



**Eunice Conceição
Horta da Veiga**

**Desenvolvimento De Microagulhas De Cimentos
Ósseos Para Libertação Controlada De Fármaco**



**Eunice Conceição
Horta da Veiga**

**Desenvolvimento De Microagulhas De Cimentos
Ósseos Para Libertação Controlada De fármaco**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica da Doutora Susana Maria Henriques Olhero, Investigadora Auxiliar no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica/CICECO-Instituto de Materiais de Aveiro e da Doutora Paula Maria da Costa Torres, Investigadora de Pós-Doutoramento no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica/CICECO-Instituto de Materiais de Aveiro da Universidade de Aveiro e do Prof. Doutora Ana Francisca Bettencourt, Professora na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus irmãos.

o júri

presidente

Prof.^a Doutora Maria Margarida Tavares Lopes de Almeida
Professora Auxiliar no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da
Universidade de Aveiro/CICECO-Instituto de Materiais de Aveiro

Prof.^a Doutora Ana Mafalda Saldanha Guedes
Professora Adjunta no Departamento de Engenharia Mecânica, Escola Superior de
Tecnologia de Setúbal-Instituto Politécnico de Setúbal

Doutora Susana Maria Henriques Olhero
Investigadora Auxiliar no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da
Universidade de Aveiro/CICECO-Instituto de Materiais de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Às minhas orientadoras, Doutora Susana Maria Henriques Olhero, Doutora Paula Maria da Costa Torres, Prof. Doutora Ana Francisca Bettencourt, por todo o apoio, acompanhamento e disponibilidade demonstrados, bem como por todo o conhecimento científico comigo partilhado, que me permitiram evoluir durante todos estes meses.

Aos técnicos do DeMAC/CICECO, por toda a ajuda prestada.

Aos meus colegas, amigos e familiares pelo apoio e incentivo e por estarem disponíveis para me ajudar sempre que precisei.

E por fim, um agradecimento especial, aos meus pais, José Veiga e Maria Horta por todos os sacrifícios, apoio, compreensão, carinho e paciência, que me permitiram concluir mais esta etapa da minha vida.

palavras-chave

Microagulhas, Cimentos de fosfatos de cálcio, Liberação Transdérmica de Fármacos, pós de β -TCP, Levofloxacina.

resumo

As microagulhas são dispositivos usados para liberação transdérmica de fármacos, com elevado potencial para aplicação em várias áreas da biomedicina. Atualmente, vários materiais, como polímeros e metais, são utilizados na produção destes microcomponentes. Porém, desvantagens como a baixa biocompatibilidade, propriedades mecânicas inadequadas (limitações relacionadas com a perfuração da pele) e o alto custo de fabrico limitam a produção e expansão destes microdispositivos. Fabricar microagulhas a custos mais reduzidos, num material com propriedades promissoras no armazenamento e liberação de fármacos, com propriedades mecânicas adequadas, foi a motivação deste trabalho. O objetivo focou-se no desenvolvimento de microagulhas sólidas a partir de cimentos à base de fosfatos de cálcio, incluindo um fármaco na sua composição. Estudaram-se diferentes cimentos à base de fosfatos de cálcio, variando a natureza dos pós de partida, o seu tamanho e distribuição de tamanhos de partícula e razões líquido de presa/pó, com o objetivo de avaliar a sua influência na porosidade, propriedades mecânicas e fases cristalinas dos cimentos e relacionar estas características com a taxa de liberação do fármaco. Como líquido de presa utilizou-se uma solução aquosa de ácido cítrico e o fármaco estudado foi o antibiótico levofloxacina.

Os resultados obtidos mostraram que a adição de fármaco não alterou significativamente as propriedades mecânicas e porosidades dos cimentos. Porém houve um aumento dos tempos de presa iniciais e finais dos cimentos na presença de levofloxacina. A velocidade de liberação do fármaco foi relativamente elevada, com um perfil idêntico para todas as formulações de cimentos estudada, não sendo possível relacionar a taxa de liberação com as propriedades avaliadas nos cimentos, nomeadamente a porosidade. A pasta cimentícia que apresentou características mais apropriadas para o enchimento sob vácuo dos moldes de microagulhas foi a que se obteve com razão líquido/pó mais elevada e distribuição de partículas mais alargada. Do estudo realizado, foi possível obter microagulhas, facilmente desmoldáveis sem se danificarem, resultantes de: (i) um enchimento completo das microcavidades do molde pela pasta cimentícia, e (ii) propriedades mecânicas adequadas dos cimentos.

Do trabalho realizado conclui-se que estes microcomponentes à base de fosfato de cálcio apresentam propriedades promissoras para futuras aplicações biomédicas, uma vez que são materiais não tóxicos que não acarretam problemas ao paciente e relativamente fáceis de produzir por micromoldagem, tornando assim o custo de produção mais competitivo.

keywords

Microneedles, calcium phosphate cements, Transdermal Drug Delivery, β -TCP powders, Levofloxacin.

abstract

Microneedles are devices used for transdermal drug delivery, with high potential in large areas of biomedicine. Currently, several materials, such as polymers and metals, are used to produce these materials. However, limitations such as low biocompatibility, inadequate mechanical properties (limitations related to skin perforation) and high manufacturing costs limit the production and expansion of these microdevices. The possibility to fabricate microneedles at lower costs in a material with promising properties for the storage and release of drugs with suitable mechanical properties was the motivation of this work. The aim was focused on the development of solid microneedles from calcium phosphate based cements, including a drug in their composition. Different calcium phosphate based cements were studied, varying the nature of the starting powders, their size and particle size distribution and liquid to powder ratios, in order to evaluate their influence on porosity, mechanical properties and crystalline phases of the cements and relate these features to the rate of drug release. An aqueous solution of citric acid was used as setting liquid and antibiotic levofloxacin was used as a model drug. The results showed that addition of the antibiotic did not significantly affect the mechanical properties and porosities of the cements. However, in the presence of levofloxacin, there was an increase in the initial and final setting times of the cements. The drug release rate was relatively high, with an identical profile for all cement formulations tested, being not possible to relate the drug release rate with the cements properties evaluated, namely porosity. The cement paste that presented the most appropriate properties for casting microneedle moulds under vacuum was the one obtained with higher liquid/powder ratio and broader particle size distribution. Sharp and fine tip microneedles were successfully de-moulded, resultant to the (i) complete filling of the microcavities of the mould and (ii) adequate mechanical properties of the cement. From the evaluated work, it can be concluded that these calcium phosphate-based microcomponents present promising properties for future biomedical applications, since they are non-toxic materials that do not cause patient problems and are relatively easy to produce by micromolding, making the production cost more economical.

Índice

Índice	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas.....	v
Lista de Abreviatura e Siglas.....	vii
Capítulo 1	3
1. Introdução.....	5
1.1. Enquadramento.....	5
1.2. Estrutura da dissertação	8
Capítulo 2	9
2. Revisão bibliográfica.....	11
2.1. Administração de fármaco.....	11
2.2. Microagulhas como via de libertação transdérmica de fármacos.....	12
2.2.1. Tipos de microagulhas.....	14
2.3. Cimentos como substitutos ósseos.....	17
2.3.1. Cimentos acrílicos	17
2.3.2. Cimentos de sulfato de cálcio (CSC).....	18
2.3.3. Cimentos de fosfatos de cálcio (CPC).....	18
2.3.3.1. Fosfatos de cálcio	19
2.3.3.2. Tipos de cimentos de fosfatos de cálcio	22
Cimentos Brushíticos.....	22
2.3.3.3. Propriedades dos CPCs.....	23
Reação de presa e endurecimento.....	24
Propriedades Mecânicas	25
Porosidade	26
2.3.4. Administração de fármacos através de cimentos ósseos	26
2.4. Objetivo e Motivação da dissertação.....	29
Capítulo 3	31
3. Materiais e Métodos	33
3.1. Materiais	33
3.2. Métodos	34

3.2.2.	Caracterização dos pós	35
3.2.2.1.	Análise por Difração de Raios-X (DRX)	35
3.2.2.2.	Análise morfológica (SEM)	35
3.2.2.3.	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	36
3.2.2.4.	Análise granulométrica	36
3.2.3.	Preparação e caracterização das pastas cimentícias	36
3.2.3.1.	Avaliação da compatibilidade da Levofloxacina com o líquido de presa dos cimentos pelo FTIR-ATR.....	38
3.2.3.2.	Medição dos Tempos de presa	39
3.2.4.	Caracterização dos cimentos	40
3.2.4.1.	Avaliação das Propriedades Mecânicas	40
3.2.4.2.	Análise quantitativa e qualitativa dos cimentos (DRX)	41
3.2.4.3.	Determinação da Porosidade total dos cimentos	41
3.2.4.4.	Análise morfológica dos cimentos (SEM)	43
3.2.5.	Estudo da Libertação de fármaco	43
3.2.5.1.	Preparação das soluções-padrão e Curva de calibração	43
3.2.5.2.	Estudo da Libertação da LEVO em PBS	44
3.2.6.	Enchimento dos moldes de microagulhas e caracterização das amostras	44
Capítulo 4	47
4.	Resultados e Discussão	49
4.1.	Caracterização dos pós	49
4.2.	Avaliação da compatibilidade da Levofloxacina com o líquido de presa dos cimentos	54
4.3.	Caracterização das pastas cimentícias	55
4.4.	Caracterização dos cimentos	57
4.5.	Estudo da Libertação da Levofloxacina	64
4.6.	Enchimento dos moldes de microagulhas e caracterização das amostras	73
Capítulo 5	79
5.	Conclusões e sugestões para trabalhos futuros	81
	Referências Bibliográficas	83

Índice de Figuras

Figura 1: Anatomia da pele. (Adaptado de [29]).....	13
Figura 2: Tipos de microagulhas e métodos de libertação de fármacos. A-microagulhas perfuradas; B- microagulhas sólidas; B1-microagulhas sólidas para criar microporos; B2-microagulhas sólidas revestidas; B3-microagulhas sólidas absorvíveis; C- microagulhas porosas; Adaptado de [9].....	15
Figura 3: Estrutura química da levofloxacina [83].....	28
Figura 4: Misturadora Thinky ARE-250	37
Figura 5: Agulha de Gilmore e molde de silicone com o cimento para a medição dos tempos de presa.	39
Figura 6: Equipamento Shimadzu Autograph Trapezium 2 utilizado para os ensaios mecânicos das amostras cimentícias cilíndricas.....	40
Figura 7: “Densímetro” criado pela equipa de investigação do Professor José M. F. Ferreira.	42
Figura 8: AVE-High Vacuum Engineers- Equipamento utilizado para o enchimento das microagulhas.....	45
Figura 9: Difractogramas de DRX dos pós calcinados a 1000°C durante 2 h (P1 e P2) e do pó comercial (PC).....	49
Figura 10: Espectros de FTIR dos pós calcinados a 1000°C durante 2h (P1 e P2) bem como do pó comercial (PC).....	51
Figura 11: Distribuição dos tamanhos de partícula dos pós (P1, P2 e PC) após calcinação e moagem.	52
Figura 12: Microestrutura dos pós A) P1 e B) P2 calcinados a 1000°C, e do pó comercial C) PC.	53
Figura 13: Espectros de FTIR-ATR da solução de Levofloxacina (LEVO), de ácido cítrico (AC) e de uma mistura de AC com LEVO (AC_LEVO).....	54
Figura 14: Tempos de presa inicial (IST) e final (FST) das pastas cimentícias: (a) sem levofloxacina; (b) com levofloxacina.	56
Figura 15: Difractogramas obtidos por DRX das fases presentes nos cimentos a) sem levofloxacina e b) com levofloxacina.....	58

Figura 16: Composições das fases cristalinas dos cimentos obtidas por DRX: a) sem levofloxacina e b) com Levofloxacina.	59
Figura 17: Resistência à compressão dos cimentos: a) sem levofloxacina; b) com a levofloxacina; Porosidade total dos cimentos c) sem levofloxacina e d) com levofloxacina.	60
Figura 18: Microestruturas dos cimentos a) sem e b) com o fármaco levofloxacina.....	63
Figura 19: Curva de calibração da levofloxacina (n=3).....	65
Figura 20: Perfis de libertação da levofloxacina, em percentagem, a partir dos cimentos CC_LEVO-0.4, CC_LEVO-0.36, C1_LEVO-0.4 e C2_LEVO-0.4, nos tempos 0,2,4,6,24 e 48 horas em PBS (n=3).	66
Figura 21: Imagens que ilustram a degradação dos cimentos C1_LEVO-0.4 durante 2 h de imersão em PBS.	67
Figura 22: Perfis de libertação da levofloxacina a partir dos cimentos CC_LEVO-0.4, CC_LEVO-0.36, C1_LEVO-0.4 e C2_LEVO-0.4, nos tempos 0, 2, 4, 6, 24 e 48 horas em PBS.....	68
Figura 23: Microestruturas dos cimentos com o fármaco: a) antes do teste de libertação e b) depois do teste de libertação.....	70
Figura 24: Espectros de FTIR correspondentes a: LEVO = fármaco levofloxacina; CC-0.4= espectro do cimento CC-0.4 sem Levofloxacina; CC_LEVO-0.4_(a) = cimento com levofloxacina antes do teste de libertação; CC_LEVO-0.4_(b) =cimento com levofloxacina depois do teste de libertação,.....	72
Figura 25: Madres poliméricas de microagulhas sólidas priamidais (A) e cónicas (B), e respetivos micromoldes à base de silicone.....	73
Figura 26: Imagens de microagulhas de cimentos com o fármaco levofloxacina, piramidais (A,C e D) e cónicas (B).....	74
Figura 27: Imagens obtidas por SEM de microagulhas piramidais preparadas com a composição de cimentos CC_LEVO-0.4.	75
Figura 28: Imagens obtidas por SEM de microagulhas cónicas preparadas com a composição de cimentos CC_LEVO-0, para o micromolde em forma de cone (B).	76

