

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



**PRODUÇÃO DE PELLETS À BASE DE HIDROXIAPATITE
CONTENDO UM FÁRMACO MODELO**

Ana Filipa Fazendeiro do Lumiar Ramos

MESTRADO EM FARMACOTECNIA AVANÇADA

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA



**PRODUÇÃO DE PELLETS À BASE DE HIDROXIAPATITE
CONTENDO UM FÁRMACO MODELO**

Ana Filipa Fazendeiro do Lumiar Ramos

MESTRADO EM FARMACOTECNIA AVANÇADA

DISSERTAÇÃO ORIENTADA POR:

Professor Doutor João F. Pinto

2012

AGRADECIMENTOS

Expresso os meus agradecimentos a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, tornaram possível a realização deste trabalho e que merecem o meu mais sincero obrigado.

Ao Professor Doutor João F. Pinto, orientador deste trabalho, gostaria de agradecer a confiança demonstrada ao aceitar a orientação deste trabalho, o empenho, a compreensão e a disponibilidade, assim como as sugestões e as valiosas críticas.

Ao Professor Doutor Paulo Salústio, gostaria de agradecer todos os conhecimentos transmitidos e a disponibilidade constante.

Ao colega Gonçalo Oliveira gostaria de agradecer a disponibilidade manifestada e o importante apoio laboratorial, colaboração indispensável para a realização deste trabalho.

Aos colegas do curso de mestrado e colegas de trabalho agradeço o companheirismo e a amizade.

À Lusomedicamenta, agradeço a disponibilidade técnica demonstrada.

Aos meus pais, irmã e amigos agradeço todo o apoio, colaboração, estímulo e carinho com que sempre pude contar e que foram tão importantes nos períodos mais difíceis. Muito Obrigada.

RESUMO

Este trabalho foi realizado tendo como objectivo principal a produção de pellets à base de hidroxiapatite com diferentes dimensões e porosidades, uma vez que a utilização de pellets de dimensões variadas permite um melhor preenchimento do espaço/cavidades ósseas e que a porosidade é um factor promotor da osteointegração.

Os pellets foram produzidos através da tecnologia de extrusão-esferonização utilizando feiras de diferentes diâmetros. Como potencial promotor da formação dos poros foi incluído cloreto de sódio com diferentes granulometrias na estrutura dos pellets. Os pellets produzidos foram sinterizados e posteriormente mergulhados sob vácuo numa solução de ibuprofeno para incorporação desta substância activa na sua estrutura.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a tecnologia utilizada permitiu produzir pellets de diferentes dimensões por extrusão-esferonização embora não tenha sido possível otimizar a produção desses pellets com estruturas macroporosas.

Foi possível verificar que o aumento da temperatura de sinterização conduziu a uma maior densificação do material com redução da porosidade e que o cloreto de sódio presente nos pellets conduziu a uma menor contracção dos mesmos quando comparados com os das formulações testadas contendo hidroxiapatite modificada sem cloreto de sódio.

Adicionalmente os resultados obtidos no ensaio de dissolução indicam que o ibuprofeno deverá ter ficado apenas à superfície dos pellets.

Ainda que não tenha sido possível obter as estruturas macroporosas propostas, os restantes objectivos deste trabalho foram atingidos, tendo sido possível produzir pellets de hidroxiapatite utilizando a tecnologia de extrusão-esferonização e sua caracterização.

Palavras-Chave: Extrusão-Esferonização, Hidroxiapatite, Ibuprofeno, Pellet, Porosidade.

ABSTRACT

The purpose of this work was to produce pellets of hydroxyapatite with different sizes and porosity. This was done because the use of pellets with different dimensions allows a better filling of bone cavities and the porosity is an important variable of osteointegration.

The pellets were produced by extrusion-spheronization using extrusion screens of different diameters. Sodium chloride with different particle sizes was added to the pellets formulation as a potencial porogenic component. The pellets were sintered and afterwards they were soaked under vacuum in an ibuprofen solution to promote its incorporation in the structure.

The data produced revealed that the technology of extrusion-spheronization was adequate to manufacture pellets with different sizes although it was not possible to optimize macroporous structures.

It was possible to verify that the sintering temperature led to a densification of material with porosity reduction and that the sodium chloride led to lower collapse of the pellets when compared with the tested formulations with modified hydroxyapatite without sodium chloride.

Adicionally, the dissolution results indicate that ibuprofen should have stayed only on the pellets external surface.

Although it was not possible to obtain the proposed macroporous structures, the other objectives of this study were attained, having been possible to produce hydroxyapatite pellets by the extrusion-spheronization technology and characterize them.

Keywords: Extrusion-Spheronization, Hydroxyapatite, Ibuprofen, Pellet, Porosity.

ABREVIATURAS

Abs.	Absorvância
CMC	Celulose microcristalina
HA	Hidroxiapatite
HAm	Hidroxiapatite modificada
IQ	Interquartilha
Lact.	Lactose
MEV	Microscopia electrónica de varrimento
NaCl	Cloreto de sódio
rpm	Rotações por minuto
TCP	Fosfato tricálcico

ÍNDICE GERAL

Resumo	V
Abstract	VI
Abreviaturas	VII
Índice Geral	IX
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas	XV
1. Introdução	1
1.1. Considerações gerais sobre implantes	3
1.2. Composição, estrutura e propriedades do osso	7
1.3. Mecanismo de crescimento ósseo	9
1.4. Utilização de biomateriais cerâmicos para substituição óssea	12
1.4.1. Hidroxiapatite	14
1.4.2. A hidroxiapatite e os biovidros	16
1.4.3. A Sinterização	18
1.5. Factores para o sucesso clínico dos substitutos ósseos	19
1.6. Produção de pellets	21
1.6.1. Processo de extrusão-esferonização	21
1.7. Inclusão de uma substância activa num biomaterial	29
2. Objectivo do Estudo	31
3. Materiais e métodos	35
3.1. Materiais	37
3.2. Métodos	37
3.2.1. Estudos preliminares	37
3.2.2. Produção de pellets à base de hidroxiapatite	41
3.2.3. Avaliação da capacidade de inclusão de um fármaco modelo (ibuprofeno) na estrutura dos pellets produzidos	43
3.2.3.1. Preparação da solução de ibuprofeno	43
3.2.3.2. Inclusão do fármaco modelo (ibuprofeno) na estrutura dos pellets	43
3.2.4. Caracterização dos pellets produzidos	44
3.2.4.1. Tamanho de partícula	44
3.2.4.2. Avaliação da estrutura interna	44

3.2.4.3. Densidade	44
3.2.4.4. Porosidade	44
3.2.4.5. Doseamento	45
3.2.4.6. Quantificação da libertação do fármaco dos pellets	45
4. Resultados	47
4.1. Estudos preliminares	49
4.2. Produção de pellets à base de hidroxiapatite	57
5. Discussão dos resultados	65
5.1. Estudos preliminares	67
5.2. Produção de pellets à base de hidroxiapatite	70
5.3. Avaliação da capacidade de inclusão de um fármaco modelo (ibuprofeno) na estrutura dos pellets produzidos	72
6. Conclusões	75
7. Trabalho futuro	79
8. Referências bibliográficas	83
9. Anexos	89
9.1. Curva de calibração (solução de ibuprofeno)	91
9.2. Tamanho de partícula (formulações C20_HA[50]_V4_L/D4_1; C50_HA[50]_V4_L/D4_1 e C180_HA[50]_V4_L/D4_1)	92
9.3. Perfis de extrusão (força versus deslocamento)	93
9.4. Tamanho de partícula (formulações com hidroxiapatite e cloreto de sódio)	94
9.5. Fotografias dos pellets produzidos antes e após sinterização	96
9.6. Imagens dos pellets antes da sinterização	102
9.7. Imagens dos pellets sinterizados a 1200°C	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Estrutura cristalina da hidroxiapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$.	15
Figura 1.2.	Representação dos dois modelos propostos para descrever o mecanismo de esferonização.	25
Figura 3.1.	Pratos de esferonização utilizados neste trabalho.	39
Figura 3.2.	Representação da relação entre a temperatura e o tempo no processo de sinterização.	43
Figura 4.1.	Superfície do extrudido (fieira de diâmetro 6 mm, velocidade de 400 mm/min, menor proporção de água – A50_C50_V4_L/D4).	50
Figura 4.2.	Imagens de MEV da superfície interna dos pellets contendo CMC com granulometrias diferentes (ampliação de 1000x).	52
Figura 4.3.	Imagens de MEV da superfície externa dos pellets contendo CMC com diferentes granulometrias (ampliação 200x).	53
Figura 4.4.	Fotografia de pellets fabricados com a fieira de 3 mm de diâmetro.	54
Figura 4.5.	Fotografia de pellets fabricados com as fieiras de 6 mm e 9 mm de diâmetro antes (fora do círculo) e após sinterização (interior do círculo).	55
Figura 4.6.	Frequências acumuladas do tamanho dos pellets com diâmetro de 1 mm.	55
Figura 4.7.	Densidade dos pellets com hidroxiapatite modificada.	56
Figura 4.8.	Distribuição de tamanho dos pellets fabricados (frequências acumuladas).	57
Figura 4.9.	Gráfico tipo representando perfis de extrusão.	58
Figura 4.10.	Imagens de pellets fabricados com a fieira de 9 mm de diâmetro.	59

Figura 4.11.	Densidade dos pellets com hidroxiapatite.	62
Figura 4.12.	Perfil de libertação da substância activa em função do tempo.	64
Figura 9.1.1.	Curva de calibração ibuprofeno em tampão fosfato pH=7,2 ($\lambda=264$ nm).	91
Figura 9.2.1.	Distribuição de tamanho dos pellets fabricados com a fieira de 1 mm de diâmetro (frequências acumuladas).	92
Figura 9.3.1.	Perfis de extrusão.	93
Figura 9.4.1.	Tamanho dos pellets fabricados com a fieira de 1 mm antes da sinterização (a) e após sinterização a 1000°C (b) e a 1200°C (c).	94
Figura 9.4.2.	Tamanho dos pellets fabricados com a fieira de 3 mm antes da sinterização (a) e após sinterização a 1000°C (b) e a 1200°C (c).	94
Figura 9.4.3.	Tamanho dos pellets fabricados com a fieira de 6 mm antes da sinterização (a) e após sinterização a 1000°C (b) e a 1200°C (c).	95
Figura 9.4.4.	Tamanho dos pellets fabricados com a fieira de 9 mm antes da sinterização (a) e após sinterização a 1000°C (b) e a 1200°C (c).	95
Figura 9.5.1.	Imagem dos pellets da formulação F1_S15_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	96
Figura 9.5.2.	Imagem dos pellets da formulação F3_S15_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	96
Figura 9.5.3.	Imagem dos pellets da formulação F6_S15_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	96
Figura 9.5.4.	Imagem dos pellets da formulação F9_S15_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	97
Figura 9.5.5.	Imagem dos pellets da formulação F1_S15_B, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	97
Figura 9.5.6.	Imagem dos pellets da formulação F3_S15_B, antes da sinterização (a) e após sinterização a 1000°C (b).	97
Figura 9.5.7.	Imagem dos pellets da formulação F6_S15_B antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	98

Figura 9.5.8.	Imagem dos pellets da formulação F6_S15_C, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	98
Figura 9.5.9.	Imagem dos pellets da formulação F9_S15_C, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	98
Figura 9.5.10.	Imagem dos pellets da formulação F3_S40_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	99
Figura 9.5.11.	Imagem dos pellets da formulação F6_S40_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	99
Figura 9.5.12.	Imagem dos pellets da formulação F9_S40_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	99
Figura 9.5.13.	Imagem dos pellets da formulação F3_S40_B, antes da sinterização (a) e após sinterização a 1000°C (b).	100
Figura 9.5.14.	Imagem dos pellets da formulação F6_S40_B, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	100
Figura 9.5.15.	Imagem dos pellets da formulação F6_S40_C, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	100
Figura 9.5.16.	Imagem dos pellets da formulação F9_S40_C, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).	101
Figura 9.6.1.	Imagem dos pellets da formulação F6_S15_C, obtida por MEV.	102
Figura 9.6.2.	Imagem dos pellets da formulação F6_S40_A, obtida por MEV.	102
Figura 9.7.1.	Imagem da superfície externa dos pellets da formulação F6_S15_A, obtida por MEV.	103
Figura 9.7.2.	Imagem dos pellets da formulação F6_S15_B, obtida por MEV.	103
Figura 9.7.3.	Imagem da superfície externa dos pellets da formulação F6_S15_C, obtida por MEV.	103
Figura 9.7.4.	Imagem dos pellets da formulação F6_S40_A, obtida por MEV.	104
Figura 9.7.5.	Imagem dos pellets da formulação F9_S40_A, obtida por MEV.	104

Figura 9.7.6.	Imagem dos pellets da formulação F6_S40_B, obtida por MEV.	105
Figura 9.7.7.	Imagem dos pellets da formulação F6_S40_C, obtida por MEV.	105
Figura 9.7.8.	Imagem dos pellets da formulação F9_S40_C, obtida por MEV.	106

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1.	Matérias-primas utilizadas no estudo.	37
Tabela 3.2.	Condições experimentais consideradas para identificar os limites de processabilidade dos materiais em pellets.	38
Tabela 3.3.	Condições experimentais consideradas no estudo do efeito da substituição da lactose pela hidroxiapatite modificada na qualidade dos pellets produzidos.	40
Tabela 3.4.	Condições experimentais consideradas na produção de pellets à base de hidroxiapatite.	42
Tabela 4.1.	Características dos pellets de 1 mm produzidos com hidroxiapatite modificada, antes e após aquecimento a 600°C e sinterização a 1000°C e 1300°C.	51
Tabela 4.2.	Resultados da caracterização efectuada aos pellets de 1, 3, 6 e 9 mm de diâmetro produzidos com hidroxiapatite modificada, antes e após sinterização a 1300°C.	56
Tabela 4.3.	Resultados da caracterização efectuada aos pellets produzidos com hidroxiapatite e cloreto de sódio de diferentes granulometrias antes e após sinterização a 1000°C e 1200°C.	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre implantes

Na última metade do século XX verificou-se um aumento significativo do uso de implantes, como por exemplo implantes ortopédicos, cardíacos, e maxilofaciais. Até há pouco tempo, nos casos em que o tratamento farmacológico se revelava insuficiente, a principal abordagem era a transplantação de órgãos e tecidos de outros indivíduos (transplante alogénico) ou transplante de tecidos de áreas saudáveis dos próprios doentes (transplantação autóloga). A falta de dadores, o risco potencial de transmissão de doenças, a taxa de rejeição dos transplantes e a morbilidade do dador, estiveram na origem nos últimos anos de um crescente desenvolvimento e investigação de substitutos artificiais de tecidos e órgãos, construídos pelo homem.¹

O bom desempenho dos tecidos naturais no organismo é o resultado de anos de evolução, enquanto o bom desempenho dos substitutos desenhados pelo homem para reparação dos tecidos tem apenas algumas décadas.¹

As principais estratégias utilizadas actualmente na reparação de tecidos são:

Enxertos – um pedaço de tecido viável ou um conjunto de células viáveis são transferidos de um local de um dador ou do próprio doente para o local receptor, com o objectivo de reconstrução no local;¹

Biomateriais - material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar, ou substituir qualquer tecido, órgão ou função no organismo.¹ Ao ser aplicado, o biomaterial deve manter as suas propriedades e características estruturais mas, simultaneamente, substituir a função para a qual foi criado. É ainda importante que permita uma boa adesão celular à sua superfície, tenha uma resistência mecânica adequada, não tenha características oncogénicas, não seja imunogénico, seja hemostático, esterilizável e, por fim, que a sua produção em grandes quantidades seja fácil e com custos aceitáveis;^{2,3}

Engenharia de tecidos – consiste na apresentação em locais apropriados de sinais moleculares, células e estruturas de suporte extracelulares que levam o organismo a desenvolver mecanismos de auto-tratamento.^{1,4}

Os biomateriais e enxertos são largamente utilizados em aplicações clínicas enquanto a engenharia de tecidos se encontra ainda no seu início. A estratégia actual na reparação de tecidos é criar estruturas que, aceites pelo organismo vivo, sejam capazes de restaurar uma função danificada, ou ainda mais desafiante, sejam capazes de reagir de forma controlada com o meio biológico e estimular mecanismos biológicos específicos.^{1,4}

O sucesso da aplicação de um material no organismo, depende essencialmente de dois factores:

- da sua biofuncionalidade, que está directamente relacionada com a capacidade do material desempenhar uma determinada função (ou parte desta) no organismo e que requer:

- propriedades mecânicas tais como a resistência à tracção e à fractura, alongação à fractura e módulo de Young (módulo de elasticidade);
- propriedades físicas como por exemplo a densidade no caso dos implantes ortopédicos, ou a expansão térmica no caso dos cimentos ósseos;
- química da superfície, que se relaciona com a resistência à degradação (por exemplo oxidação ou corrosão) ou à capacidade de ligação ao tecido.¹

- da sua biocompatibilidade, que se baseia na análise das reacções ocorridas na superfície do implante, não só aquando da sua implantação, mas também ao longo do tempo, quando este sofre um processo de degradação e desgaste.⁵

O aparecimento de doenças e defeitos nos tecidos ósseos, a osteoporose e a osteoartrite, têm conduzido a um aumento da necessidade de uso de materiais implantáveis para substituição do osso.⁶ Tem sido notável o desenvolvimento dos biomateriais utilizados em cirurgia ortopédica, traumatológica ou maxilofacial, particularmente dos substitutos ósseos. Estes podem ser definidos como “todo o material de origem humana, animal, vegetal ou sintética, destinado à implantação no homem com o propósito de uma reconstituição do osso, para reforço de uma estrutura óssea ou para o preenchimento de uma perda de substância óssea com origem traumática ou ortopédica”.²

Vários tipos de substitutos sintéticos têm sido desenvolvidos de forma a combinar a biofuncionalidade e a biocompatibilidade.

De acordo com a sua composição química, podem ser divididos nas seguintes classes:

- Metais e ligas metálicas - como o titânio, as ligas de titânio, o aço inoxidável, as ligas de cobalto-crómio. Estes são materiais com elevada rigidez, resistência ao desgaste e degradação e com condutividade térmica e eléctrica.⁷
- Cerâmicos - que podem ser descritos como compostos sólidos formados pela aplicação do calor ou por vezes pela aplicação de calor e pressão⁸ e onde se incluem o óxido de alumínio, o carbono, o fosfato de cálcio, e os vitro-cerâmicos.
- Polímeros - como o silicone, polimetilmetacrilato, ácido poliláctico, poliuretano, polietileno de ultra elevado peso molecular. Segundo Puppi³, encontram-se em investigação polímeros como polihidroxialcanoatos, polifosfazonas e polímeros naturais como o colagénio, a fibrina e o ácido hialurónico. Os polímeros naturais são de maior interesse porque são biodegradáveis e biocompatíveis, permitindo às células aderir, proliferar e diferenciarem-se sem as reacções inflamatórias e a citotoxicidade muitas vezes associadas aos polímeros sintéticos.⁹
- Compostos/compósitos – onde se incluem os implantes metálicos revestidos de materiais cerâmicos ou polímeros reforçados com os mesmos;

Por outro lado, se se considerar o comportamento biológico, a classificação dos substitutos sintéticos baseia-se na resposta do tecido receptor:

- Bioinertes - não provocam reacção de corpo estranho no organismo, encontrando-se em ligação directa ao tecido receptor (ex: titânio, zircónio e alumínio). Os cerâmicos bioinertes não têm praticamente influência no tecido vivo envolvente e o seu melhor exemplo é a alumina.¹⁰
- Biotolerados - moderadamente aceites pelo tecido receptor, sendo geralmente envolvidos por uma cápsula fibrosa (ex: aço inoxidável, ligas de crómio-cobalto e polimetilmetacrilato);²
- Bioactivos - nestes existe a formação de uma ligação directa aos tecidos vivos (ex: hidroxiapatite, vidros bioactivos que, por terem geralmente na sua composição iões de cálcio e/ou iões de fósforo, vão estabelecer uma ponte química com o osso envolvente). Quando implantados no organismo estes materiais bioactivos desencadeiam uma resposta biológica específica na interface do material, que resulta na formação de ligações entre o tecido e o material.^{3,5,10}
- Reabsorvíveis - lentamente degradáveis e gradualmente substituídos pelos tecidos onde são implantados (ex: fosfato tricálcico, vidros bioactivos).

A escolha de um material dos anteriores depende da aplicação a que se destina e do tipo de função que se pretende substituir. Infelizmente, nenhum dos biomateriais existentes responde simultaneamente a todos os requisitos.

É importante referir que à luz das Autoridades os materiais referidos anteriormente que se destinam ao controlo, tratamento ou atenuação de uma doença ou compensação de uma lesão ou de uma deficiência, são considerados dispositivos médicos (“qualquer instrumento, aparelho, equipamento, *software*, material ou artigo utilizado isoladamente ou em combinação, incluindo o *software* destinado pelo seu fabricante a ser utilizado especificamente para fins de diagnóstico ou terapêuticos e que seja necessário para o bom funcionamento do dispositivo médico, cujo principal efeito pretendido no corpo humano não seja alcançado por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos, embora a sua função possa ser apoiada por esses meios”) e devem por isso também obedecer a um conjunto de requisitos de fabrico e registo.¹¹

O objectivo clínico é sempre o desenvolvimento de implantes melhores, fiáveis e funcionais. De uma perspectiva regulamentar e do ponto de vista da sua produção, é fundamental conhecer quais as características importantes (por exemplo características de superfície) para que se possam ter processos de fabrico harmonizados e de acordo com padrões de qualidade exigidos aos implantes médicos.¹²

De entre as alternativas possíveis para substituição óssea, os materiais cerâmicos sintéticos de fosfato de cálcio são largamente utilizados por possuírem uma composição química próxima da fase mineral do osso, o que permite uma elevada capacidade de ligação ao mesmo.⁶

O osso trabecular consiste num mineral ósseo macroporoso que é a hidroxiapatite (55-70% porosidade), pelo que a hidroxiapatite sintética (com uma relação entre cálcio e fósforo (Ca/P) de 1,667) e o fosfato tricálcico (com Ca/P=1,5) ganharam uma atenção especial como substitutos ósseos em aplicações ortopédicas e maxilofaciais dada a sua biocompatibilidade e bioactividade. Estes são classificados como classe B nos materiais bioactivos, o que significa que são osteocondutivos e que são também capazes de criar ligações com o osso *in vivo*.^{5,8}

Os materiais cerâmicos porosos têm sido desenvolvidos com o objectivo de mimetizar a arquitectura porosa do osso trabecular. A vantagem desta estrutura porosa é que permite a existência de espaços apropriados para o crescimento ósseo. Alguns autores referem que quando a porosidade é suficiente (poro maior que 100µm), o material implantado é

progressivamente invadido e substituído por osso⁶, o que vai promover o crescimento ósseo nesse local, sendo também importante a interconectividade dos poros.⁸

Estudos realizados com blocos de hidroxiapatite com uma porosidade de 35 a 48% e um diâmetro dos poros de 50 – 300µm, que foram implantados em doentes, demonstraram que existiu crescimento ósseo, que se estabeleceram ligações directas entre os blocos de hidroxiapatite e o osso adjacente e que os poros localizados na interface foram invadidos por tecido ósseo.¹³

Os materiais biocerâmicos apresentam ainda a vantagem de poderem ser transportadores de fármacos.⁶

Actualmente, os implantes ortopédicos apresentam algumas limitações por não possuírem três das características consideradas mais críticas dos tecidos: a capacidade de se autoregenerarem, a capacidade de manterem o fornecimento de sangue ao local e a possibilidade de modificarem a sua estrutura e propriedades em resposta a factores ambientais como seja a força mecânica. Tendo em consideração o aumento da esperança média de vida, o sentido da investigação deve mudar da procura de substituição de tecidos para dar origem a métodos que permitam soluções de reparação a longo termo.^{5,14}

Neste trabalho procurou-se produzir pellets à base de hidroxiapatite que possam ser utilizados em substituição óssea. A estratégia seguida passou pelo fabrico de pellets de diferentes dimensões, com diferentes granulometrias de cloreto de sódio para promover diferentes porosidades. Para que se possa compreender os requisitos destas estruturas, é necessário conhecer as características do osso que se resumem de seguida.

1.2. Composição, estrutura e propriedades do osso

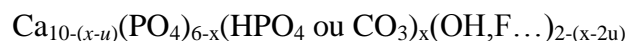
De uma forma geral, pode-se considerar que o osso é essencialmente constituído por uma parte orgânica e por uma parte mineral. A primeira é constituída maioritariamente por colagénio, glicoproteínas, proteoglicanos e sialoproteínas¹⁵ e a parte mineral é constituída por iões como o fosfato e o cálcio, estando também presentes os iões bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades. Estudos de difracção de raios X mostraram que o cálcio e o fósforo formam cristais com a estrutura da hidroxiapatite.¹⁶

A hidroxiapatite é o maior componente mineral dos ossos que está presente em tecidos duros (ossos e dentes), cujas funções são a protecção estrutural, o movimento e a mastigação. Constituindo estruturas flexíveis e elásticas, os ossos das costelas protegem o coração, os pulmões e outros órgãos cujas funções envolvem movimento, expansão ou contracção. Sendo rígido, o osso suporta estruturalmente as acções mecânicas dos tecidos leves, como a contracção dos músculos e a expansão dos pulmões. A nível celular o osso é um local de protecção e produção de tecidos especializados, tais como a medula óssea, onde se formam as células sanguíneas. Finalmente pode ainda considerar-se que o osso é um reservatório usado pelo sistema endócrino para regular a homeostasia do cálcio e do fosfato nos fluidos circulantes do organismo.¹

Na forma e na macroestrutura, os ossos e os dentes sofrem influência de factores genéticos, metabólicos e mecânicos. Todo o osso consiste numa estrutura básica: camada externa ou córtex (reveste o osso, é suave, contínuo e denso (aprox 1,80 g/cm³)) e no interior osso esponjoso (osso poroso com uma porosidade média de 75% - 95% e uma densidade média de 0,2 g/cm³). É no entanto de referir que as características do osso variam com a idade e com a sua função no organismo.¹

As propriedades mecânicas do osso conciliam uma rigidez elevada com uma elevada elasticidade de uma forma que ainda não é possível encontrar nos materiais sintéticos. Amostras de osso cortical demonstraram apresentar uma resistência à tracção na ordem dos 78,8 MPa - 151,0 MPa na direcção longitudinal e 51,0 MPa - 56,0 MPa na direcção transversal. A elasticidade do osso é também importante para a sua função porque confere ao esqueleto a capacidade de suportar o impacto. O módulo de elasticidade estimado para amostras de osso é da ordem dos 17,0 GPa - 20,0 GPa na direcção longitudinal e 6,0 GPa - 13,0 GPa na direcção transversal. Estas propriedades mecânicas resultam da microestrutura do osso que combina uma matriz orgânica com cristais minerais (fosfato cálcio e apatite) que estão habitualmente orientados numa direcção longitudinal do osso conferindo uma maior força e rigidez no eixo longitudinal relativamente ao eixo transversal.¹

A estrutura dos biominaerais humanos de fosfato cálcio e apatite presente no osso, na dentina e no esmalte, pode ser representada da seguinte forma:



com $0 \leq x \leq 2$ e $0 \leq 2u \leq x$

em que as componentes catiónicas ($x-u$) coexistem com as aniónicas monovalentes ($x-2u$). O parâmetro “ u ” aparece geralmente muito baixo e pode ser negligenciado. Dois tipos de iões carbonato estão presentes e localizados nos locais aniónicos trivalentes e monovalentes da estrutura. Para o osso e dentina, a proporção de espaços catiónicos é muito elevada e próxima do máximo, enquanto que para o esmalte é muito baixa.¹

No desenvolvimento de implantes para substituição óssea devem ser consideradas as características que possam afectar positiva ou negativamente o crescimento do tecido ósseo nos locais afectados pelo que é importante conhecer o mecanismo de crescimento ósseo.

