



USO DE MICROSISTEMAS NA PRECIPITAÇÃO EM CONTÍNUO DE HIDROXIAPATITE

F. CASTRO¹, S. KUHN², K. JENSEN², A. FERREIRA¹, F. ROCHA³, A. VICENTE¹ e J.A. TEIXEIRA¹

¹ Departamento de Engenharia Biológica – Universidade do Minho, Braga, Portugal

² Departamento de Engenharia Química, Instituto de Tecnologia de Massachusetts, Cambridge, MA, Estados- Unidos

³ Departamento de Engenharia Química – Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal

E-mail para contato: fcastro@deb.uminho.pt

RESUMO – Neste trabalho é apresentado o estudo de dois microreatores ultrasónicos para a precipitação em contínuo de hidroxiapatite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (HAp) a 37 ° C. O primeiro reator consiste num microreator tubular imerso num banho ultrasónico, onde os fluxos laminar e segmentado (gás-líquido) foram ambos avaliados. De seguida, o estudo em regime laminar foi conduzido num novo dispositivo microfluídico desenvolvido no MIT. Este é constituído por uma pilha de placas de Teflon com um elemento piezoelétrico integrado, permitindo assim a transmissão direta de ultrassons para o reator. Para todos os microsistemas estudados foram obtidas nanopartículas de HAp, em condições próximas das condições fisiológicas de pH e temperatura. Além disso, as partículas produzidas apresentam-se sob a forma de bastonetes de aproximadamente 100 nm de comprimento e 20 a 50 nm de largura. Os microreatores utilizados produziram partículas de HAp num tempo muito curto e com maior cristalinidade, comparado com as partículas produzidas num reator batch. Também foi possível reduzir significativamente a agregação das partículas nos microsistemas, ao contrário do sistema batch, onde não foi possível evitar a formação de agregados.

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas têm um enorme potencial em aplicações biomédicas, uma vez que as suas dimensões são próximas das dimensões das células, tecidos e moléculas biológicas. As suas propriedades físicas, químicas e biológicas estão diretamente relacionadas com o seu tamanho e a sua morfologia, assim um controlo estreito das condições de síntese é necessário para a obtenção de partículas com as características desejadas (Bose *et al.*, 2003). Geralmente, as nanopartículas são produzidas por síntese química em tanque agitado, no entanto, devido à baixa eficiência de mistura e larga distribuição de tempos de residência, a obtenção de partículas com propriedades controladas torna-se difícil (Wang *et al.*, 2009; Jeevarathinam *et al.*, 2011). No sentido de ultrapassar as limitações associadas a este tipo de reator, tem-se estudado a utilização de dispositivos microfluídicos. Para além de um consumo reduzido de reagentes e uma maior segurança de operação, estes apresentam elevadas taxas de



transferência de calor e massa, e uma mistura rápida e eficiente, favorecendo a formação de nanopartículas com estreita distribuição de tamanhos (Marre e Jensen, 2010; Zhao *et al.*, 2011). Os microreatores também têm a capacidade de operar em contínuo, o que para além de ser mais produtivo e capaz de promover condições de reação mais homogêneas, ainda permite a variação contínua da composição química do meio reacional (Zhao *et al.*, 2011). Contudo, existem dificuldades no manuseamento de sólidos em microcanais. De facto, os sistemas miniaturizados são geralmente caracterizados por um número de Reynolds baixo. Em tais sistemas, o fluxo laminar é dominante e é caracterizado por um perfil de velocidade parabólico, levando a uma larga distribuição de tempos de residência. Neste contexto, os microreatores de fluxo segmentado têm vindo a ser usados de forma a reduzir a dispersão ao longo dos canais e promover a mistura, e assim estreitar a distribuição de tempos de residência, sendo os sistemas gás-líquido particularmente atraentes devido ao simples processo de separação entre o gás e o líquido (Zhao *et al.*, 2011). Outro problema relacionado com o uso de sólidos em microreatores é o entupimento dos canais, que se deve essencialmente à agregação das partículas. Esta, por sua vez, pode ser significativamente reduzida através da aplicação de ondas ultrasónicas, pois as ondas de choque criadas por cavitação rompem os agregados e encurtam o tempo de contato entre as partículas, impedindo assim o entupimento dos microcanais (de Castro e Capote, 2007).