Índice de Tabelas

Tabela 1: Fosfatos de cálcio usados nas composições dos CPCs [51, 52]. Os primeiros 6 são os fosfatos de cálcio obtidos por precipitação a partir de uma solução aquosa a baixa temperatura e os restantes 5 são obtidos por uma reação térmica a altas temperaturas.	20
Tabela 2: Parâmetros que afetam as propriedades dos CPCs.....	24
Tabela 3:Matérias-primas utilizadas ao longo deste estudo	33
Tabela 4: Nomenclatura utilizada na identificação dos pós de acordo com a concentração do percussor utilizado para a síntese, bem como as razões molares utilizadas.	34
Tabela 5: Designação dos cimentos tendo em conta a RLP, os pós utilizados, e a presença ou a ausência de LEVO.	38
Tabela 6: Análise semi-quantitativa das fases presentes nos pós obtida pelo método de RIR (Relative <i>Intensity Ratio</i>).	50

Lista de Abreviatura e Siglas

AC: Acido cítrico

CaPs: Fosfatos de cálcio

CPCs : Cimentos de fosfatos de cálcio

CS: Sulfato de cálcio

CSD: Sulfato de cálcio diidratado

CSH: Sulfato de cálcio hemihidratado

DCPD:Brushite

D CPA:Monetite

DRX: Difracao de raios-X

FDA: Administração de Alimentos e Medicamentos

FTIR: Espetrocopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

HA: Hidroxiapatite

MEMS: Sistemas micro eletromecânicos

MCPM: Fosfato monocálcico monohidratado

RLP: Razão líquido/pó

LEVO: Levofloxacin

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PMMA: Polimetilmetacrilato

SEM: Microscopia eletrônica de varrimento

TDDS: Sistemas de Libertação Transdérmica de Fármacos

TDD: Libertação Transdérmica de Fármacos

TCP: Fosfato Tricálcico

β -TCP: β -Fosfato Tricálcico

β -CPP: β -Pirofosfato de cálcio

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1. Enquadramento

Os métodos de administração de fármacos incluem por exemplo a administração por via oral, intravenosa, tópica e sistemas de inalação. A administração intravenosa ou via transdérmica são as vias mais eficientes para a rápida absorção dos fármacos no organismo. Geralmente a administração é feita com auxílio de uma agulha, que possibilita o transporte do fármaco através das camadas da pele até à circulação sistémica. Uma das grandes vantagens deste tipo de método é a possibilidade de evitar a degradação enzimática do fármaco no trato gastrointestinal e no fígado levando assim a uma melhor eficácia na sua atuação [1]. Assim, cada vez mais, são estudados e desenvolvidos sistemas de libertação transdérmica de fármacos (Transdermal Drug Delivery System, TDDS), que possibilitam o transporte de fármacos através das camadas da pele até à circulação sistémica de forma controlada. O primeiro sistema transdérmico, denominado de “Transderm-SOP”, foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) em 1979 para prevenção de náuseas e vômitos [1]. Desde então, os sistemas TDDS têm despertado muito interesse, uma vez que além da possibilidade de evitar a degradação de fármacos no trato gastrointestinal e no fígado, a administração é feita de forma controlada, não invasiva, e com maior eficácia quando comparados com outros métodos [2, 3]. Estes sistemas, geralmente, são dispositivos incorporados com fármacos, com moléculas de área superficial predefinida, capazes de controlar a velocidade de libertação do fármaco, ou seja, a quantidade a ser libertada ao longo do tempo [4, 5]. Uma grande variedade de fármacos tem sido estudada através destes sistemas, de forma a superar as limitações de outros métodos de libertação (Oral e sistemas de inalação). Segundo Akhtar et al. [5] a administração de fármacos por via oral não apresenta a eficácia pretendida [5]. Atualmente, cerca de 40 % dos fármacos utilizados em estudos clínicos estão relacionados com a administração transdérmica ou dérmica [2]. O método mais utilizado para a administração transdérmica são as agulhas hipodérmicas. Contudo, o uso destas agulhas provoca dor e algum desconforto ao paciente, podendo levar até ao desenvolvimento de “fobias às agulhas” e como consequência, à fraca adesão do paciente a um determinado tratamento. Devido a estes e outros inconvenientes apresentados, nos últimos anos, têm sido estudados vários novos sistemas de administração transdérmica de fármacos. As microagulhas são uma abordagem recente deste tipo de sistemas e surgem sobretudo como

possíveis substitutos das agulhas hipodérmicas [5]. A grande vantagem do uso de microagulhas face às agulhas convencionais foca-se essencialmente nas suas dimensões. Trata-se de um componente com dimensões à escala micrométrica, que não atinge as terminações nervosas da pele após a sua inserção, diminuindo assim a severidade da dor. Por outro lado, este dispositivo melhora a eficácia da administração de fármacos em zonas específicas, sendo a segurança e a adesão do paciente simultaneamente melhoradas [6]. Tipicamente, as dimensões das microagulhas variam entre 150 a 1500 micrómetros de comprimento, 50-250 micrómetros de largura da base, e 1 a 25 micrómetros de diâmetro da ponta. As pontas podem apresentar diferentes formas como triangular, arredondadas ou em forma de seta [5].

As microagulhas são dispositivos promissores em várias áreas da biomedicina, apresentando um enorme potencial para libertação transdérmica de fármacos [7]. Além de possibilitarem a libertação de fármacos sem provocar dor ao paciente, estes dispositivos apresentam inúmeras outras vantagens relativamente às agulhas convencionais entre as quais: (i) possibilidade de serem usados por pacientes não-qualificados, isto é, autoadministração; (ii) possuindo dimensões reduzidas, podem ser produzidas milhares de agulhas usando pequenas quantidades de material, o que leva a uma boa produtividade a um custo de fabrico moderado; (iii) permitem uma dosagem precisa, padrões de libertações complexas; (iv) libertação local e estabilidade do fármaco, rápida cicatrização no local da injeção e redução de contaminação por picada de agulha, entre outras [3, 5].

As microagulhas podem ser classificadas em três tipos diferentes: (i) as microagulhas sólidas, onde se incluem as microagulhas sólidas revestidas com fármaco e microagulhas absorvíveis, (ii) as microagulhas perfuradas e (iii) as microagulhas porosas [8, 9]. Estes diferentes tipos são utilizados de acordo com a aplicação e o fármaco a administrar. A conceção de uma microagulha segura e eficaz impõe grandes exigências sobre o material a utilizar. Vários tipos de materiais já são utilizados para o fabrico das microagulhas, tais como, metais [10], silícios [11], açúcares solúveis [12], polímeros biodegradáveis [13], vidros e cerâmicos [14]. As microagulhas metálicas e de silício, normalmente perfuradas, apresentam um alto custo de produção e estão limitadas ao tipo e quantidade de fármaco a libertar. As poliméricas surgem com inúmeras vantagens relativamente às metálicas, nomeadamente no que respeita ao processo de fabrico, (facilmente moldadas) mas possuem limitações a nível da resistência mecânica da ponta e armazenamento/compatibilidade do

fármaco [9]. Desta forma, a investigação na área das microagulhas tem tido um interesse crescente, quer pela comunidade científica quer industrial, de forma a obter estes componentes com as características desejadas na libertação de fármacos, a baixos custos de produção.

O uso de materiais cerâmicos na produção destes microdispositivos é relativamente recente [15]. Os estudos efetuados já demonstraram que alguns cerâmicos como alumina e zircónia, são materiais promissores para produzir microagulhas perfuradas para transferência de fármacos “em fase líquida”, podendo, de certa forma, colmatar as limitações dos outros materiais, uma vez que apresentam propriedades vantajosas tais como, elevada resistência mecânica necessária para perfurar a pele, biocompatibilidade (materiais não tóxicos), e possibilidade de reutilização, uma vez que podem ser submetidos a elevadas temperaturas para tratamentos de esterilização. Recentemente, foi publicado um estudo onde apresentam como novidade a libertação de fármacos através de microagulhas cerâmicas sólidas (não perfuradas) porosas, sendo a taxa de libertação controlada pela porosidade. Todos estes microcomponentes de base cerâmica são normalmente obtidos por enchimento de suspensões coloidais em moldes não porosos, necessitando após desmoldagem da etapa de sinterização para densificação do material, sendo que para a obtenção das microagulhas cerâmicas porosas são usadas temperaturas de sinterização inferiores. A sinterização traz algumas desvantagens para os materiais cerâmicos, tornando-os menos competitivos quando comparados com os materiais poliméricos por exemplo, tais como o incremento do custo de fabrico, bem como a limitação na introdução do fármaco na fase de mistura dos componentes em suspensão, uma vez que este não pode ser sujeito a elevadas temperaturas.

Desta forma, neste trabalho, pretende-se dar algum contributo no sentido de colmatar estas dificuldades, estudando a possibilidade de produzir microagulhas à base de cimentos de fosfatos de cálcio, evitando assim a etapa de sinterização e portanto, abrindo possibilidades para adicionar os fármacos na fase de preparação da pasta cimentícia.

1.2. Estrutura da dissertação

A presente dissertação encontra-se estruturada em cinco Capítulos, sendo que, no Capítulo 1 é feito o enquadramento temático e descrita a estrutura do documento. No Capítulo 2 é apresentada toda a revisão bibliográfica necessária à fundamentação deste trabalho e apresentados os objetivos propostos. No Capítulo 3 apresenta-se, de forma desenvolvida, todo o trabalho prático efetuado. No Capítulo 4 são apresentados os resultados experimentais obtidos, bem como a sua análise e discussão. Por fim, no quinto e último Capítulo (Capítulo 5), tecem-se as conclusões retiradas do trabalho realizado e algumas sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2. Revisão bibliográfica

2.1. Administração de fármaco

O processo de libertação de um fármaco é um passo determinante no efeito terapêutico do mesmo. Para um efeito terapêutico ótimo, a quantidade certa deve chegar ao lugar certo e no tempo certo. Desta forma, nos últimos anos têm sido desenvolvidos sistemas avançados para libertação específica de fármacos, com intuito de melhorar a segurança, eficácia, conveniência e a adesão do paciente. Dispositivos que permitem uma distribuição local do fármaco poderão permitir a redução dos efeitos colaterais, melhorar a eficácia dos medicamentos existentes e abrir portas para novos sistemas de tratamentos [16].

Os fármacos são convencionalmente libertos no organismo, por via oral, pulmonar, transdérmica e através de injeções, e cada um destes métodos apresentam vantagens e limitações [17].

A administração de fármacos via oral é a mais utilizada por apresentar uma maior facilidade de adesão dos pacientes por não causar dor. Por outro lado, a libertação transdérmica de fármacos (*Transdermal drug delivery, TDD*), envolve o transporte de fármacos através das camadas da pele de modo a este atingir a circulação sistémica [3]. As principais vantagens deste método, contrariamente à administração via oral, são a possibilidade de evitar a degradação do fármaco no trato gastrointestinal prevenindo assim a sua degradação pelas enzimas do fígado e do intestino [18]. Desde a aprovação do sistema de libertação transdérmica de fármacos (*Transdermal drug delivery system, TDDS*), a administração transdérmica tem provado ser uma via de elevada eficácia [19].

No entanto, atualmente existem poucos sistemas transdérmicos disponíveis no mercado. Isto porque, as moléculas têm de passar através da barreira do estrato córneo por difusão passiva através da via de lípidos intercelulares entre os corneócitos antes de entrar no corpo. Contudo, esta via apenas permite a passagem de fármacos com características tais como baixo peso molecular (<500Da), elevada lipofilicidade (solúvel em óleo), e dosagens pequenas (dose diária ≤ 20 mg) [19].

As agulhas hipodérmicas são os meios mais utilizados na libertação transdérmica de fármacos. A utilização de agulhas hipodérmicas é uma forma eficiente, rápida e de baixo custo para a libertação de medicamentos [20]. Apesar da sua eficácia este método de administração apresenta alguns inconvenientes importantes: (1) estas agulhas estão

associadas a certas dores dificultando a aceitação deste método por parte dos pacientes; (2) o uso de objetos cortantes levanta grande preocupação sobre a segurança tanto para os pacientes como para os prestadores de cuidados de saúde, especialmente nos países em desenvolvimento onde injeções inseguras representam uma significativa taxa de transmissão do vírus da hepatite B e C e da imunodeficiência humana (HIV) e (3) relacionada com a segurança na administração, este método apenas pode ser utilizado por profissionais de saúde ou pacientes treinados para auto administração. Todos estes fatores impõem uma barreira na administração de fármacos [21].