1.3. Mecanismo de crescimento ósseo

O osso é um tecido altamente vascularizado, vivo e dinâmico que é notável pela sua dureza e capacidade regenerativa. Origina-se maioritariamente nas células mesenquimatosas pluripotenciais durante o desenvolvimento embrionário. Numa fase adulta, estas células podem ser isoladas por exemplo da medula óssea, da membrana amniótica ou do tecido perivascular do cordão umbilical. Estas células, por definição, têm a capacidade de se autoregenerar e repopular todas as linhagens celulares apropriadas, podendo diferenciar-se em linhagens osteoblástica, mioblástica, adipogénica, condrogénica, endotelial e neurogénica.

A formação do tecido ósseo tem lugar, não só durante o desenvolvimento embrionário, mas também durante o crescimento, no processo de remodelação, no tratamento de fracturas e após a implantação de matrizes osteoindutivas.⁹

As células envolvidas no processo de osteogénese são:

Células osteoprogenitoras – relativamente à linhagem osteogénica as células mesenquimatosas pluripotenciais suportam uma cascata de passos de diferenciação (célula mesenquimatosas pluripotencial → osteoprogenitor imaturo → osteoprogenitor maduro → pré-osteoblasto → osteoblasto maduro → osteócito).

Quanto mais tardia a etapa de diferenciação, menor é a capacidade de auto regeneração e de proliferação celular. Na medula óssea, actualmente a fonte mais comum de recolha de células mesenquimatosas, as células osteoprogenitoras representam uma percentagem muito pequena (menos de 0,005%) dos diversos tipos de células nucleadas existentes no osso adulto saudável. As células osteoprogenitoras em diferenciação expressam

várias macromoléculas da matriz óssea (fosfatase alcalina, colagénio tipo I, sialoproteína do osso, osteocalcina e osteopontina):

Osteoblastos – células altamente diferenciadas, não migratórias que podem diferir substancialmente nas suas propriedades dependendo do nível de desenvolvimento:

- osteoblastos activos – células de forma cuboidal, mononucleares e com elevada actividade da fosfatase alcalina. Sintetizam e segregam o colagénio tipo I, glicoproteínas (osteopontina e osteocalcina), citocinas e factores de crescimento para uma região de matriz não mineralizada (osteóide) entre a célula e a matriz mineralizada.¹⁶ Os osteoblastos também produzem minerais de fosfato de cálcio extra e intercelularmente. Apenas os osteoblastos activos e os seus precursores contribuem para a formação óssea.

- osteócitos - osteoblastos maduros que ficaram presos na matriz do osso e que são responsáveis pela manutenção do osso e sua homeostasia; os osteócitos são as células encontradas no interior da matriz óssea, ocupando as lacunas das quais partem canalículos. Cada lacuna contém apenas um osteócito. Dentro dos canalículos, os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contactos através das junções comunicantes, por onde podem passar pequenas moléculas e iões de um osteócito para outro. Embora as suas características ultraestruturais indiquem pequena actividade sintética, os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz óssea.¹⁶

- células da linhagem do osso - encontradas ao longo das superfícies dos ossos não sendo submetidas nem a formação de novo osso, nem a reabsorção;

- osteoblastos inactivos - células alongadas, indistintas morfológicamente das células de linhagem do osso.¹

Osteoclastos - derivados das células hematopoiéticas pluripotenciais que se diferenciam a longo das linhagens de monócitos/macrófagos. São responsáveis pela reabsorção óssea¹⁶ através da acidificação do material do osso conduzindo à sua dissolução, e pela degradação enzimática da matriz óssea extracelular desmineralizada. O osteoclasto maduro é uma célula polarizada que se liga, pelo seu pólo apical, à matriz óssea mineralizada. No seu compartimento de reabsorção, situado debaixo da célula e delimitado pela zona de ligação, os osteoclastos criam um meio ácido que resulta na dissolução do osso mineral. Esta acidificação osteoclástica é mediada pela acção da anidrase carbónica que produz dióxido de carbono, água e protões que são transferidos através da membrana celular para o compartimento de

reabsorção. Durante a remodelação do osso os osteoclastos reabsorvem o osso antigo e através de moléculas de sinalização locais activam os osteoblastos para formar novo osso.

Durante a vida, a remodelação fisiológica do osso ocorre sem afectar a forma e a densidade do mesmo, através de uma sequência de eventos que incluem a activação osteoclástica, a reabsorção óssea, a activação dos osteoblastos e a formação de novo osso no local da reabsorção.⁹ No entanto, os padrões de remodelação do osso alteram dramaticamente com a idade o que é demonstrado por doenças como a osteoporose que é caracterizada pela perda de massa óssea que aumenta a fragilidade do osso e aumenta o risco de fracturas. Esta perda de densidade do osso é o resultado do desequilíbrio entre a formação do osso e a sua reabsorção, geralmente relacionado com redução dos níveis de estrogénios.

Assim, relativamente à resposta biológica, após implantação de um biomaterial ocorre a formação de um hematoma, com uma resposta de tipo inflamatória com chamada de água e glicoproteínas, que revestem e aderem ao implante. Por quimiotactismo, numerosas células são recrutadas para o local, nomeadamente neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos. Estas últimas, além da sua actividade fagocítica, estimulam a acção dos linfócitos, fibroblastos, osteoclastos e células polimorfonucleares.

Seguidamente, inicia-se a angiogénese, com a migração e proliferação de células endoteliais que vão formar uma rede de capilares que constituirá o suporte vascular da zona. Por fim, devido à acção de citocinas (IL-1 e IL-2) e de diversos factores de crescimento (TGF- β , PDGF, IGF, BMP's) vai ocorrer um processo de diferenciação das células mesenquimatosas pluripotenciais com a formação de matriz óssea e de osso imaturo.

A maturação e remodelação que encerram este processo, realçam a semelhança que existe com a fisiologia da formação do calo ósseo, subsequente a uma fractura.

Assim, para que possa ocorrer regeneração tecidual, é necessária a presença de células capazes de formar novo tecido ósseo (osteogénese), que estas consigam aderir, crescer e atravessar todo o material (osteocondução) e que estejam presentes factores que estimulem a sua diferenciação fenotípica em osteoblastos (osteoindução).^{1,2}

1.4. Utilização de biomateriais cerâmicos para substituição óssea

Como referido anteriormente, o osso é um tecido vivo, que se encontra em remodelação contínua. Devido à sua capacidade de regeneração espontânea, em muitas das lesões ósseas, tais como fracturas, a cura ocorre de forma satisfatória com a terapia convencional. No entanto, em caso de defeitos de grandes dimensões e em deformações ósseas congénitas, um enxerto ou um substituto ósseo são necessários para auxiliar o tratamento.³

Uma das características mais importantes dos materiais utilizados para substituição óssea é a biocompatibilidade.¹⁷

O uso de enxertos ósseos, inicialmente estabelecido em 1800, significava tradicionalmente substituir osso em falta por material do corpo do doente (autoenxerto) ou de um dador (aloenxerto). O objectivo do enxerto, para além da substituição do tecido em falta, era reforçar a área a reparar como resultado do estímulo de crescimento de osso no local receptor. Este novo osso deve idealmente penetrar e substituir o implante através de ciclos de remodelação sequencial permitindo à zona reparada manter o equilíbrio óptimo entre forma e função. Apesar do autoenxerto ser largamente utilizado como o *golden standard*, o volume de osso que pode ser recolhido do local dador é limitado e pode resultar em dor e morbidade para o doente. Os aloenxertos modernos utilizando material armazenado em bancos de osso regulamentados ultrapassa estas complicações, no entanto, a estrutura e a cura podem ser imprevisíveis.¹⁸

Os biomateriais cerâmicos têm sido considerados como substitutos sintéticos do osso há mais de 30 anos incidindo em duas áreas primárias de investigação – optimização da química de superfície destes materiais e optimização da estrutura porosa. Tem sido demonstrado que as características de superfície destes materiais são críticas para a qualidade da recuperação uma vez que o uso de materiais bioactivos que suportem a ligação directa do osso à sua superfície aumentam muito o desempenho quando comparados com materiais que são apenas bioinertes ou biocompatíveis. Os materiais bioactivos podem ser osteocondutivos, suportando a aposição directa de osso nas suas superfícies por osteoblastos maduros, ou intrinsecamente osteoindutivos ou osteoprodutivos estimulando ou acelerando a aposição de osso através da sua influência na mobilização, diferenciação, e maturação das células mesenquimatosas pluripotenciais.¹⁸

Existem vários tipos de materiais que podem ser utilizados na substituição óssea, de onde se salientam:

- Vidros - Larry Hench foi o pioneiro da utilização de vidros bioativos para fins biomédicos. A principal característica dos vidros bioativos é a sua capacidade para promover uma rápida e duradoura ligação química, através de uma interface apatítica, com o tecido ósseo. Estes são materiais baseados em sílica amorfa que são biocompatíveis, bioativos, osteocondutivos e até osteoprodutivos. A capacidade de se ligarem ao osso é atribuída à formação de uma camada de um hidroxicarbonato de apatite na superfície do vidro em contacto com o tecido.⁵

Tendo em conta que os osteoblastos necessitam de sílica, cálcio e fósforo para a produção de osso, estes habitualmente são incorporados neste processo.²

Em termos de aplicação clínica, o vidro silicatado mais utilizado é o Bioglass® 45S5, que está demonstrado conduzir à formação mais rápida de osso do que a hidroxiapatite. No entanto, a baixa resistência mecânica não permite a sua aplicação em zonas do organismo sujeitas a uma maior carga.²

- Fosfato tricálcico (TCP) – existe sob duas formas alotrópicas α e β . Possui a fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (relação molar Ca/P=1,5) contendo cerca de 39% de cálcio e 20% de fósforo. É considerado um material cerâmico de rápida reabsorção. O seu mecanismo de acção depende da elevada concentração de cálcio e fósforo à superfície, o que melhora a sua osteointegração, iniciando a biomineralização, estimulando os osteoclastos e influenciando a diferenciação fenotípica das células osteogénicas. Sob a forma de pasta, são menos eficazes por falta da porosidade necessária ao crescimento ósseo. No entanto, associando produtos como o amido, é possível obter poros de 100 μm a 300 μm , permitindo uma mais rápida osteointegração.

A forma granular é a mais eficiente das três (granular, macroporosa e em pasta), porque os espaços entre os grânulos aumentam a porosidade da matriz e também a sua superfície de contacto.

As principais desvantagens do TCP, comparativamente com a hidroxiapatite, prendem-se com a sua falta de suporte estrutural provocada pela sua demasiado rápida reabsorção em função da sua macroporosidade.²

- Hidroxiapatite – existe uma grande semelhança entre a hidroxiapatite natural e a sintetizada em laboratório no que diz respeito à sua composição química e comportamento *in*

vivo. A hidroxiapatite é um fosfato de cálcio cuja fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (relação molar Ca/P=1,67) pelo que apresenta, ao contrário do TCP, muito lenta reabsorção e remodelação óssea, o que leva a que se mantenha no organismo durante anos. Apresenta no entanto uma estrutura favorável à invasão vascular.²

- Materiais compostos à base de fosfato de cálcio - os fosfatos de cálcio bifásicos, são compósitos de hidroxiapatite e TCP. São utilizados geralmente na proporção de dois terços para um terço, com porosidade de 40% até 60% o que favorece a velocidade e qualidade da osteointegração e a sua reabsorção, mantendo uma resistência à compressão que se aproxima, em alguns produtos, dos 10 MPa.

Alguns autores desenvolveram um material composto sintético, registado recentemente como Bonelike[®], a partir de hidroxiapatite reforçada com um vidro. Este material, constituído por uma matriz de hidroxiapatite e fases α -TCP e β -TCP dispersas na sua microestrutura, tem uma composição semelhante à parte inorgânica do tecido ósseo. O desenvolvimento deste material teve como objectivo obter um biomaterial com melhor bioactividade e propriedades mecânicas do que os materiais actualmente disponíveis comercialmente.²

- Cimentos de materiais cerâmicos injectáveis - novos substitutos sintéticos de fosfato dicálcico-tricálcico que foram desenvolvidos de forma a poderem ser aplicados na forma líquida sofrendo um processo de endurecimento através de uma reacção endotérmica quando aquecidos à temperatura corporal. São usados com sucesso no tratamento das fracturas distais do rádio, com o objectivo de prevenir o colapso nos doentes com osteoporose.²

1.4.1. Hidroxiapatite

Foi a importância da hidroxiapatite na constituição do osso, a sua biocompatibilidade e bioactividade (promovendo o crescimento do tecido ósseo e a osteointegração quando implantados no organismo)^{7,19} que levaram à sua selecção para a realização deste trabalho. Além disso, é o biomaterial cerâmico melhor caracterizado, existindo vários estudos sobre a sua capacidade de ligação ao osso vivo,²⁰ tornando-o extremamente atractivo e largamente utilizado nos implantes ósseos^{14,17,21} e o seu uso clínico^{18,22}.

Os biocerâmicos de hidroxiapatite como materiais de substituição do osso apresentam ainda como vantagens o fácil fornecimento, o baixo custo e a inexistência de imunogenicidade.¹⁸ Conforme referido anteriormente, a hidroxiapatite sintética é um material inorgânico com características químicas semelhantes aos tecidos duros como os ossos e os dentes⁷ com seguinte estrutura:

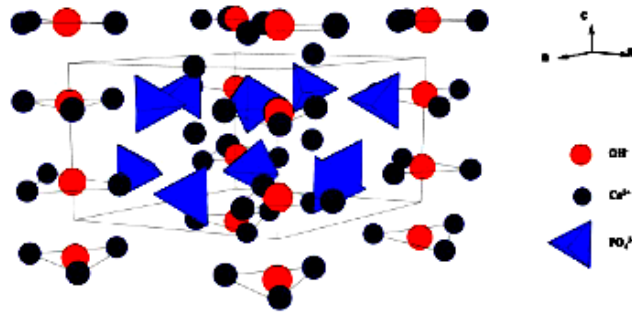


Figura 1.1. Estrutura cristalina da hidroxiapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ¹⁰

A indução do crescimento ósseo é lenta após implantação destes materiais no osso receptor. Por isso, têm sido desenvolvidas estruturas porosas e grânulos de hidroxiapatite¹⁹ uma vez que a sua estrutura porosa pode permitir o crescimento ósseo com uma melhor fixação mecânica do implante no local de implantação.²¹

O tamanho e a densidade das conexões interporos, assim como os poros em si são factores importantes na osteocondução para a área central dos poros de hidroxiapatite. Estudos demonstraram que a osteocondução é maior em poros com o tamanho de 500 μ m do que em poros com o tamanho de 200 μ m e outros estudos compararam a osteocondução em ligações de poros de 30 μ m, 60 μ m, 100 μ m e 130 μ m e concluíram que é maior nos de 130 μ m. No entanto, apesar de uma maior dimensão dos poros e do tamanho dos poros de ligação conduzirem a uma maior osteocondução, a resistência à compressão destes cerâmicos porosos é reduzida, limitando a sua aplicação clínica.^{7,15,19} O desenvolvimento de técnicas que promovam o crescimento ósseo nos poros de ligação da hidroxiapatite é desejado para eliminar as complicações associadas à sua implantação.¹⁹

Nos últimos anos, tem sido feito um esforço significativo no desenvolvimento de preparações e métodos de controlo destes pós de hidroxiapatite. Os pós de hidroxiapatite com várias morfologias têm sido sintetizados por exemplo através de reacções no estado sólido, do método hidrotermal, de microemulsão ou da técnica de emulsão. No entanto, o método

comum de precipitação química, nomeadamente sob pressão atmosférica, provou ser a forma mais conveniente de produzir os pós de hidroxiapatite.²²

1.4.2. A hidroxiapatite e os biovidros

É difícil concentrar as propriedades que se procuram – osteogénese, osteoindução e osteocondução - num material sintético, mas é possível adicionar a uma matriz osteocondutora (cerâmicos como a hidroxiapatite ou o fosfato tricálcico), agentes bioactivos que lhe forneçam as outras duas características para substituírem com sucesso os autoenxertos e os aloenxertos.²

Hench²³, colocou a hipótese de que um implante que contivesse cálcio e fosfato nas proporções semelhantes à matriz mineral do osso não seria rejeitado pelo organismo, e de facto, foi observada a ligação físico-química entre os biomateriais designados por Hench como o biovidro e o osso receptor. Até à data, e apesar de os biomateriais de fosfato de cálcio serem relativamente antigos, a sua capacidade de desencadear a formação do osso é incomparável com a de outros biomateriais. Ainda assim, estes materiais não podem substituir a função mecânica dos ossos, o que significa que as necessidades médicas, que são o factor desencadeante do desenvolvimento de substitutos sintéticos, não são inteiramente atingidas. Actualmente, tal como desejado por Hench, pretende-se criar materiais sintéticos com resposta completa e adequada do organismo.¹

Neste contexto, as aplicações médicas da hidroxiapatite são restritas aos locais de aplicação que não requerem um suporte estrutural elevado e por isso surgiu uma nova classe de biomateriais designada de hidroxiapatite reforçada pelo vidro, que possui bioactividade e melhores propriedades mecânicas quando comparada com uma fase única de hidroxiapatite. Esses biomateriais podem ser produzidos pela mistura de hidroxiapatite e vidros bioactivos. Quando um vidro baseado na composição $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ é adicionado à hidroxiapatite e é sinterizado, a fase vítrea reage com esta, sendo que as fases presentes vão depender da temperatura de sinterização e composição do vidro.^{20,24}

Em aplicações em que o osso cresce como pretendido, é particularmente benéfico ter fases absorvíveis, uma vez que são conhecidas por serem mais solúveis do que a hidroxiapatite. Estas fases por serem absorvíveis podem ser substituídas pelo novo osso e por

isso a área do defeito ósseo pode ser completamente regenerada mantendo a morfologia original.^{20,24}

É importante referir que a hidroxiapatite pura segue a via clássica de sinterização. No entanto, pequenas diferenças podem ser encontradas porque a hidroxiapatite pode conter um intervalo de iões adicionais que podem afectar o processo de sinterização. A altas temperaturas, a hidroxiapatite decompõe-se em β e depois forma a α -tricalciofosfato.²⁴ Isto encontra-se outra vez relacionado com efeitos da composição, particularmente a razão Ca/P. A hidroxiapatite reforçada pelo vidro exhibe características diferentes no processo de sinterização. O vidro adicionado como adjuvante da sinterização causa dois fenómenos que podem afectar de forma benéfica as propriedades mecânicas. Em primeiro lugar, dependendo da composição do vidro, este pode provocar a passagem de parte da hidroxiapatite a TCP, o que é favorável porque a formação de TCP é acompanhada de uma alteração de volume e por isso pode contribuir para a melhoria das propriedades mecânicas. Um segundo efeito é que o vidro actua como um inibidor de crescimento de poro, e então, a manutenção de um poro pequeno permite igualmente melhorar as propriedades mecânicas. Além de estar intimamente ligado com o nível de adição de vidro, este efeito depende também da temperatura utilizada.²⁵

É no entanto importante considerar que é requerida a existência de poros de dimensão superior a 100 μ m para permitir uma vascularização apropriada do novo tecido ósseo formado, pelo que é fundamental encontrar um equilíbrio entre o tamanho do poro e as propriedades mecânicas. Vários sistemas vítreos têm sido utilizados para produzir hidroxiapatite reforçada pelo vidro.²⁴

Outra situação a referir é o desenvolvimento e a produção de cerâmicos de vidro por cristalização controlada do vidro. Estes demonstraram propriedades mecânicas superiores às da hidroxiapatite. A sua microestrutura compreende uma estrutura de apatite, cristais de wollastonite e uma fase vítrea residual. O aumento das propriedades mecânicas é atribuído à wollastonite precipitada e é assumido que a presença de uma fase vítrea bioactiva pode proporcionar uma resposta mais rápida nos processos de ligação ao tecido ósseo e no seu tratamento. Muitos autores observaram a formação *in vivo* de uma camada rica em Ca-P na interface existente entre o osso e os implantes vitrocerâmicos. Esta camada foi caracterizada como tendo uma estrutura de apatite e é considerada como um requisito essencial para que a ligação do osso ocorra.²⁶

A falta de eficácia observada na utilização de biomateriais isoladamente devido a uma fraca resposta em comparação com a flexibilidade e reactividade de tecidos e órgãos naturais, significa que os cientistas de materiais não conseguem sozinhos resolver este assunto biológico complexo, uma vez que estes biomateriais por definição devem interagir e funcionar com as estruturas vivas. Actualmente a estratégia de desenhar biomateriais “inteligentes” vai ao encontro da sua capacidade de instruir as estruturas vivas a regenerar totalmente os tecidos, ou seja, criar um tecido sintético ou órgão que possa funcionar como o tecido vivo original.¹

Uma característica relevante dos fosfatos de cálcio é a sua capacidade de adsorver diferentes componentes à sua superfície. Esta propriedade foi explorada com a hidroxiapatite que provou ser eficiente na separação de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e outras macromoléculas.²⁷

1.4.3. A Sinterização

A sinterização é de extrema importância para produzir materiais biocerâmicos com a qualidade pretendida. Durante a sinterização, em primeiro lugar, a humidade, os carbonatos e todos os restantes componentes voláteis resultantes do processo de fabrico são removidos na forma de gases. A remoção destes gases promove a produção de materiais cerâmicos densos com subsequente redução do tamanho das amostras. Estas alterações são acompanhadas simultaneamente pelo aumento do tamanho do grão e uma redução da área de superfície específica. Por fim, ocorre a decomposição química dos ortofosfatos ácidos e a sua transformação noutros fosfatos. Um estudo extenso revelou uma correlação entre a temperatura e o tempo de sinterização e a densidade, a porosidade, o tamanho do grão, a composição química e a força mecânica do material sinterizado. O aquecimento abaixo de 1000°C resultou numa coalescência inicial sem que tenha existido ou com reduzida densificação. Foi demonstrado que o grau de densificação é dependente da temperatura.¹⁴

Muralithran²⁸ estudou os efeitos da temperatura de sinterização nas propriedades da hidroxiapatite utilizando temperaturas entre 1000°C e 1450°C, tendo determinado os 1250°C como temperatura óptima de sinterização. Ainda que possa não ter ocorrido em toda a sua extensão, a 1000°C já se observa densificação do material e por isso, ao longo deste trabalho, o aquecimento a temperaturas iguais ou superiores a 1000°C será designado de sinterização.

Os biocerâmicos de hidroxiapatite podem ser invadidos por tecido ósseo pelo que a macroporosidade (tamanho do poro > 100µm) é intencionalmente introduzida nos materiais biocerâmicos. Esta macroporosidade é normalmente formada pela libertação de vários componentes voláteis e por isso, a incorporação de substâncias porogénicas é a técnica mais popular para a criação de poros.¹⁴

1.5. Factores para o sucesso clínico dos substitutos ósseos

Tal como descrito anteriormente, para o sucesso clínico do substituto ósseo é necessário que a uma boa osteointegração esteja associada a resistência mecânica necessária para o desempenho de funções de suporte. Com o objectivo de potenciar as suas propriedades mecânicas e físico-químicas, podem combinar-se diferentes tipos de materiais que se complementam entre si. Por esta razão, muitos ortopedistas utilizam actualmente materiais compostos para reconstrução óssea, cujas propriedades são superiores às que resultariam da simples adição dos seus componentes.²

A hidroxiapatite e os materiais bioactivos de fosfato de cálcio têm atraído atenção considerável como materiais para uso clínico porque se ligam quimicamente ao osso quando implantados, resultando na formação de uma forte interface osso-implante.²⁹

O efeito das propriedades de hidroxiapatite na resposta do tecido ainda não foi completamente compreendido. É sabido da literatura que as respostas celulares dependem das características físicas e químicas do substrato e particularmente da sua composição química, cristalinidade, tamanho de partícula e estrutura da superfície. O tratamento de superfície da hidroxiapatite como a sinterização a várias temperaturas, resultando na variação das suas características químicas e cristalográficas, está descrito como influenciando a actividade osteoblástica. No entanto, as características de superfície necessárias para uma óptima osteointegração ainda não estão completamente esclarecidas.²⁹

As alterações na textura da superfície e na microtopografia podem influenciar a resposta celular a um implante. O papel importante da rugosidade da superfície do titânio e das suas ligas na resposta celular está documentada na literatura referindo que células como os osteoblastos aderem mais facilmente a uma superfície rugosa. Verificou-se também que a

síntese da matriz extracelular e subsequente mineralização se encontravam aumentadas nesta situação. No entanto, relativamente ao efeito da rugosidade e textura da superfície de hidroxiapatite na resposta celular, existe ainda pouca informação.²⁹

Apesar de permanecerem desconhecidos os mecanismos de osteoindução pelos quais os materiais exercem a sua acção, alguns factores físico-químicos críticos têm sido identificados: a macroporosidade (poros maiores que 100µm), as características da superfície e a microporosidade (poros menores que 10µm). Relativamente à sua composição, todos os biomateriais osteoindutivos apresentam macroporos, quer estejam inicialmente presentes como estruturas macroporosas ou sejam formados durante o processo de degradação dos biomateriais. A geometria do macroporo e a organização tridimensional é um critério importante sendo de referir que em várias cavidades criadas na hidroxiapatite, apenas algumas concavidades específicas demonstraram induzir a formação óssea.¹

A interconectividade dos poros influencia directamente a difusão dos nutrientes e dos gases para as células, bem como a remoção dos produtos resultantes do metabolismo.³

O aumento do tamanho do poro resulta na diminuição da área superficial e por isso tem de ser encontrado um equilíbrio. Quando o tamanho do poro é muito reduzido, as células podem provocar a oclusão do poro e não permitir a penetração celular. Poros na ordem dos 75µm a 100µm resultam no crescimento do tecido não mineralizado enquanto poros mais pequenos (abaixo de 10µm) são penetrados apenas por tecido fibroso. Além disso, como referido, a resistência mecânica diminui com o aumento do tamanho do poro, no entanto, os espaços livres nos biomateriais têm de permitir a acomodação de um número elevado de células e manter a força estrutural necessária.³

A degradação dos materiais cerâmicos de fosfato de cálcio em contacto com os líquidos biológicos, dá-se através de mecanismos de dissolução-reprecipitação. Ocorrem transferências iónicas da fase sólida para a fase aquosa pela hidratação da superfície de cálcio, fosfatos inorgânicos, e possíveis impurezas como carbonatos, flúor ou cloretos presentes no biomaterial. Em condições fisiológicas, este processo de dissolução é altamente dependente da natureza do substracto de fosfato de cálcio presente e da sua estabilidade termodinâmica.¹

Assim, as características de superfície dos materiais, quer a sua topografia, química ou energia livre de superfície desempenham um papel muito importante na adesão dos osteoblastos ao biomaterial. Numa primeira fase de interação entre a célula e o material, ocorre a adesão e espalhamento, sendo a qualidade desta fase fundamental uma vez que vai

influenciar a capacidade das células proliferarem e diferenciarem no contacto com o implante. É essencial para a sua eficácia que se estabeleça uma interface em que ocorre uma completa fusão entre a superfície do material e o tecido ósseo, sem que exista uma interface de tecido fibroso.³⁰

Neste trabalho, procurou-se promover a porosidade através da utilização de celulose microcristalina e cloreto de sódio de diferentes granulometrias. Seleccionaram-se os pellets como estrutura a fabricar devido às suas vantagens tecnológicas e a tecnologia de extrusão-esferonização devido às condições experimentais disponíveis.