Os fosfatos de cálcio, e em particular a hidroxiapatite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (HAp), são amplamente usados como substituto ósseo, devido à sua semelhança com a parte inorgânica do osso (He *et al.*, 2007). É sabido que as características das partículas de HAp, tais como a composição química, o tamanho e a distribuição de tamanhos, estão diretamente relacionadas com as propriedades da HAp, tais como a bioatividade, a biocompatibilidade e a osteocondutividade (Kumta *et al.*, 2005). Desta forma, as partículas de HAp devem ser sintetizadas com uma elevada área superficial, uma estreita distribuição de tamanhos e uma elevada pureza para melhorar o crescimento das células ósseas em torno das mesmas.

Neste trabalho, dois dispositivos microfluídicos ultrasónicos foram utilizados para a síntese de nanopartículas de HAp. Inicialmente, a precipitação em contínuo de HAp foi estudada num microreator tubular imerso num banho ultrasónico. Várias experiências foram realizadas, nomeadamente em fluxo laminar e em fluxo segmentado (sistema gás-líquido). O estudo em regime laminar também foi efetuado num novo dispositivo microfluídico, construído a partir de placas de Teflon, com a transmissão direta de ultrasons para o reator através da integração de um atuador piezoelétrico. Finalmente, as condições experimentais, nomeadamente a temperatura, a concentração dos reagentes, assim como a razão molar inicial Ca/P, foram definidas de modo a promover a formação espontânea de HAp em condições próximas das condições fisiológicas de temperatura e pH.

2. Materiais e Métodos

2.1. Instalação experimental

A precipitação em contínuo de HAp foi realizada num microreator tubular imerso num banho ultrasónico (Figura 1a), onde os estudos em fluxos laminar e gás-líquido foram ambos efetuados. Como está ilustrado na Figura 1, o reator é constituído por duas partes: uma câmara de mistura (Upchurch Scientific) e o reator tubular (Teflon PFA, Upchurch

Scientific), com um volume de 600 μL , 1,02 mm de diâmetro interno e 1,59 mm de diâmetro externo (Figura 1a). A função da primeira parte do reator é de misturar de forma eficiente os reagentes e no caso do fluxo gás-líquido a sua função também consiste na segmentação da mistura líquida. O gás segmentado é usado para separar a mistura líquida em pequenas entidades individuais (Figura 1b). Desta forma, a fase gasosa induz recirculação e aumenta a mistura dentro das entidades líquidas. O resultado é uma estreita distribuição de tempos de residências e uma redução da polidispersão das partículas. A reação progride na segunda parte do reator.



Figura 1 – a) Imagem do microreator tubular imerso num banho ultrasónico, e b) imagem do microreator tubular em fluxo gás-líquido.

Os reagentes foram injetados no dispositivo microfluídico por meio de uma bomba de infusão (Harvard PHD 2000), onde as seringas foram mantidas a 37 ° C através do uso de camisas térmicas (McMaster-Carr). No que se refere à fase gasosa, o caudal de azoto foi ajustado por um controlador de fluxo (Sierra FlowBox). As ligações microfluídicas foram asseguradas por tubos de Teflon (Upchurch Scientific) com 1,02 mm de diâmetro interno. O reator foi imerso num banho ultrasónico (VWR modelo 50HT) para minimizar o potencial de entupimento do reator e as experiências foram iniciadas com uma temperatura de 37 ° C no banho ultrasónico.

A precipitação em contínuo de HAp também foi realizada num microreator de Teflon com um atuador piezoelétrico integrado (Figura 2) (Kuhn *et al.*, 2011). O microreator foi desenvolvido no MIT (Instituto de Tecnologia de Massachusetts), sendo constituído por placas de Teflon (PTFE) e por um elemento piezoelétrico de 1 mm de espessura. O reator é constituído por um canal de 600 μm de largura e tem um volume total de 1000 μL . O sistema tem ainda duas entradas e uma saída.

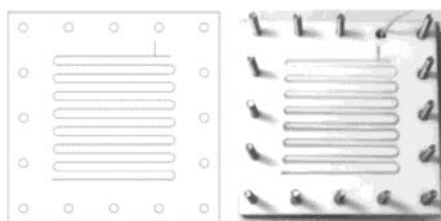


Figura 2 – Imagem (direita) e esquema (esquerda) do microreator de Teflon (Kuhn *et al.*, 2011).