2.2. Microagulhas como via de libertação transdérmica de fármacos

O desenvolvimento de microagulhas constitui dos avanços mais notórios nos sistemas de absorção cutânea de fármacos (ou TDDS). Consistem em dispositivos minimamente invasivos de tamanhos micrométricos, utilizados para administração de fármacos pela via transdérmica, de forma a atingir a circulação sistémica. Tipicamente, as dimensões das microagulhas variam entre 150 a 1500 micrómetros de comprimento, 50-250 micrómetros de largura da base, e 1 a 25 micrómetros de diâmetro da ponta. As pontas podem apresentar diferentes formas como triangular, arredondadas ou em forma de seta [3], [5]. Devido a estas dimensões, quando aplicadas à superfície da pele, atravessam o estrato córneo e penetram a camada epidérmica não atingindo a derme, de forma a não estimular os nervos localizados nesta camada da pele evitando assim a geração da sensação de dor [7].

O conceito de microagulhas foi proposto pela primeira vez na década de 1970, mas não foi realizado experimentalmente até à década de 1990, fase em que a indústria microeletrónica forneceu as ferramentas necessárias para a microfabricação [7]. Desde então, estas microagulhas têm sido utilizadas em várias aplicações como: aumento de permeabilidade da membrana [22], [23]; bioterapêutica (libertação de péptidos, proteínas, ADN) [24]–[26], elétrodos para medição de potências nos tecidos [27], entre outras. Porém, atualmente, a libertação transdérmica de fármacos (TDD) é a aplicação mais ampla destes dispositivos [28]. A diminuição das dimensões como forma de diminuir a severidade da dor durante o tratamento, bem como o melhoramento da eficácia da administração de fármacos e a segurança e a aceitação pelo paciente, justificam o uso e a produção de microagulhas[6].

Além destas, as microagulhas apresentam outras vantagens relativamente às agulhas convencionais: (1) pode ser útil para programas de imunização em massa; (2) facilidade de uso para pacientes não-qualificados e/ou autoadministração; (3) por serem de pequenas dimensões milhares de agulhas podem ser produzidas com pouco material, o que leva a uma boa produtividade e um custo de fabricação moderada; (4) permitem uma dosagem precisa, padrões de libertações complexas, libertação local e estabilidade do fármaco; (5) melhor controlo da estabilidade biológica do fármaco devido ao armazenamento em volume micro; (6) cicatrização dos orifícios feitos nas camadas superficiais da pele mais rápida do que quando utilizadas agulhas hipodérmicas; (7) redução de contaminação por picada de agulha; (8) possibilidade de administração de moléculas de alto peso molecular. [3, 5]. A Figura 1 ilustra as quatro camadas da pele, sendo o estrato córneo a principal barreira para a difusão de medicamentos.

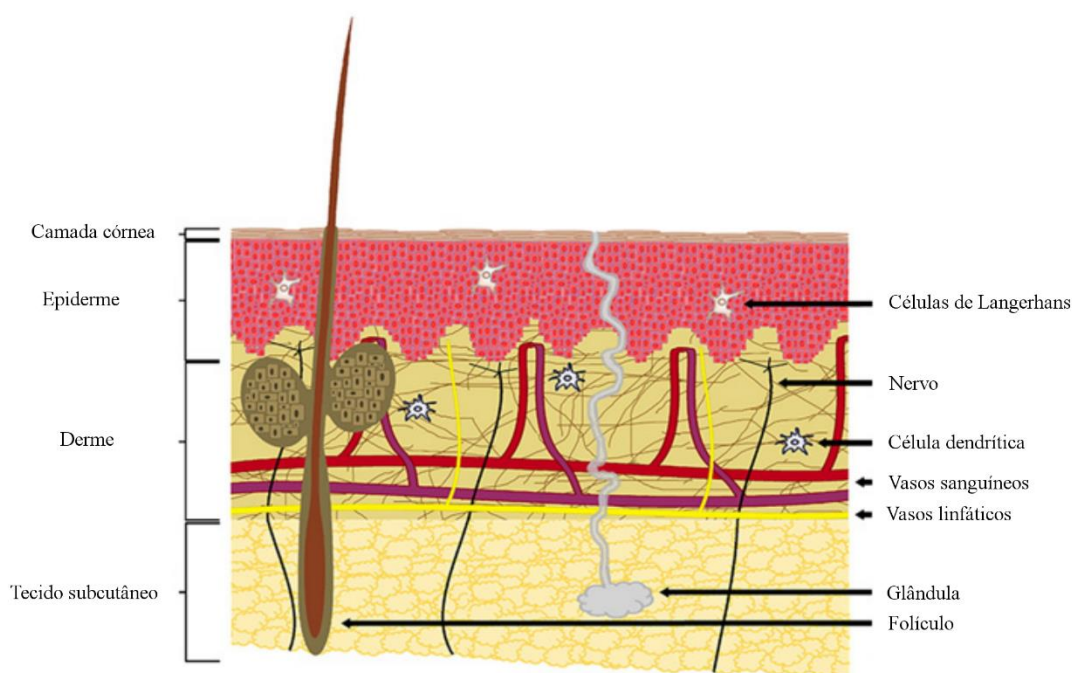


Figura 1: Anatomia da pele. (Adaptado de [29]).

Desde a sua descoberta, as microagulhas continuam a receber elevada atenção dos investigadores, devido ao potencial apresentado em aplicações terapêuticas e de diagnóstico. A tecnologia usada na produção de MEMS (*Micro Electromechanical Systems*) é a mais

promissora para produzir melhores modelos de microagulhas para aplicações específicas [30]. De entre os processos mais utilizados para a produção destes microcomponentes, destacam-se: a fotolitografia [31], a micromoldagem [32], o uso de laser [10] entre outras [33]. O uso destas técnicas é dependente do material e da geometria da microagulha. Geralmente, envolvem inúmeros processos químicos e físicos complexos, de modo que o tempo e o custo de produção tornam-se elevados.

Os processos de fabrico e de reprodutibilidade das microagulhas poliméricas, tais como fotolitografia e micromoldagem, são considerados os mais eficazes em termos de custos, quando comparados a outros processos de fabrico baseados na indústria microeletrónica. O processo de micromoldagem envolve o enchimento de um micromolde não poroso com o material injetável que após solidificação forma a microagulha. Este processo tem como vantagens, o baixo custo, a simplicidade do processo, bem como a alta precisão estrutural. Porém, as altas temperaturas envolvidas nas reações de polimerização poderão limitar a capacidade de incorporação de fármacos no interior deste tipo de microagulhas [19].

As agulhas cerâmicas surgiram recentemente, e podem ser uma alternativa aos outros tipos de microagulhas já existentes. S. Bystrova e R. Lutge demonstraram que microagulhas perfuradas à base de alumina podem ser produzidas com eficácia pelo processo de micromoldagem utilizadas na transferência de fármacos de base líquida [20]. Recentemente, surgiu a possibilidade de obtenção de microagulhas sólidas à base de cimentos de fosfatos de cálcio que permitem a incorporação de fármacos na fase de preparação da pasta cimentícia. Sendo também microagulhas de base cerâmica, estas possuem a vantagem de eliminação da etapa de sinterização tornando-o num processo bastante atrativo, de baixo custo [12].

2.2.1. Tipos de microagulhas

Atualmente, as microagulhas para a libertação transdérmica de fármacos podem ser classificadas em três tipos diferentes (Figura 2): perfuradas (A) sólidas (B), e porosas (C). As microagulhas sólidas podem ainda ser subdivididas em livres de fármaco (B1), revestidas (B2) e absorvíveis (B3), de acordo com a aplicação e o método de libertação de fármaco desejado [8, 9].

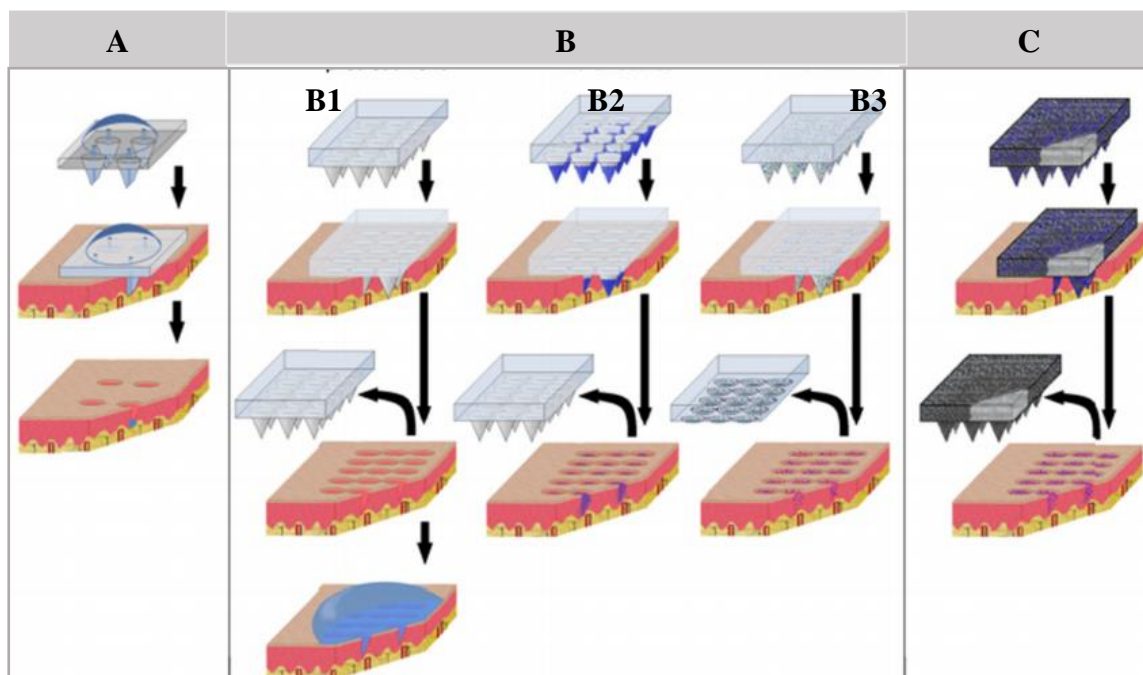


Figura 2: Tipos de microagulhas e métodos de liberação de fármacos. A- microagulhas perfuradas; B- microagulhas sólidas; B1- microagulhas sólidas para criar microporos; B2- microagulhas sólidas revestidas; B3- microagulhas sólidas absorvíveis; C- microagulhas porosas; Adaptado de [9].

As microagulhas perfuradas (Figura 2 (A)) são como as agulhas hipodérmicas tradicionais, mas mais curtas em comprimento. Estas permitem injetar uma formulação de fármaco líquida, de forma contínua, através de furos na pele. A liberação do fármaco é feita diretamente na epiderme sem atingir a derme. Estas microagulhas são especialmente úteis para administração de compostos de elevado peso molecular, tais como proteínas, oligonucleótidos e vacinas. Desta forma, as microagulhas perfuradas têm vindo a ser objeto de estudo, pois é desejável que as suas resistências mecânicas sejam suficientemente elevadas para perfurar a pele e, por outro lado, que os furos não sejam obstruídos durante a administração do fármaco, propriedades que necessitam de ser melhoradas [36].

As microagulhas sólidas livres de fármaco (Figura 2 (B1)) são utilizadas apenas para criar poros no estrato córneo aumentando a permeabilidade da pele para a posterior aplicação do fármaco à superfície, sendo em seguida removidas. Os poros criados são à escala micrométrica e permitem depois a fácil introdução do fármaco por contacto direto com a pele (creme, adesivos) [37]. As microagulhas sólidas revestidas (Figura 2 (B2)), tal como o nome indica, são revestidas à superfície com o fármaco e posteriormente introduzidas na

pele. Após adsorção completa do fármaco pelo organismo a microagulha é removida [2], [7].

Contrariamente às microagulhas revestidas, as microagulhas absorvíveis ou solúveis (Figura 2 (B3)) têm sido desenvolvidas para se dissolverem completamente nas camadas da pele. Estas microagulhas são impregnadas com uma formulação contendo o fármaco e após a inserção na pele o fármaco é libertado e a microagulha é absorvida pelo organismo. Estas são normalmente feitas de materiais inertes, solúveis em água e não tóxicos, tais como polímeros[11] e açúcares [12] que se dissolvem na pele após a inserção. A principal vantagem destas microagulhas é o facto de permitirem apenas um passo na aplicação do fármaco o que é conveniente para os pacientes [6, 38].

As microagulhas porosas (Figura 2 (C)) são uma abordagem muito recente de microagulhas e pouco se sabe sobre a libertação de fármacos através destas microagulhas [9]. Porém, várias patentes descrevem o uso destas microagulhas para libertação de fármacos em forma de pó e/ou fluidos biológicos, através de matrizes porosas [39]. A libertação é feita de forma semelhante às microagulhas sólidas, em que o fármaco é libertado através do processo de difusão, permanecendo inseridas na pele durante o processo de libertação do fármaco [9, 16, 17].

2.3. Cimentos como substitutos ósseos

Os cimentos ósseos são biomateriais sintéticos que se formam a partir de uma combinação de um componente em pó e um componente líquido. A mistura dos dois componentes dá origem a uma pasta viscosa, que poderá ser potencialmente injetável, e que tende a endurecer ao longo do tempo. As propriedades finais dos cimentos dependem das características das fases sólidas e líquidas, da relação líquido/pó, e das condições da reação. Estes biomateriais têm sido muito utilizados em aplicações médicas, tal como na ortopedia e na dentária, devido às suas inúmeras vantagens, entre as quais, a biocompatibilidade [40].

