



(e) 1200°C/3h

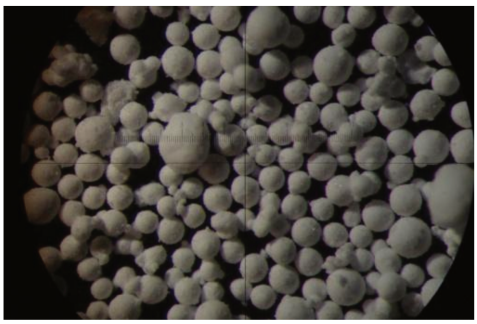


(f) 1300°C/1h

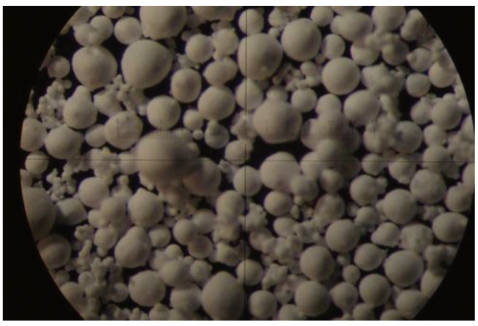


(g) 1300°C/3h

Figura 21 - Estereomicrografia das microesferas com diâmetros entre 840 e 425µm sinterizadas nas diferentes condições. Ampliação original: 62x.

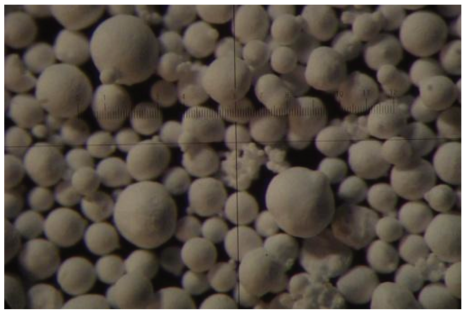


(a) 900°C/1h

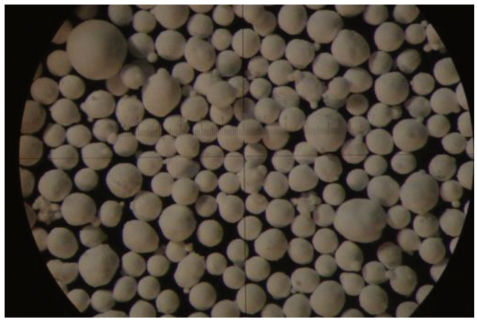


(b) 1000°C/1h

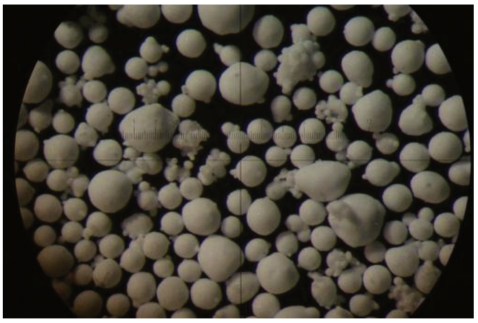
(c) 1100°C/1h



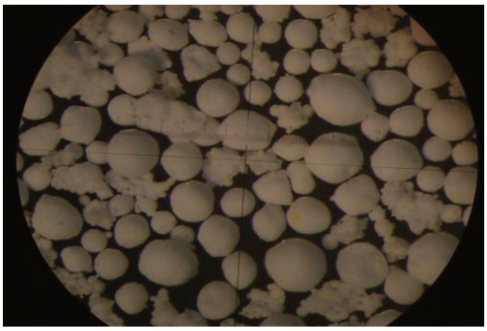
(d) 1200°C/1h



(e) 1200°C/3h

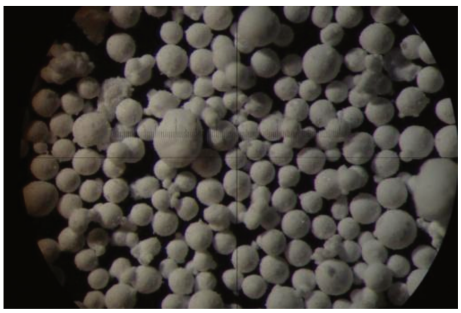


(f) 1300°C/1h

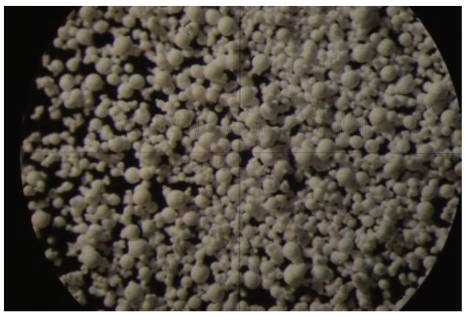


(g) 1300°C/3h

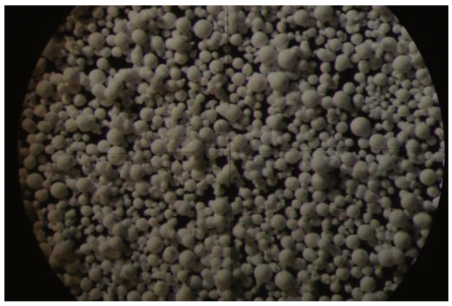
Figura 22 - Estereomicrografia das microesferas com diâmetros entre 425 e 150µm sinterizadas nas diferentes condições. Ampliação original: 62x.



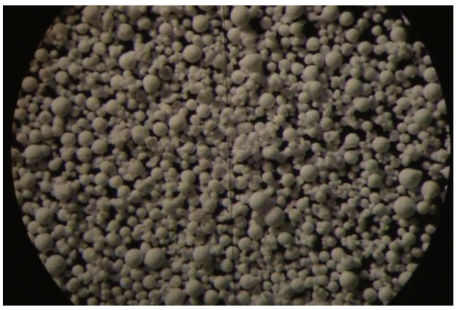
(a) 900°C/1h



(b) 1000°C/1h

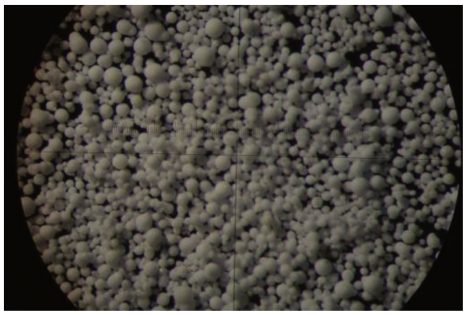


(c) 1100°C/1h



(d) 1200°C/1h

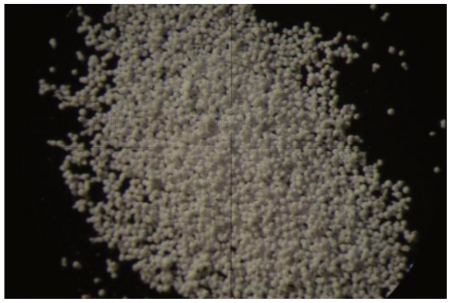
(e) 1200°C/3h



(f) 1300°C/1h

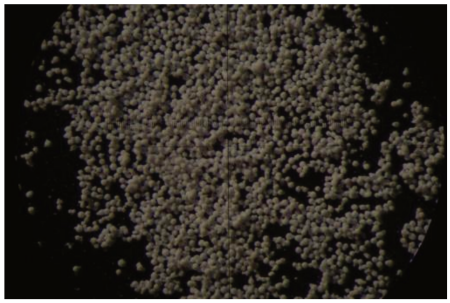
(g) 1300°C/3h

Figura 23 - Estereomicrografia das microesferas com diâmetros entre 150-53µm sinterizadas nas diferentes condições. Ampliação original: 62x.

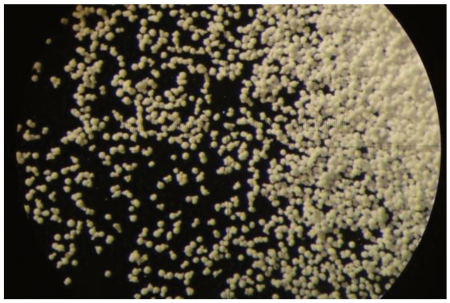


(a) 900°C/1h

(b) 1000°C/1h

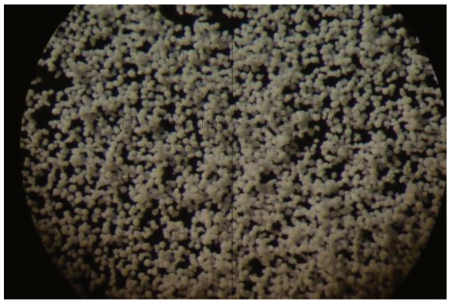


(c) 1100°C/1h

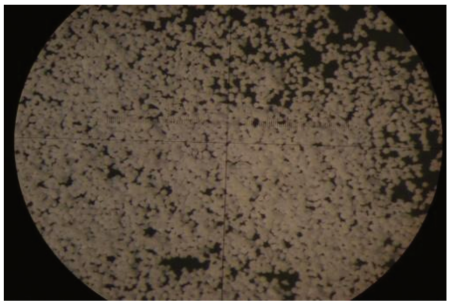


(d) 1200°C/1h

(e) 1200°C/3h

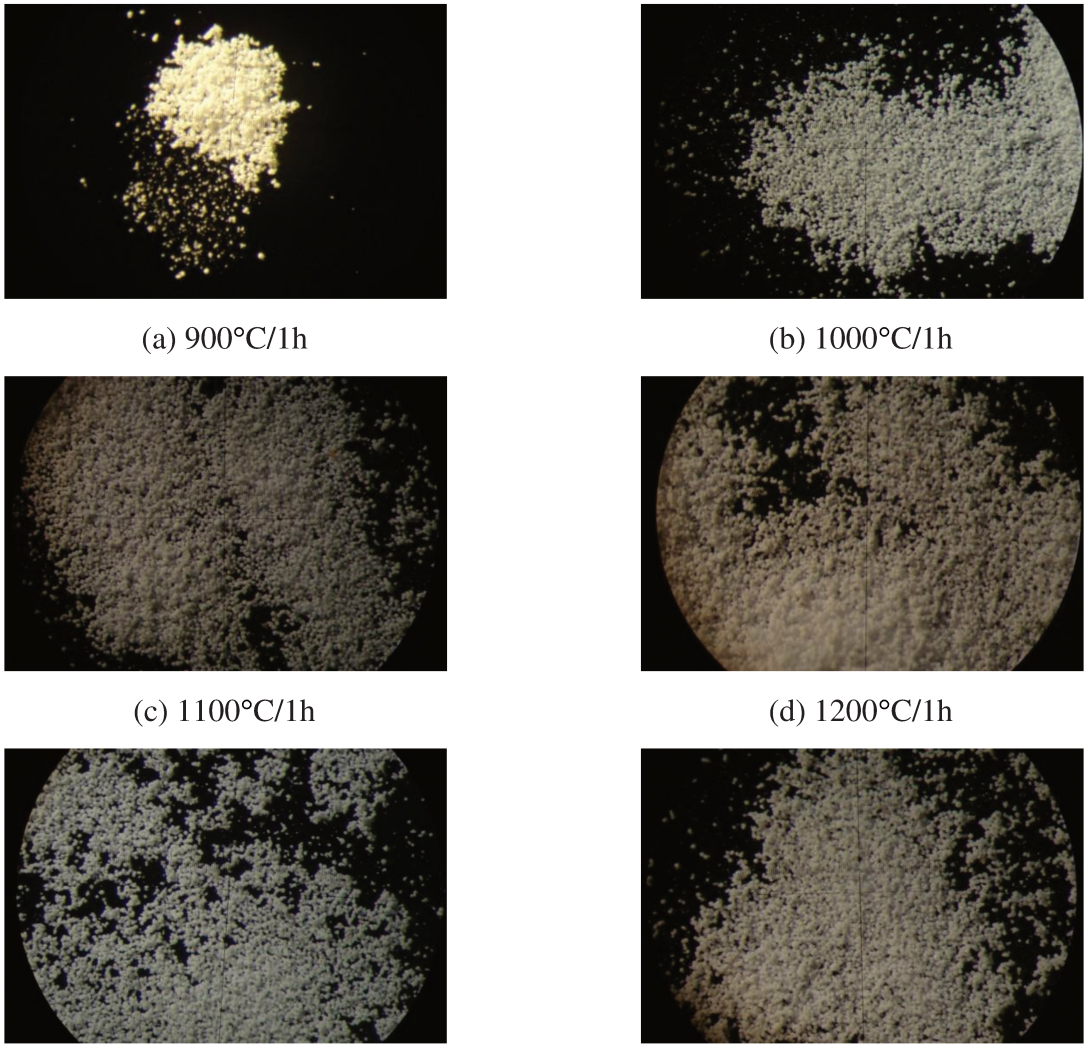


(f) 1300°C/1h



(g) 1300°C/3h

Figura 24 - Estereomicrografia das microesferas com diâmetros entre 53 e 38µm sinterizadas nas diferentes condições. Ampliação original: 62x.



(a) 900°C/1h (b) 1000°C/1h

(c) 1100°C/1h (d) 1200°C/1h

1200°C/3h (f) 1300°C/1h

Figura 25 - Estereomicrografia das microesferas com diâmetros inferiores a 38µm sinterizadas nas diferentes condições. Ampliação original: 62x.

Analisando as estereomicrografias, pode ser observado que:

- nas microesferas maiores, granulometrias acima de 840µm e entre 840 e 425µm, à medida que a temperatura de sinterização aumenta, as partículas tornam-se mais arredondadas, aparentando uma superfície mais lisa;
- à medida que diminui o diâmetro das microesferas, a morfologia torna-se mais perfeitamente esférica;
- na faixa granulométrica entre 425µm e 150µm aparecem alguns aglomerados de microesferas

com diâmetros menores;

- na separação granulométrica das microesferas sinterizadas a 1300°C por 3 horas não foram obtidas microesferas com diâmetros inferiores a 38µm.

B) Microesferas produzidas por diferentes velocidades de agitação

A figura 26 mostra as microesferas produzidas com as diferentes velocidades de agitação sinterizadas e separadas granulometricamente.

Pode observar que:

- algumas microesferas, na granulometria superior a 425µm, produzidas com as velocidades de agitação de 1500 e 2000RPM apresentam-se mais alongadas;
- as microesferas com diâmetros entre 425µm e 150µm são mais esféricas;
- na velocidade de agitação de 2000RPM, aparecem aglomerados formados por microesferas de diâmetros pequenos nas granulometrias de 840-425µm, 425-150µm e 150-53µm, sendo esta ocorrência maior na granulometria de 425-150µm. Na granulometria inferior a 53µm aparentemente não ocorrem estes aglomerados;
- na velocidade de agitação de 500RPM não são obtidas quantidades mensuráveis de microesferas com diâmetros inferiores a 53µm e na velocidade de 1000RPM , inferiores a 38µm.

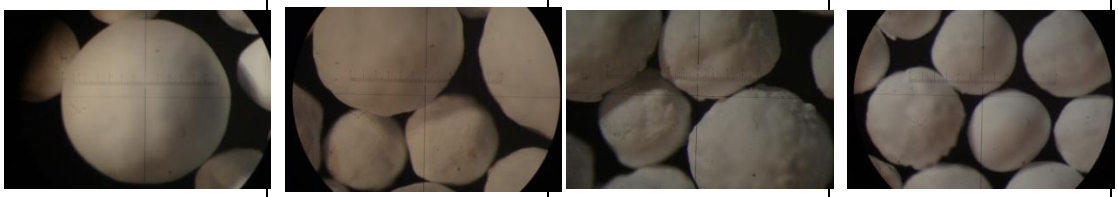
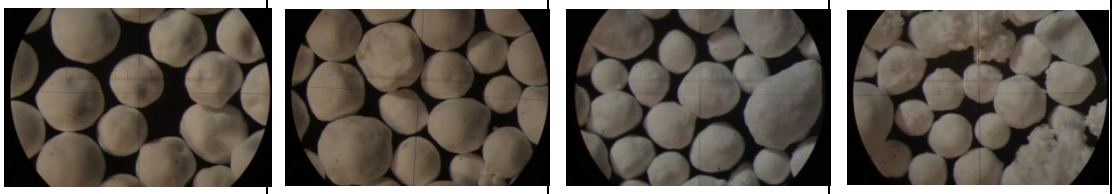
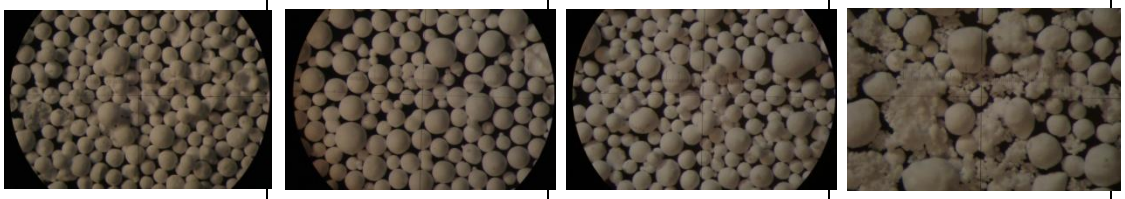
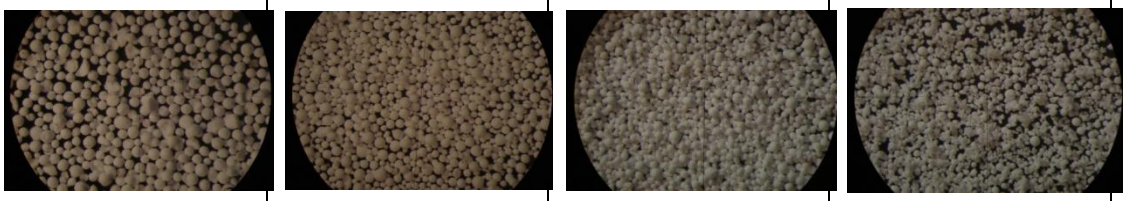
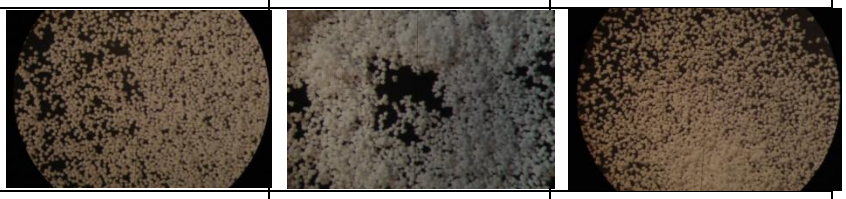
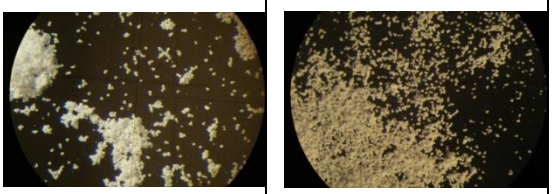
Diâmetro das esferas (µm)	Velocidade de agitação (RPM)			
	500	1000	1500	2000
>840				
840-425				
425-150				
150-53				
53-38	Não obtidas			
<38	Não obtidas	Não obtidas		

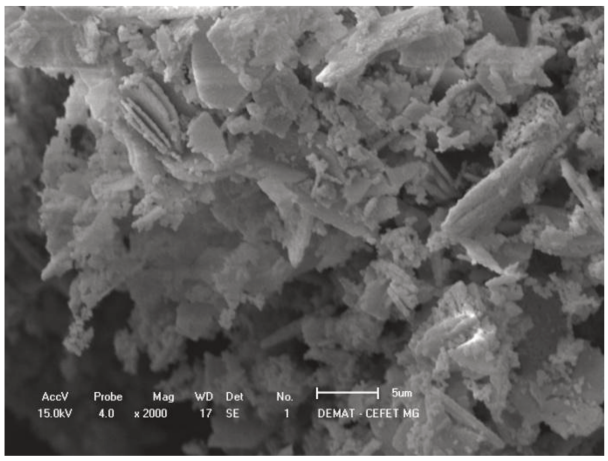
Figura 26 - Estereomicrografia das microesferas produzidas com diferentes velocidades de agitação, separadas granulometricamente. Ampliação original: 62x.

5.2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Análises topológicas foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura no BCP, nas microesferas verdes, nas sinterizadas nas diferentes condições, e nas produzidas com diferentes velocidades de agitação, separadas granulometricamente. Isto permitiu a avaliação da influência da temperatura e tempo de tratamento, e da velocidade de agitação na morfologia e diâmetro das microesferas.

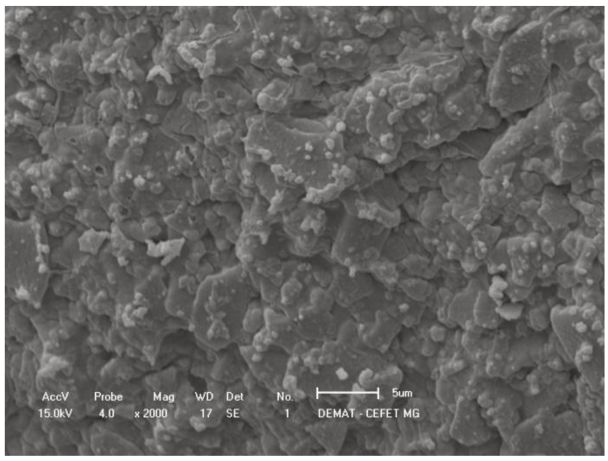
A) Microesferas para estudo das condições de sinterização

A figura 27 mostra o BCP moído, e superfícies de microesferas verde e sinterizadas nas diferentes condições. As imagens foram realizadas na superfície de uma microesfera com diâmetro superior a 840µm ou entre 840-425µm por apresentar maior área para visualização, mesmo com pequeno aumento, facilitando, assim, a comparação. Nas microesferas sinterizadas a 1400ºC durante 1h não foi possível aplicar esta metodologia, devido à sinterização ter ocorrido não somente entre as partículas formadoras das microesferas, mas entre as próprias microesferas.