1.6. Produção de pellets

O desenvolvimento e fabrico de pellets tem uma importância significativa na indústria farmacêutica.³¹ O tamanho dos pellets varia com as matérias-primas e tecnologias utilizadas mas usualmente encontra-se entre 500µm a 2mm,³¹⁻³³ no entanto outros tamanhos podem ser preparados dependendo das condições de processo utilizadas.³⁴ Deverão ter uma forma esférica porque os pellets esféricos têm boas propriedades de escoamento, são formas menos friáveis, podem ser misturados facilmente, apresentam uma distribuição estreita de tamanho de partículas, asseguram as melhores condições para o revestimento e um empacotamento mais uniforme.^{31,32}

Vários métodos são utilizados para a preparação de pellets, sendo mais comuns as técnicas de granulação com uma solução/suspensão, pelletização directa usando misturadores de corte elevado e granuladores de leito fluidizado convencionais ou rotativos e extrusão/esferonização. Esta última pode ser considerada a mais divulgada para o fabrico de pellets,³³ no entanto, o sucesso de qualquer das técnicas depende de relações complexas entre o equipamento, a formulação e as variáveis de processo.³⁵

1.6.1. Processo de extrusão-esferonização

A tecnologia de extrusão e esferonização, apesar de ter como produto grânulos esféricos, difere da granulação no que diz respeito ao tratamento dado à massa húmida de pós,

bem como quanto aos equipamentos utilizados mas também pelas características físicas apresentadas.³⁶ A extrusão-esferonização é uma tecnologia com múltiplos passos capaz de criar partículas esféricas de tamanho uniforme, sendo um processo que tem sido muito utilizado na indústria farmacêutica.³⁷

De trabalhos realizados, concluiu-se que os pellets produzidos pelo processo de extrusão-esferonização apresentam vantagens quando comparados com os pellets produzidos por outros processos, tais como, elevada esfericidade, melhor escoamento, tamanho de partícula mais preciso, distribuição estreita de tamanhos, maior resistência mecânica e menor friabilidade.³⁸ No entanto é um método trabalhoso e demorado³⁷ ainda que actualmente já tenham existido avanços tecnológicos decorrentes de trabalho de engenharia que o tornaram mais simples de aplicar. Este deve no entanto ser apenas utilizado quando o tamanho e características das partículas são críticos para o produto.³⁷ É também importante referir que, a tecnologia de extrusão-esferonização tem como vantagem o facto de permitir a produção de pellets com qualidade reprodutível.³⁹

Esta técnica, inventada em 1964 por Nakahara,⁴⁰ foi descrita inicialmente por Reynolds e por Conine e Hadley e envolve quatro etapas principais: a preparação da massa húmida (mistura uniforme de pós e malaxagem), a transformação da massa húmida em cilindros (extrusão), partir o extrudido e arredondar esses extrudidos em esferas (esferonização) e finalmente, a sua secagem^{32,33,36,41} resultando na formação de pellets esféricos com uma superfície homogénea. Estas fases estão intimamente ligadas umas às outras e a qualidade final dos pellets é dependente dos factores do processo.^{37,41} O primeiro passo do processo de extrusão-esferonização consiste na preparação da massa plástica. Diferentes tipos de granuladores são utilizados para realizar a mistura de pós e do líquido de granulação. Durante a granulação a evaporação da fase líquida deve ser minimizada. Isto pode ser particularmente difícil com os misturadores de corte elevado porque eles introduzem uma grande quantidade de energia na massa que é parcialmente transformada em calor. Este aumento na temperatura induz a evaporação do líquido de granulação podendo influenciar a massa húmida na extrusão. Um factor importante na fase de granulação é a distribuição homogénea da fase líquida na massa granulada. Alguns autores referem que a água se distribui mais uniformemente através da massa quando esta é mantida em sacos selados de polietileno por 12h.^{32,36} O líquido de granulação serve como agente aglutinante para formar grânulos assim como lubrificante durante a operação de extrusão.³⁴

É importante referir que nem todas as massas húmidas podem ser preparadas por este processo. As massas húmidas têm de ter uma consistência adequada, ou seja têm de ter um comportamento reológico óptimo. A mistura inicial para formar uma massa húmida uniforme não é contudo motivo de preocupação se a extrusão envolve o uso de matrizes longas, uma vez que esta extrusão envolve forças relativamente elevadas.³⁹

O segundo passo do processo é a extrusão que consiste na formação de cilindros a partir da massa húmida. Existem 4 tipos principais de extrusores: parafuso sem-fim, rede, rolos e pistão.

Salienta-se o último, que consiste num pistão que empurra a massa húmida através de um orifício situado no fim de um canal³² e é o extrusor primeiramente utilizado em investigação e como ferramenta analítica.^{34,37}

A extrusão consiste na aplicação de uma força sobre uma massa até que esta flua através de um orifício ou abertura de dimensão definida. Porque a geometria transversal é definida pelo orifício, a comprimento do extrudido é usualmente a única dimensão variável. Esta pode variar, dependendo das características do material a ser extrudido, do método de extrusão e da manipulação das partículas após extrusão.^{39 34,36}

Tendo em conta que no processo de extrusão, a massa tem de ser capaz de comprimir e fluir através de um orifício e que adicionalmente a isto, devem formar-se cilindros⁴², é importante avaliar os factores que podem ter influência nesta etapa do processo.

A extrusão de pós húmidos envolve dois processos consecutivos: em primeiro lugar a compressão da massa até um ponto em que o material começa a fluir através de um orifício e depois a extrusão efectiva da massa. Quer a compressão quer a extrusão, requerem que as partículas sejam capazes de interagir umas com as outras. Assim, o comportamento da massa na extrusão está relacionado com as interacções fundamentais entre as partículas e no modo como estas interacções se alteram quando é aplicada uma força sobre a massa.⁴²

Vários estudos sobre as propriedades mecânicas dos compactos dos pós húmidos quando sofrem compressão demonstraram a importância da porosidade e do grau de saturação do líquido no aglomerado para a sua resistência e deformabilidade. Além disso, as propriedades do extrudido formado no que se refere à porosidade e o grau de saturação do líquido vão ser críticos para a sua capacidade de se quebrarem e deformarem durante a esferonização.⁴²

O extrusor de pistão tem sido utilizado para caracterizar o deslocamento das massas húmidas através da matriz podendo ser dividido em três fases: compressão, em que o material é consolidado sob uma pressão aquém da observada em extrusão; deslocamento em estado estacionário em que é requerida uma pressão constante para manter um movimento constante; e deslocamento forçado, em que se observa um aumento contínuo da força para manter o movimento. A mudança do estado estacionário para o forçado é causado pela passagem de fluxo laminar a turbulento.³⁷

O *output* total do extrudido é maioritariamente determinado pela velocidade de extrusão. Deve ser a maior possível por razões económicas, mas muitos autores referem que um aumento na velocidade de extrusão influencia a qualidade final do extrudido, logo do pellet. Harrison et al. demonstraram que defeitos de superfície como a rugosidade e o “*sharkskin*” se tornam mais pronunciados com o aumento da velocidade de extrusão. Estes defeitos de superfície do extrudido conduzem a pellets de menor qualidade porque o extrudido vai partir de forma desigual durante as primeiras fases da esferonização resultando numa grande quantidade de finos e uma distribuição de tamanho de partículas muito alargada.³²

Também as características da fieira são importantes no que se refere aos parâmetros que a caracterizam (espessura e diâmetro da perfuração). A alteração de qualquer um destes parâmetros influencia a qualidade do extrudido e conseqüentemente dos pellets. O diâmetro da fieira determina o tamanho dos pellets, uma vez que um diâmetro maior irá produzir extrudidos de maiores dimensões quando processados nas mesmas condições, logo pellets de maiores dimensões.³² A relação entre o diâmetro da fieira e o diâmetro médio final dos pellets foi reportada como sendo única, no entanto o tamanho mediano do pellet também é considerado como dependente da formulação.³⁴

O controlo da temperatura durante a extrusão é um factor importante, não apenas quando a formulação é termolábil, mas também do ponto de vista da importância do teor em água. Um aumento de temperatura durante a extrusão pode alterar dramaticamente o conteúdo em humidade do granulado devido à evaporação do líquido de granulação. Isto pode levar a diferenças na qualidade do extrudido produzido desde o princípio do lote até ao fim do mesmo. É ainda de referir que a evaporação de água durante a extrusão de formulações com celulose microcristalina (Avicel PH101) é possível porque uma parte da água está disponível como água livre.³²

Uma das abordagens para descrever as propriedades mecânicas dos pós durante a extrusão é baseada na medida da força necessária para extrudir uma massa de pó húmida num extrusor de pistão em diferentes condições variando, por exemplo, o tamanho da fieira ou as velocidades de extrusão.⁴²

Através deste procedimento, as propriedades de escoamento dos pós húmidos podem ser avaliadas quantitativamente e utilizadas para prever o desempenho do material durante a produção de extrudidos e mais tarde na esferonização.⁴² Em geral, a extrusão é o factor que mais contribui para o tamanho final dos pellets.³⁴

Durante a terceira fase do processo, os cilindros são colocados no prato rotativo do esferonizador chamado prato de fricção, onde o extrudido é partido em cilindros de menor tamanho e comprimento igual ao seu diâmetro. Segundo Rowe, esses cilindros plásticos são arredondados devido a forças friccionais. No processo de esferonização podem ser distinguidas várias fases dependendo da forma das partículas, isto é, os cilindros passam a cilindros com as pontas arredondadas, estes são transformados em partículas elípticas e finalmente, passam a partículas esféricas. Outros autores (Baert e Remon) sugeriram outro mecanismo para a formação do pellet. Neste mecanismo a torção do cilindro ocorre após a formação dos cilindros com as pontas arredondadas, resultando finalmente na quebra do cilindro em duas partes distintas. Ambas as partes têm uma parte redonda e uma lisa. Devido às forças de fricção e rotação envolvidas na esferonização as extremidades do lado liso formam uma cavidade que é observada em alguns pellets.³²

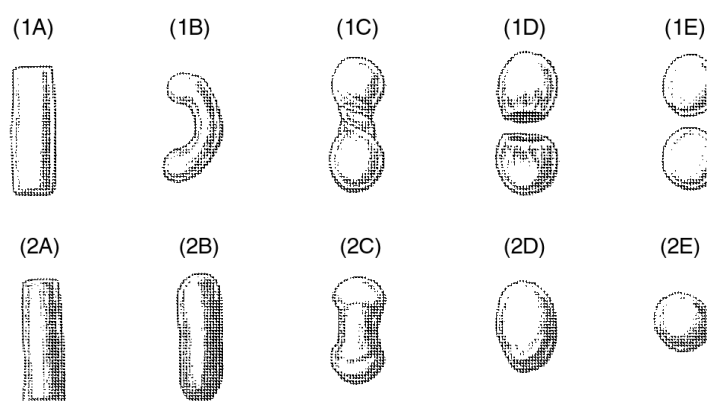


Figura 1.2. Representação dos dois modelos propostos para descrever o mecanismo de esferonização.³⁷

1A – 1E – Modelo proposto por Baert e Remon
 2A – 2E – Modelo proposto por Rowe

O prato de fricção tem uma superfície com ranhuras para aumentar as forças de fricção,³² sendo importante considerar como factores relevantes para o processo de esferonização a velocidade e a carga do equipamento, uma vez que estas devem permitir uma interacção adequada entre partícula/prato do esferonizador e entre partícula/partícula. O prato é responsável por ceder a energia necessária para produzir pellets e controlar a extensão do crescimento do pellet.³⁴ Sobrecarregar o prato vai requerer um maior tempo de processo, enquanto que a existência de uma carga inferior reduz a eficiência. Velocidades baixas não permitem as interacções necessárias para a obtenção de partículas redondas.^{32,43}

Alguns estudos demonstraram que o rendimento de esferonização é maior utilizando o prato radial no entanto, ambos os pratos originam um produto de qualidade aceitável.³⁷

A resistência ao esmagamento, a porosidade, as densidades do granel areada e batidas, a friabilidade, a velocidade de escoamento e a estrutura da superfície dos pellets são também influenciados pela alteração da velocidade de esferonização. De acordo com Rowe, a velocidade de esferonização deve ser otimizada para obter a densificação desejada. Velocidades de esferonização baixas não permitem densificação suficiente para obter esferas perfeitas, em oposição a um processo de esferonização a uma velocidade elevada que podia conduzir à aglomeração dos pellets individuais.³²

O quarto e último passo do processo é a secagem dos pellets. Os pellets podem ser secos à temperatura ambiente ou a elevadas temperaturas, por exemplo, num leito fluidizado. Alguns autores referem a utilização de microondas no final do processo de fabrico dos pellets,³² no entanto, a sua superfície era mais rugosa, os pellets eram mais porosos e apresentavam uma menor resistência ao esmagamento.³²

A produção de pellets com boas características físicas depende das propriedades dos materiais utilizados, sendo por isso dependente da formulação. Uma das variáveis mais críticas é a identificação da quantidade de água mais adequada a considerar na formulação, uma vez que, não só influenciará o tamanho da partícula, como também a sua estrutura.⁴¹

A granulometria das matérias-primas utilizadas tem também uma influência profunda nas características da massa húmida e no tamanho e arredondamento dos pellets resultantes.³²

As propriedades mecânicas dos pellets podem ser relacionadas com a sua porosidade – pellets com uma reduzida porosidade são, em princípio, mais resistentes do que os que têm uma elevada porosidade.⁴¹

Apesar de durante vários anos, diversos derivados da celulose terem sido propostos como alternativas à celulose microcristalina, nomeadamente a hidroxipropilmetilcelulose ou a hidroxietilcelulose, e de terem sido estudados outros materiais alternativos como ciclodextrinas, pectina e amidos, o excipiente mais utilizado na preparação de pellets é a celulose microcristalina.⁴⁴ Esta é largamente utilizada porque confere às misturas propriedades reológicas adequadas à extrusão e à esferonização. Se quantidades significativas de celulose microcristalina forem substituídas por outros componentes, as propriedades reológicas passam a estar mais dependentes da quantidade exacta de água adicionada, tornando o processo mais complicado e tornando mais difícil o processo de controlo do tamanho e da forma do pellet.⁴⁴ De facto, verifica-se que quase todas as misturas possuem celulose microcristalina como excipiente sendo em muitos casos necessário 50% de excipiente.³¹

A influência da celulose microcristalina na distribuição de água na massa húmida durante o processo de extrusão é muito crítica para o sucesso da esferonização que é realizado de seguida.³¹ Diferentes marcas de celulose microcristalina não podem ser utilizadas sem que se faça o ajuste da quantidade de água na massa húmida.³¹ A celulose microcristalina é capaz de reter grandes quantidades de água livre na forma húmida, podendo ser acompanhada de uma maior ou menor redução de volume quando seca.³¹

A humidade que é necessária para dar à massa a plasticidade necessária para que possa ser extrudida e deformada posteriormente, é um parâmetro extremamente importante no processo de extrusão-esferonização. Foi demonstrado que o teor de humidade pode variar entre um valor mínimo e um valor máximo e ainda assim permitir fabricar pellets com uma qualidade aceitável. Se a quantidade de água é inferior ao limite inferior, irá ser formado muito pó na esferonização resultando numa grande quantidade de partículas finas. Se a quantidade de água for superior ao limite superior existe uma sobremolhagem da massa e a aglomeração dos pellets individuais durante a esferonização devido ao excesso de água à superfície dos mesmos. As propriedades reológicas da massa húmida são importantes para que sejam atingidas boas propriedades de extrusão. Elbers et al. provou que medindo a plasticidade da mistura após malaxagem com diferentes quantidades de água pode ser determinada a quantidade de água óptima para uma composição específica.^{31,32}

A avaliação dos pellets passa pela verificação do tamanho e distribuição do tamanho, da densidade aparente e real, da esfericidade, da área superficial externa, da morfologia superficial, das propriedades de empacotamento, da resistência à fractura e da friabilidade.⁴⁵

O tamanho dos pellets pode ser determinado utilizando uma variedade de parâmetros: a distribuição do tamanho das partículas, o diâmetro médio, o diâmetro médio geométrico, a interquartilha, a largura média da partícula e o comprimento médio. O tamanho da partícula pode ser determinado por tamisação ou através de uma técnica mais avançada de análise de imagem por computador.³² No entanto, a tamisação, pela sua simplicidade e rapidez, é um dos métodos mais utilizados.³⁴

Relativamente à esfericidade que é uma das características mais importantes dos pellets, existem várias técnicas para a sua avaliação como por exemplo, a inspecção visual, a avaliação da razão entre o maior e menor diâmetro do pellet e o recurso a factores de forma calculados por meio da área projectada do pellet e o seu perímetro medido por computador. Uma indicação indirecta da esfericidade de um pellet é dada pela determinação do ângulo de repouso.³²

A friabilidade, ou seja a tendência dos pellets para descamarem durante a sua manipulação resultando na formação de pó, é avaliada rodando os pellets num friabilómetro ou através da agitação dos pellets num misturador turbulento por um período de tempo fixo de tempo. Em ambas as técnicas utilizam-se esferas de vidro para aumentar o stress mecânico dos pellets.³²

A resistência ao esmagamento do pellet pode ser correlacionada com a friabilidade do mesmo ou pode ser medida directamente. A sua determinação é realizada através da medição da força necessária para quebrar um pellet com diâmetro conhecido. A força necessária aumenta com o aumento do diâmetro³², pelo que a resistência tensil normaliza esta grandeza.

Examinar a microestrutura da superfície do pellet por microscopia electrónica de varrimento também é importante na avaliação da qualidade do pellet.³²

A porosidade dos pellets pode ser determinada qualitativamente por microscopia electrónica de varrimento e quantitativamente por porosimetria de mercúrio.³⁴

Tal como referido anteriormente, a porosidade é a medida dos espaços vazios existentes num material e pode ser determinada por diversas técnicas: adsorção gasosa, deslocamento de um líquido, porosimetria ou por cálculo matemático a partir das densidades. A determinação da porosidade de um material sólido pode fornecer informações relevantes

sobre a desagregação, dissolução, adsorção e difusão de substâncias activas. No que se refere especificamente aos pellets, a determinação da porosidade é um factor importante. Se forem pellets revestidos por película, os poros e as fissuras superficiais podem influenciar a fixação do material de revestimento e ocasionar imperfeições e irregularidades.⁴⁵

1.7. Inclusão de uma substância activa num biomaterial

Num contexto clínico, é fundamental que se consiga maximizar o acesso do fármaco a locais específicos do osso e ser capaz de controlar a sua libertação, de forma a manter a concentração desejada por períodos de tempo longos sem atingir níveis tóxicos ou sem que se atinjam níveis abaixo dos níveis terapêuticos eficazes. No tratamento farmacológico de doenças ósseas, alguns materiais inorgânicos podem ter um papel importante. De facto, materiais bioactivos baseados em fosfato de cálcio podem ter um valor acrescentado como transportadores de fármacos para o tecido ósseo.²⁷ Neste caso, os poros deverão ser pequenos ($\approx 10\mu\text{m}$ de diâmetro) para manter o fármaco no reservatório cerâmico.⁶

Pelo controlo do tamanho dos poros e das ligações entre eles, é possível ajustar a velocidade de libertação do fármaco. Alguns trabalhos mostraram que, através de um processo de granulação seguida de calcinação se obtiveram pellets de fosfato de cálcio microporosos e que estes incorporaram ibuprofeno.⁶

A escolha do ibuprofeno para pellets de fosfato de cálcio está directamente relacionada com o facto de este ser um fármaco anti-inflamatório, já associado a implantes ósseos, que pode contribuir localmente para o tratamento da inflamação pós-cirúrgica. Além disso, é um fármaco largamente estudado como fármaco modelo devido à sua curta semi-vida biológica (2 horas).^{6,46}

A utilização de implantes com forma esférica permite um melhor enchimento dos espaços presentes no tecido ósseo comparativamente com os implantes com forma de blocos, mantendo uma macroporosidade regular (espaços intergranulares $\approx 180\mu\text{m}$) necessária ao crescimento ósseo.⁶

Estudos realizados com biomateriais contendo fosfato de cálcio na forma de comprimidos e nos quais foi incorporada uma solução com um fármaco ($100\mu\text{l}$ - $200\mu\text{l}$), após a absorção da solução na estrutura porosa e evaporação do solvente, permitiram confirmar a

absorção do fármaco na estrutura porosa do comprimido.⁴⁷ O mesmo poderia acontecer com pellets de hidroxiapatite.

A hidroxiapatite é um biocerâmico largamente utilizado como implante e largamente estudado na sua forma porosa. A elevada área de superfície permite um aumento da quantidade de fármaco a ser adsorvido na superfície para uma libertação local.⁴⁸

Neste trabalho seleccionou-se o ibuprofeno como fármaco modelo pelas suas propriedades anti-inflamatórias, o que nestes sistemas pode ter um papel importante por poder atenuar a inflamação que surge como resposta ao processo de implantação.⁴⁶

2. OBJECTIVO DO ESTUDO

O trabalho desenvolvido teve como objectivos:

- Produção de pellets à base de hidroxiapatite por extrusão-esferonização com diferentes tamanhos e porosidades;
- Comparação entre os pellets não sinterizados e sinterizados;
- Avaliação da capacidade de inclusão de um fármaco modelo (ibuprofeno) na estrutura dos pellets sinterizados;
- Caracterização dos pellets produzidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Materiais*

Para a preparação dos pellets no decorrer deste trabalho foram necessárias várias matérias-primas que se descrevem resumidamente na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Matérias-primas utilizadas no estudo.

Material	Fabricante / Fornecedor
Hidroxiapatite (HA)	Sigma-Aldrich, Alemanha
Hidroxiapatite modificada (HAM)	Medmat innovation
	Avicel PH 101
Celulose microcristalina (CMC)	Avicel PH 105
	Avicel PH 200
Lactose (Granulac) (Lac)	Meggle, Alemanha
Cloreto de sódio (NaCl)	Merck, Alemanha
Água desmineralizada	Faculdade de Farmácia de Lisboa
Ibuprofeno	Hubei Granules Biocause Pharmaceuticals Ltd, China
Solução de hidróxido de sódio 1 M e 0,2 M	Carlo Erba, Itália
Di-hidrogenofosfato de potássio	Panreac, Espanha

3.2. *Métodos*

3.2.1. Estudos preliminares

Foram realizados estudos preliminares para a avaliação do efeito de determinadas variáveis de processo e posterior identificação das formulações e condições a utilizar. As condições experimentais encontram-se descritas na Tabela 3.2. e descrevem-se de seguida.

A celulose microcristalina e a lactose foram misturadas num misturador planetário (Kenwood chef, Reino Unido) durante 10 minutos. De seguida, a água foi adicionada lentamente sob agitação durante mais 10 minutos, permitindo a produção de uma massa homogénea. Para uma completa homogeneização e hidratação dos materiais, a massa foi deixada em repouso durante 24 horas em saco selado de polietileno.

A extrusão das massas preparadas foi realizada num extrusor de pistão acoplado a uma prensa mecânica (Lloyds Instruments, Reino Unido) com uma célula de carga de 50 kN. O extrusor permite o uso de feiras com espessura (L) e diâmetro (D) variáveis. Assim, foram utilizadas feiras com relações $L/D=10$ e $L/D=4$.

Tabela 3.2. Condições experimentais consideradas para identificar os limites de processabilidade dos materiais em pellets.

Designação	CMC (20 µm) (%)*	CMC (50 µm) (%)*	CMC (180 µm) (%)*	Lactose (%)*	Água (g)**	Velocidade (mm/min)
<u>Tamanho de partícula da CMC (fieira de diâmetro 1 mm)</u>						
C20_V2_L/D10	50			50	60	200
C50_V2_L/D10		50		50	60	200
C180_V2_L/D10			50	50	60	200
<u>Quantidade de água (fieira de diâmetro 1 mm)</u>						
A55_C20_V2_L/D10	50			50	55	200
A60_C20_V2_L/D10	50			50	60	200
A62,5_C20_V2_L/D10	50			50	62,5	200
A65_C20_V2_L/D10	50			50	65	200
A67,5_C20_V2_L/D10	50			50	67,5	200
A55_C50_V2_L/D10		50		50	55	200
A60_C50_V2_L/D10		50		50	60	200
A62,5_C50_V2_L/D10		50		50	62,5	200
A67,5_C50_V2_L/D10		50		50	67,5	200
A65_C50_V2_L/D10		50		50	65	200
A55_C180_V2_L/D10			50	50	55	200
A60_C180_V2_L/D10			50	50	60	200
A62,5_C180_V2_L/D10			50	50	62,5	200
A65_C180_V2_L/D10			50	50	65	200
A67,5_C180_V2_L/D10			50	50	67,5	200
<u>Relação L/D=4 (fieira de diâmetro 1 mm)</u>						
C20_V2_L/D4	50			50	57,5	200
C50_V2_L/D4		50		50	57,5	200
C180_V2_L/D4			50	50	57,5	200
<u>Velocidade de extrusão (fieira de diâmetro 1 mm)</u>						
C20_V4_L/D4	50			50	55	400
C50_V4_L/D4		50		50	55	400
C180_V4_L/D4			50	50	55	400
<u>Processabilidade com feiras de maior diâmetro (feiras de diâmetro 3, 6 e 9 mm)</u>						
A50_C20_V4_L/D4	50			50	50	400
A50_C50_V4_L/D4		50		50	50	400
A50_C180_V4_L/D4			50	50	50	400
A55_C20_V4_L/D4	50			50	55	400
A55_C50_V4_L/D4		50		50	55	400
A55_C180_V4_L/D4			50	50	55	400
A50_C20_V2_L/D4	50			50	50	200
A50_C50_V2_L/D4		50		50	50	200
A50_C180_V2_L/D4			50	50	50	200
A55_C20_V2_L/D4	50			50	55	200
A55_C50_V2_L/D4		50		50	55	200
A55_C180_V2_L/D4			50	50	55	200

* Percentagem (m/m) do componente sólido na mistura

** Quantidade de água por 100 g da fração sólida da mistura

As experiências foram codificadas tendo em consideração as variáveis em estudo. Por exemplo, a experiência A55_C20_V2_L/D10 significa que foram utilizados 55g de água na mistura (A55), foi utilizado Avicel PH105 (CMC com tamanho de partícula 20 µm) (C20), a extrusão foi realizada a uma velocidade de 200 mm/min (V2) e a relação entre o comprimento e o diâmetro da fieira foi de 10 (L/D10).

Ao longo deste trabalho e para distinguir as fieiras utilizadas, estas serão também referenciadas pelo seu diâmetro (1 mm, 3 mm, 6 mm e 9 mm).

A velocidade do pistão durante a extrusão nestes estudos preliminares variou entre 200mm/min e 400 mm/min.

Os extrudidos produzidos foram esferonizados num esferonizador (Caleva 230, Reino Unido) utilizando um prato com estrias radiais a 1000 rpm para as misturas correspondentes aos pellets fabricados com as fieiras de 1 e 3 mm de diâmetro e um prato com estrias cruzadas a 500 rpm para as misturas correspondentes a pellets fabricados com fieiras de 6 e 9 mm de diâmetro. Para todos os extrudidos produzidos o processo de esferonização foi realizado durante 10 minutos.

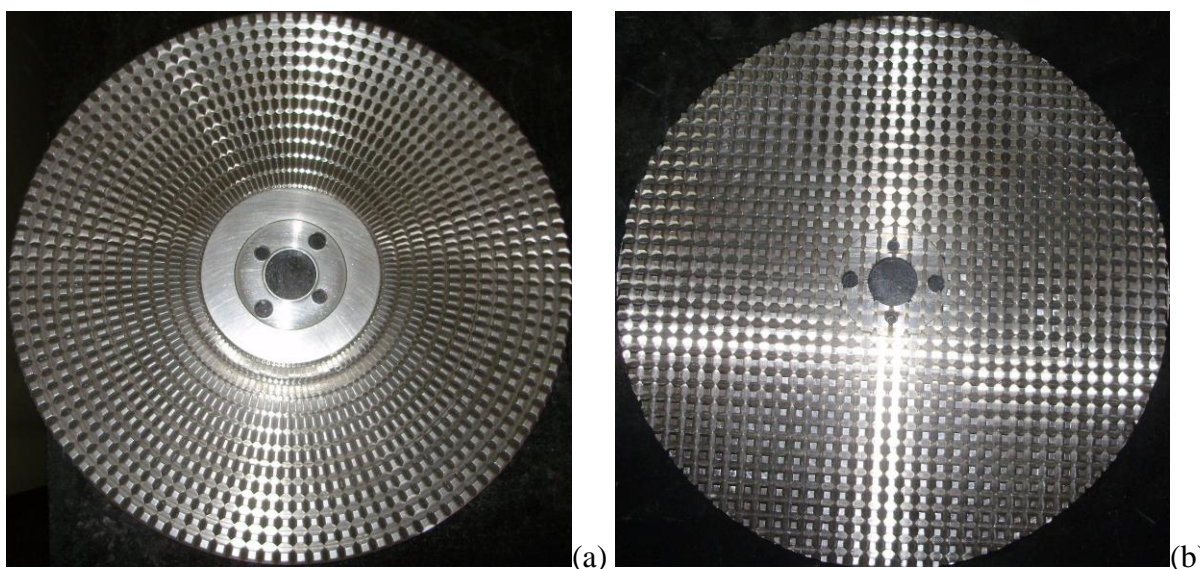


Figura 3.1. Pratos de esferonização utilizados neste trabalho

- a) prato de estrias radiais
- b) prato de estrias cruzadas

Os pellets foram secos num leito fluidizado (Aeromatic Fielder, Suíça) durante 30 minutos a 60°C, no caso dos pellets fabricados com as fieiras de 1 e 3 mm de diâmetro e, durante 1 hora à mesma temperatura no caso dos pellets fabricados com as fieiras de 6 e 9 mm de diâmetro.