As aplicações mais comuns dos cimentos ósseos na área da ortopedia são na fixação de próteses. Estes preenchem o espaço livre entre a prótese e o osso, fixando a prótese. Além de cimentarem próteses, também podem preencher cavidades e pequenos defeitos ósseos, sendo nesses casos usado como material de enxerto ósseo, em que se pretende que o cimento seja reabsorvido pelo organismo e substituído por novo tecido ósseo [40, 41].

Os cimentos ósseos podem ser à base de fosfato de cálcio (CPCs), de polimetilmetacrilato (PMMA) comumente designados de cimentos acrílicos, ou de sulfatos de cálcio (CSCs) [42]. Estes vários tipos de cimentos serão descritos posteriormente, com maior ênfase para os cimentos à base de fosfatos de cálcio, uma vez que são o foco deste estudo.

2.3.1. Cimentos acrílicos

Os cimentos à base de PMMA são dos cimentos mais utilizados para a fixação de próteses, devido às suas excelentes propriedades mecânicas e biocompatibilidade [43, 44]. Estes cimentos consistem num pó (PMMA) e num monómero líquido (metacrilato de metilo, MMA). Comparativamente com os seus homólogos cerâmicos, os cimentos à base de PMMA, possuem maior resistência mecânica [44]. Apesar das suas inúmeras vantagens, os cimentos acrílicos possuem alguns inconvenientes, nomeadamente o facto de as reações de polimerização serem exotérmicas, podendo levar à necrose térmica devido às altas temperaturas criadas durante a polimerização do cimento. A elevada resistência mecânica face à do osso que poderá provocar tensões induzidas no osso, a contração volúmica do cimento durante a polimerização, a possibilidade de provocar respostas inflamatórias ao interagir com os tecidos envolventes, são algumas das desvantagens destes cimentos. Contudo, a probabilidade de durabilidade de uma prótese cimentada à base de PMMA,

especialmente a prótese do joelho e anca de pacientes com idades superiores a 50 anos, é em média de 90% durante 15 anos [44].

2.3.2. Cimentos de sulfato de cálcio (CSC)

O sulfato de cálcio tem sido utilizado em medicina desde há muitos anos como material único para a fixação externa de fraturas ósseas em humanos.

Atualmente, o sulfato de cálcio (CS) ocupa uma posição única no grupo de materiais regenerativos. Este material existe naturalmente na forma de sulfato de cálcio di-hidratado (CSD) mas por ação térmica, pode ser produzida na forma hemi-hidratada (CSH). O sulfato de cálcio é fácil de misturar e origina uma pasta injetável que, quando aplicada, endurece *in situ*. Estes tipos de cimentos, além de preenchimento de osso, têm sido utilizados para libertação controlada de fármacos [45]. Contudo, apresentam uma rápida taxa de dissolução que pode ser problemática quando utilizado como substituto ósseo. Se a sua taxa de degradação for superior à taxa de crescimento do osso, no final do processo de dissolução do implante a cavidade óssea poderá não estar preenchida na totalidade por novo osso [46].

2.3.3. Cimentos de fosfatos de cálcio (CPC)

O primeiro CPC (*CPC, calcium phosphate cement*) comercial foi desenvolvido pelo Brow e Crow, em 1980 [47]. Desde então, estes cimentos ósseos têm atraído muita atenção e abriram uma nova era nas aplicações médicas, pois oferecem inúmeras e atraentes vantagens [48].

Os cimentos à base de fosfatos de cálcio (CPCs) são cimentos reabsorvíveis, osteocondutores, biocompatíveis, possuem uma composição química muito semelhante à do osso, têm capacidade de efetuarem ligações químicas com tecidos duros, apresentam uma excelente moldabilidade e um rápido tempo de presa [49]. Estes tipos de cimentos resultam a partir de uma combinação de um componente sólido que contém um ou vários sais de fosfato de cálcio e uma solução aquosa para formar uma pasta que reage à temperatura ambiente ou corporal, dando origem a um precipitado que contém um ou mais fosfatos de cálcio. Os cimentos de fosfato de cálcio dividem-se quanto ao seu produto final em duas categorias: apatite e brushite. A grande diferença entre a formação de apatite e brushite é o pH a que ocorre a reação: a $\text{pH} > 4,2$ origina-se apatite (HA , $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) e com $\text{pH} \leq 4,2$

forma-se brushite (DCPD, $\text{Ca}(\text{HPO}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$). A DCPD é mais solúvel que a HA sob condições fisiológicas sendo mais facilmente reabsorvível após implantação [50].

A utilização dos CPCs como substitutos ósseos tem vindo a aumentar, uma vez que, além de outras propriedades, possuem uma elevada similaridade com a parte inorgânica da maioria dos tecidos calcificados (osso e dentes). Além disso, os CPCs apresentam uma baixa taxa de calor libertado durante a reação de presa, quando comparada com os cimentos ósseos acrílicos, prevenindo o risco de necrose óssea [46, 47].

2.3.3.1. Fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio (CaPs) são encontrados abundantemente na crosta terrestre, podendo ser facilmente sintetizados e usados para produzir os CPCs. Os ortofosfatos de cálcio (que contêm o grupo PO_4^{3-}), comumente denominados por fosfatos de cálcio são os mais usados nas composições de cimentos de fosfatos de cálcio. Os fosfatos de cálcio podem ser distinguidos em dois grandes grupos: (i) fosfatos de cálcio obtidos por precipitação a partir de uma solução aquosa (ou a baixa temperatura) e (ii) fosfatos de cálcio obtidos por uma reação térmica (ou a altas temperaturas) [51]. A Tabela 1 apresenta os fosfatos de cálcio mais comumente usados na produção de CPCs.

A solubilidade em água dos fosfatos de cálcio é, provavelmente, a sua propriedade mais importante, uma vez que o comportamento *in vivo* destes materiais pode ser previsto em grande parte através desta característica. Assim, a taxa de degradação *in vivo* dos fosfatos de cálcio a $\text{pH}=7$ apresenta-se da seguinte ordem [52]:

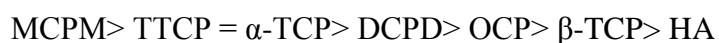


Tabela 1: Fosfatos de cálcio usados nas composições dos CPCs [51, 52]. Os primeiros 6 são os fosfatos de cálcio obtidos por precipitação a partir de uma solução aquosa a baixa temperatura e os restantes 5 são obtidos por uma reação térmica a altas temperaturas.

Rácio molar Ca/P	Fosfatos de cálcio	Formula química
0,5	Fosfato monocálcico monoidratado (MCPM)	Ca (H ₂ PO ₄) ₂ H ₂ O
1	Fosfato de dicálcio diidratado (DCPD)	Ca (HPO ₄) ₂ H ₂ O
1	Fosfato de dicálcio anidro (DCPA)	Ca (HPO ₄)
1,33	Fosfato de octacálcio (OCP)	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ 5H ₂ O
1,2-22	Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	Ca _x H _y (PO ₄) ₂ nH ₂ O n=3-4.5
1,5-,67	Hidroxiapatite deficiente em cálcio (CDHA)	Ca ₉ (HPO ₄)(PO ₄) ₅ (OH)
0,5	Fosfato monocálcico anidro (MCPA)	Ca (H ₂ PO ₄) ₂
1,5	Fosfato Tricálcio α (α-TCP)	α- Ca ₃ (PO ₄) ₂
1,5	Fosfato Tricálcio β (β -TCP)	β- Ca ₃ (PO ₄) ₂
1,67	Hidroxiapatite (HA)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
2	Fosfato de Tetracálcio (TTCP)	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O

Desta grande variedade de CaPs utilizados na produção de cimentos para aplicações biomédicas, apenas são descritos seguidamente, os envolvidos neste estudo:

O fosfato monocálcico monoidratado (MCPM, Ca (H₂PO₄)₂ H₂O) é o fosfato de cálcio mais ácido e o mais solúvel para quase todos os valores de pH [52]. O MCPM pode ser obtido pelo método de precipitação a partir de soluções altamente ácidas à temperatura ambiente e apresenta uma morfologia cristalina que assemelha-se a placas finas [53]. A temperaturas superiores a 100°C o MCPM liberta uma molécula de água e transforma-se em MCPA. Devido à sua acidez e solubilidade, não é biocompatível pelo que não pode ser utilizado por si só como substituto ósseo. No entanto, pode ser utilizado em combinação com compostos básicos de fosfato de cálcio para a produção de vários cimentos de ortofosfatos de cálcio [52, 53].

O Fosfato dicálcico diidratado (DCPD, $\text{Ca}(\text{HPO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) também conhecido como o mineral Brushite, é o CaP mais facilmente sintetizado. Pode ser facilmente cristalizado à temperatura ambiente e a partir de soluções aquosas a $\sim 2,0 < \text{pH} < \sim 6,5$. Porém é metastável e pode ser convertido em DCPA a temperaturas superiores a 80°C . Esta transformação é acompanhada de uma diminuição de volume [54] e de alterações estruturais [55]. O DCPD apresenta cristais de estrutura monoclinica e consistem em cadeias paralelas entre si sob forma de agulhas. O DCPD é de grande importância biológica, pois muitas vezes é encontrado em calos ósseos e calcificações patológicas (cálculos dentários, cálculos renais) e em algumas lesões cariosas [56]. Curiosamente, a DCPD tem a mesma composição e estrutura cristalográfica que o sulfato de cálcio diidratado (CDS), no entanto o DCPD é cerca de 10 vezes menos solúvel que o CDS a pH neutro [57]. Este composto tem sido muito utilizado como substituto ósseo por ser biocompatível, biodegradável e osteocondutor, e *in vivo* pode ser facilmente convertido em HA [52, 56]. Em relação ao DCPA, também conhecido com o mineral monetite, é importante salientar que este composto resulta normalmente da recristalização do DCPD, no entanto pode ser cristalizado a partir de soluções aquosas mas a temperaturas de aproximadamente 100°C [57]. O DCPA é menos solúvel do que o DCPD devido a ausência da molécula de água, sendo também ligeiramente mais estável que o DCPD a valores de pH na gama de 2 e 7. No entanto, a taxa de crescimento de cristais de DCPD é muito superior à do DCPA, fazendo com que as misturas de cimento definidas formem principalmente brushite na presença de uma fase aquosa [56, 58]. O DCPA também é biocompatível e biodegradável e apresenta uma estrutura cristalina triclinica.

O β -Fosfato Tricálcio (β -TCP, β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) pode ser obtido por tratamento térmico a temperaturas acima de pelo menos 650°C [59]. Este fosfato de cálcio apresenta uma estrutura cristalina romboédrica, é estável desde a temperatura ambiente até 1125°C , sendo que a partir desta temperatura transforma-se na fase α -TCP. O β -TCP é menos solúvel em água do que o α -TCP, sendo este amplamente utilizado como substituto ósseo, quer como grânulos ou como blocos. O β -TCP não deve ser confundido com fosfato tricálcico na forma alfa que tem quase a mesma composição química, mas uma estrutura cristalográfica diferente. O β -TCP é um dos componentes do CPC de brushite [52].

2.3.3.2. Tipos de cimentos de fosfatos de cálcio

Os CPCs geralmente são classificados quanto ao seu produto final em cimentos apatíticos e brushíticos, como mencionado anteriormente. Sendo apenas os cimentos de brushite o foco deste estudo, a seguir são apresentadas algumas das suas principais propriedades.

Cimentos Brushíticos

Os cimentos de brushite conforme o nome indica, apresentam o DCPD como o produto principal no final da reação de solidificação. Estes tipos de cimentos foram introduzidos por Mirtchi e Lemaitre em 1987 [59, 60], em que o DCPD resulta da reação entre o β -TCP + MCPM, formulação utilizada neste estudo, conforme apresentado na equação (1):



Várias formulações destes tipos de cimentos têm sido propostas tais como β -TCP + H_3PO_4 [59, 61] e TTCP + MCPM + CaO [62]. De acordo com o Bohner et al. [61] β -TCP + H_3PO_4 apresenta algumas vantagens em relação à formulação de β -TCP + MCPM, tais como: (i) preparação rápida e fácil, (ii) melhor controle da composição química e da reatividade, e (iii) melhoria a nível das propriedades físico-químicas tais como tempos de presa e maiores resistências à tração devido a uma maior homogeneidade. Contudo, o uso do H_3PO_4 (ácido ortofosfórico) pode levar a uma diminuição da biocompatibilidade do cimento, devido aos valores baixos de pH durante a presa [61, 63].