Os reagentes foram misturados numa câmara de mistura antes de entrar no reator e, portanto, apenas uma entrada foi usada. Como no estudo anterior, os reagentes foram injetados no reator por meio de uma bomba de infusão (Harvard PHD 2000), onde as seringas foram mantidas a 37 ° C através do uso de camisas térmicas (McMaster-Carr). As ligações microfluídicas foram asseguradas por tubos de Teflon (Upchurch Scientific) com 1,02 mm de diâmetro interno.

2.2. Precipitação de HAp

HAp foi sintetizada a partir da mistura de uma solução aquosa saturada de hidróxido de cálcio (19.3 mM) (Sigma-Aldrich, 95%) com uma solução aquosa de ácido ortofosfórico (14.5 mM) (Mallinckrodt, 85%) a 37 ° C, com uma razão molar inicial Ca/P = 1,33. 0,5 L de ambos os reagentes foram preparados com água ultrapura (água Milli Q com uma resistividade de 18,2 MΩ/cm a 25 ° C) e a força iônica foi ajustada pela adição de 6 mL de uma solução de cloreto de potássio 4M (Mallinckrodt, 99,8%). Para facilitar a dissolução do hidróxido de cálcio, a solução foi previamente agitada num frasco fechado durante 24 horas a 500 rpm e a 25 ° C, uma vez que a sua solubilidade diminui com o aumento da temperatura (Johannsen e Rademacher, 1999). De seguida, ambos os reagentes foram aquecidos e mantidos a 37 ° C. As condições de operação são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições experimentais

	Caudal _{líquido} (mL/min)	Caudal _{gás} (standard mL/min)	Tempo de residência τ (min)	Ultrassons: frequência e potência
Microreator tubular	2.0	-	0.30	40 kHz and 4-8 W
	2.0	1.2	0.19	
	2.0	2.0	0.15	
Microreator de Teflon com elemento piezoelétrico integrado	3.3	-	0.30	50 kHz and 30 W

A temperatura (J-KEM Scientific) e o pH (micro elétrodo de pH do tipo agulha, Thermo Fisher Scientific Orion) foram medidos em diferentes intervalos de tempo à saída dos microsistemas. O elétrodo de pH foi calibrado com duas soluções tampão com pH = 7,00 e pH = 10,00 a 25 ° C.

Num trabalho anterior (Castro *et al.*, 2012), a precipitação de HAp foi realizada em batch num tanque agitado de 1L, sob as mesmas condições de concentração de reagentes, de razão molar inicial Ca/P e de temperatura. Nanopartículas de HAp foram sintetizadas, sendo as partículas recolhidas após cerca de 6 horas a um pH final próximo de 7. Os resultados obtidos serão comparados aos resultados apresentados neste trabalho.

2.3. Caracterização de HAp

As amostras foram retiradas à saída dos microreatores, centrifugadas (a 1500 rpm durante 5 min), lavadas duas vezes com água ultrapura e conservadas em etanol (Koptec 200 puro), de forma a parar a reação sólido-líquido (Bernard *et al.*, 2000). Em relação às análises por difração de raios X (XRD) (PANalytical X'Pert PRO MPD) e por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) (FEI Quanta 400FEG ESEM/EDAX Genesis X4M), as suspensões foram secas a $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. No caso da análise granulométrica (Malvern Mastersizer 2000), as suspensões foram recolhidas no final de cada experiência e diretamente analisadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, as experiências foram conduzidas em condições próximas das condições fisiológicas de temperatura e pH (Tabela 2), sendo particularmente importante no caso da síntese de HAp para fins médicos. De facto, é importante seguir critérios específicos, nomeadamente em termos de pH e temperatura, a fim de promover condições para a sobrevivência das células ósseas (Kumta *et al.*, 2005). Além disso, termodinamicamente, estas condições favorecem a precipitação de HAp, uma vez que à temperatura do corpo e para um pH entre 4 e 12, HAp é o fosfato de cálcio mais estável (Elliot, 2004). Mas, de um ponto de vista cinético, isso não implica que a HAp seja a única fase a precipitar (Koutsopoulos, 2002). Por conseguinte, soluções diluídas foram utilizadas de forma a obter sobressaturações baixas e assim promover a formação de uma solução homogênea de iões hidróxido e cálcio e, portanto, um melhor controlo das condições reacionais (Castro *et al.*, 2012).