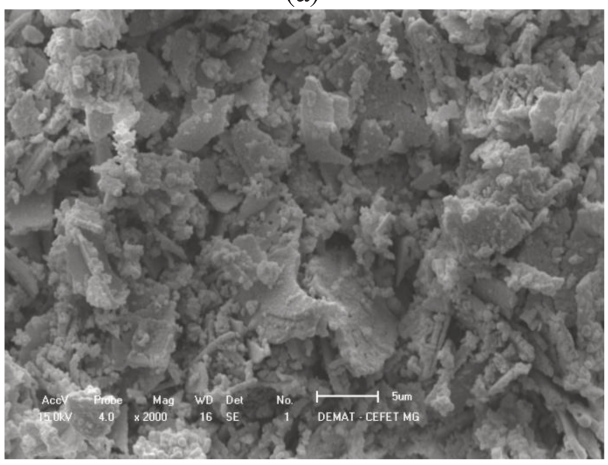
BCP moído

(a)



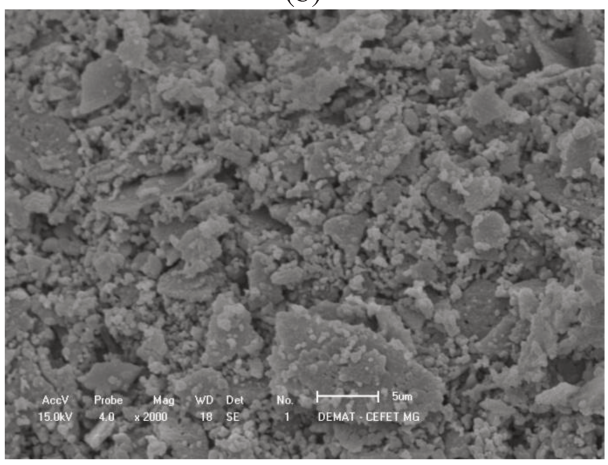
Microesfera verde

(b)



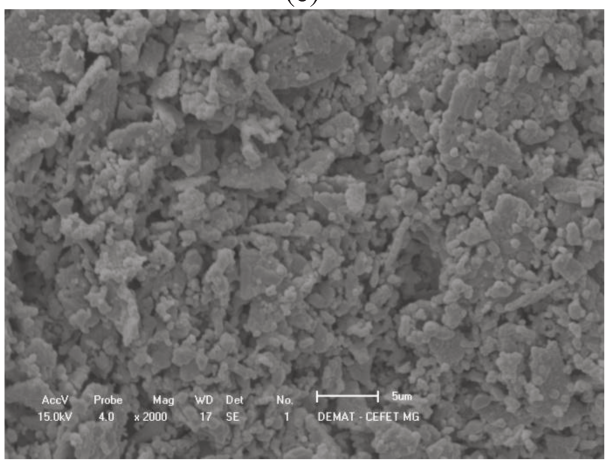
Microesfera sinterizada a 900°C/1h

(c)



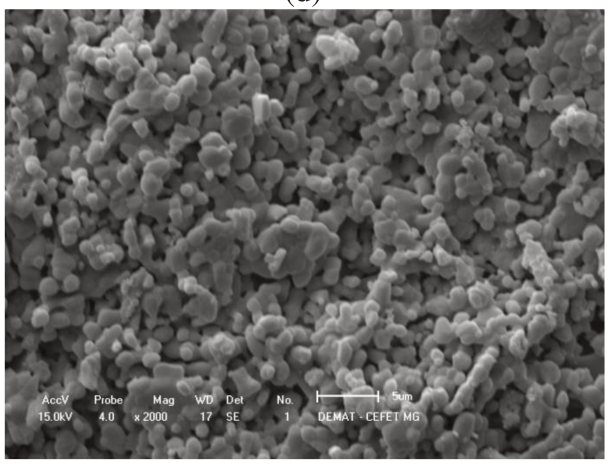
Microesfera sinterizada a 1000°C/1h

(d)



Microesfera sinterizada a 1100°C/1h

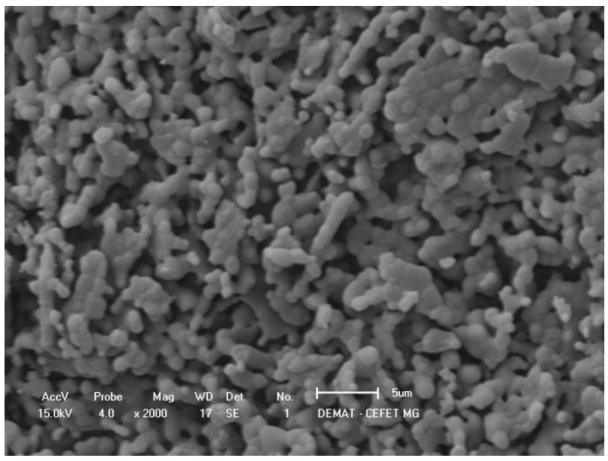
(e)



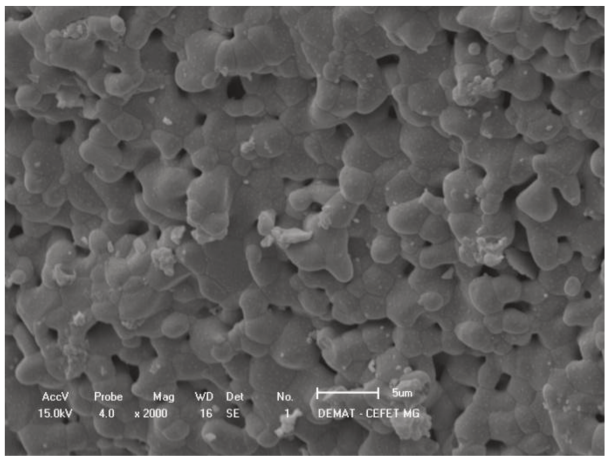
Microesfera sinterizada a 1200°C/1h

(f)

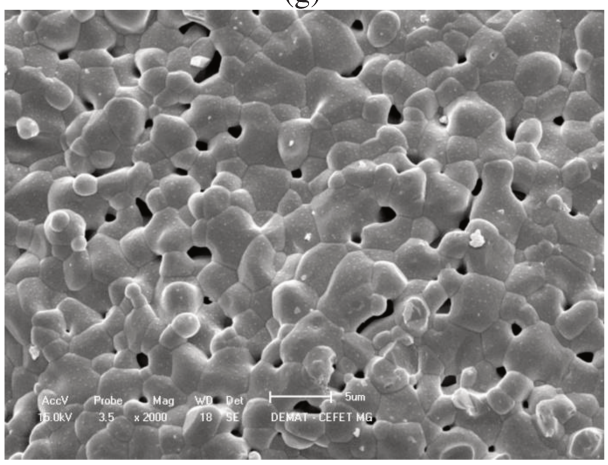
Figura 27 - Imagens de MEV do BCP moído e das superfícies de microesferas verde e sinterizadas em diferentes temperaturas/tempo.



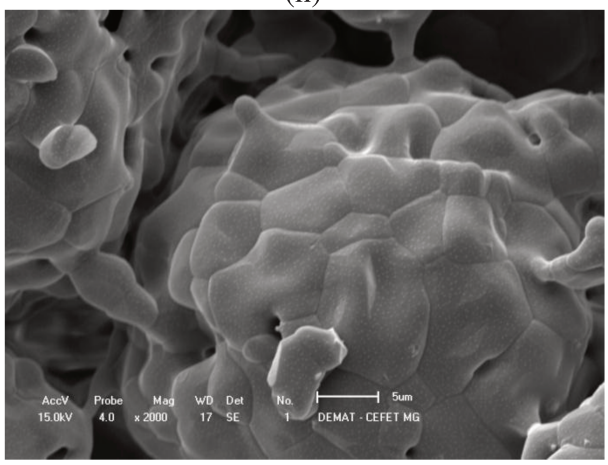
Microesfera sinterizada a 1200°C – 3h
(g)



Microesfera sinterizada a 1300°C
(h)



Microesfera sinterizada a 1300°C/3h
(i)



Microesferas sinterizadas a 1400°C/1h
(j)

Figura 27 (continuação) - Imagens de MEV do BCP moído e das superfícies de microesferas verde e sinterizadas em diferentes temperaturas/tempo.

Analisando-se a figura 27, observa-se a evolução da sinterização, das partículas de BCP que formam as microesferas, à medida que aumenta a temperatura de tratamento. Na superfície da microesfera verde, pode-se observar que as partículas de BCP encontram-se envoltas pela gelatina. A microesfera sinterizada a 900°C apresenta uma fraca consolidação, com as partículas de BCP apenas justapostas. Esta justaposição vai se transformando em sinterização à medida que as partículas se unem com o aumento da temperatura de tratamento. A partir do tratamento a 1200°C durante 1 hora as partículas apresentam maior sinterização e observa-se a presença de poros, que diminuem em quantidade à medida que a temperatura de tratamento aumenta.

Aumentando o tempo de tratamento de uma para 3 horas, aparentemente não ocorre significativa diminuição no tamanho dos poros, mas ocorre principalmente um aumento no tamanho dos grãos. Aumentando-se a temperatura para 1400ºC quase não se observam poros nas microesferas e observa-se a sinterização entre elas, através da formação de pescoços, o que levou à formação de um bloco, mostrado visto na figura 19(h). A figura 28 apresenta uma maior área de visualização deste bloco de microesferas.

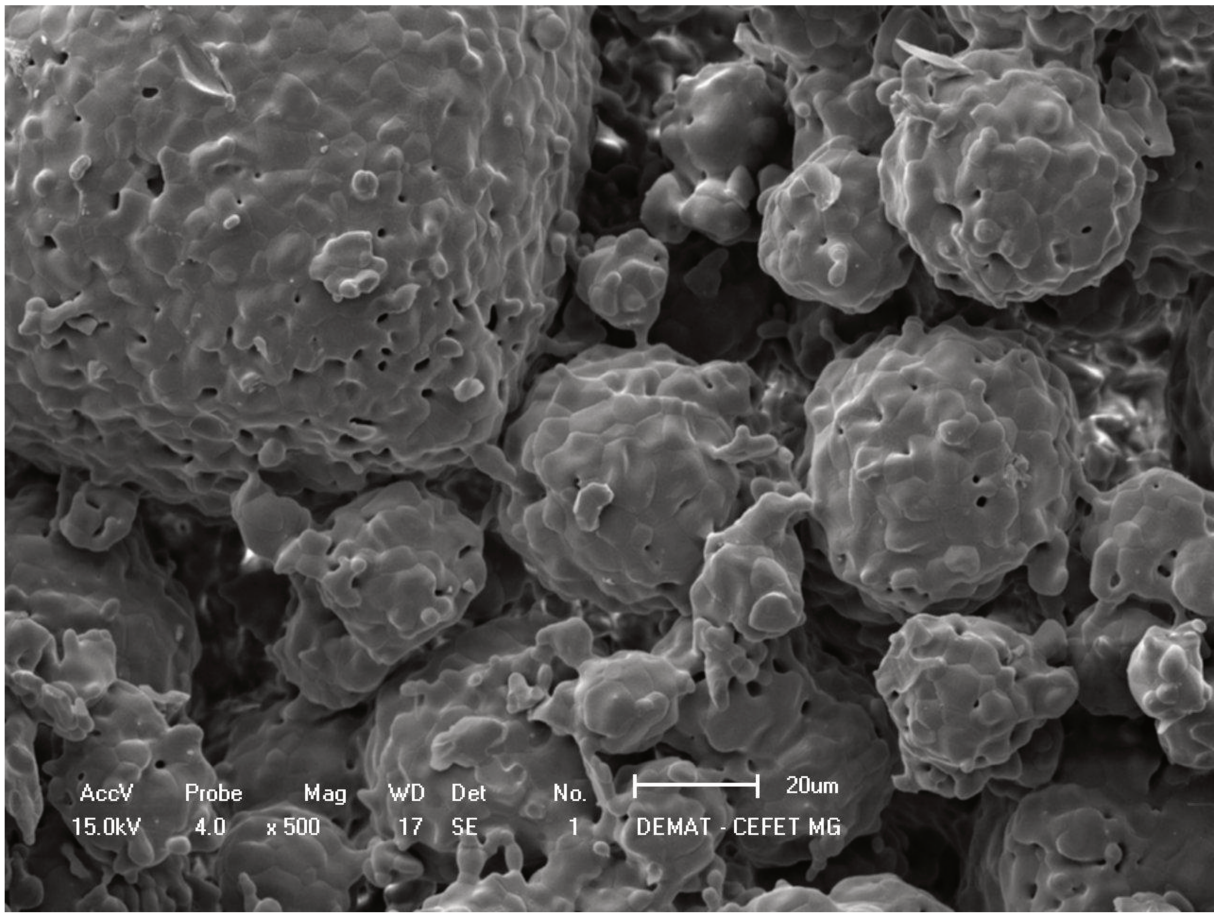


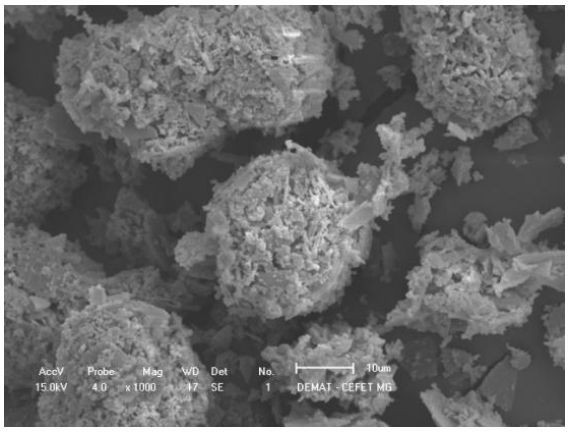
Figura 28 - Imagem de MEV de microesferas sinterizadas a 1400°C/1h.

Através desta análise por MEV, juntamente com uma avaliação qualitativa da integridade das microesferas após manipulação, foi escolhida a condição de sinterização de 1200°C/3 horas para tratar o material produzido por diferentes velocidades de agitação. Esta condição foi

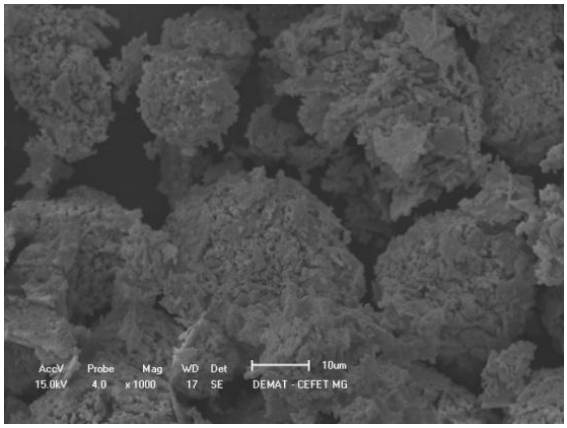
escolhida por apresentar microesferas com resistência adequada à manipulacão aliada à porosidade, importante para carreamento de fármacos, proteínas, etc.

A importância da temperatura/tempo de sinterização pode ser vista nas microesferas de diâmetros menores, onde fica evidenciada a morfologia mais esférica à medida que aumenta a temperatura/tempo de tratamento, de 900ºC/1h para 1200ºC/3h. Em temperaturas superiores começa a ocorrer sinterização entre as microesferas com pequenos diâmetros, evidenciada pela formação de aglomerados. Isto pode ser visto na figura 21, e também na figura 29, a seguir, que mostra microesferas com diâmetros inferiores sinterizadas nas diversas condições.

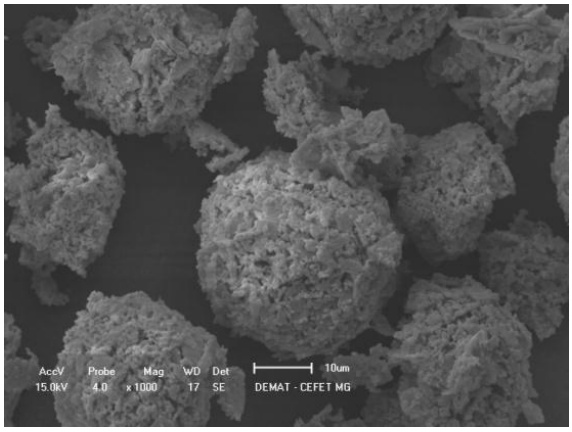
Na figura 29, em algumas condições, pode-se observar a presença de partículas de BCP ao lado das microesferas, evidenciando que as condições de sinterização inferiores a 1200ºC/3h não são suficientes para sinterizar as partículas e, assim, manter a integridade das microesferas.



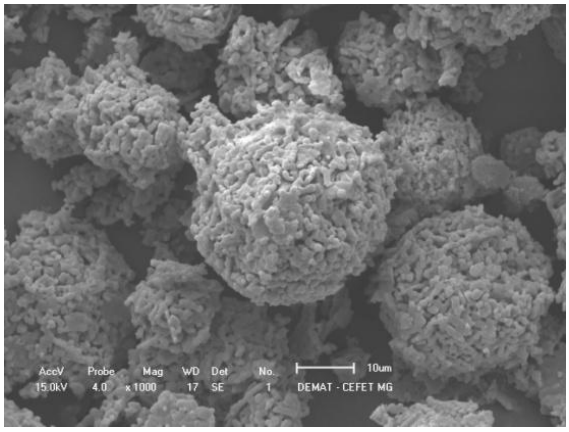
900ºC/1h



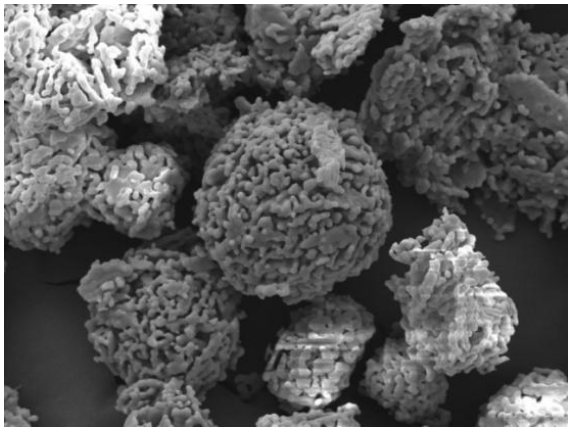
1000ºC/1h



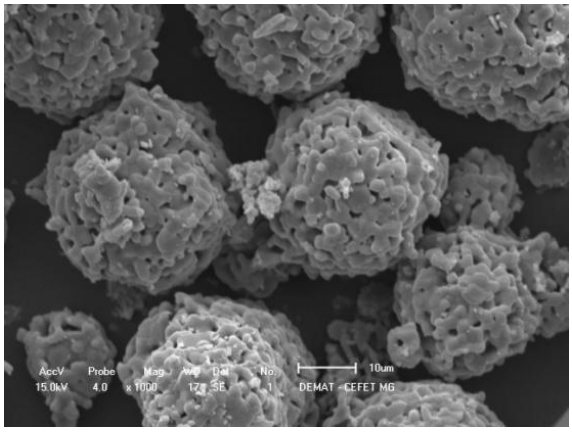
1100ºC/1h



1200ºC/1h

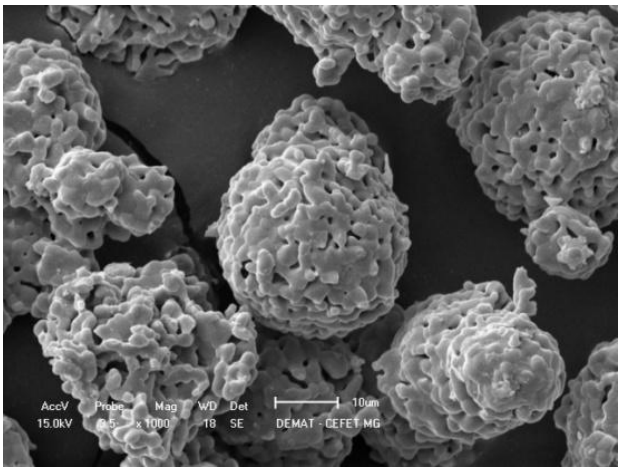


1200ºC/3h



1300ºC/1h

Figura 29 - Imagens de MEV de microesferas com diâmetros inferiores a 38µm obtidas nas diferentes condições de sinterização.

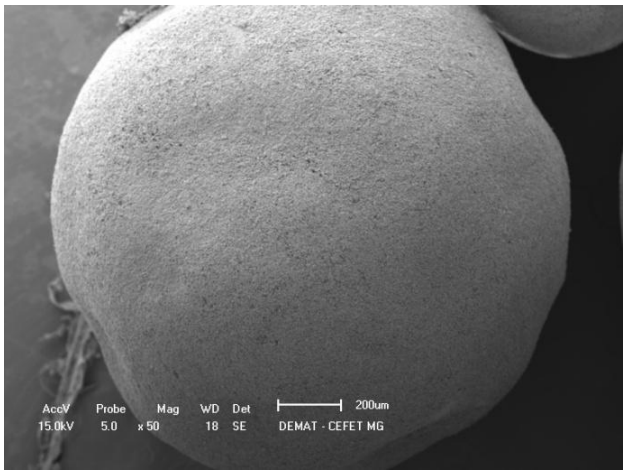


1300ºC/3h

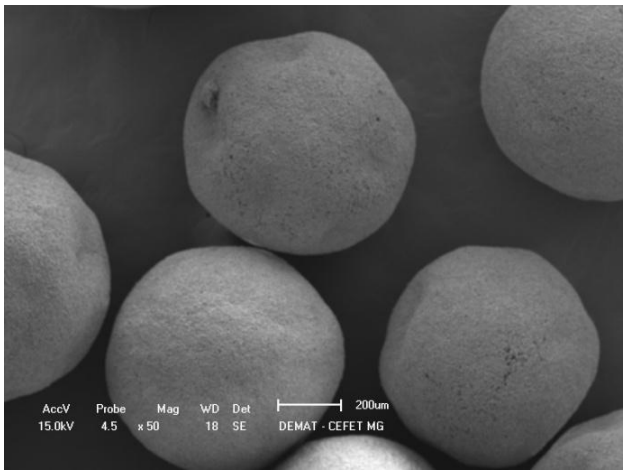
Figura 29 (continuação) - Imagens de MEV de microesferas com diâmetros inferiores a 38µm obtidas nas diferentes condições de sinterização.

B) Microesferas produzidas por diferentes velocidades de agitação

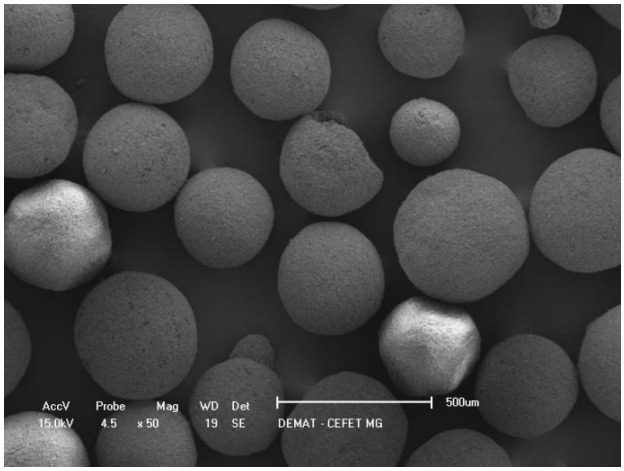
As figuras 30-33 mostram as microesferas produzidas com as velocidades de agitação de 500, 1000, 1500 e 2000RPM, respectivamente, e separadas por granulometria. A figura 34 mostra as aglomerações encontradas nas microesferas produzidas com a velocidade de 2000RPM. E, a figura 35 apresenta as imagens de MEV das microesferas produzidas em todas as velocidades de agitação e separadas granulometricamente, dispostas de forma comparativa.



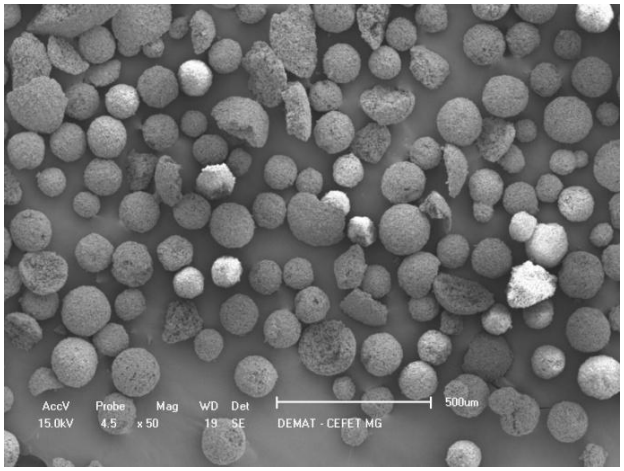
>840µm



840-425µm

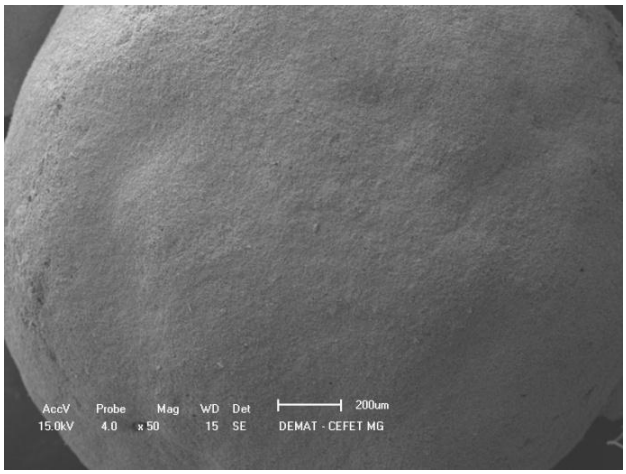


425-150µm

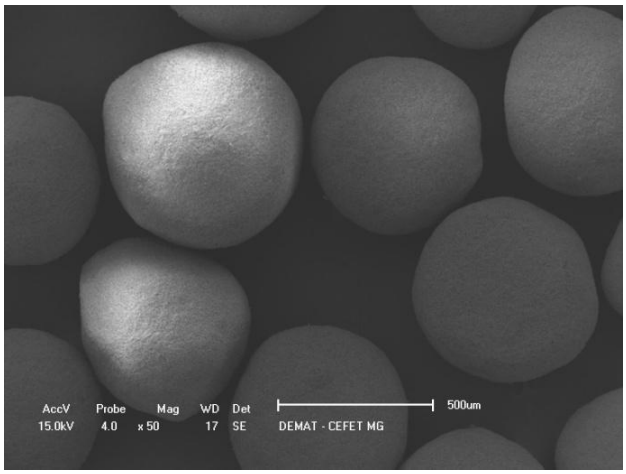


150-53µm

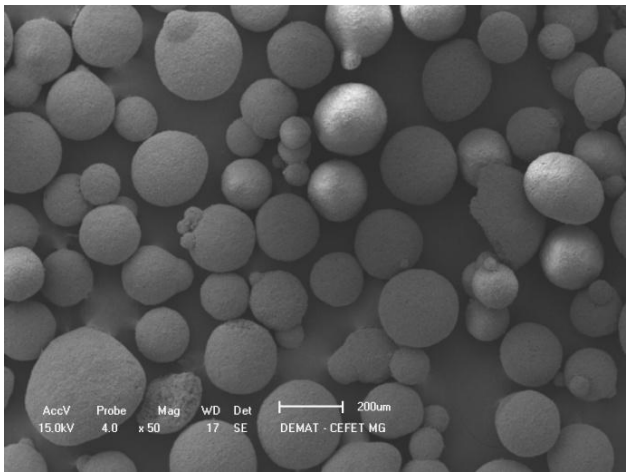
Figura 30 – Imagens de MEV de microesferas produzidas com velocidade de agitação de 500RPM.