Todos os CPCs de brushite são obtidos por uma reação ácido-base, ou seja, a pasta cimentícia de um cimento brushítico durante a reação de presa é ácida, uma vez que a brushite só precipita a valores de pH inferior a 6 [61, 64]. Por exemplo, o valor do pH dos cimentos de brushite da formulação de β -TCP + MCPM varia de ácido, pH ~ 2.5, para quase neutro, pH ~ 6 [62]. Os cimentos de brushite são biocompatíveis e bioreabsorvíveis. Quando comparados com os cimentos de apatite, são mais rapidamente degradáveis, em condições fisiológicas, devido a uma melhor solubilidade [65]. Porém, a alta taxa de crescimento de cristais levando a um tempo de presa muito curto, e a alta taxa de dissolução levando a baixas resistências mecânicas, impedem este tipo de cimentos de uma aplicação clínica mais ampla

[66]. Desta forma, aditivos como o ácido cítrico [67], o ácido glicólico [68] e o sulfato de condroitina [69], que inibem o crescimento dos cristais de DCPD têm sido implementados com sucesso para aumentar o tempo de presa dos cimentos de brushite. Além disso, podem-se usar reagentes menos solúveis (por exemplo, a HA em vez do β -TCP) a fim de controlar a reação de presa inicial destes cimentos. Apesar da elevada reatividade inicial, a reação de endurecimento dos cimentos (formação completa dos cristais) de brushite tem duração de um dia [70]. Isto, provavelmente, deve-se ao facto de, no final da reação de presa, haver um aumento do pH da pasta, o que provoca uma diminuição da solubilidade dos reagentes. O tempo de presa deste tipo de cimentos depende grandemente da solubilidade da fase básica, isto é, quanto maior a solubilidade da fase básica, mais rápido é o tempo de presa. Desta forma, o tempo de presa de um cimento feito com o MCPM e um fosfato de cálcio básico aumenta na seguinte ordem: HA > β -TCP > α -TCP (HA+ MCPM- tempo de presa de alguns minutos, β -TCP + MCPM- tempo de presa de 30 a 60s, α -TCP+MCPM – tempo de presa de poucos segundos)[59].

2.3.3.3. Propriedades dos CPCs

As propriedades dos cimentos de fosfatos de cálcio dependem de vários fatores e podem ser adaptadas de acordo com a aplicação pretendida através de vários parâmetros, que estão resumidos na Tabela 2 [70].

As propriedades do cimento final pretendido variam com a composição da fase sólida, nomeadamente composição química, proporção relativa dos constituintes, aditivos e distribuição dos tamanhos de partícula. Como a reação de obtenção de cimentos ocorre através do processo dissolução-precipitação, quanto mais fino for o pó menor é o tempo de presa, uma vez que partículas mais pequenas dissolvem-se mais rapidamente do que partículas maiores e a precipitação de uma nova fase começa mais cedo. Por outro lado, são utilizados aditivos de forma a alterar parâmetros, tais como, tempos de manipulação, de presa, propriedades reológicas das pastas.

Tabela 2: Parâmetros que afetam as propriedades dos CPCs.

Fase sólida	Composição química Proporção relativa dos constituintes Aditivos (aceleradores, retardadores) A distribuição de tamanho de partícula do pó
Fase líquida	Aditivos (aceleradores, retardadores, parâmetros de coesão) pH
Parâmetros de mistura	Razão líquido/pó Modo de mistura (tempo, rotação)
Fatores ambientais	Temperatura Humidade pH

A razão líquido/pó utilizada para a produção de um CPC, além de afetar a sua injetabilidade e a moldabilidade, tem um grande impacto nas propriedades mecânicas finais dos CPCs, uma vez que a porosidade formada está diretamente relacionada com a razão líquido/pó utilizada. Assim quanto maior a razão líquido/pó utilizada maior será a porosidade do CPC e menor a resistência mecânica.

Seguidamente encontram-se descritas algumas das propriedades mais relevantes dos CPCs:

Reação de presa e endurecimento

A reação de presa de um cimento consiste em três fases: (i) dissolução dos reagentes, (ii) nucleação da nova fase (brushite ou apatite) e (iii) crescimento de cristais. Isto é, a presa de um cimento ocorre através de um processo de dissolução-precipitação [71]. Durante a dissolução, os pós libertam iões de cálcio e fosfatos, gerando assim uma supersaturação na solução. A concentração iónica atinge um valor crítico, ocorrendo assim a nucleação e a formação de uma nova fase (formação de núcleos). Esta nova fase continua a crescer à medida que a dissolução dos reagentes prossegue, formando assim cristais cada vez maiores

que começam a interagir entre si, formando assim um material sólido [72]. A este momento de solidificação dá-se o nome de presa do cimento, que é caracterizada por um tempo de presa inicial (*IST, inicial setting time*) e um tempo de presa final (*FST, final setting time*). As reações químicas e o crescimento dos cristais prosseguem até ao completo endurecimento dos cimentos, resultando assim num material com propriedades mecânicas superiores. Dependendo da química do cimento, do tamanho de partícula do pó de partida e das condições da reação, o processo de endurecimento pode ser muito longo ou muito curto [70]. O controlo da cinética de reação dos cimentos é um passo fundamental para a aplicação desejada. Para o estudo em causa, nomeadamente o fabrico de microagulhas, o tempo de presa do cimento deve ser longo o suficiente de modo a permitir a moldagem e a trabalhabilidade da pasta e curto o suficiente para diminuir o custo do processo (desmoldagem mais rápida dos componentes).

Atualmente existem dois métodos padronizados para a medição do tempo de presa dos cimentos, o método de agulha de Vicat (*ASTM C191-92*) [73] e de duas agulhas de Gilmore (*ASTM C266-89*) [74]. Ambos os métodos baseiam-se essencialmente na determinação da capacidade da pasta cimentícia para resistir a uma carga mecânica aplicada à sua superfície. Enquanto no método de agulha de Vicat uma única agulha é aplicada na superfície do cimento, no método de Gilmore são utilizadas duas agulhas com pesos e diâmetros diferentes. A agulha mais leve e com maior diâmetro permite medir o IST, enquanto a agulha mais pesada e de menor diâmetro mede o FST dos cimentos. Neste trabalho usou-se o método de agulha de Gilmore, sendo o processo de medição descrito no Capítulo 3, secção 3.2.3.2.

Propriedades Mecânicas

Na maioria das aplicações clínicas os fosfatos de cálcio são usados como substitutos ósseos, sendo a resistência mecânica à compressão uma das propriedades a ter em conta. Esta deve ser pelo menos tão elevada quanto a dos ossos trabeculares, que é aproximadamente 10 MPa [75]. A resistência à compressão é a propriedade mecânica mais estudada neste tipo de cimentos, sendo definida como a tensão máxima (σ_{\max}) que um material, com uma determinada área de secção transversal (A_0), pode suportar antes de fraturar. Esta medição é normalmente feita utilizando uma máquina de ensaio universal, medindo a força máxima

(F_{max}) que pode ser aplicada ao material. Para tal, geralmente, são utilizados provetes de geometria cilíndrica com uma proporção de 1:2 entre o seu diâmetro (6mm) e altura (12 mm), e são colocados na posição vertical de acordo com a norma ASTM F 451-0891 para cimentos ósseos acrílicos [76]. Nesta norma, a resistência à compressão é calculada de acordo com a Equação 2.

$$\sigma_{max} = \frac{F_{max}}{A_0} \quad (2)$$

Uma vasta gama de valores de resistência à compressão em cimentos pode ser encontrada na literatura, dependendo da composição e dos parâmetros do processamento, e é muito difícil fazer comparações entre eles, uma vez que os valores medidos são muito dependentes das condições e modos de preparação das amostras (condições em que é feito o teste de compressão, temperatura de preparação dos CPCs, condições de humidade). No entanto, em geral, os cimentos de brushite são ligeiramente mais frágeis que os cimentos de apatite [63].

Porosidade

Quimicamente, a reação de presa de um CPC consiste na dissolução de um ou mais constituintes do pó de cimento e, em seguida, na precipitação de um fosfato de cálcio novo. Fisicamente, a reação ocorre pela interação dos cristais e o seu conseqüente entrelaçar resultando num material sólido. Os CPCs são normalmente materiais porosos devido a espaços livres existentes entre cristais precipitados. Desta forma, pode-se dizer que, os CPCs apresentam microestruturas intrinsecamente porosas [70]. A porosidade dos CPCs pode ser controlada através da razão líquido/pó e do tamanho das partículas dos pós de partida. Os valores da porosidade dos CPCs variam normalmente entre 30% e 50%, embora valores ainda mais elevados possam ser alcançados. Os poros geralmente são na escala nano ou micrométrica e o tamanho do pó de partida pode modificar o tamanho dos cristais precipitados e também a distribuição do tamanho dos poros [52, 70].

De entre os diversos métodos para determinar a porosidade dos CPCs, destacam-se: o picnómetro de hélio [77] e a porosimetria de mercúrio [78].

2.3.4. Administração de fármacos através de cimentos ósseos

Infeções ósseas e nos tecidos moles são problemas sérios e relativamente frequentes em ortopedia e cirurgia reconstrutiva. Sendo muitas vezes de difícil tratamento, uma administração sistêmica de fármacos pode não ser eficaz resultando num aumento da infecção. Estudos existentes na literatura mostram que o uso de cimentos ósseos contendo fármacos na sua composição, como por exemplo antibiótico, para uma libertação local do mesmo na área onde foi feita a cirurgia, pode contribuir para a redução da infecção [79].

A administração de fármaco através de cimentos ósseos é um processo complexo, pois envolve variáveis importantes incluindo o tipo de medicamento, o tipo de cimento ósseo, e a condição em que se mistura. Para um resultado satisfatório neste tipo de aplicação, devem-se considerar dois aspetos essenciais: (i) o fármaco deve ser termoestável, solúvel em água, hipoalergénico, resistente à presença de necrose; (ii) o cimento, deve apresentar porosidade e resistência mecânica adequadas, facilidade de manuseamento entre outras propriedades [79].

A dosagem ideal do fármaco no cimento ósseo também é determinante na eficácia do tratamento e na segurança do paciente. Segundo Hanssen, o teor de antibiótico mais adequado para ser incorporado no cimento é de 3,6 wt% [80]. O mesmo autor considera uma incorporação de dose elevada de antibióticos no cimento ósseo quando são utilizadas quantidades superiores a 2 g de antibiótico por 40 g de cimento e uma incorporação de dose baixa quando são utilizadas quantidades inferiores a 2 g de antibiótico por 40 g de cimento. Este recomenda ainda o uso de doses mais elevadas para a utilização de cimentos em forma de grânulos e de doses mais baixas para fixação de próteses [80].

O desenvolvimento de microagulhas sólidas à base de cimentos de fosfatos de cálcio para a libertação de fármacos é uma área inovadora, tendo sido apenas encontrado na literatura um estudo recente que aborda este tema [15]. Bing Cai et al.[15], desenvolveram microagulhas à base de cimentos de fosfatos de cálcio e sulfatos de cálcio por micromoldagem com o objetivo de controlar a taxa de libertação de um fármaco. O fármaco utilizado foi o Zolpidem tartrate (Cambrex, EUA), usado para tratamento de insónia, e foi incorporado nas microagulhas na fase de preparação das pastas cimentícias. Os autores verificaram que as propriedades do fármaco incorporado não foram afetadas pela reação de presa e que é possível controlar a taxa de libertação do mesmo, alterando a área superficial, a porosidade e a reabsorção do material cerâmico. No entanto, sendo este estudo uma primeira abordagem ao tema, são apresentados e discutidos alguns resultados muito superficialmente, mostrando

a necessidade de efetuar estudos mais aprofundados e sistemáticos nesta área, nomeadamente, no esclarecimento da relação entre a libertação do fármaco com as propriedades das pastas e as propriedades do produto final (mecânicas, porosidade). Apesar disso, este estudo inicial mostrou que os cimentos de fosfatos de cálcio são um material com forte potencial para a produção de microagulhas para libertação controlada de fármacos, reforçando a ideia promissora do presente trabalho, abrindo portas para futuros desenvolvimentos inovadores nesta área [15].

Neste estudo foi utilizado como fármaco a levofloxacina, que consiste num agente antibacteriano da classe das fluoroquinolonas. Devido a seu largo espectro de ação, a levofloxacina é prescrita para uma vasta gama de infeções bacterianas, nomeadamente as infeções respiratórias, urinárias, gastrointestinal, e infeções abdominais [81, 82]. Além do amplo espectro de ação, este antibiótico apresenta vantagens como a excelente penetração nos tecidos e a possibilidade de ser administrado via oral ou intravenoso [81].

Com exceção às infeções mais difíceis de tratar (infeções hospitalares e infeções complicadas da pele), a dose diária utilizada é de 500 mg [82]. A fórmula química da levofloxacina é $C_{18}H_{20}F_1N_3O_4$, estando a sua estrutura representada na Figura 3.

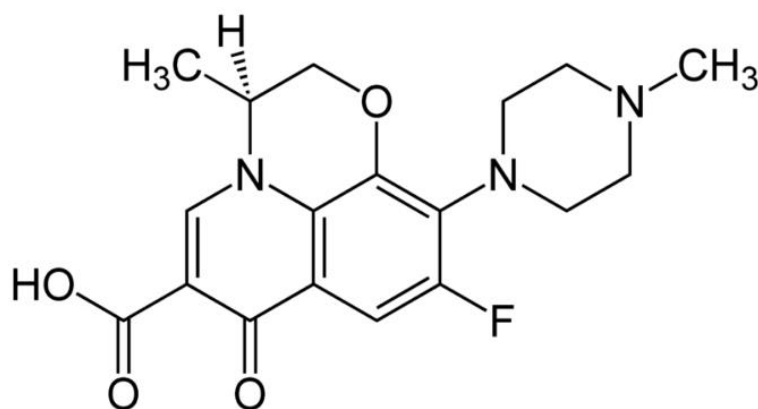


Figura 3: Estrutura química da levofloxacina [83].