Seguindo o mesmo processo de fabrico e, para dar seguimento a estes estudos preliminares, foram fabricados pellets com hidróxiapatite modificada (HAM) em total substituição da lactose, com um ajuste da quantidade de água a utilizar. As velocidades de

extrusão nestes estudos foram de 100, 200 e 400 mm/min. As condições experimentais são apresentadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Condições experimentais consideradas no estudo do efeito da substituição da lactose pela hidroxiapatite modificada na qualidade dos pellets produzidos.

Designação	CMC (20 µm) (%)*	CMC (50 µm) (%)*	CMC (180 µm) (%)*	Hidroxiapatite modificada (%)*	Água (g)**	Velocidade (mm/min)	Diâmetro da feira (mm)
<i>Tamanho de partícula da CMC</i>							
C20_HA[50]_V4_L/D4_1	50			50	75	400	1
C50_HA[50]_V4_L/D4_1		50		50	75	400	1
C180_HA[50]_V4_L/D4_1			50	50	75	400	1
<i>Processabilidade com feiras de maior diâmetro</i>							
C50_HA[50]_V2_L/D4_3		50		50	82,5	200	3
C50_HA[50]_V2_L/D4_6		50		50	82,5	200	6
C50_HA[50]_V2_L/D4_9		50		50	82,5	200	9
C180_HA[50]_V2_L/D4_3			50	50	82,5	200	3
C180_HA[50]_V2_L/D4_6			50	50	82,5	200	6
C180_HA[50]_V2_L/D4_9			50	50	82,5	200	9
<i>Proporção dos componentes da formulação utilizando feiras de vários diâmetros</i>							
C20_HA[20]_V2_L/D4_1	80			20	80	200	1
C50_HA[20]_V2_L/D4_1		80		20	80	200	1
C50_HA[20]_V1_L/D4_3		80		20	100	100	3
C50_HA[20]_V1_L/D4_6		80		20	100	100	6
C50_HA[20]_V1_L/D4_9		80		20	100	100	9
C180_HA[20]_V2_L/D4_1			80	20	80	200	1
C180_HA[20]_V1_L/D4_3			80	20	100	100	3
C180_HA[20]_V1_L/D4_6			80	20	100	100	6
C180_HA[20]_V1_L/D4_9			80	20	100	100	9

* Percentagem (m/m) do componente sólido na mistura

** Quantidade de água por 100 g da fracção sólida da mistura

As experiências foram codificadas tendo em consideração as variáveis em estudo. Assim, a experiência C50_HA[50]_V2_L/D4_3 significa que foi utilizado Avicel PH101 (CMC com tamanho de partícula 50 µm) (C50), a proporção de hidroxiapatite utilizada foi de 50% (m/m) (HA[50]), a extrusão foi realizada a uma velocidade de 200 mm/min (V2), a relação entre o comprimento e o diâmetro da feira foi de 4 (L/D4) e o diâmetro da feira foi de 3 mm (3).

Após secagem, os pellets correspondentes à avaliação do efeito do tamanho da partícula da CMC foram aquecidos a 600°C e sinterizados a 1000°C e a 1300°C e posteriormente caracterizados quanto ao tamanho da partícula, densidades e resistência ao esmagamento.

Mediante os resultados obtidos, foram seleccionados alguns pellets para observação microscópica em microscópio electrónico de varrimento (JOEL JSM 5200LV, Japão), que permitiu uma melhor caracterização das suas morfologias.

Os pellets das restantes formulações (as correspondentes à avaliação da processabilidade com fieiras de maior diâmetro e as correspondentes à avaliação do efeito da proporção dos componentes da formulação utilizando fieiras de vários diâmetros) foram sinterizados a 1300°C. O aquecimento da mufla (Termolab, Portugal) decorreu com o aquecimento das amostras até 1300°C (a 0,5°C/min), manutenção desta temperatura por 1 hora e arrefecimento natural. Estes pellets foram avaliados quanto ao tamanho de partícula.

3.2.2. Produção de pellets à base de hidroxiapatite

Após a realização dos estudos preliminares descritos anteriormente foram definidas condições experimentais para produzir os pellets finais à base de hidroxiapatite. Estas formulações, que incluem além da hidroxiapatite e da celulose microcristalina (50µm), cloreto de sódio com diferentes granulometrias (como elemento adjuvante para a criação de poros de diferentes dimensões na estrutura dos pellets), encontram-se descritas na Tabela 3.4.

As diferentes granulometrias foram obtidas por pulverização do cloreto de sódio em almofariz de vidro e posterior separação das fracções desejadas por tamisação.

O processo de fabrico destes pellets foi o mesmo daquele considerado nos estudos preliminares sendo utilizadas as velocidades de extrusão de 200 mm/min para a fieira de 1 mm de diâmetro e de 100 mm/min para as fieiras de 3, 6 e 9 mm de diâmetro. Após fabrico, as fracções representativas dos pellets fabricados foram divididas em 3 fracções: a fracção 1 foi aquecida a 650°C em estufa, foi arrefecida e foi depois sinterizada a 1000°C em mufla (Kittec, Alemanha); a fracção 2 foi guardada como controlo e a fracção 3 foi aquecida em mufla (Termolab, Portugal) até aos 650°C (para remoção das matérias-primas orgânicas) com velocidade de aquecimento de 0,5°C/min, foi mantida 90 min a 650°C e depois, a uma velocidade de 4°C/min foi aquecida até 850°C onde se manteve durante 30 min (assegurando a fusão completa do cloreto de sódio – ponto de fusão: 804°C). Após este período de estabilidade, foi sinterizada a 1200°C a uma velocidade de aquecimento de 4°C/min onde

estabilizou durante 60 min. A descida de temperatura até aos 30°C foi realizada a uma velocidade de 4°C /min (Figura 3.2).

Tabela 3.4. Condições experimentais consideradas na produção de pellets à base de hidroxiapatite.

Designação	CMC (50 µm) (%)*	Hidroxiapatite (%)*	NaCl		Água (g)**	Diâmetro fieira (mm) L/D=4
			(%)*	(µm)		
F1_S15_A	38,1	47,6	14,3	125-355	52,5	1
F3_S15_A					52,5	3
F6_S15_A					55	6
F9_S15_A					55	9
F1_S15_B	38,1	47,6	14,3	500-710	51	1
F3_S15_B					51	3
F6_S15_B					51	6
F9_S15_B					51	9
F6_S15_C	38,1	47,6	14,3	2000 - 4000	54	6
F9_S15_C					54	9
F1_S40_A	14,3	47,6	38,1	125-355	35,5	1
F3_S40_A					35,5	3
F6_S40_A					35,5	6
F9_S40_A					35,5	9
F3_S40_B	14,3	47,6	38,1	500-710	40	3
F6_S40_B					40	6
F9_S40_B					40	9
F6_S40_C	14,3	47,6	38,1	2000 - 4000	45,5	6
F9_S40_C					45,5	9

* Percentagem (m/m) do componente sólido na mistura

** Quantidade de água por 100 g da fracção sólida da mistura

As experiências foram codificadas tendo em consideração as variáveis em estudo. Por exemplo, a experiência F1_S15_A significa que foi utilizada a fieira de 1 mm de diâmetro (F1), a proporção de cloreto de sódio utilizada foi de 14,3% (m/m) (S15) e o tamanho de partícula do cloreto de sódio foi de 125 – 355 µm (A).

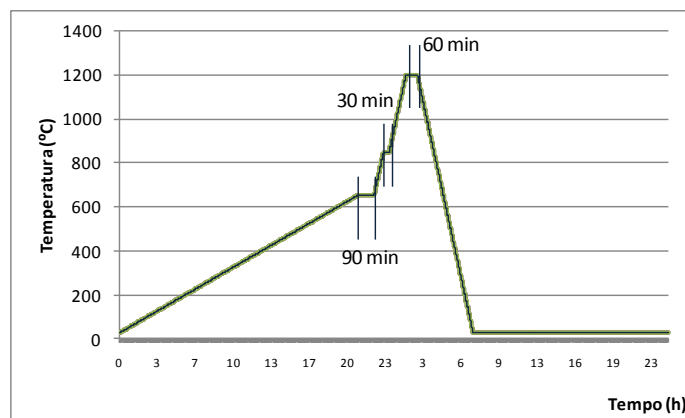


Figura 3.2. Representação da relação entre a temperatura e o tempo no processo de sinterização.

3.2.3. Avaliação da capacidade de inclusão de um fármaco modelo (ibuprofeno) na estrutura dos pellets produzidos

3.2.3.1. Preparação da solução de ibuprofeno

Foi preparada à temperatura ambiente uma solução de ibuprofeno (80 mg/ml) com recurso a uma solução de hidróxido de sódio 1M (pH=12) para aumentar a solubilidade do fármaco (pKa=4,8).

3.2.3.2. Inclusão do fármaco modelo (ibuprofeno) na estrutura dos pellets

Os pellets foram mergulhados na solução preparada em 3.2.3.1. durante 15 minutos sob vácuo (-0,7 bar) dentro de um exsiccador e foram posteriormente secos em estufa estacionária a 60°C durante 48 horas (Mettert, Alemanha).

3.2.4. Caracterização dos pellets produzidos

3.2.4.1. Tamanho de partícula

A distribuição do tamanho da partícula para pellets fabricados com feiras de 1 mm e 3 mm de diâmetro foi determinada com a utilização de tamises.

A determinação do tamanho da partícula para pellets fabricados com feiras de 6 mm e 9 mm de diâmetro foi realizada pela determinação individual com uma craveira ($n \geq 50$) pois o seu tamanho era muito superior ao da malha dos tamises disponíveis.

3.2.4.2. Avaliação da estrutura interna

Os pellets produzidos foram observados por microscopia electrónica de varrimento (JOEL JSM 5200LV, Japão), após corte dos pellets em plano equatorial e revestimento com ouro (*sputtering*) (JEOL JFC1200, Japão). A avaliação das amostras de pellets incidiu na observação da sua superfície externa e da superfície obtida após o corte.

3.2.4.3. Densidade

A densidade dos pós e dos pellets foi determinada por picnometria (Hélio, Accupyc, Micromeritics, EUA, $n=3$).

3.2.4.4. Porosidade

A porosidade dos pellets foi calculada a partir das densidades obtidas para os pós das matérias-primas e para os pellets produzidos, de acordo com a equação 1:

$$\varepsilon = \left[1 - \frac{\rho_{medida}}{\rho_{calculada}} \right] \times 100$$

equação 1

em que ε é a porosidade, ρ_{medida} é a densidade medida e $\rho_{calculada}$ é a densidade após cálculo por ponderação das densidades das matérias-primas com as proporções em que estão presentes nos pellets.

Nos pellets sinterizados, a porosidade foi determinada utilizando a equação 1, mas a *p*calculada utilizada foi a densidade obtida após medição da densidade do pó obtido por pulverização dos pellets em almofariz, uma vez que durante o processo de sinterização as matérias primas orgânicas foram volatilizadas.

3.2.4.5. Doseamento

Para as formulações F6_S15_A, F9_S15_A, F1_S15_B, F3_S15_B, F6_S15_B, F6_S15_C, F9_S15_C, F6_S40_A, F9_S40_A, F6_S40_B, F6_S40_C e F9_S40_C, uma quantidade conhecida de pellets foi pulverizada em almofariz de vidro e colocada num balão volumétrico tendo-se adicionado 50 ml de solução tampão fosfato (pH=7.2, Farmacopeia Europeia 7.0)⁴⁹. Após 48 horas, a solução foi filtrada e, no filtrado foi quantificado o ibuprofeno presente por espectrofotometria de UV/Vis (Hitachi U-1900, Japão, $\lambda = 264$ nm, n=3).

O valor de doseamento foi encontrado efectuando a média dos valores obtidos pela aplicação da equação da recta de calibração, produzida previamente. Esta recta foi obtida após a preparação de triplicados de soluções de concentração conhecida de ibuprofeno em tampão fosfato⁴⁹ (pH=7.2) e lidas em espectrofotómetro UV/Vis (Hitachi U-1900, Japão) a 264 nm, e encontra-se representada no Anexo 9.1.

3.2.4.6. Quantificação da libertação do fármaco dos pellets

A quantificação da libertação do ibuprofeno foi feita através do ensaio de dissolução para os pellets F6_S15_A, F9_S15_A, F1_S15_B, F3_S15_B, F6_S15_B, F6_S15_C, F9_S15_C, F6_S40_A, F9_S40_A, F6_S40_B, F6_S40_C e F9_S40_C (n=3), utilizando como meio de dissolução 900 ml de tampão fosfato⁴⁹ (pH=7,2 a 37°C). O ensaio de dissolução foi realizado em aparelho de dissolução (Sotax AT7, Sotax, Suíça), método de pás (2.9.3., Farmacopeia Europeia 7.0)⁴⁹ (rotação das pás - 50 rpm). O equipamento utilizado foi programado para recolha automática de amostras filtradas aos 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 e 180 minutos.

A quantidade de ibuprofeno libertado dos pellets foi determinada por medição em espectrofotómetro UV/Vis (Hitachi U-1900, Japão) a 264 nm.

4. RESULTADOS

4.1. Estudos preliminares

Os estudos preliminares foram realizados com o objectivo de permitirem uma primeira abordagem ao fabrico de pellets por extrusão-esferonização, o conhecimento das variáveis envolvidas e a definição das condições experimentais a aplicar na produção dos pellets à base de hidroxiapatite para inclusão da substância activa. Assim, nos primeiros ensaios realizados, foi possível verificar que as formulações destinadas à avaliação do efeito do tamanho médio de partícula da CMC no processo de extrusão-esferonização (C20_V2_L/D10; C50_V2_L/D10 e C180_V2_L/D10) não apresentaram visualmente diferenças muito significativas entre si no que diz respeito ao aspecto, embora seja possível referir de um ponto de vista qualitativo, que a formulação com a CMC de 180µm originou pellets de maior tamanho e superfície mais homogénea quando comparada com as restantes. A formulação com CMC de 20µm originou os pellets de menor tamanho. Em todos os casos foi evidente a ocorrência de aglomeração de pellets no processo de esferonização.

Relativamente à avaliação do efeito da quantidade de água na formulação, foi possível verificar que as formulações que tinham na sua constituição mais de 60 g de água por 100 g da fracção sólida da mistura foram extrudidas com sucesso, ou seja, deram origem a extrudidos com uma superfície homogénea. No entanto, na esferonização voltou a observar-se aglomeração de pellets existindo uma elevada dispersão de tamanhos. Esta resposta tornou-se mais evidente com o aumento da quantidade de água nas formulações. Com quantidades de água inferiores a 60 g por 100 g da fracção sólida não foi possível obter extrudidos com nenhuma das CMCs. Nos casos em que foi possível produzir pellets, os que incluíam a CMC de 50µm foram os que apresentaram qualitativamente melhores resultados, quer no que se refere a uma menor dispersão de tamanhos, quer à esfericidade dos mesmos.

Após a mudança da fieira, confirmou-se a observação inicial de que a formulação com CMC de 180µm origina pellets de maior tamanho, seguida da formulação com CMC de 50µm e por fim da que continha CMC de 20µm. A mudança da fieira para uma relação L/D=4 (formulações C20_V2_L/D4, C50_V2_L/D4 e C180_V2_L/D4) permitiu obter pellets com melhores resultados de esfericidade e menor aglomeração, quando comparados com os pellets das formulações C20_V2_L/D10, C50_V2_L/D10 e C180_V2_L/D10.

As formulações em estudo para a avaliação do efeito do aumento da velocidade de extrusão demonstraram que este aumento leva ao aparecimento de extrudidos com uma

superfície rugosa (“*sharkskin*”). Nestas formulações, não se observaram resultados diferentes entre os vários tamanhos de partícula de CMC utilizados.

Nos estudos realizados para avaliar a processabilidade com feiras de maior diâmetro, as formulações propostas demonstraram impossibilidade de extrusão com a feira de 3 mm de diâmetro. Verificou-se novamente com as feiras de 6 e 9 mm de diâmetro que, para uma maior velocidade, aumenta o aparecimento de extrudido com superfície rugosa (Figura 4.1.). Estas observações correspondem também às formulações com uma menor quantidade de água em proporção com os restantes constituintes.



Figura 4.1. Superfície do extrudido (feira de diâmetro 6 mm, velocidade de 400 mm/min, menor proporção de água – A50_C50_V4_L/D4).

Adicionalmente verificou-se que nas formulações com maior quantidade de água existiu uma tendência para a formação de pellets ovais, não sendo possível uma esferonização completa durante os 10 minutos definidos nos métodos.

As observações destes estudos preliminares serviram de base para as formulações seguintes que incluíam hidroxiapatite modificada em substituição total da lactose.

As primeiras misturas produzidas com hidroxiapatite modificada pretenderam determinar o efeito do tamanho médio da partícula da CMC na qualidade dos pellets e a sua influência na porosidade dos mesmos após sinterização. Foi possível verificar que a extrusão e esferonização decorreram com sucesso, tendo-se conseguido produzir pellets cujas propriedades se encontram descritas na Tabela 4.1, sendo de salientar que se verificou a ocorrência de contracção da estrutura dos pellets, tanto maior, quanto maior a temperatura a que estes foram sujeitos. As Figuras 4.2. e 4.3. correspondem às observações realizadas com recurso a MEV para avaliação da morfologia interna e da superfície dos pellets.

Tabela 4.1. Características dos pellets de 1 mm produzidos com hidroxiapatite modificada, antes e após aquecimento a 600°C e sinterização a 1000°C e 1300°C.

Designação	Mediana (mm)	IQ (mm)	Densidade (g/cm³)	Resistência a esmagamento (N)
<u>Antes da sinterização</u>				
C20_HA[50]_V4_L/D4_1	1,60	0,45	ND	ND
C50_HA[50]_V4_L/D4_1	1,70	0,35	ND	ND
C180_HA[50]_V4_L/D4_1	1,60	0,50	ND	ND
<u>Após aquecimento a 600°C</u>				
C20_HA[50]_V4_L/D4_1	1,25	0,25	2,979 ± 0,005	ND
C50_HA[50]_V4_L/D4_1	1,40	0,50	2,987 ± 0,003	ND
C180_HA[50]_V4_L/D4_1	1,30	0,35	2,990 ± 0,001	ND
<u>Após sinterização a 1000°C</u>				
C20_HA[50]_V4_L/D4_1	1,05	0,35	ND	ND
C50_HA[50]_V4_L/D4_1	1,15	0,30	ND	ND
C180_HA[50]_V4_L/D4_1	1,10	0,30	ND	ND
<u>Após sinterização a 1300°C</u>				
C20_HA[50]_V4_L/D4_1	0,85	0,15	3,114 ± 0,004	5,9 ± 0,9
C50_HA[50]_V4_L/D4_1	0,95	0,30	3,115 ± 0,004	7,1 ± 1,6
C180_HA[50]_V4_L/D4_1	0,90	0,20	3,111 ± 0,005	4,7 ± 1,3

ND – Não determinado

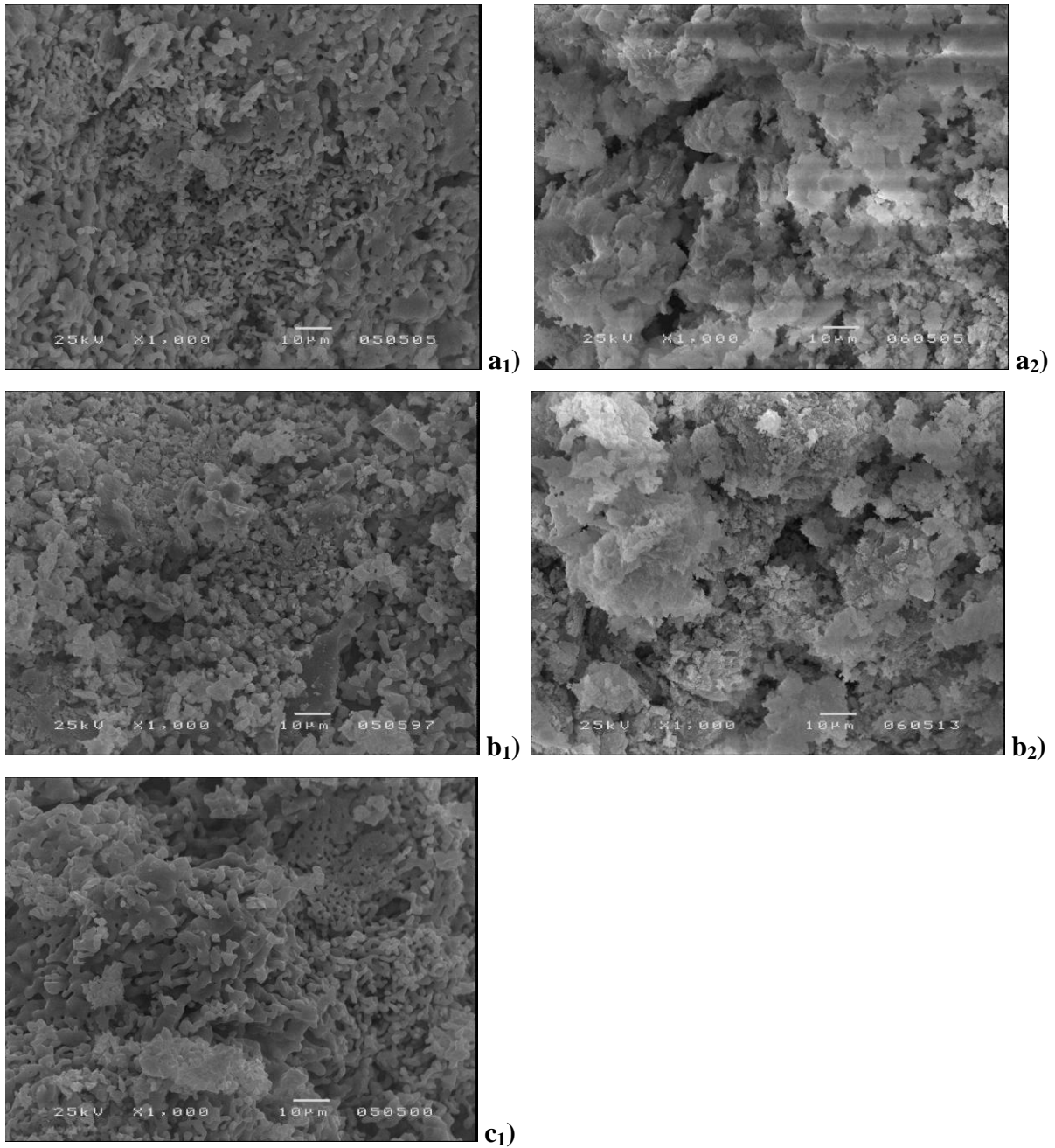


Figura 4.2. Imagens de MEV da superfície interna dos pellets contendo CMC com granulometrias diferentes (ampliação de 1000x).

a₁ e a₂ – pellets contendo CMC (20 μm) – [C20_HA[50]_V4_L/D4_1]

b₁ e b₂ – pellets contendo CMC (50 μm) – [C50_HA[50]_V4_L/D4_1]

c₁ – pellets contendo CMC (180 μm) – [C180_HA[50]_V4_L/D4_1]

Os índices 1 e 2 correspondem a aquecimento até 1300°C e 600°C, respectivamente

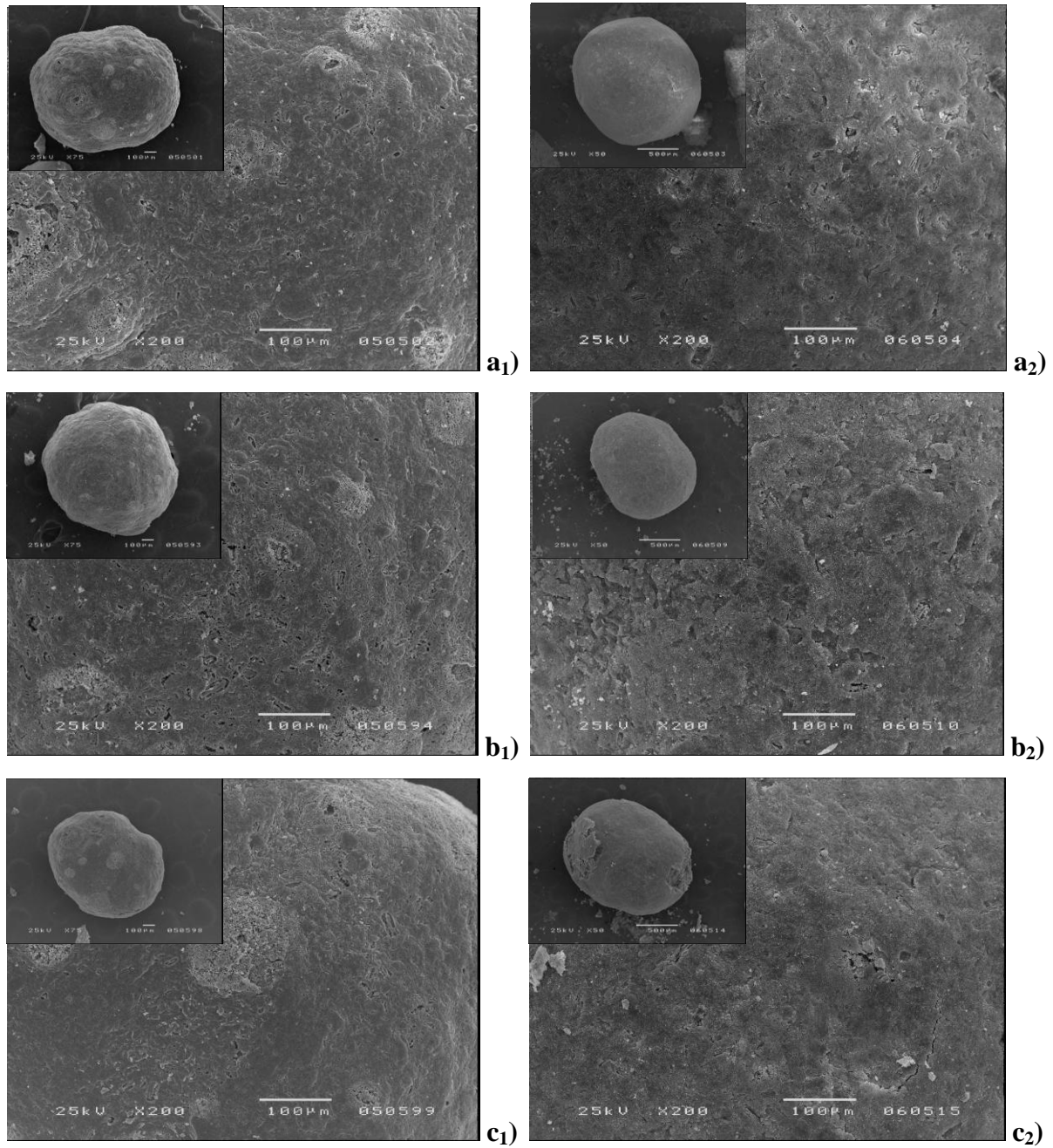


Figura 4.3. Imagens de MEV da superfície externa dos pellets contendo CMC com diferentes granulometrias (ampliação 200x).

a₁ e a₂ – pellets contendo CMC (20 μm) – [C20_HA[50]_V4_L/D4_1]

b₁ e b₂ – pellets contendo CMC (50 μm) – [C50_HA[50]_V4_L/D4_1]

c₁ – pellets contendo CMC (180 μm) – [C180_HA[50]_V4_L/D4_1]

Os índices 1 e 2 correspondem a aquecimento até 1300°C e 600°C, respectivamente.