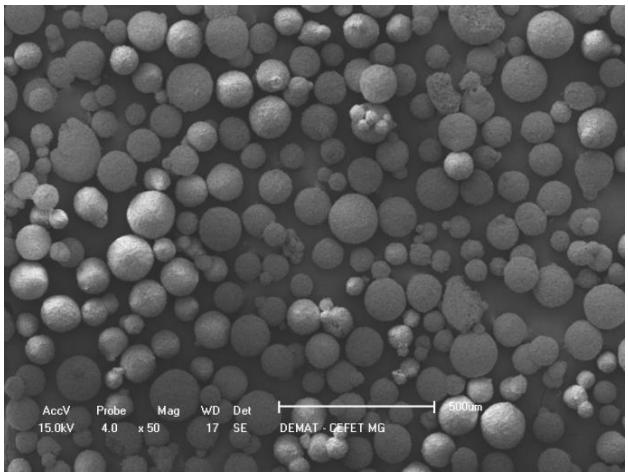
>840µm



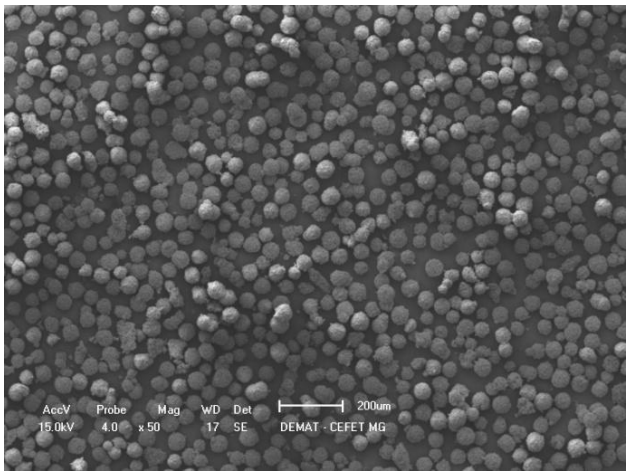
840-425µm



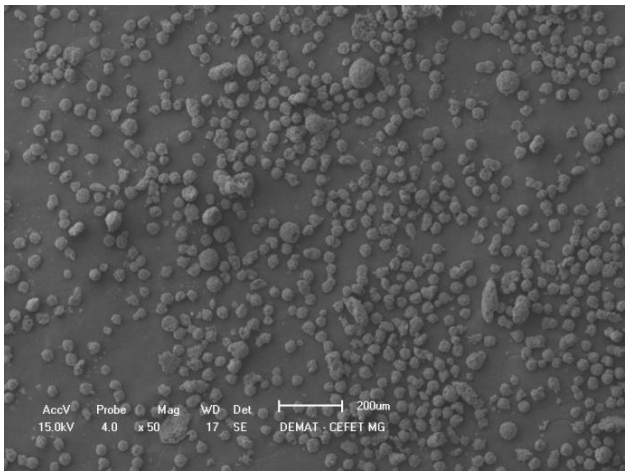
425-150µm



150-53µm

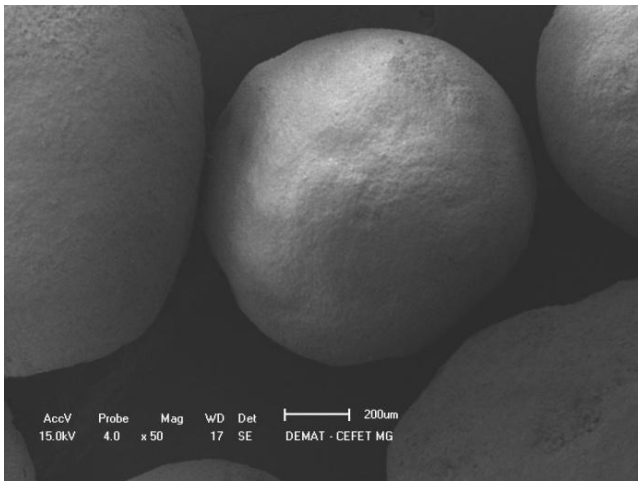


53-38µm

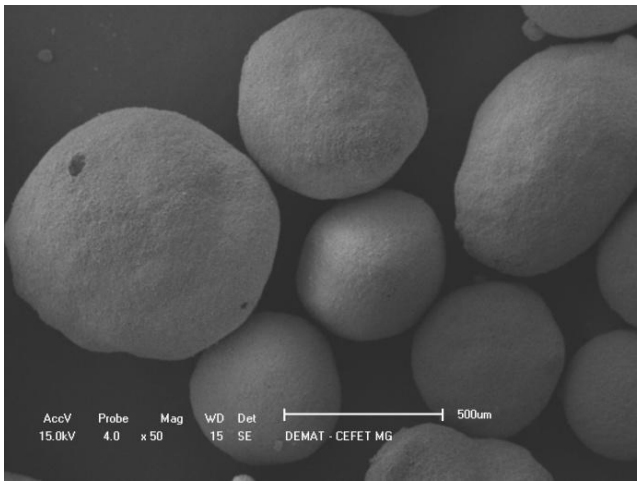


<38µm

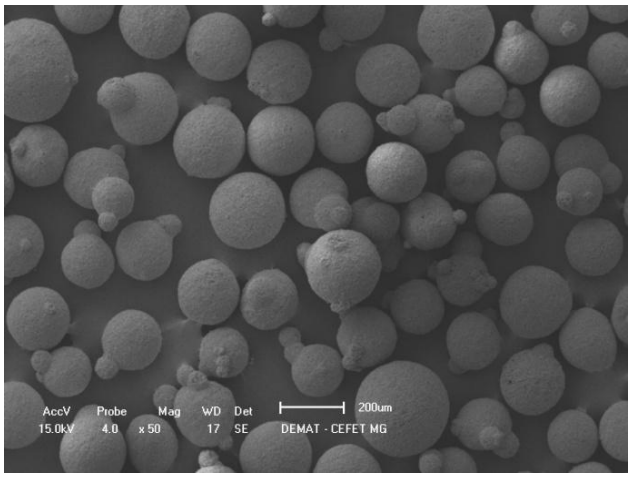
Figura 31 – Imagens de MEV de microesferas produzidas com velocidade de agitação de 1000RPM.



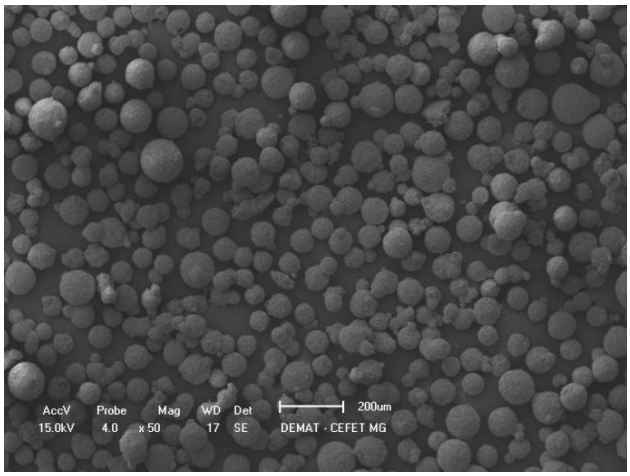
>840µm



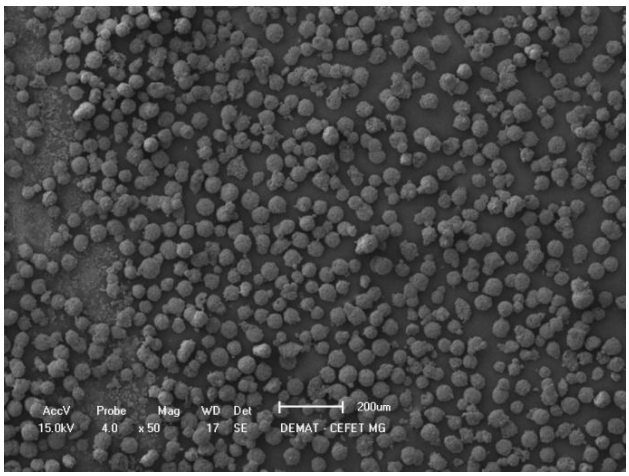
840-425µm



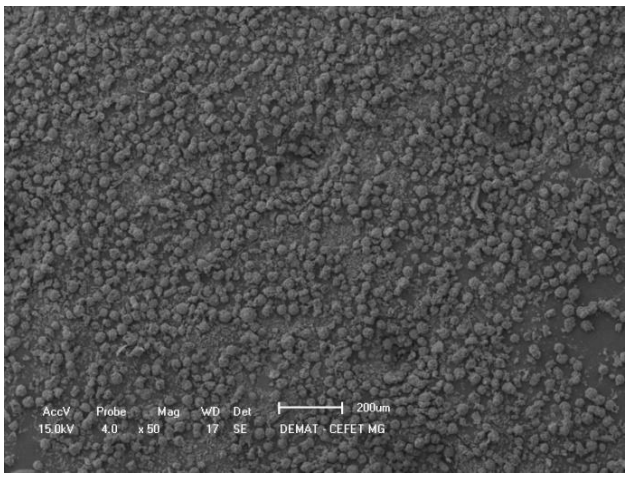
425-150µm



150-53µm

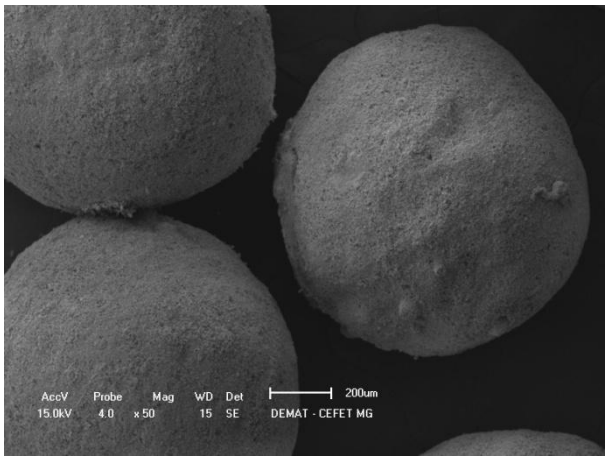


53-38µm

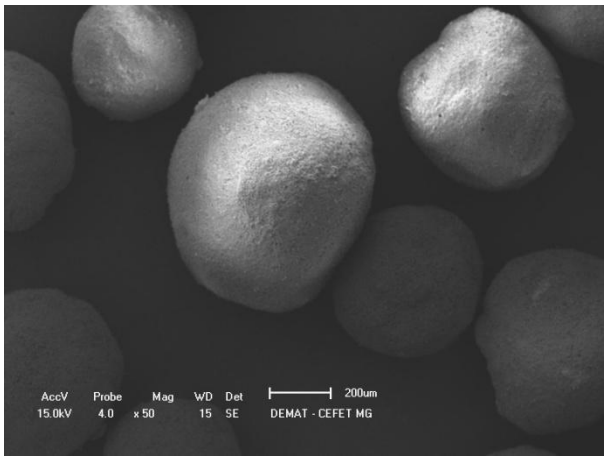


<38µm

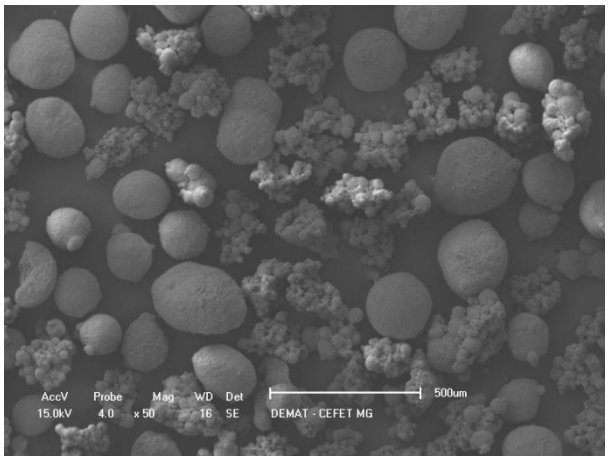
Figura 32 – Imagens de MEV de microesferas produzidas com velocidade de agitação de 1500RPM.



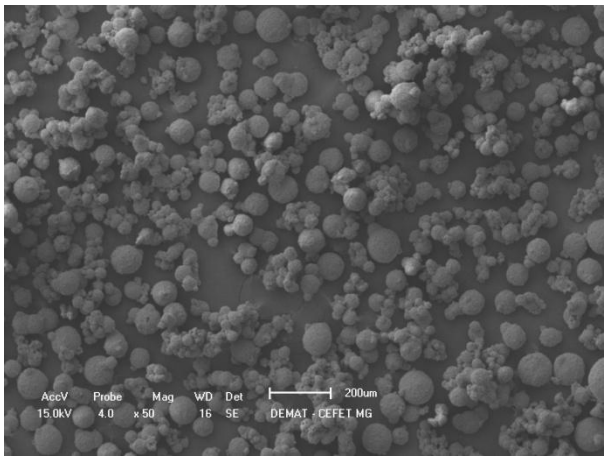
>840µm



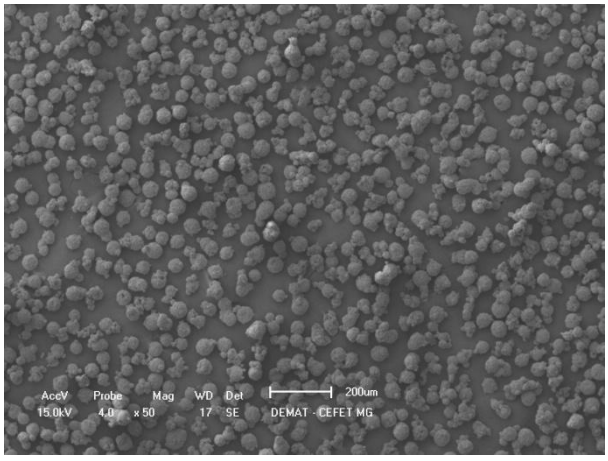
840-425µm



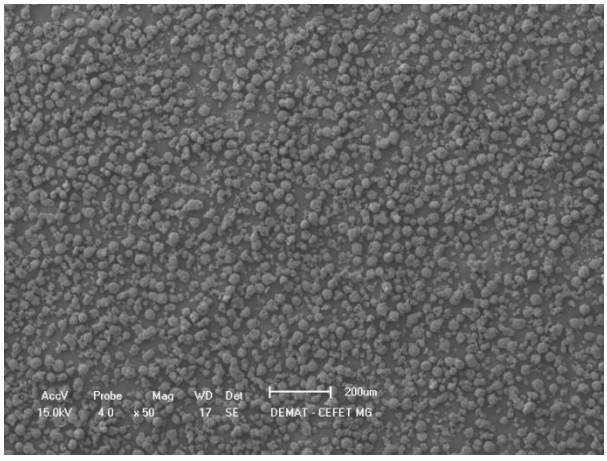
425-150µm



150-53µm

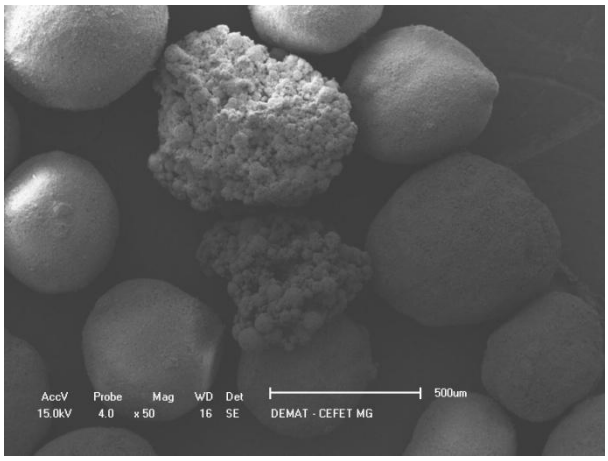


53-38µm

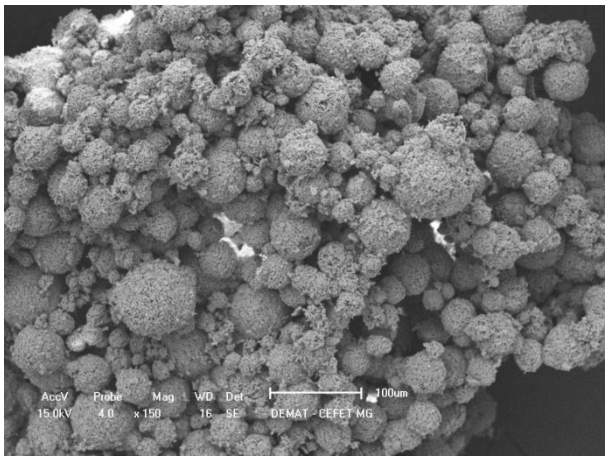


<38µm

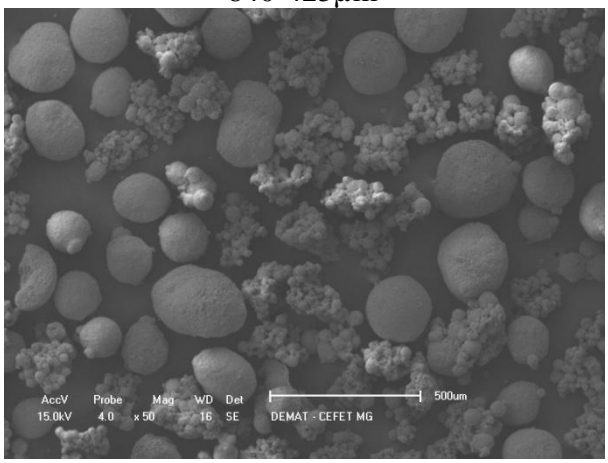
Figura 33 – Imagens de MEV de microesferas produzidas com velocidade de agitação de 2000RPM.



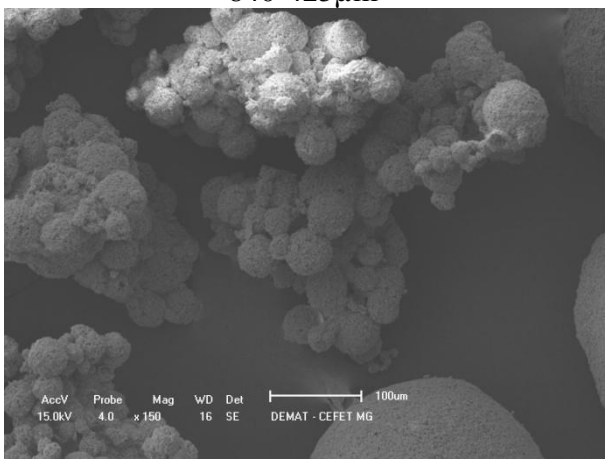
840-425µm



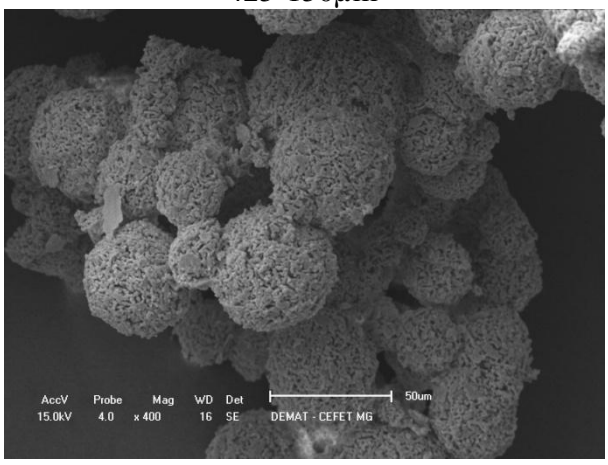
840-425µm



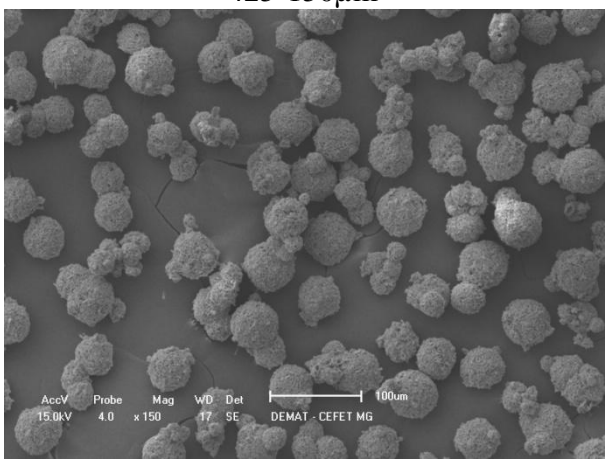
425-150µm



425-150µm



425-150µm



53-38µm

Figura 34 – Imagens de MEV de microesferas aglomeradas produzidas com velocidade de agitação de 2000RPM.