2.4 Objetivo e Motivação da dissertação

Esta dissertação teve como principal objetivo o desenvolvimento de microagulhas sólidas a partir de cimentos à base de fosfatos de cálcio, incluindo um fármaco na sua composição. A motivação para este estudo baseou-se essencialmente na possibilidade de fabricar um microcomponente por um processo a custos mais reduzidos, num material com propriedades vantajosas na libertação de fármacos, quando comparados com os materiais e processos de fabrico atualmente existentes na produção de microagulhas.

Para atingir o objetivo final foi necessário estudar diferentes fases do processo de forma a obter um compromisso entre as seguintes características: (1) compatibilidade do fármaco com o líquido de presa, (2) uma pasta cimentícia suficientemente fluída durante o enchimento dos moldes para garantir o preenchimento de toda a cavidade do molde da microagulha, nomeadamente a ponta submicrométrica; (3) um cimento com uma resistência mecânica suficientemente elevada que permita a desmoldagem dos microcomponentes e a perfuração da pele sem se danificar e (4) porosidade adequada que permita a libertação do fármaco nos tempos desejados.

Para atingir estas características, a componente experimental deste trabalho centrou-se essencialmente no estudo de algumas variáveis, tais como: compatibilidade do fármaco com o líquido de presa, variação da razão líquido/pó, diferentes distribuições de tamanho de partículas, influência da viscosidade da pasta e tempos de presa do cimento (inicial e final), com intuito de: (i) variar a porosidade e estudar a sua influência na resistência mecânica dos componentes e na taxa de libertação do fármaco e (ii) obter uma pasta suficientemente fluída para encher moldes com formas pontiagudas na ordem dos 20-50 μm , simultaneamente com propriedades mecânicas adequadas para uma fácil desmoldagem.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Como descrito no capítulo anterior, o objetivo principal deste trabalho é desenvolver microagulhas sólidas a partir de cimentos ósseos à base de pós de fosfatos de cálcio. Deste modo, para o desenvolvimento dos cimentos, foram utilizados dois pós de β -fosfato tricálcico (β -TCP) sintetizados em laboratório e um pó de β -TCP comercial. Para a síntese dos dois pós de β -TCP foram utilizados como reagentes o nitrato de cálcio tetra hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_4\text{H}_2\text{O}$, Panreac, Espanha) e o hidrogenofosfato de diamónio ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Sigma-Aldrich, Alemanha). Para a preparação dos cimentos foi utilizado como precursor, além do β -TCP, o fosfato monocálcico monohidratado (MCPM, Sigma –Aldrich, Alemanha) e como agente retardador da reação de presa, o ácido cítrico (AC) incorporado no líquido de presa. O fármaco utilizado neste estudo foi o antibiótico Levofloxacina (LEVO, $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{F}_1\text{N}_3\text{O}_4$, Sigma-Aldrich, Alemanha). Nos ensaios de libertação utilizou-se “Phosphate Buffer Saline” (PBS, Sigma-Aldrich, Alemanha). Na Tabela 3 estão apresentados, em forma de síntese, as matérias-primas utilizadas neste trabalho.

Tabela 3: Matérias-primas utilizadas ao longo deste estudo

Matéria -prima	Fornecedor
Pó de β -fosfato tricálcico comercial [β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]	Sigma-Aldrich, Alemanha
Pós de β - Fosfato Tricálcico sintetizados [β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]	Lab. DeMAC
Fosfato monocálcico monohidratado[MCPM $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$]	Sigma-Aldrich, Alemanha
Nitrato de cálcio 4-hidratado [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_4\text{H}_2\text{O}$]	Panreac, Espanha
Hidrogenofosfato de diamónio [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$]	Sigma-Aldrich, Alemanha
Ácido Cítrico [AC, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$]	Sigma-Aldrich, Alemanha
Hidróxido de amónio [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$],	Sigma-Aldrich, Alemanha
Levofloxacina [LEVO, $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{F}_1\text{N}_3\text{O}_4$]	Sigma-Aldrich, Alemanha
Água desionizada	DeMAC
Solução salina tamponada com fosfato (PBS)	Sigma-Aldrich, Alemanha

3.2. Métodos

3.2.1. Síntese dos pós

A Tabela 4 apresenta a nomenclatura utilizada na identificação dos pós e as respectivas concentrações molares dos precursores utilizados. O PC corresponde ao pó comercial de β -TCP e os pós de β -TCP, P1 e P2, correspondem aos pós sintetizados em laboratório. A síntese dos pós P1 e P2 foi feita pelo método de precipitação química.

Tabela 4: Nomenclatura utilizada na identificação dos pós de acordo com a concentração do percussor utilizado para a síntese, bem como as razões molares utilizadas.

Nomenclatura do Pó	Razão molar Ca/P	Concentração molar dos precursores	
		Ca	P
P1	1,49	0,894	0,6
P2	1,51	0,906	0,6
PC	-	-	-

Para a produção dos pós P1 e P2 foram utilizados os precursores Ca (Cálcio) e P (Fósforo). As concentrações dos precursores foram calculadas partindo de duas razões molares: Ca/P=1,49 (para P1) e Ca/P=1,51 (para P2). De notar que a concentração do P foi mantida fixa num valor de 0.6 M como mostra a Tabela 4. De seguida, foram preparadas soluções aquosas para cada um dos precursores utilizando água desionizada. As soluções foram colocadas num reator sob agitação mecânica constante de 700 rpm durante 3 horas, à temperatura constante de 30°C. O valor do pH foi controlado durante as 3h com adições sucessivas de hidróxido de amónio e a gama de variação de pH durante o processo foi entre 7-8. Após as 3h, os precipitados formados foram filtrados sob vácuo e, posteriormente, secos numa estufa a 100°C durante 72h. Depois de secos, os sólidos formados foram moídos, e posteriormente calcinados a 1000°C, num forno Termolab, com uma taxa de aquecimento de 5°C/min e com 2 horas de patamar. Estas condições experimentais foram assim ajustadas de forma a obter pós de β -TCP com maior grau de pureza possível, isto é, de forma a evitar

a formação da fase pirofosfato de cálcio (CPP) [84, 85]. Os pós resultantes foram moídos e peneirados através de uma malha de tamanho 40 μm .

3.2.2. Caracterização dos pós

As técnicas utilizadas para a caracterização dos pós obtidos incluem: Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM), Espectrometria de difração laser para determinar a distribuição de tamanhos de partícula. De seguida são apresentados os procedimentos utilizados para cada uma das técnicas e as descrições das mesmas.

3.2.2.1. Análise por Difração de Raios-X (DRX)

A identificação e quantificação das fases cristalinas presentes nos pós P1, P2 e PC foram realizadas por Difração de Raios-X. Nesta técnica, são comparados os difratogramas com os padrões de difração de fases individuais disponibilizados pelo ICDD (International Centre for Diffraction Data). As amostras foram moídas e passadas por uma malha de 20 μm e de seguida levadas para a análise num difratómetro de alta resolução PANalytica Xpert -PRO equipado com um filtro de Níquel (Ni) e uma radiação Cu-K α ($\lambda=1,5406\text{\AA}$) produzido a 45kV e 40mA. O conjunto de dados foi registado no intervalo de 5-70° a cada 0,013° 2 θ /s.

3.2.2.2. Análise morfológica (SEM)

Para a análise morfológica e microestrutural dos pós obtidos foi utilizada a microscopia eletrónica de varrimento (SEM, Hitachi S-4100, Tokyo, Japan). Os pós foram suspensos numa solução aquosa e colocados em ultrassons cerca de 10 minutos. Retirou-se 1 gota destas suspensões que foram colocadas numa lamela fixa no porta amostras com cola de carbono e deixadas a secar durante 24h. Após a secagem, o porta amostras foi recoberto com carbono num depositador de carbono e de seguida levada para as observações no SEM.

3.2.2.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Para identificar os grupos funcionais presentes nos pós recorreu-se ao método de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) utilizando o equipamento FTIR Bruker Tensor 27. O FTIR é uma técnica rápida e económica, sendo das mais utilizadas para análise qualitativa de materiais e consiste numa espectroscopia vibracional, que permite identificar compostos químicos e grupos funcionais [86]. O espectro vibracional de uma molécula é considerado uma propriedade física única e característica de cada molécula, não existindo dois compostos exatamente com o mesmo espectro de infravermelhos.

Deste modo, para observação dos espectros vibracionais, as amostras em pó foram misturadas com brometo de potássio (KBr) numa proporção de 1:50 (em peso) durante 15 minutos, e em seguida prensada numa pastilha. Os espectros foram registados a 128 *scans* e a uma resolução de 4 cm^{-1} , entre $4000 - 350\text{ cm}^{-1}$.

3.2.2.4. Análise granulométrica

A granulometria dos pós foi determinada utilizando um instrumento de dispersão de luz (Coulter LS 230, Reino unido, modelo ótico Fraunhofer). Para tal, preparou-se uma suspensão para cada pó onde se adicionou 2 gotas de desfloculante (Targon 1128) de forma a garantir uma máxima dispersão das partículas e em seguida submetidos a ultra-sons durante 5 minutos.

3.2.3. Preparação e caracterização das pastas cimentícias

Para a preparação dos cimentos foram utilizados os três pós β -TCP, anteriormente apresentados na Tabela 4 (**P1**, **P2** e **PC**). Todos os pós estudados apresentam como fase cristalina principal a fase β -TCP, sendo distintas a distribuição e tamanhos de partículas. Para a preparação das pastas cimentícias, inicialmente, foram misturados a seco os pós de β -TCP (**P1**, **P2** e **PC** (55,17 %)) com quantidades equimolares de MCPM (44,83 %) durante 20s. Em seguida, adicionou-se o líquido da reação seguido de uma mistura automática na

misturadora (MIXER Thinky ARE-250) durante 20 s a 1000 rpm. A mistura foi feita a temperatura controlada de 22°C, à pressão atmosférica. O líquido de presa utilizado para a produção das pastas foi uma solução aquosa contendo 20 wt % de AC. Foram utilizadas três razões líquido/pó (RLP) diferentes: 0,36 mL.g⁻¹, 0,38 mL.g⁻¹ e 0,4 mL.g⁻¹. Esta última razão foi a que deu origem a pastas cimentícias com características mais adequadas para o objetivo pretendido, tais como tempos de presa iniciais mais longos e baixas viscosidades, fatores essenciais para a fase de enchimento das microagulhas. Convencionalmente, a mistura dos pós com o líquido reativo nos cimentos são feitas manualmente. No entanto, neste trabalho testaram-se dois métodos de mistura com o objetivo de comparar as propriedades finais dos cimentos. Através da caracterização por DRX, ensaios mecânicos e tempo de presa dos cimentos obtidos por ambos os métodos de mistura, não foram observadas diferenças significativas a nível de fases ou mesmo a nível de propriedades mecânicas. Desta forma, optou-se pela mistura automática, uma vez que a reprodutibilidade seria superior. Assim, todos os cimentos apresentados no decorrer deste trabalho foram produzidos por mistura automática na misturadora Thinky ARE-250 (Figura 4).



Figura 4: Misturadora Thinky ARE-250

Existem três formas de impregnação de fármaco nos cimentos ósseos: (i) o fármaco pode ser adicionado na fase sólida dos cimentos antes de adicionar o líquido da reação, (ii) pode ser

adicionado no líquido de presa e só depois adicionar a fase sólida ou então (iii) adicionado por absorção nos cimentos. Neste trabalho, o fármaco foi incorporado na fase sólida dos cimentos. Misturou-se a seco 2,5 wt% de Levofloxacina (calculada com base na quantidade de sólidos da pasta) com quantidades equimolares de MCPM (44,83 %) e dos pós P1, P2, PC (55,17 %), já referidos.

A Tabela 5 apresenta a designação utilizada na identificação dos cimentos produzidos no decorrer deste trabalho, tendo em conta a relação líquido/pó (RLP), os pós utilizados e a presença ou a ausência de LEVO.

Tabela 5: Designação dos cimentos tendo em conta a RLP, os pós utilizados, e a presença ou a ausência de LEVO.

<i>Designação dos cimentos</i>	<i>RLP (mL.g⁻¹)</i>	<i>LEVO (%)</i>	<i>Pó utilizado</i>
CC-0.4	0,4	0	PC
CC-0.36	0,36	0	PC
C1-0.4	0,4	0	P1
C2-0.4	0,4	0	P2
CC_LEVO -0.4	0,4	2,5	PC
CC_LEVO-0.36	0,36	2,5	PC
C1_LEVO-0.4	0,4	2,5	P1
C2_LEVO-0.4	0,4	2,5	P2

3.2.3.1. Avaliação da compatibilidade da Levofloxacina com o líquido de presa dos cimentos pelo FTIR-ATR

De forma a garantir a integridade da levofloxacina durante a preparação das pastas cimentícias foi indispensável uma avaliação da interação do líquido de presa (solução aquosa com 20 wt% de ácido cítrico) com o fármaco levofloxacina, uma vez que este é adicionado na fase da preparação das pastas. Desta forma, preparou-se uma solução de ácido cítrico com levofloxacina na mesma proporção utilizada para a preparação das pastas cimentícias. A avaliação foi efetuada por FT-IR num espectrofotómetro (Bruker Tensor 27) acoplado a um acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR) (GOLDEN GATE, SPECAC). Para obter os

espectros, as amostras, foram coladas diretamente no cristal ATR sem outra preparação prévia. Os espectros de cada amostra foram registados a 256 *scans* e a uma resolução de 4 cm^{-1} , entre 4000 a 350 cm^{-1} .