As inserções nas imagens correspondem aos pellets originais com ampliação 75x nos índices 1 e 50 x nos índices 2, permitindo ver as suas morfologias.

De seguida procurou-se avaliar a processabilidade com as feiras de maior diâmetro recorrendo ao uso da CMC de 50 μ m e 180 μ m. Os extrudidos produzidos com as feiras de 3 mm de diâmetro não foram esferonizados por completo nos 10 minutos definidos para a esferonização (Figura 4.4.)

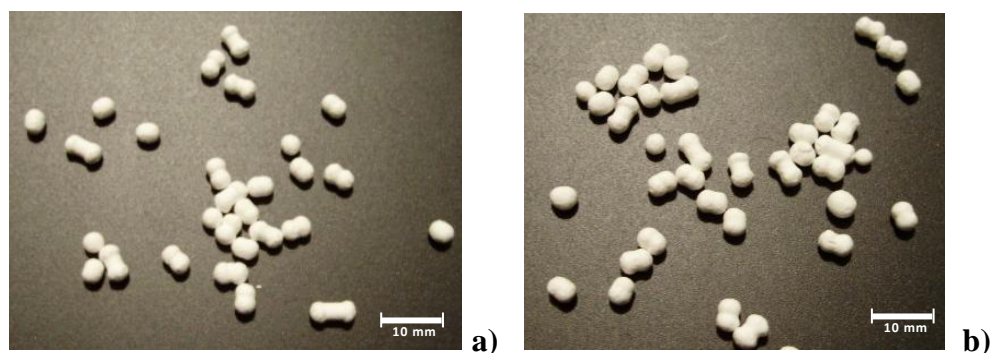


Figura 4.4. Fotografia de pellets fabricados com a feira de 3 mm de diâmetro.

- a) C50_HA[50]_V2_L/D4_3
- b) C180_HA[50]_V2_L/D4_3

Os pellets fabricados com as feiras de 6 e 9 mm não esferonizaram por completo tendo dado origem a alguns pellets ovais. Após sinterização destes pellets a 1300°C (aquecimento a 0,5°C/min) verificou-se novamente a ocorrência de contracção da estrutura, conforme evidenciado na Figura 4.5.

A avaliação do efeito da proporção dos componentes na formulação demonstrou que para os pellets produzidos com a feira de 1 mm de diâmetro, a relação CMC/HAm de 50:50 apresenta um tamanho de partícula superior (mediana \approx 1,6mm), quando comparado com a relação CMC/HAm 80:20 (mediana \approx 1,2 mm) (Figura 4.6.).

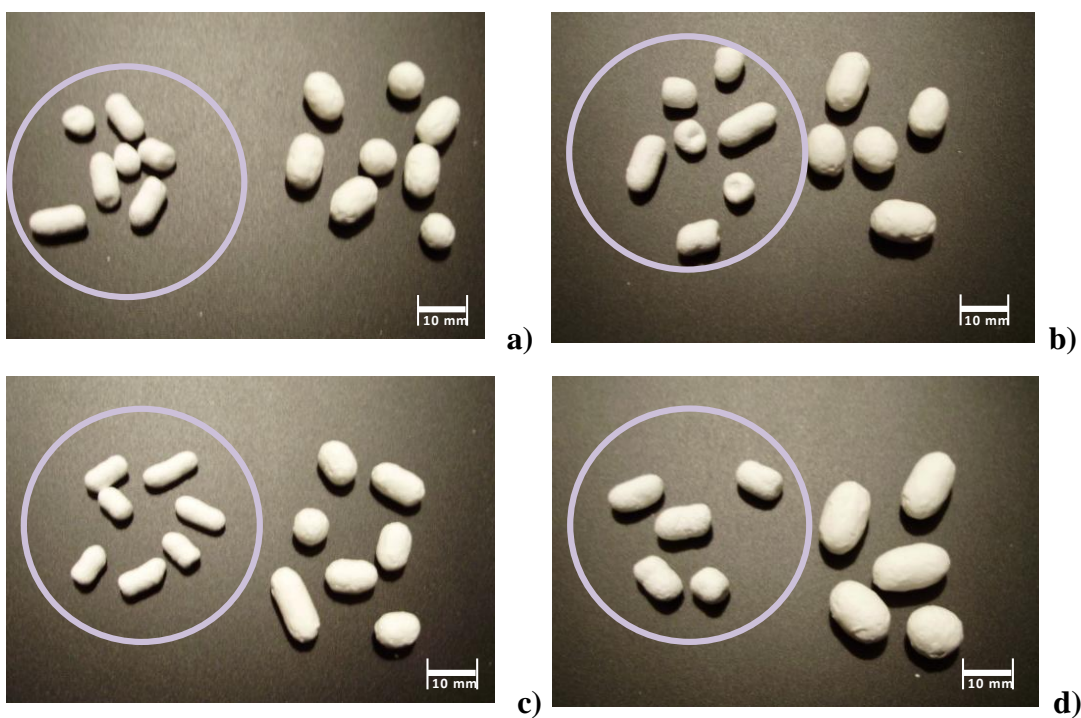


Figura 4.5. Fotografia de pellets fabricados com as feiras de 6 mm e 9 mm de diâmetro antes (fora do círculo) e após sinterização (interior do círculo).

- a) C50_HA[50]_V2_L/D4_6
- b) C50_HA[50]_V2_L/D4_9
- c) C180_HA[50]_V2_L/D4_6
- d) C180_HA[50]_V2_L/D4_9

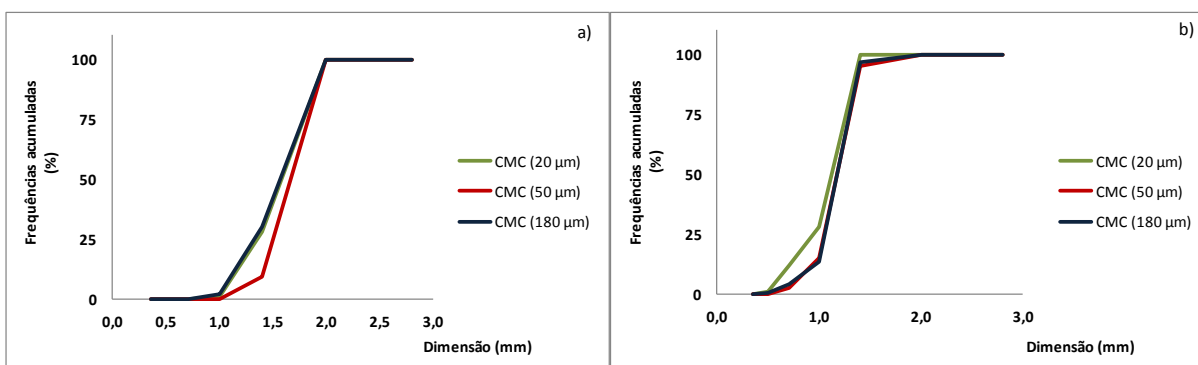


Figura 4.6. Frequências acumuladas do tamanho dos pellets com diâmetro de 1 mm.

- a) C20_HA[50]_V4_L/D4_1, C50_HA[50]_V4_L/D4_1 e C180_HA[50]_V4_L/D4_1
- b) C20_HA[20]_V2_L/D4_1, C50_HA[20]_V2_L/D4_1 e C180_HA[20]_V2_L/D4_1.

Tal como definido, foram produzidos pellets (com a relação CMC/HAm 80:20) com as restantes feiras e foi realizada a respectiva caracterização, Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Resultados da caracterização efectuada aos pellets de 1, 3, 6 e 9 mm de diâmetro produzidos com hidroxiapatite modificada, antes e após sinterização a 1300°C.

Designação	Antes da sinterização			Após sinterização a 1300°C		
	Mediana (mm)	IQ (mm)	Densidade (g/cm ³)	Mediana (mm)	IQ (mm)	Densidade (g/cm ³)
C20_HA[20]_V2_L/D4_1	1,20	0,25	1,690 ± 0,000	0,60	0,15	3,047 ± 0,006
C50_HA[20]_V2_L/D4_1	1,20	0,20	1,698 ± 0,002	0,65	0,20	3,031 ± 0,008
C180_HA[20]_V2_L/D4_1	1,20	0,20	1,684 ± 0,001	0,60	0,15	3,046 ± 0,005
C50_HA[20]_V1_L/D4_3	3,40	0,65	1,687 ± 0,004	1,70	0,40	3,081 ± 0,006
C180_HA[20]_V1_L/D4_3	3,20	0,80	1,686 ± 0,002	1,70	0,40	3,079 ± 0,006
C50_HA[20]_V1_L/D4_6	3,80	2,35	1,700 ± 0,001	2,75	1,00	3,074 ± 0,006
C180_HA[20]_V1_L/D4_6	5,40	ND	1,699 ± 0,001	2,45	0,50	3,098 ± 0,010
C50_HA[20]_V1_L/D4_9	5,40	ND	1,709 ± 0,002	3,55	0,75	3,085 ± 0,009
C180_HA[20]_V1_L/D4_9	4,60	1,95	1,691 ± 0,001	3,40	0,60	3,120 ± 0,013

O gráfico seguinte (Figura 4.7.) evidencia o aumento de densidade que é observado quando os pellets descritos na Tabela 4.2. são sujeitos a sinterização a 1300°C e a Figura 4.8. representa o efeito da sinterização no tamanho da partícula.

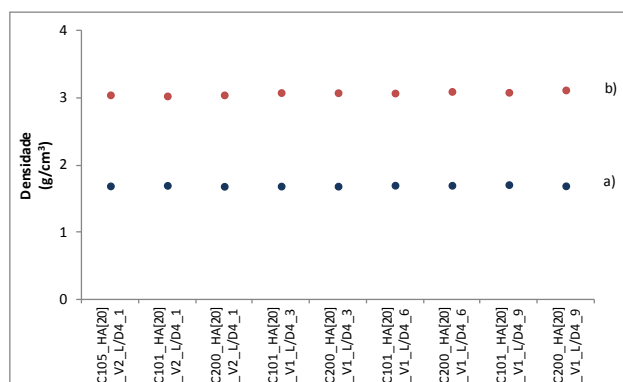


Figura 4.7. Densidade dos pellets com hidroxiapatite modificada.

- a) Antes da sinterização
- b) Após sinterização a 1300°C

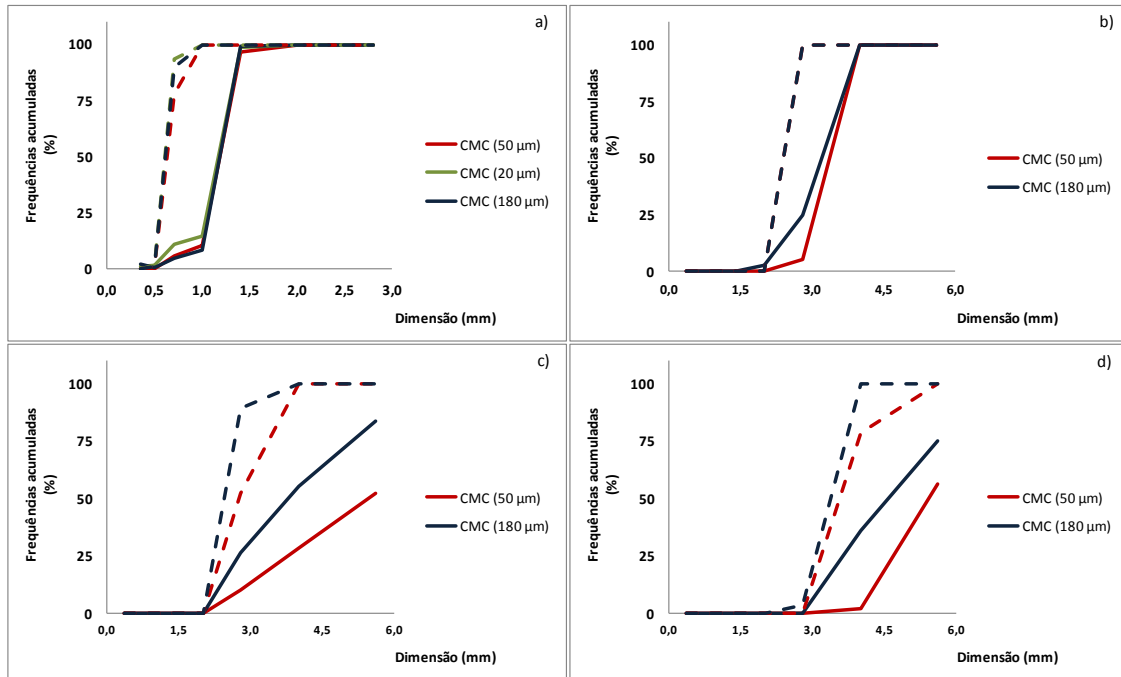


Figura 4.8. Distribuição de tamanho dos pellets fabricados (frequências acumuladas).

- a) Feira de 1 mm de diâmetro – C20_HA[20]_V2_L/D4_1, C50_HA[20]_V2_L/D4_1 e C180_HA[20]_V2_L/D4_1
- b) Feira de 3 mm de diâmetro - C50_HA[20]_V1_L/D4_3 e C180_HA[20]_V1_L/D4_3
- c) Feira de 6 mm de diâmetro - C50_HA[20]_V1_L/D4_6 e C180_HA[20]_V1_L/D4_6
- d) Feira de 9 mm de diâmetro - C50_HA[20]_V1_L/D4_9 e C180_HA[20]_V1_L/D4_9

A linha contínua corresponde aos pellets antes da sinterização e a linha tracejada corresponde aos pellets após sinterização a 1300°C.

4.2. Produção de pellets à base de hidroxiapatite

O trabalho prosseguiu com o fabrico de pellets contendo na formulação CMC, hidroxiapatite e cloreto de sódio. Foi seleccionada a CMC com tamanho de partícula de 50μm porque foi a que demonstrou apresentar melhores resultados quer no que se refere a dispersão de tamanhos após esferonização, quer no que se refere à esfericidade dos mesmos. O cloreto de sódio foi adicionado como um adjuvante para a formação de poros na estrutura do pellet, tendo em conta a possibilidade de este fundir na estrutura já sem compostos orgânicos (removidos a 650°C) e eventualmente facilitar e consolidar a conexão entre os poros formados anteriormente.

Todas as formulações propostas permitiram a obtenção de um extrudido com uma superfície sem rugosidades. Os gráficos mais representativos do processo de extrusão podem

ser verificados no Anexo 9.3., estando um desses gráficos representado na Figura 4.9. como exemplo. Verifica-se que a força de extrusão (descrita na Tabela 4.3.) vai diminuindo à medida que aumenta o diâmetro da fieira.

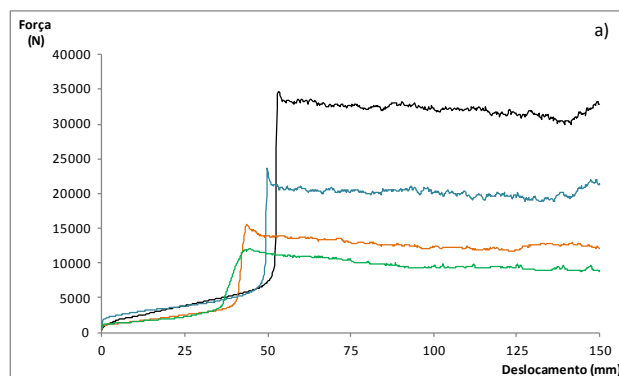


Figura 4.9. Gráfico tipo representando perfis de extrusão.
Formulações F1_S15_A (a preto), F3_F15_A (a azul), F6_S15_A (a laranja) e F9_S15_A (a verde)

No processo de esferonização, os extrudidos produzidos com as fieiras de 1 e 3 mm não permitiram uma esferonização completa ficando alguns pellets oblongos e existindo alguma aglomeração nos da fieira com 1 mm de diâmetro.

Relativamente às fieiras de 6 e 9 mm de diâmetro, foi possível realizar a esferonização tendo sido originados pellets tendencialmente esféricos. As imagens destes pellets podem ser verificadas no Anexo 9.5.

Quando se inverteu a proporção de cloreto e sódio e hidroxiapatite, com uma maior quantidade de cloreto de sódio, verificou-se que os resultados foram semelhantes no que se refere à processabilidade das massas, no entanto, existiu uma maior aglomeração na fieira de 1 mm e a de 9 mm deu origem a pellets de maior tamanho.

Na Figura 4.10. encontram-se representadas as imagens de pellets sinterizados a 1200°C. As restantes imagens encontram-se nos Anexos 9.5. e 9.7. Estas imagens mostram a morfologia interna e a superfície dos pellets, sendo possível observar em ambas que a formulação com uma maior granulometria do cloreto de sódio apresenta uma maior porosidade nas superfícies externa e interna.

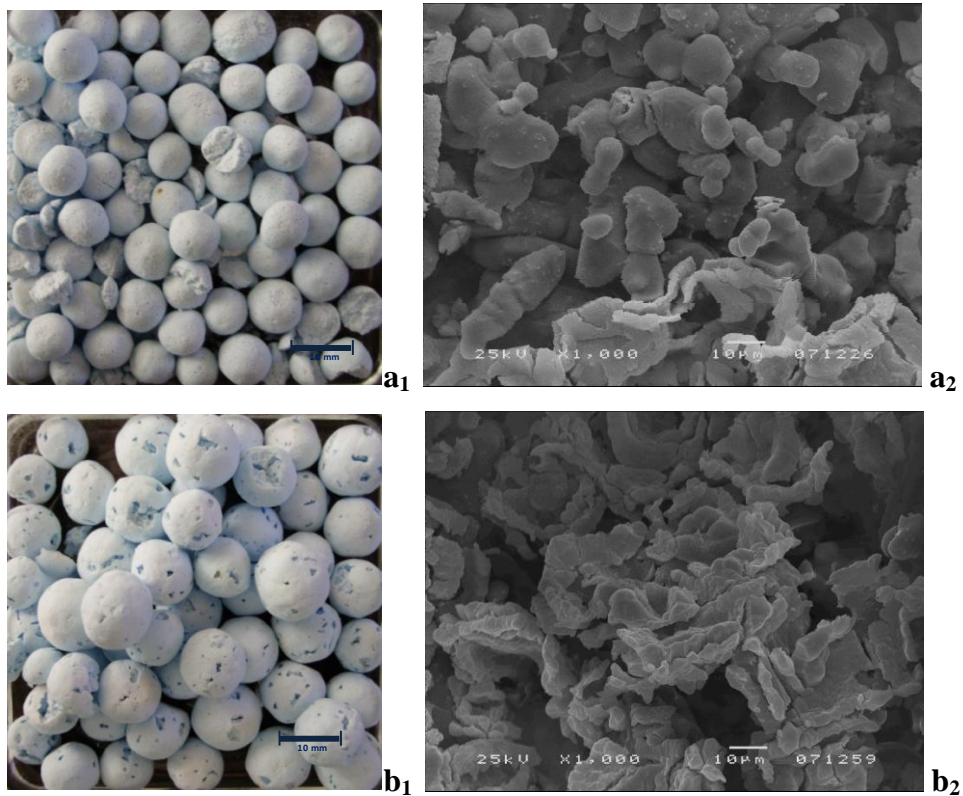


Figura 4.10. Imagens de pellets fabricados com a feira de 9 mm de diâmetro.

a₁ e a₂ – F9_S40_A

b₁ e b₂ – F9_S40_C

Os índices 1 e 2 correspondem a observação visual e observação por MEV (ampliação 1000x), respectivamente

As amostras mais representativas foram sinterizadas e submetidas ao método em estudo para a inclusão de substância activa (ibuprofeno).

Na Tabela 4.3. encontram-se os resultados da caracterização dos pellets antes e após sinterização e após a inclusão da substância activa.

Tabela 4.3. Resultados da caracterização efectuada aos pellets produzidos com hidroxiapatite e cloreto de sódio de diferentes granulometrias antes e após sinterização a 1000°C e 1200°C.

Formulação	Força de extrusão (N)	Antes da sinterização		Após sinterização a 1000°C		Após sinterização a 1200°C	
		Mediana (mm)	IQ (mm)	Mediana (mm)	IQ (mm)	Mediana (mm)	IQ (mm)
F1_S15_A	32061	1,20	0,20	1,20	0,20	1,20	0,20
F3_S15_A	20110	3,40	0,60	2,60	0,80	2,70	1,00
F6_S15_A	18373	6,50	0,80	6,00	1,00	5,60	0,80
F9_S15_A	9664	8,60	1,00	8,30	0,70	8,30	1,00
F1_S15_B	29748	1,20	0,20	1,20	0,20	1,20	0,20
F3_S15_B	18174	3,40	0,60	-	-	2,50	0,80
F6_S15_B	15313	6,00	1,30	5,40	0,80	5,50	1,00
F9_S15_B	12129	8,60	1,10	-	-	-	-
F6_S15_C	11439	6,60	0,60	5,80	1,10	6,00	1,20
F9_S15_C	8621	9,20	1,60	8,70	1,90	8,50	1,50
F1_S40_A	21785	1,20	0,20	-	-	-	-
F3_S40_A	10532	3,40	0,70	3,40	0,70	3,20	0,80
F6_S40_A	8305	6,40	1,00	6,50	1,10	5,70	1,00
F9_S40_A	7242	8,60	1,20	8,50	0,90	8,20	1,10
F3_S40_B	12178	3,40	0,60	-	-	3,00	1,00
F6_S40_B	9586	6,50	0,70	6,00	1,20	6,10	1,20
F9_S40_B	7509	9,20	1,60	-	-	-	-
F6_S40_C	7195	7,60	0,90	7,40	1,70	7,50	1,30
F9_S40_C	6791	11,00	2,00	10,80	2,00	9,80	1,80

Tabela 4.3. (continuação) Resultados da caracterização efectuada aos pellets produzidos com hidroxiapatite e cloreto de sódio de diferentes granulometrias antes e após sinterização a 1000°C e 1200°C.

Formulação	Densidade dos pellets (g/cm ³)			Porosidade calculada (%)			Doseamento Ibuprofeno (mg/g pellet)	Quantidade de Ibuprofeno libertada (%)		
	Antes da sinterização	Após sinterização 1000°C	Após sinterização 1200°C	Antes da sinterização	Após sinterização 1000°C	Após sinterização 1200°C		<i>t</i> =15 min	<i>t</i> =60 min	<i>t</i> =120 min
F1_S15_A	1,717 ± 0,004	2,936 ± 0,002	3,183 ± 0,005	26,1	1,0	0,6	-	-	-	-
F3_S15_A	1,708 ± 0,000	2,965 ± 0,005	3,189 ± 0,005	26,5	0,6	0,6	-	-	-	-
F6_S15_A	1,653 ± 0,001	2,976 ± 0,005	3,169 ± 0,005	28,9	0,8	0,2	75,4 ± 2,8	78,5 ± 6,2	96,8 ± 3,6	99,0 ± 1,1
F9_S15_A	1,637 ± 0,000	2,989 ± 0,007	3,204 ± 0,010	29,5	1,3	0,2	81,0 ± 0,8	40,8 ± 3,8	66,2 ± 5,5	77,8 ± 4,8
F1_S15_B	1,707 ± 0,001	2,920 ± 0,003	3,167 ± 0,003	26,5	0,3	0,8	114,5 ± 4,3	77,6 ± 3,7	75,6 ± 3,2	74,4 ± 3,4
F3_S15_B	1,703 ± 0,001	-	3,187 ± 0,005	26,7	-	0,7	78,2 ± 1,3	85,7 ± 4,8	89,4 ± 4,7	89,2 ± 4,4
F6_S15_B	1,664 ± 0,000	3,028 ± 0,005	3,159 ± 0,004	28,4	0,4	0,3	72,6 ± 1,1	66,7 ± 0,7	93,1 ± 3,9	95,3 ± 1,0
F9_S15_B	1,645 ± 0,001	-	-	29,2	-	-	-	-	-	-
F6_S15_C	1,649 ± 0,001	3,004 ± 0,007	3,166 ± 0,002	29,0	0,1	0,2	75,5 ± 3,8	63,9 ± 1,7	89,8 ± 3,9	95,2 ± 4,1
F9_S15_C	1,632 ± 0,000	3,065 ± 0,001	3,190 ± 0,012	29,4	0,3	0,0	81,8 ± 4,3	47,3 ± 6,0	66,2 ± 6,6	75,1 ± 8,4
F1_S40_A	1,846 ± 0,005	-	-	25,0	-	-	-	-	-	-
F3_S40_A	1,849 ± 0,001	2,622 ± 0,004	3,160 ± 0,006	24,8	0,6	0,5	-	-	-	-
F6_S40_A	1,838 ± 0,001	2,624 ± 0,003	3,125 ± 0,002	25,3	2,4	0,9	62,2 ± 1,7	37,5 ± 0,9	40,2 ± 1,3	40,9 ± 2,2
F9_S40_A	1,812 ± 0,002	2,706 ± 0,002	3,113 ± 0,005	26,4	1,1	0,9	64,8 ± 2,9	82,7 ± 4,3	92,3 ± 5,5	92,5 ± 5,9
F3_S40_B	1,820 ± 0,001	-	-	26,0	-	-	-	-	-	-
F6_S40_B	1,809 ± 0,026	2,668 ± 0,003	3,141 ± 0,004	26,5	0,9	0,9	68,9 ± 1,9	93,3 ± 3,5	98,4 ± 1,5	98,8 ± 0,8
F9_S40_B	1,796 ± 0,000	-	-	27,0	-	-	-	-	-	-
F6_S40_C	1,899 ± 0,003	2,611 ± 0,001	3,157 ± 0,007	22,8	0,8	0,4	65,5 ± 3,4	94,9 ± 0,3	98,2 ± 1,8	96,9 ± 0,7
F9_S40_C	1,950 ± 0,005	2,608 ± 0,002	3,137 ± 0,012	20,8	1,1	1,2	55,9 ± 2,8	88,8 ± 4,0	93,4 ± 4,4	91,4 ± 4,8

Nos resultados apresentados verifica-se uma redução do tamanho das partículas com a sinterização. Estes resultados não apresentam o mesmo significado dos resultados obtidos nos estudos preliminares uma vez que nestes a contração da estrutura foi muito significativa. Por outro lado, as densidades obtidas confirmam e são comparáveis com o que tinha sido verificado nos estudos preliminares, nomeadamente o aumento da densidade dos pellets com a sinterização.

A Figura 4.11. permite verificar em maior detalhe a variação da densidade com a sinterização e com as respectivas temperaturas. Observa-se que as formulações com maior proporção de cloreto de sódio apresentam antes da sinterização uma densidade ligeiramente superior (de acordo com o esperado uma vez que a densidade do cloreto de sódio é superior à da densidade CMC) e inferior após sinterização a 1000°C. A 1200°C não existe diferença nas densidades obtidas entre as várias formulações.