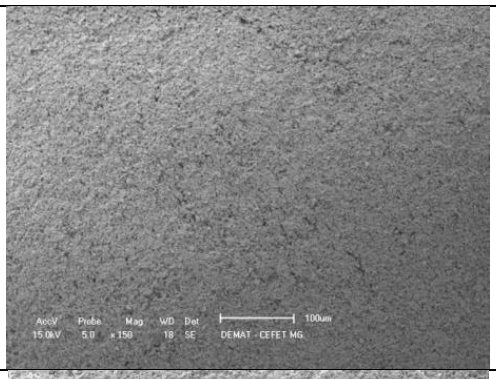
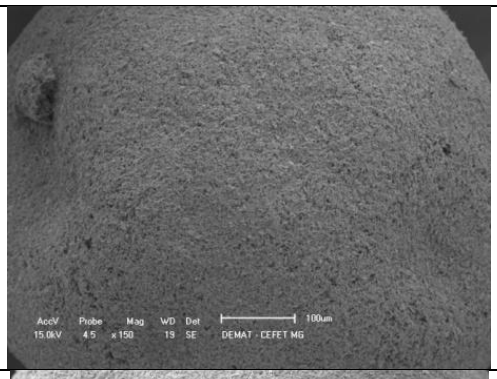
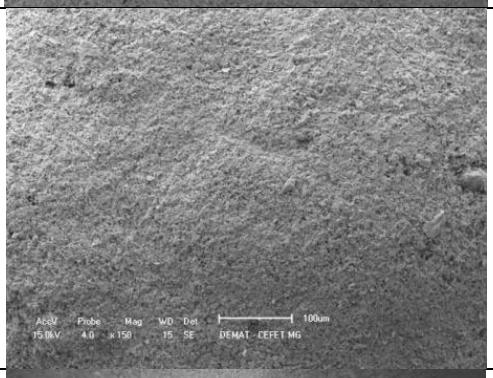
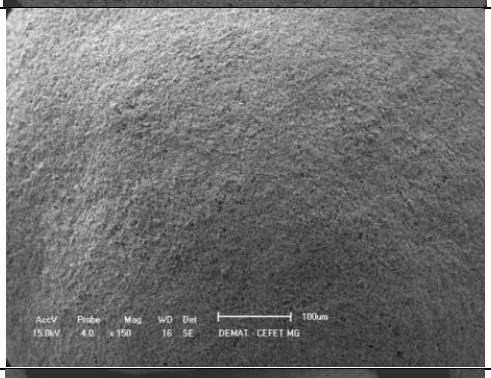
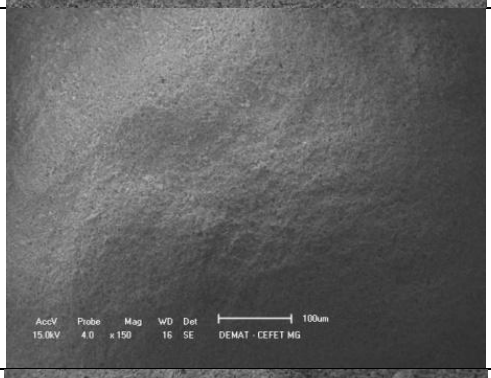
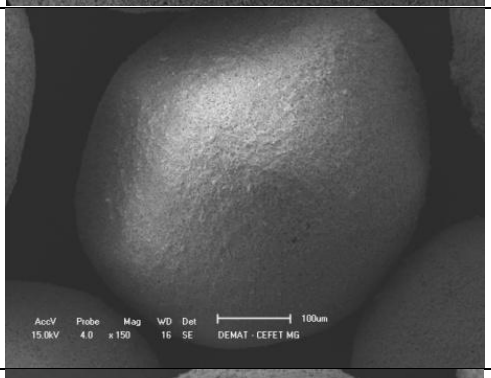
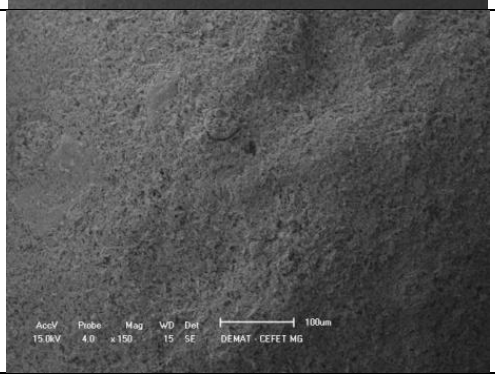
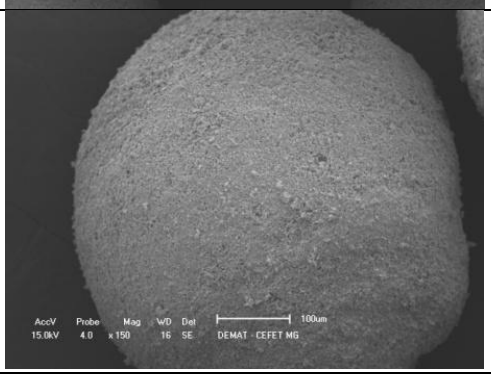
Veloc. agita-ção (RPM)	Granulometria (µm)	
	≥840	840-425
500		
1000		
1500		
2000		

Figura 35 - Imagens de MEV das microesferas produzidas com diferentes velocidades de agitação, sinterizadas e separadas granulometricamente.

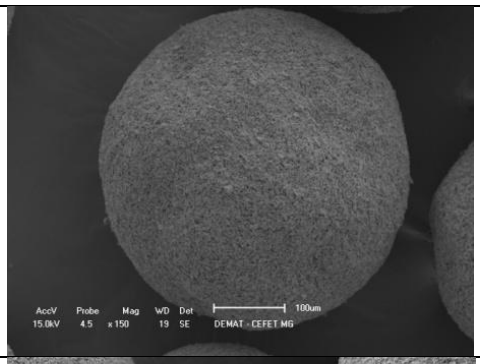
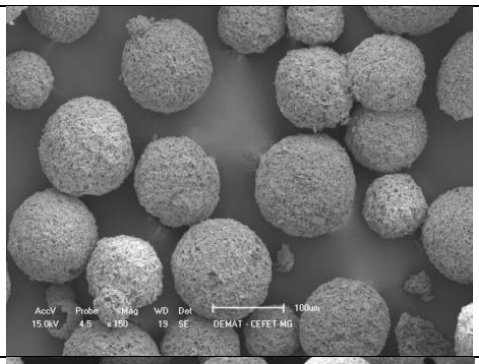
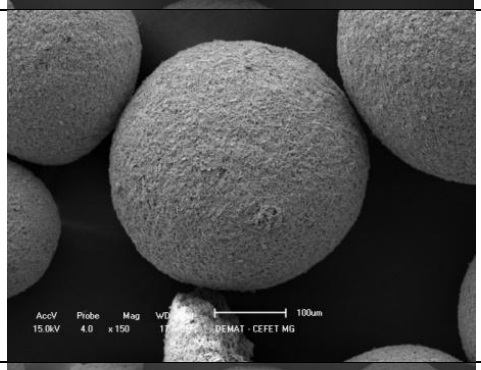
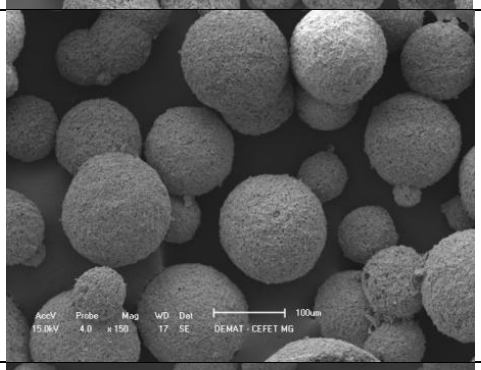
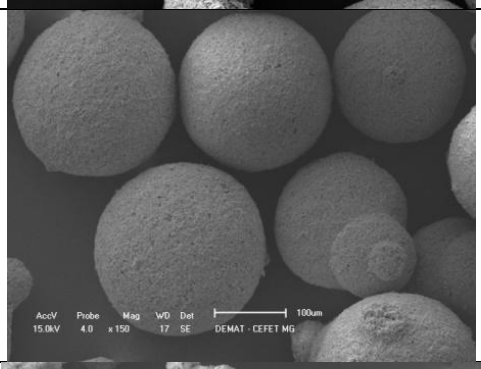
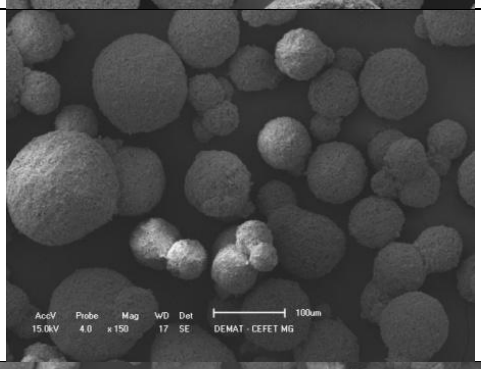
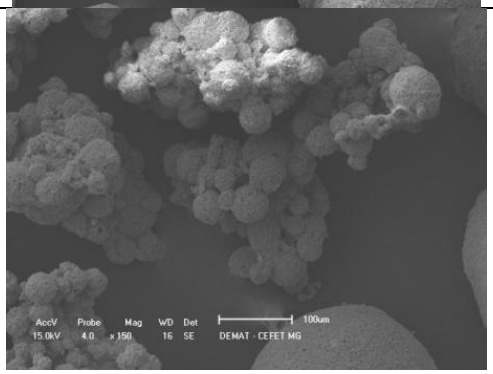
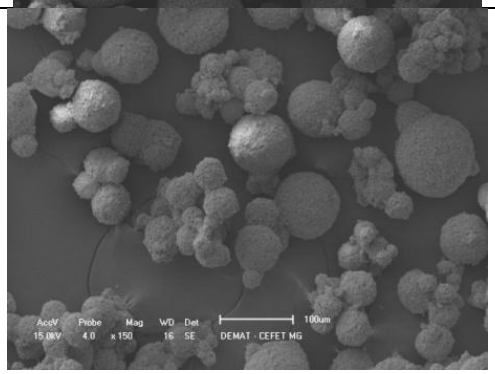
Veloc. agitação (RPM)	Granulometria (µm)	
	425-150	150-53
500		
1000		
1500		
2000		

Figura 35 (continuação) - Imagens de MEV das microesferas produzidas com diferentes velocidades de agitação, sinterizadas e separadas granulometricamente.

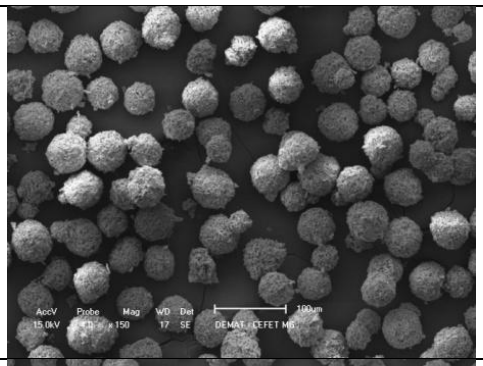
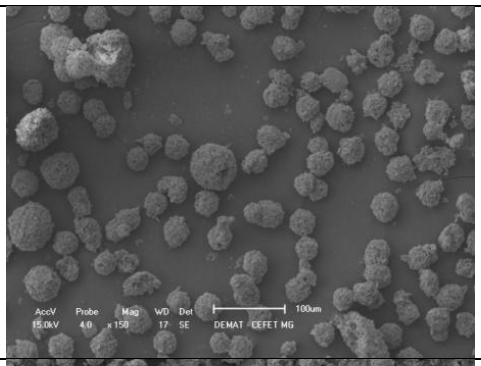
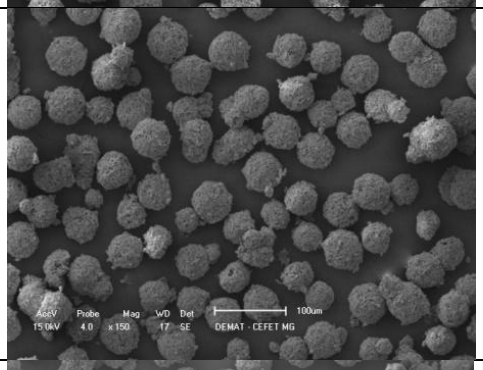
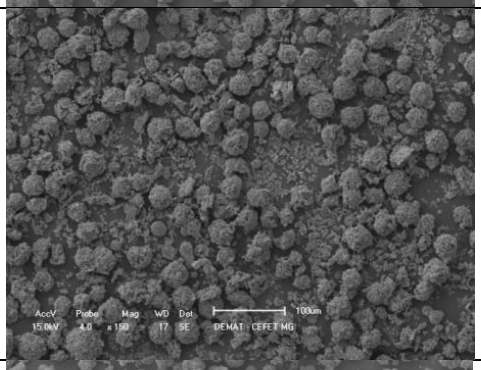
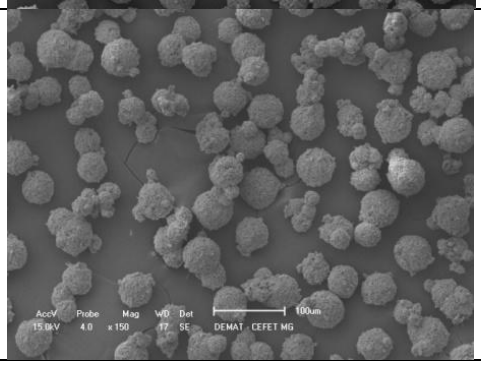
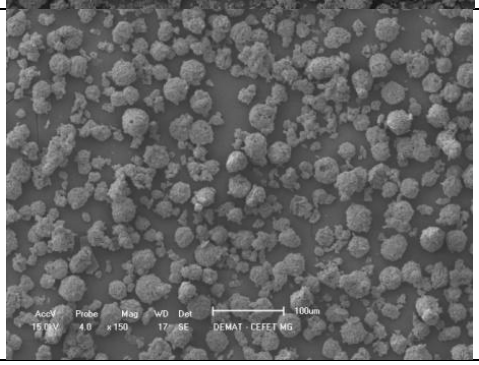
Veloc. agita-ção (RPM)	Granulometria (µm)	
	53-38	<38
500	-	-
1000		
1500		
2000		

Figura 35 (continuação) - Imagens de MEV das microesferas produzidas com diferentes velocidades de agitação, sinterizadas e separadas granulometricamente.

No material produzido com velocidade de agitação de 500RPM observa-se que as microesferas maiores apresentam uma morfologia um pouco deformada, aumentando a esfericidade à medida que o diâmetro diminui. A deformação das microesferas se deve à atuação de uma menor força cisalhante sobre uma massa maior, e à medida que diminui a massa esta força atua mais eficazmente formando partículas com maior esfericidade. Com esta velocidade não foram produzidas microesferas nas granulometrias de 53-38µm e inferiores a 38µm, devido às baixas forças que não foram suficientes para a quebra das microesferas formadas em outras menores. Não se verificam aglomerações entre as microesferas. Acredita-se que isto se deve ao fato desta velocidade ter produzido microesferas com diâmetros maiores, assim, em menor quantidade, que se apresentaram mais separadas uma das outras pela fase contínua, e/ou à baixa velocidade que não permitiu uma forte colisão entre elas, o que favoreceria a aglomeração. Verifica-se a existência de uma quantidade razoável de microesferas quebradas na menor granulometria. Supõe-se que esta quebra possa ocorrer durante a calcinação e/ou início da sinterização, onde a maior massa das microesferas maiores (Ø≥840µm – 44,5% e 840-425µm – 36,5%) sobre as microesferas menores levaria ao colapso das mesmas.

No processamento realizado com a velocidade de agitação de 1000RPM, as microesferas de diâmetros maiores se apresentam menos deformadas que as produzidas com velocidade de 500RPM, e aparecem algumas aglomerações a partir da faixa granulométrica de 425-150µm. Acredita-se que o maior número de partículas pequenas tenha aumentado o número de colisões, levando estas microesferas menores a aderirem às maiores. Aqui não são observadas muitas partículas fraturadas. Acredita-se que por haver um maior equilíbrio na quantidade de partículas nas faixas granulométricas de 150-53µm (30,0%) e 425-150µm (44,9%), o peso destas últimas não é suficiente para promover a fratura das microesferas na faixa granulométrica imediatamente inferior. Esta velocidade de agitação já é suficiente para produzir microesferas nas faixas granulométricas de 53-38µm e inferior a 38µm.

Observando-se as imagens das microesferas produzidas com a velocidade de 1500RPM, verifica-se que algumas esferas maiores perdem um pouco da esfericidade e se apresentam alongadas. Supõe-se que isto esteja relacionado ao fato das microesferas maiores apresentarem maior massa, assim maior inércia, e como a reticulação da gelatina leva algum tempo para

ocorrer, o movimento rápido das partículas antes do final da reticulação as tornaria mais alongadas. A quantidade de microesferas pequenas aumenta.

A observação mais importante sobre as microesferas produzidas com a agitação de 2000RPM foi a presença de grande quantidade de aglomerados. Isto se deve ao maior número de microesferas de menor diâmetro, que aumentaram em número, diminuindo assim a quantidade da fase contínua entre elas, que com a elevada velocidade de agitação se chocaram com maior intensidade, propiciando a aglomeração.

A figura 36 apresenta imagens de MEV de microesferas com diâmetros inferiores a 38µm, produzidas com as velocidades estudadas, para análise da eficiência do processo na obtenção de microesferas nesta faixa granulométrica. Pode ser observado que, mesmo apresentando pequena quantidade de microesferas nesta faixa de tamanho e, apresentando problemas de aglomeração, como na produção com a velocidade de 2000RPM, é possível a obtenção de microesferas com diâmetros inferiores a 38µm. As imagens das microesferas produzidas com velocidade de 1500RPM apresentam esferas quebradas, porém isto ocorreu na preparação para a realização das imagens.

A figura 37 mostra uma superfície interna de uma esfera com diâmetro superior a 840µm, produzida com velocidade de agitação de 1500RPM, sinterizada a 1200°C por 3 horas, onde se observa que a partícula não é oca e apresenta porosidade.

As figuras 38, 39 e 40 mostram imagens de MEV de esferas e microesferas fraturadas produzidas com diferentes velocidades de agitação.

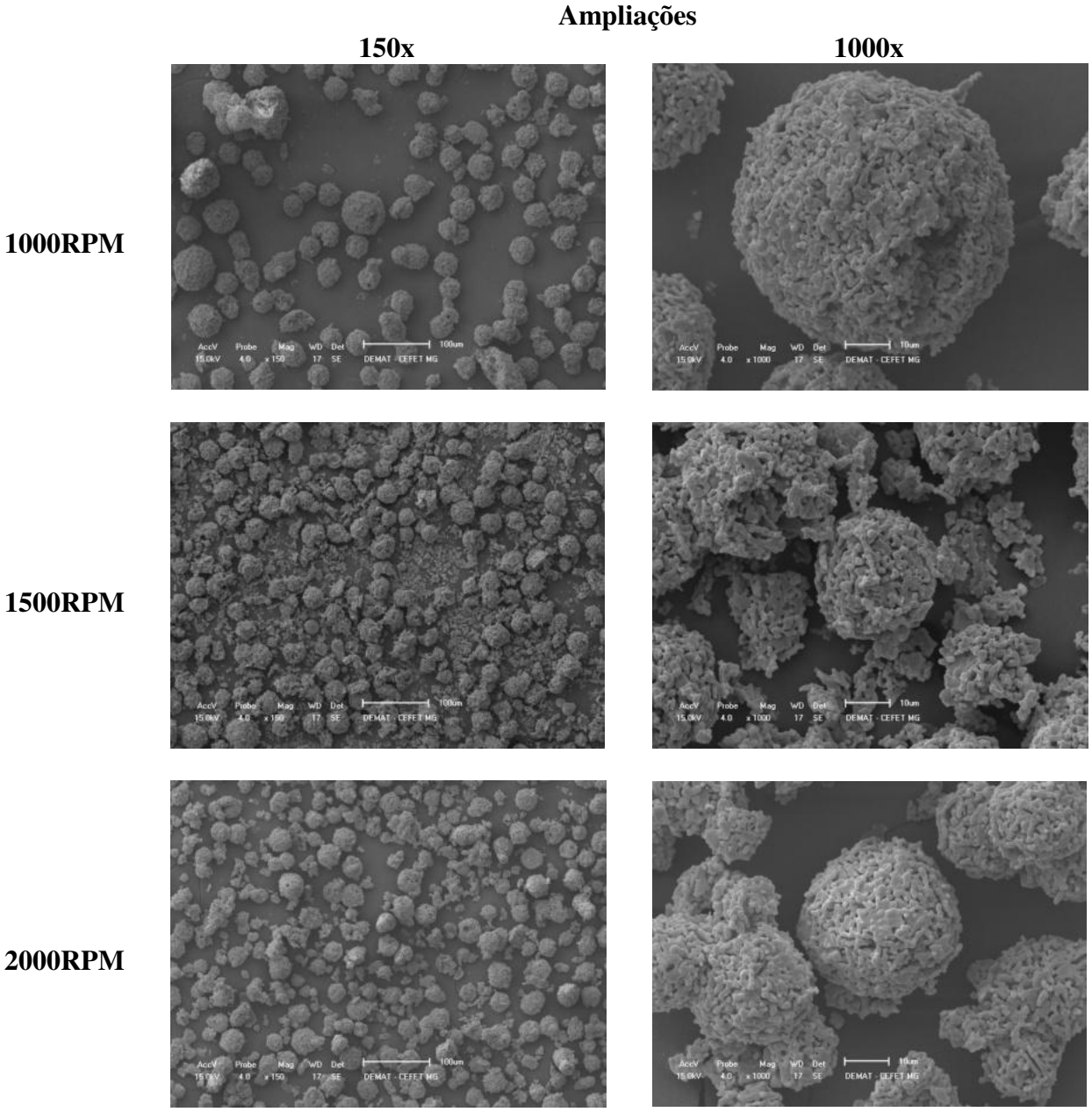


Figura 36 – Imagens de MEV de microesferas com diâmetros inferiores a 38µm, produzidas com diferentes velocidades de agitação.

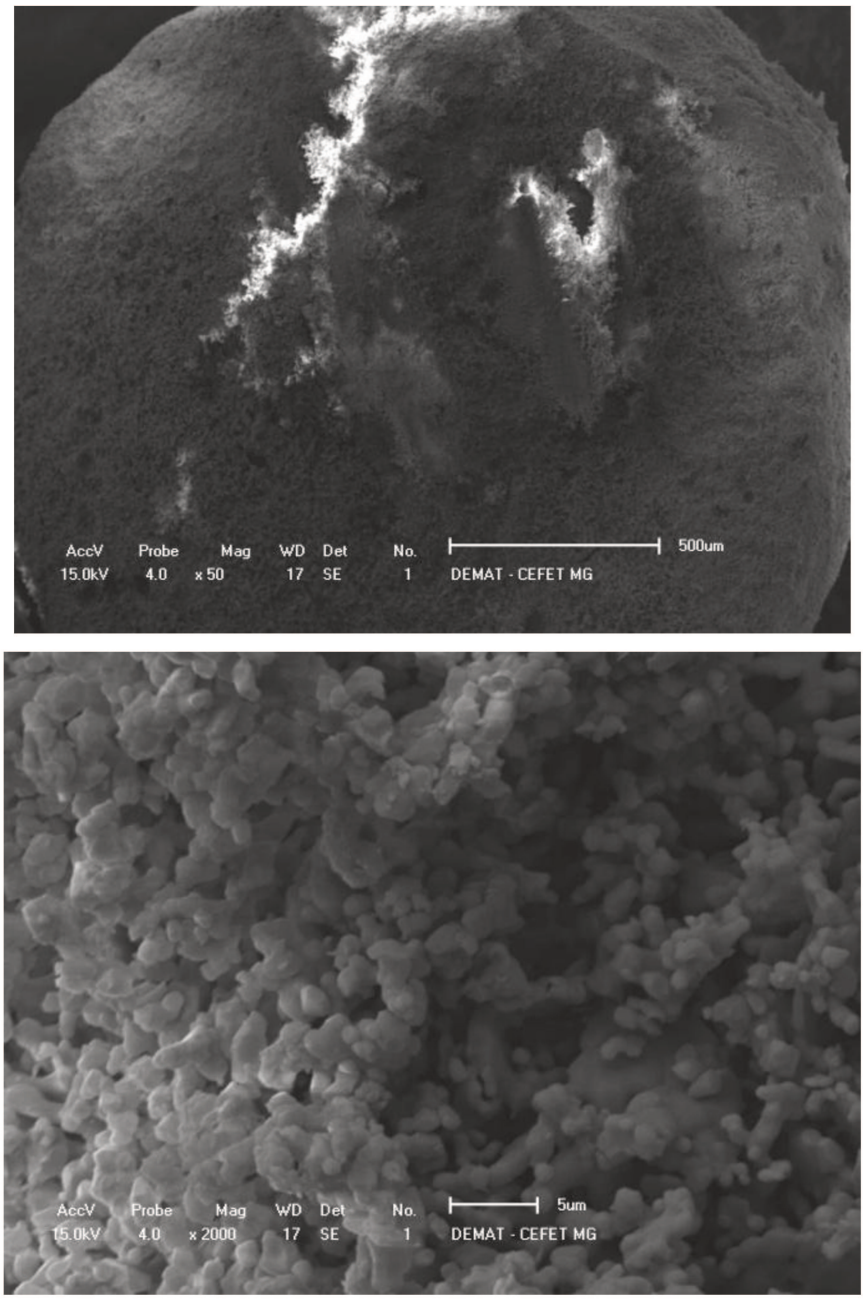
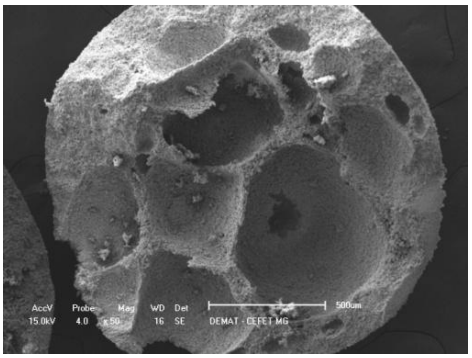
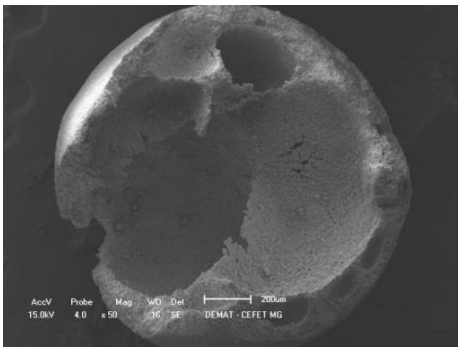


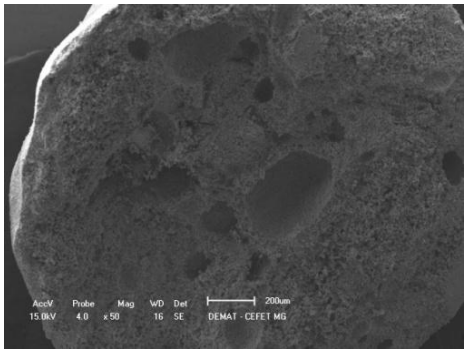
Figura 37 – Imagem de MEV da superfície interna de uma microesfera sinterizada a 1200°C/3h.

