

“ Estratégias verdes e biomiméticas para o desenvolvimento de materiais compósitos sílica/biopolímeros/biomoléculas para aplicações biomédicas e de Engenharia de tecidos ”

Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Mestrado Integrado de Engenharia Química

Rita Joana de Almeida Bento Chim

2009/2010

Tese de mestrado



Orientador: Doutor Hermínio José Cipriano de Sousa

Co-Orientador: Doutora Mara Elga Medeiros Braga

Orientanda: Rita Joana de Almeida Bento Chim

Coimbra, 13 de Setembro de 2010

“Pedras no meu caminho, guardo-as todas...

...um dia vou construir um castelo”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Ao terminar esta etapa da minha vida cumpre-me agradecer a todos que directamente ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço ao orientador Professor Doutor Hermínio Sousa, pela disponibilidade e por toda a sabedoria transmitida, mas principalmente pelo entusiasmo e dedicação demonstrados neste projecto. Agradeço ainda à co-orientadora, Doutora Mara Elga Braga, pelo apoio incondicional, por toda a disponibilidade no esclarecimento de todas as questões e ainda por toda a ajuda e conhecimentos que fui adquirindo ao longo deste trabalho. Sem este apoio não teria sido possível a sua realização.

Agradeço em especial à minha mãe pelo carinho e paciência e a todos os amigos indirectamente ou directamente influenciaram a realização deste mestrado.

Resta-me agradecer aos restantes professores e investigadores que constituem o Grupo do Laboratório de Alta Pressão e Tecnologia Supercrítica (LAPTS), do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra, por todo o incentivo e ajuda ao longo deste processo laboratorial, assim como a partilha de muitos conhecimentos.

Resumo

O desenvolvimento de *scaffolds* visa a criação de estruturas tridimensionais, tendo por base materiais sintéticos ou naturais. Um dos principais objectivos deste trabalho é usar estratégias “verdes” e biomiméticas na formação e processamento de *scaffolds* como sistemas de libertação controlada, para aplicação em regeneração de tecidos duros, especialmente o tecido ósseo. Este trabalho envolve primeiramente a produção de sílica utilizando catalisadores biomiméticos, como a L-glutathiona reduzida (GSH), a DL-metionina (MET) e a cisteamina (CYS)), através do processo sol-gel, usando como solvente a água e como precursor o tetraetilortosilicato (TEOS). A utilização destes catalisadores permite produzir sílica desde condições ácidas (pH 2,46 – GSH) até condições básicas (pH 9,81 – CYS). Estas condições podem gerar sílica com diferentes propriedades físico-químicas para aplicação em diversas áreas. A etapa de secagem da sílica, a eliminação de catalisadores e a incorporação da dexametasona para posterior libertação controlada, foram as principais prioridades deste trabalho. Além disso, foram estudadas formulações de compósitos, com potencial biomédico, à base de sílica e diversos polímeros (sintéticos e naturais). Para encapsulação e posterior libertação da dexametasona, foram seleccionados compósitos preparados com proteína de soja, albumina e quitosano, assim como o extracto de pinheiro como uma fonte natural de proantocianidinas. Tanto a sílica quanto os compósitos, foram caracterizados por microscopia, espectroscopia, termogravimetria, porosimetria e densitometria. Este trabalho apresenta resultados promissores para o uso de sílica como *scaffolds* na aplicação em regeneração de tecidos duros. A libertação controlada da dexametasona atingiu valores de até 80 µg/mg de sílica, que ao ser aplicado no processo de regeneração óssea, poderá favorecer/promover os mecanismos de osteocondução e osteoindução. O teste de hemocompatibilidade realizados para a sílica produzida, mostrando que os catalisadores residuais podem aumentar o índice de hemólise.

Palavras-chave: Catalisadores Biomiméticos; Sílica; Processo Sol-Gel; Libertação controlada de fármacos; Dexametasona.

Abstract

The development of *scaffolds* has as a primary goal the formation of three-dimensional structures, based on synthetic or natural materials. One of the main purposes of this work is to use green and biomimetic strategies to prepare and process *scaffolds* as drug delivery systems, to be applied to hard tissue regeneration, especially bone tissue. This work involves the production of silica using biomimetic catalysts, as L-glutathione reduced (GSH), DL-methionine (MET) and cysteamine (CYS) through the sol-gel process, using water as solvent and Tetraethyl Orthosilicate (TEOS) as precursor. The use of such catalysts allows the production of silica from acidic conditions (pH 2,46 - GSH) to alkaline conditions (pH 9,81 - CYS).

These conditions may generate silica with different physic-chemical conditions that can find applications in several areas. Silica drying step, catalysts removal, as well as dexamethasone incorporation for further controlled release, was the main priorities of this work. The formulation of composites with biomedical potential, based on silica and different synthetic and natural polymers, was also studied. Composites prepared with soybean protein, albumin and chitosan, as well as pinus extract as a natural source of proanthocyanidin, were selected for studies of encapsulation and release of dexamethasone. Both silica and composites were characterized by microscopy, spectroscopy, thermogravimetry, porosimetry and densitometry. This work presents promising results for the use of silica as scaffolds to apply in hard tissue regeneration. The sustained release of dexamethasone presented values up to 80 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of silica, which may support/promote the osteoconductive and osteoinduction mechanisms during the regeneration process. The hemocompatibility assays for the silica produced indicate that the presence of catalytic residues may increase the hemolytic index.

Key-words: Biomimetic catalyst; Silica; Sol-Gel Process; Drug Delivery System; Dexamethasone

Índices

Capítulo I

1. Introdução	2
1.1. Tecidos duros, respectiva fisiologia e regeneração	3
1.2. Materiais para <i>Scaffolds</i> : Características e exemplos.....	5
1.3. Processo Sol-Gel	9
1.4. Catalisadores biomiméticos e biomineralização na natureza	12
1.5. Sistemas de libertação controlada	14

Capítulo II

2. Materiais e métodos	17
2.1. Produção de sílica, compósitos e processamento	17
2.2. Sistemas de libertação controlada	23
2.3. Caracterização dos materiais obtidos	24
2.4. Testes de biocompatibilidade	25

Capítulo III

3. Resultados e discussão	27
3.1. Produção de sílica.....	27
3.2. Produção de Compósitos à base de sílica	43

Capítulo IV

4. Conclusões	63
---------------------	----

Perspectivas Futuras	64
-----------------------------------	----

Bibliografia	66
---------------------------	----

Anexos	70
---------------------	----

Anexo A - Protocolo do teste de hemólise.....	71
Anexo B - Análise FTIR para a extracção SCF.....	73
Anexo C - Microscopia Electrónica de Varredura (SEM) para sílica e compósitos à base de sílica	76
Anexo D - Porosimetria por intrusão de Hg para os diferentes métodos de secagem.....	78
Anexo E - Curva de Calibração da dexametasona.....	95
Anexo F - Análise FTIR para alguns compósitos	96
Anexo G - Microscopia óptica	97

Índice de figuras

Figura 1.1. Estrutura do osso.....	3
Figura 1.2. Processo de regeneração do tecido ósseo.....	5
Figura 1.3. Principais factores envolvidos na fabricação de <i>scaffolds</i> para regeneração de tecido ósseo	6
Figura 1.4. Adesão celular na presença de sílica.....	8
Figura 1.5. Imagens de SEM de várias famílias de diatomáceas.....	13
Figura 2.1. Condição de temperatura, agitação e tipo de catalisador para a síntese de sílica.....	17
Figura 2.2. Procedimento experimental para a produção de sílica <i>in vitro</i>	18
Figura 2.3. Diagrama de processo para a obtenção de sílica e compósitos à base de sílica e técnicas de caracterização.....	20
Figura 3.1. Amostras com catalisador GSH: (A) 4°C por 66 h + 3h a 24 °C (B) 24 °C (C) 37 °C.....	27
Figura 3.2. Massa de sílica obtida em função do tempo, utilizando como método de secagem o liofilizador.....	29
Figura 3.3 Imagens de SEM para a sílica a partir de proteína de soja (A) e albumina (B).....	30
Figura 3.4. Perda de massa (%) obtida para a sílica a diferentes valores de pH.....	32

Figura 3.5. Massa de sílica produzida para diferentes valores de pH e diferentes catalisadores utilizando como método de secagem SCF.....	32
Figura 3.6. Sílica GSH para diferentes métodos de secagem.....	33
Figura 3.7. Distribuição de poros para pH ácido e básico em função do método de secagem.....	36
Figura 3.8. Imagens de SEM obtidas para a sílica a diferentes pH's.....	37
Figura 3.9. Curva de TGA para uma diatomácea.....	39
Figura 3.10. Curvas de TGA para a sílica obtida a diferentes pH's.....	40
Figura 3.11. Espectro IV e respectivas bandas características, para a sílica obtida a pH 2,46 com o catalisador glutatona.....	41
Figura 3.12. Espectro IV e respectivas bandas características, para a sílica obtida a pH 9,81 com o catalisador cisteamina.....	42
Figura 3.13. Espectro IV e respectivas bandas características, para a sílica obtida a pH 9,81 com o catalisador metionina.....	42
Figura 3.14. Imagens de SEM obtidas para os compósitos de sílica obtidos a partir de GSH.....	45
Figura 3.15. Imagens de SEM obtidas para os compósitos de sílica a partir do catalisador GSH.....	46
Figura 3.16. Espectro IV para o compósito sílica/quitosano.....	47
Figura 3.17. Curva de libertação para a sílica obtida a partir de pH ácido (GSH) para as concentrações.....	50
Figura 3.18. Curva de libertação para a sílica obtida a partir de pH neutro para as concentrações.....	51
Figura 3.19. Curva de libertação para a sílica obtida a partir de pH básico para as concentrações.....	52
Figura 3.20. Comparação para a concentração de dexametasona libertada para as diferentes amostras de sílica.....	54
Figura 3.21. Curva de libertação da dexametasona (1mg/g) para o compósito de sílica obtido a partir do catalisador GSH.....	55

Figura 3.22. Libertação de dexametasona (1 mg) para os compósitos de sílica obtidas a partir de □ GSH,O CYS.....57

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Principais constituintes da matriz óssea e respectivas funções e propriedades.....	4
Tabela 1.2. Parâmetros considerados no desenvolvimento de scaffolds em engenharia de tecidos	7
Tabela 2.1. Concentração da solução de catalisador em função do pH.....	18
Tabela 2.2. Compósitos obtidos para o catalisador GSH (0,15 M) e CYS (0,15 M).....	21
Tabela 2.3. Polimerização usando precursores com grupos vinílicos.....	22
Tabela 3.1. Efeitos da temperatura (°C), agitação (rpm) e do pH da solução de catalisadores/precursor na produção de sílica (g).....	28
Tabela 3.2. Massa de sílica (g) produzida a partir de albumina e proteína de soja.....	29
Tabela 3.3. Perda de massa (%) obtida para o processo de secagem (M _I) e para o processo de calcinação (M _{II}) e massa de sílica final (M _{III}).....	31
Tabela 3.4. Características da sílica obtida a diferentes pH's e diferentes métodos de secagem.....	35
Tabela 3.5. Características da sílica obtida a diferentes pH's utilizando como método de secagem a extracção por SCF, por adsorção de azoto.....	35
Tabela 3.6. Resumo para os diferentes pH's em função do rendimento de sílica.....	38
Tabela 3.7. Observações relativas à preparação dos compósitos de sílica.....	44
Tabela 3.8. Massa de sílica (g) para os compósitos que tem por base GSH e CYS.....	45
Tabela 3.9. Propriedades obtidas para os compósitos à base de sílica obtidos para o catalisador GSH(0,15 M) e CYS (0,15M).....	48
Tabela 3.10. Parâmetros cinéticos para o sistema sílica/ dexametasona.....	53

Tabela 3.11. Parâmetros cinéticos para o sistema sílica (GSH (2,46), 0,15 M)/ dexametasona (1 mg/ 8 mL GSH)/ polímero (80 mg).....	56
Tabela 3.12. Parâmetros cinéticos para o sistema sílica (GSH (2,46) e CYS (9,81), 0,15 M)/ dexametasona (1 mg/ 8 mL catalisador)/ polímero (80 mg).....	58
Tabela 3.13. Percentagem hemolítica para as amostras de sílica.....	59
Tabela 3.14. Percentagem hemolítica para os compósitos à base de sílica.....	60

Motivações e Objectivos

O presente trabalho pretende encontrar estratégias “verdes” e biomiméticas para a produção de sílica e materiais compósitos à base de sílica para aplicações biomédicas, especialmente no que diz respeito à medicina regenerativa de tecidos duros. Pretende-se estudar o desenvolvimento de um método de produção de sílica inovador em relação ao existente, sendo fácil produzir, ser obtido num curto espaço de tempo, que apresente um carácter “verde” e com boas propriedades físico-químicas para que possam ser usados como suportes biomédicos. Para tal proporcionar condições brandas de temperatura, agitação e tempo, estudando os efeitos destas variáveis no processo de formação e rendimento de sílica, simulando as condições da natureza. Além disso, como parte do processo de obtenção de sílica, estudar o processo de secagem da sílica e eliminação e/ou redução de catalisadores e precursores de sílica no produto final, de forma a investigar o efeito destes resíduos na biocompatibilidade do “scaffold” em aplicações biomédicas, nomeadamente a hemocompatibilidade.

Pretende-se ainda, estudar a produção de compósitos baseados em sílica, com o intuito de seleccionar formulações para futuras aplicações biomédicas. A incorporação e libertação controlada da dexametasona na sílica e compósitos produzidos foi objecto também de estudo.

A sílica e alguns compósitos foram caracterizados por microscopia óptica, microscopia electrónica de varredura, termogravimetria, espectroscopia por infravermelho, porosimetria por mercúrio e densidade usando picnometria por gás hélio.

Capítulo I

1. Introdução

A medicina regenerativa é uma área multidisciplinar em crescente desenvolvimento, sendo o seu objectivo principal o tratamento do tecido lesado por trauma (acidental e/ou provocado por cirurgia), assim como doença degenerativa. A investigação nesta área centra-se no desenvolvimento de produtos de base biológica para reparação e/ou regeneração de tecidos e órgãos, com o objectivo de melhorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Neste sentido, o desenvolvimento de sistemas bioinspirados de compósitos ou nanocompósitos apresentam-se como uma aposta promissora. Especificamente na medicina ortopédica, a ciência aposta essencialmente em desenvolver materiais biocompósitos, com propriedades mecânicas e biológicas adequadas, com a possibilidade de controlar a distribuição da fase orgânica na matriz inorgânica, de modo a otimizar os dispositivos biomédicos e melhorar as interacções com o tecido *in vivo* (Eduardo K. Moiola, 2007; Lieberman J. R., 2005).

As interacções entre o material de regeneração e os tecidos consistem essencialmente em interacções moleculares, principalmente as pontes de hidrogénio. A formação do colagénio, um dos principais constituintes dos tecidos duros, é fortemente dependente das interacções hidrofóbicas no ambiente fisiológico, que se desenvolve ao longo de várias etapas da sua expressão proteica para a formação em fibras triplo-helicoidais (Eduardo K. Moiola, 2007; Atala A., 2008).

O material a ser implantado deve ser um suporte que possua a capacidade de regenerar o tecido lesado dando-lhe a estrutura adequada do tecido vivo. Para tal usam-se os *scaffolds*, suportes que orientam o crescimento das células. Este material, quer autólogo (o paciente é o próprio dador) ou alogénico (proveniente de outra pessoa), ou fabricado a partir de biomateriais naturais, sintéticos ou semi-sintéticos, permite a expansão da cultura de células, através da sua cultura sobre os *scaffolds*, definindo a arquitectura e aspecto final do novo tecido.

Os *scaffolds* devem fornecer temporariamente a sustentação das células que se encontram numa fase inicial de implantação, até que estas sejam capazes de suportar a sua própria matriz extracelular (ECM). A construção de um *scaffold* deve reunir condições tais que promovam a migração, a diferenciação e a proliferação celular, assegurando assim as características naturais do tecido. Factores como, arquitectura, propriedades mecânicas, propriedades de superfície, degradação dos compostos que o constituem, e as mutações notórias destes factores aquando expostos *in vitro* e/ou *in*

vivo, são considerações essenciais no seu desenvolvimento (Eduardo K. Muioli, 2007; Lieberman J. R., 2005).

As células e a ECM apresentam uma matriz 3-D, altamente porosa, característica que deve ser garantida na construção do *scaffold*. Principalmente, no que se refere ao tecido ósseo, a porosidade é fundamental para o crescimento do tecido, perfeita vascularização e disponibilização de nutrientes para que ocorra a regeneração.

1.1. Tecidos duros, respectiva fisiologia e regeneração

O tecido ósseo, principal sistema de apoio dos seres vertebrados, apresenta-se de duas formas arquitectónicas diferentes, o denominado osso trabecular ou osso esponjoso (cerca de 20 %) e o osso cortical ou osso compacto (cerca de 80 %) conforme a Figura 1.1.

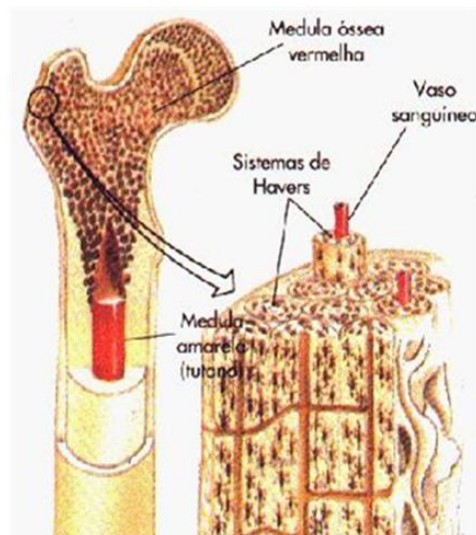


Figura 1.1. Estrutura do osso (Carneiro, 2004)

Este tipo de tecido é considerado um tecido conjuntivo complexo, organizado e especializado. É constituído por uma fase inorgânica e pela fase orgânica. A fase inorgânica caracteriza-se por material extracelular calcinado, essencialmente hidroxiapatite que em conjunto com a fase orgânica, constituída por células e tecido, formam a denominada matriz óssea (Carneiro, 2004). A célula específica da matriz orgânica é o osteócito, que se encontra incorporado nas lamelas, recoberto pela matriz mineralizada. Na sua constituição, a fase inorgânica equivale a cerca de 65 – 70 %, enquanto que a fase orgânica representa o restante, 25 – 30 %, composta por glicoproteínas, proteoglicanas, sialoproteínas, entre outras (Tabela 1.1) (Salgado, et al., 2004).

Tabela 1.1. Principais constituintes da matriz óssea e respectivas funções e propriedades (Salgado et al, 2004).

Constituintes da matriz óssea extracelular	Funções e propriedades
Colagénio tipo I	Fomece estrutura óssea, calcificação da matriz.
Biglicam	Proteoglicanas que afectam o crescimento das fibras de colagénio e respectivo diâmetro, envolvidas no processo de mineralização da matriz.
Decorin	
Osteonectina	Glicoproteína: Promove a ligação do Ca^{2+} e do Colagénio.
Trombospondina	Glicoproteína: Promove a ligação do Ca^{2+} , hidroxiapatite, osteonectina e outras proteínas de superfície celular; intervêm na adesão celular.
Fibronectina	Substrato de fixação dos osteoblastos.
Osteopontina	Sialoproteína: constituintes da <i>cement line</i> ; envolvida na regeneração óssea.
Sialoproteína óssea	Sialoproteína: constituintes da <i>cement line</i> ³
Osteocalcina	

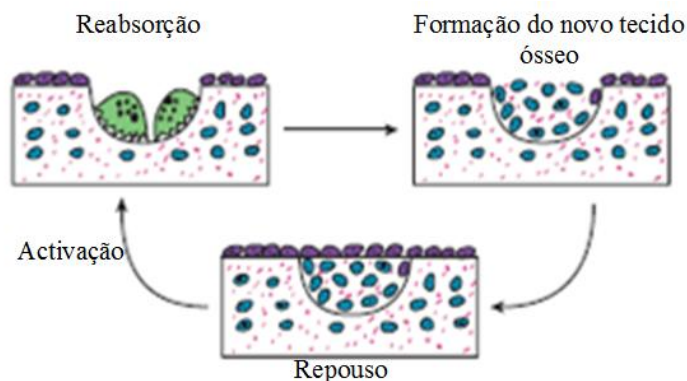
O osso caracteriza-se fisicamente pela sua resistência, que é conferida pela combinação de sais minerais e tecidos, assim como das fibras de colagénio, que apresentam um aspecto característico no microscópico. Uma das suas características é a dinâmica e a vascularização que apresenta, assim como a sua capacidade de regeneração sem deixar cicatriz (Salgado et al, 2004). Fazem parte do tecido ósseo quatro tipos de células, nomeadamente os osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e as células mesenquimatosas ou também denominadas por osteoprogenitoras, cada uma delas com funções específicas (Stocum, 2006). As células responsáveis pelo processo de regeneração são os osteoblastos e osteoclastos. Este é um processo contínuo nos seres vertebrados adultos, onde cerca de 10 % da quantidade de osso existente no corpo degrada-se e regenera-se a cada ano, Figura 1.2.

Os osteoblastos são células diferenciadas que se localizam na superfície óssea dispondo-se em camadas, sendo responsáveis pela produção da fase orgânica da matriz óssea (colagénio tipo I, proteoglicanas, glicoproteínas) durante o desenvolvimento embrionário ou na fase de crescimento, regeneração ou reparação óssea. Apresentam uma membrana plasmática rica em fosfatase alcalina, e capacidade de recepção de várias hormonas, assim com factores de crescimento (TGF-p, IGF-I), sendo ainda os responsáveis pela secreção e síntese dos osteócitos. (Carneiro, 2004).

Os osteoclastos são células multinucleadas (4 – 20 núcleos) que têm como função a reabsorção óssea. Este processo é controlado pelo sistema endócrino e por

factores de crescimento. Após o processo de remoção, estes regeneram de imediato o tecido ósseo. O período de repouso depende do tipo de localização do tecido ósseo.

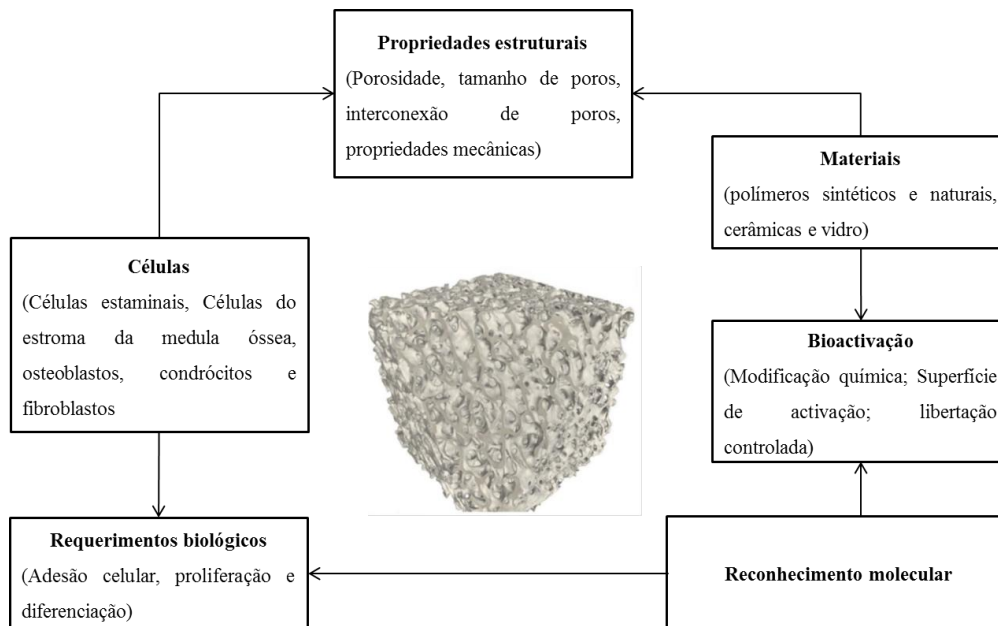
Os osteócitos são células osteoblásticas em fase de maturação que apresentam grande diferenciação, encontrando-se envolvidos na matriz extracelular. Por fim, as células mesenquimatosas são osteoblastos maduros que terminaram a sua actividade e que não se diferenciaram em osteócitos e contribuem para homeostasia mineral, regulando os fluxos de cálcio e fosfato. Possuem ainda a capacidade de responder a estímulos mecânicos e hormonais, e sintetizam alguns factores de crescimento (Stocum, 2006).



Figural.2. Processo de regeneração do tecido ósseo Adaptado (Stocum, 2006).

1.2. Materiais para *Scaffolds*: Características e exemplos

No desenvolvimento de *scaffolds* para a regeneração do tecido ósseo, deve ser garantida estrutura tridimensional, que auxilie no suporte ao tecido neoformado, através de poros interconectados assegurando uma adequada migração das células, a regeneração e crescimento do tecido, assim como a sua vascularização, apresentando características osteocondutivas e angiogénicas (Salgado, et al., 2004). A ausência da angiogénese (crescimento de vasos sanguíneos) pode afectar o transporte dos nutrientes, oxigénio e inúmeros factores de crescimento angiogénico às células. (Stocum, 2006). Devem ainda garantir uma estabilidade mecânica adequada, fornecendo o ambiente apropriado à formação do tecido. No que respeita à taxa de degradação, esta deve ser conjugada com a taxa de formação do novo tecido (Chu, 2008). Na Figura 1.3, apresentam-se os principais factores a ter em consideração aquando da projecção de *scaffolds*.



Figural.3. Principais factores envolvidos na fabricação de *scaffolds* para regeneração de tecido ósseo (Adaptado de Gerhardt, 2010).

Na literatura, verifica-se que existe uma crescente procura no desenvolvimento de *scaffolds* com espécies bioativas incorporadas melhorando assim as potencialidades terapêuticas. Sendo preferencialmente escolhidos fármacos, factores de crescimento ósseo (BGF) e factores de crescimento de vasos sanguíneos (VGF) ou até mesmo sequências de peptídeos (Chu, 2008).

Os principais materiais para o desenvolvimento de *scaffolds* dividem-se, especialmente, em três grandes grupos: os polímeros, os compósitos e os cerâmicos.

Os *scaffolds* que apresentam na sua composição materiais poliméricos, em especial os polímeros biodegradáveis, permitem o desenvolvimento de *estruturas tridimensionais* temporárias com porosidade interconectada e propriedades químicas benéficas, uma vez que o tempo de degradação é igual ao tempo de crescimento do novo tecido, evitando assim a necessidade de uma segunda cirurgia para remover o implante. As células preferem, maioritariamente, superfícies hidrofílicas, contudo os materiais hidrofóbicos tem geralmente maior tempo de residência *in vivo*, o que torna os polímeros biodegradáveis ideais para libertação controlada de espécies bioativas. Os principais polímeros biodegradáveis sintéticos utilizados são os copolímeros PLGA (poli-ácido láctico-co-glicólico), a policaprolactona, os polianidridos, o PHBV (poli-(hidroxibutirato- co-hidroxivalerato)) entre outros. Dos polímeros naturais destaca-se as proteínas como o colagénio e polissacarídeos, em especial o alginato, o quitosano e

derivados, assim como o ácido hialurônico. Estes são especialmente atraentes pelas propriedades de biocompatibilidade, por promoverem o crescimento celular, assim como serem de fácil obtenção e a custo reduzido.

Relativamente aos compósitos, as matrizes são preparadas utilizando polímeros biodegradáveis onde são incorporadas partículas de CaP (fosfato de cálcio), HA (hidroxiapatite), por forma a melhorar a resistência mecânica e a bioactividade. Normalmente, a combinação de polímeros com este tipo de partículas, dão origem a biocerâmicas porosas, reunindo assim as vantagens dos polímeros biodegradáveis com o uso das cerâmicas bioactivas. Este tipo de materiais promove a formação da camada de apatite óssea, garantindo assim uma melhor fixação do implante. Além disso, a fase inorgânica pode ainda ser combinada com polímeros o que permitirá a formação de bioactivos, compósitos biodegradáveis inertes ou injectáveis. Promovem ainda, a formação da camada de apatite óssea, garantindo assim uma melhor fixação do implante. Além disso, a fase inorgânica pode ainda ser combinada com polímeros o que permitirá a formação de bioactivos, compósitos biodegradáveis inertes ou injectáveis.

Então, os polímeros biodegradáveis em combinação com materiais que contenham dióxido de silício apresentam-se como um excelente material para promover a formação da apatite¹ *in vitro* e/ou *in vivo*. Segundo Carlisle et al, a quantidade de silício *in vivo* é devido à formação da cartilagem e osso, contudo este participa também no metabolismo celular. Neste seguimento, o desenvolvimento de implantes que contenham silício, induzem a formação óssea, estimulam a proliferação osteogénica e activando a expressão genética do osso. Assim, os implantes ósseos devem promover a formação do tecido ósseo e a ligação ao tecido circundante.

Contudo, todos os materiais apresentam vantagens e desvantagens, os materiais inorgânicos tal como os fosfatos de cálcio, salientam-se por uma excelente biocompatibilidade, e uma osteocondutividade razoável, apresentando contudo adequadas propriedades mecânicas, apresentando uma degradabilidade lenta e frágeis. Aos materiais bioactivos conferem-lhe a boa biocompatibilidade, osteocondutividade, assim como uma excelente expressão genética dos osteoblastos e razoáveis propriedades mecânicas, apresentando as mesmas desvantagens que os fosfatos de cálcio. Relativamente aos materiais orgânicos estes apresentam excelente biocompatibilidade e taxa de degradação, sendo a grande desvantagem a possibilidade de provocar

¹ Apatita – mineral do grupo dos fosfatos, por exemplo, a hidroxiapatite.

inflamação. No que se refere aos compósitos, estes apresentam-se biocompatíveis, tal como os anteriores, apresentando melhores propriedades mecânicas, sendo no entanto o grande entrave, as complexas técnicas de processamento (Mourinõ et al, 2009).

Entretanto, os polímeros biodegradáveis em combinação com materiais que contenham dióxido de silício apresentam-se como um excelente material para promover a formação da apatite *in vitro* e/ou *in vivo*. Exemplos destes compósitos são o quitosano, especialmente por estes apresentarem boas propriedades mecânicas, e por promoverem o aumento significativo na adesão, proliferação e actividade da fosfatase alcalina, melhorando assim, a regeneração óssea quando aplicado *in vivo*. O colagénio acelera a formação da apatita do osso, permitindo a diferenciação do monócito humano em células osteoclasto.

Na Figura 1.4, observa-se que as células na presença de um compósito polimérico exibem uma forma esférica o que se afasta do idealismo de adesão das células, no entanto a incorporação de nanopartículas bioactivas, tal como a sílica, permitem uma melhor adesão celular.



Figura 1.4. Adesão celular na presença de sílica. Adaptado (Wu, et al., 2010).

Compostos bioactivos como os polifenólicos têm sido objecto de grande interesse na área da medicina, em particular os taninos devido às suas propriedades anti-inflamatórias, anti-microbianas, anti-oxidantes e anti-alérgicas. Os taninos são compostos fenólicos que possuem a capacidade de se combinarem com proteínas e alguns polímeros, como os polissacarídeos. São classificados em hidrolisáveis e condensados, dos quais se salientam os taninos condensados, mais propriamente as proantocianidinas (PA). Estes bioflavonóides encontram-se em diversas plantas, sobretudo numa espécie de pinheiro (*Pinus radiata*), que contem uma quantidade considerável de PA extraível. Este tipo de moléculas, PAs, possui a aptidão para precipitar proteínas ricas em prolina, um dos principais componentes do colagénio, que tem por função a sua estabilização. (Chang et al, 2007).

Os biomateriais podem ser definidos como uma substância terapêutica que está em contacto com fluidos biológicos. Obedecem a propriedades essenciais de acordo com a funcionalidade a que se destinam (Chu, 2008). Assim, existem critérios mínimos que terão obrigatoriamente que garantir, quando colocado *in vivo*, devendo ser:

- Não-tóxicos e não-cancerígenos;
- Biocompatíveis (não interage com o meio biológico);
- Biofuncionais (capacidade de substituir a função afectada);
- Resistência mecânica e densidade adequadas ao seu uso;
- Estéreis (resistente as radiações gama, ao óxido de etileno ou à autoclavagem);
- Estável durante o processo de implantação;
- Possuir uma textura de superfície conveniente para que a adesão celular possa ocorrer;
- Não devem degradar *in vivo*, a menos que o processo seja intencional.

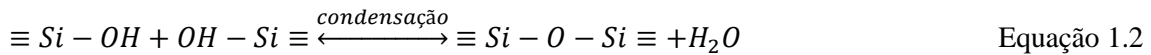
Actualmente já existem no mercado alguns materiais para regeneração óssea, tal como o Bonelike[®], o Calcibon[®], o Edobon granules II[®] e o New osteo[®], que apresentam dimensão de partículas entre 0,5 – 5,6 mm, porosidades compreendidas entre 45 – 85 % com uma dimensão de poros a variar entre 0,5 – 1500 µm (Nies et al, 2009; Medmat Innovation; Biomet; GMReis).

1.3. Processo Sol-Gel

O processo sol-gel é um processo que envolve a transição de um estado líquido, o “sol” para um estado sólido, o “gel” da qual resultará uma rede tridimensional. Tem envolvido duas etapas fundamentais: a hidrólise e a condensação (Gupta et al, 2006; Brinker et al, 1990), fazendo parte delas um solvente e um alcóxido.

Os alcóxidos metálicos (R-O-M) são compostos pertencem à família dos organometálicos que tem um ou mais átomos de metal (M) ligados à sua molécula. São a classe de precursores químicos mais utilizados no processo sol-gel, sendo o mais utilizado o tetraetilortosilicato (TEOS; Si (OC₂H₅)₄), em especial devido à elevada reactividade com a água (instabilidade hidrolítica). Esta reacção é denominada por hidrólise, onde o ião hidroxilo se liga ao átomo de silício (Eq. 1). Dependendo da quantidade de água e catalisador presente, a hidrólise poderá ser completa para que todos os grupos alcóxidos sejam substituídos pelos grupos hidroxilo (Eq. 2). A etapa da condensação origina a libertação de uma molécula de água e subsequente formação das

ligações silano (Si- O- Si). À medida que esta reacção vai ocorrendo, a dimensão da molécula inicial vai crescendo por um processo equipolente à polimerização.



É importante referir que o facto de o TEOS possuir uma funcionalidade igual a 4, confere-lhe a capacidade de estabelecer quatro ligações com outros alcóxidos através do processo de condensação, crescendo assim moléculas tridimensionais. Quando esta funcionalidade é diminuída para dois, a molécula poderá crescer até assumir dimensões macroscópicas, contudo a sua cadeia molecular será linear. No entanto, quando são usados alcóxidos metálicos a estrutura obtida é aleatoriamente ramificada, podendo apenas ser menos ramificadas na presença do défice de água, uma vez que pode ainda existir grupos alcóxidos na estrutura final (Tseng, 2010).

Estas etapas, hidrólise e condensação, estão ainda fortemente dependentes de parâmetros reaccionais que encontram, como o pH, a natureza e concentração de catalisador, a temperatura, a razão molar H₂O/Si e o tipo de solvente.