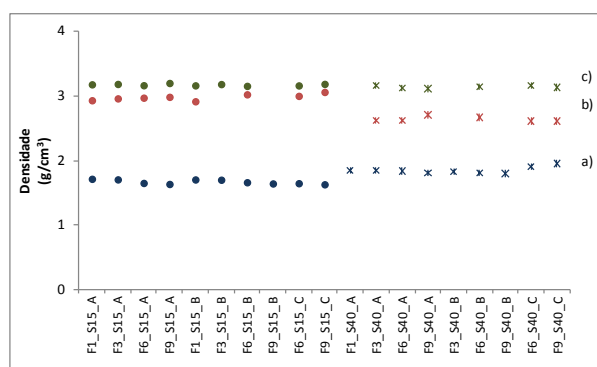


Figura 4.11. Densidade dos pellets com hidroxiapatite.

- a) Antes da sinterização
- b) Após sinterização a 1000°C
- c) Após sinterização a 1200°C

Os pontos assinalados com cruz correspondem às formulações com maior quantidade de cloreto de sódio na proporção cloreto de sódio/CMC

Relativamente à porosidade, os resultados obtidos revelam uma redução muito significativa com a sinterização, não se verificando nenhuma tendência entre formulações e/ou temperatura de sinterização.

Ainda que não tenha sido determinada a resistência ao esmagamento dos pellets produzidos é importante referir, como observação, que durante a manipulação dos pellets se verificou que os obtidos após sinterização a 1000°C (principalmente os correspondentes a granulometrias superiores do cloreto de sódio) eram muito mais friáveis do que os obtidos

após a sinterização a 1200°C, embora estes últimos também não apresentassem uma resistência elevada.

No que diz respeito ao doseamento, os pellets com maior quantidade de cloreto de sódio na proporção cloreto de sódio/CMC apresentaram doseamentos ligeiramente inferiores. No entanto não é possível relacionar a capacidade de inclusão de substância activa com as porosidades dos pellets, conforme se pretendia neste trabalho.

Relativamente ao ensaio de dissolução, os resultados revelam que existe uma libertação elevada do ibuprofeno nos primeiros 15 minutos de ensaio não existindo uma libertação muito significativa a partir dos 60 minutos.

A formulação F6_S40_A apresenta um perfil diferente das restantes formulações correspondentes à feira de 6 mm de diâmetro. Esta formulação corresponde a uma maior quantidade de cloreto de sódio com menor granulometria. Por outro lado, verificando os perfis de libertação das formulações correspondentes à feira de 9 mm de diâmetro, verifica-se a existência de dois perfis de libertação consoante a proporção de cloreto de sódio nas formulações sendo menor a libertação naquelas que tinham menor quantidade de cloreto de sódio. Na Figura 4.12. é possível verificar os vários perfis de libertação obtidos neste trabalho.

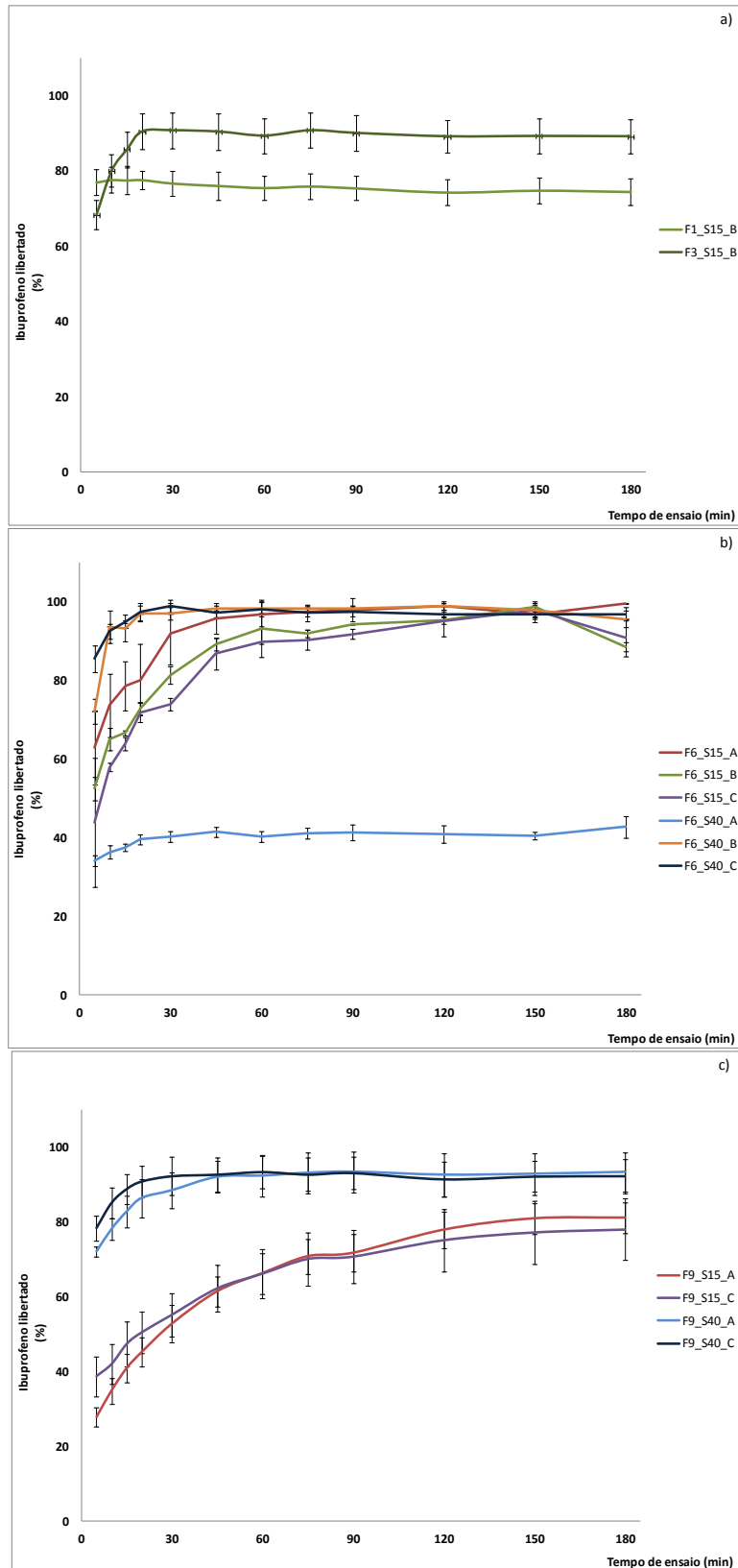


Figura 4.12. Perfil de liberação da substância activa em função do tempo.

- a) Feiras de 1 e 3 mm de diâmetro
- b) Feira de 6 mm de diâmetro
- c) Feira de 9 mm de diâmetro

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. *Estudos preliminares*

Nos estudos preliminares, nomeadamente no que diz respeito à influência do tamanho médio de partícula da celulose microcristalina (CMC), foi possível verificar que a sua variação não representou uma diferença muito significativa no aspecto dos pellets obtidos com excepção da observação de que os pellets resultantes das formulações com CMC de 180µm se apresentavam maiores do que os pellets produzidos com as outras CMCs.

Nestas primeiras formulações produzidas foi evidente a existência de aglomeração no processo de esferonização, o que não seria um resultado esperado uma vez que as formulações em causa se encontram descritas na literatura como capazes de originar pellets com características adequadas.⁴³ Tendo em conta que todas elas apresentaram aglomeração, e que os processos de extrusão e esferonização são muito dependentes da quantidade de água presente e qualidade da sua dispersão,³⁷ foi avaliado o efeito da quantidade de água nas formulações em causa. Foi possível observar que as misturas que tinham na sua constituição mais de 60 g de água por 100 g da fracção sólida da mistura foram extrudidas com sucesso mas apresentaram uma aglomeração de pellets no processo de esferonização e uma elevada dispersão de tamanhos. Esta resposta tornou-se mais evidente com o aumento da quantidade de água nas misturas o que vem confirmar a relação entre o aumento da quantidade de água e a existência de aglomeração no processo de esferonização. Alguns estudos realizados com outros excipientes concluíram que a existência de partículas maiores faz com que as forças de capilaridade no interior do pellets sejam inferiores e conseqüentemente podem levar a um excesso de água na superfície dos pellets durante a esferonização e conduzir à aglomeração destes.³² Por outro lado, as formulações com menor quantidade de água não permitiram a obtenção de extrudidos.

Os pellets fabricados com CMC de 50µm foram os que apresentaram qualitativamente melhores resultados quer na menor dispersão de tamanhos, quer na esfericidade dos mesmos, razão pela qual, foi esta a CMC seleccionada para a produção dos pellets finais à base de hidroxiapatite para inclusão da substância activa.

As formulações seguintes procuraram avaliar o efeito da relação entre a espessura da fieira e o diâmetro da mesma pelo que a fieira que estava a ser utilizada nestes estudos preliminares L/D=10 foi substituída por uma fieira L/D=4. Os pellets produzidos permitiram confirmar o facto de a CMC de 180µm originar pellets de maior tamanho, seguida da

formulação com CMC de 50 μ m e por fim da que continha CMC de 20 μ m. A mudança da fieira para uma relação L/D=4 permitiu claramente obter pellets com melhores resultados de esfericidade e menor aglomeração de pellets de menores dimensões. Poderá ter também existido um segundo efeito que foi a ligeira redução da quantidade de água da formulação já que também não existem resultados publicados que evidenciem a influência da espessura da fieira na qualidade dos pellets produzidos.⁴³

Tendo em conta que a velocidade de extrusão também tem um papel relevante na qualidade dos extrudidos, este parâmetro também foi avaliado através do seu aumento. Foi demonstrado que esta variação levou ao aparecimento de extrudidos com a superfície rugosa (“*sharkskin*”). Mais uma vez, poderá também ter existido um factor secundário para os resultados obtidos uma vez que a quantidade de água das formulações foi ligeiramente reduzida. Estas observações relativas à velocidade estão de acordo com a literatura que refere que a extrusão a velocidade inferior permite a movimentação da água ao longo da interface com a parede da fieira e desta forma, funciona como lubrificante baixando as forças de extrusão. A velocidades mais elevadas, a água não é capaz de se deslocar tão rapidamente através da massa resultando em forças maiores³⁷ e em alterações na superfície do extrudido.

Nestas formulações também não se observaram resultados significativamente diferentes entre os tamanhos de CMC utilizados.

O trabalho teve continuidade com o fabrico de pellets recorrendo a fieiras de maior diâmetro, todas elas com a relação L/D=4. Verificou-se que independentemente da CMC utilizada, não foi possível realizar extrusão com as fieiras de diâmetro 3 mm uma vez que as massas se encontravam pouco hidratadas. Relativamente às fieiras de diâmetro 6 e 9 mm, verificou-se o aparecimento de extrudidos com aspecto “*sharkskin*”. Adicionalmente, nas formulações com maior quantidade de água existiu uma tendência para a formação de pellets ovais, não sendo possível uma esferonização adequada e completa.

As observações destes estudos iniciais serviram de base para as formulações dos estudos preliminares que incluíram hidroxiapatite modificada em substituição total da lactose.

As primeiras formulações produzidas com hidroxiapatite modificada procuravam determinar o efeito do tamanho médio da partícula da CMC na qualidade dos pellets produzidos e a sua influência na porosidade final dos mesmos. Foi possível verificar que em todos os casos, a extrusão e esferonização decorreram com sucesso no entanto, novamente sem diferenças significativas decorrentes do tamanho médio da partícula das CMCs utilizadas. Estas observações estão de acordo com as observações retiradas num estudo que

concluiu que o tamanho médio do pellet não diferenciava muito com a utilização de diferentes qualidades de Avicel®, se as condições fossem mantidas constantes. É referido que a CMC actua como uma esponja molecular que inibe a alteração no tamanho do pellet induzida por outros componentes da formulação. De acordo com este modelo, as propriedades de extrusão e subsequente esferonização da CMC depende das microfibrilhas de CMC e dos espaços livres entre elas. Além da água presente no interior dos poros das fibras, a água presente neste espaço livre assegura as propriedades reológicas adequadas à massa húmida, o que vai auxiliar o processo de extrusão-esferonização.⁵⁰

Estes pellets foram submetidos a diferentes temperaturas para que fosse possível avaliar o efeito da temperatura de sinterização. Os resultados obtidos evidenciam que existe uma redução do tamanho dos pellets que apresentam medianas entre 1,6 e 1,7 mm antes da sinterização e passam a ter medianas que variam entre 1,25 a 1,40 mm, 1,05 a 1,15 mm e 0,85 a 0,95 mm após aquecimento a 600°C, 1000°C e 1300°C, respectivamente. Também se verifica um ligeiro aumento da densidade do material quando são comparadas as densidades dos pellets aquecidos a 600°C (na ordem dos 2,98 g/cm³) com as dos sinterizados a 1300°C (da ordem dos 3,11 g/cm³). Verifica-se que, tal como descrito na literatura, durante a sinterização ocorre uma contracção acentuada do material, uma vez que o sistema tende para energia interfacial mínima (ou seja, diminuição da porosidade), ocorrendo a sua densificação.¹⁷ Os resultados relativos ao tamanho dos pellets (complementados no Anexo 9.2.) e as imagens obtidas por MEV representadas na Figura 4.2, não permitem concluir se existirá algum efeito do tamanho da celulose microcristalina no tamanho dos poros que se formam na estrutura mas, se existir, é possível que não seja uma dependência linear. A variação da densidade dos pellets em relação às matérias-primas não é significativa. Durante a sinterização há uma fusão parcial ou total do componente da hidroxiapatite o que leva ao colapso da estrutura do pellet.

De forma a confirmar a contracção da estrutura e avaliar a possibilidade de produzir pellets de maiores dimensões, foram produzidos pellets com as fieiras de maior diâmetro (3, 6 e 9 mm). Verificou-se que não foi possível esferonizar as amostras extrudidas relativas à fieira 3 mm de diâmetro que, tendo em conta o seu aspecto, sugerem que a quantidade de água incorporada não foi suficiente para conferir a plasticidade necessária ao material no processo de esferonização.³⁷ Por outro lado, os pellets correspondentes às fieiras de 6 e 9 mm deram origem a pellets esféricos e alguns ovais conforme pode ser verificado na Figura 4.5. Ainda

assim, e para confirmar o fenómeno de contracção da estrutura em pellets de maior tamanho durante o processo de sinterização, estes foram sinterizados a 1300°C. Confirmou-se a referida contracção de volume dos pellets.

Ainda para dar continuidade à avaliação da contracção devida à proporção dos componentes na formulação, foram definidas formulações com menor quantidade de hidroxiapatite modificada e maior quantidade de CMC. Tendo em conta que a CMC é capaz de absorver e reter uma grande quantidade de água devido à sua grande área de superfície e alta porosidade interna,^{33,51} nestas formulações foi aumentada a quantidade de água.

Com as fieiras de 1 mm manteve-se a utilização dos três tamanhos de partícula da CMC, com as restantes fieiras utilizou-se apenas a CMC de 180µm e 50µm.

Ao comparar os resultados de tamanho de partícula após sinterização para os pellets produzidos com a fieira de 1 mm verifica-se que a menor quantidade de hidroxiapatite modificada permitiu obter pellets de menor dimensão. Este resultado está de acordo com o esperado uma vez que após remoção da celulose da estrutura do pellet, o único componente da formulação inicial presente é a hidroxiapatite modificada.

Relativamente aos restantes pellets, foi possível verificar a redução do tamanho dos pellets na sequência da sinterização e que, o tamanho de partícula da CMC não tem um impacto significativo no tamanho final do pellet.

5.2. Produção de pellets à base de hidroxiapatite

O trabalho prosseguiu com o fabrico de pellets contendo na formulação CMC, hidroxiapatite e cloreto de sódio. Conforme referido anteriormente, o cloreto de sódio foi incluído na formulação para promover a obtenção de poros uma vez que a CMC seria removida da estrutura a menores temperaturas e que este tem a sua temperatura de fusão de 804°C. Ao realizar o processo em duas etapas, considerou-se a possibilidade de o cloreto de sódio promover a criação de poros de diferentes dimensões no interior da estrutura (razão pela qual se utilizaram diferentes granulometrias desta matéria-prima) e/ou algum favorecimento das conexões entre os poros deixados pelos materiais orgânicos volatilizados na primeira etapa.

Todas as formulações permitiram a obtenção de um extrudido de boa qualidade, sendo possível verificar que dentro de uma mesma formulação se verifica uma redução da força de

extrusão com o aumento do diâmetro da fieira. Em parte esta situação pode dever-se a redução da velocidade de extrusão, mas também ao diâmetro da fieira utilizada. Também existe uma redução acentuada das forças de compressão quando existe inversão da proporção de cloreto de sódio e CMC passando esta última a estar presente em menor quantidade.

No processo de esferonização, as formulações correspondentes às fieiras de 1 e 3 mm não permitiram uma esferonização completa ficando com alguns pellets oblongos e existindo alguma aglomeração nos de 1 mm.

Relativamente às fieiras de 6 e 9 mm, foi possível realizar a esferonização tendo sido originados pellets tendencialmente esféricos.

As amostras mais representativas foram sinterizadas sendo possível verificar que se obteve uma porosidade calculada muito baixa após a sinterização e que não se verifica uma diferença muito significativa entre a sinterização realizada até 1000°C e a sinterização realizada a 1200°C. Verificou-se que os pellets sinterizados apresentavam uma fragilidade elevada. A fragilidade dos pellets sinterizados está de acordo com estudos realizados anteriormente que revelam que a elevadas temperaturas a hidroxiapatite pode sofrer decomposição por eliminação do grupo funcional OH da matriz de hidroxiapatite (desidratação) e com isso levar à decomposição da fase de hidroxiapatite para formar α TCP, β TCP e fosfato tetracálcico (TTCP)²⁸ e, conseqüentemente, resultar em fracas propriedades mecânicas, com uma fraca resistência. A taxa de decomposição aumenta com a temperatura de sinterização.⁵² Os 1200°C utilizados não deveriam provocar uma grande extensão de degradação da hidroxiapatite, no entanto, não foi realizada qualquer análise às fases de hidroxiapatite presentes (por exemplo por difração raios X) e por isso não foi possível avaliar a causa da fragilidade observada. Muralithran²⁸ refere que a temperatura óptima de sinterização encontrada no seu estudo foi de 1250°C e que a decomposição da hidroxiapatite foi verificada em amostras acima dos 1350°C. A sinterização a temperaturas inferiores, originava, conforme esperado, densidades mais baixas e, simultaneamente, o aumento da temperatura acima de 1400°C resultava numa redução da densidade por decomposição severa.²⁸

Recorrendo apenas à observação visual dos pellets, esta estratégia de inclusão do cloreto de sódio parece ter resultado. No entanto, os resultados obtidos para a porosidade não o confirmam. Pode ser colocada a hipótese de os pellets não terem sido devidamente pulverizados para determinação da densidade calculada a aplicar na Equação 1 mas o erro

associado a esta eventual pulverização incompleta, não seria suficiente para alterar o resultado para valores muito altos de porosidade como os que se procuravam com a realização deste trabalho. Por outro lado, existiu um aumento de densidade tal como tinha sido observado nos estudos preliminares. Da avaliação dos resultados obtidos, é possível ainda concluir que a introdução do cloreto de sódio nos pellets preveniu o colapso da estrutura, uma vez que não se observa uma redução de tamanho da mesma ordem de grandeza do observado nos estudos iniciais ou em outros estudos realizados com estruturas sinterizadas de hidroxiapatite.

Não se tendo identificado qualquer relação entre formulações e/ou temperatura de sinterização e a redução significativa de porosidade com a sinterização, é difícil relacionar este resultado em simultâneo com os resultados de densidade e tamanhos de partícula.

Da observação das imagens dos pellets sinterizados, quer pela observação visual, quer através de MEV para avaliação da morfologia interna e da superfície dos pellets, conclui-se que parece existir porosidade e que esta é maior nas formulações que utilizaram o cloreto de sódio de maiores dimensões.

A utilização do cloreto de sódio não é conclusiva relativamente ao seu efeito na porosidade dos pellets, existem contudo outras estratégias para a obtenção de diferentes porosidades descritas na literatura e que apresentaram resultados mais conclusivos. Palazzo⁴ descreveu ser possível fabricar estruturas porosas de hidroxiapatite recorrendo a esponjas celulósicas. Estas estruturas foram fabricadas mergulhando as esponjas numa suspensão de hidroxiapatite que tinha sido preparada com água e um agente dispersante. Após tratamento ultrassónico, e após mergulho completo das esponjas, estas foram decantadas, secas ao ar e sinterizadas a 1250°C. Através da utilização de hidroxiapatite de diferente cristalinidade e variando a sua percentagem e a do agente dispersante, foi também possível obter diferentes porosidades.⁴

5.3. Avaliação da capacidade de inclusão de um fármaco modelo (ibuprofeno) na estrutura dos pellets produzidos

Tal como descrito noutros trabalhos¹⁷, o controlo da rampa de temperatura no processo de sinterização é importante pelo que se consideraram para a inclusão da substância activa apenas pellets sinterizados a 1200°C com controlo das várias rampas de temperatura e patamares.

Ainda que não tenha sido determinada a resistência ao esmagamento dos pellets produzidos, é importante referir como observação que durante a manipulação dos pellets se verificou que os obtidos após sinterização a 1000°C (principalmente os correspondentes a granulometrias superiores do cloreto de sódio) eram muito mais friáveis do que os obtidos após a sinterização a 1200°C.

No que diz respeito ao doseamento e ao ensaio de dissolução verifica-se que quantidades variáveis de ibuprofeno foram colocadas nos pellets tendo os pellets com maior quantidade de cloreto de sódio na proporção cloreto de sódio/CMC, apresentado doseamentos ligeiramente inferiores aos outros. No entanto, não é possível relacionar a capacidade de inclusão de substância activa com a porosidade dos pellets. Adicionalmente, a elevada libertação de ibuprofeno no início do ensaio de dissolução sugere que este deverá ter ficado à superfície dos pellets e não terá sido incorporado em poros interiores numa extensão aceitável. Também Palazzo⁴ descreveu que num estudo em que o fármaco foi incorporado pela impregnação de uma solução aquosa do mesmo até secagem numa libertação inicial elevada (como a verificada neste trabalho) revelava que uma grande parte do fármaco se encontrava presente nos macroporos das paredes do material cerâmico.

Os pellets fabricados no presente trabalho demonstraram a capacidade de libertar a substância activa e permanecerem intactos após o ensaio de dissolução sem que se tenham desintegrado. Chevalier⁶ verificou que a incorporação de substância activa melhorou as propriedades mecânicas do material o que pode ser um factor favorável à implantação dos materiais biocerâmicos porosos nas cavidades ósseas defeituosas. Um outro estudo recente em que o ibuprofeno foi incorporado, com recurso a uma solução de hexano, em comprimidos de hidroxiapatite refere que a interacção entre o ibuprofeno e a superfície da hidroxiapatite deverá ser consequência do estabelecimento ligações de hidrogénio entre os grupos carboxilo do ibuprofeno e os grupos OH da superfície da estrutura de hidroxiapatite.⁵³

Noutros estudos anteriores, os pellets obtidos foram impregnados de ibuprofeno pelo método de evaporação de solvente.⁴⁶ Este método é vantajoso em relação ao utilizado no presente trabalho porque permite saber qual a quantidade de ibuprofeno incorporado nos pellets, mas tem como desvantagem a utilização de solventes orgânicos que foram evitados neste trabalho devido à sua toxicidade.

6. CONCLUSÕES

O estudo realizado demonstrou que:

- foi possível produzir pellets à base de hidroxiapatite com diferentes dimensões, desde 1 mm até 9 mm de diâmetro;
- a sinterização resultou num aumento da densidade dos pellets;
- a inclusão de cloreto de sódio nos pellets preveniu o colapso das suas estruturas após sinterização;
- os pellets fabricados apresentaram limitações de manipulação devido a fraca resistência mecânica;
- não foi possível produzir estruturas macroporosas com as formulações e métodos executados;
- se verificou a existência de substância activa nos pellets, ainda que os dados obtidos sugiram que as formulações de pellets propostas e o método utilizado para a sua incorporação apenas permitiram o revestimento exterior dos pellets com a substância activa;

7. TRABALHO FUTURO

Tendo em consideração os resultados obtidos neste trabalho e outros descritos na literatura é importante continuar os estudos de fabrico de pellets de hidroxiapatite com porosidade controlada pelo que, como perspectiva futura:

- deve ser aprofundado o efeito do cloreto de sódio com diferentes granulometrias utilizado neste trabalho, uma vez que a sua inclusão parece ter tido um papel importante na prevenção da contracção da estrutura dos pellets sinterizados. Além disso, o cloreto de sódio tem sido utilizado como sistema modelo para a investigação do comportamento na sinterização e o cloreto de sódio sinterizado é utilizado no fabrico de metais ou cerâmicos altamente porosos recorrendo a um outro processo - processo de replicação⁵⁴ pelo que, o seu uso deverá ser mais explorado;
- deve ser dada continuidade à procura de melhores propriedades mecânicas uma vez que a fraca resistência observada pode ser um obstáculo à manipulação normal dos pellets;
- na procura de uma melhor resposta clínica, também devem ser considerados e combinados outros estudos que demonstraram que a utilização de corpos porosos de hidroxiapatite polarizada é um método promissor para um rápido crescimento ósseo e completo do osso já que parece existir uma interacção cooperativa entre a osteocondutividade da hidroxiapatite porosa e a actividade celular osteogénica aumentada pela carga na superfície interna dos poros da hidroxiapatite polarizada;¹⁹
- a sinterização por microondas é uma alternativa à sinterização convencional,¹⁴ e pode ser também uma técnica a considerar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrère F, Mahmood TA, de Groot K, van Blitterswijk CA 2008. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 59(1-6):38-71.
2. Gutierrez M, Lopes MA, Hussain NS, Cabral AT, Almeida L, Santos JD 2006. Substitutos Ósseos - Conceitos Gerais e Estado Actual. *Arquimede* 19(4):153-162.
3. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E 2010. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* 35(4):403-440.
4. Palazzo B, Sidoti MC, Roveri N, Tamperi A, Sandri M, Bertolazzi L, Galbusera F, Dubini G, Vena P, Contro R 2005. Controlled drug delivery from porous hydroxyapatite grafts: An experimental and theoretical approach. *Materials Science and Engineering* 25:207 - 213.
5. Jones JR, Hench LL 2003. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 7(4-5):301-307.
6. Chevalier E, Viana M, Cazalbou S, Makein L, Dubois J, Chulia D 2010. Ibuprofen-loaded calcium phosphate granules: Combination of innovative characterization methods to relate mechanical strength to drug location. *Acta Biomaterialia* 6(1):266-274.
7. Desai S, Bidanda B, Bártolo P. 2008. Metallic and Ceramic Biomaterials: Current and Future Developments. In Bártolo P, Bidanda B, editors. *Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine*, ed.: Springer. p 1-14.
8. Habraken WJEM, Wolke JGC, Jansen JA 2007. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59:234-248.
9. Kanczler JM, Oreffo ROC 2008. Osteogenesis and Angiogenesis: The Potential for Engineering Bone. *European Cell and Materials* 15:100-114.
10. Vallet-Regí M, González-Calbet JM 2004. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry* 32(1-2):1-31.
11. Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de Junho. Disponível em <http://drept/sug/1s/diplomasasp>; Consultado em 07/01/2012.
12. Kasemo B, Gold J 1999. Implant Surfaces and Interface Processes. *Advanced Dental Research* 13:8-20.
13. Koshino T, Murase T, Takagi T, Saito T 2001. New bone formation around porous hydroxyapatite wedge implanted in opening wedge high tibial osteotomy in patients with osteoarthritis. *Biomaterials* 22(12):1579-1582.
14. Dorozhkin SV 2010. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* 31(7):1465-1485.
15. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL 2004. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromolecular Bioscience*:743-765.
16. Junqueira LC, Carneiro J. 2008. *Histologia Básica*, 11ª ed.: Editora Guanabara Koogan, S.A. p 135 - 152.