Tabela 2 – Parâmetros medidos durante a precipitação de HAp

	Tipo de fluxo	Tempo de residência τ (min)	pH	T_{inicial} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{final} ($^{\circ}\text{C}$)
Microreator tubular	Laminar	0.30	7.24		38.0
	Gás-líquido	0.19	7.25	37.0	37.7
	Gás-líquido	0.15	7.04		37.0
Microreator de Teflon com elemento piezoelétrico integrado	Laminar	0.30	7.23	38.3	42.0
Tanque agitado	Batch	330	6.90	36.7	37.9

Segundo a Tabela 2, existe um aumento de temperatura no decorrer da experiência, o que pode ser explicado pelo uso contínuo de ultrassons, bem como pelo facto de a reação em questão ser exotérmica. Isto pode afetar as propriedades do precipitado, tais como a distribuição de tamanhos das partículas, uma vez que a solubilidade da HAp diminui com o aumento da temperatura (van Kemenade e de Bruyn, 1987). O problema é ampliado no microreator de Teflon. De facto, no caso do microreator tubular, as ondas ultrasónicas emitidas precisam primeiro de atravessar o líquido no interior do banho de ultrassons (neste



caso água) antes de atingir o microreator. Portanto, a intensidade dos ultrassons dentro da microreator é menor do que a esperada. No microreator de Teflon, a onda acústica é diretamente transmitida para o reator, permitindo, assim, uma maior intensidade.

A Figura 3 mostra os espectros de XRD dos produtos obtidos nos diferentes sistemas estudados e de uma HAp comercial. Os espectros foram comparados com um espectro de referência (JCPDS 01-076-0694), indicando que o produto formado é HAp. Os espectros das partículas sintetizadas possuem picos largos em comparação com o espectro da HAp comercial, o que pode ser justificado pela baixa cristalinidade do produto formado. A presença de picos a $28\ 2\theta^\circ$ e a $40,5\ 2\theta^\circ$ poderá estar relacionada com a presença de cristais de cloreto de potássio, uma vez que o cloreto de potássio foi utilizado para ajustar a força iônica.

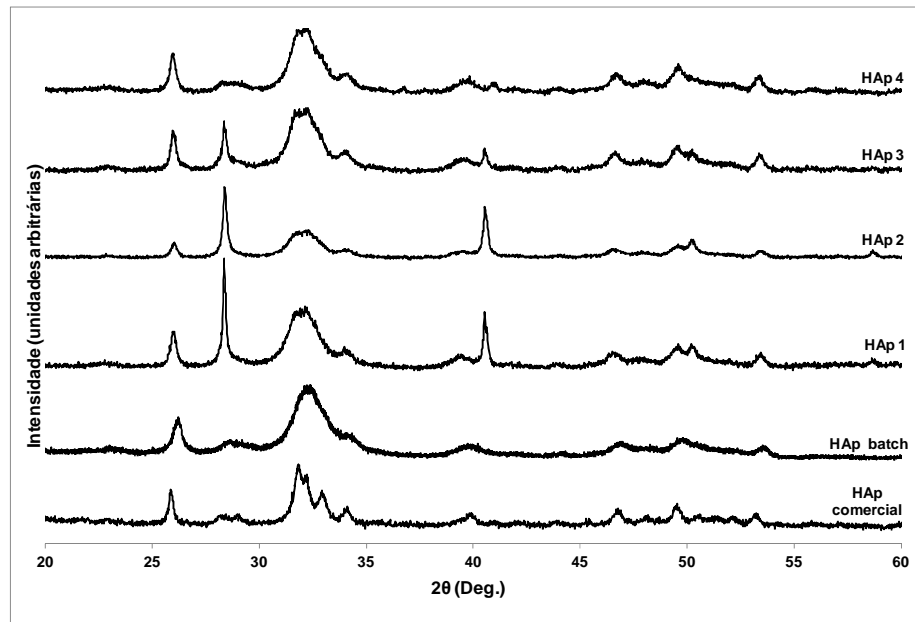


Figura 3 – Espectros XRD das partículas de HAp produzidas em diferentes reatores (HAp 1, HAp 2 e HAp 3 são produtos obtidos no microreator tubular em regime laminar e em fluxo gás-líquido com $\tau = 0,30$ min, $0,19$ e $0,15$, respectivamente; HAp 4 é o produto obtido no microreator de Teflon com o atuador piezoelétrico integrado; HAp batch é o produto obtido em batch num tanque agitado (Castro *et al.*, 2012)) e de uma HAp comercial.