- pH
- Natureza e concentração de catalisador
- Temperatura
- Razão molar H₂O/Si

O pH influencia directamente as reacções de hidrólise, que tem um efeito muito importante nas estruturas finais obtidas. Assim, a velocidade destas reacções está dependente do pH do meio, isto é para catálise ácida (pH < 5), a hidrólise é favorecida contudo as reacções de condensação são limitantes. Inicialmente formam-se moléculas muito pequenas com grupos reactivos Si-OH, originando cadeias lineares ou ramificadas aleatoriamente. A geleificação em meio ácido caracteriza-se por modelo de crescimento cluster – cluster. Para pH ~ 2,4 originam-se cadeias lineares de elevada área de superfície e reduzido volume específico de poros, acima deste pH a taxa de hidrólise reduz e a condensação aumenta, havendo assim um aumento no numero de ligações siloxano (Si – O – Si), passando a existir um crescimento do tipo aglomerado – monómero, em resultado surgem estruturas mais ramificadas, que se caracterizam pelo aumento do volume de poros e redução da área superficial. Sob condições alcalinas (pH > 7), os processos de condensação são dominantes, originando partículas menos

agregadas, maiores e mais densas que a pH ácido, resultando menores áreas de superfície e poros de maiores dimensões.

O tipo de catalisador está fortemente dependente do pH, pois este determina o carácter ácido ou básico. A catálise ácida é maioritariamente realizada com HCl, H₂SO₄, HNO₃, HF, ácido oxálico, fórmico e acético, enquanto o carácter básico é conseguido com o NH₃ ou NaOH. Relativamente à produção de sílica, esta reacção é bastante lenta, no entanto é possível observar uma notável aceleração quando o pH da solução se desloca para meio básico ou ácido, tal conseguido através da adição de catalisadores. O facto de o processo poder ocorrer tanto em meio básico como ácido confere-lhe uma extrema relevância, uma que vez que é possível obter um número diferenciado de materiais diferentes. Em meio ácido o processo de gelificação resulta em cadeias que se unem para formar géis, onde é possível obter uma matriz compacta com baixo volume de poros, (diâmetro de 2 nm) denominados por microporos. Relativamente ao meio básico, a reacção de gelificação caracteriza-se pelo ataque do nucleófilo ao silício, dando a origem, preferencialmente, a partículas esféricas, resultando um gel com partículas interconectadas, denominado por gel coloidal, dando origem a mesoporos com elevada porosidade (2 – 50 nm) (Gupta, et al.2006, Brinker, et al.,1990). Contudo, estes métodos convencionais fazem uso de substâncias perigosas, tais como ácidos e bases fortes.

A natureza do solvente, em especial a sua polaridade, a viscosidade e o comportamento protónico ou não protónico, influencia a taxa de reacção, e consequentemente a estrutura do material final. Assim os solventes polares e protónicos mais aplicados são a água, álcoois, que possuem a capacidade de estabilizar as espécies siliciosas. A título de exemplo de espécies polares não-protónicas são a acetona, tetraidrofurano entre outros.

Ainda a razão solvente/precursor (R) é fundamental para que as etapas de hidrólise e condensação se convertam de forma completa. Sendo a quantidade de solvente determinante no volume de poros, um elevado R poderia originar um material de baixa densidade devido ao excesso de solvente. Quando nos referimos ao uso de água como solvente e o uso de TEOS como precursor, é necessário duas moles de água para 1 mol TEOS, ou seja um valor de R=2. Com uma variação $1 < R < 25$ é possível obter estruturas diferenciadas, desde monólitos, películas finas ou partículas coloidais. Para valores $R < 2$, ou seja, pequenas quantidades de água, a reacção de hidrólise é afectada, sendo predominante a reacção de condensação do álcool. Com o aumento do

valor R ($R \geq 2$) a reacção de hidrólise é favorecida, no entanto para valores muito superiores pode ocorrer separação do sistema água/TEOS.

Assim, o processo sol-gel permite ainda a combinação, a nível nanométrico, de componentes orgânicos e inorgânicos, dando origem aos denominados materiais híbridos. É essencialmente utilizado para a produção adsorventes, materiais cerâmicos, vidros, micropartículas, nanocompósitos (Brinker et al,1990).

As técnicas mais utilizadas para o desenvolvimento de scaffolds para a regeneração óssea, com a inclusão de libertação controlada de fármacos, são: o “melt moulding”, a evaporação de solvente, a liofilização, técnica térmica de separação induzida líquido/líquido, a formação de espumas, técnica de modelação, a compactação de pó, assim como o processo sol-gel. Neste último, os scaffolds são preparados por dissolução do composto (inorgânico ou orgânico) num solvente, dando-se início à reacção de hidrólise e polimerização permitindo a formação de uma suspensão coloidal, o sol. Este é então colocado num molde, originando um gel, que sofre um processo de secagem e tratamento térmico da qual resulta um material denso.

1.4. Catalisadores biomiméticos e biomineralização na natureza

A sílica é o segundo biomineral mais abundante na terra, estimando-se que esta constituía 55,71 % dos óxidos existentes. É produzida essencialmente pelas diatomáceas e esponjas marinhas (Ruiz-Hitzky, et al., 2008)

Estas espécies desenvolvem estruturas de sílica altamente organizadas, tridimensionais, em condições suaves, tais como pH neutro e temperatura ambiente.

As diatomáceas são algas eucariontes unicelulares que se podem encontrar em oceanos e habitat de água doce, sendo fundamentais a nível ecológico, uma vez que são responsáveis por 40 % da produção biológica nos oceanos. São organismos que apresentam estruturas muito diferenciadas, tridimensionais (3-D) e com porosidade significativa, conforme evidenciado na Figura 1.5 (Ruiz – Hitzky et al, 2008).

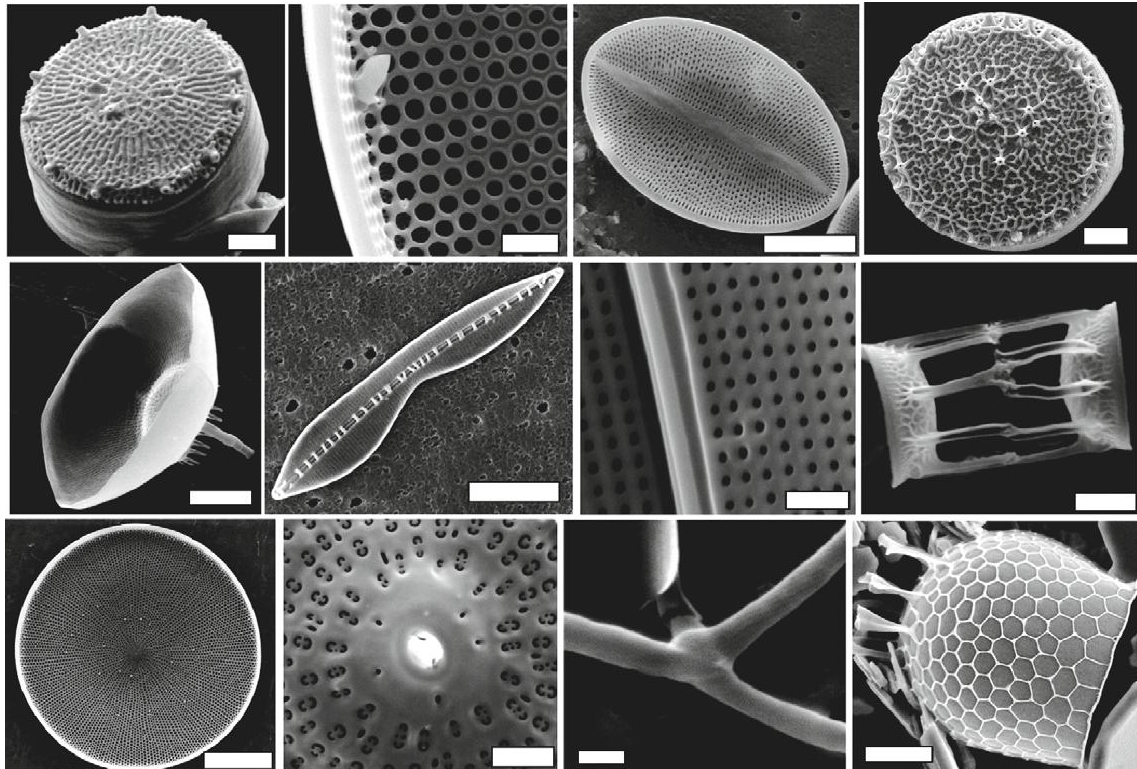


Figura 1.5. Imagens de SEM de várias famílias de diatomáceas (Ruiz-Hitzky et al 2008)

Há cerca de 200 anos, que investigadores se interessam por compreender a estrutura altamente organizada das diatomáceas, iniciando-se o estudo na década de 20, onde as frustulas² das diatomáceas eram compostas por ácido silício puro em estado “subcoloidal”. Em 1952, *Cooper*, afirmou que os exoesqueletos das diatomáceas são semelhantes à sílica hidratada dispersa em água. Segundo este estudo, o sucesso da cultura das diatomáceas estava em adicionar silício solúvel à solução, no entanto se a sua capacidade de formação fosse deficiente, ao adicionar-se glutatona, cisteamina, DL-metionina esta era restaurada. Os grupos sulfídricos seriam os responsáveis pela formação do silício nas diatomáceas (Lewin, 1953). A glutatona (GSH) é um tripeptídeo e o composto não proteico mais abundante nos organismos vivos, estando envolvido em muitos processos fisiológicos. Encontra-se também amplamente disponível a custo reduzido e que não apresenta toxicidade. Relativamente à cisteamina é um produto proveniente da degradação do aminoácido cisteína que é um dos constituintes do código genético. No que se refere à DL-metionina é um aminoácido usado como suplemento alimentar, apresentando um nível muito baixo de toxicidade.

² Frustula – Parede celular das diatomáceas

Em síntese, o uso destes compostos como catalisadores biomiméticos podem acelerar o processo de obtenção de sílica, como é o caso do processo sol-gel onde se usa como solvente a água e como precursor o TEOS, conferindo a este método de produção de sílica um carácter verde, comparativamente com os métodos já existentes, uma vez que para o método convencional são usados como catalisadores bases ou ácidos fortes.

A importância da utilização da sílica, ao ser considerada como um material híbrido é essencial na produção de *scaffolds*, para além das boas propriedades mecânicas e estabilidade química, mantêm inalterável a presença de solventes aquosos ou orgânicos, impedindo a lixiviação das biomoléculas aprisionadas. Também o facto de a sílica não ser uma fonte de alimento para microorganismos, não ser tóxica e ser biologicamente inerte, confere a este material uma extrema importância na área da medicina regenerativa. Muitos têm sido os estudos realizados numa tentativa de imobilizar enzimas ou células na superfície de vidros porosos, no entanto a bioactividade destas acabam por ser afectadas (Gill, et al., 1998).

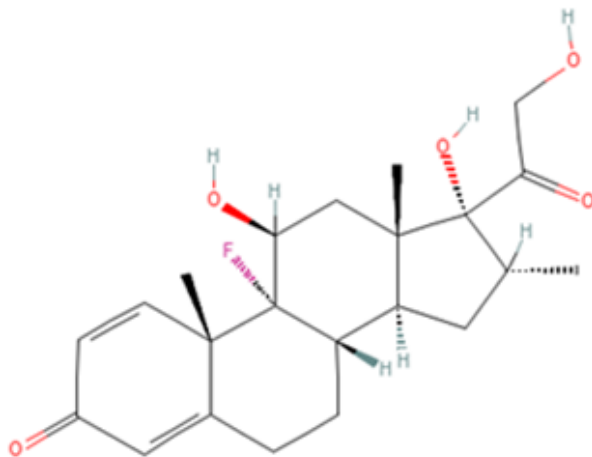
1.5. Sistemas de libertação controlada

A encapsulação de biomoléculas em biomateriais tem assumido um papel fundamental no desenvolvimento de sistemas biomédicos, uma vez que é possível a encapsulação de fármacos, enzimas ou células e a sua libertação controlada.

A bioencapsulação permanecia restrita ao uso de polímeros orgânicos, mas o uso de sílica, apresenta claras vantagens tais como o melhoramento das propriedades mecânicas e estabilidade química. Em contacto com solventes, quer orgânicos ou inorgânicos, o material desenvolvido à base de sílica não é afectada por qualquer tipo de modificação, principalmente no que se refere ao inchaço, evitando assim a lixiviação das biomoléculas (Livage et al, 2001).

Na maioria dos casos, processo que mais se adequa à encapsulação de biomoléculas, proteínas ou qualquer tipo de macromolécula é o processo sol-gel, uma vez que o processamento é possível através de temperatura reduzida e pH neutro. Contudo, estas condições podem ainda ser consideradas severas relativamente à encapsulação, sendo muitas vezes necessário que se proceda primeiramente à hidrólise e só posteriormente à adição das biomoléculas, aquando da condensação, originando assim uma rede cristalina que aprisiona as biomoléculas (Livage et al, 2001).

A dexametasona pertencente ao grupo dos corticosteróides³ que engloba os glucocorticóides, anti-inflamatórios. Promove a diferenciação osteogénica das células do tronco mesenquimais. Assim como, a actividade da fosfatase alcalina, que é indispensável à mineralização óssea, actua também nos processos de diferenciação, estimulando a maturação osteoblástica. Apresenta, contudo, uma solubilidade baixa em água (Nuttelman C. R., 2005; Infarmed, 2005).



IUPAC: (11β,16α)-9-fluor-11,17,21-trihidroxi-16-metilpregna-1,4-dieno-3,20-

Propriedades físico-químicas	
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅
Peso molecular	392,462 g/mol
Ponto de fusão	262 °C
Solubilidade em água (25°C)	89 mg/L

Os corticosteróides exercem efeito sobre quase todas as células, influenciando o metabolismo proteico, lipídico, glucídico, o balanço hidroelectrolítico, as funções cardiovasculares, renais, da musculatura esquelética, do sistema nervoso assim como em todos os tecidos e órgãos. Desempenhando um papel fundamental na homeostasia dos estímulos nócicos⁴ internos e externos. São ainda capazes de induzir a diferenciação das células do estroma⁵ da medula óssea humana em fenótipo⁶ osteoblástico, células responsáveis pela regeneração óssea (Infarmed, 2005).

³ Corticosteróides-Grupo de hormonas esteróides produzidas pelas glândulas supra-renais ou derivados sintéticos destas.

⁴ Estímulos nócicos – sensibilidade à dor.

⁵ Estroma – tecido de suporte que forma a estrutura de um órgão.

⁶ Fenótipo – características observáveis de um organismo (morfologia, características bioquímicas, entre outras).

Capítulo II

2. Materiais e Métodos

Para o processo Sol-Gel foram usados como catalisadores a L-glutathiona reduzida (Sigma Aldrich; 99%), a Cisteamina (Sigma Aldrich; 98%) e a DL- metionina (Sigma Aldrich; 99%) e como precursor o tetraetilortosilicato (Fluka, 99%). Na produção de outros compósitos à base de sílica, Tabela 2.2., utilizou-se vários polímeros naturais e sintéticos. Estes foram escolhidos na sua maioria, baseando-se na literatura (Pillai et al, 2001; Costa et al, 2006; Maia et al, 2005; Parhi et al, 2006). Também o uso de outros precursores foi objecto de estudo, Tabela 2.2, tendo sido a sua aplicação, igualmente, baseada na literatura (Li et al, 2007).

2.1. Produção de sílica, compósitos e processamento

No processo de produção de sílica, pretendeu-se avaliar o rendimento da mesma em função de três parâmetros fundamentais: a temperatura, a agitação e o pH. Este encontra-se directamente interligado aos três catalisadores utilizados: a L-glutathiona reduzida (GSH), a Cisteamina (CYS), e a DL- metionina (MET) (Figura 2.1.), uma vez que é possível, através da manipulação da sua concentração, obter diferentes valores de pH. Foi ainda possível a titulação do catalisador GSH com CYS de forma a obter o pH neutro (pH 7,00).

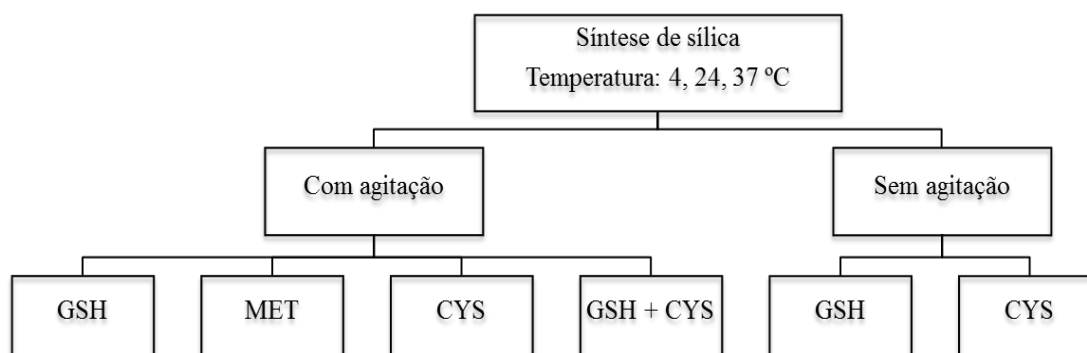


Figura 2.1. Condição de temperatura, agitação e tipo de catalisador para a síntese de sílica.

Espera-se identificar o efeito do pH e temperatura no rendimento de sílica, assim como a agitação uma vez que a reacção sol-gel dá-se na interface entre o solvente e o precursor (Figura 2.2). Com a utilização desta prevê-se que as etapas envolvidas no processo sol-gel sejam mais rápidas, uma vez que se promove a homogeneização da solução garantindo uma maior superfície de contacto entre o solvente e o precursor.

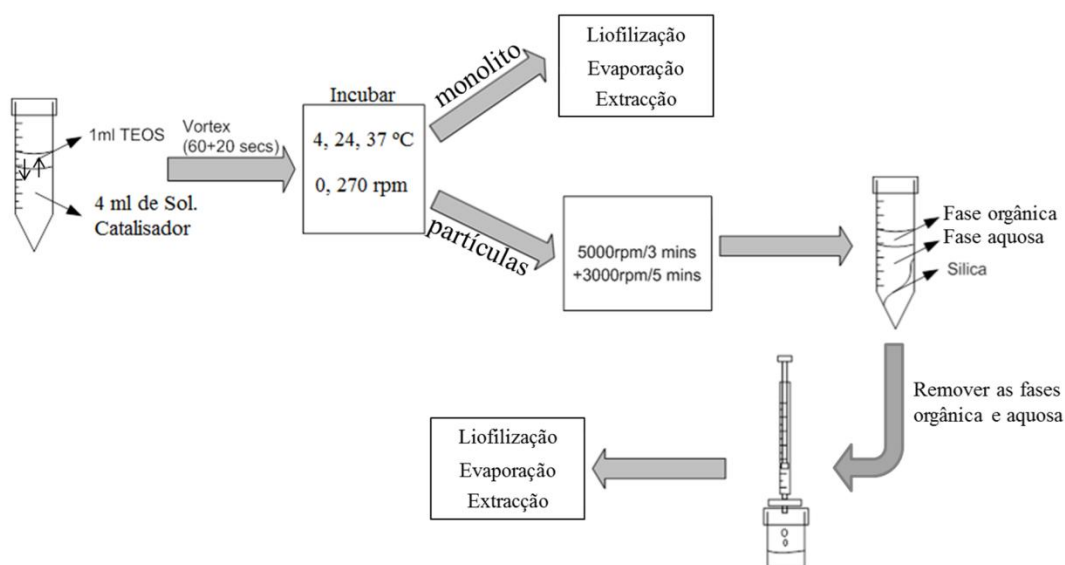


Figura 2.2. Procedimento experimental para a produção de sílica *in vitro*.

O uso de diferentes catalisadores com diferentes concentrações, vão conferir diferentes valores de pH compreendidos entre 2,46 – 9,81, da qual se obtém diferentes estruturas, monólitos (pH 2,46 e pH 9,81) e partículas. Para pH ácido a etapa de hidrólise é rápida e conseqüentemente uma condensação lenta, para pH básico a hidrólise é lenta, assim como a condensação. No entanto para pH neutro a hidrólise é lenta e a condensação é rápida.

A tabela 2.1. mostra as concentrações dos catalisadores usados, respectivos pHs e o tipo de formação de sílica.

Tabela 2.1. Concentração da solução de catalisador em função do pH.

Catalisador	Concentração de catalisador, M	pH	Formação
GSH	0,15	2,46	Monólito
MET	0,15	5,47	Partículas
GSH	0,01	6,00	Partículas
CYS+GSH	0,15	7,00	Partículas
CYS	0,01	8,60	Partículas
CYS	0,15	9,81	Monólito

Para a produção de sílica procedeu-se inicialmente à preparação do catalisador em água milli-Q degaseificada, com agitação posterior por um período de ~ 5 minutos a ~ 270 rpm para completar a dissolução total dos catalisadores. Adicionou-se 2 ml de

precursor TEOS a 8 ml da solução de catalisador previamente preparada, seguindo-se agitação no vortex por 60 segundos (Sousa et al, 2007). A produção de sílica foi assim avaliada para os parâmetros referidos anteriormente.

Foi realizado uma cinética de produção de sílica para estudar a influência do pH e do tempo no rendimento de sílica. Assim, foi avaliada a massa de sílica para os diferentes pH's para o tempo de formação rápida da sílica (GSH) e a formação lenta de sílica (MET). Todas as amostras foram realizadas em triplicado. Foi ainda avaliado qual o desempenho, na produção de sílica, utilizando a proteína de soja e a albumina como catalisadores.

Na Figura 2.3. apresenta-se todo o diagrama do processo de obtenção de sílica e técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho.

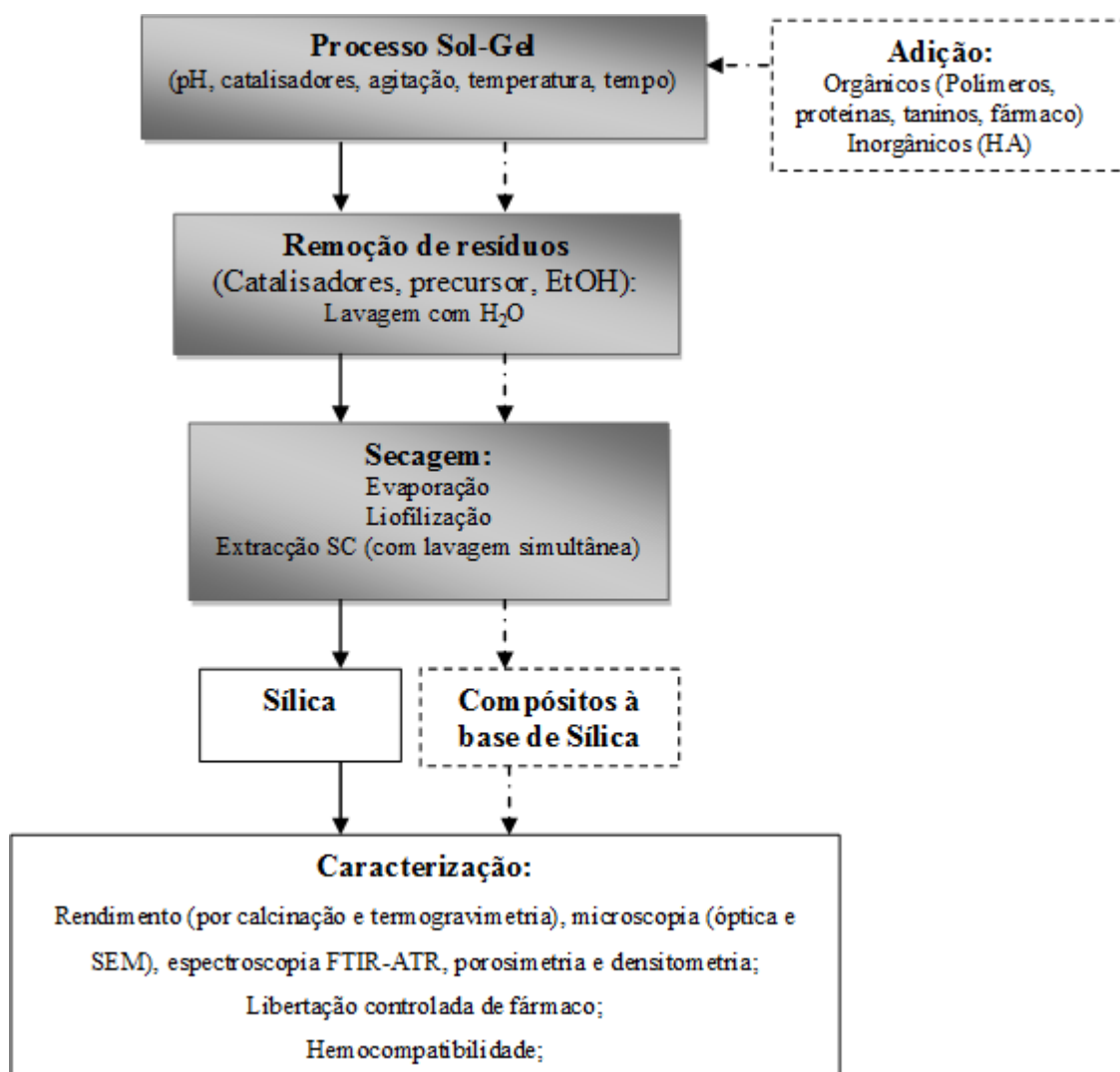


Figura 2.3. Diagrama de processo para a obtenção de sílica e compostos à base de sílica e técnicas de caracterização.

Relativamente à produção de compostos, o polímero foi primeiramente dissolvido no catalisador por um período de ~ 16 horas, a ~ 270 rpm e só depois se adicionou o precursor e procedeu-se à agitação no vortex por 60 segundos. A etapa mais importante era a dissolução do polímero.

A Tabela 2.2. apresenta as concentrações de polímero utilizados nas formulações dos compostos à base de sílica.

Tabela 2.2. Compósitos obtidos para o catalisador GSH (0,15 M) e CYS (0,15 M).

Polímeros	Composição (precursor:catalisador:polímero), g/g/g	
	Catalisador GSH, 0,15 M	Catalisador CYS, 0,15 M
Dextrano	(1,87/0,37/0,04) (1,87/0,37/0,08)	(1,87/0,09/0,04)
Gelatina	(1,87/0,37/0,04) (1,87/0,37/0,08)	(1,87/0,09/0,04)
Amido	(1,87/0,37/0,04) (1,87/0,37/0,08)	(1,87/0,09/0,04)
Pectina de maçã	(1,87/0,37/0,04) (1,87/0,37/0,08)	(1,87/0,09/0,04)
Pectina de citrinos	(1,87/0,37/0,04) (1,87/0,37/0,08)	(1,87/0,09/0,04)
Quitosano	(1,87/0,37/0,04) (1,87/0,37/0,08) (1,87/0,37/0,04)	(1,87/0,09/0,04)
Albumina	(1,87/0,37/0,04) (1,87/0,37/0,08)	(1,87/0,09/0,04)
Proteína de soja	- (1,87/0,37/0,04)	(1,87/0,09/0,04)
Alginato de sódio	(1,87/0,37/0,04)	(1,87/0,09/0,04)
Amilopectina	(1,87/0,37/0,04)	(1,87/0,09/0,04)
Dextrano oxidado	(1,87/0,37/0,04)	-
Carboximetil quitosano	(1,87/0,37/0,04)	-
Carboxibutil quitosano	(1,87/0,37/0,04)	-
Suxinil quitosano	(1,87/0,37/0,04)	-
Dextrano oxidado	(1,87/0,37/0,04)	-
Alginato de sódio + Gelatina	(1,87/0,37/0,08 + 0,08)	-
Pectina maçã + quitosano	(1,87/0,37/0,04 + 0,16)	-
Pectina de citrinos + quitosano	(1,87/0,37/0,04 + 0,16)	-
Quitina + Líquido Iônico	(1,87/0,37/0,04 + 0,01)	-
Hidroxiapatite	(1,87/0,37/0,04)	-
Metacrilato de 2-hidroxietila	(1,87/0,37/1,45)	(1,87/0,37/1,45)
Ácido acrílico	(1,87/0,37/1,05)	-
Taninos		
Tara fruto > 80 mesh	(1,87/0,37/0,04)	-
Tara fruto e semente	(1,87/0,37/0,04)	-
Extracto de Pinheiro	(1,87/0,37/0,04)	(1870/90/0,04)
	(1,87/0,37/0,08)	
Mimosa	(1,87/0,37/0,08)	-
Extracto de Pinheiro + quitosano	(1,87/0,37/0,08 + 0,08)	-

Foram ainda avaliados o desempenho de outros precursores, com grupos vinílicos, na produção de híbridos de sílica. As formulações estudadas apresentam-se na Tabela 2.3. É importante referir que neste sistema foi adicionado 25 mg de persulfato de sódio como iniciador da reação.

Tabela 2.3. Polimerização usando precursores com grupos vinílicos e outros catalisadores naturais.

Precusores	Composição (precursor:catalisador;iniciador), g/g/g	
	Catalisador GSH 0,15 M	Catalisador CYS 0,15 M
Vinil tri-metoxi-silano	(1,36/0,37/0,25)	(1,36/0,09/0,25)
Vinil tri-etoxi-silano	(1,81/0,37/0,25)	(1,81/0,09/0,25)
Glicidil propil trimetoxissilano	(2,14/0,37/0,25)	(2,14/0,09/0,25)
Catalisadores	Composição (precursor:catalisador;solvente), g/g/g	
Albumina	(1,87/0,1/8)	
Proteína de soja	(1,87/0,1/8)	

Para as amostras de sílica obtidas por diferentes catalisadores, foi estudado o encapsulamento da dexametasona para posterior libertação controlada. Em cada amostra foi colocado três quantidades diferentes de dexametasona (1, 2, 4 mg) ao qual se adicionou 8 mL de solução de catalisador, e por fim 2 mL de precursor. Nos compósitos onde a dexametasona foi encapsulada, após a dissolução do polímero foi adicionado 1 mg de dexametasona. Todas as amostras foram preparadas em triplicado.

A resposta esperada no estudo das variáveis do processo sol-gel é o rendimento de sílica. Para isso, todo o resíduo de catalisador e precursor deveriam ser removidos para a quantificação do rendimento de sílica na reação gerada no processo sol-gel. Para eliminação dos resíduos da reação utilizou-se a lavagem. Assim as amostras foram sujeitas a três lavagens com água destilada, sendo que esta foi removida por filtração com filtros de celulose (porosidade 0,45 μm). Estes filtros foram secos para obter a massa residual de sílica nos mesmos por gravimetria. A calcinação foi realizada a 600 °C por 2 horas, atendendo que determinados compósitos havia a necessidade de manter por um período de mais 2 horas, aqui o critério exigível foi manter a sílica na sua cor natural branca, indicando que os demais compostos orgânicos foram degradados.

Para o processamento final da sílica foi necessário remover a água do meio reaccional, utilizando assim três distintos métodos: liofilização, evaporação na estufa de vácuo, evaporação à temperatura ambiente e a extracção com água e etanol pressurizados e secagem com CO₂ supercrítico.

A liofilização é um processo de que consiste num fenómeno de sublimação, onde toda a água no estado sólido passa a vapor, assim as amostras foram mantidas em

estado sólido e para tal foram congeladas em azoto líquido. Este foi realizado num equipamento Snijders Scientific, à temperatura de $-49\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ~ 2 bar durante ~ 48 horas.

Para a secagem com a estufa de vácuo (SELECTA VACIOTEM-T) as amostras foram mantidas a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e com um vácuo $-1,0$ bar, até se obter uma massa constante, ~ 10 dias (240 horas).

A secagem à temperatura ambiente ocorreu a $\sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$, tendo sido deixadas as amostras até se obter massa constante, o equivalente a ~ 15 dias (360 dias).

Ainda o uso dos solventes pressurizados e o CO_2 supercrítico apresenta vantagens devido às propriedades físico-químicas que estes apresentam, tais como a densidade, a viscosidade e a difusividade. Processos que usam este tipo de fluidos são particularmente interessantes no que respeita à síntese de preparação e analítica, separação orgânica e inorgânica, nanotecnologia, obtenção de materiais porosos, entre outros. Denomina-se por fluido supercrítico aquele que se encontra acima da sua temperatura e pressão crítica. No ponto crítico a densidade do gás torna-se igual à da fase líquida, e a interface entre o gás e o líquido desaparece (Cansell et al, 2004), o que facilita a eliminação dos catalisadores sem deixar traços de solventes. Este método torna-se uma etapa importante do processo, uma vez que se for eficiente pode-se retirar a etapa anterior de lavagem, e manter num único processo a remoção de catalisadores e precursor quanto à secagem. Foi assim usado água milli-Q por um período de 60 minutos com um caudal de $4\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ com o objectivo de remover resíduos de catalisador e precursor e na sequência etanol, por um período de 90 minutos com o mesmo caudal. A utilização do etanol tem por finalidade auxiliar a eliminação da água da amostra para posteriormente se proceder à secagem da mesma com CO_2 supercrítico durante 180 minutos, utilizando uma pressão de 2900 psia e um caudal de $2,71\text{ mL}/\text{min}$. Posteriormente procedeu-se à evaporação da água numa estufa a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, para remover resíduos de água. Depois de esta massa ser constante, procedeu-se à calcinação para o identificar se os resíduos de catalisador e precursor foram removidos.

2.2. Sistemas de libertação controlada

Nesta etapa, procedeu-se à moagem do material para homogeneização da amostra e posteriormente colocou-se ~ 15 mg numa membrana de diálise (8 kD), que foi previamente colocada em água milli-Q por 24 horas para hidratação da membrana de forma a diminuir qualquer tipo de barreiras que possam comprometer a difusão. A

membrana foi então fechada com as respectivas molas de diálise, procedendo-se à libertação em 20 mL água milli-Q, à temperatura de 37 °C. As absorvâncias são lidas num espectrofotómetro (Infrared Spectrum, V650) a λ 242 nm, a cada 5 minutos durante os primeiros 30 minutos, e a cada 10 minutos até perfazer 1 hora, e posteriormente leituras a cada hora, até 8 horas.

Os perfis de libertação da dexametasona foram estudados de acordo com a equação de *Korsmeyer e Peppas* (equação 2.1.), (Zuleger et al, 2001) segundo a qual M_i é a massa inicial, M_∞ é massa final de libertação, k é constante cinética, t é o tempo de análise e n é o expoente de libertação:

$$\frac{M_i}{M_\infty} = k t^n \quad (2.1.)$$

2.3. Caracterização dos materiais obtidos

As amostras foram caracterizadas a nível químico e físico (morfológico). Para caracterização morfológica foi usado o microscópico óptico (Leika), observando assim a superfície da sílica e os principais detalhes característicos da mesma. Sempre que possível as amostras foram visualizadas nas várias ampliações (4, 10, 40 e 100 vezes). Relativamente ao SEM, Scanning Electron Microscope, com o sistema EDX (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) (EDX genesis, Philips, XL 30 model) as análises foram feitas a 10 kV para uma de resolução de 250 – 5000 X. As amostras, inicialmente, foram recobertas com uma camada de ouro de 300 Å, para visualização da superfície das partículas.

Para caracterização química foi utilizada espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, FTIR (Infrared Spectrum, Jasco, 4200 type A), no comprimento de onda de 500 – 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} e 256 scans, identificando assim as principais ligações químicas da sílica.