17. Prokopiev O, Sevostianov I 2006. Dependence of the mechanical properties of sintered hydroxyapatite on the sintering temperature. *Materials Science and Engineering: A* 431(1-2):218-227.
18. Hing KA, Wilson LF, Buckland T 2007. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *The Spine Journal* 7(4):475-490.
19. Wang W, Itoh S, Tanaka Y, Nagai A, Yamashita K 2009. Comparison of enhancement of bone ingrowth into hydroxyapatite ceramics with highly and poorly interconnected pores by electrical polarization. *Acta Biomaterialia* 5(8):3132-3140.
20. Prado da Silva MH, Lemos AF, Ferreira JMF, Santos JD 2003. Mechanical Characterisation of Porous Glass Reinforced Hydroxyapatite Ceramics - Bonelike. *Materials Research* 6(3):321-325.
21. Tadic D, Beckmann F, Schwarz K, Epple M 2004. A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering. *Biomaterials* 25(16):3335-3340.
22. Wang P, Li C, Gong H, Jiang X, Wang H, Li K 2010. Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process. *Powder Technology* 203(2):315-321.
23. Hench LL, Polack JM 2002. Third-Generation Biomedical Materials. *Science* 295:1016 - 1017.
24. Prado da Silva MH, Lemos AF, Ferreira JMF, Lopes MA, Santos JD 2002. Production of porous biomaterials based on glass reinforced hydroxyapatite composites. *Key Engineering Materials* 230-232:483-486.
25. Knowles JC, Talal S, Santos JD 1996. Sintering effects in a glass reinforced hydroxyapatite. *Biomaterials* 17(14):1437-1442.
26. Santos JD, Knowles JC, Reis RL, Monteiro FJ, Hastings GW 1994. Microstructural characterization of glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Biomaterials* 15(1):5-10.
27. Ginebra MP, Traykova T, Planell JA 2006. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *Journal of Controlled Release* 113(2):102-110.
28. Muralithran G, Ramesh S 2000. The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite. *Ceramics International* 26(2):221-230.
29. Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF 2001. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* 22(1):87-96.
30. Anselme K 2000. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21(7):667-681.
31. Lustig-Gustafsson C, Kaur Johal H, Podczeczek F, Newton JM 1999. The influence of water content and drug solubility on the formulation of pellets by extrusion and spheronisation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 8(2):147-152.
32. Vervaet C, Baert L, Remon JP 1995. Extrusion-spheronisation A literature review. *International Journal of Pharmaceutics* 116(2):131-146.

33. Dukic-Ott A, Thommes M, Remon JP, Kleinebudde P, Vervaet C 2009. Production of pellets via extrusion-spheronisation without the incorporation of microcrystalline cellulose: A critical review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71(1):38-46.
34. Ghebre-Sellassie I. 1989. *Pharmaceutical Pelletization Technology*. ed., New York and Basel: Marcel Dekker, Inc. p 71 - 99; 123 - 141; 187 - 215; 241-265.
35. Hirjau M, Nicoara AC, Hirjau V, Lupuleasa D 2011. Pelletization Techniques used in Pharmaceutical Fields. *Practica Farmaceutica* 4:206 - 211.
36. Santos HMM, Veiga FJB, de Pina MET, de Sousa JJMS 2004. Obtenção de Pellets por Extrusão e Esferonização Farmacêutica. Parte I. Avaliação das variáveis tecnológicas e de formulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 40(4):455-470.
37. Mehta KA, Rekh GS, Parikh DM. 2005. Extrusion/Spheronization as a Granulation Technique. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*, ed.: Taylor & Francis Group, LLC. p 333-365.
38. Pinto JF, Lameiro MH, Martins P 2001. Investigation on the co-extrudability and spheronization properties of wet masses. *International Journal of Pharmaceutics* 227(1-2):71-80.
39. Chohan RK, Newton JM 1996. Analysis of extrusion of some wet powder masses used in extrusion/spheronisation. *International Journal of Pharmaceutics* 131(2):201-207.
40. Nakahara N October 1966. US Patent 3277520. Disponível em <http://www.freepatentsonline.com/3277520pdf>; Consultado a 07/01/2012.
41. Sousa JJ, Sousa A, Podczeczek F, Newton JM 2002. Factors influencing the physical characteristics of pellets obtained by extrusion-spheronization. *International Journal of Pharmaceutics* 232(1-2):91-106.
42. Jerwanska E, Alderborn G, Newton JM, Nyström C 1995. The effect of water content on the porosity and liquid saturation of extruded cylinders. *International Journal of Pharmaceutics* 121(1):65-71.
43. Newton JM, Chapman SR, Rowe RC 1995. The influence of process variables on the preparation and properties of spherical granules by the process of extrusion and spheronisation. *International Journal of Pharmaceutics* 120(1):101-109.
44. Prieto SA, Méndez JB, Espinar FJO 2005. Starch-dextrin mixtures as base excipients for extrusion-spheronization pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 59:511 - 521.
45. Santos HMM, Veiga FJB, de Pina EMST, de Sousa JJMS 2006. Obtenção de Pellets por Extrusão e Esferonização Farmacêutica. Parte II. Avaliação das características físicas de pellets. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 42(3):309-318.
46. Baradari H, Damia C, Maggy D-C, Champion E 2011. β -TCP porous pellets as an orthopaedic drug delivery system: ibuprofen/carrier physicochemical interactions. *Science and Technology of advanced Materials* 12:1 - 10.

47. Cosijns A, Vervaet C, Luyten J, Mullens S, Siepmann F, Van Hoorebeke L, Masschaele B, Cnudde V, Remon JP 2007. Porous hydroxyapatite tablets as carriers for low-dosed drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67(2):498-506.
48. Queiroz AC, Teixeira S, Santos JD, Monteiro FJ 2004. Production of Porous Hydroxyapatite with Potential for Controlled Drug Delivery. *Materials Science Forum* 455-456:358-360.
49. European Pharmacopoeia 7.0, 2011. ed.: Council of Europe.
50. Sinha VR, Agrawal MK, Kumria R 2005. Influence of Formulation and Excipient Variables on the Pellet Properties prepared by Extrusion Spheronization. *Current Drug Delivery* 2:1-8.
51. Tripurasundari P, Prabhakar B 2012. Review on the production of pellets via extrusion-spheronization exclusive of microcrystalline cellulose. *International Journal of Pharmacy Review & Research* 2(1):1-10.
52. Yang C, Guo Y-k, Zhang M-l 2010. Thermal decomposition and mechanical properties of hydroxyapatite ceramic. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 20(2):254-258.
53. Oner M, Yetiz E, Ay E, Uysal U 2011. Ibuprofen release from porous hydroxyapatite tablets. *Ceramics International* 37:2117 - 2125.
54. Goodall R, Despois JF, Mortensen A 2006. Sintering of NaCl powder: Mechanisms and first stage kinetics. *Journal of the European Ceramic Society* 26(16):3487-3497.

9. ANEXOS

9.1. Curva de calibração (solução de ibuprofeno)

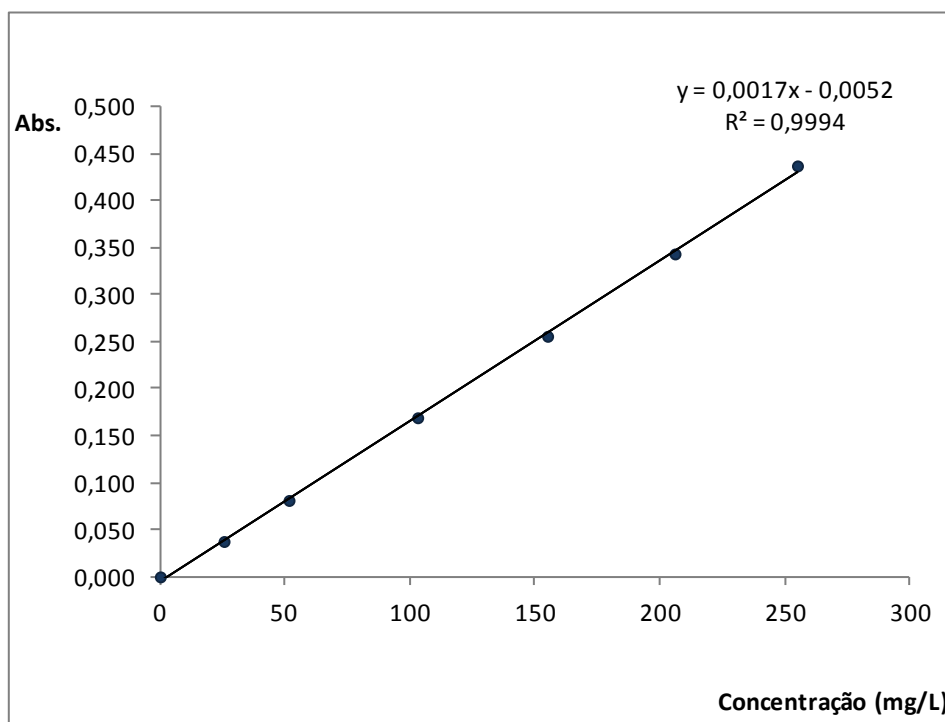


Figura 9.1.1. Curva de calibração ibuprofeno em tampão fosfato pH=7,2 ($\lambda=264$ nm).

9.2. Tamanho de partícula (formulações C20_HA[50]_V4_L/D4_1; C50_HA[50]_V4_L/D4_1 e C180_HA[50]_V4_L/D4_1)

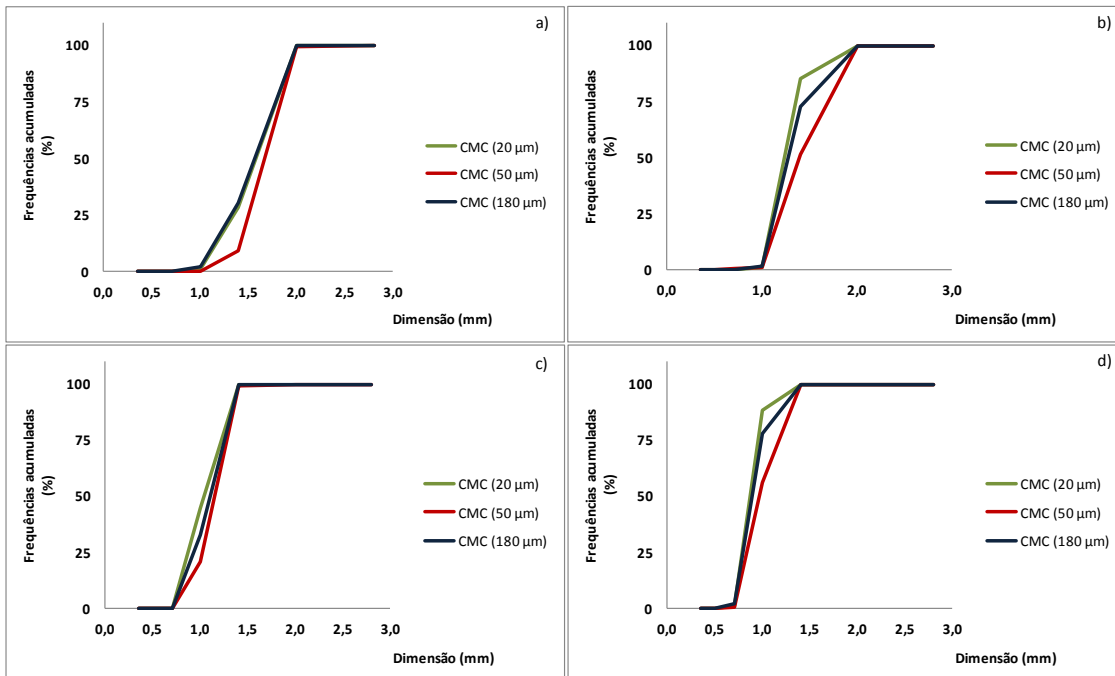


Figura 9.2.1. Distribuição de tamanho dos pellets fabricados com a fieira de 1 mm de diâmetro (frequências acumuladas).

- Antes da sinterização
- Após aquecimento a 600°C
- Após sinterização a 1000°C
- Após sinterização a 1300°C

9.3. Perfis de extrusão (força *versus* deslocamento)

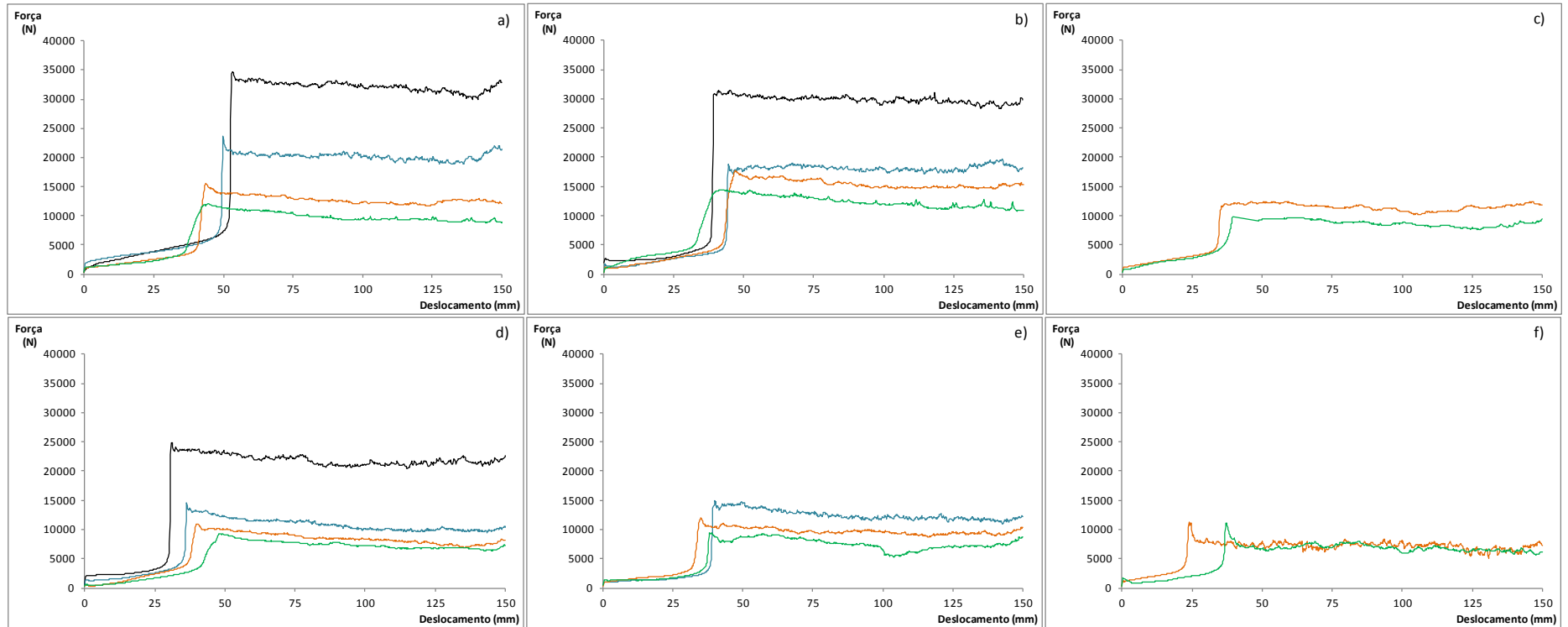


Figura 9.3.1. Perfis de extrusão.

- a) Formulações F1_S15_A, F3_F15_A, F6_S15_A e F9_S15_A
- b) Formulações F1_S15_B, F3_F15_B, F6_S15_B e F9_S15_B.
- c) Formulações F6_S15_C e F9_S15_C.
- d) Formulações F1_S40_A, F3_F40_A, F6_S40_A e F9_S40_A.
- e) Formulações F3_S40_A, F6_F40_A e F9_S40_A.
- f) Formulações F6_S40_A e F9_S40_A.

A preto a feira de 1 mm, a azul a feira de 3 mm, a laranja a feira de 6 mm e a verde a feira de 9 mm.

9.4. Tamanho de partícula (formulações com hidroxiapatite e cloreto de sódio)

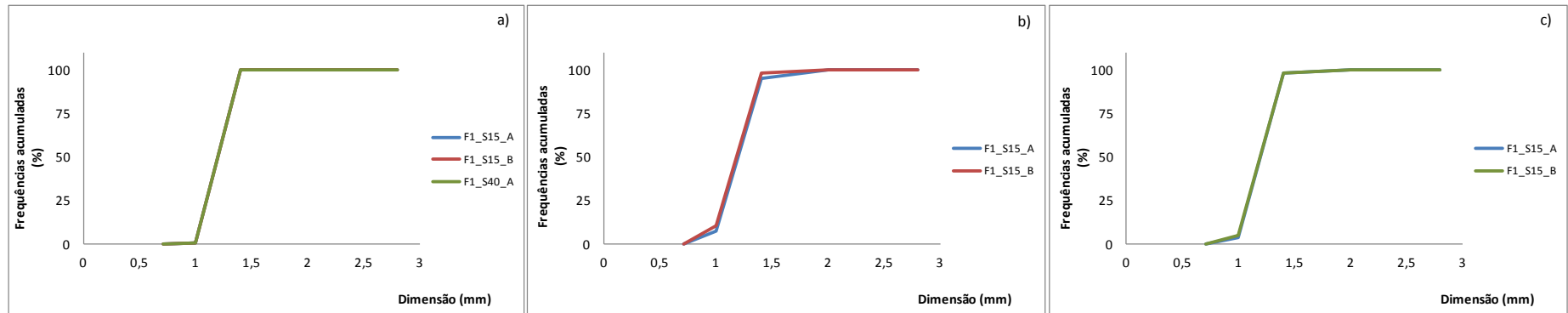


Figura 9.4.1. Tamanho dos pellets fabricados com a feira de 1 mm antes da sinterização (a) e após sinterização a 1000°C (b) e a 1200°C (c).

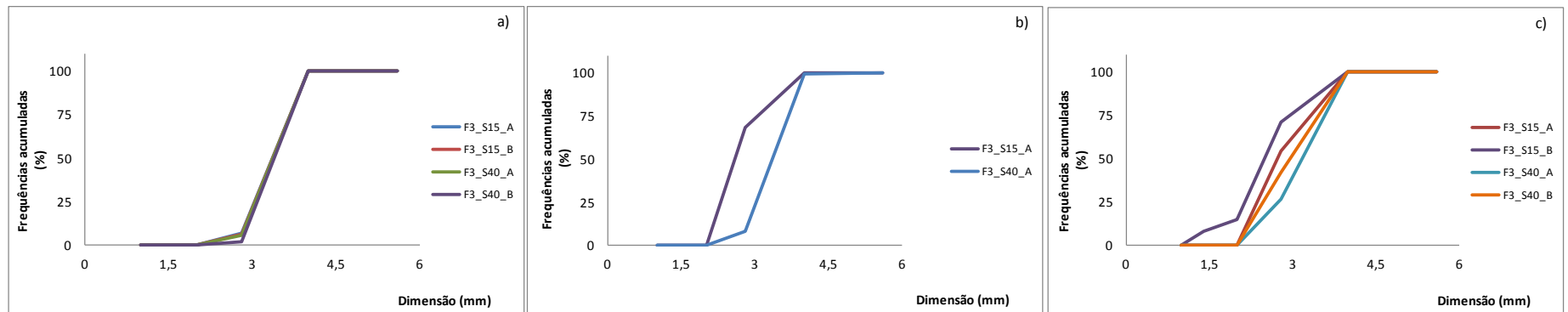


Figura 9.4.2. Tamanho dos pellets fabricados com a feira de 3 mm antes da sinterização (a) e após sinterização a 1000°C (b) e a 1200°C (c).

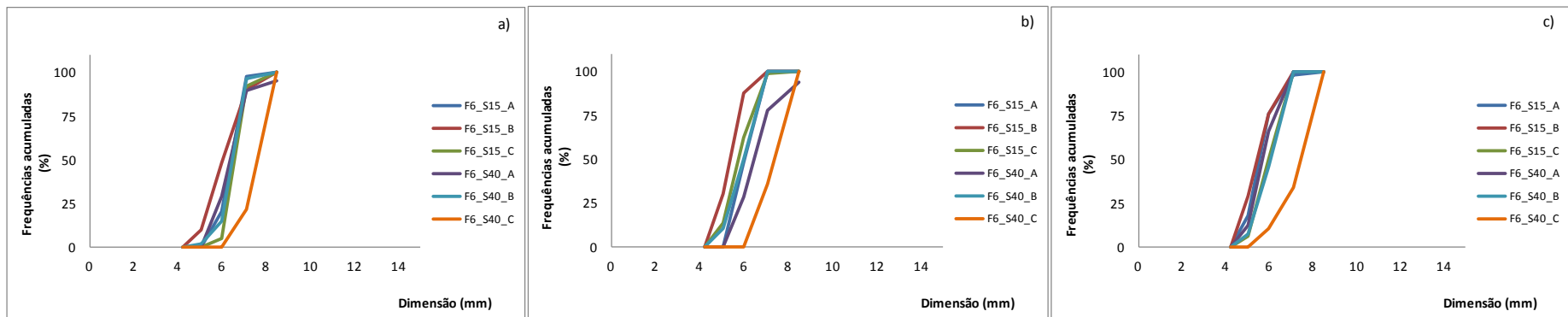


Figura 9.4.3. Tamanho dos pellets fabricados com a fieira de 6 mm antes da sinterização (a) e após sinterização a 1000°C (b) e a 1200°C (c).

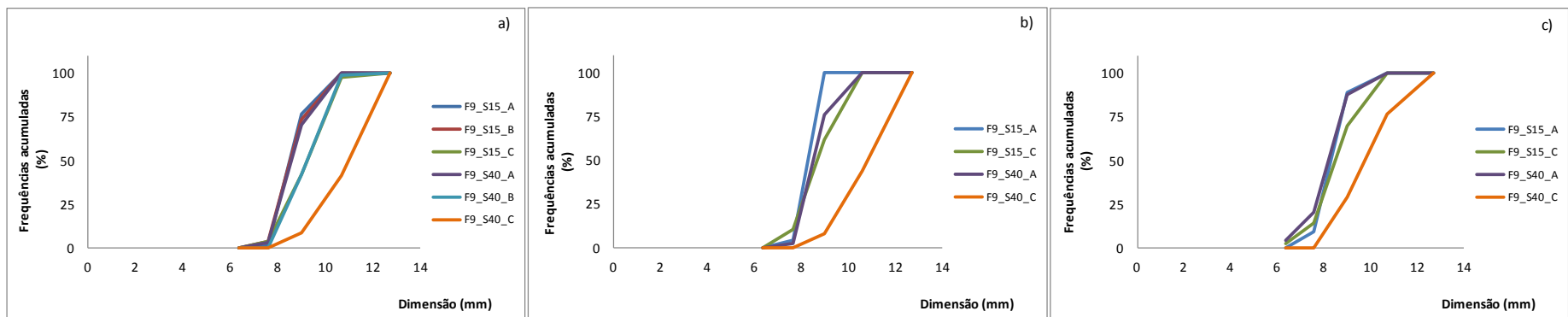


Figura 9.4.4. Tamanho dos pellets fabricados com a fieira de 9 mm antes da sinterização (a) e após sinterização a 1000°C (b) e a 1200°C (c).

9.5. Fotografias dos pellets produzidos antes e após sinterização

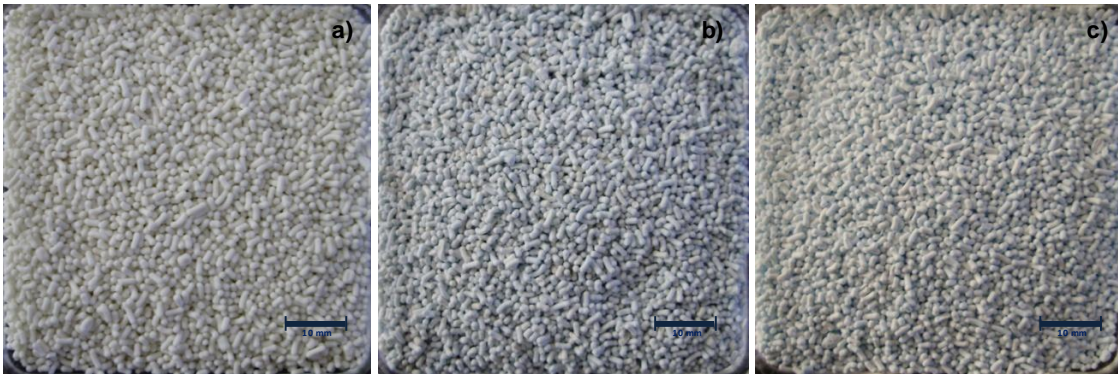


Figura 9.5.1. Imagem dos pellets da formulação F1_S15_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).



Figura 9.5.2. Imagem dos pellets da formulação F3_S15_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).



Figura 9.5.3. Imagem dos pellets da formulação F6_S15_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).

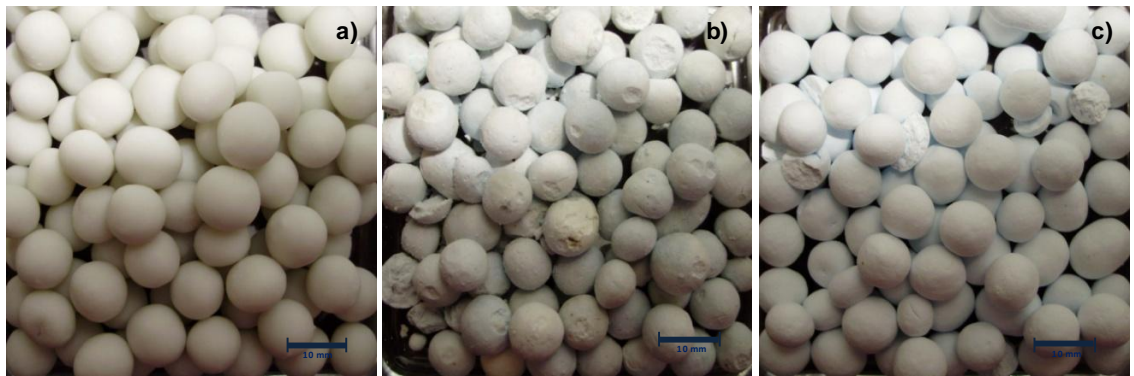


Figura 9.5.4. Imagem dos pellets da formulação F9_S15_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).



Figura 9.5.5. Imagem dos pellets da formulação F1_S15_B, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).



Figura 9.5.6. Imagem dos pellets da formulação F3_S15_B, antes da sinterização (a) e após sinterização a 1000°C (b).

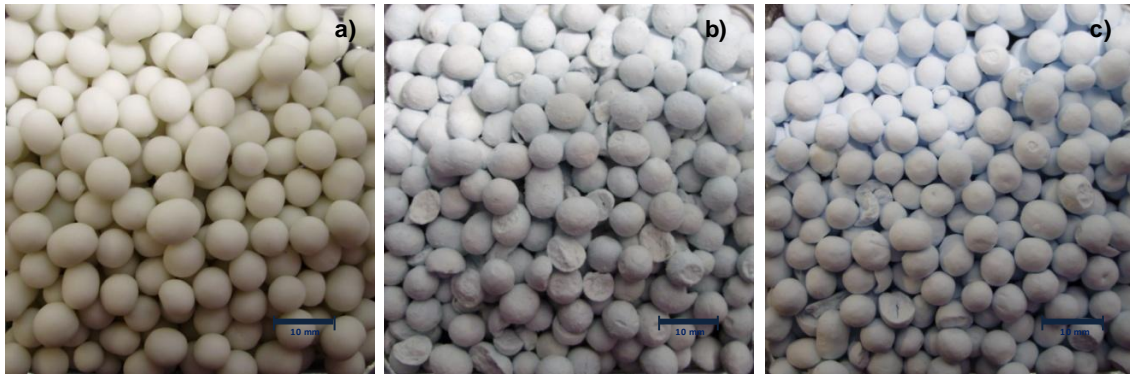


Figura 9.5.7. Imagem dos pellets da formulação F6_S15_B antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).