De acordo com a Figura 4, existem diferenças significativas na distribuição de tamanhos das partículas sintetizadas nos diferentes reatores. Os resultados mostram a formação de agregados para todos os casos estudados, o que pode ser justificado pelo tamanho das partículas e pelo seu estado amorfo. De facto, as partículas formadas possuem uma elevada razão área superficial/volume, resultando numa tensão superficial elevada que as partículas tendem a diminuir aderindo uma a outra (de Castro e Capote, 2007). A Figura 4 também evidencia a redução da agregação das partículas nos microreatores, nomeadamente no microreator tubular de fluxo segmentado e no microreator de Teflon. Na verdade, a segmentação do fluxo resulta na formação de pequenas entidades líquidas, separadas umas das outras por bolhas de gás, diminuindo as interações entre as partículas, e, assim, a

formação de agregados (Kuhn *et al.*, 2011). No caso do microreator de Teflon, a redução da agregação pode ser justificada pela maior intensidade dos ultrassons. No que diz respeito à morfologia e ao tamanho das partículas formadas, as partículas apresentam-se sob a forma de bastonetes de cerca de 100 nm de comprimento e de 20 a 50 nm de largura (Figura 5).

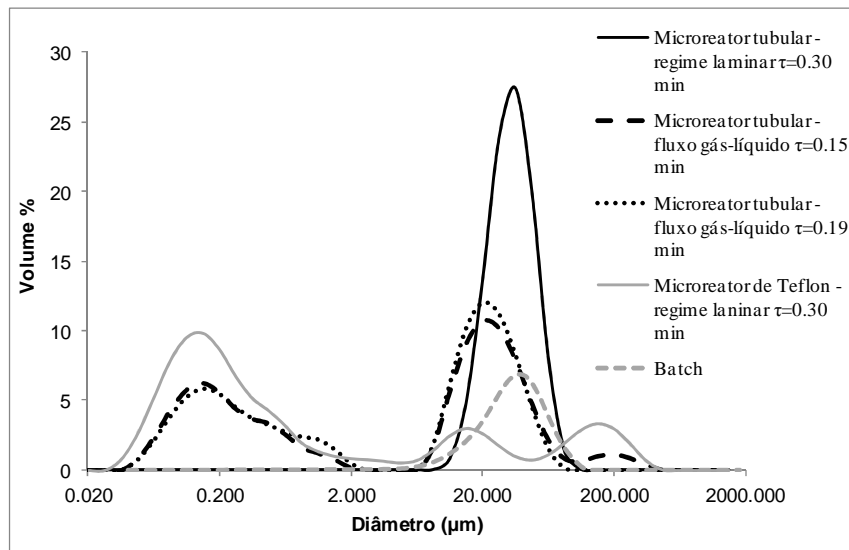


Figura 4 – Distribuição de tamanhos das partículas formadas nos diferentes reatores.

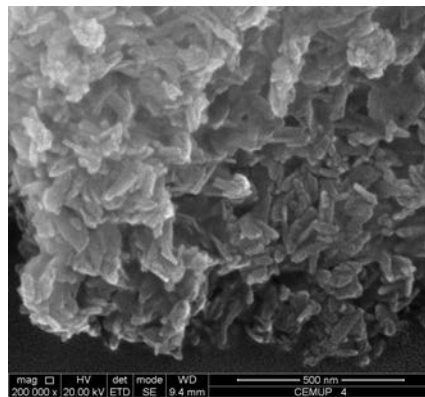


Figura 5 – Imagem SEM das partículas de HAp.