Por último no que respeita à caracterização física foi usado o TGA, Thermalgravimetric analysis, (TGA, Q500 – Tainstruments) para avaliação da temperatura de degradação da amostra. A porosidade da sílica, foi determinada no porosímetro de mercúrio (Poro Sizer 9320, Micromeritics) e a densidade esta foi medida no picnómetro de hélio (Accupyc 1330, Micromeritics), à temperatura ambiente.

2.4. Testes de biocompatibilidade

A hemocompatibilidade da sílica foi avaliada *in vitro* de acordo com a norma internacional (ISO) 10993-4 1999 e ASTM F 756-00 (2000), na qual se estudou o índice hemolítico através do teste de hemólise. Inicialmente procedeu-se à determinação da concentração de hemoglobina (Hb) tanto para o sangue como para o plasma e posteriormente no sangue em contacto a sílica com/sem resíduos de catalisador e precursor (ver anexo A).

Capítulo III

3. Resultados e discussão

Neste capítulo pretende-se apresentar os principais resultados obtidos assim como a sua discussão, e sempre que possível, compará-los com os existentes na literatura.

3.1. Produção de sílica

Sendo o principal objectivo a avaliação do rendimento mássico de sílica produzida, este foi avaliado de acordo com os diferentes parâmetros estudados. Assim, considerando o efeito da temperatura, para a 4 °C, com agitação a ~270 rpm e 66 horas de reacção a formação de sílica não ocorreu, isto é, não existia a formação do monólito nem partículas, apenas se verificou que o precursor foi consumido, o que indicava que uma das etapas do processo sol-gel, a hidrólise, estava concluída. Posteriormente, colocou-se a amostra à temperatura ambiente, com a mesma agitação, o que promoveu a formação de sílica ao fim de 3 horas. Conclui-se que é possível a produção do sol pode ser obtida e ser reservada para posterior obtenção do gel, evitando assim os problemas de envelhecimento do gel. Relativamente à temperatura de 37 °C com agitação a ~270 rpm, a formação de sílica foi obtida ao fim de 48 horas. Conforme é verificado na Figura 3.1, o gel que sofreu o “choque térmico” apresenta uma cor mais transparente do que o obtido para a 24 °C e 37 °C, o que se deve provavelmente ao período de tempo mais longo, que permitiu que houve-se uma estrutura mais uniforme originando, um gel mais forte e mais transparente.

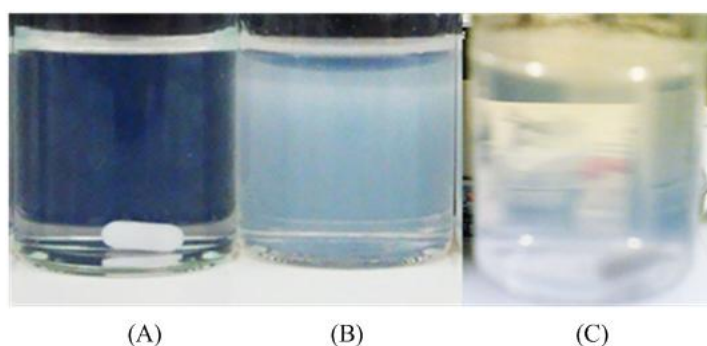


Figura 3.1 Amostras com catalisador GSH: (A) 4°C por 66 h + 3h a 24 °C (B) 24 (C) 37 °C.

Entretanto a temperatura de 4 °C foi eliminada do grupo de ensaio, visto o processo ser bastante lento.

Relativamente ao processamento da sílica produzida, e sendo que se pretendia remover os resíduos resultantes da reacção, numa fase inicial procedeu-se à lavagem dos monólitos e das partículas, contudo este método mostrou-se ineficiente,

especialmente por grandes perdas de massa de sílica durante a lavagem e a difícil remoção da água mesmo utilizando filtros de seringa, esta etapa foi eliminada do processo passando directamente para o processo de secagem. A etapa de remoção de catalisadores foi então transferida para uma etapa final do trabalho, onde se procedeu à calcinação para remoção dos resíduos da reacção.

No seguimento do objectivo principal do trabalho, a massa de sílica produzida é apresentada na Tabela 3.1. Assim sendo, verificou-se que a maior massa de sílica se obtém para o catalisador GSH, a 37 °C e com agitação de 270 rpm. Atendendo ao catalisador GSH, observou-se que para uma menor concentração há uma diminuição na produção de massa de sílica, para a mesma temperatura e agitação, variando o pH de 2,46 para 6,00. Assim, concluiu-se que o pH influencia directamente a produção de sílica, uma vez que este está dependente da concentração.

Tabela 3.1. Efeitos da temperatura (°C), agitação (rpm) e do pH da solução de catalisadores/precursor na produção de sílica (g).

Catalisador, M/L	pH	Sílica, g (Média ± Desvio Padrão.)							
		24 °C				37 °C			
		0 rpm	t (h)	270 rpm	t (h)	0 rpm	t (h)	270 rpm	t (h)
GSH, 0.15 M	2.46	0.37 ± 0.01	480	0.61 ± 0.05	72	0.50±0.05	120	1.14 ± 0.27	48
MET, 0.15 M	5.47	-		0.07 ± 0.01	408	-		0.28 ± 0.02	408
GSH, 0.01 M	6.00	-		0.15 ± 0.01	408	-		0.20 ± 0.02	408
CYS+GSH (0.15 M)	7.00	-		0.53 ± 0.02	408	-		0.66 ± 0.02	408
CYS, 0.01 M	8.60	-		0.40 ± 0.02	408	-		0.65 ± 0.18	408
CYS, 0.15 M	9.81	0.44 ± 0.05	720	0.54 ± 0.05	96	0.42±0.01	408	0.79 ± 0.03	72

Relativamente à agitação, para as mesmas condições de temperatura e pH, verificou-se um aumento na produção de sílica quando a mesma é usada. Este aumento deve-se ao facto da reacção de hidrólise ocorrer na interface entre o solvente e o precursor, assim a agitação promove a homogeneização da solução havendo uma maior superfície de contacto entre ambos, Tabela 3.1.

Atendendo ao objectivo de comparar os rendimentos de sílica para os diversos sistemas, foram escolhidos dois tempos de reacção, 72 e 120 horas, baseados em ensaios anteriores, Figura 3.2 Considerando o factor tempo, é perceptível que este é fulcral para a produção de sílica visto que o seu rendimento é significativamente superior para as mesmas condições e para o período de 120 horas. Contudo há que

salientar que para pH neutro e/ou próximo do pH neutro a massa de sílica pode ser alcançada mas para um período de tempo consideravelmente superior. A produção de sílica deve-se aos grupos sulfídricos, sendo assim compostos que contenham estes grupos, são capazes de produzir sílica na presença de um precursor, TEOS.

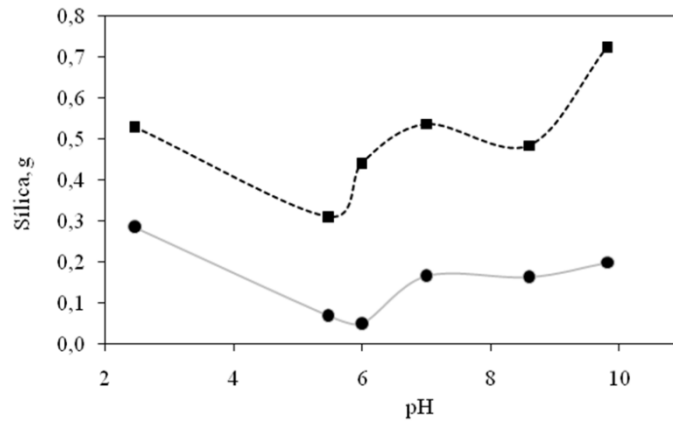


Figura 3.2. Massa de sílica obtida em função do tempo, utilizando como método de secagem o liofilizador: • 72 horas ■ 120 horas.

Foram estudados outros dois precursores naturais como a albumina e proteína de soja com o objectivo de aumentar o carácter natural da sílica, foi assim avaliado a sua funcionalidade para actuarem como catalisadores a proteína de soja e a albumina, visto fazerem parte na sua constituição moléculas que apresentam tais grupos, chegando-se à conclusão que de facto há produção de sílica, conforme evidenciado na Tabela 3.2. Esta massa de sílica foi obtida por calcinação a 600 °C e a sua presença foi confirmada pela análise de SEM/EDX como se segue.

Tabela 3.2. Massa de sílica (g) produzida a partir de albumina e proteína de soja.

Precusores	Composição	
	solvente/polímero/precursor (g/g/g)	Massa de sílica (g)
Albumina	(0,08/0,1/1,87)	0,030 ± 0,0006
Proteína de soja	(0,08/0,1/1,87)	0,025 ± 0,0005

A análise de SEM-EDX comprovou a sua presença dos grupos representativos da sílica, conforme a Figura 3.3.

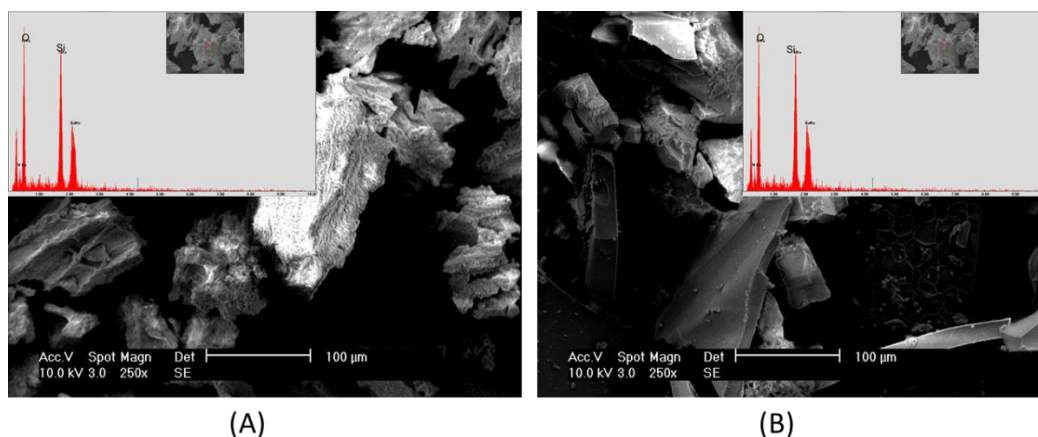


Figura 3.3 Imagens de SEM para a sílica a partir de proteína de soja (A) e albumina (B).

O rendimento mássico obtido pelos precursores naturais (albumina e proteína de soja) foram semelhantes, as amostras com GSH (pH 2,46) e MET (pH 5,47).

Relativamente aos métodos de secagem foram usados três métodos, por forma a identificar qual o método mais adequado quer na eficiente na remoção de água e possíveis resíduos da reacção (TEOS e catalisador), assim foi quantificado para os três processos, a quantidade de sílica referente primeiramente à eliminação da água, TEOS e resíduos de catalisador. Esta perda de massa no processo de secagem é denominada por M_I . Como os resíduos de catalisador e água que podiam ainda existir na amostra, foi utilizado o processo de calcinação para eliminá-los; esta segunda perda de massa é denominada M_{II} e M_{III} corresponde à massa de sílica (%) após calcinação a 600 °C em função da massa inicial de monolito. A quantidade resultante será a massa de sílica final, denominada por M_{III} . Como é observável pela Tabela 3.3, as amostras que sofrem maior perda por calcinação são as amostras secas na estufa de vácuo, pelo que neste processo o que poderá ter sido removido na etapa de secagem terá sido em parte alguma quantidade de água, também o facto de serem obtidas partículas de maiores dimensões originou que resíduos de catalisador, precursor e água tenham ficado aprisionados na matriz. O processo que apresenta melhor capacidade de remoção de resíduos catalisadores, precursor e água é o uso da extracção pressurizada e supercrítica, onde a perda de massa por calcinação é substancialmente menor para a sílica obtida a partir de GSH (pH 2,46) e CYS (pH 9,81) o que em comparação com o processo de liofilização, concluiu-se que é o processo onde os catalisadores foram removidos durante o processo, conforme o desejado. A perda de massa existente ainda no método do CO_2 supercrítico deveu-se a um tempo insuficiente de secagem. Contudo verifica-se que no uso da

extração supercrítica, para os sistemas de partículas, existe um rendimento de sílica baixo comparativamente com os restantes métodos de secagem, o que se deve possivelmente a perdas durante o processo verificadas pela presença de partículas no frasco de recolha.

Tabela 3.3. Perda de massa (%) obtida para o processo de secagem (M_I) e para o processo de calcinação (M_{II}) e massa de sílica final (M_{III})

	Sílica	M_I (%)	M_{II} (%)	M_{III} (%)
		Média ± desvio padrão		
Liofilização	GSH (pH 2,46)	90,83 ± 0,40	4,84 ± 0,08	4,32 ± 0,33
	MET (pH 5,47)	96,35 ± 0,70	1,07 ± 0,35	2,57 ± 1,05
	GSH (pH 6,00)	95,74 ± 1,70	1,90 ± 0,85	2,36 ± 0,85
	CYS+GSH (pH 7,00)	93,20 ± 0,16	3,65 ± 0,30	3,16 ± 0,15
	CYS (pH 8,60)	98,74 ± 0,39	0,59 ± 0,05	0,67 ± 0,33
	CYS (pH 9,81)	94,32 ± 1,16	4,17 ± 1,42	1,51 ± 0,26
Evaporação em estufa de vácuo	GSH (pH 2,46)	11,66 ± 6,24	84,63 ± 8,17	3,71 ± 1,92
	MET (pH 5,47)	3,04 ± 0,73	95,37 ± 0,91	1,59 ± 0,18
	GSH (pH 6,00)	8,02 ± 3,67	89,00 ± 4,55	2,98 ± 0,88
	CYS+GSH (pH 7,00)	6,72 ± 0,26	90,35 ± 0,36	2,93 ± 0,10
	CYS (pH 8,60)	1,41 ± 0,06	98,13 ± 0,06	0,46 ± 0,00
	CYS (pH 9,81)	4,53 ± 0,30	94,41 ± 0,28	1,06 ± 0,01
Extração SCF	GSH (pH 2,46)	94,88 ± 0,27	3,68 ± 0,07	3,68 ± 0,20
	MET (pH 5,47)	97,48 ± 0,44	0,95 ± 0,48	0,95 ± 0,04
	GSH (pH 6,00)	97,88 ± 1,34	1,70 ± 0,25	1,70 ± 1,09
	CYS+GSH (pH 7,00)	98,59 ± 0,55	0,64 ± 0,26	0,64 ± 0,29
	CYS (pH 8,60)	99,07 ± 0,52	0,87 ± 0,04	0,87 ± 0,48
	CYS (pH 9,81)	95,14 ± 0,09	4,18 ± 0,05	4,18 ± 0,04

Relativamente à eficiência do processo de secagem, verifica-se que o processo mais eficiente é o processo de extração supercrítica, uma vez que a perda de massa por calcinação (M_{II}) foi o que apresentou menores valores de perda de massa, conforme evidenciado na Figura 3.4, provando assim que a remoção dos catalisadores foi bem sucedida com o uso dos fluidos pressurizados na etapa lavagem/ secagem. Estas amostras foram obtidas nas mesmas condições de tempo de 7 dias, à 100 rpm e 37 °C. Atendendo aos desvios, as grandes variações podem dever-se a perdas do processo, devido à falta de controlo do vácuo, tanto na liofilização quanto na evaporação em estufa de vácuo. Relativamente à extração SFE as perdas ocorrem pela presença de um difusor de solvente com alta porosidade (poros maiores que as partículas de sílica) que permitiram a sua perda durante o processo.

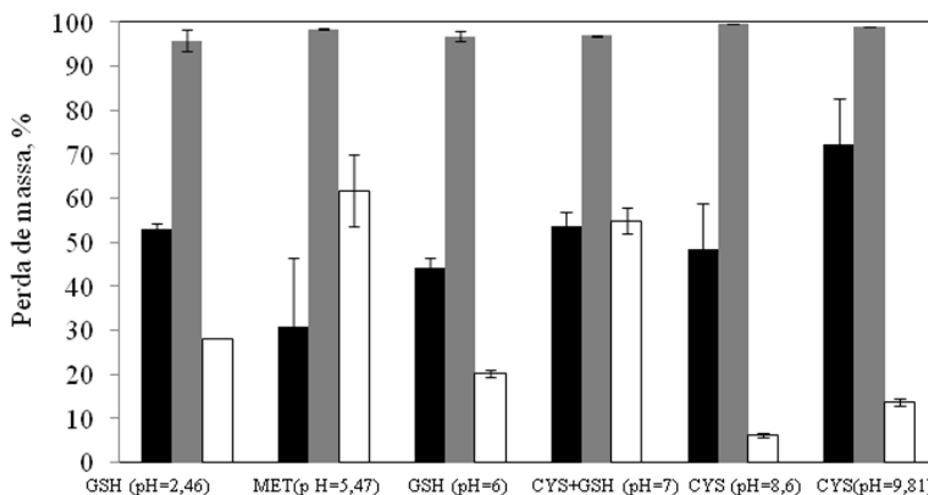


Figura 3.4. Perda de massa (%) obtida para a sílica a diferentes valores de pH (7 dias, 100 rpm, 37 °C): ■ Liofilização (-47°C; 7mbar), ■ evaporação em estufa de vácuo (-1.0mbar; 40°C), e por □ extracção SCF (40°C, 2900 psi, 2,71 mL.min⁻¹)

Foi efectuado um estudo cinético de acordo com o processo de secagem, e todos seguem uma cinética típica do processo sol-gel em excepção ao que é usado o CO₂ supercrítico, que apresenta maior massa. Este aumento pode estar relacionado com o uso de CO₂; isto é verificado na literatura onde o processo de sol-gel ocorre em células de alta pressão para a produção de sílica (Charpentier, 2008). O facto de estar perante um sistema em que há formação de partículas, as quantidades de catalisador e precursor encontram-se em excesso na solução e em presença de CO₂, a reacção no processo sol-gel provavelmente prolonga-se dentro da célula de alta pressão devido à formação de ácido carbónico, levando assim a um aumento na produção de sílica.

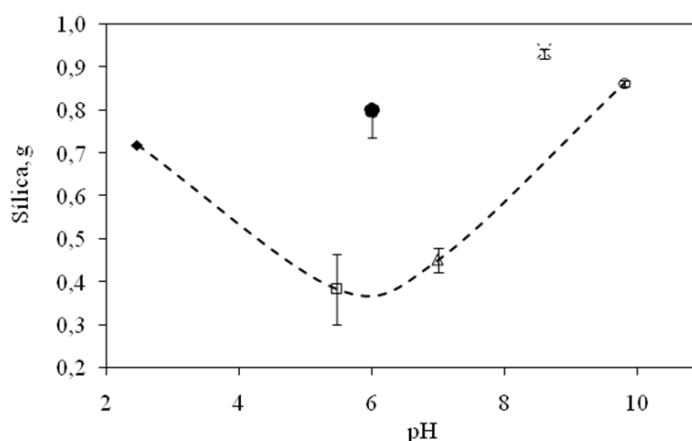


Figura 3.5. Massa de sílica produzida para diferentes valores de pH e diferentes catalisadores utilizando como método de secagem SCF.

No que se refere à estrutura da sílica, a mesma foi influenciada pelo processo de secagem. Visualmente, é possível obter partículas de dimensões bastante pequenas, pelo

processo de liofilização, como que um pó de sílica de “baixa densidade”. Na evaporação em estufa de vácuo e à temperatura ambiente as partículas apresentaram-se com uma certa granulometria, tal que também se verificou quando foi usado o CO₂ supercrítico, conforme a Figura 3.6., no entanto de dimensões mais reduzidas. Este efeito observado também pode ser devido à aglomeração de partículas que ocorre em todos os métodos e com mais frequência no processamento por evaporação na estufa de vácuo.



Figura 3.6. Sílica GSH para diferentes métodos de secagem.

A diferente configuração das partículas, está assim, associado ao método de secagem, uma vez que durante a evaporação da água houve uma retracção na estrutura do gel, e à medida que esta aumenta, a compactação da fase sólida é maior originando tensões superficiais, que em conjunto originaram o colapso da estrutura, dando origem, por vezes, a fissuras. Na evaporação na estufa de vácuo, a tensão superficial na interface gás-líquido provocou uma contracção no diâmetro dos poros e consequentemente diminuição dos mesmos, comparativamente com os restantes métodos de secagem (Tabela 3.4). No processo de liofilização a amostra é previamente congelada com azoto líquido, a transição do estado líquido para o estado sólido, teoricamente, origina uma expansão da matriz, obtendo-se assim um aumento no diâmetro dos poros. Contudo o mesmo não se observa, mas a análise destes resultados deve ser avaliado com especial atenção atendendo que as quantidades de amostra por vezes são reduzidas, podendo os resultados estarem falseados. É importante referir que as amostras obtidas, pelo processo de liofilização e evaporação em estufa de vácuo, posteriormente foram calcinadas para remover e/ou confirmar a presença de resíduos de catalisador, precursor e água. Entretanto, este processo de calcinação a partir de ~ 450 °C provoca colapso dos poros existentes na sílica.

Foi ainda avaliado a porosidade, de acordo com a variação do pH (Figura 3.7.), esta encontra-se na mesma ordem de grandeza, no entanto ligeiramente mais elevada comparativamente com o pH ácido, este facto deve-se à presença dos grupos OH que

conferiram maior basicidade à solução. Para pH ácido a porosidade é consideravelmente satisfatória, mas os valores para a liofilização e estufa de vácuo podem estar falseados devido ao processo de calcinação, para as amostras obtidas da extração supercrítica não foi usado processo de calcinação. Para pH=5,47, MET, há um aumento na concentração de OH^- provocado pelo aumento de pH, que por sua vez leva a um aumento na velocidade de condensação e conseqüentemente um aumento no crescimento das partículas, levando a um aumento de porosidade. Este efeito é anulado e leva a uma diminuição da porosidade quando se aproximou de pH neutro, onde a concentração de íons H^+ é igual à concentração de OH^- , sendo a hidrólise lenta e a condensação é mais rápida comparativamente com o pH ácido, conforme a Tabela 3.4.

De acordo com o método de secagem/eliminação de resíduos da reação e conseqüentemente efeito de colapso de poros, foi produzido um material com características finais de baixa porosidade e conseqüentemente alta densidade. De acordo com os resultados obtidos por adsorção de azoto, Tabela 3.5., o diâmetro dos poros é concordante com o obtido por intrusão de mercúrio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO Capítulo III

Tabela 3.4. Características da sílica obtida a diferentes pH's e diferentes métodos de secagem.

Amostra	Métodos de Secagem da sílica								
	Liofilização			Evaporação em Estufa de Vácuo			Extracção por SCF		
	Densidade (g/cm ³)	Porosidade (%)	Diâmetro de poros (µm)	Densidade (g/cm ³)	Porosidade (%)	Diâmetro de poros (µm)	Densidade (g/cm ³)	Porosidade (%)	Diâmetro de poros (µm)
GSH pH 2,46	1,85 ± 0,01	57,16	< 8,7	2,627 ± 0,036	45,93	< 0,007	2,526 ± 0,016	70,70	0,010
MET pH 5,47	1,99 ± 0,07	81,79	0,01	1,876 ± 0,202	51,30	0,013	2,554 ± 0,032	75,80	0,025
GSH pH 6,00	2,11 ± 0,03	78,82	-	2,85 ± 0,030	63,00	< 0,011	2,73 ± 0,112	70,08	12 – 0,01
GSH + CYS pH 7,0	2,11 ± 0,06	72,17	-	3,338 ± 0,056	67,76	0,010	2,119 ± 0,055	87,17	45,29 – 0,12
CYS pH 8,60	1,94 ± 0,04	78,82	-	1,853 ± 0,053	73,51	0,013	2,584 ± 0,053	83,98	60,64 – 0,026
CYS pH 9,81	1,99 ± 0,03	73,98	0,01	2,426 ± 0,026	67,35	0,154	2,463 ± 0,032	72,82	0,016

Tabela 3.5. Características da sílica obtida a diferentes pH's utilizando como método de secagem a extracção por SCF, por adsorção de azoto.

Catalisador (pH)	Extracção SCF		
	Adsorção N ₂		
	Diâmetro de poros (µm)	Área de superfície de BET (m ² /g)	Volume total de poros (cm ³ /g)
GSH (pH 2,46)	0,0006	139,85	0,217
MET (pH 5,47)	0,025	54,67	0,343
GSH (pH 6,00)	0,011	494,45	1,302
GSH + CYS (pH 7,00)	0,007	29,24	0,049
CYS (pH 8,60)	0,016	137,12	0,564
CYS (pH 9,81)	0,019	71,20	0,343

Da análise da Figura 3.7 conclui-se que o primeiro pico refere-se à intrusão de mercúrio nos espaços intersticiais das partículas e o segundo pico corresponde a porosidade da própria partícula. Contudo observa-se que algumas amostras, o segundo pico não é evidente o que indica que este processo é limitante, havendo assim a necessidade de avaliar a porosidade por outro tipo análise, por exemplo, através de adsorção de azoto.

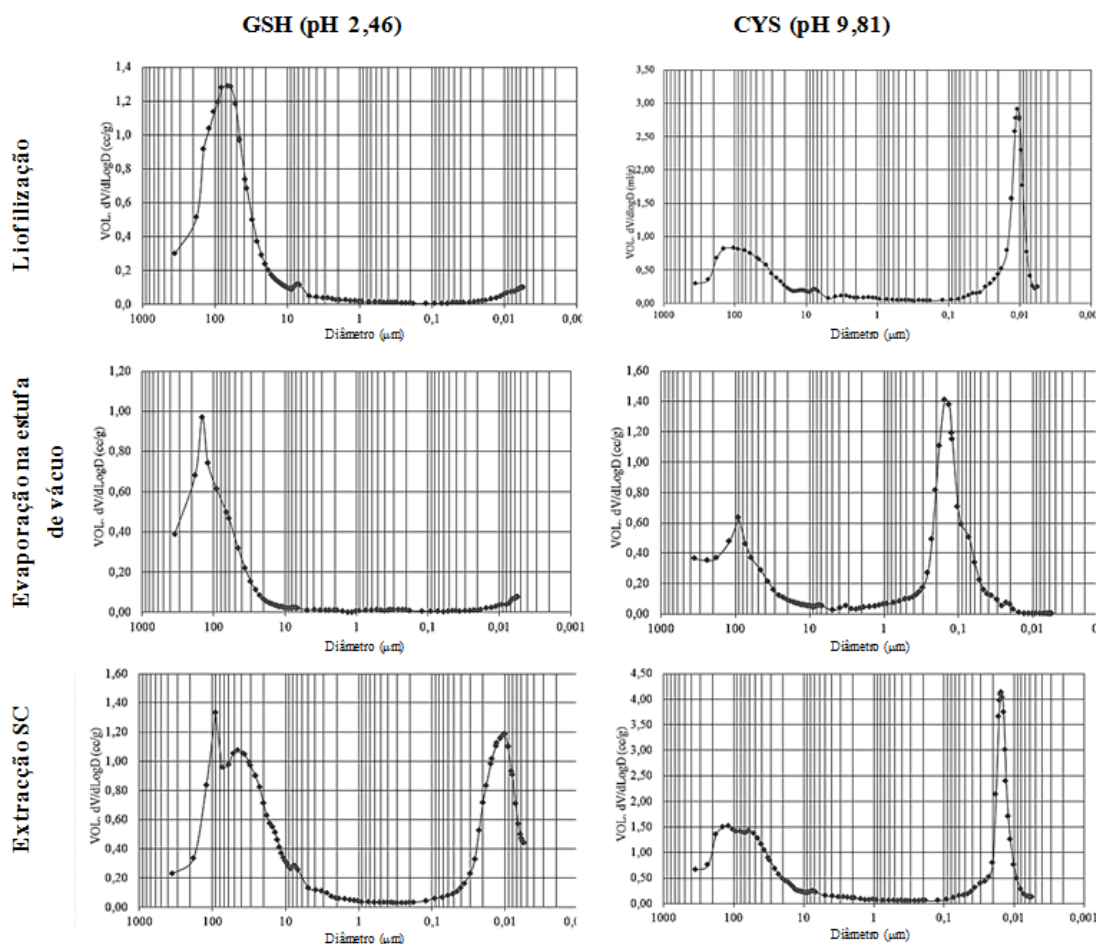


Figura 3.7. Distribuição de poros para a sílica obtida a partir de pH ácido e básico e em função do método de secagem (Anexo D).

Relativamente à análise SEM para a sílica pura encontram-se na Figura 3.8., verificou-se que para pH mais próximo do neutro, pH 5,47, 6,00 e 7,00 a sílica apresenta-se mais recortada onde se ligam os grupos OH, o que em termos de regeneração óssea seria interessante, pois garantiria uma maior área de superfície, porém, para confirmação desta característica devem ser efectuadas análise de TEM (Transmission Electron Microscopy) e NMR (Nuclear Magnetic Resonance).

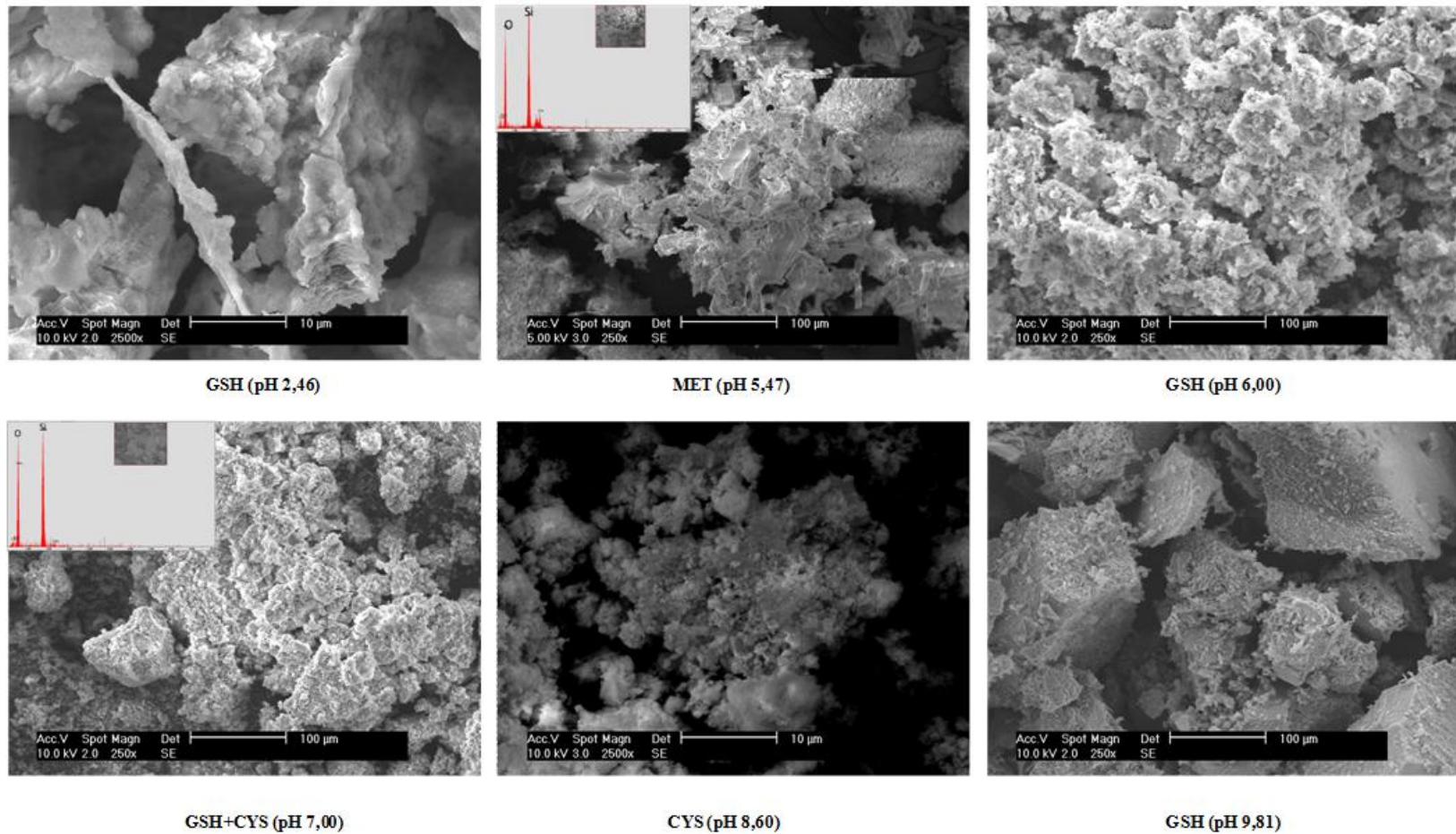


Figura 3.8. Imagens de SEM obtidas para a sílica a diferentes pH's (ver Anexo C).

Observou-se ainda partículas de maiores dimensões originadas no processo de moagem da amostra, visto ser muitas vezes ser difícil manter o mesmo tipo de moagem em todas as amostras num almofariz. Encontram-se ainda dificuldades para a obtenção de micrografias pelo comportamento da amostra aquando da passagem do feixe de electrões, o facto de esta ser extremamente instável levou a que houvesse deslocações momentâneas das partículas. Da análise EDX que se efectuou os grupos característicos da sílica (Si e OH) estavam presentes.

Comparando as medidas termogravimétricas, os valores de TGA obtidos foram relativamente mais elevados comparativamente com a mufla a 600 °C, sendo esta diferença devida a perdas durante o processo de calcinação, visto que a sílica obtida é um material extremamente sensível e perdia-se na manipulação dos cadinhos. Considerando a precisão do método e do equipamento, os valores de TGA, Tabela 3.6., apresentam maior confiabilidade, embora com grandezas similares.

Tabela 3.6. Resumo para os diferentes pH's em função do rendimento de sílica.

Amostra	TGA		Mufla 600 °C, Resíduo %
	Temperatura inicial de degradação (°C)	Resíduo %	
GSH (pH 2,46)	91,28	68,31	56,83
MET (pH 5,47)	144,93	52,26	48,89
GSH (pH 6,00)	24,89	76,44	51,70
GSH + CYS (pH 7,00)	67,01	81,25	56,72
CYS (pH 8,60)	91,58	82,24	66,80
CYS (pH 9,81)	96,88	84,73	75,58
Diatomácea	97,73	97,44	-

As curvas de TGA apresentam-se na Figura 3.10., onde se verifica que as amostras onde é usado MET e CYS a degradação dos resíduos existentes na sílica inicia-se à mesma temperatura que o catalisador, o que se conclui que estes resíduos são referentes a catalisador ainda existente na amostra. Relativamente às amostras de GSH essa temperatura é difícil de identificar, possivelmente, devido ao comportamento do catalisador.

Da curva de TGA que se efectuou a uma amostra de uma diatomácea, Figura 3.9, obtém-se um resíduo de 97,44 %, ou seja, na sua composição ~ 97% é sílica.

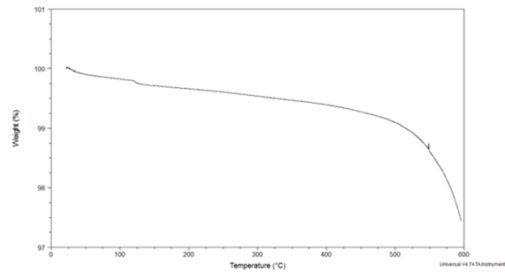


Figura 3.9. Curva de TGA para uma diatomácea.