3.2.3.2. Medição dos Tempos de presa

O tempo de presa dos cimentos foi avaliado pelo método das agulhas de Gilmore de acordo com a norma C266-89 ASTM. No método de Gilmore são utilizadas duas agulhas diferentes, permitindo assim, determinar o tempo de presa inicial (IST) e o tempo de presa final (FST) dos cimentos (Figura 5), como descrito anteriormente.

Assim, após os pós estarem devidamente pesados, adicionou-se a fase líquida da reação, seguido de uma mistura automática na misturadora durante 20 s a 1000 rpm. A pasta cimentícia obtida foi vertida num molde de silicone e as agulhas foram colocadas sobre a sua superfície com intervalos de tempo regulares até não deixar marca na superfície dos cimentos. Sendo, a primeira medição feita com a agulha de menor peso, refere-se então ao IST, e a seguinte ao FST, com a agulha de maior peso. A inspeção é feita visualmente. Este procedimento ocorreu à temperatura controlada de 22°C e à pressão atmosférica. Os tempos de presa foram medidos em cimentos na presença e na ausência do fármaco. Para cada cimento foram efetuadas três medições e os resultados foram expressos em médias com o respetivo desvio padrão.



Figura 5: Agulha de Gilmore e molde de silicone com o cimento para a medição dos tempos de presa.

3.2.4. Caracterização dos cimentos

3.2.4.1. Avaliação das Propriedades Mecânicas

O teste mecânico realizado foi a resistência à compressão. Para a realização deste teste, as pastas cimentícias foram vertidas em moldes de silicone com dimensões ($\Phi 6 \times 12 \text{ mm}^3$). Tentou-se minimizar as possíveis bolhas de ar obtidas durante a mistura das pastas através da agitação dos moldes. Após este processo, os cimentos foram guardados dentro dos moldes em ambiente húmido a 37°C durante 24 h. Passado este período de tempo, os cilindros foram desmoldados e polidos de forma a obter faces planas e paralelas. Depois de polidos, estes foram deixados a secar numa estufa à 37°C durante aproximadamente 5 dias e a resistência à compressão foi medida a uma velocidade de $1\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando o equipamento de teste universal (Shimadzu Autograph, Trapezium 2, Japan) (Figura 6), equipado com uma célula de carga de 10 kN. Foram utilizados 7 cilindros para cada composição e os resultados foram expressos em médias com o respetivo desvio padrão. Os cilindros obtidos foram também utilizados para o cálculo da porosidade total.



Figura 6: Equipamento Shimadzu Autograph Trapezium 2 utilizado para os ensaios mecânicos das amostras cimentícias cilíndricas.

3.2.4.2. Análise quantitativa e qualitativa dos cimentos (DRX)

A determinação e quantificação das fases formadas nos cimentos foram feitas por difração de raios-X utilizando o método de refinamento de Rietveld. O refinamento de Rietveld foi feito por comparação de difratogramas utilizando as fichas JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards). Para tal, os cimentos preparados anteriormente, com e sem LEVO, foram moídos em pós finos e levados para análise no Difratómetro PANalytica Xpert -PRO equipado com um filtro de Níquel (Ni) e uma radiação Cu-K α ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$) produzido a 45 kV e 40 mA. O conjunto de dados foi registado no intervalo de 20-50° a cada 0,013° 2 θ /s.

3.2.4.3. Determinação da Porosidade total dos cimentos

A porosidade total é determinada pela relação entre o volume total dos poros e o volume aparente do material. Neste trabalho utilizou-se a equação (3) para o cálculo da porosidade total dos cimentos.

$$Porosidade\ total = \frac{\rho_{real} - \rho_a}{\rho_{real}} \quad (3)$$

Onde, ρ_{real} é a densidade real dos cimentos e ρ_a é a densidade aparente dos cimentos.

Para o cálculo da densidade aparente utilizou-se um densímetro de mercúrio baseado no princípio de Arquimedes, utilizando a seguinte fórmula (equação (4)):

$$\rho_a = \frac{m_c}{v_{ap}} \quad (4)$$

Onde, m_c é a massa dos cilindros e v_{ap} é o volume aparente dos cimentos que neste caso é igual ao volume do mercúrio deslocado no pistão. Para tal, as amostras, previamente secas em estufa a 37°C durante vários dias até garantir secagem total (cerca de 5 dias), foram

pesadas e levadas para a determinação do volume de deslocamento do mercúrio quando estas são imersas em mercúrio.

Este método tem a vantagem de ser aplicável tanto ao material cru como cozido, no entanto, o manuseamento do mercúrio é perigoso, com riscos de intoxicação por contacto ou inalação. Contudo, neste trabalho foi utilizado um dispositivo construído para esse fim (Figura 7) que possibilitou o uso desta técnica amenizando os riscos de intoxicação por contacto ou inalação do mercúrio. Foram utilizados 3 a 4 provetes para cada amostra e os resultados foram expressos em médias com o respetivo desvio padrão.

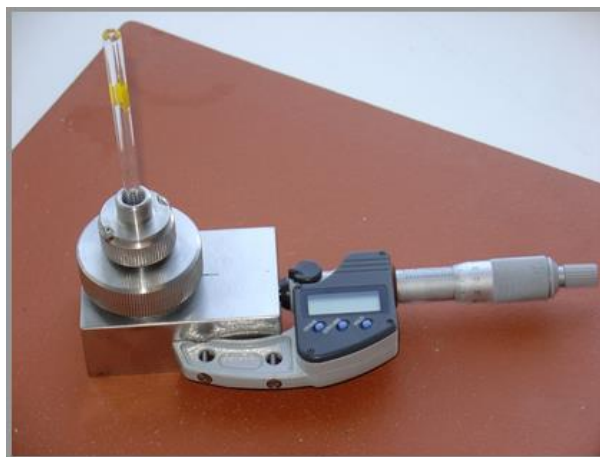


Figura 7: “Densímetro” criado pela equipa de investigação do Professor José M. F. Ferreira.

A densidade real dos cimentos foi determinada através do picnómetro de Hélio. Esta técnica baseia-se igualmente no princípio de Arquimedes, em que o volume é determinado a partir do deslocamento de um fluido. O gás utilizado neste equipamento é o hélio, que se comporta como um gás perfeito e consegue penetrar em poros com dimensões muito pequenas ($\sim 1\text{\AA}$), graças ao seu reduzido tamanho atómico. Para facilitar a penetração do Hélio, foi necessário moer as amostras cimentícias cilíndricas de forma a obter pós finos. De seguida, os pós foram deixados a secar em estufa a 37°C durante 2 dias e depois levados para a determinação do volume real (V_{real}) através da equação (5).

$$V_{real} = (V_c - V_r) * \left(\frac{P_1}{P_2} - 1 \right) \quad (5)$$

Onde, P_1 e P_2 são os valores de pressão lidos diretamente no equipamento, e V_c e V_r são obtidos por calibração do equipamento. O resultado final para V_{real} resultou da média aritmética de 3 medições. Depois de obter o V_{real} , finalmente foi calculada a densidade real (ρ_{real}) dos pós pela expressão (6).

$$\rho_{real} = \frac{m_p}{V_{real}} \quad (6)$$

Onde, m_p é a massa dos pós de cimentos e V_{real} é o volume real dos pós.

3.2.4.4. Análise morfológica dos cimentos (SEM)

A morfologia da superfície dos cimentos, com e sem LEVO, foi analisada por microscopia eletrônica de varrimento (SEM). As amostras foram partidas e um fragmento de cada uma delas foi colocado em porta amostras com cola de carbono e deixadas a secar. Após a montagem, todas as amostras foram recobertas com um filme de carbono, num depositador de carbono. Para os cimentos incorporados com LEVO a análise morfológica foi feita antes e depois do teste de libertação. Esta análise permite observar os diferentes tamanhos de poros existentes nos cimentos, de forma a indagar algumas considerações acerca da influência da porosidade dos cimentos na libertação do fármaco incorporado.

3.2.5. Estudo da Libertação de fármaco

3.2.5.1. Preparação das soluções-padrão e Curva de calibração

A quantificação da levofloxacina foi realizada por espectroscopia de fluorescência, através do método de calibração por padrão externo. Inicialmente foi preparada uma solução-mãe através da dissolução de 10 mg de LEVO em 10 mL de PBS (pH=7,4). A partir desta solução foram preparadas, por diluições seriadas em microplacas de 96 poços (Greiner bio-one, Germany), outras soluções padrão com concentrações iguais a 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,097; 0,048 e 0,024 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, para obtenção de curvas de calibração. A fluorescência

das soluções foi lida num espectrofotómetro (FLUOstar Omega, BMG LABTECH). O comprimento de onda de excitação utilizado foi igual a 280 nm e o de emissão foi igual a 460 nm. Foram testados 3 cilindros (n=3) de cada composição e realizadas três leituras para cada amostra. As leituras relativas ao PBS foram utilizadas como controlo.

3.2.5.2. Estudo da Libertação da LEVO em PBS

Os estudos *in vitro* da libertação de LEVO foram efetuados ao longo de um período de 120 horas, em tubos *eppendorfs* (5 mL), em PBS, incubados num banho termostaticado a 37°C e com agitação constante a 60 rpm (Mettler). Este estudo foi feito a partir de amostras cilíndricas de cimento de diferentes composições contendo LEVO ($\Phi 6 \times 12$ mm; com uma massa aproximadamente igual a 700 mg). Cilindros com dimensões e massas semelhantes sem levofloxacina foram usados como controlos. O volume de PBS utilizado para cada amostra foi determinado a partir da massa dos cimentos, numa proporção de 1/5 (massa/volume). Aos tempos pré definidos 0, 2, 4, 6, 24, 48 h e 120 h, foram recolhidos 1 mL de solução de cada amostra com uma micropipeta e imediatamente foi reposta a mesma quantidade com igual volume de PBS. As soluções recolhidas para cada tempo foram armazenadas em *eppendorfs* de 1,5 mL e analisadas no espectrofotómetro de fluorescência (FLUOstar Omega, BMG LABTECH) conforme procedimento previamente descrito para a curva de calibração. Após 5 dias (120 h), todas as amostras foram retiradas dos *eppendorfs* e deixadas a secar no exsiccador. Após a completa secagem das mesmas, foram levadas a observação das suas microestruturas no SEM e posterior avaliação pela técnica FTIR.

3.2.6. Enchimento dos moldes de microagulhas e caracterização das amostras

Após estabelecidos os parâmetros anteriormente descritos (tamanho e distribuição de tamanhos de partícula dos pós, razões líquido de presa/pó e quantidades de fármaco), procedeu-se então para a etapa de enchimento de micromoldes em forma de microagulha sólida, com a formulação de cimento que apresentou as melhores características quer a nível mecânico quer na taxa de libertação do fármaco, neste caso o CC_LEVO-0.4.

Para o enchimento dos micromoldes utilizou-se o equipamento AVE-High Vacuum Engineers (Bristol, Reino Unido) (Figura 8), onde a pasta cimentícia é introduzida no molde

sob vácuo, garantindo assim um enchimento mais eficaz de todas as microcavidades do molde e posterior eliminação de bolhas de ar originadas no processo de mistura da pasta cimentícia. Após um período de tempo superior ao FST, as microagulhas foram desmoldadas e deixadas a secar à temperatura ambiente.



Figura 8: AVE-High Vacuum Engineers- Equipamento utilizado para o enchimento das microagulhas

As morfologias das microagulhas sólidas incorporadas com LEVO foram posteriormente observadas por Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM).

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização dos pós

Os pós de fosfatos de cálcio sintetizados em laboratório (P1 e P2), bem como o pó comercial (PC) foram inicialmente analisados por difração de Raios-X (DRX) de forma a determinar as fases cristalinas presentes, cujos difratogramas estão apresentados na Figura 9.

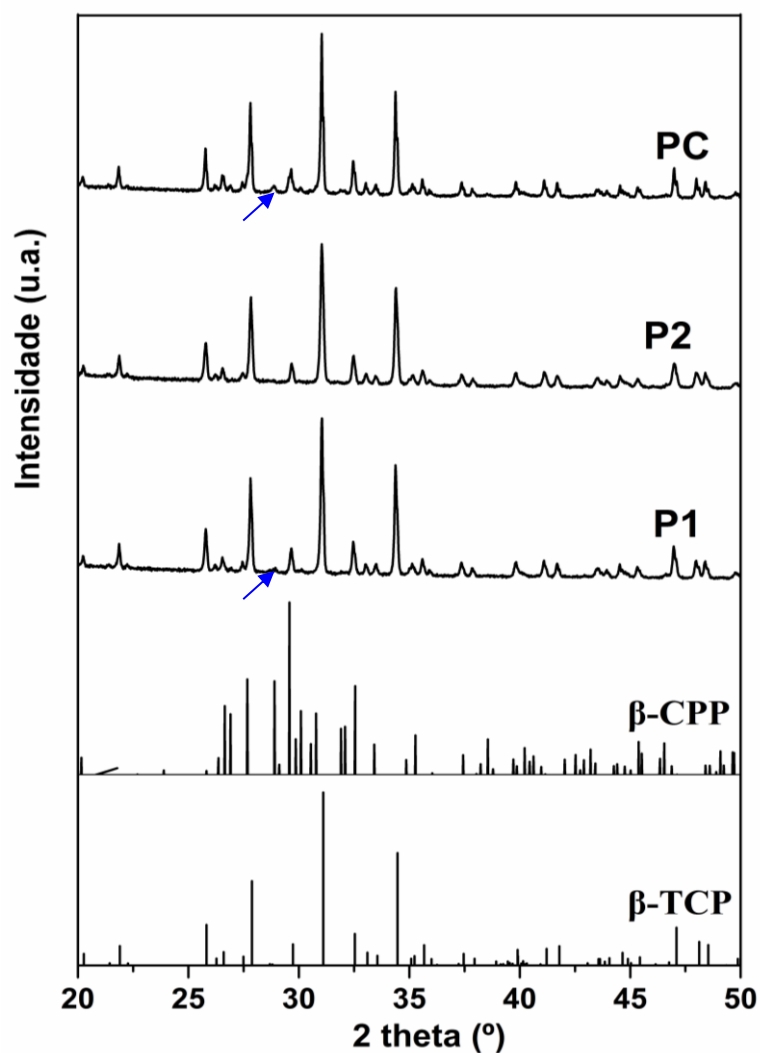


Figura 9: Difratogramas de DRX dos pós calcinados a 1000°C durante 2 h (P1 e P2) e do pó comercial (PC).