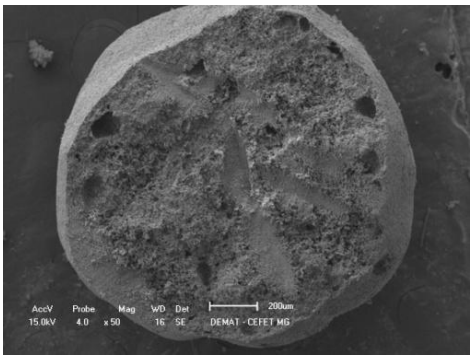
500RPM



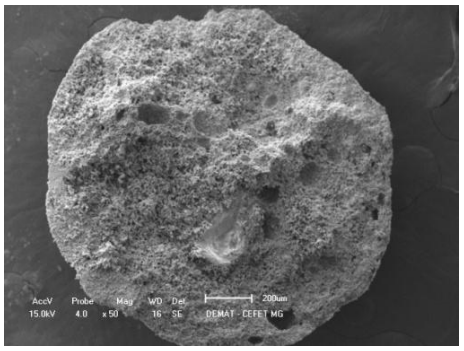


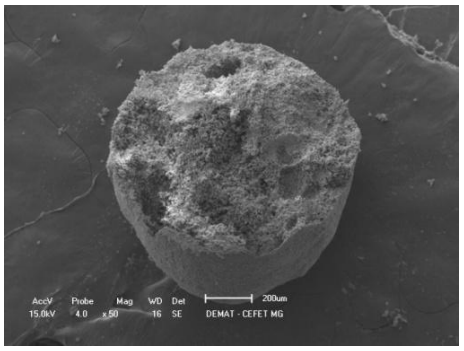
1000RPM



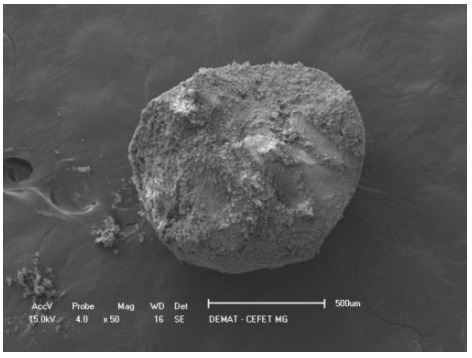


1500RPM





2000RPM



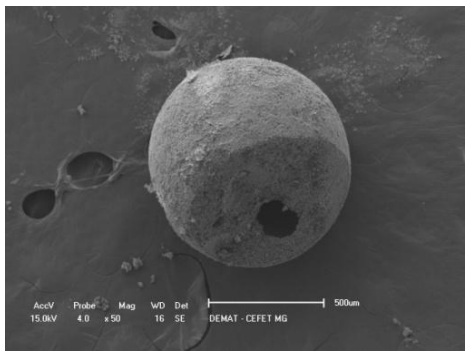
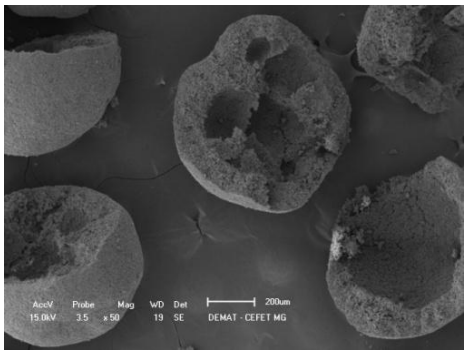
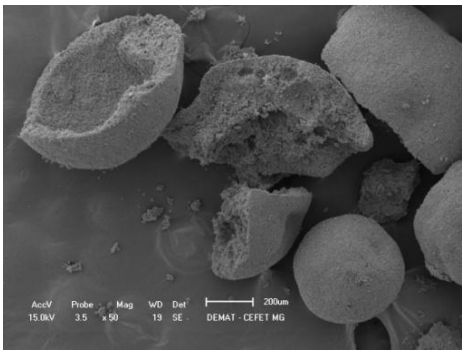


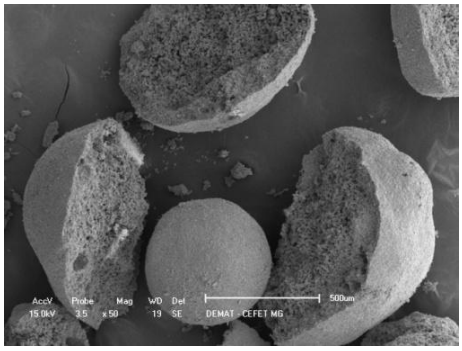
Figura 38 – Imagens de MEV de microesferas fraturadas com diâmetros ≥840µm, produzidas com diferentes velocidades de agitação.

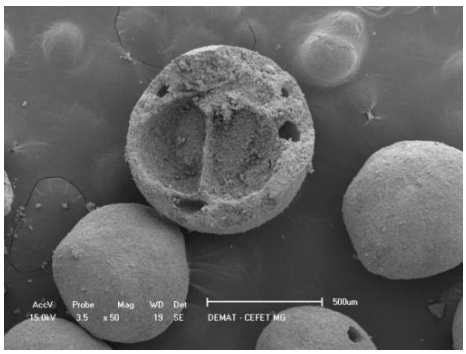
500RPM



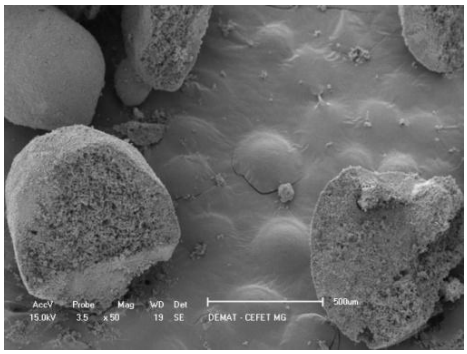


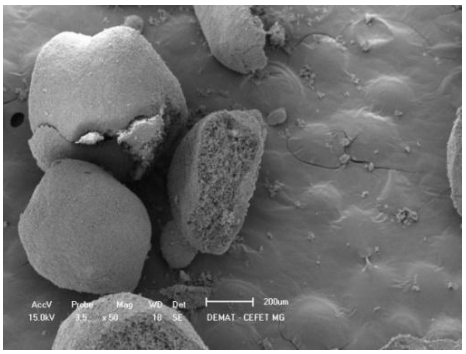
1000RPM



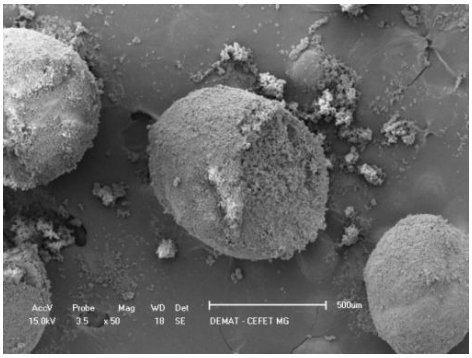


1500RPM





2000RPM



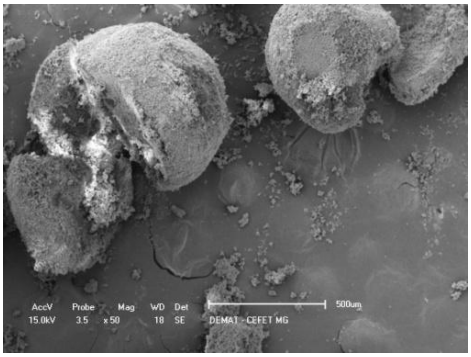
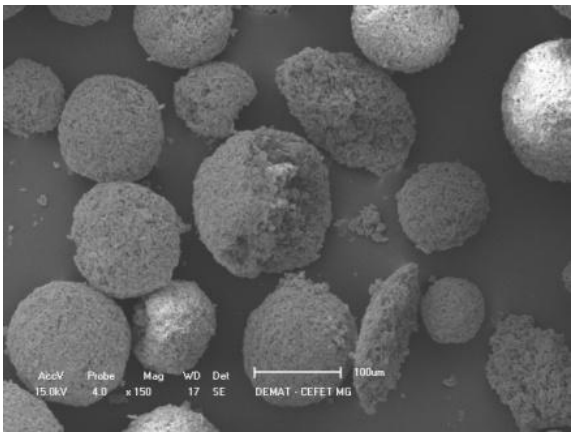


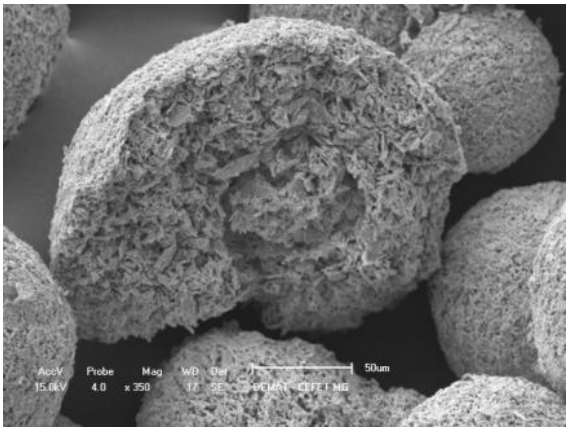
Figura 39 – Imagens de MEV de microesferas fraturadas com diâmetros entre 840-425µm, produzidas com diferentes velocidades de agitação.

500RPM



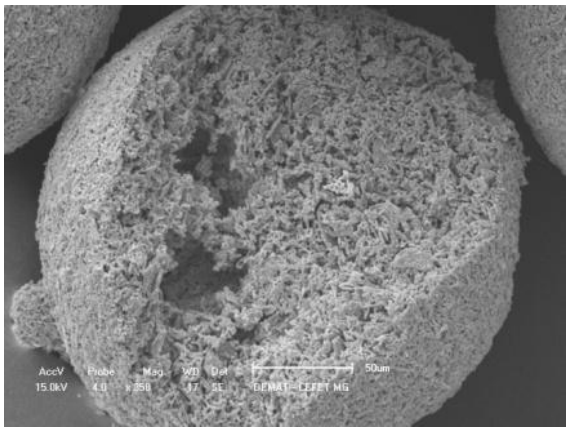
150-53µm

1000RPM



150-53µm

2000RPM



425-150µm

Figura 40 – Imagens de microesferas fraturadas produzidas com as velocidades de agitação de 500, 100 e 2000RPM, nas granulometrias de 425-150 e 150-53µm.

As esferas (diâmetros ≥1000μm) e as microesferas foram fraturadas utilizando-se um estilete. Não foi possível fraturar microesferas produzidas com todas as velocidades de agitação e faixas granulométricas, de forma que apresentassem uma superfície interna que pudesse ser observada. Analisando as micrografias observa-se que as esferas maiores produzidas com menor velocidade de agitação apresentaram cavidades, enquanto que as menores e produzidas com maior velocidade de agitação se mostraram mais compactas. Uma possibilidade é que isso seja devido às baixas forças cisalhantes que exercem uma menor pressão sobre as esferas e microesferas formadas nestas condições apresentando um padrão de bolhas que se formaram durante a dissolução da gelatina e que não puderam ser eliminadas.

5.2.2.7 Distribuição granulométrica

1 Peneiramento

A) Peneiramento das microesferas produzidas para o estudo da determinação das condições de sinterização.

Para cada condição estudada foi produzido um lote de microesferas nas mesmas condições, utilizando a velocidade de agitação de 1500RPM.

A tabela 9 mostra a porcentagem de microesferas retidas em cada faixa granulométrica, de acordo com as condições de sinterização, e a figura 41 mostra o gráfico de barras desta distribuição.

Tabela 9 - Distribuição granulométrica (% massa) das microesferas produzidas com diferentes condições de sinterização.

Tamanho das esferas (µm)	**% de retenção por temperatura/tempo de sinterização (°C/h)**						
	900	**1000**	**1100**	**1200**	**1200/3h**	**1300**	**1300/3h**
≥840	5,9	6,0	5,7	5,4	5,9	5,4	3,9
840 > Ø ≥ 425	7,6	6,0	4,5	4,9	6,2	5,7	6,3
425 > Ø ≥ 150	36,6	21,8	17,5	16,5	9,6	17,9	8,8
150 > Ø ≥ 53	**48,2**	**62,7**	**66,6**	**68,3**	**67,1**	**65,3**	**68,8**
53 > Ø ≥ 38	1,4	3,1	5,1	4,3	9,9	5,1	11,6
< 38	0,3	0,5	0,6	0,5	1,2	0,6	0,7
Total	100	100,1	100	99,9	99,9	100	100,1

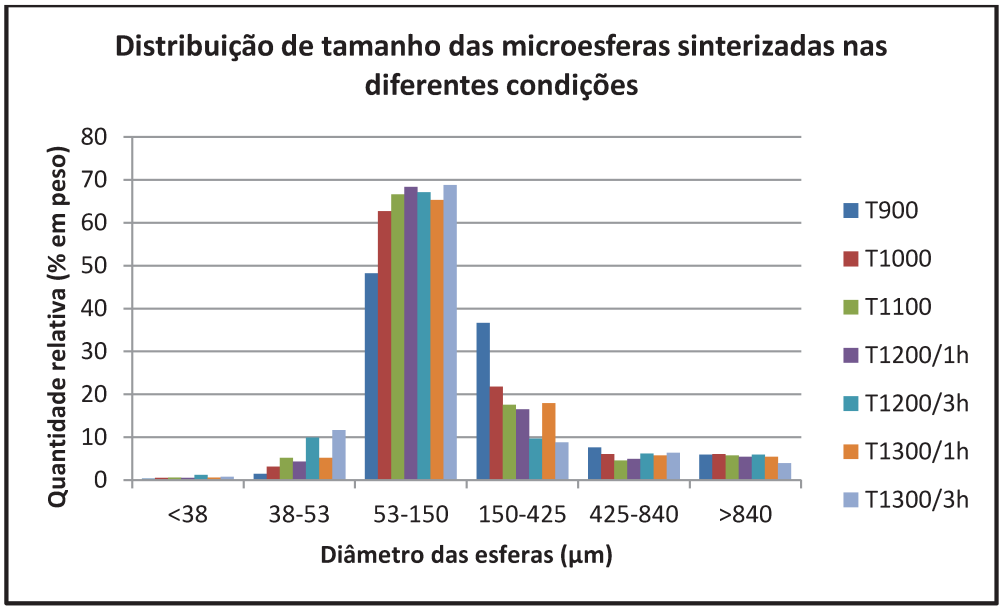


Figura 41 - Gráfico da distribuição granulométrica das microesferas, separadas por peneiramento, obtidas com a mesma velocidade de agitação e com diferentes temperaturas de sinterização.

Analisando-se o gráfico, observa-se que a maior quantidade das microesferas, em todas as

condições de sinterização, encontra-se na faixa de 53-150µm. Este fato era esperado, pois os parâmetros utilizados para a produção das microesferas foram os mesmos. A quantidade de microesferas com diâmetros inferiores a 38µm foi insignificante em todas as condições de sinterização. Nas faixas granulométricas menores, 38-53µm e 53-150µm, observam-se tendência de aumento da quantidade de microesferas com o aumento da temperatura de sinterização, ocorrendo o inverso com a faixa granulométrica entre 150-425µm. Nas granulometrias maiores, entre 425-840µm e acima de 840µm, praticamente não existem variações na quantidade das microesferas com o aumento da temperatura de sinterização. Isto pode ser explicado pela contração decorrente da sinterização que exerce maior influência nos diâmetros menores, fazendo com que parte das microesferas passe para a faixa granulométrica inferior, não afetando da mesma forma os diâmetros maiores. Através do gráfico pode ser observada, também, a reprodutibilidade do processo de obtenção das microesferas, evidenciada pela mesma distribuição granulométrica de todas as condições, uma vez que as microesferas foram obtidas da mesma forma, variando apenas os parâmetros de sinterização (temperatura/tempo).

Foram determinados os diâmetros médios de Sauter das microesferas sinterizadas nas diferentes condições, e a tabela 10 mostra o resultado. Através desta análise, observa-se uma tendência de diminuição do diâmetro médio das microesferas com o aumento da temperatura de sinterização, o que também pode ser explicado pela contração ocorrida durante o tratamento.

Tabela 10 - Diâmetros médios de Sauter para as diferentes condições de sinterização.

	Temperatura/ tempo de sinterização (°C/h)						
	900/1	**1000/1**	**1100/1**	**1200/1**	**1200/3**	**1300/1**	**1300/3**
Diâmetro médio de Sauter (µm)	149	123	114	116	101	116	99

B) Peneiramento das microesferas produzidas por diferentes velocidades de agitação.

Foram produzidos lotes de microesferas com diferença apenas nas velocidades de agitação utilizadas para o processamento, que foram de 500, 1000, 1500 e 2000RPM.

A tabela 11 mostra a distribuição granulométrica das microesferas produzidas com as diferentes velocidades de agitação. Pode ser observada uma tendência de aumento na quantidade de microesferas com diâmetros menores à medida que se aumenta a velocidade de agitação. Porém, a velocidade de agitação de 2000RPM apresentou a maior quantidade na mesma faixa granulométrica das produzidas com a velocidade de 1500RPM. Isto pode ser explicado pela aglomeração de microesferas de diâmetros inferiores que ficaram retidas na abertura superior, como pode ser visto nas figuras 33 e 34. A figura 42 mostra o gráfico de barras desta distribuição.

Tabela 11 - Distribuição granulométrica (% massa) das microesferas produzidas através de diferentes velocidades de agitação.

Tamanho das partículas (µm)	**Velocidade de agitação (RPM)**			
	500	**1000**	**1500**	**2000**
	%	**%**	**%**	**%**
≥840	**44,5**	11,9	5,0	1,4
840 > Ø ≥ 425	36,5	11,9	9,7	5,8
425 > Ø ≥ 150	16,4	**44,9**	33,5	9,0
150 > Ø ≥ 53	2,5	30,0	**48,3**	**69,9**
53 > Ø ≥ 38	-	1,2	3,1	11,0
< 38	-	-	0,3	2,9
Total	99,9	99,9	99,9	100

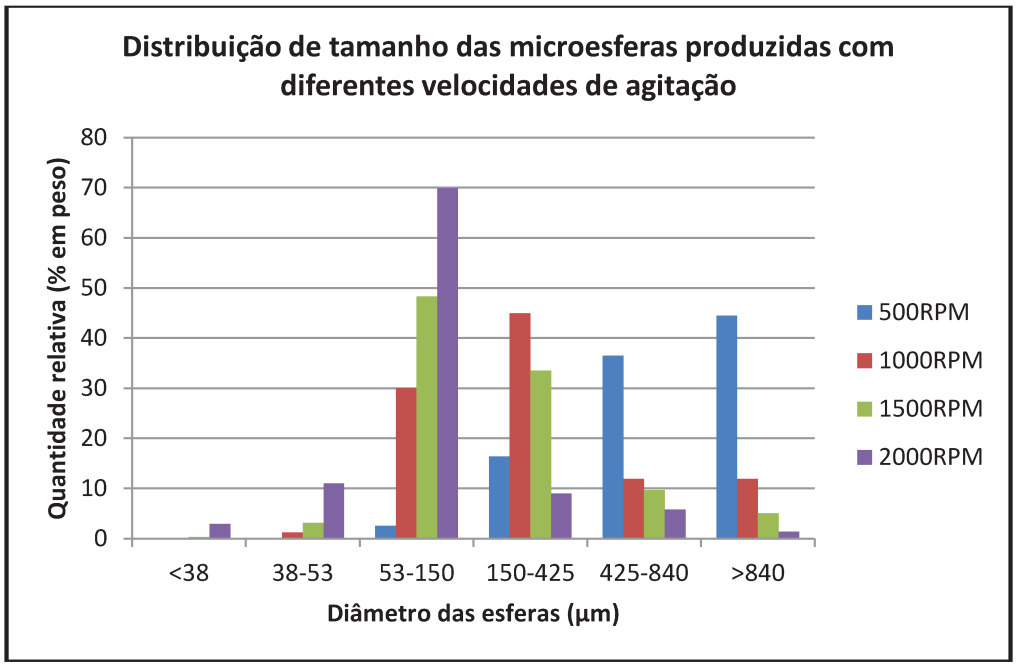


Figura 42 - Gráfico da distribuição granulométrica das microesferas, separadas por peneiramento, obtidas com diferentes velocidades de agitação e sinterizadas na mesma condição, 1200°C/3h.

Observa-se que o processamento com as velocidades de agitação de 1500 e 2000RPM apresentam a maior quantidade de microesferas na faixa granulométrica de 150-53µm.Verifica-se também que, com a diminuição da velocidade de agitação, ocorre um deslocamento da distribuição para tamanhos maiores. Isto pode ser explicado pela diminuição da taxa de cisalhamento, que causa uma diminuição da taxa de quebramento das partículas e por consequência a redução da formação de partículas de diâmetros menores (PINTO, 2006).

A tabela 12 mostra os resultados do diâmetro médio de Sauter das microesferas produzidas pelas diferentes velocidades de agitação. Através da análise destes resultados observa-se que o diâmetro médio diminui à medida que a velocidade de agitação aumenta. Isto pode ser verificado observando-se as imagens de MEV. O diâmetro médio resultante da velocidade de agitação de 2000RPM na verdade seria menor, se não houvesse as aglomerações retidas em peneiras com aberturas superiores. A quantidade de microesferas com diâmetros entre 53-150µm também seria menor, se não fossem os aglomerados retidos nesta faixa granulométrica.

Tabela 12 - Diâmetros médios de Sauter para as microesferas produzidas com diferentes velocidades de agitação.

	Velocidade de agitação (RPM)			
	500	**1000**	**1500**	**2000**
Diâmetro médio de Sauter (µm)	526	193	132	82

2 Análise de tamanho de partículas por espalhamento de luz

Esta análise foi realizada apenas nas microesferas com diâmetros inferiores a 425µm devido a limitações do equipamento. Assim, esta análise não fornece o valor correto do diâmetro médio das partículas, mas mostra a tendência da variação de tamanhos das partículas, decorrente da modificação da velocidade de agitação utilizada na produção das microesferas. Os valores apresentados são a média de três ensaios. A tabela 13 mostra estes resultados. Através da análise dos resultados confirma-se a tendência da diminuição do diâmetro médio com o aumento da velocidade de agitação do processo.

Tabela 13 - Distribuição granulométrica das microesferas com diâmetros < 425µm, produzidas com diferentes velocidades de agitação, medida por laser – CILAS, usando Triton X como dispersante.

Diâmetros	Velocidade de agitação (RPM)			
(µm)	**500**	**1000**	**1500**	**2000**
a 10%	47,30	38,85	27,79	41,17
a 50%	127,32	85,32	81,26	88,54
a 90%	259,17	222,41	182,65	171,75
médio	**141,90**	**109,09**	**96,98**	**98,27**

5.2.2.8 Porosidade das microesferas

A tabela 14 mostra o volume de poros das microesferas, obtido através da equação 3, descrita na seção *4.1.3.7,* e apresentada no trabalho de Paul e Sharma (1999).

Tabela 14 - Volume de poros de algumas granulometrias obtidas com diferentes velocidades de agitação.