RESULTADOS E DISCUSSÃO Capítulo III

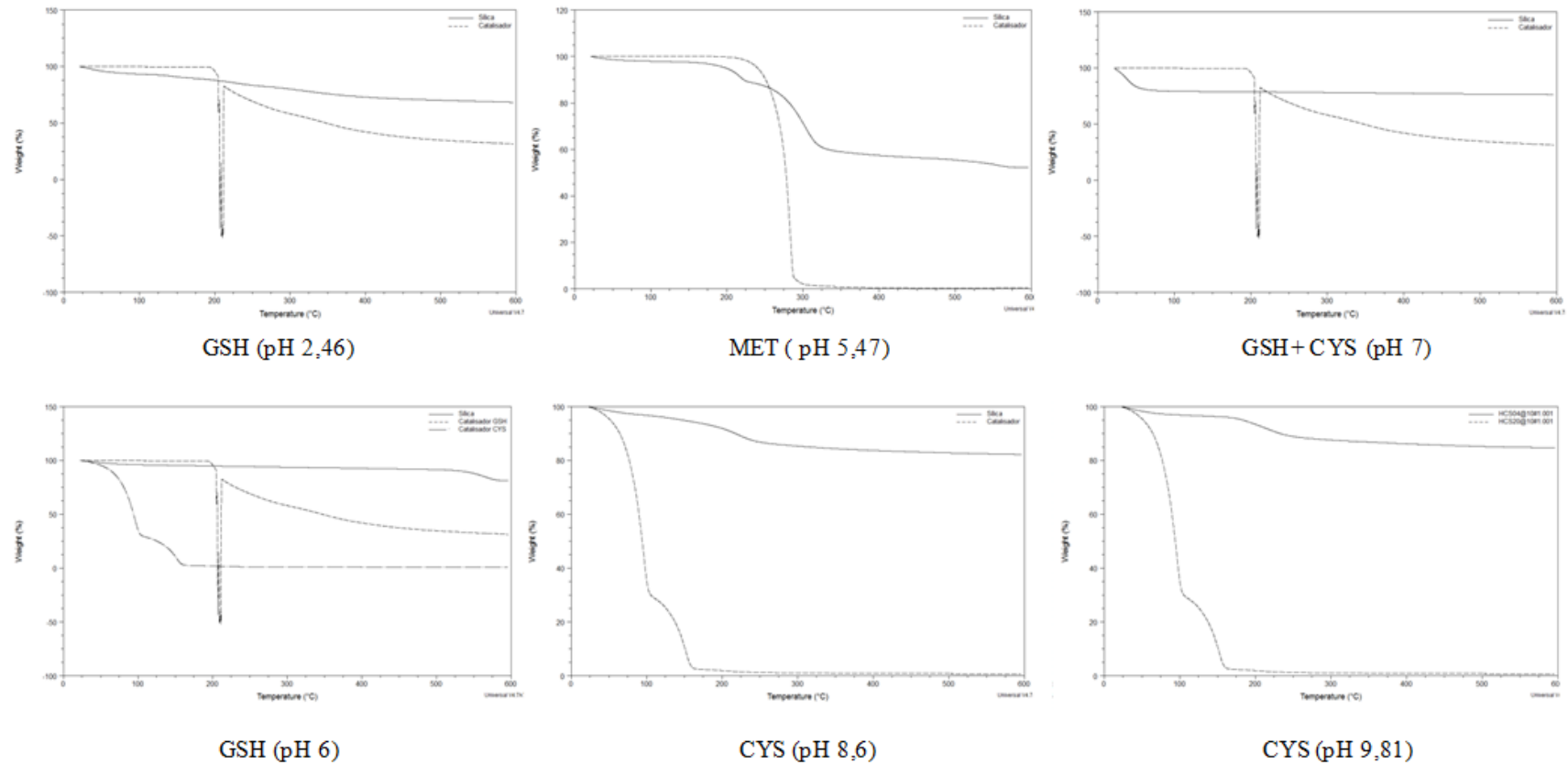


Figura 3.10. Curvas de TGA para a sílica obtida a diferentes pH's.

Os espectros infravermelhos (IV) para os sistemas estudados, os quais tem por base a produção de sílica, foram obtidos para a gama de comprimentos de onda de 500 – 4000 cm^{-1} . De salientar, que inicialmente o comprimento de onda que se pretendia estudar, encontrava-se compreendida entre 400 – 4000 cm^{-1} atendendo que a sílica apresenta uma banda característica a $\cong 480 \text{ cm}^{-1}$, torção Si – O – Si / O – Si – O, a qual não foi possível obter devido a limitações do equipamento usado.

Na Figura 3.11, são apresentados os espectros obtidos para a sílica a partir do catalisador glutaciona. Cruzando os resultados para o catalisador e para a sílica obtida a partir do mesmo, pode-se concluir que a quantidade que existe de catalisador é diminuta, uma vez que não existe nenhum pico evidente. Relativamente à sílica é possível identificar as bandas características da mesma. As bandas características quer para o catalisador, quer para a sílica são apresentadas na mesma figura.

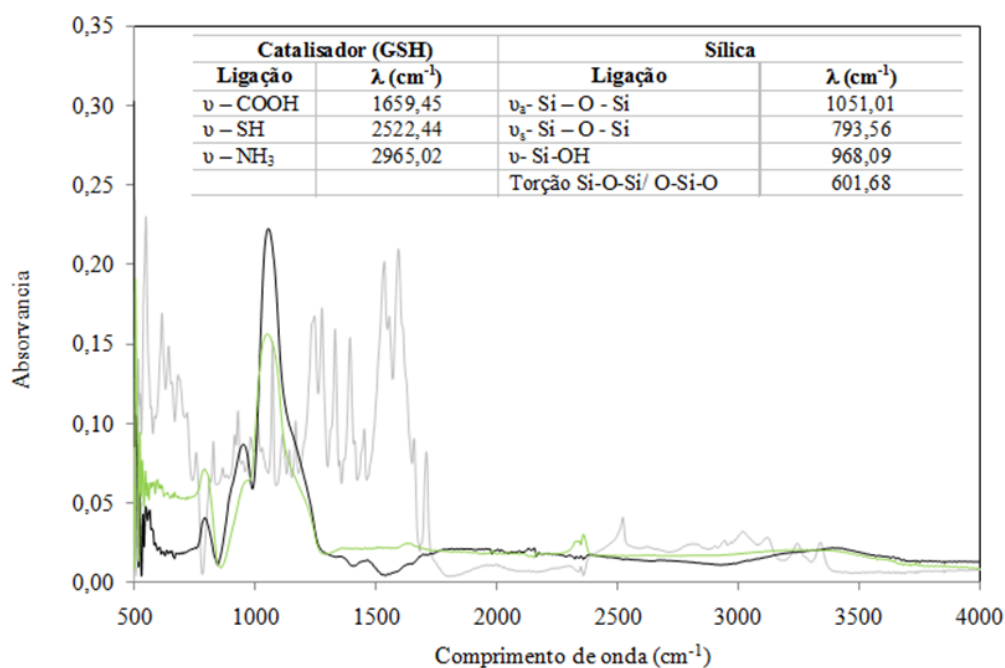


Figura 3.11. Espectro IV e respectivas bandas características, para a sílica obtida a pH=2,46 com o catalisador glutaciona (- Catalisador; - sílica calcinada; - sílica não calcinada).

No que se refere ao catalisador cisteamina, estão apresentados os resultados referentes ao mesmo e a respectiva sílica, na Figura 3.12. Da sua análise é evidente as bandas características da sílica, apesar de se encontrarem ligeiramente deslocadas para a direita, no entanto encontram-se dentro da gama de comprimento de onda esperado.

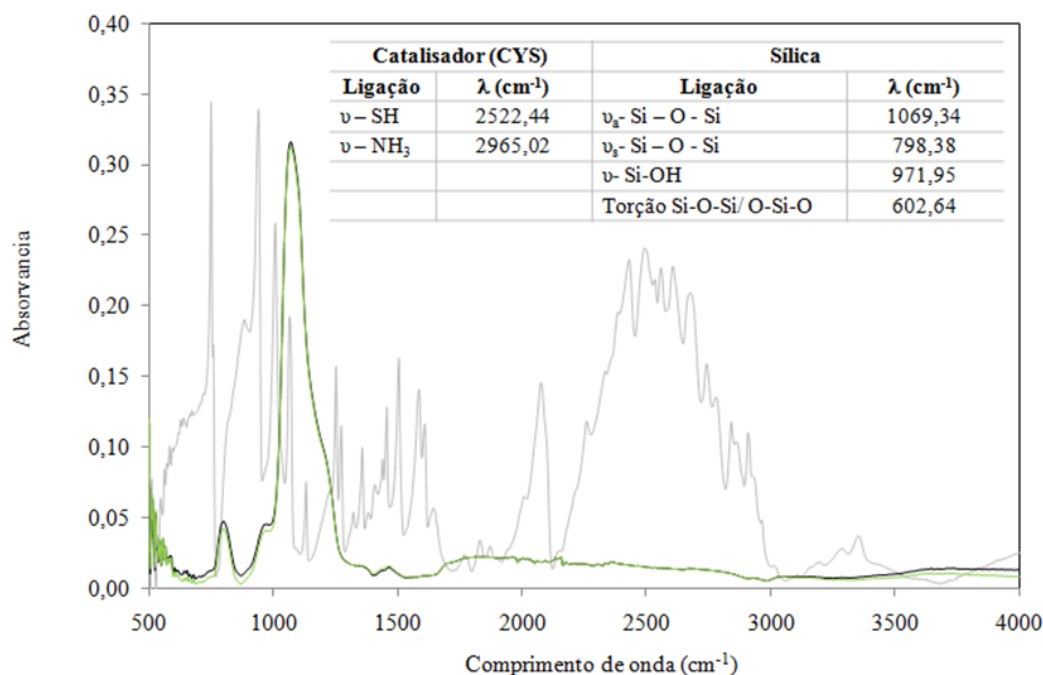


Figura 3.12. Espectro IV e respectivas bandas características, para a sílica obtida a pH=9,81 com o catalisador cisteamina (- Catalisador; - sílica calcinada; - sílica não calcinada).

Relativamente ao último catalisador estudado, metionina, os espectros IV quer para o catalisador assim como para a sílica obtida a partir são apresentados de seguida, no gráfico 3.13, onde estão evidentes as bandas características da sílica.

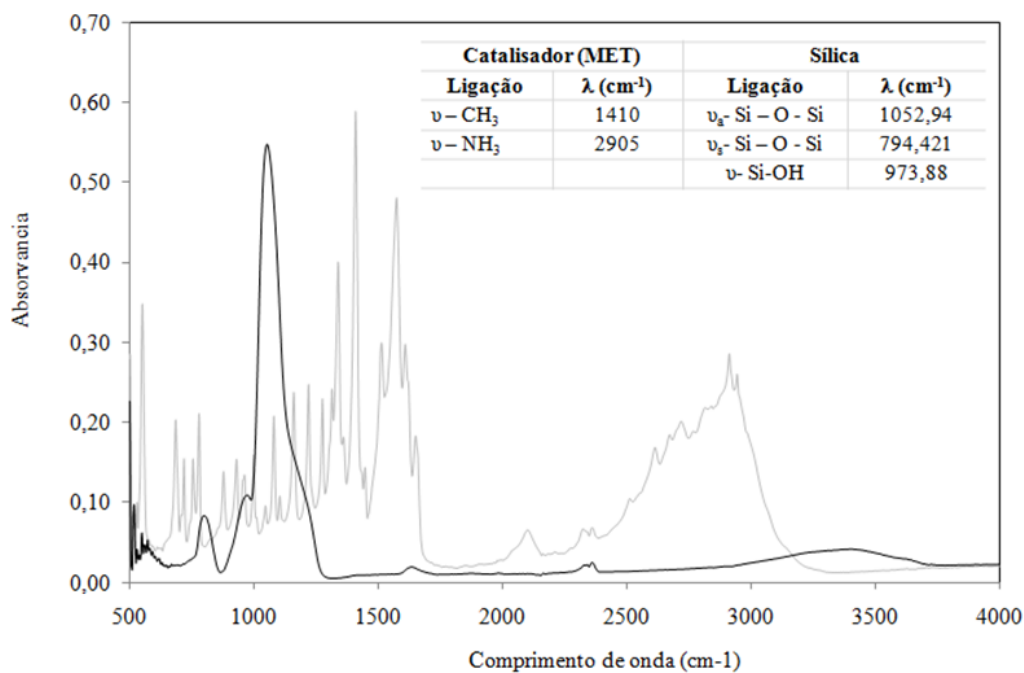


Figura 3.13. Espectro IV e respectivas bandas características, para a sílica obtida a pH=9,81 com o catalisador metionina (- Catalisador; - sílica calcinada; - sílica não calcinada).

Conclui-se da análise FTIR, que ambos os catalisadores utilizados promovem a formação de sílica, uma vez que as ligações características da sílica estão evidentes. Contudo, os resíduos de catalisadores, se existentes, não são quantificáveis, uma vez que, aparentemente, estão em quantidades muito pequenas.~

3.2. Produção de Compósitos à base de sílica

Para a produção de compósitos à base de sílica foi efectuado um estudo com diversos biopolímeros, com potenciais aplicações biomédicas, assim como o uso de outro tipo de precursores de modo a avaliar qual o potencial na polimerização vinílica usando os catalisadores biomiméticos no processo sol-gel. São assim apresentados na tabela 3.5. as principais observações da sua obtenção. Este estudo foi efectuado para o catalisador GSH (2,46) e CYS (9,81).

Alguns polímeros não se dissolveram, nomeadamente, o dextrano, a gelatina, o amido, tanto para o pH ácido quanto básico. As pectinas, a proteína de soja, o alginato de sódio e também a hidroxiapatite não se dissolveram. Durante o processo sol-gel algumas destas formulações produziram partículas de sílica e outras em monólito, Tabela 3.7.

A utilização de monómeros vinílicos (Tabela 3.7), são comumente utilizados em combinação com o processo sol-gel, para a obtenção de materiais híbridos à base de sílica. Primeiramente dá-se a formação dos grupos silanol, provenientes do processo sol-gel, seguindo-se a polimerização vinílica, onde estes grupos vão reagir com os grupos OH originando uma ligação covalente entre o monómero e composto inorgânico de sílica. O Metacrilato de 2-hidroxietila é muito usado, para a produção da poli (sílica-acrílica) com potenciais aplicações para restauradores odontológicos. (Li , et al., 2007).

Tabela 3.7. Observações relativas à preparação dos compósitos de sílica.

Polímero	Observações	
	GSH (0,15 M)	CYS (0,15 M)
Dextrano	Não se dissolveu, originou uma dispersão com partículas	Não se dissolveu, originou uma dispersão com
Gelatina		
Amido		
Pectina de maçã	Dissolveu-se originando um monolito	Não se dissolveu, originou uma dispersão com partículas
Pectina de citrinos		
Quitosano		
Albumina	Dissolveu-se parcialmente, originou uma dispersão com partículas	Dissolveu-se originando uma solução viscosa
Proteína de soja		
Alginato de sódio	Não se dissolveu, originou uma dispersão com partículas	-
Amilopectina	Dissolveu-se originando um monolito	-
Dextrano oxidado		-
Carboximetilquitosano		-
Carboxibutilquitosano		-
Succinilquitosano		-
Alginato de sódio + Gelatina (1:1)	Dissolveu-se parcialmente originando um monolito	-
Hidroxiapatite	Não se dissolveu, originou uma dispersão com partículas	-
Taninos		
Tara fruto > 80 mesh	Dissolveu-se originando um monolito	-
Tara fruto e semente		-
Extracto de Pinheiro		Não se dissolveu, originou uma dispersão com partículas
Quebracho		-
Mimosa		-
Precursores		
Vinil tri-metoxi-silano	Formação de gel ao fim de ~ 10 minutos. Usou-se agitação	Partículas em suspensão ao fim de 1 minuto, ao fim de 3 minutos formação de um gel
Vinil tri-etoxi-silano		Solução turva ao fim de 10 minutos com partículas em suspensão.
Glicidil propil trimetoxissilano	Formação de gel ao fim de ~ 15 minutos. Usou-se agitação.	-
Metacrilato de 2-hidroxietila		Solução turva ao fim de 30 minutos.
Ácido acrílico/Persulfato de potássio	Formação de gel ao fim de ~ 5 minutos. Procedeu-se primeiramente à hidrólise a 37°C. Usou-se agitação.	-

De acordo com os polímeros estudados e para uma avaliação mais pormenorizada, procedeu-se ao estudo mais detalhado para o extracto de pinheiro, o

quitosano, a albumina e a proteína de soja, para GSH (0,15M) e CYS (0,15 M) utilizando dois métodos de secagem, cujos resultados são apresentados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Massa de sílica (g) para os compósitos que tem por base GSH e CYS.

Compósitos	Massa de sílica (g)	
	Evaporação por estufa de vácuo	Liofilização
GSH		
Extracto de pinheiro	2,052±0,1616	1,416±0,012
Quitosano	1,580±0,060	1,566±0,262
Albumina	0,596±0,420	0,596±0,420
Proteína de Soja	0,659±0,465	0,463±0,327
CYS		
Extracto de pinheiro	0,874 ±0,0006	1,010 ±0,010
Quitosano	1,315 ± 0,002	1,327 ± 0,002
Albumina	1,049 ± 0,021	1,132 ± 0,0008
Proteína de Soja	1,003 ± 0,215	1,081 ± 0,019

Da análise da Tabela 3.8. verifica-se que os rendimentos de sílica não foram afectados, isto é, a presença de polímeros não inibiu a sua produção. Contudo, observa-se que a secagem através de evaporação por estufa de vácuo é o que apresenta maiores desvios, no entanto estes estão associados a perdas no processo, uma vez que não é possível o controlo do vácuo

Para uma visão macroscópica dos compósitos foi utilizado microscopia óptica, a qual se apresenta no Anexo G.

Relativamente à análise de SEM, Figura 3.14 e 3.15 é possível observar a existência de partículas de diferentes dimensões, provavelmente devido ao método de moagem utilizado, uma vez que não era possível uma uniformização.

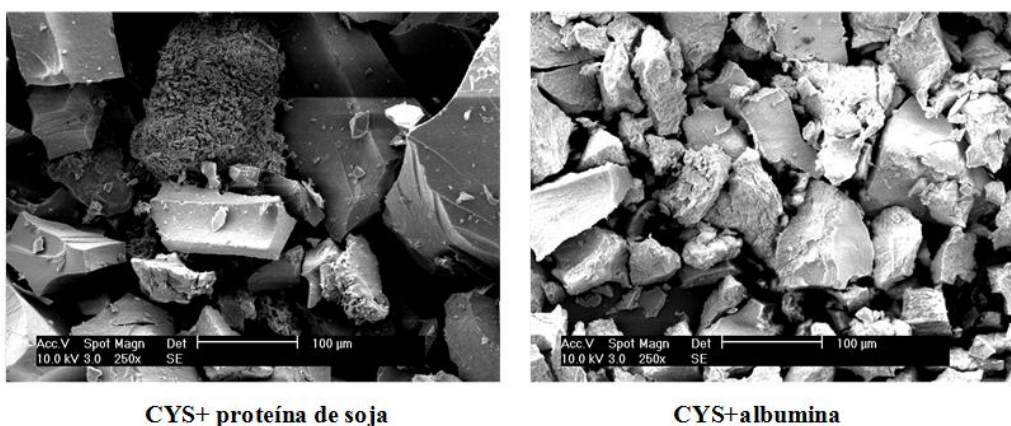


Figura 3.14. Imagens de SEM obtidas para os compósitos de sílica a partir do catalisador GSH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO Capítulo III

Visualmente, observa-se regiões mais densas e outras mais porosas, contudo esta porosidade é relativa e poderá não ser representativa de toda a amostra. Entretanto o EDX, mostrou sempre a presença de silício assim como zonas em que a sua presença era diminuta dando assim lugar, aparentemente, o que indica a presença do polímero, assegurando que em parte um dos objectivos da obtenção de compósitos à base de sílica foi alcançado.

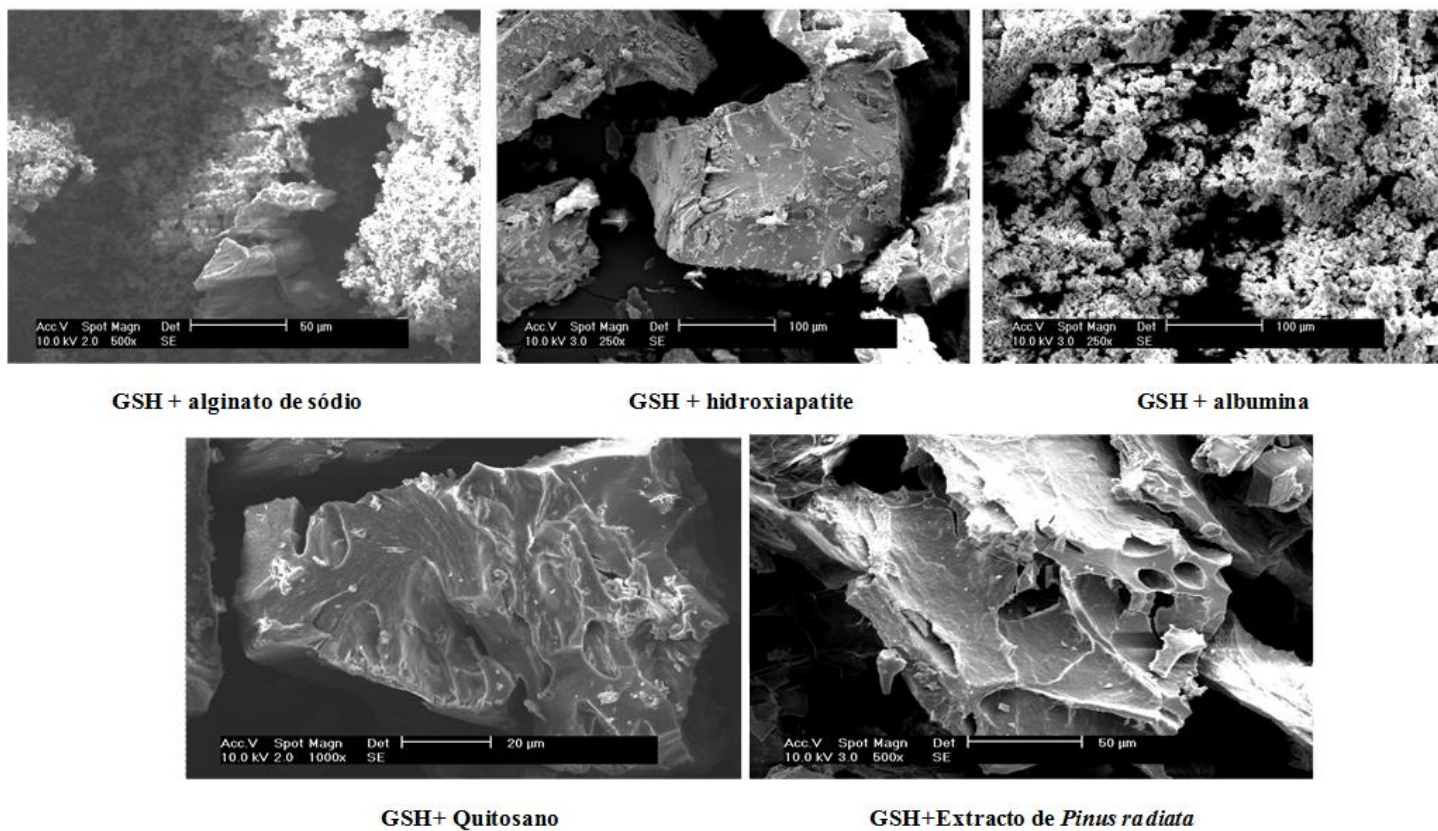


Figura 3.15. Imagens de SEM obtidas para os compósitos de sílica obtidos a partir de GSH.

Foi ainda utilizado a análise FTIR para alguns dos compósitos obtidos, por forma a avaliar a presença da sílica.

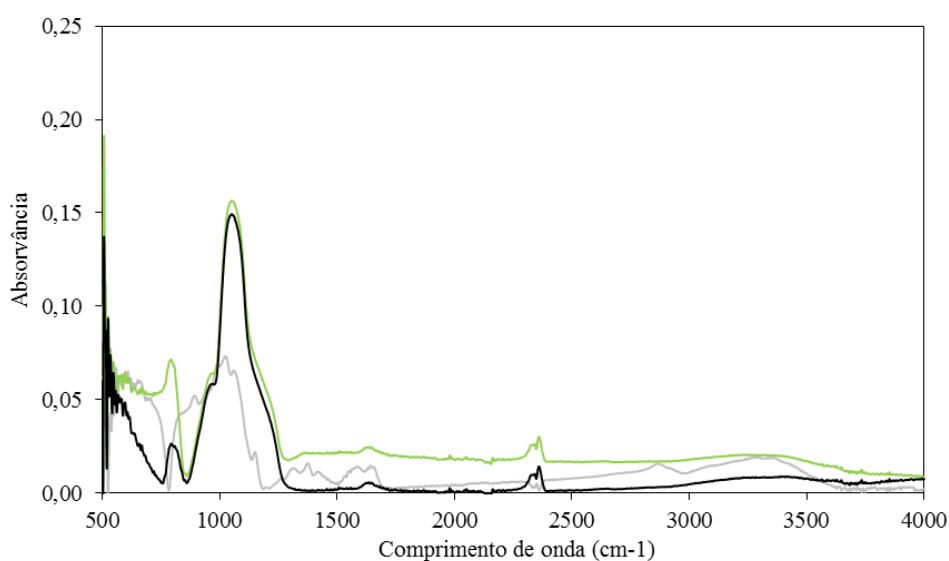


Figura 3.16. Espectro IV para o compósito sílica quitosano. (- Polímero; - sílica; - sílica com polímero).

Por exemplo, para o compósito quitosano (Figura 3.16.), é evidenciado o pico que representa a presença de uma amina primária a $1024,98\text{cm}^{-1}$, a amina secundária a $1585,2\text{ cm}^{-1}$. Ainda as bandas a $1150,33\text{ cm}^{-1}$ e a $1060,75\text{ cm}^{-1}$ devido ao estiramento da ligação C-O, e a $3295,75\text{ cm}^{-1}$ devido ao estiramento das ligações O-H. A zona entre $650\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ é característica dos anéis benzóicos. Relativamente ao espectro de sílica com polímero é perceptível que a produção de sílica não é afectada, mantendo-se presente as bandas características da sílica e aparentemente as bandas características do quitosano.(Anexo F).

Para a sílica com catalisador CYS, os dados tem ser analisados com especial cuidado uma vez que a dissolução do polímero não é completa, como é o caso do quitosano e extracto de pinus, podendo levar a conclusões precipitadas, sendo que da análise do Tabela 3.9., são estes que apresentam diminuição da porosidade relativamente à sílica pura, uma vez que para os restantes compósitos se verifica esse aumento.

Tabela 3.9. Propriedades obtidas para os compósitos à base de sílica obtidos para o catalisador GSH (0,15 M) e CYS (0,15M).

Compósitos		Porosidade %	Diâmetro de poros (µm)	Densidade (g/cm ³)	TGA		Mufla 600 °C
					Temperatura inicial de degradação	Resíduo, %	Resíduo, %
GSH	Extracto de pinheiro	74,82	< 0,01	1,54 ± 0,02	70,79	82,73	78,91
	Quitosano	60,34	< 0,015	1,49 ± 0,01	96,49	67,54	54,89
	Albumina	52,34	< 0,01	1,46 ± 0,01	65,23	72,58	56,89
	Proteína de soja	74,07	< 0,007	1,95 ± 0,01	65,24	65,92	65,02
CYS	Extracto de pinheiro	70,42	0,185	2,66 ± 0,04	56,45	78,14	72,15
	Quitosano	73,30	0,183	2,91 ± 0,04	45,87	78,76	74,52
	Albumina	76,28	1,648	1,66 ± 0,03	36,45	78,61	65,25
	Proteína de soja	76,97	0,021	1,51 ± 0,03	45,87	66,09	65,12

Relativamente aos compósitos à base de sílica obtidos para o catalisador GSH, a temperatura de degradação foi estudada para os compósitos à base de sílica e alginato de sódio, hidroxapatite, quitosano, proteína de soja, albumina, tal como o extracto de pinheiro.

Para o compósito de sílica e alginato de sódio, conclui-se que amostra ainda possui alguma humidade que é representada pelo decaimento inicial. Comparando a curva do compósito de sílica com a sílica pura é perceptível que seguem os mesmos patamares de degradação, no entanto o patamar que se inicia a ~ 240 °C é ligeiramente acentuado, o que é justificável uma vez que corresponde também a uma das etapas de degradação do alginato de sódio. Segundo *Parhi et al.* (2006), o alginato de sódio submetido a um processo de degradação 25–900 °C da qual resultaram duas etapas de degradação, a primeira etapa ocorre a 240 °C com uma perda de massa de 35 % e a segunda a 640 °C evidenciando uma perda de 13 %. Relativamente ao polímero analisado e atendendo que o processo apenas é submetido de uma temperatura máxima de 600 °C, é evidenciado uma etapa de degradação a 245 °C o que indica a ruptura das cadeias resultando um resíduo de 65,52 %. No entanto, o processo de degradação deveria atingir os 900 °C para que fosse garantido a degradação completa do polímero (*Parhi, et al., 2006*). Relativamente ao compósito sílica/alginato de sódio, a 600 °C existe um resíduo de 65,37%.

De acordo com a curva de degradação o quitosano apresenta uma temperatura de degradação de ~ 301,49 °C, que comparado com a sílica pura o compósito de sílica estes apresentam os mesmos patamares de degradação, sendo no entanto mais acentuado

o patamar para a temperatura de 300 °C. O mecanismo de degradação do compósito de sílica com polímero ocorre num processo de duas etapas, a degradação inicia-se 38,69 °C, originando uma perda de massa de 10,45 %, ocorrendo a degradação seguinte a 192,18 °C com uma perda de massa de 9,061 %. De acordo com *Peng-Zhi Hong* (2007), o mecanismo de degradação do quitosano resulta uma só etapa a 300 °C, sendo totalmente degradado. Assim o resíduo de 67,51 % obtido refere-se unicamente a sílica, uma vez que a 600 °C todo o polímero foi consumido.

No que se refere à proteína de soja, a sílica pura vs compósito de sílica segue os mesmos patamares de degradação. Segundo o estudo térmico efectuado por *Soares et al.* (2005), a 600 °C ainda existirá cerca de 25 % de polímero o que vai de encontro ao que se obteve, assim o resíduo do compósito que se obtém, 65,92 %, ainda possui cerca de 25 % de proteína de soja, sendo portanto necessário uma temperatura superior para se proceder à degradação completa do polímero.

Relativamente aos taninos, a degradação do compósito de sílica sofre algumas modificações nas etapas de degradação em relação à sílica pura, algo que não se tinha verificado para os restantes compósitos. Também no que se refere ao extracto puro, a 600 °C ainda existe cerca de 40 % por degradar, o que poderá justificar a obtenção de um resíduo no compósito de 82,73 %. Não há valores na literatura para o extracto de pinheiro rico em taninos, assim como a hidroxiapatite.

No que se refere ao catalisador cisteamina, foram utilizados os mesmos polímeros para o catalisador glutaciona, sendo os mesmos apresentados de seguida.

Considerando o compósito sílica/quitosano, este segue os mesmos patamares de degradação da sílica pura, sendo no entanto evidente uma ligeira acentuação. Resultando um resíduo de 78,76 % que ainda possui polímero, uma vez que a 600 °C ainda existe polímero por degradar, apesar de muitos autores afirmarem que a esta temperatura o polímero já se degradou completamente (*Peng- Zhi Hong*, 2007).

Tal como para o compósito sílica/proteína de soja, a degradação do compósito também segue a degradação da sílica pura, resultando um resíduo de 65,96 %, este que ainda contem parte de polímero visto que a 600 °C ainda existe cerca de 25 % do mesmo.

No que se refere ao compósito de sílica/extracto de pinheiro, o resultante é de 78,14 %, resíduo este que ainda possui na sua constituição resíduo de polímero.

No sistema de libertação controlada para a sílica obtida a partir dos catalisadores GSH, MET e CYS a diferentes concentrações de fármaco, (1, 2 e 4 mg/g) verificou-se

que a libertação obtida a partir da sílica produzida em meio ácido com GSH, existiu uma relação directa da massa libertada de fármaco com a concentração inicial do mesmo.

Para a GSH a produção média de sílica com diferentes concentrações de dexametasona foi de $1,02 \pm 0,01$ g, revelando que a concentração de fármaco não interferiu no processo de produção de sílica, assim como para a MET e CYS, com produções médias de $0,95 \pm 0,04$ e $0,94 \pm 0,01$, respectivamente.

Esta sílica apresenta diâmetro de poros $\sim 8,6 \mu\text{m}$, contudo, para a sílica com fármaco observou-se que existiu uma diminuição no tamanho dos poros, $< 0,01 \mu\text{m}$, do qual se concluir que a dexametasona possa estar aprisionada dentro destes.

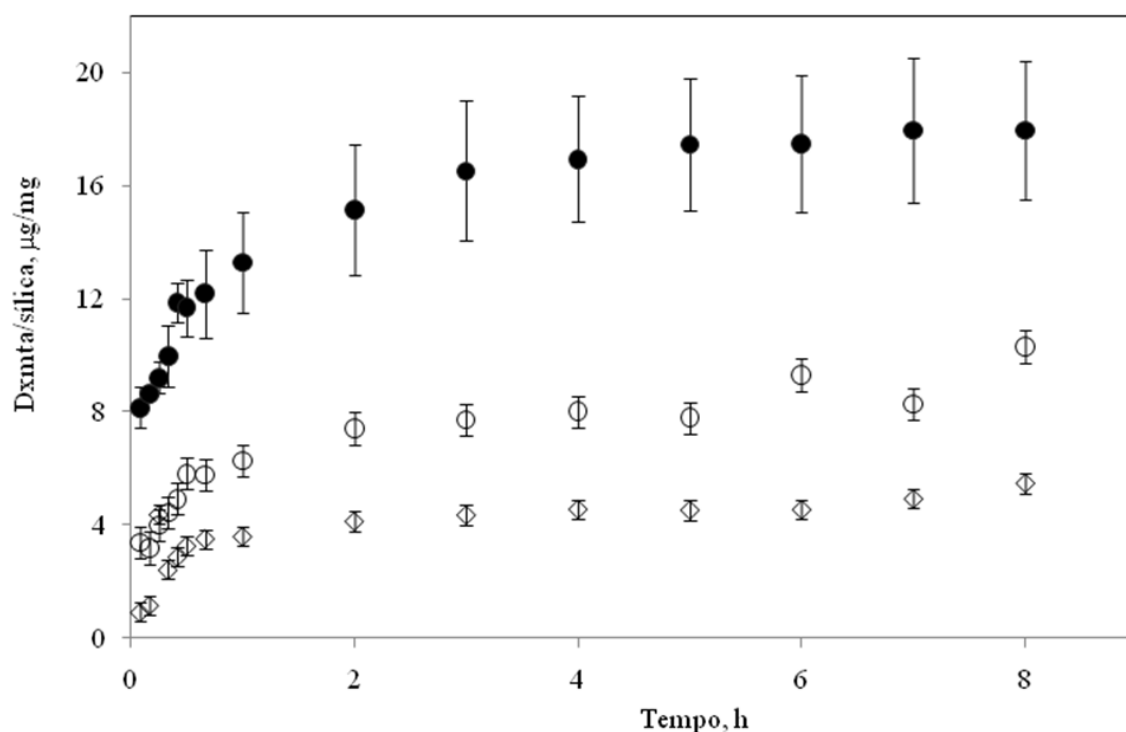


Figura3.17. Curva de libertação para a sílica obtida a partir de pH ácido (GSH) para as concentrações: ∇ 1 mg, \circ 2 mg, \bullet 4 mg.