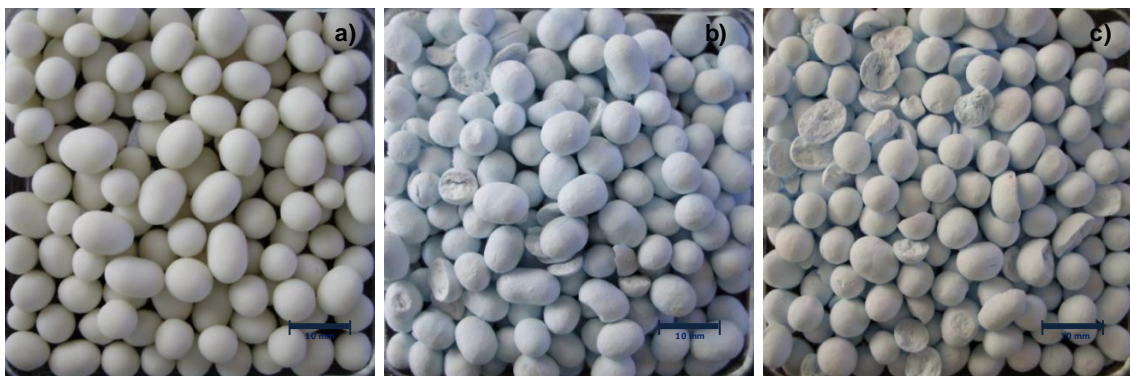


Figura 9.5.8. Imagem dos pellets da formulação F6_S15_C, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).

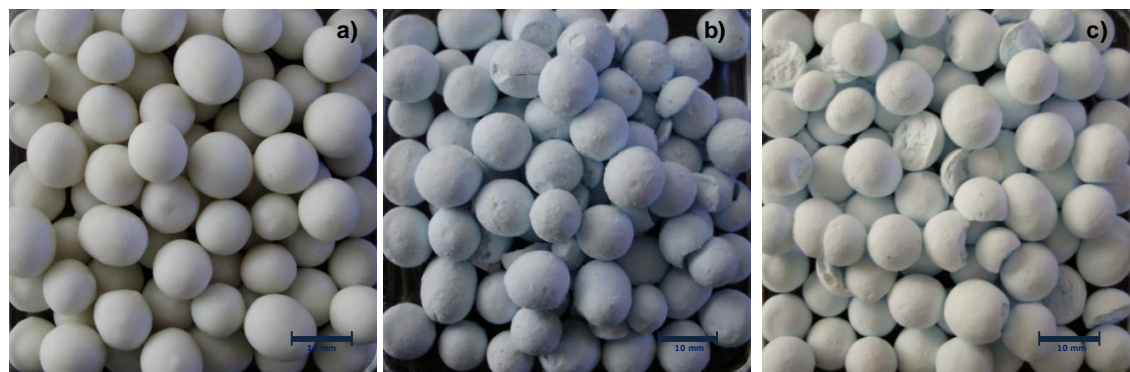


Figura 9.5.9. Imagem dos pellets da formulação F9_S15_C, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).

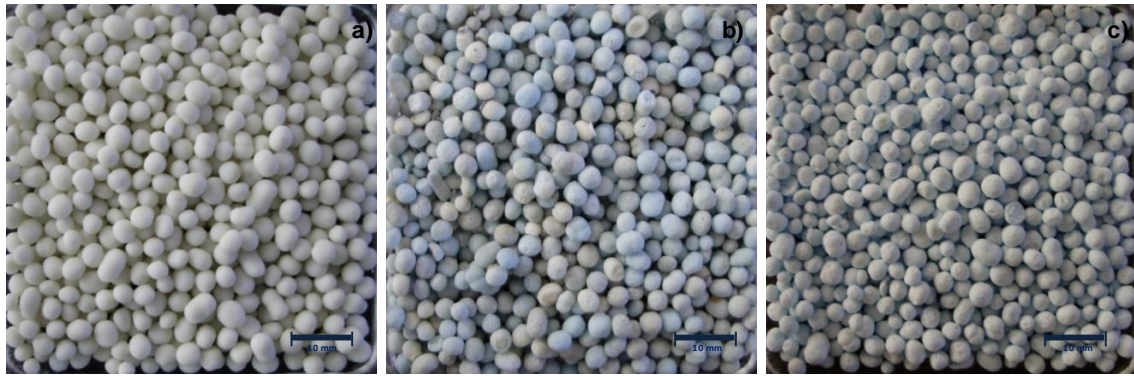


Figura 9.5.10. Imagem dos pellets da formulação F3_S40_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).



Figura 9.5.11. Imagem dos pellets da formulação F6_S40_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).

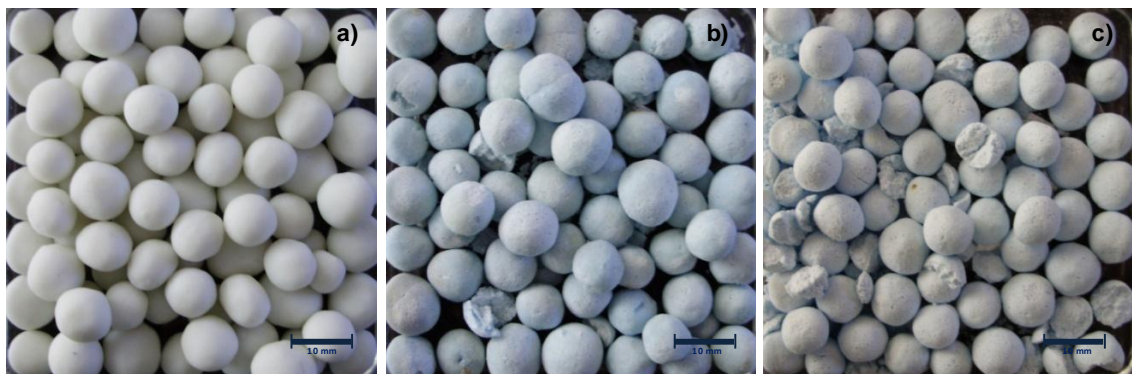


Figura 9.5.12. Imagem dos pellets da formulação F9_S40_A, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).



Figura 9.5.13. Imagem dos pellets da formulação F3_S40_B, antes da sinterização (a) e após sinterização a 1000°C (b).

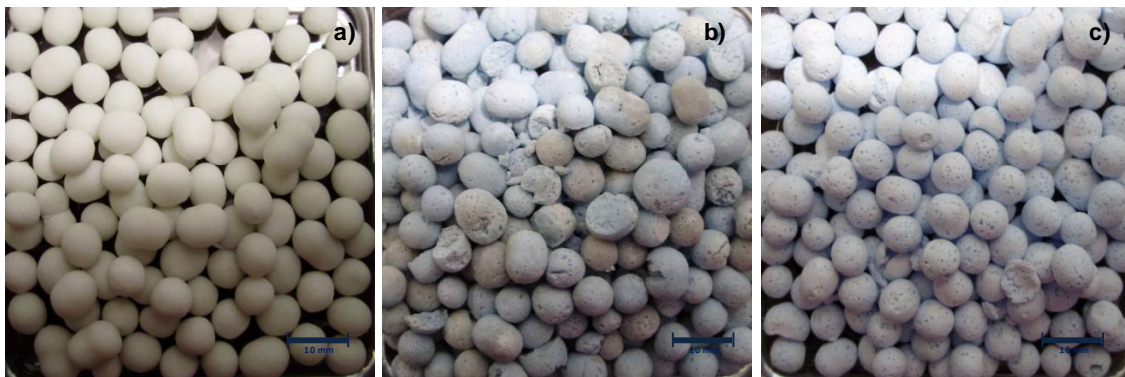


Figura 9.5.14. Imagem dos pellets da formulação F6_S40_B, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).



Figura 9.5.15. Imagem dos pellets da formulação F6_S40_C, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).



Figura 9.5.16. Imagem dos pellets da formulação F9_S40_C, antes da sinterização (a), após sinterização a 1000°C (b) e após sinterização a 1200°C (c).

9.6. Imagens dos pellets antes da sinterização

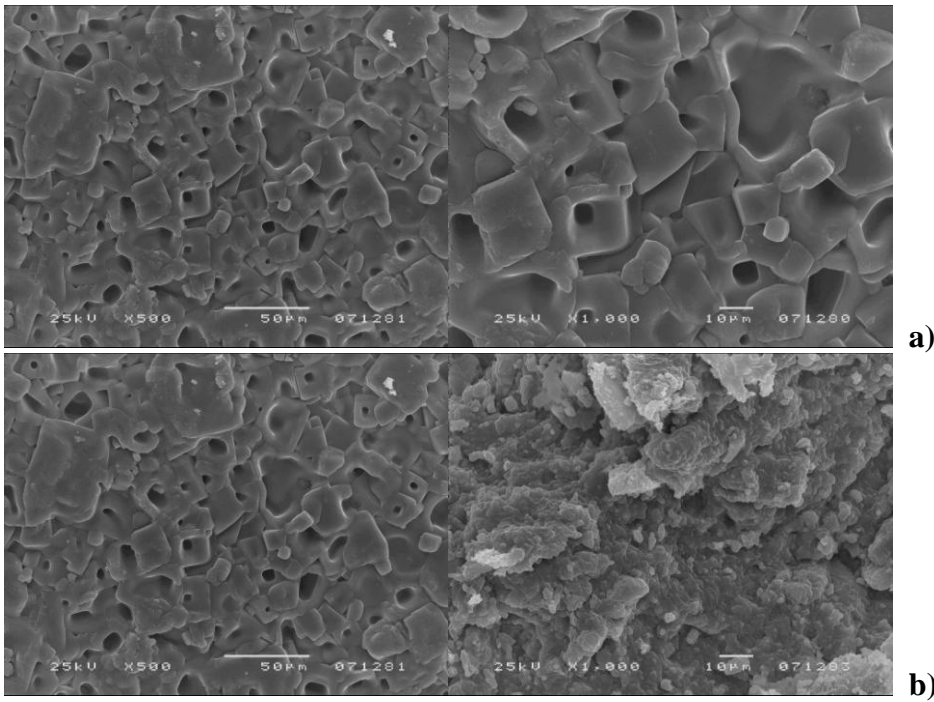


Figura 9.6.1. Imagem dos pellets da formulação F6_S15_C, obtida por MEV.

- a) superfície externa (ampliada a 500x e 1000x)
- b) superfície interna (ampliada a 500x e 1000x)

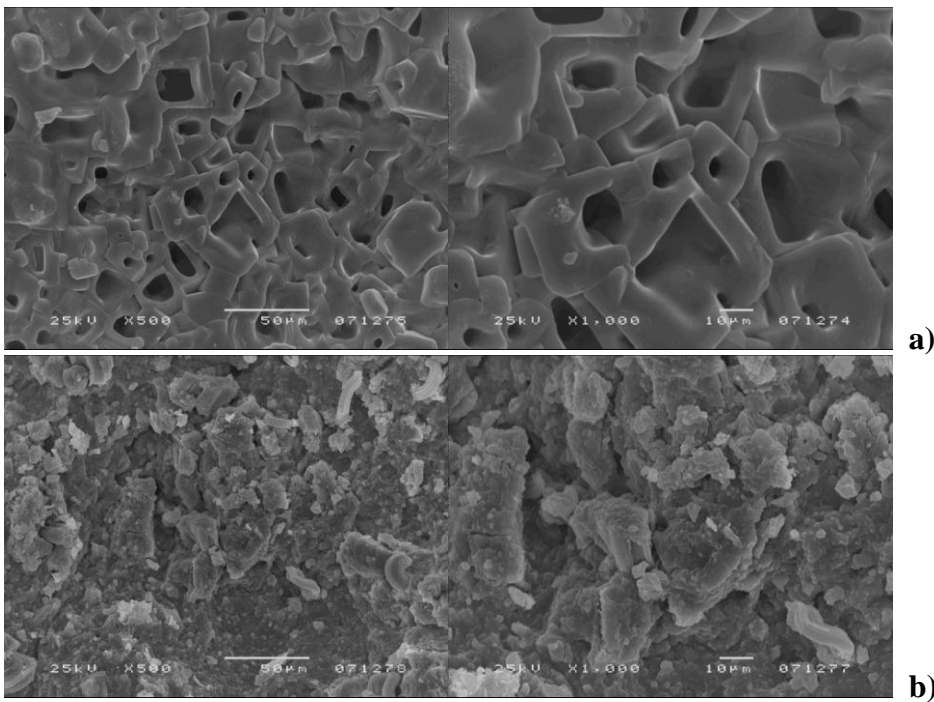


Figura 9.6.2. Imagem dos pellets da formulação F6_S40_A, obtida por MEV.

- a) superfície externa (ampliada a 500x e 1000x)
- b) superfície interna (ampliada a 500x e 1000x)

9.7. Imagens dos pellets sinterizados a 1200°C

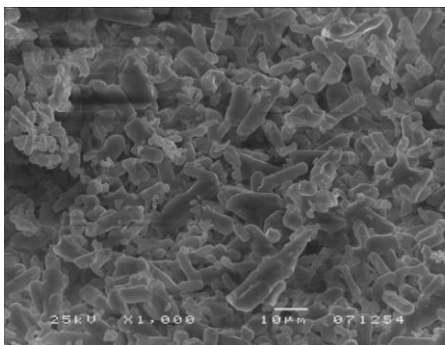


Figura 9.7.1. Imagem da superfície externa dos pellets da formulação F6_S15_A, obtida por MEV (ampliada 1000x).

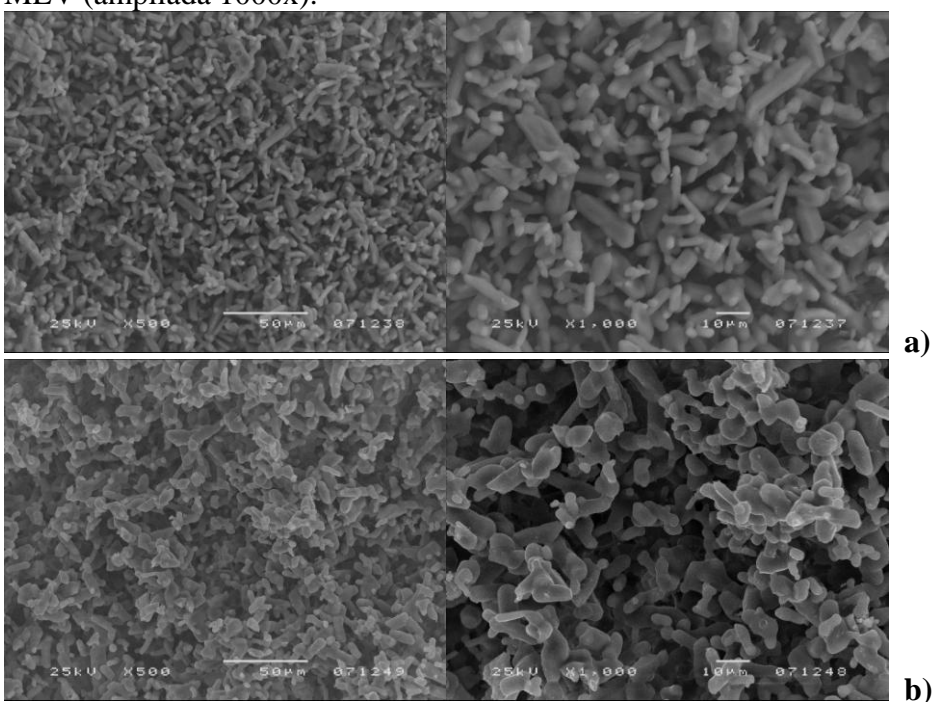


Figura 9.7.2. Imagem dos pellets da formulação F6_S15_B, obtida por MEV.

a) superfície externa (ampliada a 500x e 1000x)

b) superfície interna (ampliada a 500x e 1000x)

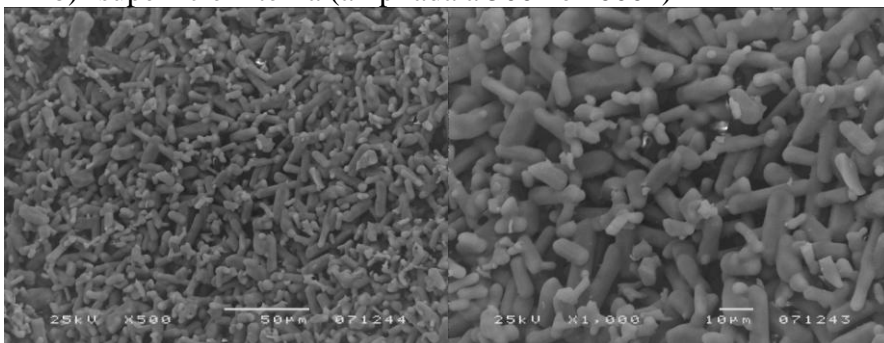


Figura 9.7.3. Imagem da superfície externa dos pellets da formulação F6_S15_C, obtida por MEV (ampliada a 500x e 1000x).

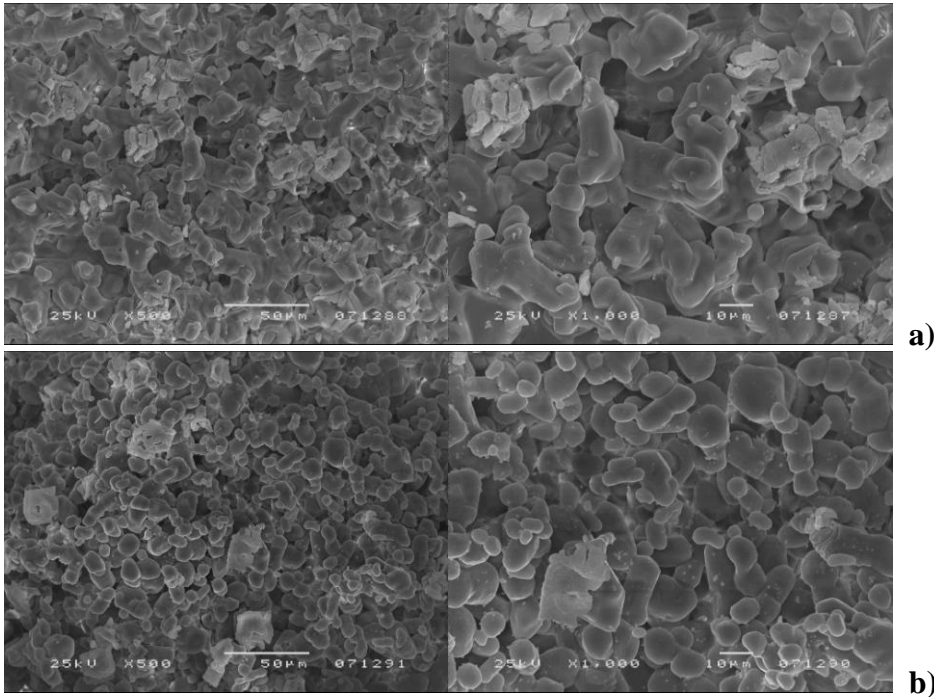


Figura 9.7.4. Imagem dos pellets da formulação F6_S40_A, obtida por MEV.

- a) superfície externa (ampliada a 500x e 1000x)
- b) superfície interna (ampliada a 500x e 1000x)

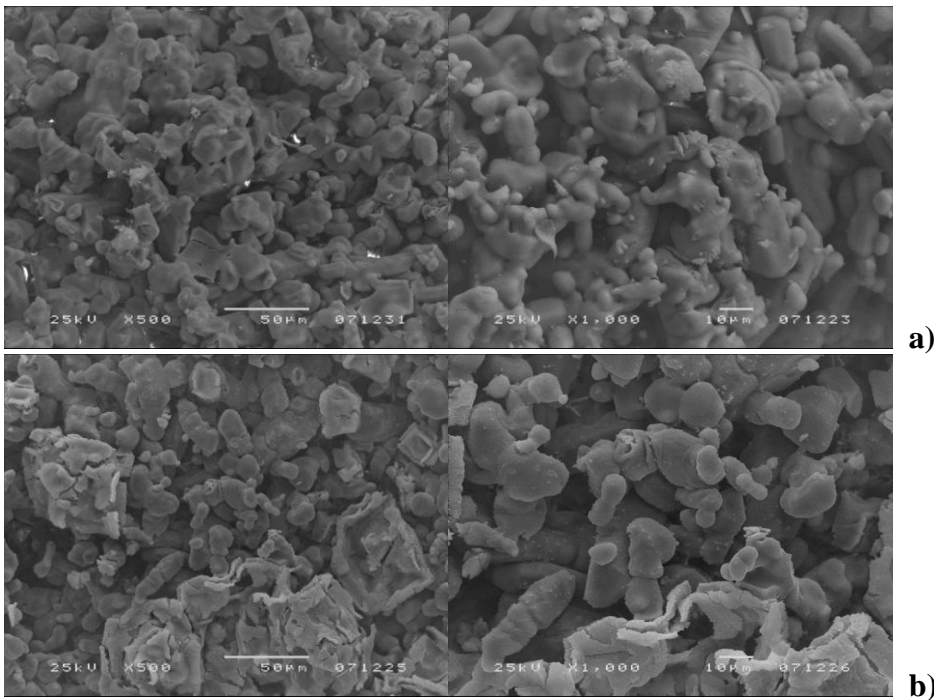


Figura 9.7.5. Imagem dos pellets da formulação F9_S40_A, obtida por MEV.

- a) superfície externa (ampliada a 500x e 1000x)
- b) superfície interna (ampliada a 500x e 1000x)

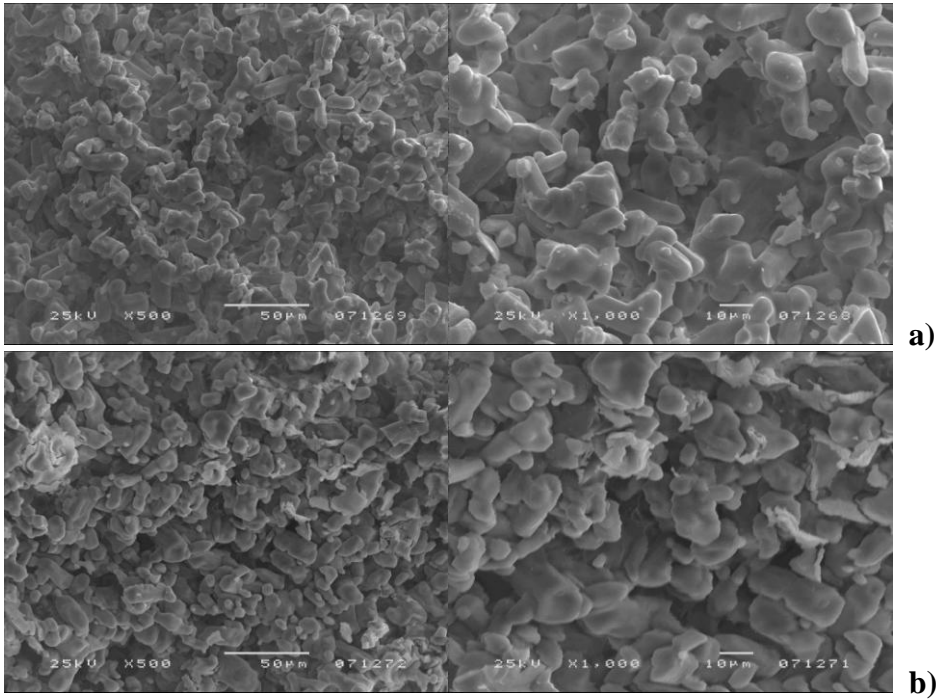


Figura 9.7.6. Imagem dos pellets da formulação F6_S40_B, obtida por MEV.

- a) superfície externa (ampliada a 500x e 1000x)
- b) superfície interna (ampliada a 500x e 1000x)

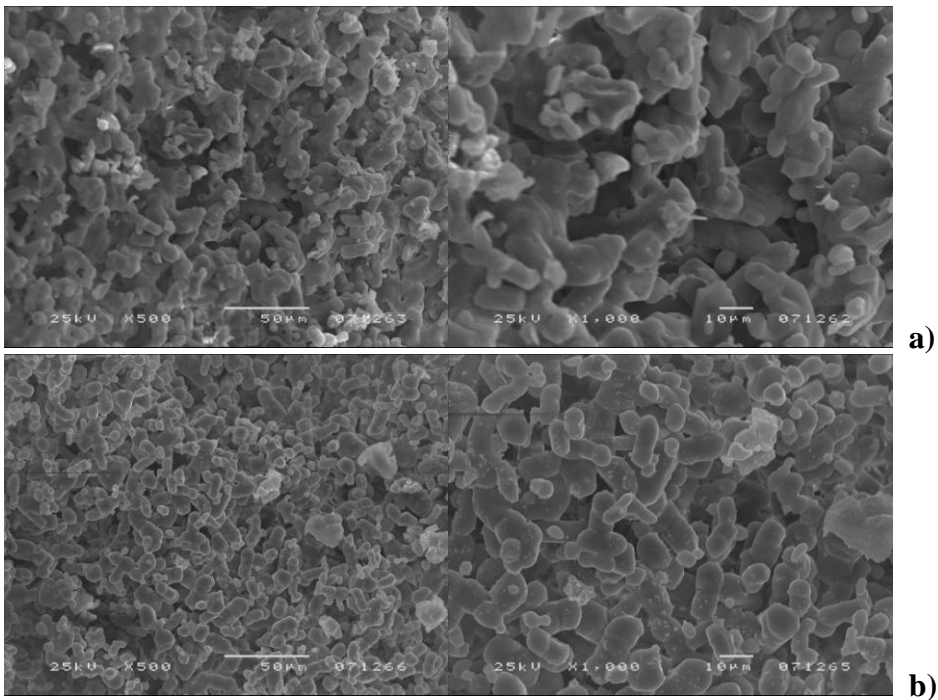


Figura 9.7.7. Imagem dos pellets da formulação F6_S40_C, obtida por MEV.

- a) superfície externa (ampliada a 500x e 1000x)
- b) superfície interna (ampliada a 500x e 1000x)

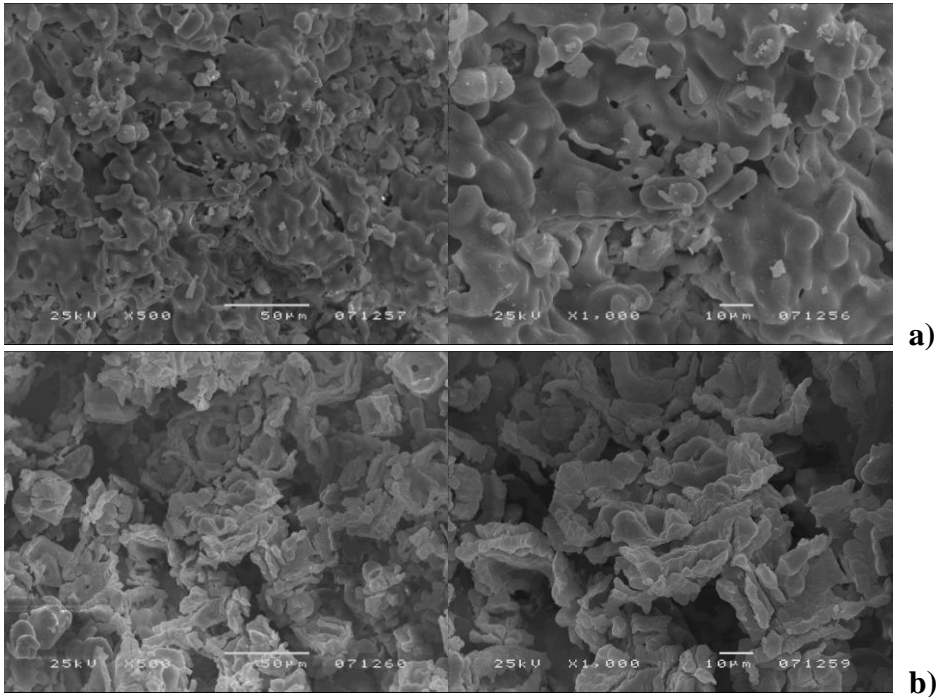


Figura 9.7.8. Imagem dos pellets da formulação F9_S40_C, obtida por MEV.

- a) superfície externa (ampliada a 500x e 1000x)
- b) superfície interna (ampliada a 500x e 1000x)