4. CONCLUSÃO

A precipitação em contínuo de HAp foi estudada em dois microreatores ultrasônicos, um microreator tubular imerso num banho ultrasônico e um microreator de Teflon com um atuador piezoelétrico integrado. Todas as amostras preparadas, independentemente do sistema utilizado, são constituídas por nanopartículas de HAp. Além disso, as partículas foram obtidas em condições próximas das condições fisiológicas de pH e temperatura, tornando-as compostos promissores para a aplicação em substituição óssea. Várias configurações foram testadas no microreator tubular (fluxo laminar e fluxo segmentado, mais precisamente fluxo gás-líquido), e a segmentação do fluxo foi bem sucedida na diminuição da agregação das partículas. O controle da agregação foi, porém, melhor sucedido no microreator de Teflon,

devido nomeadamente à maior intensidade dos ultrassons. Os produtos sintetizados também foram comparados ao produto obtido num reator batch. As partículas de HAp formadas nos microreatores foram obtidas num tempo muito curto e demonstraram ser mais cristalinas em relação às partículas produzidas no reator batch. Por fim, foi possível reduzir significativamente a agregação das partículas nos microsistemas, ao contrário do sistema batch, onde não foi possível evitar a formação de agregados.

6. REFERÊNCIAS

- Bernard, L.; Freche, M.; Lacout, J.L.; Biscans, B. Modeling of the dissolution of calcium hydroxyde in the preparation of hydroxyapatite by neutralization. *Chem. Eng. Sci.*, v. 55, p. 5683-5692, 2000.
- Bose, S.; Saha, S.K. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanopowders by Emulsion Technique. *Chem. Mater.*, v. 15, p. 4464-4469, 2003.
- Castro, F.; Ferreira, A.; Rocha, F.; Vicente, A.; Teixeira, J.A. Characterization of intermediate stages in the precipitation of hydroxyapatite at 37,0 °C. *Chem. Eng. Sci.*, 2012.
- de Castro, M.D.L.; Priego-Capote, F. Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization). *Ultrason. Sonochem.*, v. 14, p. 717-724, 2007.
- Elliot, J.C. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. Amsterdam: Elsevier, 1994.
- He, Q.; Huang, Z.; Liu, Y.; Chen, W.; Xu, T. Template-directed one-step synthesis of flowerlike porous carbonated hydroxyapatite spheres. *Mater. Lett.*, v. 61, p. 141-143, 2007.
- Jeevarathinam, D.; Gupta, A.K.; Pitchumani, B.; Mohan, R. Effect of gas and liquid flowrates on the size distribution of barium sulfate nanoparticles precipitated in a two phase flow capillary microreactor. *Chem. Eng. J.*, v. 173, p. 607-611, 2011.
- Johannsen, K.; Rademacher, S. Modelling the kinetics of calcium hydroxide dissolution in water. *Cryt. Res. Technol.*, v. 27, p. 72-78, 1999.
- Koutsopoulos, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 62, p. 600-612, 2002.
- Kuhn, S.; Noel, T.; Gu, L.; Heider, P.L.; Jensen, K.F. A Teflon microreactor with integrated piezoelectric actuator to handle solid forming reactions. *Lab chip*, v. 11, p. 2488-2492, 2011.
- Kumta, P.N.; Sfeir, C.; Lee, D.-H.; Olton, D.; Choi, D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. *Acta Biomater.*, v. 1, p. 65-83, 2005.
- Marre, S.; Jensen, K.F. Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. *Chem. Soc. Rev.*, v. 39, p. 1183-1202, 2010.
- van Kemenade, M.J.J.M.; de Bruyn, P.L. A kinetic study of precipitation from supersaturated calcium phosphate solutions. *J. Colloid Interf. Sci.*, v. 118, p. 564-585, 1987.



- Wang, Q.-A.; Wang, J.-X.; Li, M.; Shao, L.; Chen, J.-F.; Gu, L.; An, Y.-T. Large-scale preparation of barium sulphate nanoparticles in a high-throughput tube-in-tube microchannel reactor. *Chem. Eng. J.*, v. 149, p. 473-478, 2009.
- Zhao, C.-X.; He, L.; Qiao, S.Z.; Middelberg, A.P.J. Nanoparticle synthesis in microreactors. *Chem. Eng. Sci.*, v. 66, p. 1463-1479, 2011.