Para pH neutro (5,46), MET, observou-se que a libertação apresenta valores inferiores ao pH ácido (GSH), o que também levou a uma maior variação da medida. É importante referir que no caso da Figura 3.18., estava-se perante um sistema de formação de partículas, não garantindo assim que a sílica se forma-se com a dexametasona encapsulada. Os desvios existentes podem dever-se a problemas técnicos do método de libertação. Contudo, fim de oito horas a libertação máxima conseguida foi de $\sim 10 \mu\text{g}/\text{mg}$ a partir de pH neutro (MET), Figura 3.18.

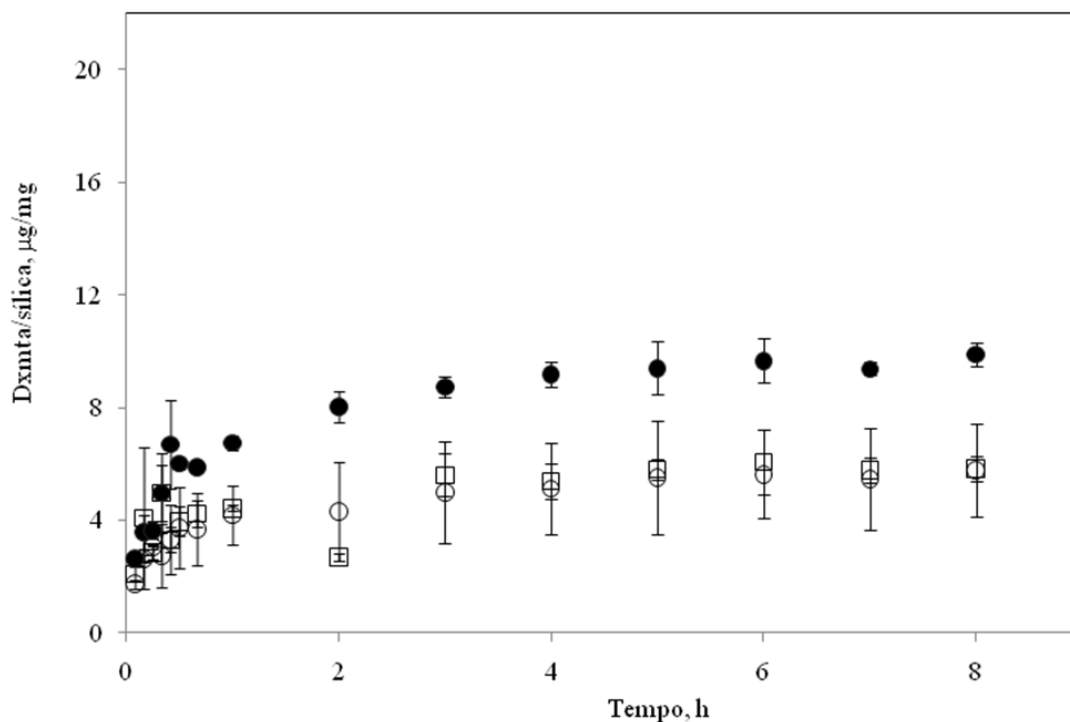


Figura 3.18. Curva de libertação para a sílica obtida a partir de pH neutro (MET) para as concentrações: \diamond 1 mg, \circ 2 mg, \bullet 4 mg.

Relativamente às amostras produzidas com CYS, Figura 3.19, observou-se ao fim de duas horas de libertação houve uma inversão nas quantidades de dexametasona libertada, isto é, a amostra que possuía maior concentração de fármaco passou a libertar menos. Este facto pode estar associado a dimensão dos poros que constituíam a amostra, uma vez que estes apresentavam uma dimensão de $\sim 0,011 \mu\text{m}$, uma vez que este diâmetro demasiado pequeno pode dificultar a libertação. No entanto, pode ainda aliar-se o facto de estarmos perante uma dispersão e a dexametasona se encontrar em suspensão na solução, o efeito de difusão observável no gráfico ser apenas referente ao efeito da membrana apesar de esta ter sido hidratada em água por 24 h. Para uma avaliação deste resultado devia ter sido estudado o efeito da dexametasona na membrana eliminando-se assim o seu efeito. Ao fim de 8 horas a massa máxima de dexametasona libertada foi de $\sim 10 \mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra, e tal era conseguido para a concentração de 1mg.

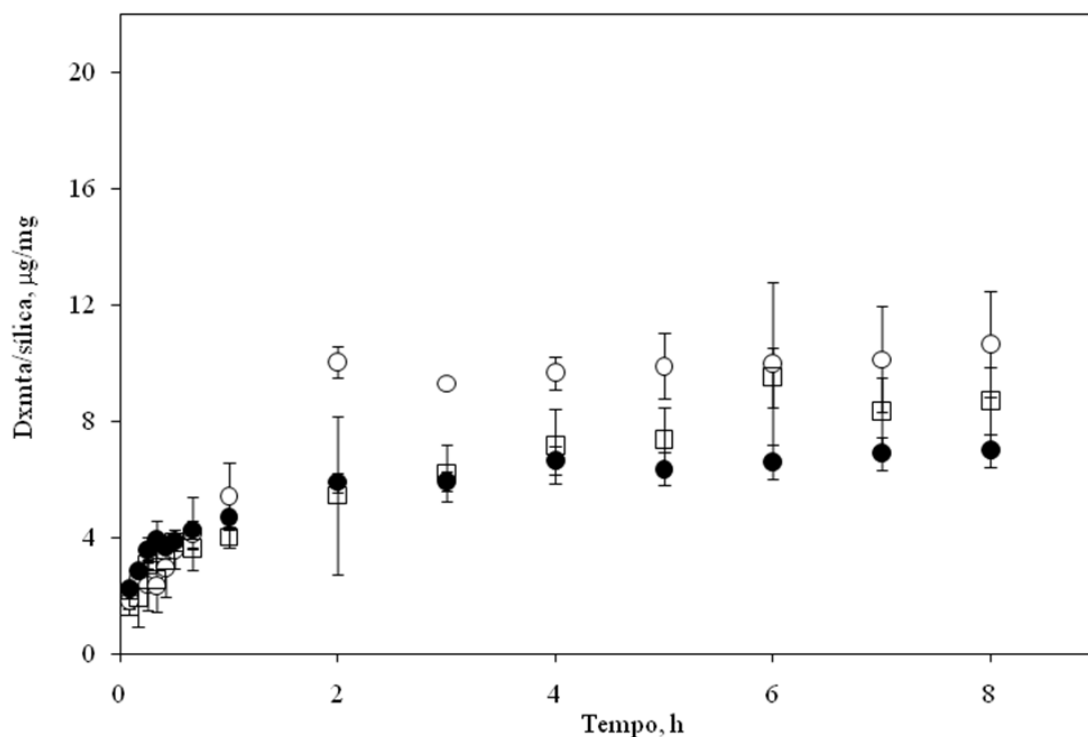


Figura 3.19. Curva de liberação para a sílica obtida a partir de pH básico (CYS) para as concentrações: \diamond 1 mg, \circ 2 mg, \bullet 4 mg.

Da análise dos gráficos anteriores conclui-se, que há um gradiente de liberação mais acentuado para as amostras que possuem uma concentração mais elevada, em excepção para a sílica CYS (9,81). Nas primeiras horas de liberação existe alguma instabilidade que se deve ao facto da barreira que o fármaco encontra, primeiramente a saída de dentro da partícula de sílica e posteriormente atravessar a barreira da membrana que encontra, embora esta estivesse hidratada previamente.

Efectuado o estudo cinético de acordo com o modelo de *Korsmeyer e Peppas*, o valor obtido para o expoente de liberação, n , para a amostra de 1 mg, caracteriza-se por apresentar um comportamento análogo. Pode dever-se também à geometria da partícula, acerca da qual nada se pode aferir, visto que a geometria de partículas não foi objecto de estudo no presente trabalho. Relativamente às restantes concentrações utilizadas, 2 e 4 mg, apresenta comportamento fickiano, o qual é conduzido por diferenças de gradiente onde a concentração de dexametasona é directamente proporcional ao tempo de liberação. Relativamente à MET, o valor do expoente de liberação é de 2,210, sendo este valor superior a 1, pode-se afirmar que a cinética é de ordem t^{n-1} . Para 2 e 4 mg apresentam comportamento fickiano. Verifica-se que a constante cinética não aumenta proporcionalmente com a massa, sendo o valor deste superior para a amostra de 2 mg. No que se refere à cisteamina, ambas as amostras apresentam comportamento fickiano

existindo um aumento proporcional com a massa. Para ambas as amostras o valor do erro é sempre superior a 0,9, conforme a Tabela 3.10.

Tabela 3.10. Parâmetros cinéticos para o sistema sílica/ dexametasona.

Amostra (pH)	Concentração de dexametasona, mg/g sílica	Parâmetros cinéticos		
		<i>n</i>	<i>k</i>	<i>R</i> ²
GSH (2,46)	1	0,644	0,074	0,999
	2	0,338	0,197	0,983
	4	0,126	0,391	0,954
MET (5,47)	1	2,210	0,001	0,922
	2	0,409	0,166	0,927
	4	0,409	0,139	0,901
CYS (9,81)	1	0,407	0,086	0,911
	2	0,411	0,093	0,939
	4	0,300	0,209	0,924

Comparando as sílicas obtidas por diferentes catalisadores (GSH, MET e CYS) produzidas com dexametasona nas três concentrações (Figura 3.20.), pode-se verificar o perfil de libertação desta molécula para identificar a “performance” deste material.

Verifica-se que a sílica obtida a partir de GSH liberta maiores quantidades de fármaco nas formulações iniciais de 2 e 4 mg/ g de sílica. No entanto, os valores mais elevados de dexametasona libertada foi de ~ 18 µg/ mg para a formulação da sílica a partir de GSH com 4 mg/g.

Para formulações iniciais de 1 e 2 mg/g, independente das amostras de sílica, apresentam valores de dexametasona libertada na mesma ordem de grandeza. Destacando-se a amostra de CYS à formulação de 1 mg/g com libertação de ~10,7 µg/g.

Entretanto, esta amostra é formada por partículas que pode justificar a presença de dispersão de dexametasona na amostra, além da variação do método analítico.

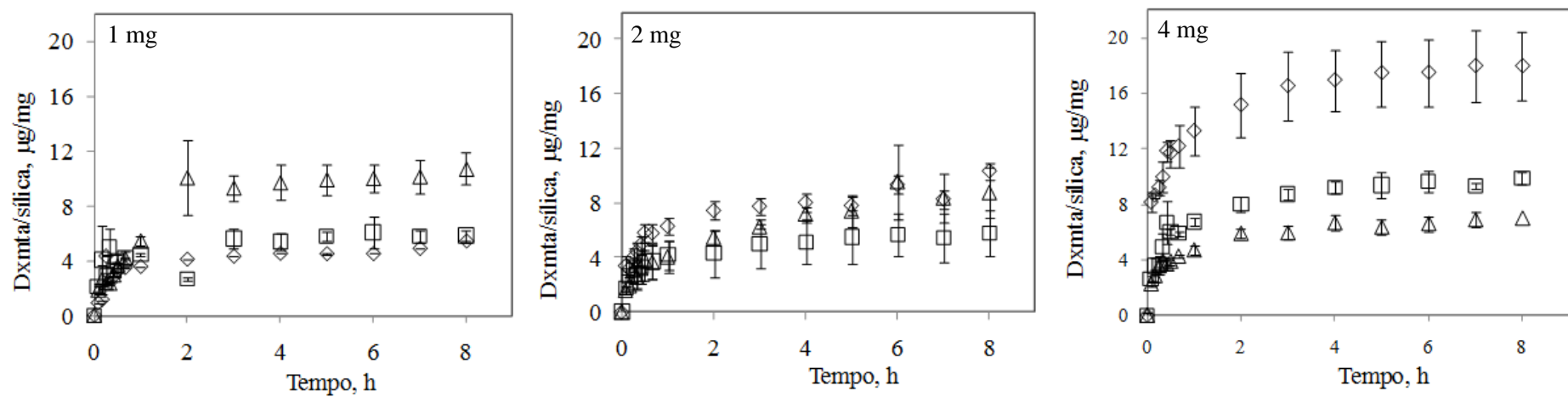


Figura 3.20. Comparação para a concentração de dexametasona libertada para as diferentes amostras de sílica: \diamond GSH; Δ CYS; \square MET.

Partindo do pressuposto, que uns dos objectivos do trabalho era a obtenção de materiais compósitos a partir de biopolímeros eram escolhidos os polímeros que apresentam maior potencial para aplicação biomédica, dos quais se salienta um derivado do quitosano, a carboximetilquitosano, em especial pelas suas características de osteoindução, assim como o dextrano oxidado e o alginato. De acordo com a Tabela 3.10, apenas o que formou dispersão é o alginato, no entanto, também foi estudado visto ser um polímero com um forte estatuto na área da medicina e estudando a libertação da dexametasona nos mesmos, Figura 3.21, para o qual se verificou que existe um bom coeficiente de correlação linear.

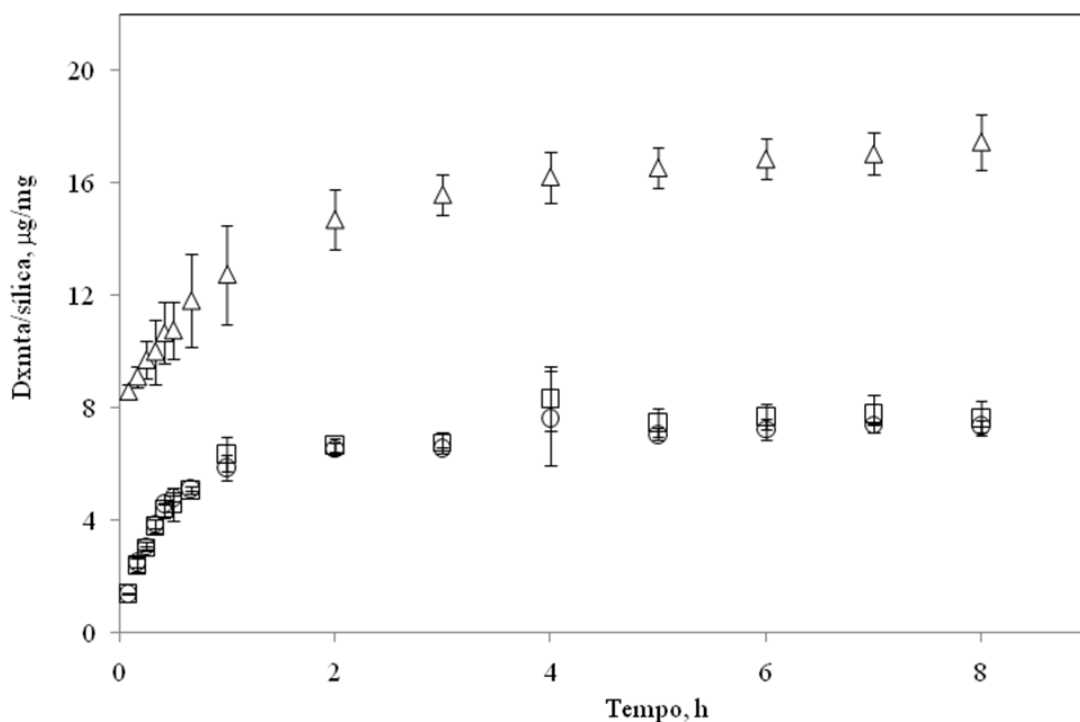


Figura 3.21. Libertação da dexametasona (1mg/g) para o compósito de sílica obtido a partir do catalisador GSH: Δ Carboximetilquitosano \square Dextrano oxidado \circ Alginato de sódio.

De acordo com o expoente de libertação, indicado na Tabela 3.11., ambos os compósitos apresentam um comportamento Fickiano ($\leq 0,5$).

Tabela 3.11. Parâmetros cinéticos para o sistema sílica (GSH (2,46), 0,15 M)/ dexametasona (1 mg/ 8 mL GSH)/ polímero (80 mg).

Amostra (pH)	Parâmetros cinéticos		
	<i>n</i>	<i>k</i>	R ²
Carboximetilquitosano	0,420	0,117	0,997
Dextrano oxidado	0,157	0,423	0,984
Alginato de sódio	0,182	0,382	0,965

Para um estudo mais pormenorizado, onde fosse possível comparar a influência do pH ácido (GSH) e o pH básico (CYS), escolheu-se como biopolímeros os taninos, como uma fonte natural de PAs, a proteína de soja por ser biodegradável, biocompatível e abundante, sendo considerada como um biomaterial atractivo em engenharia de tecidos. O quitosano pelas suas características que promovem uma adesão, proliferação e actividade da fosfatase alcalina desenvolvendo assim todas as condições para uma melhor regeneração óssea quando colocado *in vivo* (Salgado et al, 2004). No que se refere aos compósitos, para o extracto de pinheiro, Figura 3.20., conclui-se que a libertação de dexametasona é bastante menor para o catalisador CYS do que para GSH. Na sílica GSH, tudo leva a concluir que o fármaco está inserido na matriz, enquanto que na CYS, provavelmente, está disperso. É de referir que ao fim de 8 horas a quantidade de dexametasona libertada foi de ~ 4 mg, tal não é concordante com o que se encapsulou, 1 mg, possivelmente a 242 nm, banda onde absorve a dexametasona, estava a haver absorção de compostos fenólicos do extracto, uma vez que estes absorvem a 280 nm.

Para o compósito sílica proteína de soja, Figura 3.21., é perceptível que ambos os compósitos seguem uma curva de libertação bastante semelhante. Quando se procedeu à dissolução do polímero a proteína de soja dissolveu em ambos os casos, havendo a formação de monolito em ambos os casos, o que leva a concluir que a dexametasona tenha ficado aprisionada dentro do monolito.

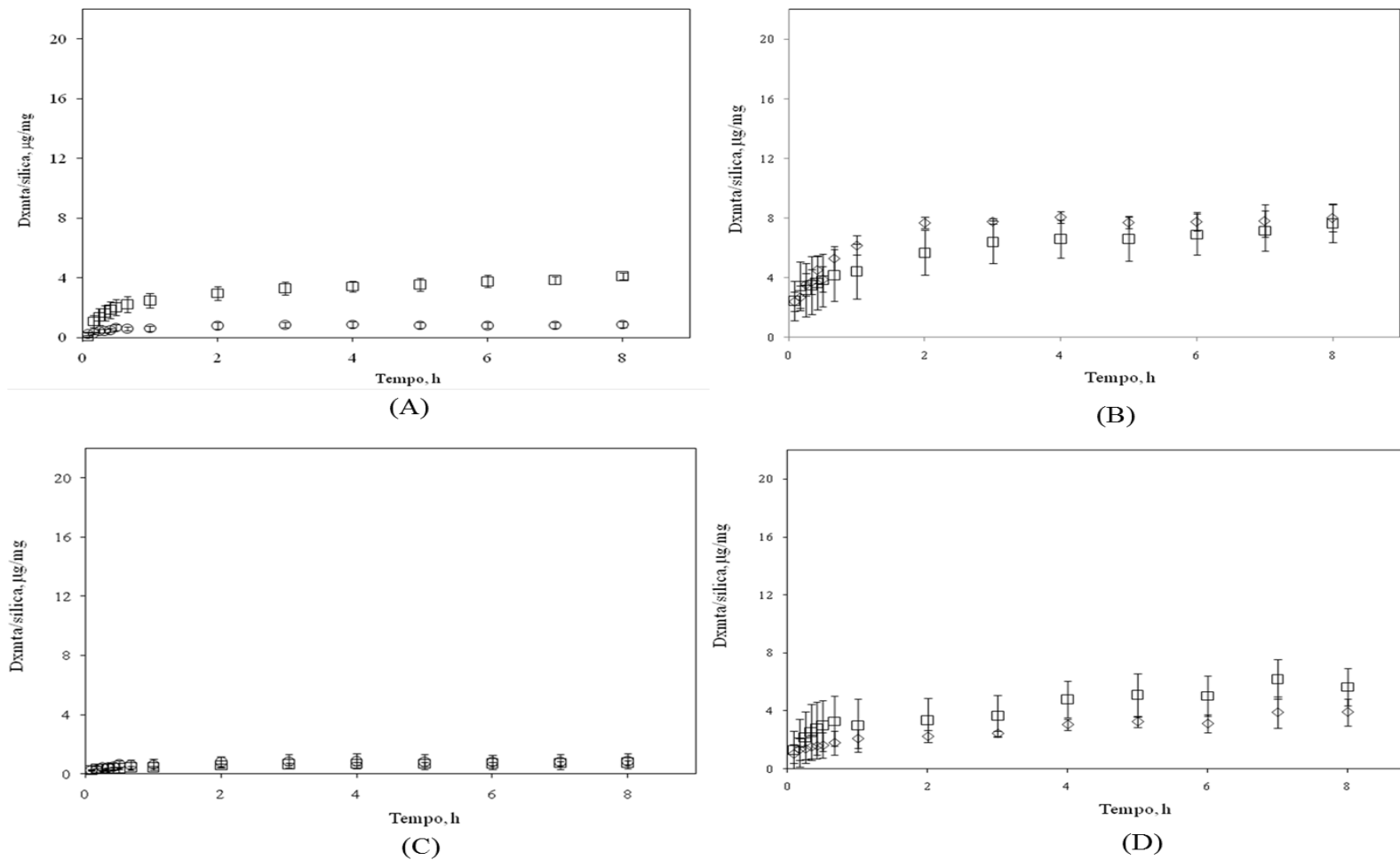


Figura 3.22. Liberação de dexametasona (1 mg) para os compósitos de sílica obtidas a partir de □ GSH,O CYS com extracto de pinheiro (A); proteína de soja (B); albumina (C) e quitosano (D).

Relativamente à albumina os desvios apresentados são elevados, podendo estes estar associados ao facto das molas de diálise já não se encontrarem nas melhores condições para garantir o fecho das membranas. Contudo, o diâmetro de poros do compósito pode também ser uma justificação plausível, uma vez que o compósito obtido a partir de GSH possui diâmetro de poros $<0,01 \mu\text{m}$ enquanto que no compósito obtido a partir de CYS o diâmetro de poros é de $\sim 0,0209 \mu\text{m}$, o que é substancialmente superior, podendo o aumento de dexametasona observável no gráfico ser então causado pelo diâmetro de poros, no entanto, devem ser realizados mais testes para uma melhor interpretação dos resultados. No que se refere ao quitosano a curva de libertação apresenta desvios consideravelmente elevados, questionando-se novamente o método de libertação em relação às molas de diálise, assim como a porosidade do material, uma vez que para o compósito obtido a partir de GSH o diâmetro de poros ser $< 0,015 \mu\text{m}$, e para o CYS de $0,183 \mu\text{m}$. No entanto, tal como no caso anterior, assim como nos restantes sistemas de libertação, devem ser realizados mais ensaios para credibilizar e poder tirar as mais devidas conclusões.

Efectuando o estudo cinético, Tabela 3.12., obtém-se valores de expoente de libertação que indicam que o comportamento Fickiano, onde os valores de erro de ajuste do modelo são $\sim 0,9$. Além disso, os compósitos formados com quitosano e proteína de soja apresentam constantes cinéticas maiores, independentemente do tipo de sílica, o que mostram potencial para a produção de *scaffolds* com capacidades diferenciadas de libertação à sua estrutura físico-química.

Tabela 3.12. Parâmetros cinéticos para o sistema sílica (GSH (2,46) e CYS (9,81), 0,15 M)/dexametasona(1 mg/ 8 mL catalisador)/polímero (80 mg).

Amostra (pH)		Parâmetros cinéticos		
		<i>n</i>	<i>k</i>	<i>R</i> ²
GSH (2,46)	Extracto de pinheiro	0,233	0,024	0,900
	Quitosano	0,169	0,334	0,886
	Albumina	0,421	0,009	0,932
	Proteína de Soja	0,262	0,202	0,863
CYS (9,81)	Extracto de pinheiro	0,248	0,035	0,911
	Quitosano	0,224	0,217	0,869
	Albumina	0,277	0,010	0,944
	Proteína de Soja	0,195	0,321	0,995

3.3. Testes de biocompatibilidade - Hemólise

Quando se desenvolve um biomaterial é fundamental avaliar a biocompatibilidade deste, uma vez que este poderá interagir com sistemas vivos, provocando a hemólise (destruição dos glóbulos vermelhos) uma vez que pode acarretar problemas severos tais como a anemia, icterícia assim como outros estados patológicos. No Tabela 3.13, são apresentadas as propriedades hemolíticas para a sílica pura, calcinada e não calcinada.

Tabela 3.13. Percentagem hemolítica para as amostras de sílica.

Sílica calcinada	
GSH (pH 2,46)	1,15 ± 0,05
MET (pH 5,47)	2,66 ± 0,10
GSH (pH 6,00)	0,76 ± 0,09
CYS + GSH (pH 7,00)	5,07 ± 0,33
CYS (pH 8,60)	0,66 ± 0,04
CYS (pH 9,81)	2,91 ± 0,03
Sílica não calcinada	
GSH (pH 2,46)	38,07 ± 0,79
MET (pH 5,47)	0,30 ± 0,01
CYS (pH 9,81)	12,55 ± 0,91
Catalisadores	
GSH (0,15 M)	45,30 ± 0,03
MET (0,15 M)	-0,14 ± 0,62
CYS (0,15 M)	56,94 ± 0,08
GSH (0,01 M)	-0,06 ± 0,02
MET (0,01 M)	-0,14 ± 0,03
CYS (0,01 M)	1,22 ± 0,05
Precursor	
TEOS	25,80 ± 0,67

De acordo com a norma ASTM F 756 – 00, as amostras de sílica calcinada, para a GSH (pH 2,46 e pH 6,00) e CYS (pH 8,60) são não hemolíticas uma vez que o índice de hemólise está compreendido entre 0 – 2. Relativamente, à metionina (pH 5,47) esta é levemente hemolítica, sendo a CYS + GSH (pH 7) hemolítica. No que se refere às amostras que foram calcinadas, o que pretendeu avaliar foi a influência dos resíduos de catalisador e precursor que podessem ainda existir na amostra. Assim, conclui-se que o único catalisador que não influencia negativamente o índice de hemólise é a MET, que

comparativamente com a amostra calcinada, ainda apresenta um valor mais baixo, podendo dever-se ao facto de ser um composto muito usado como suplemento para seres vivos. As restantes amostras apresentam um índice de hemólise mais elevado, comparativamente com as restantes. Este aumento da toxicidade pode estar associado ao precursor ou a concentração de GSH ser ainda um pouco elevada. As células não reagem de modo severo à presença de qualquer resíduo uma vez que a glutatona é encontrada nos organismos em três locais de reserva, no citosol, na mitocôndria e ainda núcleo. É também uma molécula abundante no fígado atingindo concentrações de 5mM e a atendendo que é usado uma concentração de 0,15 M, pode ainda existir quantidades um pouco elevadas de catalisador. Relativamente aos catalisadores estes podem ser classificados como hemolíticos, assim como o precursor (TEOS) o que pode justificar, possivelmente, o facto das amostras não calcinadas se apresentarem hemolíticas.

Relativamente à cisteamina, a percentagem hemolítica também aumenta, no entanto de uma maneira não tão acentuada. A cisteamina é uma molécula usada no tratamento de algumas doenças o que leva a concluir que não provocará toxicidade nas células do sangue.

Contudo, há que salientar que apesar das quantidades de amostra utilizadas terem sido os recomendados pela norma ASTM F 756 – 00, a área de contacto entre amostra e o sangue pode não ter sido suficiente, assim como o elevado tempo que o sangue esteve guardado até à realização do teste. Relativamente aos compósitos este efeito foi também avaliado, apresentando-se de seguida na Tabela 3.14.

Tabela 3.14. Percentagem hemolítica para os compósitos à base de sílica.

Compósitos	
CYS + Albumina	99,85 ± 0,24
CYS + Proteína de soja	52,90 ± 0,13
CYS + Extracto de Pinus	6,83 ± 0,15
CYS + Quitosano	37,67 ± 0,22
GSH + Albumina	48,41 ± 0,67
GSH + Proteína de soja	59,26 ± 0,53
GSH + Extracto de Pinus	34,24 ± 0,45
GSH + Quitosano	33,46 ± 0,18
Polímeros	
Albumina	7,58 ± 4,03
Proteína de soja	72,73 ± 16,60

Da análise da Tabela 3.14. verifica-se que ambos os compósitos são hemolíticos, salientando-se o CYS + Extracto de pinus por apresentar um índice hemolítico mais baixo comparativamente com os restantes compósitos.

Capítulo *IV*

4. Conclusões

Este trabalho teve por objectivo a produção de sílica usando catalisadores bioinspirados e biomiméticos, para a formação de materiais compósitos de sílica/biopolímeros e com imobilização da dexametasona para o uso em libertação controlada.

Foi utilizado o processo sol-gel que permitiu a produção de sílica à temperatura ambiente, num período de 48 horas, recriando as condições da natureza.

Neste contexto, foi possível obter sílica numa vasta gama de pH, de 2,46 até 9,81, à temperatura de 37 °C e agitação (~ 270 rpm). Concluiu-se que a produção de sílica foi favorecida nos meios com pH's extremos estudados, assim como a agitação. Foi ainda possível obter sílica a partir duas fontes renováveis e naturais de polímeros, a albumina e proteína de soja. Deste processo resultam resíduos da reacção que devem ser removidos, onde se verifica que o processo mais eficiente da remoção destes é o uso da extracção supercrítica, em especial pelo facto de evitar o uso de uma etapa adicional a calcinação. Este processo, mantém assim porosidade da sílica formada não alterando a morfologia da sílica, uma vez que não é usado o processo adicional de calcinação. Além disso, é um processo que utiliza um fluido considerado “verde”, que associado ao carácter biomimético dos catalisadores, conferem a inovação deste trabalho. Os ensaios de hemocompatibilidade mostraram que a presença de resíduos de catalisador GSH e CYS não é benéfica quando em contacto com as células de sangue, pois provocam a hemólise.

A dexametasona libertada a partir da sílica e/ou compósitos baseados em sílica atingiram valores máximos de 80 µg/mg o que pode promover a osteoindução e o osteocondução no processo de regeneração óssea.

Várias formulações de compósitos foram estudados e apresentam potencial para aplicações futuras.

Perspectivas futuras

- No seguimento deste trabalho apresentam-se como perspectivas futuras testes de toxicidade para os compósitos, o estudo de sistemas de libertação com outro tipo de polímeros, assim como a incorporação da dexametasona nos sistemas onde é usado a albumina e a proteína e soja como “catalisador”.
- Estudar mais pormenorizadamente as propriedades do pinus radiata.
- Realizar o teste de hemólise para os compósitos e compósitos com dexametasona.
- Estudar a diferenciação e proliferação celular *in vitro*.

Bibliografia

Atala, A.; Lanza, R.; Thomson, J. A.; Nerem, R.M. Principles of Regenerative Medicine, Academic Press, 2008, p 1478.

Brinker, C. J.; Scherer, G. W. Sol-Gel Science, Academic Press, San Diego CA 92101, 1990, p-908. ISBN-13:978-0-12-134970-7

Cansell, F.; Aymonier, C.; Loppinet-Serani, Anne Review on materials science and supercritical fluids, Solid State and Materials Science, 7, 2003, 331–340.

Carneiro, J; Junqueira, L.C. Histologia básica, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2004, p 533.

Charpentier, A. P.; Li, X.; Sui, R., Study of the Sol-Gel Reaction Mechanism in Supercritical CO₂ for Formation of SiO₂ Nanocomposites, Langmuir, 25, 3748 – 3754.

Chu P. K., Liu, X.; Biomaterials Fabrication and Processing Handbook, CRC Press, London, 2008, p-720.

Costa, S. H. S. R.; Santos; K.S.C.R. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações biomédicas e avanços. Química Nova, 4, 2006, 776-785.

Eduardo, K. M.; Paul A. C.; Xuejun X., S. L., Jeremy, J. M. Matrices and scaffolds for drug delivery in dental, oral and craniofacial tissue engineering, Advanced Drug Delivery Reviews, 59, 2007, 308-324.

Gerhardt, L.; Boccaccini, A.R. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineerin, Materials 2010, 3, 3867-3910.

Gill, I.; Ballesterons, A. Encapsulation of biologicals within Silicate, Siloxane, and hybrid sol-gel Polymers: An efficient and generic approach. Journal Chemical of the American Society, 120, 1998, 8587–8598.

Gupta, R.; Chaudhury, N. K. Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: Problem and future Prospects, Biosensors & Bioelectronics , 2007, 22, 2387–2399.

Hong, P.; Li, S.; Ou C; Li, C; Yang, L. Zhang, C., Thermogravimetric Analysis of Chitosan, Journal of Applied Polymer Science, 105, 2007, 547-551.

Infarmed. Farmacopeia Portuguesa, Lisboa, 2005.

Jeon, B. J.; Hah, H. J.; Koo, S. M. Surface modification of silica particles with organoalkoxysilanes through two-step (acid-base) process in aqueous solution aqueous solution. Journal of Ceramic Processing Research, 3, 2002, 216-221.

Jung, W. C.; Gaharwar, A. K.; Schexnailder, P. J.; Schmidt, G. Development of biomedical polymer-silicate nanocomposites: A materials science perspective, *Materials*, 3, 2010, 2986-3005.

Junqueira Luiz Carlos Histology basic [Livro]. - 2005.

Lewin, J. C. Silicon metabolism in diatoms, *The Journal of General Physiology*, 1953.

Li Shuxi; Shah. A.; Haghghat, R; Praveen,S. S.; Mukherjee, I.; Wei, E.; Zhang, Z.; Wei, Y.Characterization of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-silica) hybrid materials with different silica contents, *Polymer*, 48, 2007, 3982 e 3989

Lieberman, J. R.; Friedlaender, G.R.; Bone Regeneration and Repair, Human Press, 2005, p 411.

Livage, J.; Coradin, T.; Roux, Cécile, Encapsulation of biomolecules in silica gels. *Journal of physics: condensed matter*, 13, 2001, 673-691.

Maia, J.; Ferreira, L; Carvalho, R; Ramos, M. A; Gil, M. H.; Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels. *Polymer*, 46, 2005, 9604–9614

Nies, B.; Jeschke, B.; Schaffener, P. Patente US 7 578 845 B2, Structured composites as a matrix (scaffolds) for the tissue engineering bones, 25 de Agosto de 2009.

Nuttelman, C. R.; Tripodi, M. C.; Anseth, K. S. Dexamethasone-functionalized gels induce osteogenic differentiation of encapsulated hMSCs. *Wiley Periodicals*, 10, 2005, 183-95.

Parhi, P.; Ramanan, A.; Ray, A. R. Preparation and Characterization of Alginate and Hydroxyapatite-Based Biocomposite, *Journal of Applied Polymer Science*, 102, 2006, 5162–5165

Pillai, O.; Panchagnula, R., Polymer drug delivery, *Current opinion on Chemical Biology*, 5, 2001, 447-451.