Diâmetro das microesferas (µm)	**Velocidade de agitação (RPM)**			
	500	**1000**	**1500**	**2000**
	Volume dos poros (cm^3/g)			
840-425	0,43			
425-150	0,21	0,28	0,46	0,37
150-53		0,18	0,47	0,51

Observando-se os resultados, verifica-se uma tendência de aumento da porosidade com a diminuição do diâmetro das microesferas. Acredita-se que isto esteja relacionado apenas com aumento da área superficial, uma vez que o tamanho dos poros não deve variar, pois as microesferas foram realizadas com os mesmos parâmetros de processamento que influenciam sua formação. O maior volume verificado nas microesferas produzidas com velocidade de agitação de 500RPM e na granulometria 840-425µm pode estar relacionado com a presença de bolhas nas microesferas, conforme visto na figura 39. Por sua vez, a diminuição no volume de poros das microesferas produzidas com a velocidade de agitação de 2000RPM na granulometria de 425-150µm e discreto aumento na granulometria de 150-53µm pode ser devido à aglomeração das microesferas, que com a sinterização se uniram diminuindo assim a área superficial. Não foram realizados ensaios em todas as granulometrias devido à quantidade insuficiente de microesferas em algumas delas.

6 CONCLUSÕES

A rota desenvolvida para produção de microesferas de fosfato de cálcio bifásico se mostrou eficiente para a obtenção de materiais particulados porosos, de geometria esférica, e em ampla faixa granulométrica.

A técnica aprimorada foi simplificada com a utilização de apenas um equipamento, no caso um misturador mecânico, sem utilização de agentes emulsificantes e substâncias tóxicas, e se mostrou viável para obtenção de *scaffolds.*

A rota desenvolvida produz microesferas multidispersas e não deixa resíduos das substâncias utilizadas no processamento, como comprovado pelas análises de FRX, DRX e MEV.

A obtenção de uma maior ou menor porosidade nas microesferas pode ser controlada através da temperatura e tempo de sinterização. Estes parâmetros também alteram o percentual das fases do fosfato de cálcio presentes nas microesferas.

A velocidade de agitação utilizada no processamento afeta a distribuição de tamanho e o diâmetro médio das microesferas produzidas. Aumentando a velocidade de agitação, aumenta a quantidade de microesferas em faixas granulométricas menores e diminui o diâmetro médio.

As microesferas produzidas, segundo a rota desenvolvida, não apresentaram efeitos citotóxicos.

As microesferas produzidas, em função de suas características, apresentaram potencial para incorporação e liberação de medicamentos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1) Avaliar a influência da concentração (%) de gelatina e/ou solução de gelatina na porosidade das microesferas, visando à obtenção de esferas densas, ou com maior porosidade, através do processo desenvolvido.

2) Realizar um estudo detalhado da influência dos parâmetros de sinterização nas microesferas, analisando porcentagem de contração, porcentagem e tamanho de nano, meso e macroporos visando à obtenção de esferas com boa resistência mecânica, porosidade e área superficial elevadas.

3) Avaliar a influência da quantidade da fase contínua na produção e características físicas das microesferas.

4) Realizar um estudo dos fenômenos físicos-químicos envolvidos na produção das microesferas.

5) Aprimorar os parâmetros de processamento para a obtenção de microesferas na faixa granulométrica de 38-53µm e inferior.

6) Estudar a produção de *scaffolds* partindo do método aprimorado.

REFERÊNCIAS

ARITA, Irene H.; WILKINSON, David S.; MONDRAGÓN, Maria Antonieta; CASTAÑO, Victor M. Chemistry and sintering behaviour of thin hydroxyapatite ceramics with controlled porosity. **Biomoterials**, v.16, p.403-408, 1995.

BEHNAMGHADER, A.; BAGHERI, N.; RAISSI, B.; MOZTARZADEH, F. Phase development and sintering behaviour of biphasic HA-TCP calcium phosphate materials prepared from hydroxyapatite and bioactive glass. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v.19, p.197–201, 2008.

BORDEN, M.; ATTAWIA, M.; KHAN, Y.; LAURENCIN, C.T. Tissue engineered microsphere-based matrices for bone repair: design and evaluation. **Biomaterials**, v.23, n.2, p.551-559, 2002.

BRITO, Silvio L. M.; GOUVÊA, Douglas; GANZELLA, Renato. Principais fatores que influenciam o comportamento reológico de suspensões aquosas de um sistema varistor à base de ZnO. **Cerâmica**, v.53, p.169-174, 2007.

CARRODEGUAS, Raúl García; DE AZA, Antonio H.; Xavier TURRILLAS; PENA, Pilar; DE AZA, Salvador. New approach to the b-a polymorphic transformation in magnesium-substituted tricalcium phosphate and its practical implications. **J. Am. Ceram. Soc.**, v.91, n.4, p.1281-1286, 2008.

CASTRO, A. L. de; PANDOLFELLI, V. C. Revisão: Conceitos de dispersão e empacotamento de partículas para a produção de concretos especiais aplicados na construção civil. **Cerâmica**, v.55, p.18-32, 2009.

CHIAVERINI, Vicente. **Metalurgia do pó**. 4.ed. São Paulo: Associação Brasileira de Metalurgia e Materiais, 2001. 326p.

COELHO, Maria Alice Zarur; AMARAL, Priscilla Filomena Fonseca. Técnicas de Purificação. Disponível em: <http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Enzimol%20Aplic/eqb706_aula_08.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2012.

CONZ, Márcio Baltazar; GRANJEIRO, José Mauro; SOARES, Glória de Almeida. Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medicaldental applications as bone graft. **J. Appl. Oral Sci.** v.13, n.2, p.136-140, 2005.

CORTESI, Rita; ESPOSITO, Elisabetta; OSTI, Maria; SQUARZONI, Giacomo; MENEGATTI, Enea; DAVIS, Stanley Spencer; NASTRUZZI, Claudio. Dextran cross-linked gelatin microspheres as a drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 47, p. 153–160, 1999.

CORTESI, R.; NASTRUZZI, C.; DAVIS, S.S. Sugar cross-linked gelatin for controlled release: microspheres and disks. **Biomaterials**, v. 19, p. 1641-1649, 1998.

COSTA, A.C.F.M.; LIMA, M.G.; LIMA, L.H.M.A.; CORDEIRO, V.V.; VIANA, K.M.S.;SOUZA, C.V.; LIRA, H.L. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.4, n.3, p.29-38, 2009.

DACULSI, Guy; LABOUX, Olivier; MALARD, Olivier; WEISS, Pierre. Current state of art of biphasic calcium phosphate bioceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.14, p.195-200, 2003.

DOROZHKIN, Sergey V. Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art. **J. Funct. Biomater.**,v.1, p. 22-107, 2010.

ELLIOT, J. C. **Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates**. New York: Elsevier, 1984. v.18, n.1, p. 389.

ESPOSITO, Elisabetta; CORTESI, Rita; NASTRUZZI, Claudio. Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. **Biomaterials**, v.17, n.20, p.2009-2020, 1996.

FERREIRA, Oscar Jacinto Bareiro. **Síntese do α-fosfato tricálcico e estudo da modificação de cimentos de fosfato de cálcio com silicato tricálcico**. 2009. Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro de Materiais, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

FONSECA, Flávia Mendonça; SILVA, Marcelo Henrique Prado da; LOURO, Luís Henrique Leme; COSTA, Carlos Roberto Corrêa da. Fabricação de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita por gelcasting . **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v.XXVIII, p.33-41, 1. trim. 2011.

FOOK, A.C.B.M.; APARECIDA, A.H.; FOOK, M.V.L. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea. **Revista Matéria**, v.15, n.3, p. 392-399, 2010.

GAUTHIER, Olivier; BOULER, Jean-Michel; WEISS, Pierre; BOSCO, Julia; DACULSI, Guy; AGUADO, Eric. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.47, n.1, p.28-35, 1999.

GOPI, D.; INDIRA, J.; PRAKASH, V. Collins Arun; KAVITHA, L. Spectroscopic characterization of porous nanohydroxyapatite synthesized by a novel amino acid soft solution freezing method. **Spectrochimica Acta Part A**, v.74, p.282–284, 2009.

GONSALVES, Arlan de Assis; ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo; SOARES, Nivaldo Alves; GOULART, Marília Oliveira Fonseca; ABREU, Fabiane Caxixo de. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v.34, n.7, p.1215-1223, 2011.

GLOVER, Paul. Porosity. Disponível em: <http://www2.ggl.ulaval.ca/personnel/paglover/CD%20Contents/Formation%20Evaluation%20English/Chapter%205.PDF>.Acesso em: 18 ago. 2011. (Formation Evaluation MSc Course Notes, p.43-53).

GROSS, Karlis A.; BERNDT, Christopher C. Biomedical Application of apatites. In: KOHN, Matthew; RAKOVAN, John; HUGHES, John M. (Ed.). **Phosphates:** geochemical, geobiological, and materials importance. Whashington: Mineralogy Society of America, 2002, Materials Application, p. 631-672. (Reviews in Mineralogy, v.48).

GUASTALDI, Antonio Carlos; APARECIDA, Anahi Herrera. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1352-1358, 2010.

HSU, F.Y.; CHUEH, S.C.; WANG, Y.J. Microspheres of hydroxyapatite/reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth. **Biomaterials**, v.20, n.20, p.1931-1936, 1999.

HUANG, Ya-I; CHENG, Yu-Hsiu; YU, Chien-Chih; TSAI, Tong-Rong; CHAMA, Thau-Ming. Microencapsulation of extract containing shikonin using gelatin–acacia coacervation method: a formaldehyde-free approach. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 58, p. 290–297, 2007.

JYOTHI, N.V.; PRASANNA M.; PRABHA, S.; RAMAIAH, P. Seetha; SRAWAN, G.; SAKARKAR, S. N. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency: a review. **The Internet Journal of Nanotechnology**, v.3, n.1, 2009.

KIMURA, Yu; OZEKI, Makoto; INAMOTO, Takashi; TABATA, Yasuhiko. Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. **Biomaterials**, n.24, p.2513–2521, 2003.

KOMLEV, Vladimir S.; BARINOV, Serguei M.; KOPLIK, Elena V. A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release. **Biomaterials**. n.23, p.3449 – 3454, 2002.

KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.62, n.4, p. 600-612, dez. 2002.

KRYLOVA E.; IVANOV, A.; ORLOVSKI, V.; EL-REGISTAN G.; BARINOV, S. Hydroxypatite-polysaccharide granules for drug delivery. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.13, n.1, p.87-90, 2002.

LACERDA, Kássio André; LAMEIRAS, Fernando Soares; SILVA, Viviane Viana. Avaliação da biodegradação de matrizes porosas à base de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1216-1221, 2009.

LEGEROS, R.Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. **Adv. Dent. Res.**, v.2, n.l, p.164-180, aug. 1988.

LIAO, Chun-Jen; LIN, Feng-Huei; CHEN, Ko-Shao; SUN, Jui-Sheng. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. **Biomaterials**, v.20, p.1807-1813, 1999.

MARCOS, P. J. B.; CASTRO, R. H. R.; GOUVÊA, D. Estudo de suspensões de zircônia e magnésia em etanol. **Cerâmica**, v.47, n.304, p.187-192, 2001.

MEDEIROS, Daniela Cristina de. **Desenvolvimento de microesferas de diclofenaco de sódio de liberação prolongada** – avaliação do potencial de utilização de blendas de acetobutirato de celulose e poloxamers na modulação do perfil de liberação do fármaco. 2009. 129p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MENDES FILHO, Antonio Alves. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita e compósitos a partir de matéria-prima reciclada**. 2006. 204p. Tese (Doutorado) – Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Rede Temática em Engenharia de Materiais - REDEMAT, Ouro Preto.

MOTTA, Éder Presa. **Queda de pressão em um leito de partículas de xisto**: avaliação de modelos para distribuição granulométrica e diâmetros médios equivalentes, estudo do efeito da altura do leito e avaliação de modelos para predição da queda de pressão. 2009. 135f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

NARURKAR, Vic A.; LIZZUL, Paul F. The role of calcium hydroxyalapatite (Radiesse) in nonsurgical aesthetic rejuvenation. **Journal of Drugs in Dermatology**, 2010.

OLIVEIRA, Daniela Maria Pinheiro de. **Síntese e caracterização de pós de fosfato tricálcio β e de hidroxiapatita: elaboração de bifásicos Ha/TCP-β para aplicações como substituto ósseo**. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville.

OLIVEIRA, Fernando Perotta de. **Influência do processamento na obtenção de biocerâmicas à base de hidroxiapatita**. 2008. 117p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

OLIVEIRA, I. R. de; SEPULVEDA, P.; PANDOLFELLI, V. C. Heterodefloculação no sistema Al_2O_3 – SiC. **Cerâmica**, v.44, n.290, p. 238-243, 1998.

OLIVEIRA, Ivone. R.; STUDART, André R.; PILEGGI, Rafael G.; PANDOLFELLI, Vitor C. **Dispersão e empacotamento e partículas:** princípios e aplicações em processamento cerâmico. São Paulo: Fazendo Arte Editorial, 2000, 195p.

OLIVEIRA, S. V.; BARBOSA, W. P. F.; ARAÚJO, E.P.; RABELLO, G. P.; BRAGA, C. R. C.; FOOK, M.V.L. Influência da temperatura na formação de fases do fosfato tricálcio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CERÂMICA,53, 2009, Guarujá.

ORTEGA, F. S.; PANDOLFELLI, V. C.; RODRIGUES, J. A.; SOUZA, D. P. F. de. Aspectos da reologia e da estabilidade de suspensões cerâmicas. Parte III: mecanismo de estabilização eletroestérica de suspensões com alumina. **Cerâmica**, v.43, n.281-282, p.112-118, 1997.

ORTEGA, F. S.; PILEGGI, R. G.; PANDOLFELLI, V. C. Análise da relação entre distância de separação entre partículas (IPS) e viscosidade de suspensões. **Cerâmica,** v.45, n.295, p. 155-159, 1999.

PATEL, Zarana S.; YAMAMOTO, Masaya; UEDA, Hiroki; YASUMIKO, Tabata; MIKOS, Antonios G. Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. **Acta Biomaterialia**, v.4, p.1126 – 1138, 2008.

PATIL, Sachin. Crosslinking of polysaccharides: methods and applications. Disponível em: < http://www.pharmainfo.net/reviews/crosslinking-polysaccharides-methods-and-applications>. Acesso em: 11 jul.2010.

PAUL, Willi.; SHARMA, Chandra. P. Infection resistant hydroxyapatite/alginate plastic composite. **J. Mater. Sci. Let.**, v.16, p.2050-2051, 1997.

PAUL, W.; SHARMA, C. P. Development of porous spherical hydroxyapatite granules: application towards protein delivery. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, n.10, p.383 – 388, 1999.

PINTO, Lindomar. **Efeito das condições de operação e da geometria do reator sobre a distribuição de tamanhos de partícula de uma polimerização em suspensão**. 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PRADEESH, T. S.; SUNNY, M. C.; VARMA, H. K.; RAMESH, P. Preparation of microstructured hydroxyapatite microspheres using oil in water emulsions. **Bull. Mater. Sci.**, v.28, n. 5, p.383–390, 2005.

PONTO isoelétrico. Disponível em: <http://www.rousselot.com/ponto-isoeletrico.html>. Acesso em: 02 maio 2010.

QIU, Chaofan; XIAO, Xiufeng; LIU, Rongfang. Biomimetic synthesis of spherical nano-hydroxyapatite in the presence of polyethylene glycol. **Ceramics International**, v.34, p.1747–1751, 2008.

QIU, Qing-Qing; DUCHEYNE, Paul; AYYASWAMY, Portonovo S. New bioactive, degradable composite microspheres as tissue engineering substrates. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, n.1, p.66–76, 2000.

RAMAY, Hassna R.R.; ZHANG, M. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 25, p. 5171–5180, 2004.

RAO, R. Ramachandra; ROOPA, H. N.; KANNAN, T. S. Solid state synthesis and thermal stability of HAP and HAP – β-TCP composite ceramic powders. **Journal of materials science: materials in medicine**, v. 8, p. 511-518, 1997.

REIS, Catarina Pinto; NEUFELD, Ronald J.; RIBEIRO, Antônio J.; VEIGA, Francisco. Nanoencapsulation I. methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.2, p.8–21, 2006.

RIBEIRO, C.C.; BARRIAS, C.C.; BARBOSA, M.A. Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. **Biomaterials**, v.25, p.4363–4373, 2004.

RIBEIRO, C. C.; BARRIAS, C. C.; BARBOSA, M. A. Preparation and characterization of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. **J. Mater. Sci: Mater. Med.** , v.17, p.455-463, 2006.

ROKHADE, Ajit P.; AGNIHOTRI, Sunil A; PATIL, Sangamesh A.; MALLIKARJUNA, Nadagouda N.; KULKARNI, Padmakar V.; AMINABHAVI, Tejraj M.. Semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboxymethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p.243–252, 2006.

ROSA, Adalberto Luiz; SHAREEF, Mohammed Youssef; NOORT, Richard van. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v.14, n.3, p.273-277, jul/set.2000.

RUYS, A.J.; WEI, M.; SORRELL, C.C.; DICKSON M.R.; Brandwood, A.; Milthorpe, B .K. Sintering effects on the strength of hydroxyapatite. **Biomaterials**, n.16, p.409-415, 1995.

RYU, H. S.; YOUN, H. J.; HONG, K. S.; CHANG, B.S.; LEE, C. K.; CHUNG, S. S. An improvement in Sintering property of β-Tricalcium phosphate by addition of calcium pyrophosphate. **Biomaterials**, v.23, n.14, p.909-914, 2002.

RYU, H. S.; YOUN, H. J.; HONG, K. S.; KIM, S. J.; LEE, D. H.; CHANG, B.S.; LEE, C. K.; CHUNG, S. S. Correlation Between MgO Doping and Sintering Characteristics in Hydroxyapatite/β-Tricalcium phosphate Composite. **Rev. Engineering Materials**, v.218-220, n.14, p.21, 2002.

SILVA, G. A.; DUCHEYNE, P.; REIS, R. L. Materials in particulate form for tissue engineering 1: basic concepts. **Journal of Tissue Engineering end Regenerative Medicine**. v. 1, p. 4 – 24, 2007.

SINGH, Saranjit; RAO, K.V.Rama; VENUGOPAL, MANIKANDAN, K.; R. Alteration in dissolution characteristics of gelatin-containing formulations: a review of the problem, test methods, and solutions. **Pharmaceutical Technology**, p.36-58, april 2002.

SIVAKUMAR, M.; MANJUBALA I.; RAO, K. Panduranga. Preparation, characterization and *in vitro* release of gentamicin from coralline hydroxyapatite–chitosan composite microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v.49, p.281, 2002.

SIVAKUMAR, M.; RAO, K. Panduranga. Preparation, characterization, and *in vitro* release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-alginate composite microspheres. **J Biomed. Mater. Res. A**, v.65, p. 222–228, 2003.

SOFT tissue engineering: healing wounds, enhancing appearances. Disponível em: <http://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/articles/article_2579_en.html>. Acesso em: 06 mar. 2009.

SOUZA, Maria Sílvia Martins de. Ativos microencapsulados encontram mais aplicações. Disponível em: <http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd388/microencap3.htm>. Acesso em: 22 maio 2010.

STUECKER, John N.; CESARANO III, Joseph. Rheology control of highly concentrated mullite suspensions with polyelectrolyte for robocasting. Disponível em: <http://www.osti.gov/bridge/servlets/purl/759857-kh5ahG/webviewable/759857.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2011.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.;MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente /** Health and Environment Journal, v. 7, n. 2, p.12-20, 2006.

SUN, Ruixue; LU, Yupeng; CHEN, Kezheng. Preparation and characterization of hollow hydroxyapatite microspheres by spray drying method. **Materials Science and Engineering C**, v.29, n. 4, p. 1088-1092, 2009.

SUNNY, M.C.; RAMESH, P.; VARMA, H.K. Microstructured microspheres of hydroxyapatite bioceramic. J Mater Sci Mater Med., v.13, n.7, p.623-632, 2002.

TABATA Y.; IKADA, Y.; MORIMOTO, K.; KATSUMATA, H.; YABUTA, T.; IWANAGA, K.; KAKEMI, M. Surfactant-free preparation of biodegradable hydrogel microspheres for protein release. **J. Bioact. Compat. Polym.**, v.14, p.371–84, 1999.

TAKAHASHI, Yoshitake; YAMAMOTO, Masaya; TABATA, Yasuhiko. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and b-tricalcium phosphate. **Biomaterials**, v.26, p.3587–3596, 2005.

TANIMOTO, Yasuhiro; SHIBATA, Yo; MURAKAMI, Asuka; Takashi, MIYAZAKI; NISHIYAMA, Norihiro. Effect of varying HAP/TCP ratios in tape-cast biphasic calcium phosphate ceramics on response *in vitro*. **Journal of Hard Tissue Biology**, v.18, n.2, p.71-76, 2009.

TEMENOFF, Johnna S.; MIKOS, Antonios G. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, p.2405-2412, 2000.

VANDELLI, M. A.; RIVASI, F.; GUERRA, P.; FORNI, F.; ARLETTI, R. Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v.215, p.175–184, 2001.

VANDELLI, Maria Angela; ROMAGNOLI, Marcello; MONTI, Alessandra; GOZZI, Manuela; GUERRA, Paolo; RIVASI, Francesco; FORNI; Flavio. Microwave treated gelatin microspheres as drug delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 67– 84, 2004.

VIGUIER, E.; BIGNON, A.; LAURENT, F.; GOEHRIG, D.; BOIVIN, G.; CHEVALIER, J. A

new concept of gentamicin loaded HAP/TCP bone substitute for prophylactic action: in vivo pharmacokinetic study. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v.22, p.879-886, 2011.

WEINAND, W.R.; GONÇALVES, F.F.R.; FEIDEN, A.; BERVEGLIERI, C.I.; GRANDE, H.L.C.; LIMA, W.M. Influência da temperatura de sinterização nas propriedades físico-mecânicas e na microestrutura da hidroxiapatita natural obtida de ossos de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS (CBECIMat), 17, 2006, Foz do Iguaçu. **Anais eletrônicos**... Foz do Iguaçu: Metallum, 2006. Disponível em: <http://www.metallum.com.br/17cbecimat/resumos/17cbecimat-101-022.pdf>. Acesso em: 11 out. 2010.

WEISS, P.; MIJARES, D.; LEGEROS, J.; ENKEL, B.; JEAN, A.; DALCUSI, G.; LEGEROS, R. Surface characterization of calcium phosphate ceramics used in an injectable bone substitute. **European Cells and Materials**, v. 10, n. 4, 2005, p. 9-10.

WU, Ta-Jen; HUANG, Hsiu-Hsuan; LAN, Cheng-Wen; LIN, Chi-Hung; HSU, Fu-Yin; WANG, Yng-Jiin. Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. **Biomaterials**, v.25, p.651–658, 2004.

YEOM, C. K.; OH, S. B.; RHIM, J. W.; LEE, J. M. Microencapsulation of water-soluble herbicide by interfacial reaction I.: characterization of microencapsulation. **Journal of Applied Polymer Science**, v.78, p.1645–1655, 2000.