Ruiz-Hitzky, E.; Ariga, K.e Lvov, Y. Bio-inorganic Hybrid Nanomaterials, Wiley, 2008, p 522.

Salgado, A. J.; Coutinho, O. P.; Reis, R. L.; Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends, *Macromolecular Bioscience*, 4, 2004, 743-765

Soares, R. M. D.; Fernanda F., Scremin V. S. Thermal Stability of Biodegradable Films Based on Soy Protein and Corn Starch, *Wiley interscience*, 229, 2005, 258-265

Sousa, H.; Hess, D. M.; e Watkins J. J., Silica Formation and Acid Phosphatase Immobilization Using Small Bi-Functional Biomimetic Catalysts at near Neutral pH Conditions, Annual Meeting, Salt Lake City, Utah, USA, 2007.

Stocum, D. L., Regenerative Biology and medicine, Academic Press, 2006, p 458. ISBN 13: 978-0-12-369371-6

Tseng, K. T.; Lin, Y. S.; Chen, Y. J.; Chu, H. A review of photocatalysts prepared by sol-gel methods for VOCs removal, International Journal Molecular Science 2010, *11*(6), 2336-2361.

Zuleger, S.; Lippold, B. C. Polymer particle erosion controlling drug release. I. Factors influencing drug release and characterization of the release mechanism, International Journal of Pharmaceutics, 217, 139–152, 2001.

Anexos

Protocolo de teste hemólise:

Para a determinação da concentração de Hb foi necessário delinear uma curva de calibração onde foram usadas várias soluções de hemoglobina a diferentes concentrações, o que permitiu relacionar valores de absorbância obtidos com a quantidade de hemoglobina livre. Os padrões para a curva de calibração foram obtidos por diluição de uma solução de Hb. Esta obtém-se por diluição de 0,25-0,30 g de hemoglobina (Sigma; Hb, hemoglobin bovine, lyophilized powder) em 75 ml da solução de tampão fosfato (PBS) 0,01 M a pH=7,4. A solução de PBS foi preparada por dissolução de 0,2 g de cloreto de potássio (KCl; Pro analysis; M=74,56 g/mol; 99,5 %), 8,0 g de cloreto de sódio (NaCl; Sigma; 99,5 %), 0,2 g de di-hidrogenosfosfato de potássio (KH₂PO₄; M&B, Laboratory Chemicals; 99,7 %) e 1,43 g de hidrogenofosfato de sódio di-hidratado (Na₂HPO₄.2H₂O) em 1 L de água destilada. Depois da solubilização da hemoglobina na solução de PBS procedeu-se à centrifugação (ROTOFIX 32 A, Hettich) a 3100 rpm durante 15 minutos. Obtem-se assim um sobrenadante onde se encontra solubilizada a hemoglobina presente nos eritrócitos. Recolhido 1 mL de sobrenadante junta-se 5 mL da solução de Drabkin. Esta solução permite converter todas as formas de Hb em cianometahemoglobina permitindo assim a sua quantificação total no comprimento de onda de 540 nm. A solução de Drabkin modificada é preparada por 50 mg de cianeto de potássio (KCN;), 200 mg de di-hidrogenosfosfato de potássio (KH₂PO₄), 140 mg de ferrocianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆) e 1 mL de Triton X-100, dissolvidos em 1L de água destilada. Posteriormente é filtrada e mede-se o pH, que é aceitável quando se encontra na gama de valores entre 7,0-7,4, posteriormente guardada num frasco escuro até à sua utilização. A concentração de Hb foi determinada por espectrofotometria de UV-VIS (Jasco V-530) no comprimento de onda onde este composto absorve (540 nm) e calculada mediante a equação:

$$[Hb] = \frac{A_{540\text{ nm}} \times M \times f_d}{\epsilon_{HiCN}^{540\text{ nm}} \times 1 \times 1000} \quad \left(\frac{g}{l} \right)$$

Onde $A_{540\text{ nm}}$ corresponde à absorvância 540 nm, $\epsilon_{HiCN}^{540\text{ nm}}$ (11,0m.M.cm⁻¹) corresponde ao coeficiente de absorção milimolar da cianometahemoglobina (HiCN), M (16114,5 g) está relacionada com a massa molecular da hemoglobina e f_d é o factor de diluição. Substituindo na equação 2, obtem-se:

$$[Hb] = 1,465 \times A_{540\text{ nm}} \times f_d \quad \left(\frac{g}{l} \right)$$

A solução padrão para a elaboração da curva de calibração foi aceite sempre que o valor da concentração de Hb obedecia aos seguintes requisitos $1,59 < \frac{A_{540nm}}{A_{504nm}} < 1,63$ e $A_{750nm} \leq 0,003$.

Posteriormente procedeu-se à determinação da [Hb] livre existente no plasma, assim centrifugaram-se 5 mL de sangue a 3100 rpm durante 15 minutos resultando a sedimentação de todas as partículas em suspensão e o sobrenadante que é o plasma. Recolhe-se 1 mL de plasma ao qual se junta 1 mL de solução de Drabkin e se procede à leitura a $A_{540\text{ nm}}$. Assim a [Hb] é determinada atendendo à equação da recta de calibração multiplicada pelo f_d (volume total/volume de amostra). Da qual se obtém um valor de 0,85g/L, o que segundo a norma ASTM F 756-00 (2000) que indica que se a [Hb] livre no plasma for inferior a 2,0 mg/mL a amostra de sangue pode ser utilizada para a realização dos testes de hemólise, conforme se verifica.

No que se refere à hemoglobina total no sangue foram diluídos 20 μ l deste em 5,00 ml de solução Darbkin e procedeu-se à leitura a $A_{540\text{ nm}}$. Recorrendo novamente à curva de calibração na qual se obtém uma concentração de [Hb] no sangue de 9,09 g/L. Atendendo que segundo a norma a [Hb] no sangue deve ser $10 \pm 1\text{ mg/mL}$, garantindo assim que o sangue pode ser utilizado.

Após todos os ensaios preliminares ao teste de hemólise propriamente dito. Colocou-se em 1 tubo de falcon ~1g de sílica ao qual se juntou 7ml de uma solução de sangue diluída e foi incubado a 37 °C durante 3 horas conforme mencionado na norma. Após este período as amostras foram centrifugadas a 3100 rpm durante 15 minutos.

Posteriormente procede-se à determinação das densidades ópticas (DO) no sobrenadante através da leitura de A_{540nm} . A percentagem de hemólise foi calculada de acordo com:

$$\% \text{ Hemólise} = \left(\frac{DO_{\text{teste}} - DO_{\text{controlo negativo}}}{DO_{\text{controlo positivo}} - DO_{\text{controlo negativo}}} \right) \times 100$$

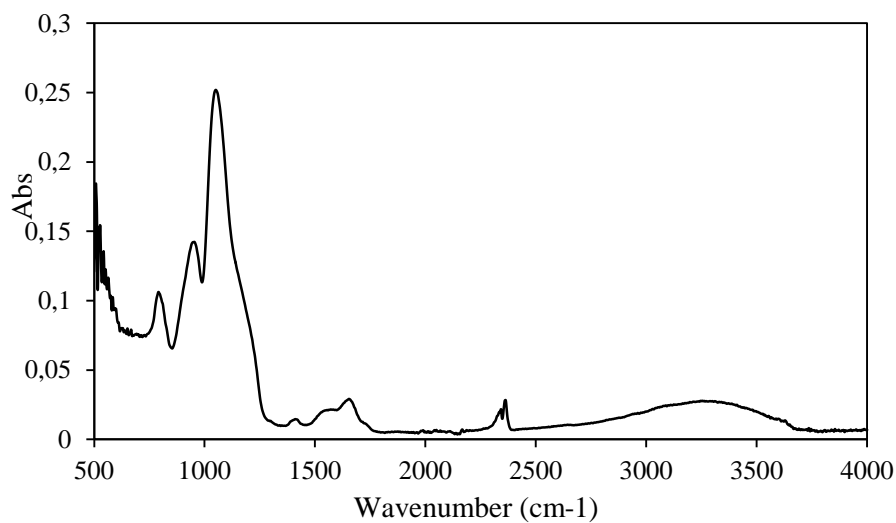
Análise FTIR para a sílica - extracção SCF:

Figura 1. Espectro IV obtido para a sílica GSH (pH=2,46) utilizando como método de secagem extracção SCF.

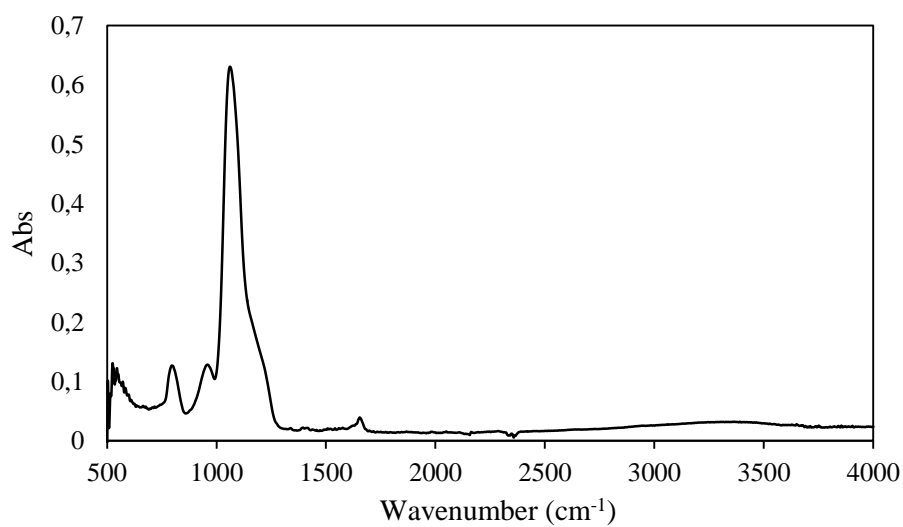


Figura 2. Espectro IV obtido para a sílica MET (pH=5,47) utilizando como método de secagem extracção SCF.

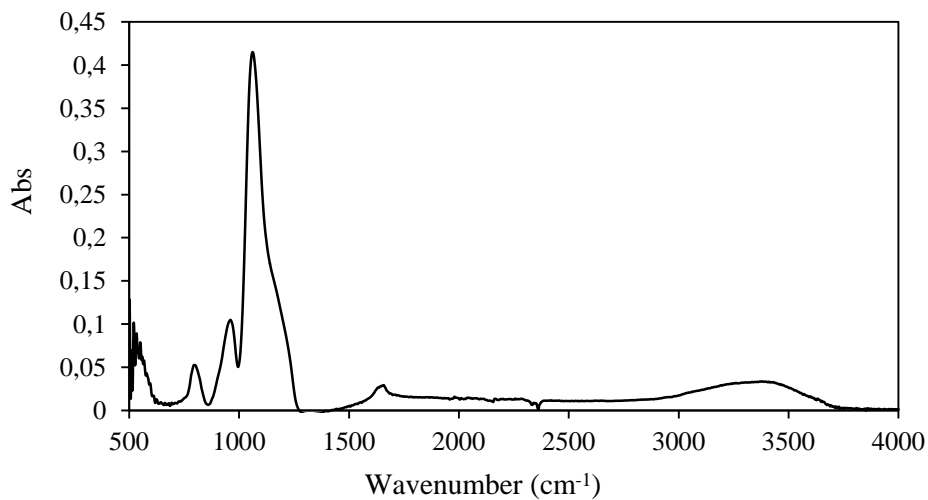


Figura 3. Espectro IV obtido para a silica GSH (pH=6) utilizando como método de secagem extracção SCF.

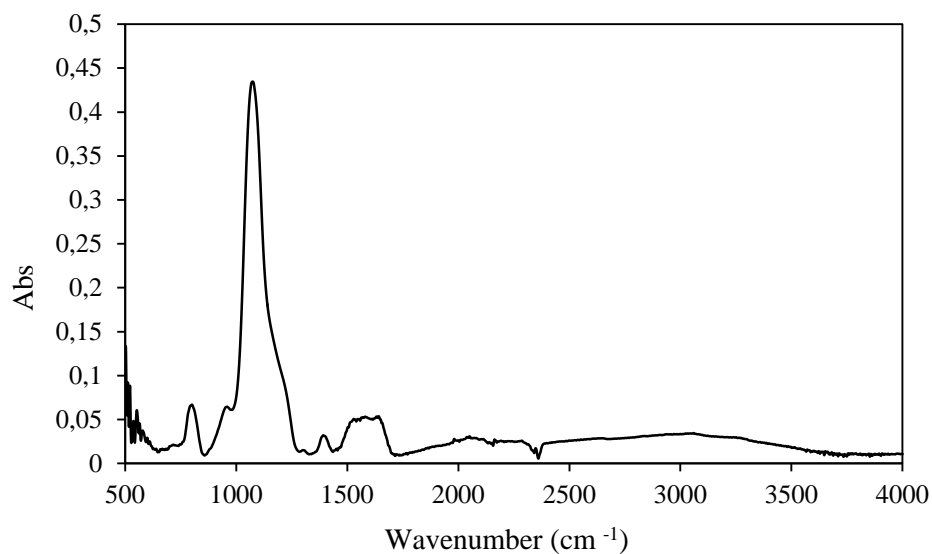


Figura 4. Espectro IV obtido para a silica CYS+GSH (pH=7) utilizando como método de secagem extracção SCF.

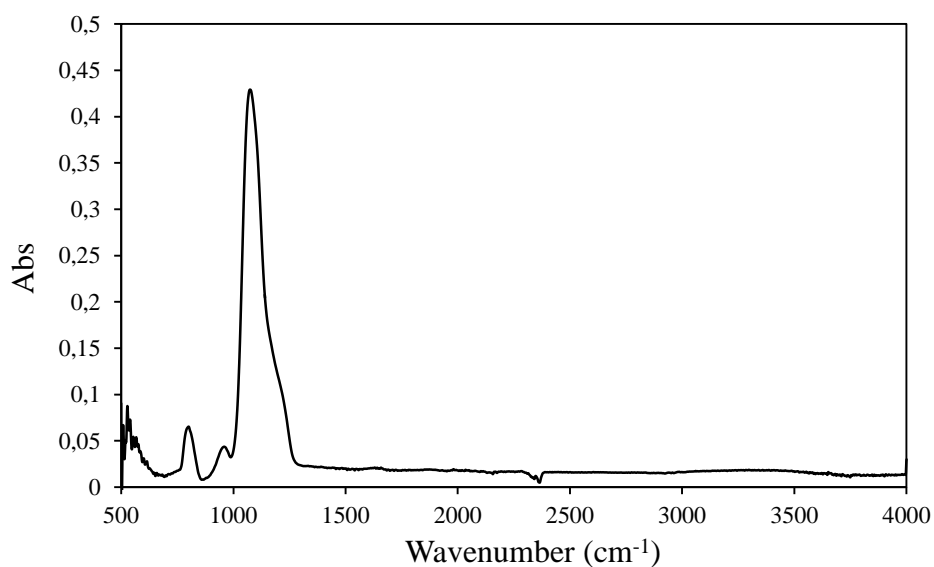


Figura 5. Espectro IV obtido para a silica CYS (pH=8,6) utilizando como método de secagem extracção SCF.

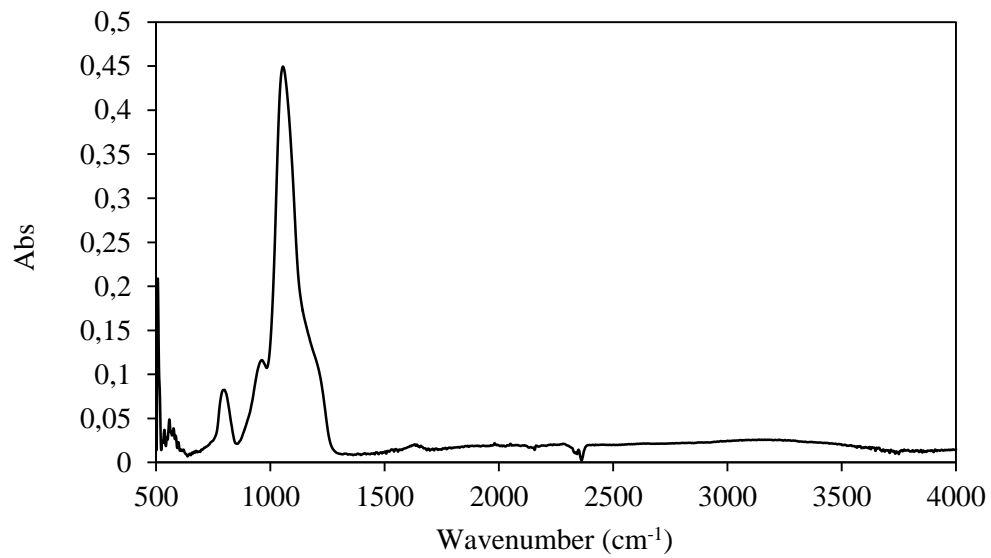
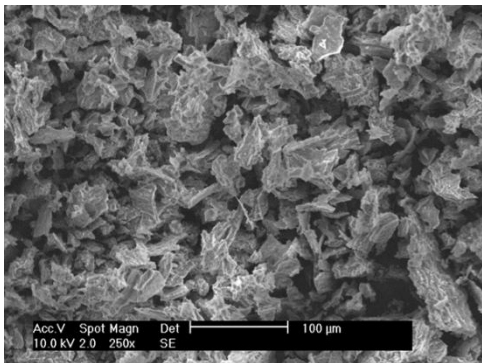
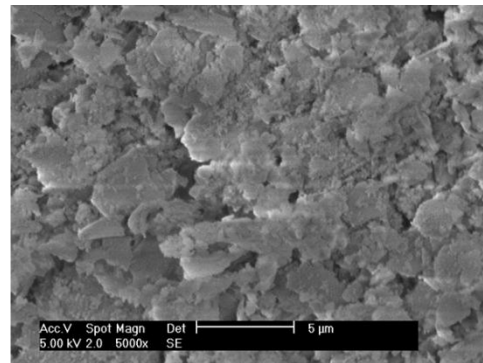


Figura 6. Espectro IV de sílica obtido para a CYS (pH=9,81) utilizando como método de secagem extração SCF.

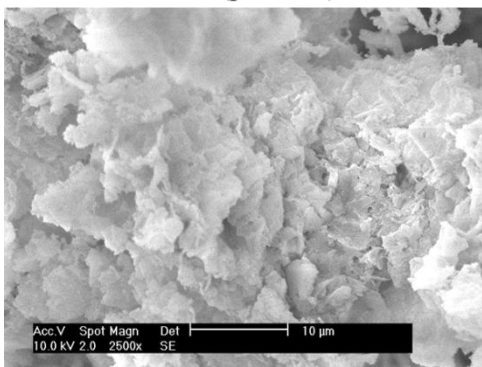
Microscopia Electrónica de Varredura (SEM) para sílica e compósitos à base de sílica:



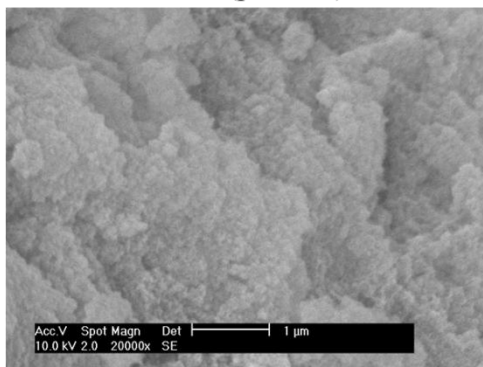
GSH (pH 2,46)



MET (pH 5,47)



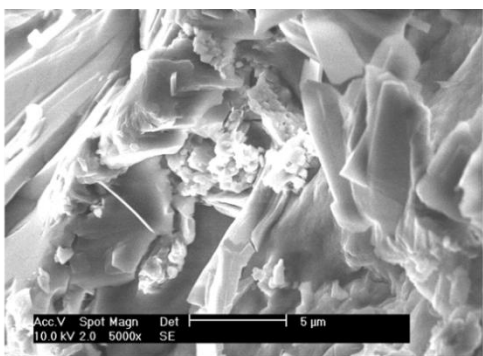
GSH (pH 6,00)



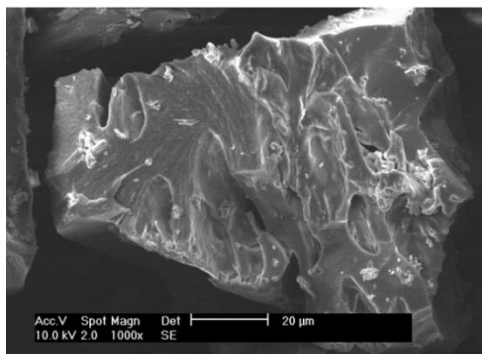
CYS (pH 9,81)



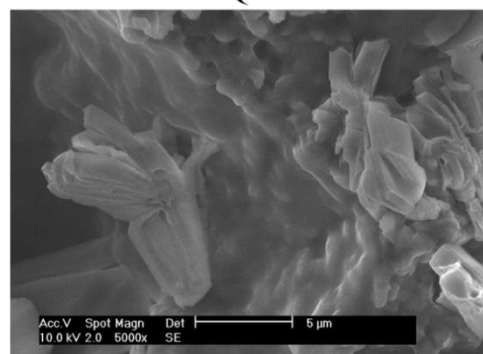
GSH + Alginato de sódio



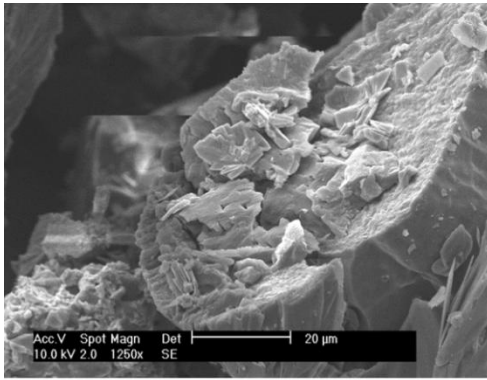
GSH + Quitosano



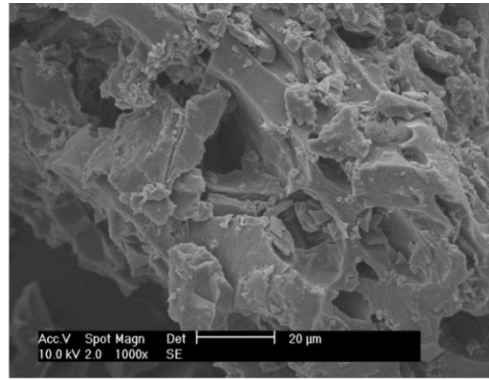
GSH + Quitosano



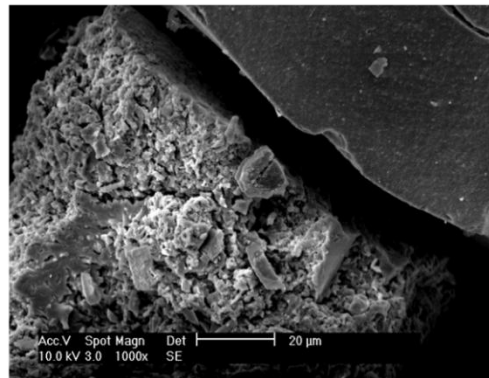
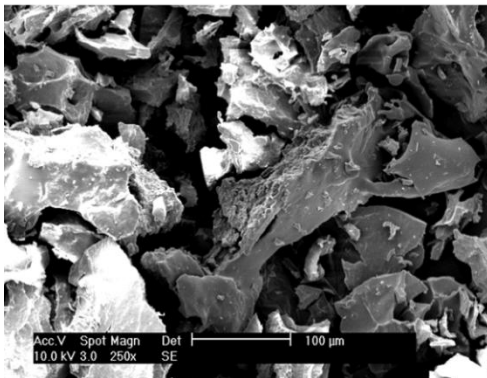
GSH + Quitosano



GSH + Quitosano



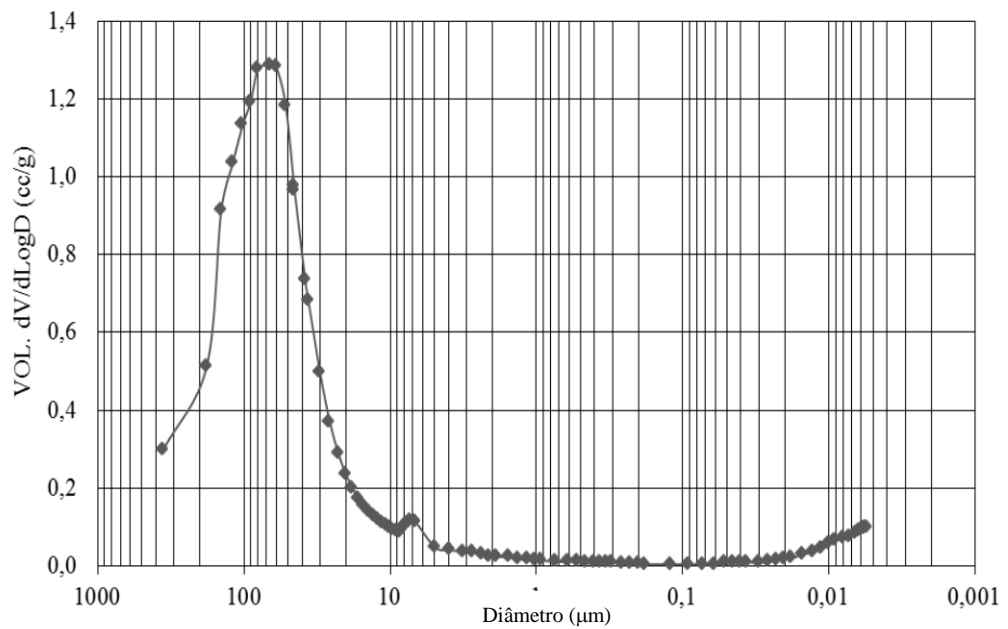
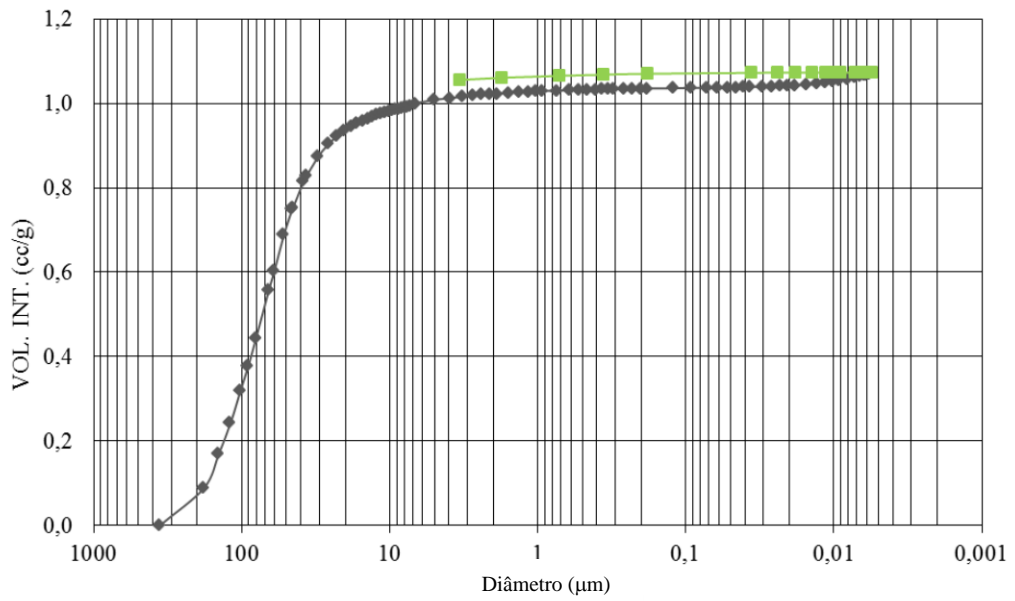
GSH + Quitosano



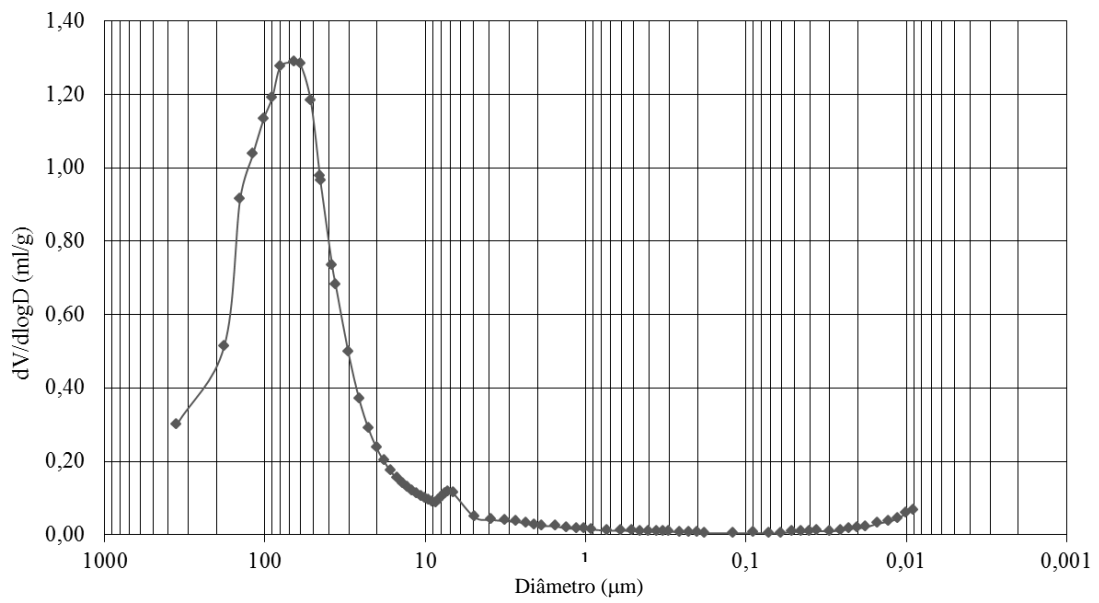
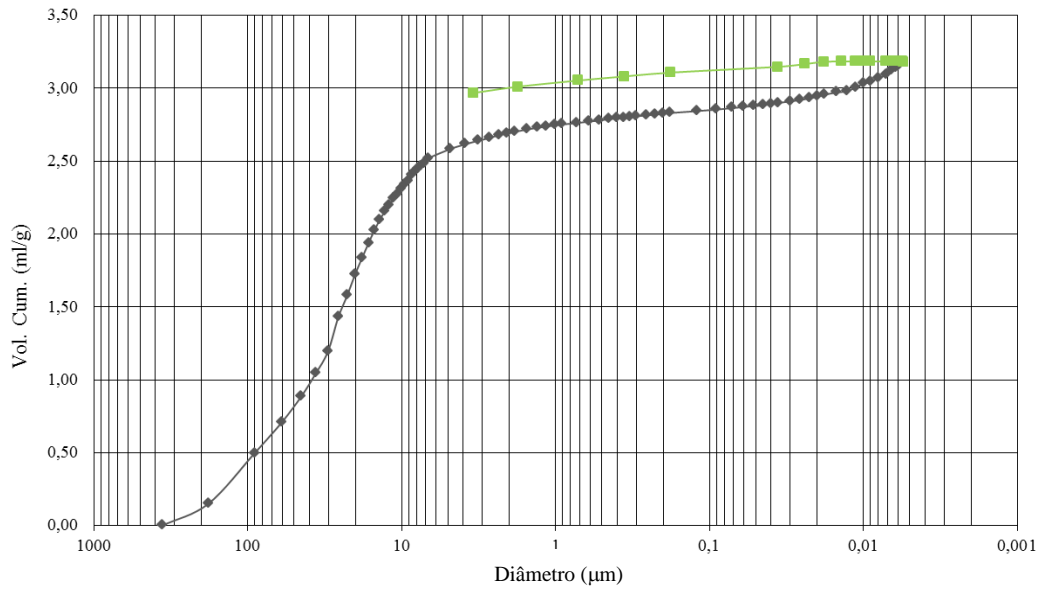
Porosimetria por intrusão de Hg para os diferentes métodos de secagem:

❖ Liofilização

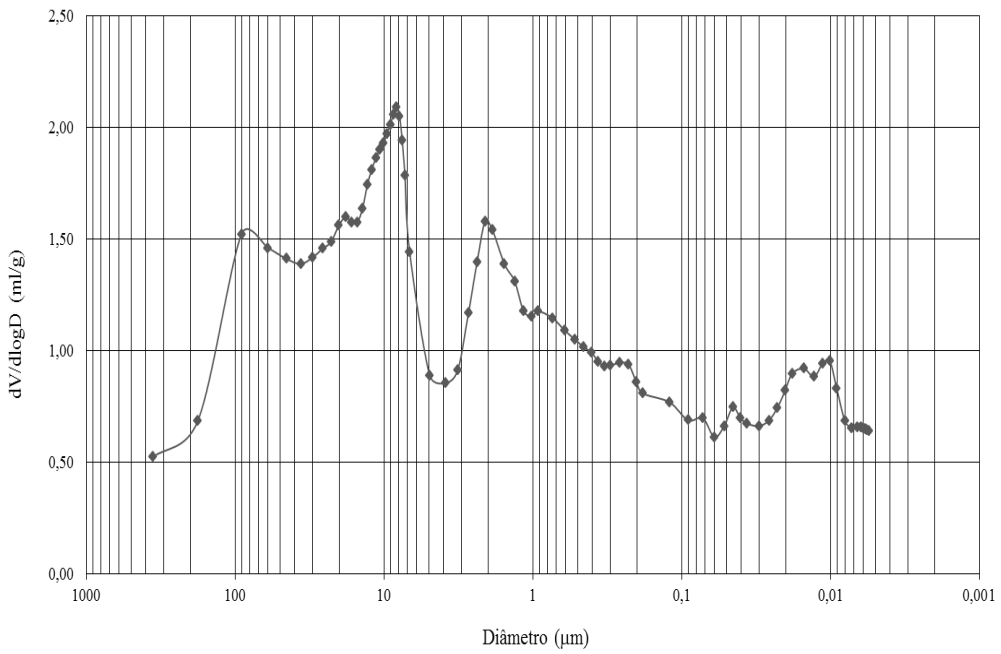
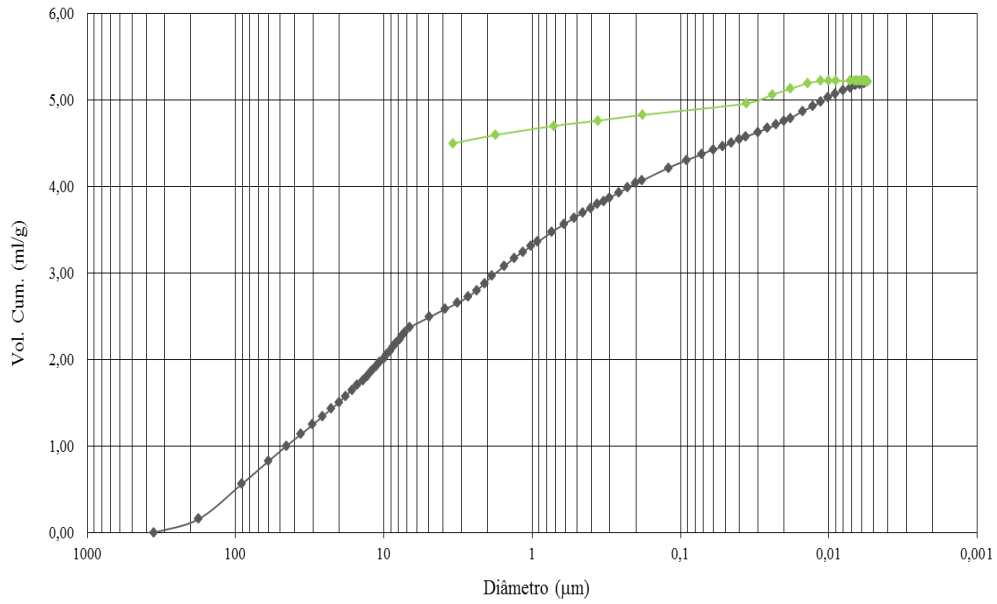
GSH (pH 2,46)



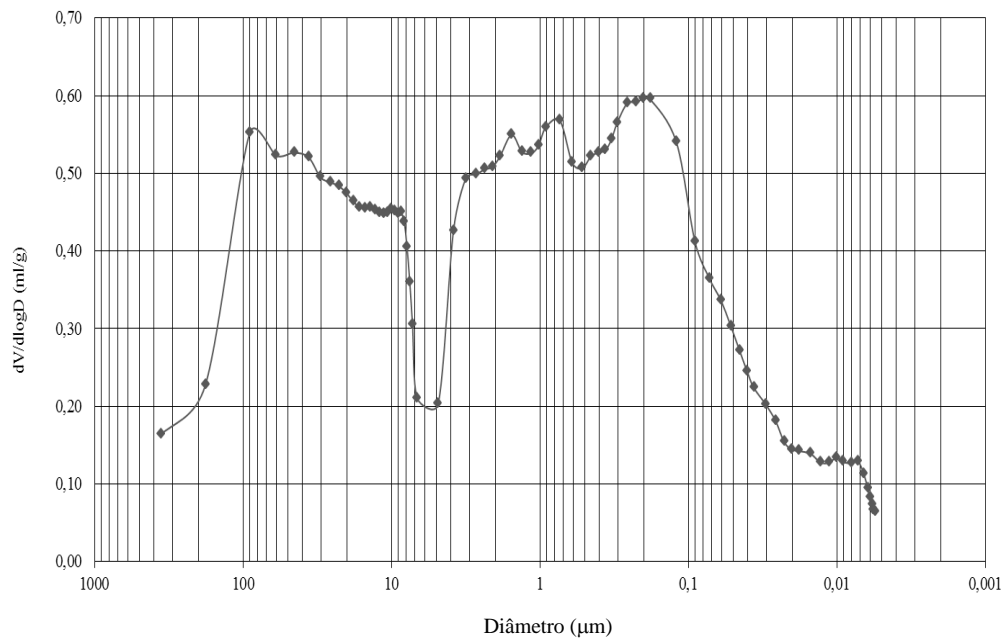
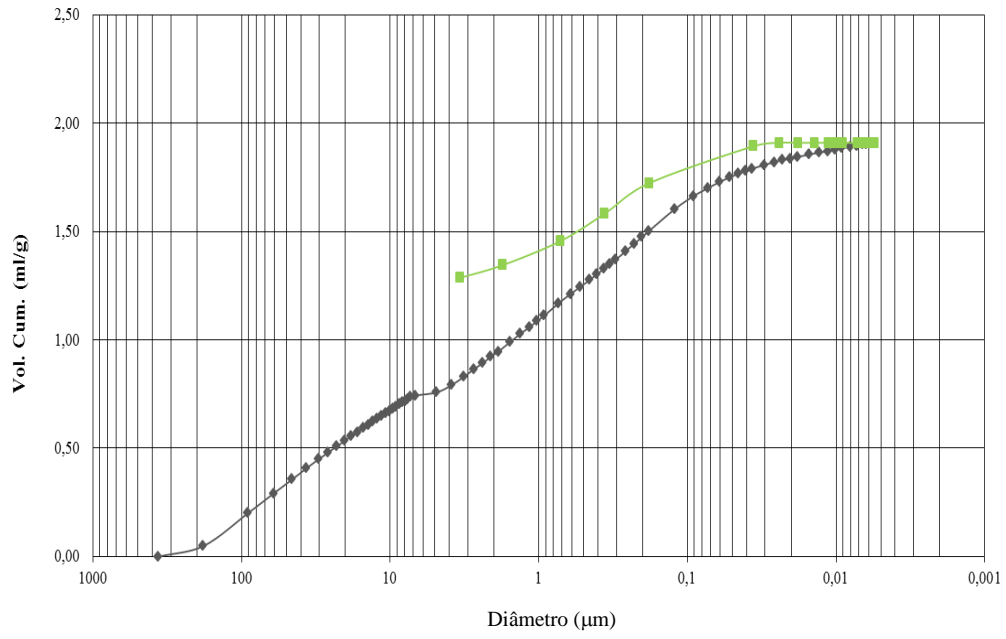
MET (pH 5,47)



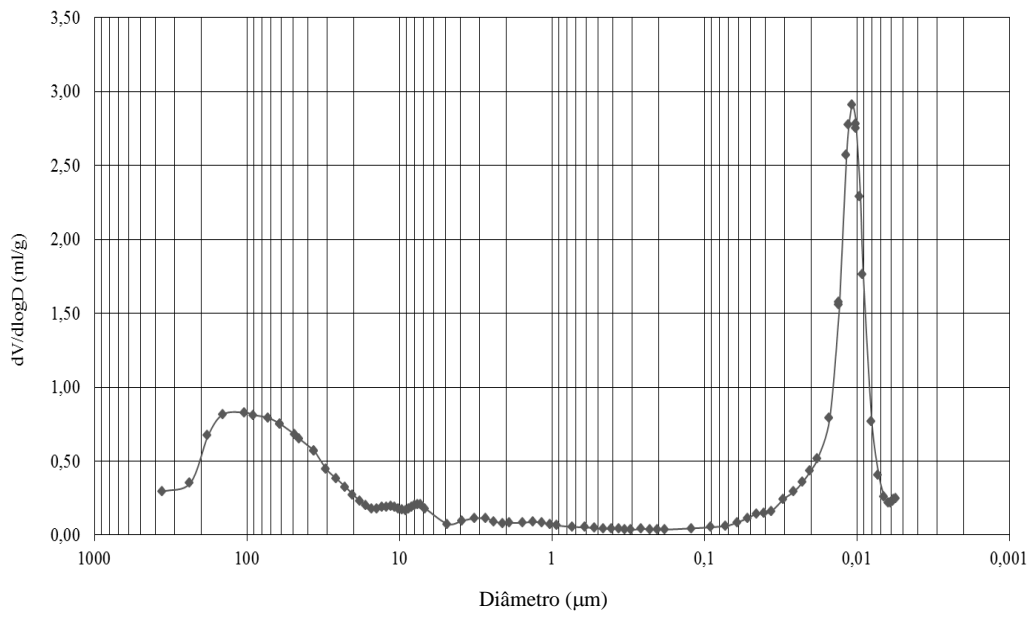
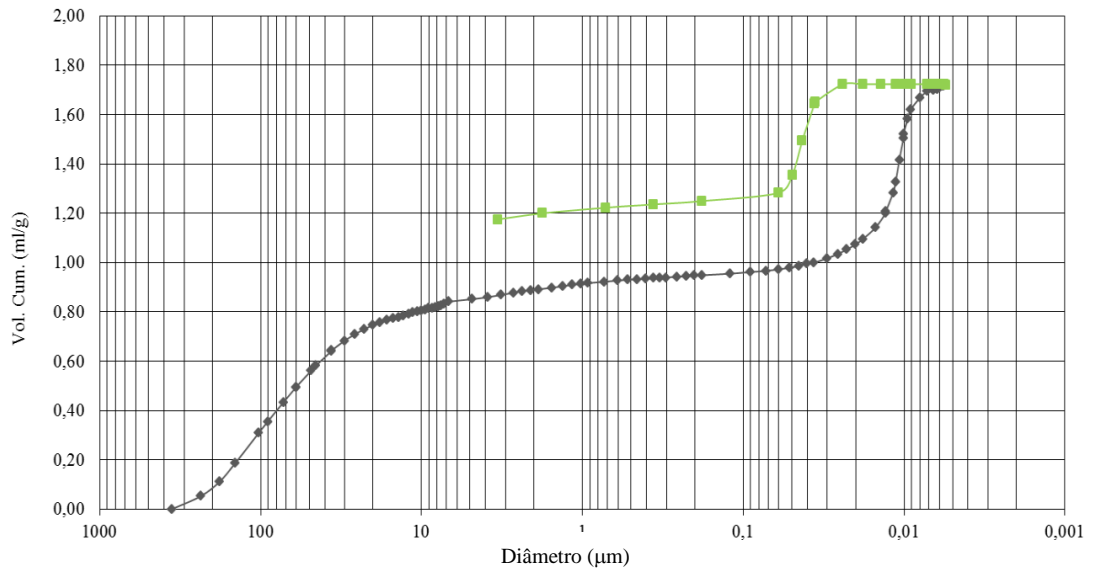
GSH (pH 6,00)



CYS + GSH (pH 7,00)

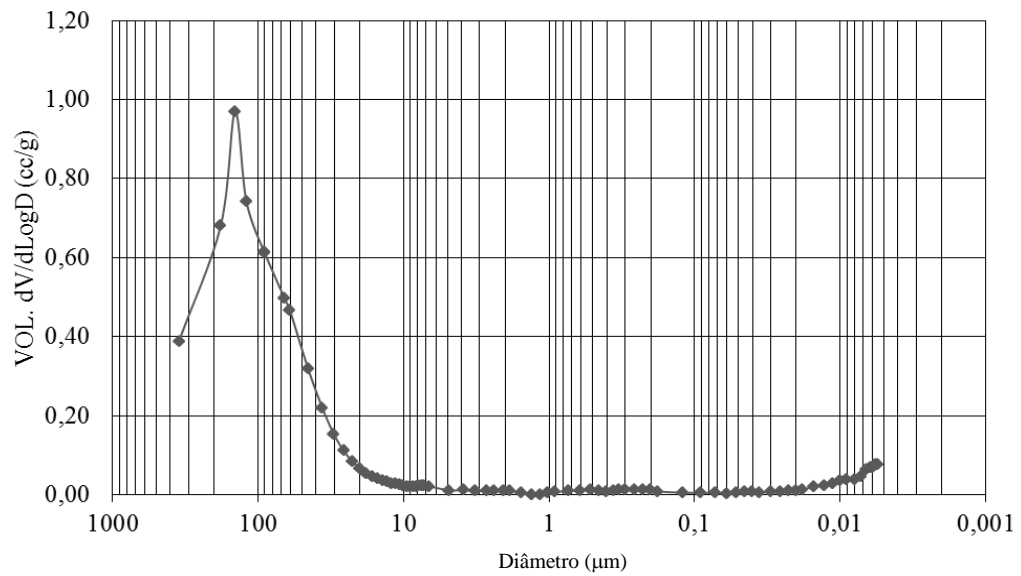
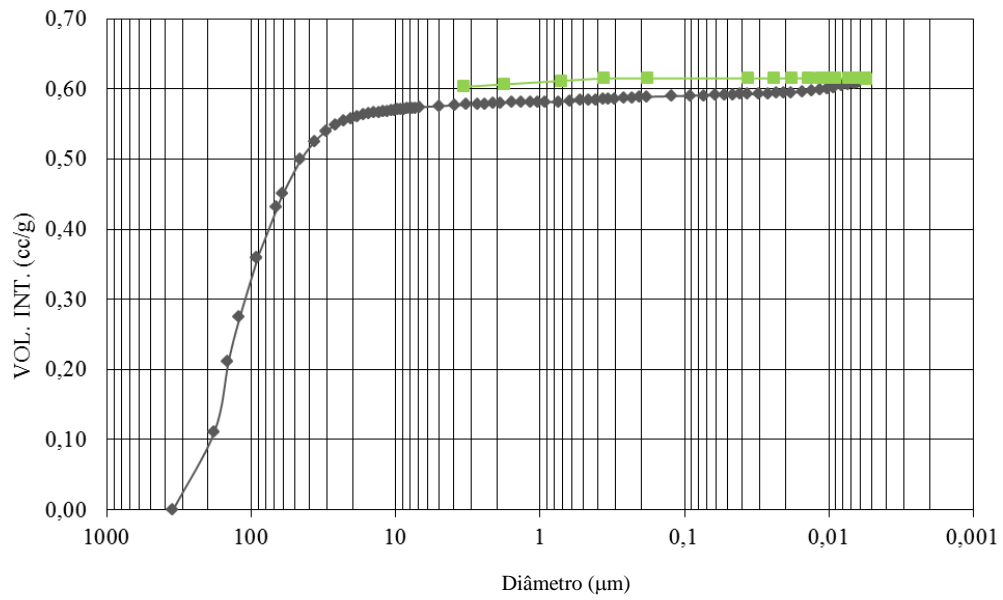


CYS (pH 9,81)

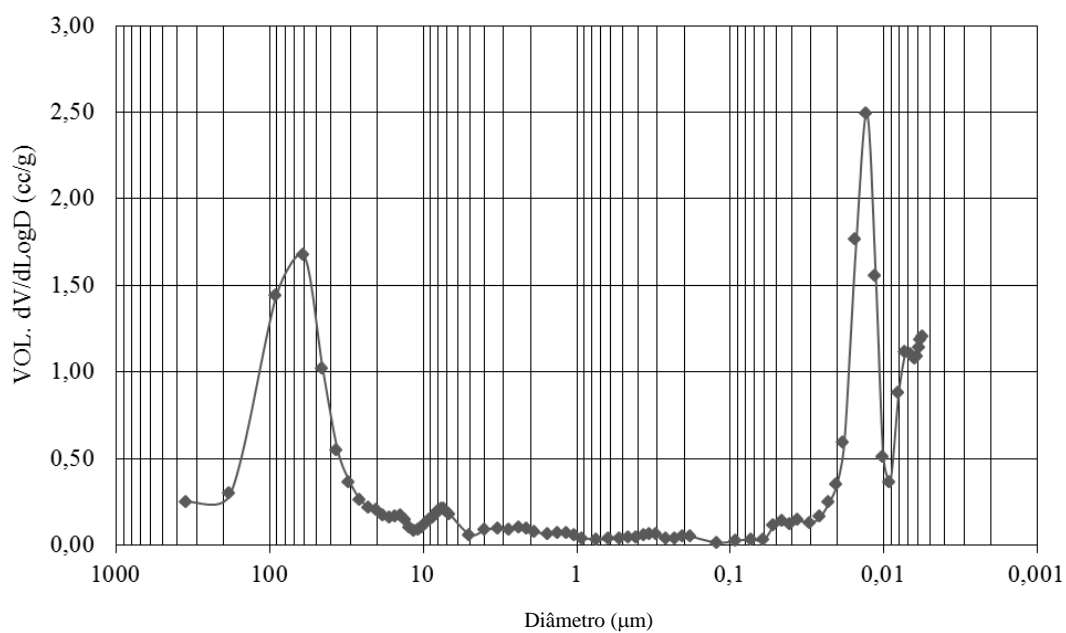
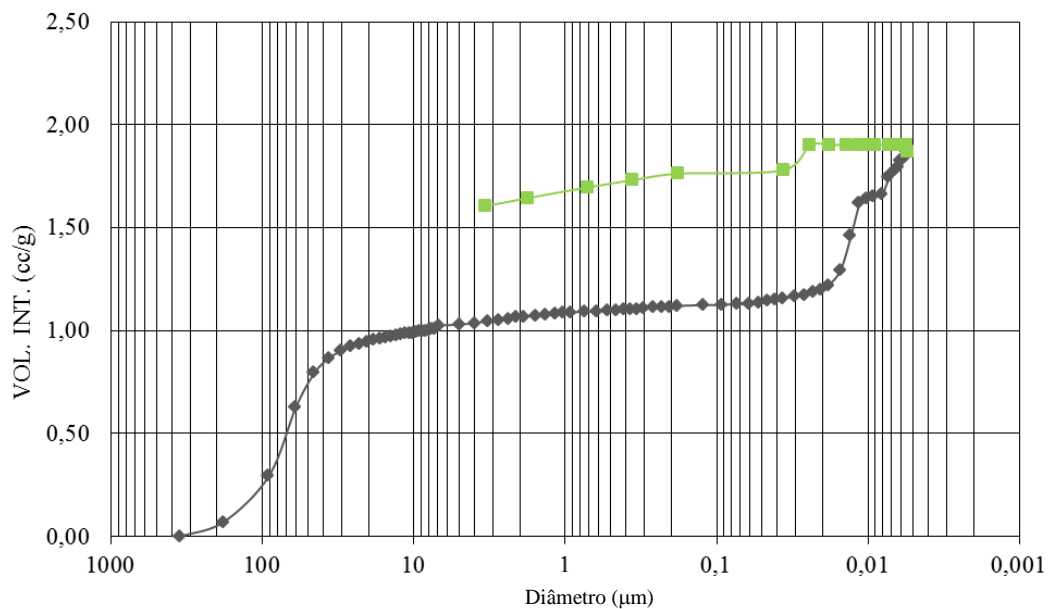


❖ Evaporação estufa de vácuo

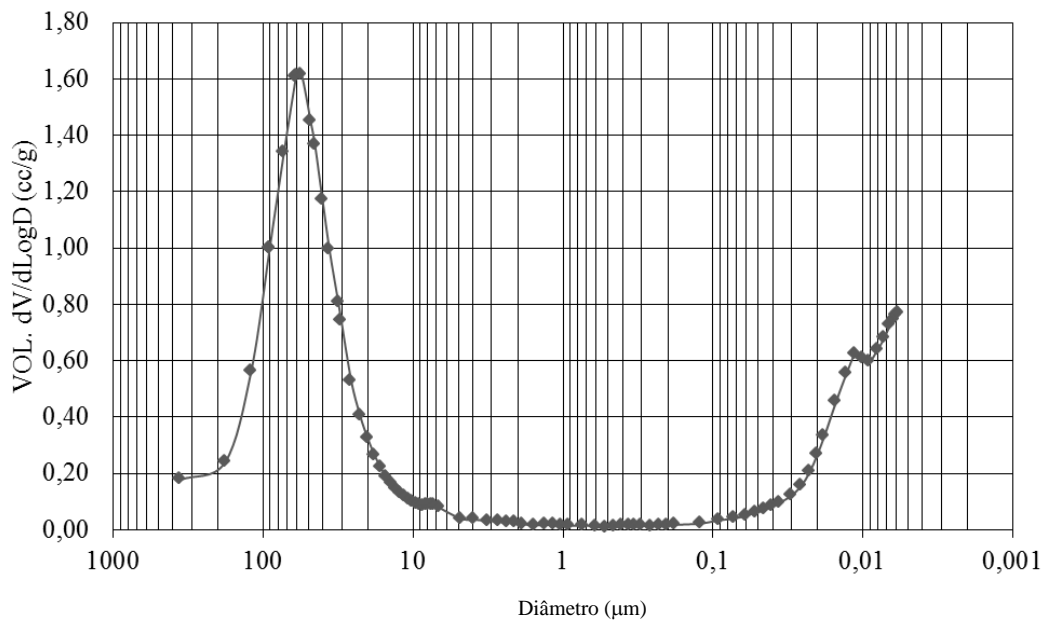
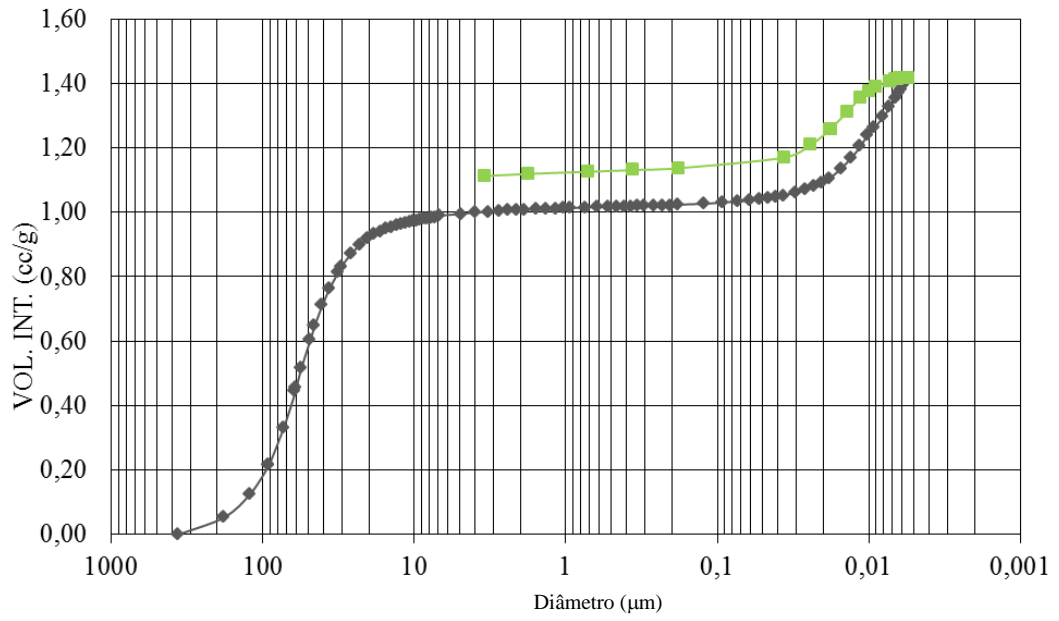
GSH (pH 2,46)



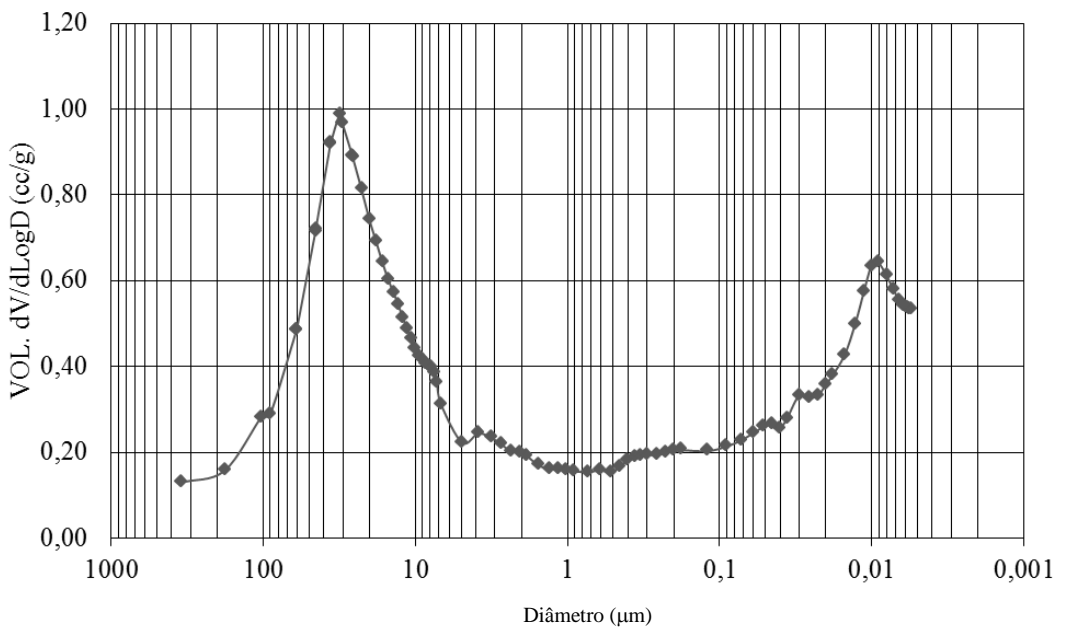
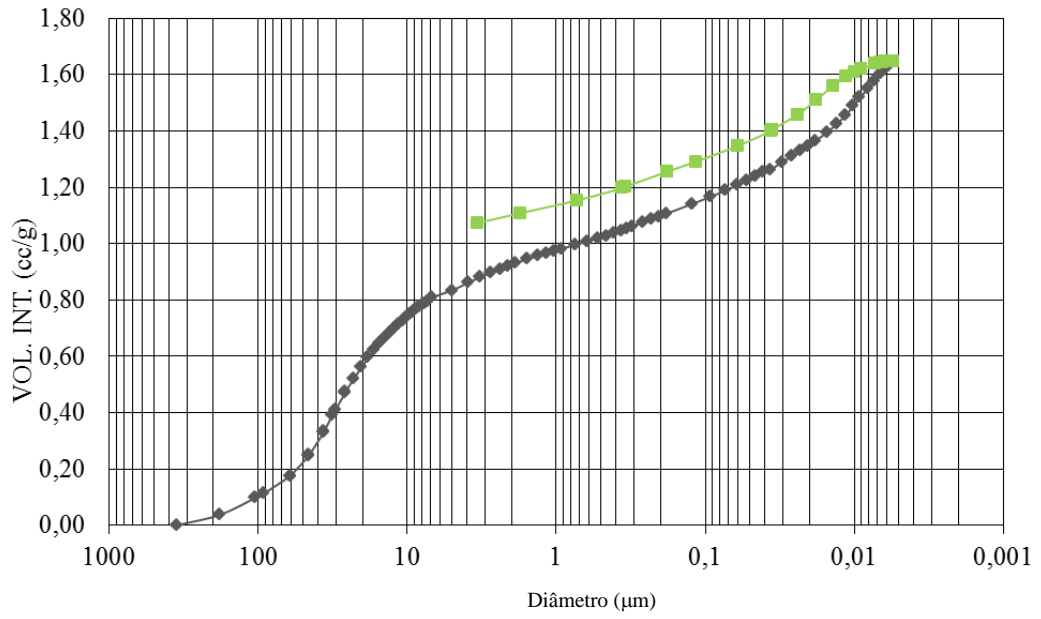
MET (pH 5,47)



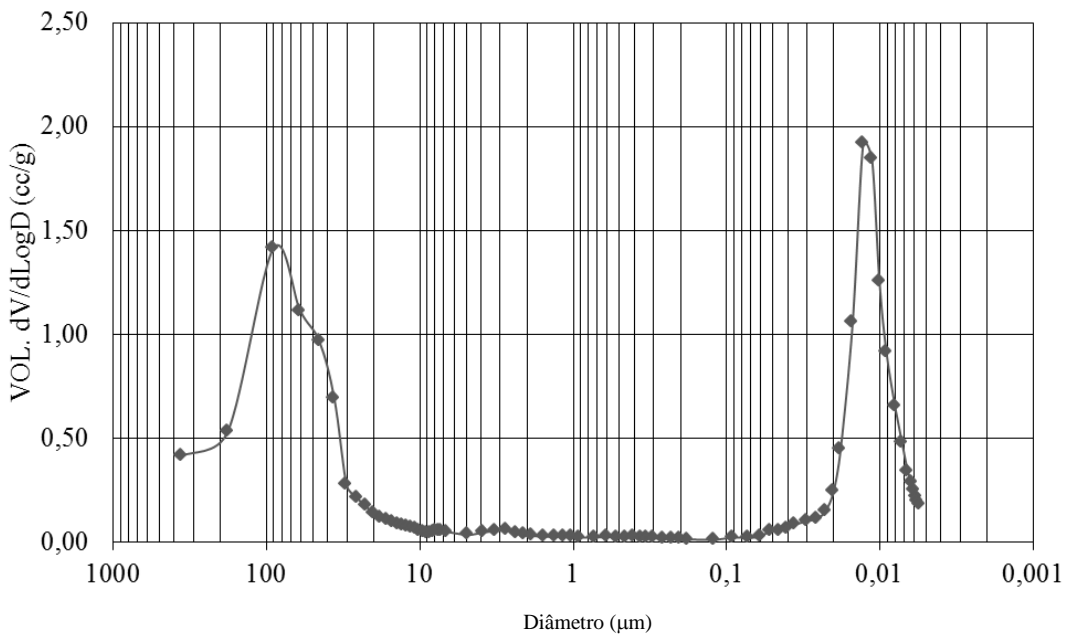
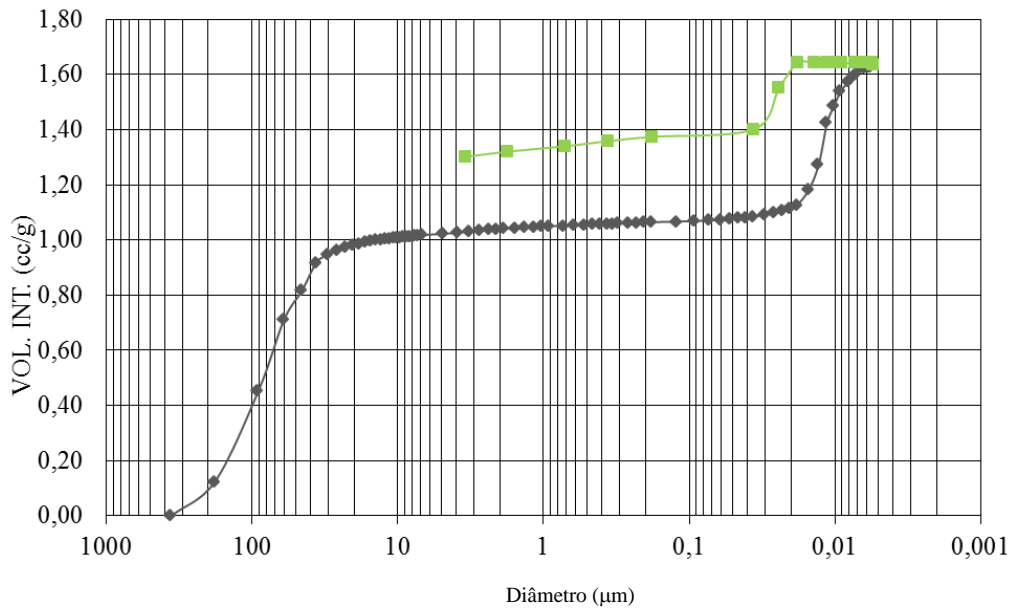
GSH (pH 6,00)



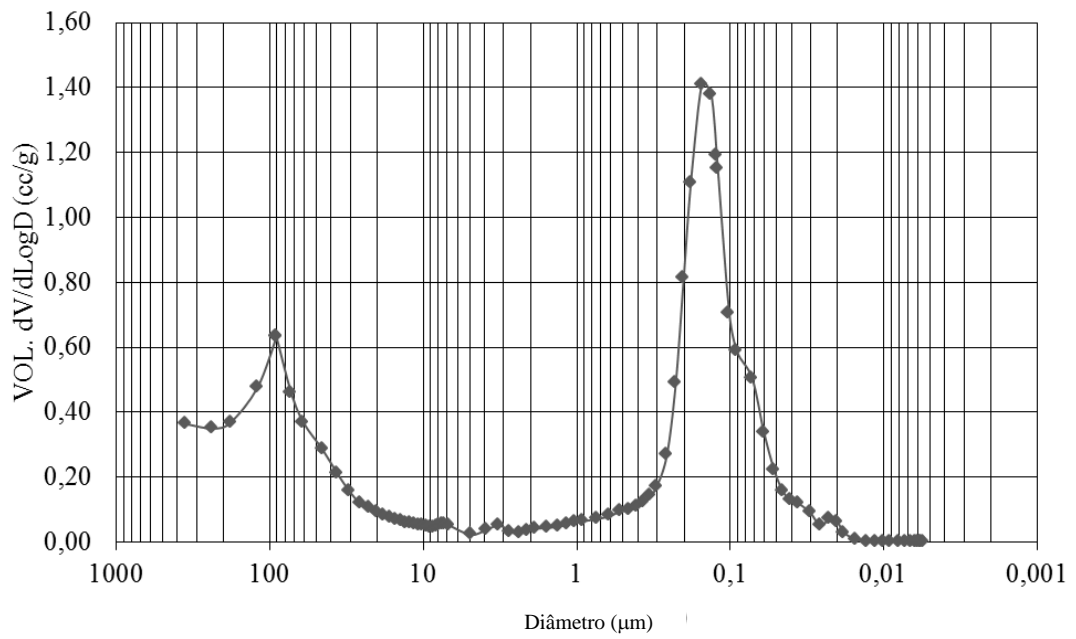
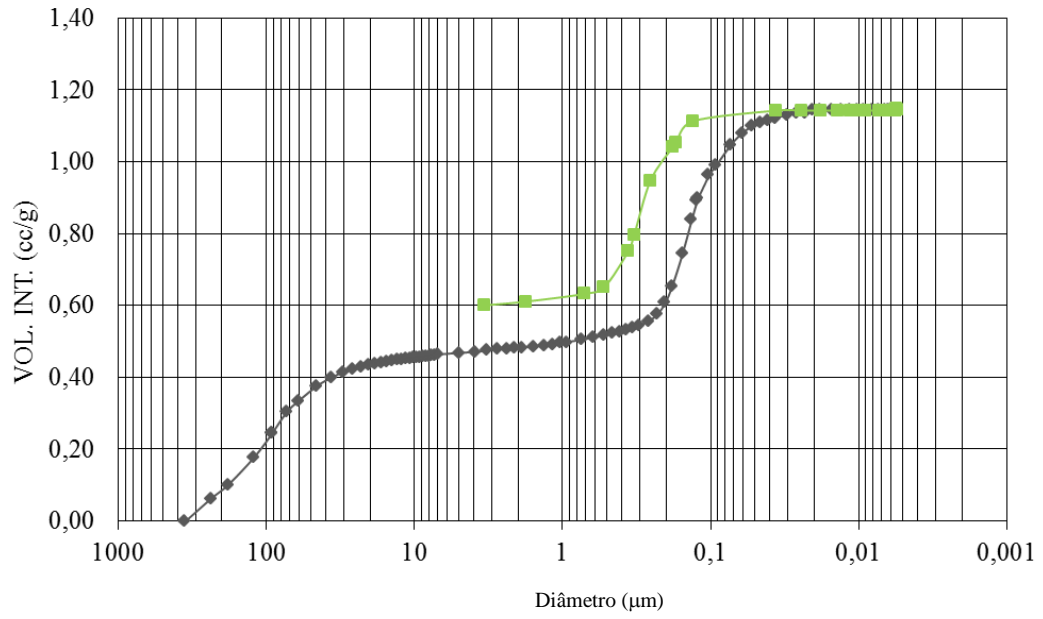
CYS + GSH (pH 7,00)



CYS (pH 8,60)