APÊNDICE A – Cópias dos artigos e resumo publicados

Key Engineering Materials Vols. 493-494 (2012) pp 269-274
Online available since 2011/Oct/27 at www.scientific.net
© (2012) Trans Tech Publications, Switzerland
doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494.269

Study of the Release Potential of the Antibiotic Gentamicin from Microspheres of BCP

Rachel Mary.Osthues[1, a]; Sidney Nicodemos da Silva[2, b];
Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia[3, c], Sílvia Ligório Fialho[4, d]

[1] Ph.D student, Department of Materials, Mechanical Engineering Faculty, UNICAMP, Campinas, SP/ Federal Center for Technological Education - CEFET- MG, Belo Horizonte, MG, Brazil.
[2] Department of Materials Engineering, Federal Center for Technological Education - CEFET- MG, Belo Horizonte, MG, Brazil.
[3], Department of Materials, Mechanical Engineering Faculty, UNICAMP, Campinas, SP. Brazil.
[4] Pharmaceutical and Biotechnological Development – Fundação Ezequiel Dias – FUNED, Belo Horizonte, Brazil.
[a]osthues@fem.unicamp.br, [b]sidneynicodemos@yahoo.com.br, [c]zavagl@fem.unicamp.br, [d]silvia.fialho@funed.mg.gov.br

Key-words: microspheres, BCP, drug delivery, HA + β-TCP granules, ceramic microspheres

Abstract. Orthopedics surgeries frequently are open surgeries, but the improvement of the specific instrumentation and the use of bioresorbable polymerics implants for regeneration of bone fractures are contributing to the development of noninvasive techniques such as an injectable bone substitute. These injectable materials are composites, formed by a particulate ceramic phase and a polymeric phase, and have the advantages of combining bioactivity and the ability to control degradation and some mechanical properties. In addition, microparticles present flexibility to fill several types of defects with closer packing and allow new bone growth and vascularization through the interconnected pores formed by the spaces between them. Another advantage of the particulate materials is that they have the potential to incorporate drugs such as antibiotics that can be applied *in situ* for treatment or prevention of bone infection, which is important because the poor circulation of blood in the osseous tissues makes necessary large amounts of these drugs to guarantee that an adequate dose reaches the affected site. This work evaluates the release potential of gentamicin from BCP spherical microparticles to be used in osseous injectable implants. The particles present a smooth geometry to prevent inflammatory reactions frequently caused by an irregular morphology, and their compositions offer a combination of biodegradability and stability. Microparticles with diameters between 150-425μm, were obtained by a method based on the immiscibility of liquids. To encapsulate the antibiotic, the spheres were immersed in a gentamicin solution, and after 24h they were separated and dried. The evaluation of the gentamicin release from the microspheres was carried out at 37°C in PBS, and the release medium was collected at predetermined time intervals for measurement of the amount released. This work demonstrates that these microspheres can find potential application in bone repair and regeneration.

Introduction

The increase of the life expectancy of the world population became the diseases related to the bone structure a public health problem, leading the United Nations to declare, in 1999, the decade of 2000 to 2010 as the "decade of the bone and joints" [1].

The search for longevity and for superior quality of life generates the need for development of alternatives for repair and substitution of tissues damaged by accidents, illnesses, fractures and other causes [2].

Orthopedics surgeries frequently are open surgeries, but the improvement of the specific instrumentation and the use of bioresorbable polymerics implants for regeneration of bone fractures are contributing to the development of noninvasive techniques such as an injectable bone substitute [3].

All rights reserved. No part of contents of this paper may be reproduced or transmitted in any form or by any means without the written permission of TTP, www.ttp.net. (ID: 177.77.128.186-20/12/11,21:28:56)

These injectable materials are composites, formed by a particulate ceramic phase and a polymeric phase, and have the advantages of combining bioactivity with the ability of control of degradation and some mechanical properties. In addition, microparticles present flexibility to fill several types of defects with closer packing and allow new bone growth and vascularization through the interconnected pores formed by the spaces between them [4].

Particular attention has been focused on the use of the ceramic based systems, especially on hydroxyapatite, because of its use for bone regeneration, being biocompatible, non-toxic and osteocondutive. The behavior of the ceramic particles, for instance, and their packing characteristics, depends on the morphology and microstructure. An irregular morphology is known to cause inflammatory reactions, so rounded and smooth geometries are preferable for filling tissue defects and they conform better than non-homogeneous granules in irregular implant sites. Uniform particles also present more predictable flowing properties during injection [5, 6].

Another advantage of the particulate materials is that they have the potential to incorporate drugs such as antibiotics that can be applied *in situ* for treatment or prevention of bone infection. This is important because the poor circulation of blood in the osseous tissues makes necessary the presence of large amounts of these drugs, for prolonged periods, to guarantee that an adequate dose reaches the affected site [7,8]. But high concentrations of drugs for long periods may induce toxicity and microbial antibiotic resistance can occur because of the selective pressure induced by the medicine. The local delivery of the antibiotic achieves high local concentration levels with low risk of systemic toxicity [8].

The usual therapeutic or prophylaxis dose recommended is 3mg/kg/day, which corresponds, for example, to a dose of 150mg for a patient weighing 50kg. The recommended duration of the prophylactic treatment with antibiotics is less than 48 hours, so as not to select antibiotic resistant bacterial strains. Actually, gentamicin is the antibiotic most commonly incorporated [8].

This work evaluates the release potential of gentamicin from biphasic calcium phosphate (BCP) spherical microparticles with diameter between 150-425μm, obtained by a method based on the immiscibility of liquids, which can find applicability in bone regeneration, when used as injectable bone substitutes.

Material and Methods

Materials

The BCP used to produce the microspheres, composed of 90/10 HA/β-TCP weight ratio, was donated by Inside Materiais Avançados Ltda. Gelatine powder was from VETEC Química Fina Ltda. Vegetable oil (rape oil) was of food-grade refined oil from Cargill Incorporated. Gentamicin was aquired from Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Other reactants were of analytical grade.

Methods

Preparation of the Microspheres. The BCP powder was added to an aqueous solution of gelatin and this slurry was dispersed in the stirring oil. The stirring results in formation of beads due to the surface tension forces. The precipitated beads were washed with acetone, recovered and dried in air. The gelatin/BCP beads were heated for burning-off the polymer, sintered at 1200°C for 60 minutes in an air furnace, washed with dionized water to eliminate any residue and dried at 180°C for 2h. The microspheres were sieved to separate the desired range of diameters, 150-425μm.

Characterization of the Microspheres. X-Ray Fluorescence analysis was performed using Shimadzu EDX-720 equipment. The X-ray diffraction pattern was obtained with a Shimadzu X-ray diffractometer, model Lab XRD 6000 with monochromatic Cu-kα radiation. The BCP powder and the microspheres were analyzed by FTIR. The specific area of the powder, volume of pores and median diameter of the microspheres were measured by BET method (Quantachrome NovaWin2). Additionally the internal pore spaces in the spheres were estimated by allowing a solvent to penetrate into the spheres and using the Eq. 1:

$$V_p = (w_2 - w_1)/w_1 d. \quad (1)$$

Where w_1 is the weight of empty spheres, w_2 the weight of solvent filled spheres and d the density of the solvent [9]. Dry spheres were weighted and place in deionized water at room temperature for 24h to allow the penetration into the spheres. The spheres were removed and their surfaces were wiped with a paper filter and reweighted. The microporosity, morphology and surface roughness of the microspheres were studied using a Wild Heerbrugg Typ 327615 stereomicroscope and a scanning electron microscopy (SEM) Shimadzu SSX-550.

Cytotoxicicity Assay. For the evaluation of the cytotoxicity of the microspheres, the material was sterilized with γ radiation of 25kGy intensity. The *in vitro* assay was realized by the agar diffusion cell culture method, in quadruplicate, using cell line NCTC clone 929, cells of conjunctive rat tissue (ATCC CCL1) according ASTM F895-84: 1984-Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture, ISO 10993.5:2009-Biological Evaluation for Medical Devices Test for Cytotoxicity: in vitro methods and US Pharmacopeia 32, 2009, -Biological Reactivity Tests *In Vitro*. The positive control was realized in toxic latex and the negative control in atoxic paper filter discs.

Encapsulation of Gentamicin into BCP Microspheres. For the encapsulation of gentamicin into BCP microspheres, 100mg of the microspheres was immersed in 10mL of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 containing 100mg of gentamicin sulphate at room temperature for 24 hours. The microspheres were then separated by centrifugation (2500xg for 15 minutes, three times) and dried at room temperature for 48 hours or in a drying oven for 24 hours. The amount of gentamicin encapsulated was calculated indirectly, by measuring the difference in the concentration of gentamicin in the medium before and after microspheres loading. The experiments were performed in triplicate.

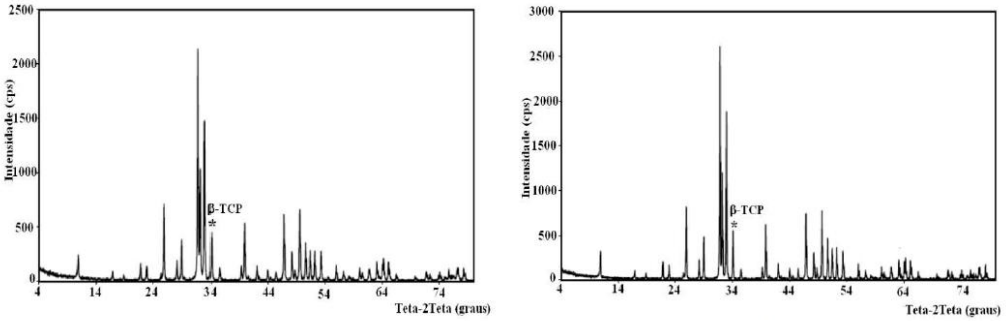
Determination of the Concentration of Gentamicin Sulphate. The amount of gentamicin sulphate encapsulated into the microspheres and released in the medium in the *in vitro* release study was measured by high performance liquid chromatography (HPLC) using the method adapted from the United States Pharmacopeia (U.S. Pharmacopeia 32, 2009) by a Merck apparatus equipped with an autosampler. A pump was used at a constant flow rate of 1.5mL/min. A C-18 reverse-phase column (4.6mm x 125mm) filled with octadecyl silane chemically bonded to porous silica was used. The mobile phase was composed by sodium heptanosulphonate (0.5% w/v) solubilized in a mixture of methanol, ultra filtrated water and glacial acetic acid (70:25:5). An ultraviolet detector (model, Merck, USA) was used at a wavelength of 330nm. The validation of the method showed the absence of interference of phosphate-buffered saline compounds with gentamicin sulphate retention time, discarding the risks of overestimation.

***In Vitro* Release Study.** The *in vitro* release study was performed in 10mL of PBS (pH 7.4), under sink conditions. This study was carried out in a water bath set at a constant temperature of 37°C, coupled with a stir plate. 100mg of BCP microspheres loaded with gentamicin sulphate were added to individual small glass bottles, which were maintained under stirring during the whole study. At set time intervals (2, 4, 6, 12, 24 and 36 hours), 1.0mL of the incubation medium was sampled and 1.0mL of fresh medium was immediately added to each sample bottle. The collected samples were analyzed as described above in *Determination of the concentration of gentamicin sulphate.* The experiment was conducted in triplicate. Both microspheres dried at room temperature and in a drying oven were evaluated for comparison.

Results and Discussion

X-ray Fluorescence. The result showed that the microspheres do not contain contaminants.

XRD. X-ray diffraction analysis indicated that the particles did not contain any distinguishable crystalline impurity, and show a characteristic peak of β-TCP. The X-ray patterns for the BCP powder and for the microspheres, shown in Fig. 1, differ in their intensity, but present the same peaks. This shows that the process used to obtain the microspheres does not leave residues, and that the sintering increases the crystalinity.



(a) (b)

Figure 1 – X-ray diffraction patterns: (a) BCP powder, (b) microspheres of BCP.

FTIR. Fig. 2 shows the spectra of the spheres produced. The PO_4 bands were at 476, 570, 603, 961, 1049 and 1090cm^{-1}. The sharp bands at 3579 and 633cm^{-1} were the vibrations from OH. There was a sharp peak at 1648 and a broad band near 3400cm^{-1} which are an indication of adsorbed water. The adsorbed water gave bands near 3400cm^{-1}[9].

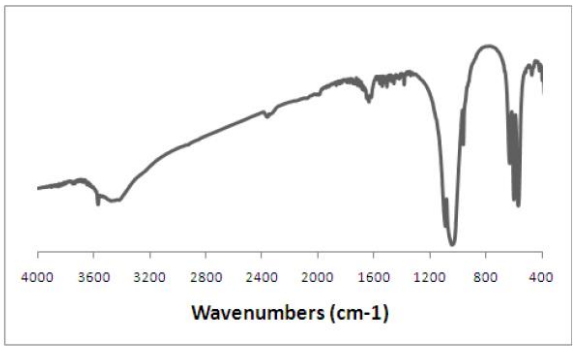


Figure 2 – FTIR spectra of sintered microspheres of BCP.

BET. From this assay the superficial area of the spheres in the diameter range of 150-425μm is equal to 1.11m^2/g. The pore volume is 0.003cm^3/g, and the median diameter is 0.18μm.

Using the Eq. 1 the estimated internal pore space is 0.12cm^3/g. The difference between this result and the BET result may be due the greater affinity of the hydroxyapatite and water, so the last one adsorves better on it than nitrogen.

Stereomicroscopy. The stereomicrograph shows that the spheres prepared had an overall spherical geometry as shown in Fig. 3.

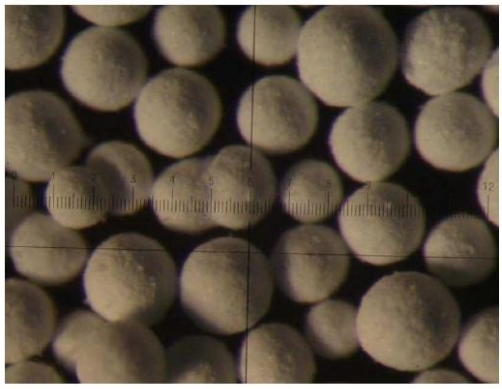
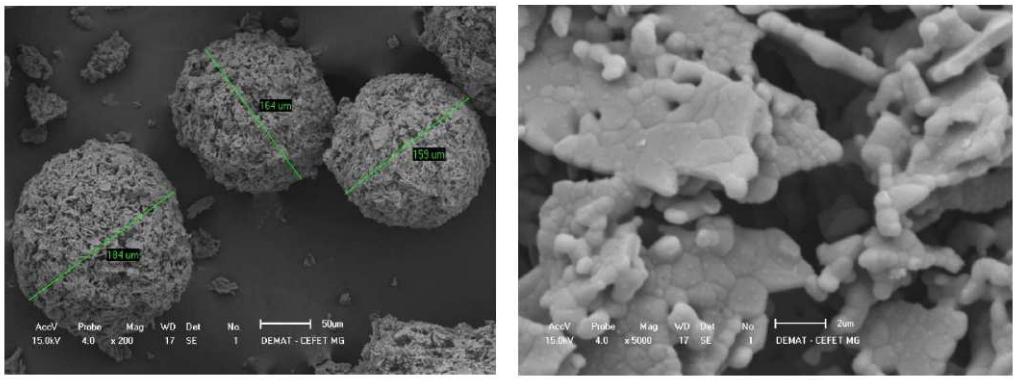


Figure 3 – Stereomicrograph of microspheres (150-425μm)

SEM. The surface morphology of BCP microspheres after sintering is shown in Fig. 4. The surface roughness of the spheres and the interconnected pores of the sintered particles can be clearly seen.



(a) 200x (b) 5000x

Figura 4 - SEM micrographs of BCP microspheres.

Cytotoxicity. To the cell line NCTC Clone 929 (ATCC CCL-1) utilized, the samples do not present toxic effects.

***In Vitro* Release Study.** The percentage of drug loading of gentamicin found in this study was 41.23±1.98 and 45.05±1.49 for the samples dried at room temperature and dry oven, respectively. Fig. 5 presents the *in vitro* release of gentamicin from BCP microspheres in phosphate buffer pH 7.4 at 37°C. It shows that in 36 hours almost 40% of the gentamicin loaded is released.

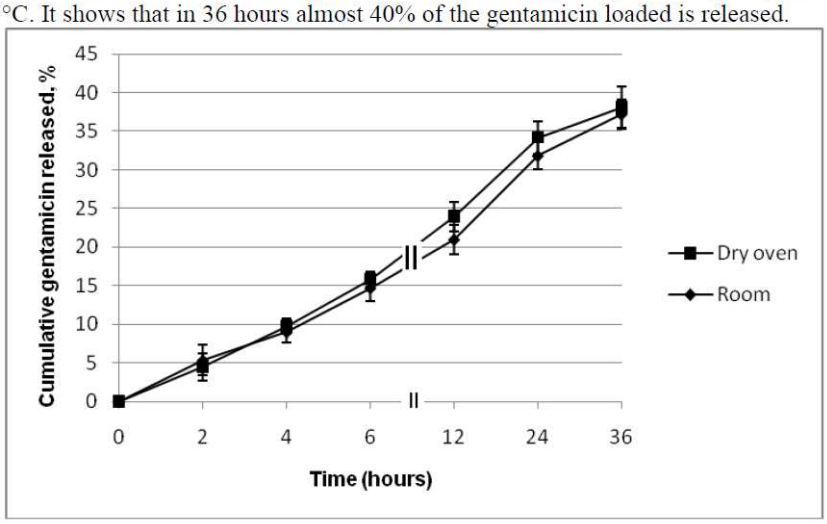


Figure 5 - *In vitro* release of gentamicin from BCP microspheres in phosphate buffer pH 7.4 at 37°C.

Conclusion

The microspheres produced present morphology of interconnected pores, which is favorable to the incorporation of drugs. The size and volume of the pores can be controlled by the set of parameters of production. Gentamicin, an antibacterial agent that is generally used in the treatments of infected bone healing or to prevent infection, was incorporated in the BCP spheres, and the *in vitro* release study shows the potential of the loaded spheres for applications in bone repair and regeneration.

Acknowledgments
We are grateful to Inside Materiais Avançados Ltda for the donation of the ceramic material, some reagents, for the use of its installations, and for the realization of the cytotoxicity assays. We are thankful to Cláudia Lima Caldeira for the BET analysis, to Prof. Dr. Vander Vasconcelos for the FTIR spectroscopic studies. We are thankful to the Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN for the sterilization of the microspheres. Rachel M. Osthues is grateful to CEFET/Capes/Setec for the PIQDTec scholarship.

References

[1] A. C. Guastaldi, A. H. Aparecida, Fosfato de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. Química Nova. 33, 6 (2010) 1352-1358.

[2] A. L. Andrade, R. Z. Domingues, Cerâmicas bioativas: estado da arte. Química Nova. 29, 1 (2006) 100-104.

[3] G Grimandi, P. Weiss, F. Millot, G.Dalcusi, *In vitro* evaluation of a new injectable calcium phosphate material. J. Biomed. Mater. Res. 39 (1998) 660 – 666.

[4] G. A. Silva, P. Ducheyne, R. L. Reis, Materials in particulate form for tissue engineering. 1 Basic concepts, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.1 (2007) 4-24.

[5] V. S. Komlev, S. M. Barinov, E. V. Koplik, A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release. Biomaterials. 23 (2002) 3449 – 3454.

[6] C. C. Ribeiro, C. C. Barrias, M. A. Barbosa. Preparation and characterization of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications, J. Mater Sci: Mater. Med. 17 (2006) 455–463.

[7] M. Sivakumar, K. Panduranga Rao, Preparation, characterization and *in vitro* release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-alginate composite microspheres, J. Biomed. Mater. Res. 65A (2003) 222-228.

[8] F. Laurent, A. Bignon, J. Goldnadel, J. Chevalier, G. Fantozzi, E. Viguier, T. Roger, G. Boivin, D. Hartmann, A new concept of gentamicin loaded HAP/TCP bone substitute for prophylactic action: *in vitro* release validation, J. Mater. Sci Med. 19 (2008) 947-951.

[9] W. Paul, C. P. Sharma, Development of porous spherical hydroxyapatite granules: application towards protein delivery, Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 10 (1999) 383-388.

Bioceramics 23
10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494

Study of the Release Potential of the Antibiotic Gentamicin from Microspheres of BCP
10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494.269

Key Engineering Materials Vols. 493-494 (2012) pp 703-708
Online available since 2011/Oct/27 at www.scientific.net
© (2012) Trans Tech Publications, Switzerland
doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494.703

Study of the Cytotoxicity of a Composite of Carboxymethylcellulose (CMC) and a BioCeramic (biphasic calcium phosphate-BCP) Injection for Use in Articular Cartilage Repair

Deny Gomes de Freitas[1, a], Rachel Mary.Osthues[2, b],
Sidney Nicodemos da Silva[3, c]

[1]MD. student, Department of Materials Engineering, Federal Center for Technological Education, CEFET- MG, Belo Horizonte, MG, Brazil
[2]Ph.D student, Department of Materials, Mechanical Engineering Faculty, UNICAMP, Campinas, SP/ Federal Center for Technological Education - CEFET- MG, Belo Horizonte, MG, Brazil.
[3]Department of Materials Engineering, Federal Center for Technological Education - CEFET – MG, Belo Horizonte, MG, Brazil.
[a]denyfreitas2@hotmail.com, [b]osthues@fem.unicamp.br, [c]sidneynicodemos@yahoo.com.br,

Keywords: Cytotoxicity, composite, carboxymethylcellulose (CMC). Biphasic calcium phosphate (BCP), articular cartilage.

Abstract. The failure of organs and tissues caused by trauma and other injuries is one of the most costly of human health problems. It is estimated that 1.6 million people experience work limitations caused by osteoarthritis and related disorders, representing 8.3% of all main conditions. Joint injuries frequently lead to progressive joint degeneration and post-traumatic osteoarthritis. Articular cartilage has only a limited capacity for self-healing, mainly due to the fact that it is avascular; and once seriously damaged, articular cartilage lesions will not regenerate. There is strong evidence that cartilage lesions may lead to osteoarthritis when left untreated. Numerous animal experiments and clinical studies have shown that early biological reconstruction of circumscribed cartilage defects in the knee is superior to conservative or delayed surgical treatment. Tissue engineering has shown promising therapeutic strategies for repair or regeneration of damaged tissues. Currently, ceramic based and polymeric scaffolds have been developed to bring about the restoration of tissue functions. The bioceramics associated with water-soluble polymers have been developed as substitutes for various orthopedic applications. The objectives of this work are the processing and characterization of a composite of carboxymethylcellulose (CMC) and biphasic calcium phosphate (Biphasic Calcium Phosphate - BCP) in the form of a hydrogel, and a study of its cytotoxicity (*in vitro*), aimed at its application as an injectable biomaterial in order to repair the extracellular matrix of articular cartilage. The CMC and BCP were characterized by Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR) and X-Ray Diffraction (XRD), X-ray fluorescence (XRF), respectively, and scanning electron microscopy (SEM) of powders and the composite. To evaluate the biological effect of the composite hydrogel, tests of cytotoxicity (MTT) and rheological tests under real conditions of use were performed. The composite of carboxymethylcellulose (CMC) and bioceramics (biphasic calcium phosphate-BCP) in the form of hydrogel showed an adequate injectability in the conditions studied, and a non-toxic response, presenting potential for use as fillers or to stimulate the healing of cartilage defects in the extracellular matrix of articular cartilage.

Introduction

The failure of organs and tissues caused by trauma and other injuries is one of the most costly human health problems [1]. Articular cartilage defects have been recognized as a cause of significant morbidity for more than 200 years [2]. Musculoskeletal conditions, like osteoarthritis, represent a major economic burden on individuals, health systems and social care systems, with indirect costs being predominant. It is estimated that 1.6 million people experience work limitations caused by osteoarthritis and related disorders, representing 8.3% of all main conditions [3].

All rights reserved. No part of contents of this paper may be reproduced or transmitted in any form or by any means without the written permission of TTP, www.ttp.net. (ID: 177.19.9.147-30/11/11,11:08:09)

Cartilage lesions frequently result in pain, swelling, and mechanical symptoms such as locking and catching that substantially reduce the patient's quality of life [4]. Documented cartilage lesions were classified as localized focal osteochondral or chondral lesion in 67%, osteoarthritis in 29%, osteochondritis dissecans in 2% and other types in 1% of the cases. Non-isolated cartilage lesions accounted for 70% and isolated lesions accounted for 30%. The patellar articular surface and the medial femoral condyle were the most frequent localization of the cartilage lesions [5].

The knee joint is one of the most common body area injured during sports and recreational activities [6]. Joint injuries frequently lead to progressive joint degeneration and post-traumatic osteoarthritis [7]. Global adolescent knee injury prevalence ranges between 10-25%. Trauma, particularly in men, is associated with progression towards osteoarthritis [3, 6].

Articular cartilage is a highly organized tissue responsible for the optimal functioning of the joint through its specific load bearing capacities and by providing a smooth interface for the moving joint. Articular cartilage has only a limited capacity for self-healing, this mainly due to the fact that it is avascular; and once seriously damaged, articular cartilage lesions will not regenerate [8]. There is strong evidence that cartilage lesions predispose to osteoarthritis when left untreated [9]. Osteoarthritis (OA), the syndrome of joint pain and dysfunction caused by joint degeneration, affects more people than any other joint disease. In most instances joint degeneration develops in the absence of an identifiable cause, but increasing age, excessive joint loading, and joint abnormalities and trauma increase the risk of OA. Articular surface contact stress that causes tissue damage and compromises that ability of chondrocytes to maintain and restore the tissue has an important role in the development of joint degeneration [7].