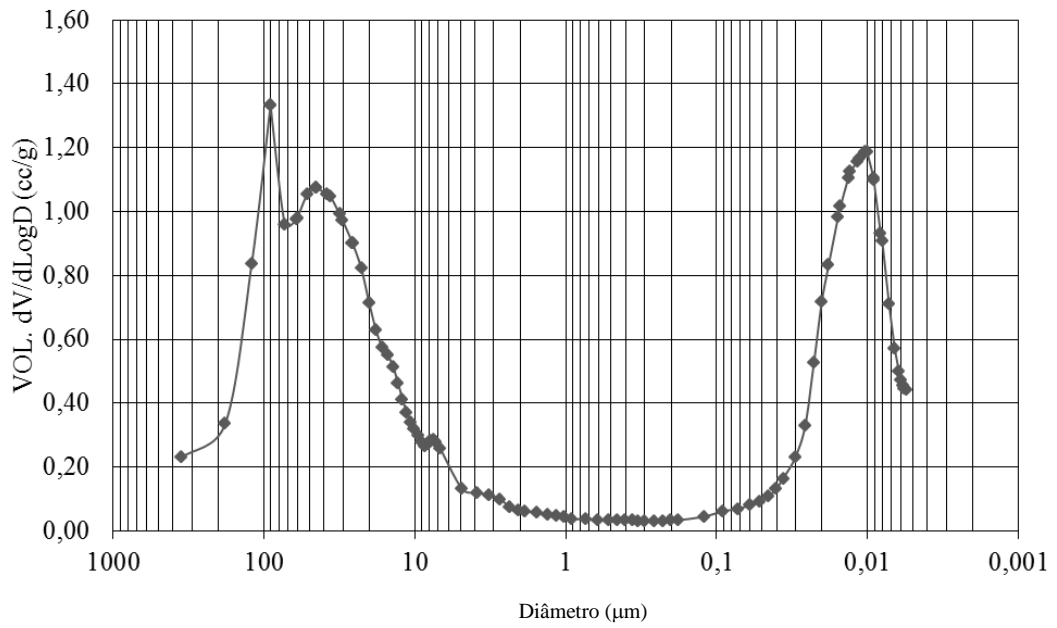
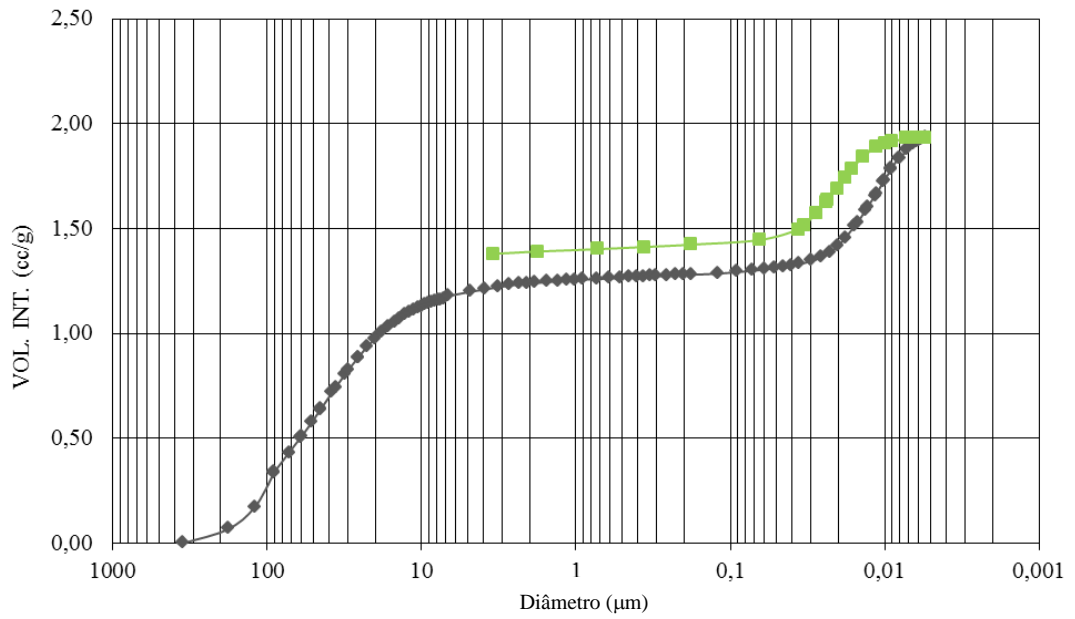


CYS (pH 9,81)

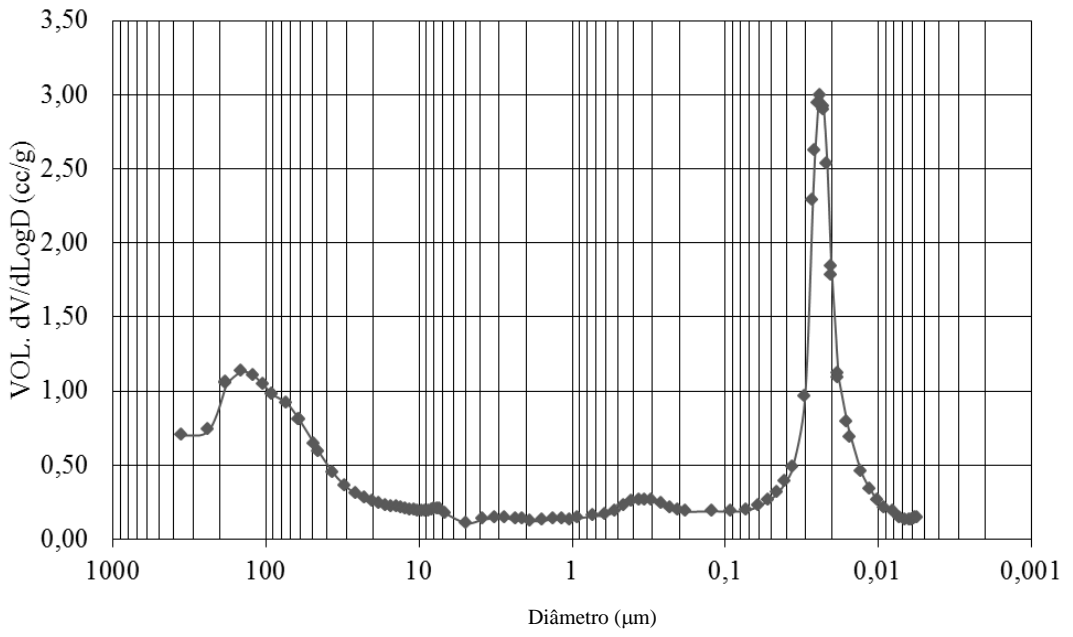
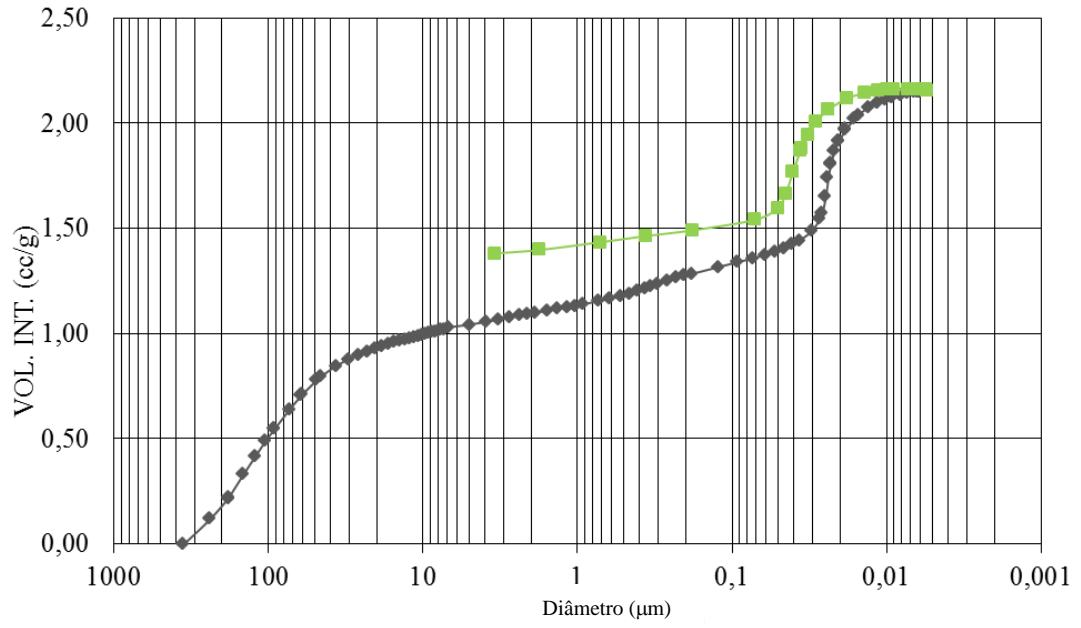


❖ Extração supercrítica

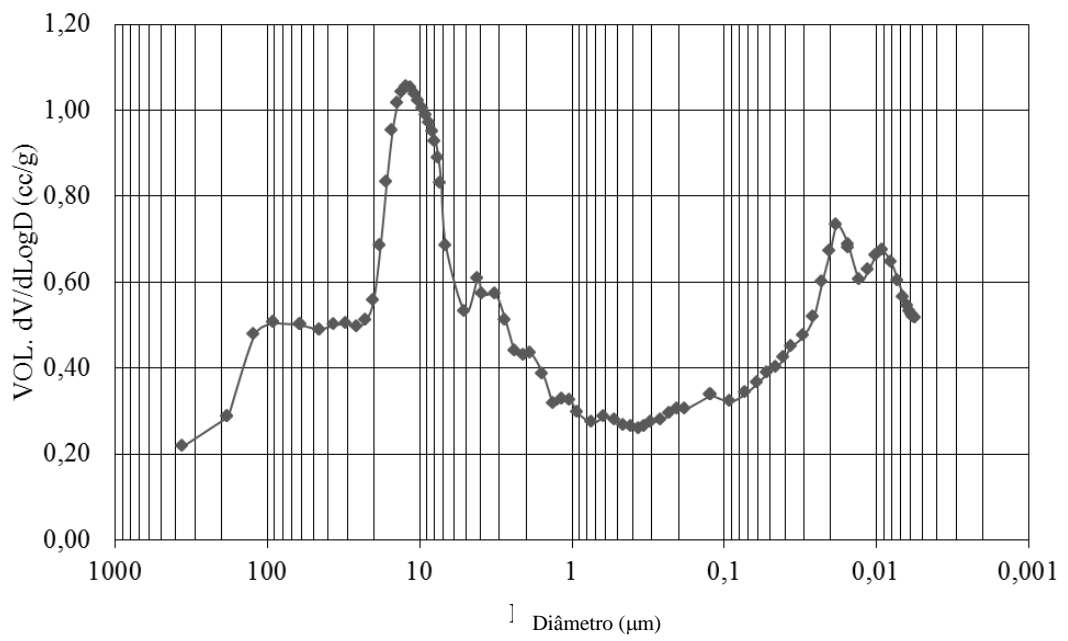
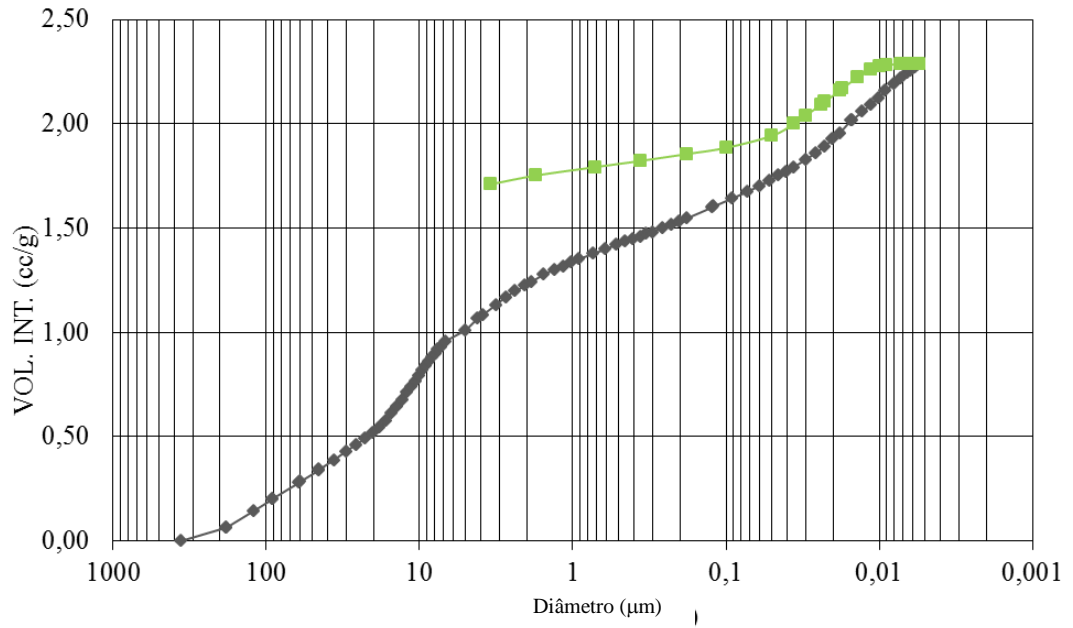
GSH (pH 2,46)



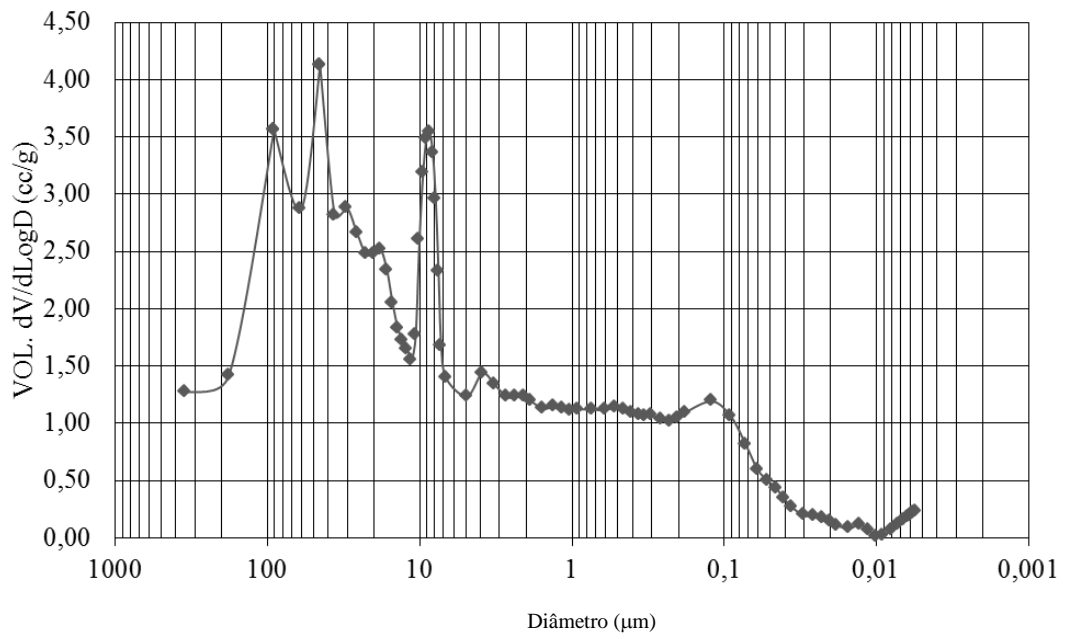
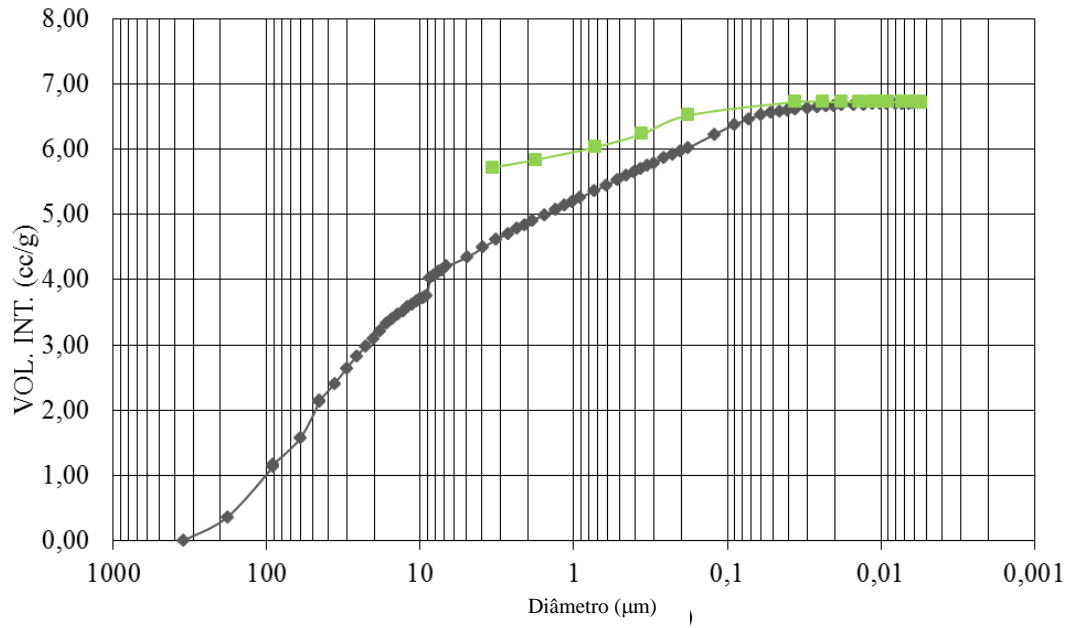
MET (pH 5,47)



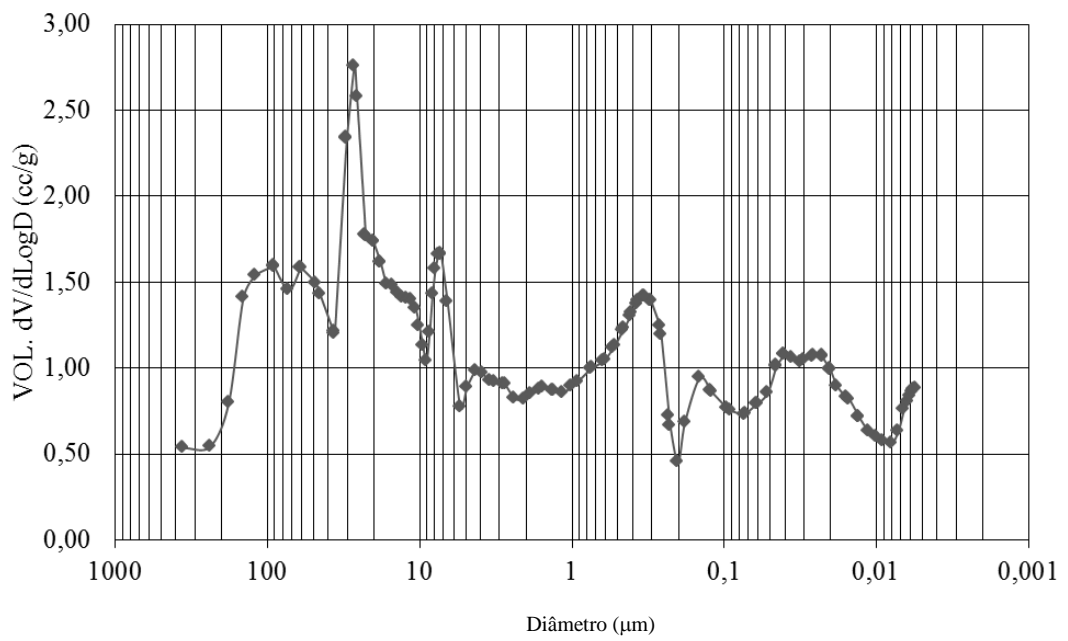
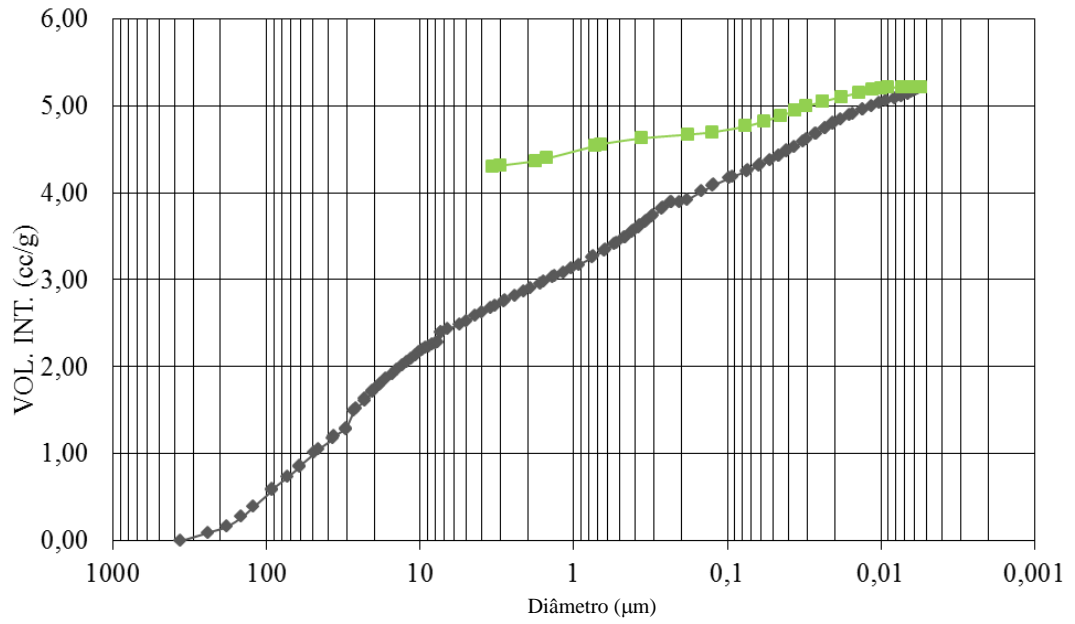
GSH (pH 6,00)



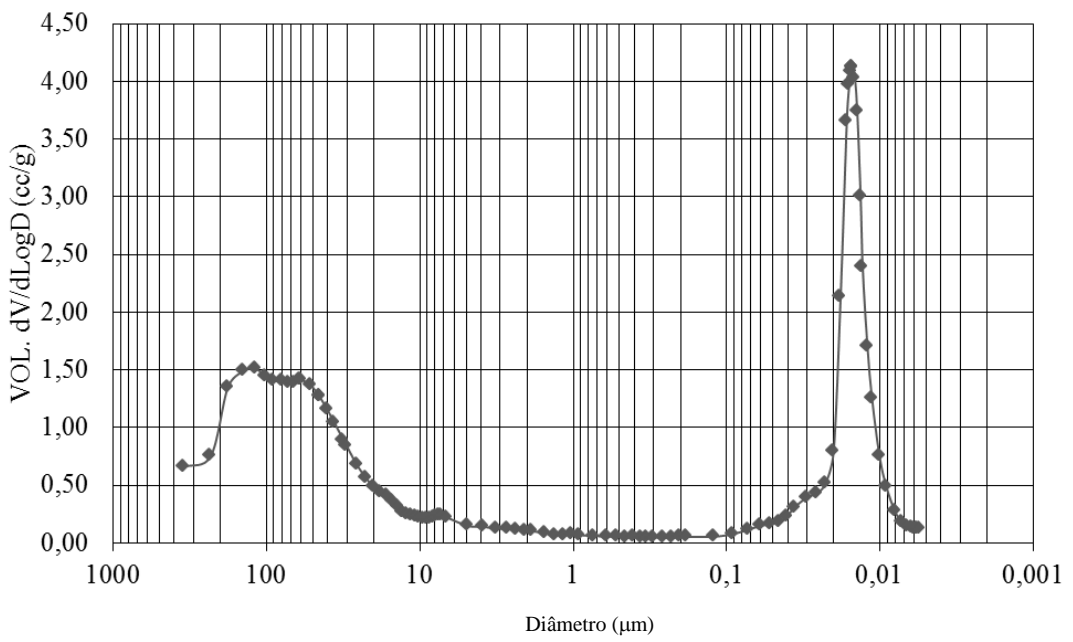
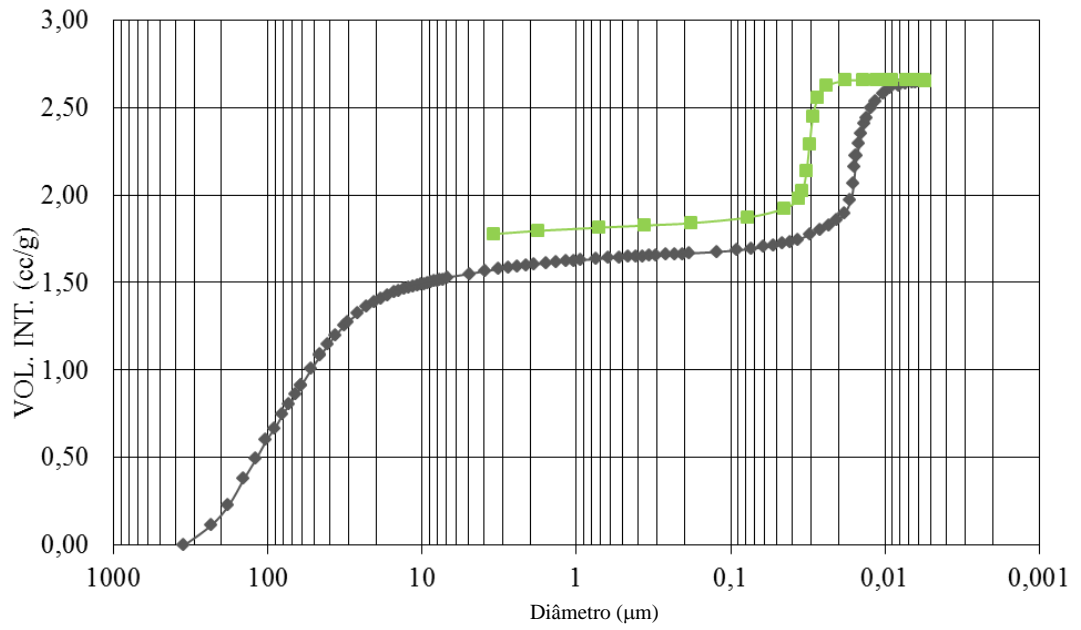
CYS+GSH (pH 7,00)



CYS (pH 8,60)



CYS (pH 9,81)



Curva de calibração para a dexametasona

Tabela 1. Concentração e respectivas diluições para a obtenção da recta de calibração da dexametasona.

Amostra	Concentração da amostra	Absorvância
1	50	1,813
	50	1,890
2	25	0,917
	25	0,981
3	17	0,646
	17	0,688
4	13	0,488
	13	0,501
5	10	0,386
	10	0,405
6	8	0,305
	8	0,313
7	5	0,201
	5	0,187
8	2	0,070
	2	0,091
9	1,5	0,053
	1,5	0,056
10	1	0,012
	1	0,065

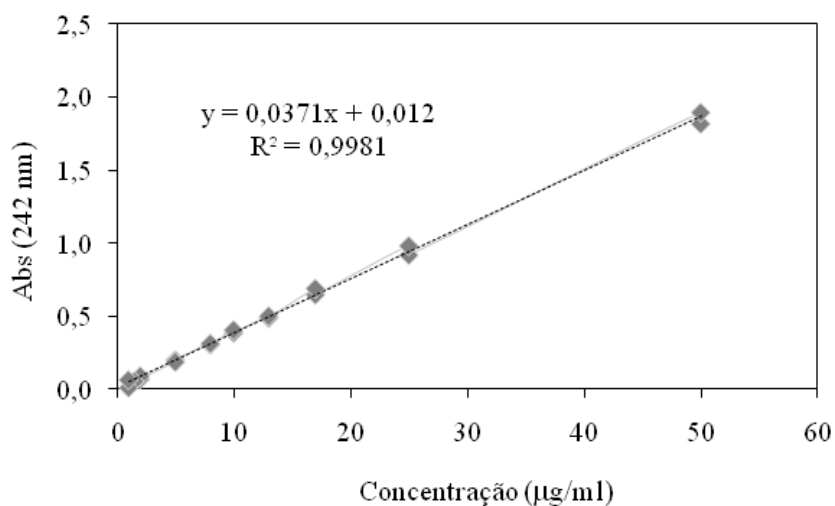


Figura 1. Curva de calibração da dexametasona.

Análise FTIR para alguns compósitos:

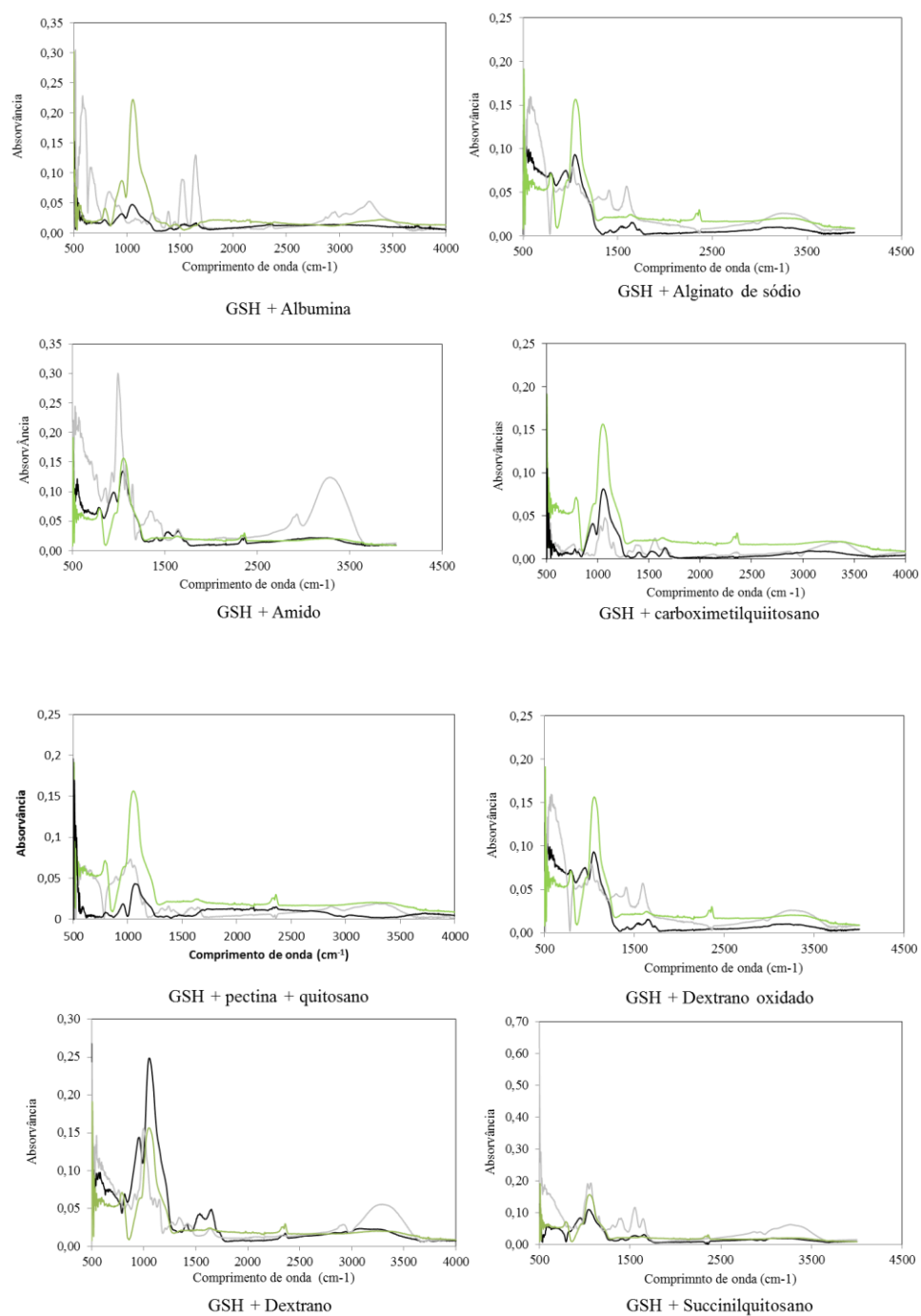

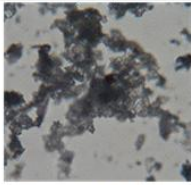

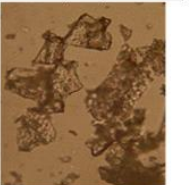

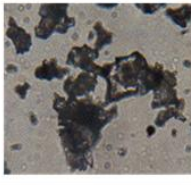

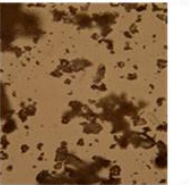

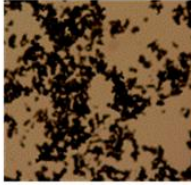

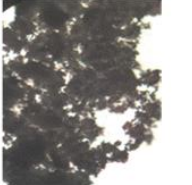

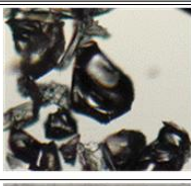

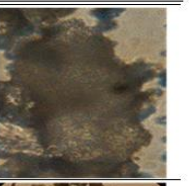

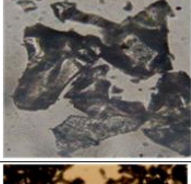

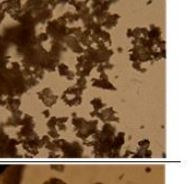

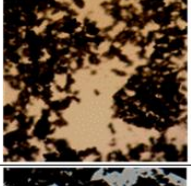
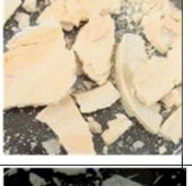
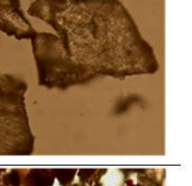

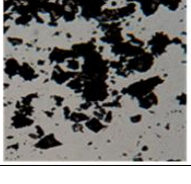
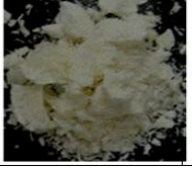
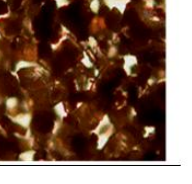

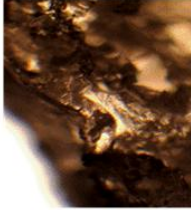

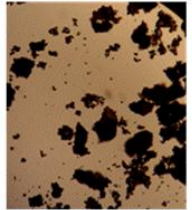

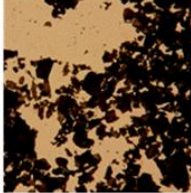

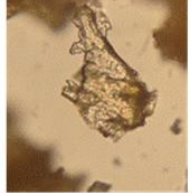



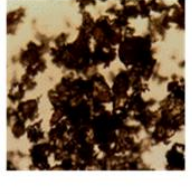

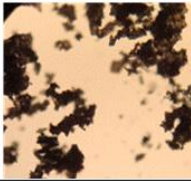

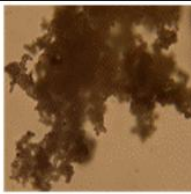



Figura 1. Espectros IV para os compósitos de sílica.

Microscopia óptica de alguns compósitos à base de sílica:

	GSH				
	Visão Macro	Visão microscópica (40 x)		Visão Macro	Visão microscópica (40 x)
Dextrano (1.0 %)			Quitosano (0.5 %)		
Dextrano (0.5 %)			Pectina de maçã (0.5 %) + Quitosano (2 %) (s/ agitação)		
Gelatina (1.0 %)			Pectina de maçã (0.5 %) + Quitosano (2 %)		
Gelatina (0.5 %)			Alginato de sódio (0.5 %)		
Amido (1%)			Alginato de sódio + gelatina (1.0 % + 1.0 %)		
Carboximetilquitosano (0.5 %)			Dextrano oxidado (0.5 %)		
HEMA (1.5 %)			Viniltrimetoxisilano (0.25 %)		

3-glicidiloxipropil trimetoxisilano (0.25 %)			Hidroxiapatite (1.0 %)		
Acido acrilico (1.05 %)			Extracto de Pinheiro (1.0 %)		
Extracto de pinheiro + quitosano (1.0% + 1.0%)			Taninos de Tara (0.5 %)		
Taninos de Mimosa (0.5 %)					
CYS					
Hema (1.5 %)			Viniltrimetoxisilano (0.25 %)		
3-glicidiloxipropil (0.25 %)	