Numerous animal experiments and clinical studies have shown that early biological reconstruction of circumscribed cartilage defects in the knee is superior to conservative or delayed surgical treatment. This superiority refers not only to defect healing but also to the elimination of changes following secondary osteoarthritis [10].

Tissue engineering has provided promising therapeutic strategies for repair or regeneration of damaged tissues. In recent decades numerous studies related to tissue engineering have shown that the combination of cells, bioactive molecules (growth factors, cytokines, and fragments of polymers) and scaffolds (biomaterials) function as an outline for the newly-formed tissue, facilitating interaction, proliferation and tissue differentiation [11].

Currently, ceramic based and polymeric scaffolds have been developed seeking the restoration of tissue functions [12]. The bioceramics associated with water-soluble polymers have been developed as substitutes for various orthopedic and maxillofacial applications. These substitute injections are intended to stimulate tissue regeneration and are reabsorbed after long deployment. The efficiency of these multiphase materials is due to the mechanical properties of bioceramics (compressive strength) associated with water-soluble polymers considered good ionic carriers that help in the formation of a new extracellular matrix support[13].

The objectives of this work are the processing and characterization of a composite of carboxymethylcellulose (CMC) and biphasic calcium phosphate (Biphasic Calcium Phosphate - BCP) in the form of a hydrogel, and a study of its cytotoxicity (*in vitro*) aimed at its application as an injectable biomaterial in order to repair the extracellular matrix of articular cartilage.

Material and Methods

Materials. The CMC with a purity of 99.84% and degree of substitution between 0.7 and 0.9 was purchased from Denver Cotia Ind. e Com. The BCP used in the production of the microspheres, composed of 90/10 HA/β-TCP weight ratio, was donated by Inside Materiais Avançados Ltda. The microspheres in the diameter range of 53-150μm were yielded by one of the authors of this work and are resultant of another study. Other reactants were of analytical grade.

Methods

Preparation of the Composite. The CMC and BCP powder were weighed on an electronic scale (Shimadzu model BL32004) and gently added to 75mL of deionized water at a ratio of 0.9g of CMC, 0.3g of BCP. The mixture was stored in a 100mL beaker and mixed to homogenize.

Characterization of Composite Components. The characterization of CMC and BCP used in the composite was carried out using X-ray diffraction (XRD) in a diffractometer model XRD 7000 with a copper target, and a scan rate of 1° per minute, between a 2 theta angle of 20 to 50 degrees. X-ray fluorescence (XRF) was performed in a model EDX-720 X-ray spectrometer. Scanning Electron Microscopy (SEM) was carried out using a Superscan model SSX 550, with limited lateral resolution of 5nm. All equipment was from Shimadzu. The Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra and the ATR (attenuated total reflection) were obtained in the wavenumber range 4000-500 cm^{-1} using the ThermoScientific Nicolet 380 with a zinc selenide (ZnSe) crystal

Cytotoxicicity assay. In the evaluation of the cytotoxic effect a lamellar flow chapel was used for the plating of 1 x 10^5 cells of strain WI 26 (human lung fibroblasts) provided by the American Type Culture Collection in 96-well plates in a volume of 100 mL of medium 10% fetal bovine (FBS) and incubated for 24 hours at 37°C in 5% CO2. After 24 hours of elapsed incubation the supernatant from each well was discarded and washed with 100 ml of PBS per well. Then the compound, diluted in medium 1% FBS (100mL/well) was added to 96-well plates and incubated for 24 hours. After this time the medium was removed and washed with 1X PBS (100 ml / well) and added to the cell culture using the MTT diluted in 1% FBS in an environment with reduced luminosity. After incubation of 3 hours the contents of the plates was centrifuged (100rpm for 10 min.) precipitating the formazan. The supernatant was removed (using more waste MTT) and discarded. The solubilized formazan salt in the mitochondria was re-suspended in 50mL of dimethyl sulfoxide (DMSO). Then each well was read with the spectrophotometer (ELISA) brand Spectramax ESPBC02C using a wavelength of 570nm. Positive and negative controls on the same plate sample were analyzed

Rheological Test. Rheological tests were carried out under real conditions of use of the composite polymer with a 25mL syringe and needles G-27 and G-25, without lubricant.

Results and Discussion

X-ray Fluorescence. The result showed that the microspheres de BCP do not contain contaminants.

XRD. X-ray diffraction analysis indicated that the particles did not contain any distinguishable crystalline impurity, and show a characteristic peak of β-TCP as showed in Fig. 1.

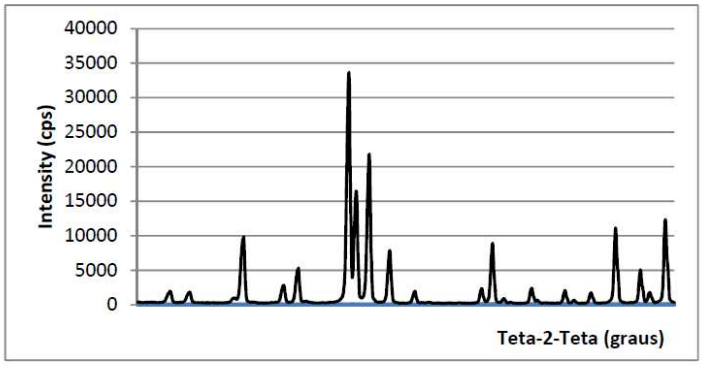


Figure 1. X-ray diffraction pattern of microspheres of BCP.

FTIR. The FTIR spectrum of the samples, in Fig. 2 shows that the carboxyl methyl and hydroxyl functional groups are found at wavelength of 1618, 1426 and 1300cm-^{1}, respectively. According to reported data, the peaks at wavelength of 1620 and 1423 cm^{-1} represented two different functional groups in CMC. The additional peaks at wavelength of 2152 and 2376cm-^{1} might be peaks at wavelength of 2152 and 2376cm-^{1} might be due to impurities or combination band with water [11].

Fig. 3. The PO4 bands were at 570, 603, 961, 1049 and 1090 cm^{-1}. The sharp bands at 3579 and 633cm^{-1} were the vibrations from OH. There was a sharp peak at 1648 and a broad band near 3400cm^{-1} which are indications of adsorbed water.

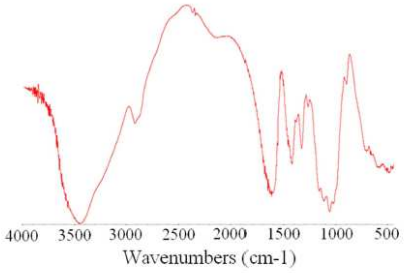


Figure 2. FTIR spectra of CMC powder

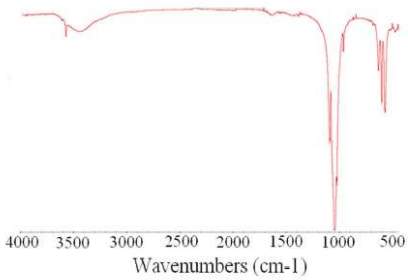
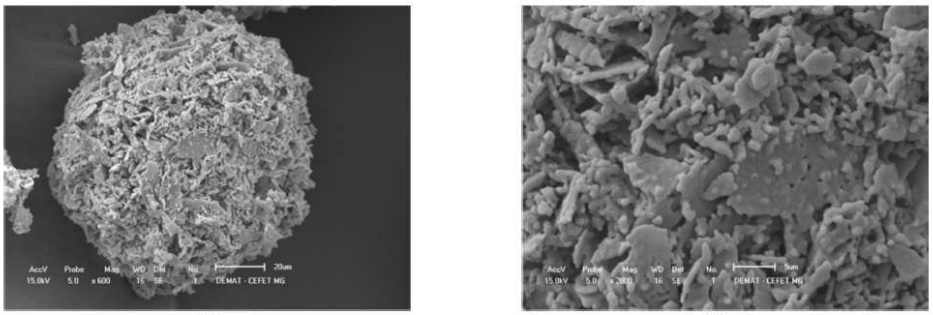


Figure 3 .FTIR spectra of BCP microspheres

SEM. The Fig. 4 (a) and (b) show the micrographs of scanning electron microscopy images of the BCP microsphere surface and the particles with diameter between 53μm to 150μm.



(a) (b)

Figure 4. Scanning electron microscopy image showing the BCP microsphere: (a) microsphere with diameter between 53-150 μm; (b) microsphere surface

Cytotoxicity. For the cell line WI 26 utilized, the samples do not present toxic effects.

Rheological Test. The composite hydrogel formulated, under the conditions studied, using 25mL syringe with G25 and G27 needles, exhibited adequate injectability. The test is shown in Fig. 5.

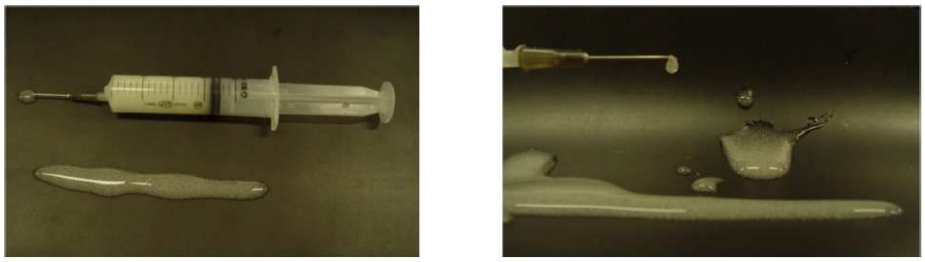


Figure 5. Rheological test in real conditions of use.

Conclusion

The composite of carboxymethylcellulose (CMC) and a bioceramic (biphasic calcium phosphate-BCP) in the form of a hydrogel, under the conditions studied, provided adequate injectable properties and non-toxic response, which demonstrate the potential of the material to be used for repair of articular cartilage. Future rheological studies of various compositions of the composite, and *in vivo* tests, should be carried out to determine with accuracy, the potential use of this biomaterial as a filler or to stimulate the healing of cartilage defects in the extracellular matrix of articular cartilage.

Acknowledgments

The authors sincerely thanks to Inside Materiais Avançados Ltda. for providing inputs and given the facilities to carry out the work, to Federal Center of Technological Education of Minas Gerais (Cefet-MG) and to Dr Luciana Maria from Fundação Ezequiel Dias (Funed / BH) (Funed) for supporting the biological activities of this research.

References

[1] D. Puppi, F Chiellini, A.M. Piras; E Chiellini. Polymeric materials for bone and cartilage repair. Progress in Polymer Science, 35 (2010) 403–440.

[2] P. B. Lewis, L. P. McCarty, R. W. Kang, B. J. Cole, Basic science and treatment options for articular cartilage injuries, Journal of Orthopedic & Sports Physical Therapy, 36, (2006) 717-727.

[3] A. D. Woolf, B. Pfleger, Burden of major musculoskeletal conditions. Bull World Health Organ, 81(2003) 646-56.

[4] L. Bartha, A. Vajda, Z.F. Duska, H. Rahmeh, L. Hangody, Autologous osteochondral mosaicplasty grafting, J Orthop. Sports Phys Ther., 36 (2006) 739-750.

[5] W. Widuchowsk, J. Widuchowski, T. Trzaska, Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. Knee, 14(2007) 177-82.

[6] Q.A. Louw, J. Manilall, K.A. Grimmer. Epidemiology of knee injuries among adolescents: a systematic review. Br J Sports Med 42 (2008) 2-10.

[7] K. Muldrew, Osteoarthritis as an inevitable consequence of the structure of articular cartilage Medical Hypotheses 59 (2002) 389–397.

[8] J. M. McPherson, R. Tubo, Articular cartilage injury, second edition, Academic Press, New York, 2000.

[9] A.C. Gelber, M.C Hochberg, L.A Mead, N.Y Wang, F.M. Wigley, M. J. Klag, Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis, Ann Intern Med, 5 (2000) 321-8.

[10] J. Fritz, P. Janssen, C. Gaissmaier, B. Schewe, K. Weise, Articular cartilage defects in the knee-basics, therapies and results, Injury 39 (2008) S50-S57.

[11] F.T Moutos, F. Guilak, Composite scaffolds for cartilage tissue engineering, Biorheology. 45 (2008) 501-512.

[12] A.F. Aly, A. Agameia, A. S.Eldesouky, M. A. Sharaf, Bioceramic bone scaffolds for tissue engineering, Journal of Applied Sciences Research, 6 (2010) 1712-1721.

[13] G Daculsi, A. P. Uzel, P. Weiss, E. Goyenvalle, E. Aguado, Developments in injectable multiphasic biomaterials. The performance of microporous biphasic calcium phosphate granules and hydrogels. J. Mater. Sci.: Mater. Med., 21(2010) 855–86.

[14] A. P. Kumar, K. K. Menhaden, S. A. S. Alariqi, R. P. Singh Preparation and characterization of bioceramic nanocomposites based on hydroxyapatite (HA) and carboxymethyl cellulose (CMC), Macromolecular Research, 18 (2010) 1160-1167

Bioceramics 23
10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494

Study of the Cytotoxicity of a Composite of Carboxymethylcellulose (CMC) and a BioCeramic (Biphasic Calcium Phosphate-BCP) Injection for Use in Articular Cartilage Repair
10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494.703

Evaluation of antibiotic release from microspheres BCP

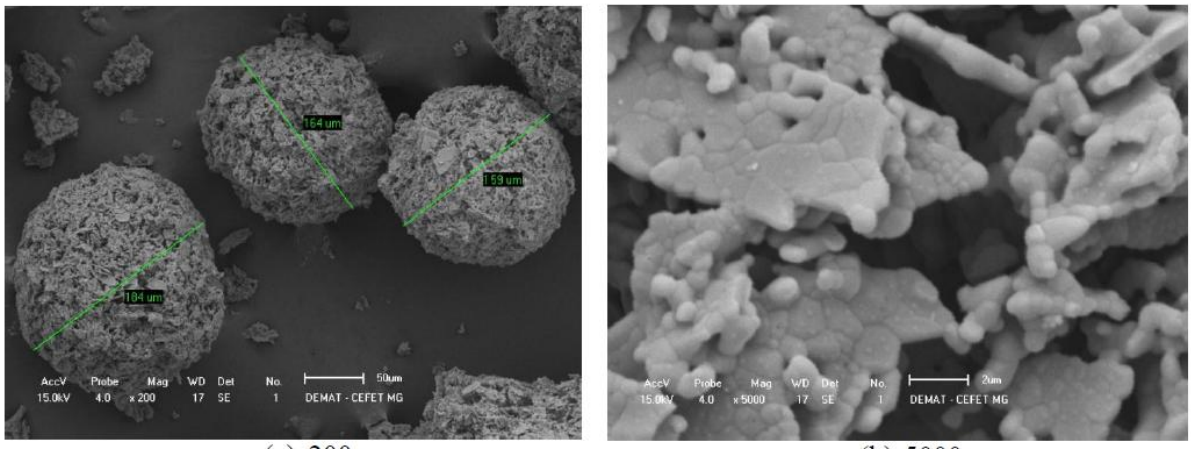
R.M. Osthues[1], C.A.C. Zavaglia[2], S.L. Fialho[3] and S.N. Silva[4*]

[1] Federal Center for Technological Education – DEMAT/CEFET- MG, Belo Horizonte, MG, Brazil.
[2] Department of Materials, Mechanical Engineering Faculty, UNICAMP, Campinas, SP. Brazil.
[3] Pharmaceutical and Biotechnological Development – FUNED, Belo Horizonte, Brazil.
[4] Department of Materials Engineering, Federal Center for Technological Education – DEMAT/CEFET- MG, Belo Horizonte, MG, Brazil, sidneynicodemos@yahoo.com.br.

The increase of the life expectancy of the world population became the diseases related to the bone structure a public health problem, leading the United Nations to declare, the decade of 2000 to 2010 as the "decade of the bone and joints" [1]. Orthopedics surgeries frequently are open surgeries, but the improvement of the specific instrumentation and the use of bioresorbable polymerics implants for regeneration of bone fractures are contributing to the development of noninvasive techniques such as an injectable bone substitute. These injectable materials are composites, formed by a particulate ceramic phase and a polymeric phase, and have the advantages of combining bioactivity and the ability to control degradation and some mechanical properties. In addition, microparticles present flexibility to fill several types of defects with closer packing and allow new bone growth and vascularization through the interconnected pores formed by the spaces between them. Uniform particles also present more predictable flowing properties during injection [2]. Another advantage of the particulate materials is that they have the potential to incorporate drugs such as antibiotics that can be applied in situ for treatment or prevention of bone infection, which is important because the poor circulation of blood in the osseous tissues makes necessary large amounts of these drugs to guarantee that an adequate dose reaches the affected site. This work evaluates the release potential of gentamicin from BCP spherical microparticles to be used in osseous injectable implants [3, 4]. The particles present a smooth geometry to prevent inflammatory reactions frequently caused by an irregular morphology, and their compositions offer a combination of biodegradability and stability. Microparticles with diameters between 150-425μm, were obtained by a method based on the immiscibility of liquids. The surface morphology of BCP microspheres after sintering is shown in Fig.1. The surface roughness of the spheres and the interconnected pores (SEM) of the sintered particles can be clearly seen. To encapsulate the antibiotic, the spheres were immersed in a gentamicin solution, and after 24h they were separated and dried. The evaluation of the gentamicin release from the microspheres was carried out at 37°C in PBS, and the release medium was collected at predetermined time intervals for measurement of the amount released (Fig.2). This work evaluates the release potential of gentamicin from biphasic calcium phosphate (BCP) spherical microparticles with diameter between 150-425μm, obtained by a method based on the immiscibility of liquids, which can find applicability in bone regeneration, when used as injectable bone substitutes.

References

[1] A. C. Guastaldi, A. H. Aparecida. Química Nova. 33, 6 (2010) 1352-1358.
[2] C. C. Ribeiro et al., J. Mater Sci: Mater. Med. 17 (2006) 455–463.
[3] M. Sivakumar, K. Panduranga Rao, J. Biomed. Mater. Res. 65A (2003) 222-228.
[4] F. Laurent et al., J. Mater. Sci Med. 19 (2008) 947-951.
[5] This research was supported by CAPES and FAPEMIG (Brazil). We are grateful to Inside Materiais Avançados Ltda for the donation of the ceramic material.



(a) 200x (b) 5000x

Figura 1 - SEM micrographs of BCP microspheres (150-425µm).

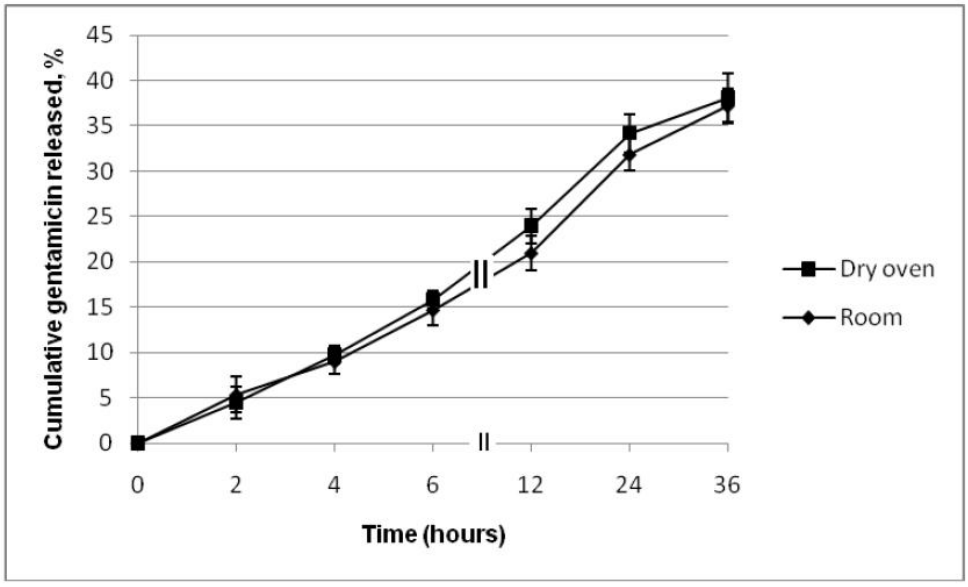


Figure 2 - In vitro release of gentamicin from BCP microspheres in phosphate buffer pH 7.4 at 37°C.

ANEXO A – Relatório de ensaio de avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro*

medlab
Laboratório de Análises Científicas
Uma empresa da Medlab Group

Empresa: **INSIDE MATERIAIS AVANÇADOS LTDA - 03991**
Av. José Cândido da Silveira,2100 - Sl. 20 - Horto
Belo Horizonte - MG - CEP: 31170-000 - FAX: (31)3466-3300 - A/c Dra. Lidia Campos de Oliveira

Ensaio: **294457/001/001** Lote: **PILOTO 1**
Produto: **ESFERAS DE HIDROXIAPATITA**

Fabricação : 03/2010 Validade : 03/2012 Código: **PILOTO1**
Data de Entrada: **29/03/11** Hora: **13:20 h** Data de Início do Ensaio: **04/04/11** Data do Fim do Ensaio: **05/04/11** Analista: ****Lab. Apoio**
Método: **Difusão em Agar**

RELATÓRIO DE ENSAIO AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CITOTOXICIDADE ``IN VITRO´´ - Nº 294457/001/001

LINHAGENS CELULARES: NCTC Clone 929, células de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL1), são semeadas em placas de Petri e incubadas por 48 horas para formação da monocamada celular. O meio de cultura líquido é substituído pelo meio de cobertura sólido, que é composto de partes iguais de meio 2x concentrado e ágar com vermelho neutro. As amostras são colocadas sobre esse meio de cobertura e as placas novamente incubadas por 24h Observa-se macro e microscopícamente o índice de Zona (IZ) que é a área não corada pelo corante vital. As amostras são testadas em quadruplicatas em placas separadas.

IZ	DESCRIÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
0	Nenhuma Zona sob e ao redor da amostra	Nenhuma
1	Alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra	Fraca
2	Zona limitada sob a amostra	Leve
3	Zona entre 0,5 - 1,0 cm ao redor da amostra	Moderada
4	Zona maior que 1,0 cm ao redor da amostra	Severa

Amostras sólidas: São colocadas diretamente sobre o meio de cobertura.
Amostras em pó: São colocadas dentro de 1 cilindro fixado sobre o meio de cobertura.
Amostras líquidas: Disco de papel de filtro atóxico são embebidos com a amostra e colocados sobre o meio de cobertura.
Amostras submetidas à extração: A relação da área de superfície do material e o volume do veículo de extração não deve ser maior que 6cm²/ mL e o menor do que 0,5cm²/mL. Quando a superfície da amostra for indeterminada pesar de 0,1 - 0,2g/mL. Os veículos de extração utilizados são: solução salina ou óleo de semente de algodão. As condições de extração recomendadas são 37ºC-24h, 50ºC-72h ou 70ºC-24h. Embeber o extrato em discos de papel de filtro e colocar sobre o meio de cobertura.
Controle positivo: fragmento de 0,5 cm x 0,5 cm de látex tóxico.
Controle Negativo: discos de papel de filtro atóxico com 0,5 cm de diâmetro:

Os resultados se encontram sumarizados abaixo:

AMOSTRA	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4
	IZ	IZ	IZ	IZ
ESFERAS DE HIDROXIAPATITA	0	0	0	0
Controle Negativo	0	0	0	0
Controle Positivo	4	4	4	4

Conclusão: A amostra não apresentou efeito tóxico para a linhagem celular NCTC Clone 929 (ATCC CCL-1).

Referências bibliográficas:
1. ASTM F895-84: 1984-Standard test method for Agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity ISO 10993.5:2009-Biological evaluation for medical devices test for Cytotoxicity, in vitro methods. 2. US Pharmacopéia 32, 2009, -Biological reactivity tests in vitro.

Comentário : Ensaio realizado em laboratório de apoio.

O resultado desta análise tem significação restrita e se aplica apenas a amostra analisada.

São Paulo , 11/04/11

O Relatório de Ensaio original seguirá posteriormente. Este comunicado tem caráter informativo.

Relatório Informativo