As posições dos picos e as suas intensidades relativas permitiram a identificação das fases cristalinas presentes na estrutura de cada um dos pós, através da comparação com as fichas de JCPDS. Assim, para a análise da fase β -TCP foi utilizada a ficha 04-006-9376 e para a fase β -CPP a ficha 04-009-3876. Com base nos espectros obtidos (Figura 9), pode-se afirmar que o tratamento térmico aplicado permitiu a formação da fase β -TCP tanto para o P1 como para o P2, tal como era esperado, de acordo com outros trabalhos presentes na literatura [87]. No entanto, para o P1 houve a formação de uma pequena quantidade de β -CPP (pirofosfato de cálcio, pico assinalado com a seta a azul na Figura 9) que não se verificou para o pó P2, que é composto apenas pela fase β -TCP. Relativamente ao pó comercial, este é composto, da mesma forma que o P1, por β -TCP e vestígios de β -CPP. A presença da fase β -CPP no pó P1 deve-se, provavelmente, à razão Ca/P utilizada para a preparação do mesmo (razão Ca/P = 1.49) bem como a pequenas variações de pH durante o processo de síntese, uma vez que o ciclo de calcinação foi idêntico para ambos os pós. A razão Ca/P superior utilizada para a síntese do pó P2 (1.51) não promoveu o aparecimento da fase β -CPP, sendo o P2 um pó de β -TCP puro. A análise semi-quantitativa das fases está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6: Análise semi-quantitativa das fases presentes nos pós obtida pelo método de RIR (Relative Intensity Ratio).

Pó	Fases presentes (%)	
	β -TCP	β -CPP
P1	93	7
P2	100	0
PC	88*	12

*Análise de DRX feita no DeMAC, porém o fornecedor garante ≥ 96 % de β -TCP.

De forma a complementar os resultados obtidos por DRX, os pós (P1, P2 e PC) foram também avaliados pelo método de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 10.

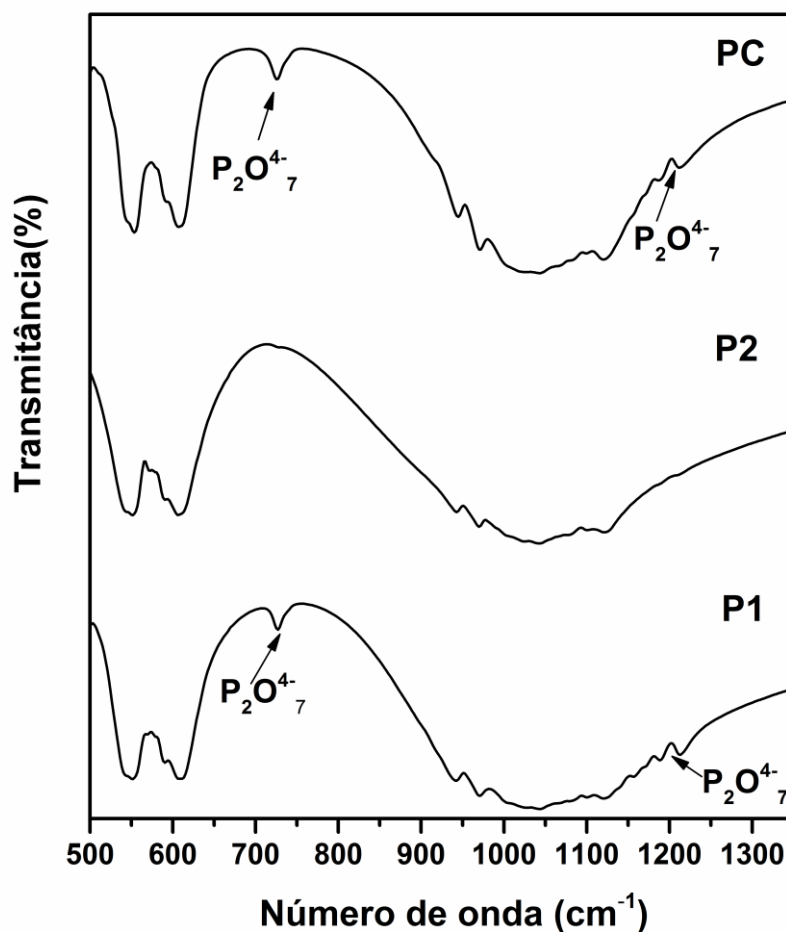


Figura 10:

Espectros de FTIR dos pós calcinados a 1000°C durante 2h (P1 e P2) bem como do pó comercial (PC).

Os espectros de FTIR confirmam que o β -TCP é a fase predominante nos três pós, de acordo com os resultados de DRX apresentados anteriormente. As bandas dos espectros são típicas dos pós de β -TCP como se pode verificar na Figura 10 [88]. Esta análise permitiu, do mesmo modo, confirmar a presença de bandas dos grupos $P_2O_7^{4-}$ observadas a 780 cm^{-1} e a 1210

cm^{-1} , atribuídos à fase do β -CPP presentes nos pós P1 e PC. Relativamente ao pó P2, como seria de esperar, estão presentes apenas as bandas correspondentes aos grupos do β -TCP. Depois de calcinados, moídos e peneirados numa malha de $40 \mu\text{m}$, foram avaliados os tamanhos e distribuição de tamanhos de partícula dos pós. A Figura 11 apresenta os gráficos da distribuição granulométrica obtidos e os respetivos valores de D_{10} , D_{25} , D_{50} , D_{75} e D_{90} (<volume%).

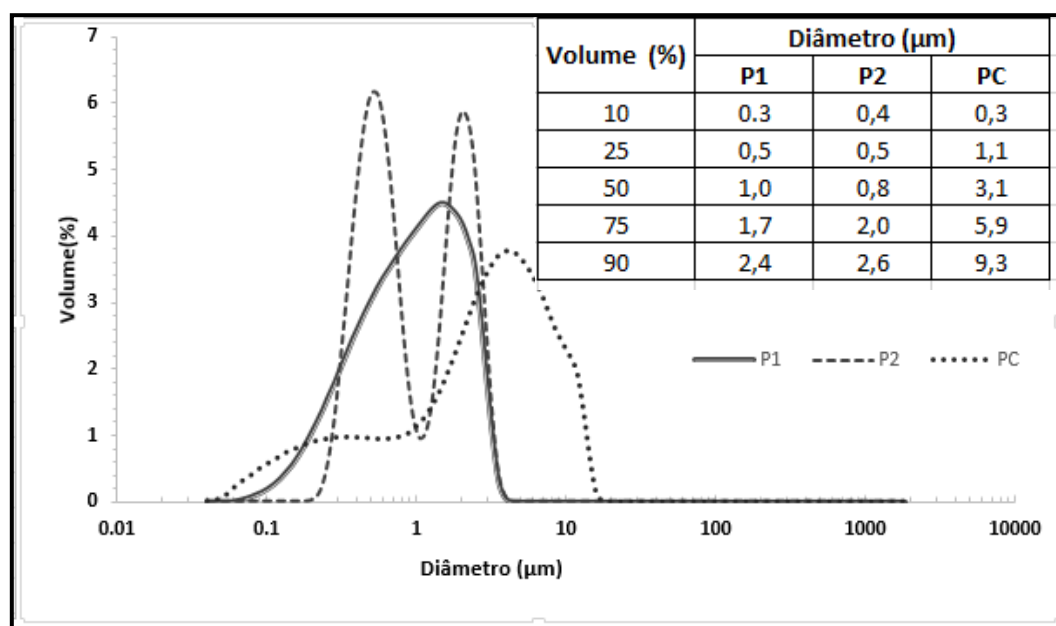


Figura 11: Distribuição dos tamanhos de partícula dos pós (P1, P2 e PC) após calcinação e moagem.

O P1 apresenta uma distribuição unimodal com um tamanho médio de partícula de $1,2 \mu\text{m}$, com 90% das partículas (D_{90}) abaixo de $2,4 \mu\text{m}$. O P2 apresenta uma distribuição bimodal, com um tamanho médio de $1,3 \mu\text{m}$, com 90% em volume (D_{90}) de partículas abaixo de $2,6 \mu\text{m}$. O pó comercial apresenta também uma distribuição bimodal, embora bastante mais alargada quando comparado com os pós sintetizados em laboratório, apresentando um tamanho médio de partícula de $4,0 \mu\text{m}$, com D_{10} , D_{50} e D_{90} de $0,3 \mu\text{m}$, $3,1 \mu\text{m}$ e $9,3 \mu\text{m}$, respetivamente.

Para complementar os resultados obtidos nas distribuições de tamanhos de partícula, as partículas dos diferentes pós foram observadas por Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM). As microestruturas obtidas estão apresentadas na Figura 12.

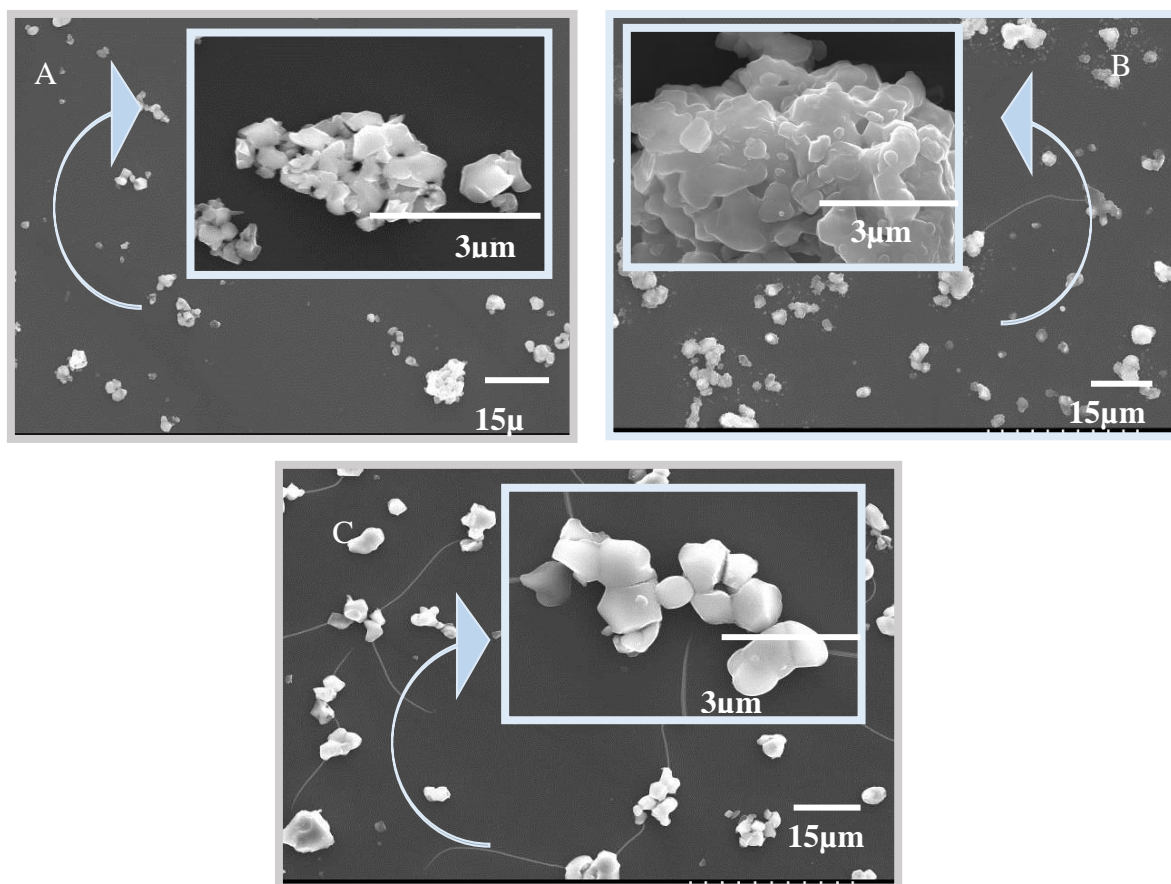


Figura 12: Microestrutura dos pós A) P1 e B) P2 calcinados a 1000°C, e do pó comercial C) PC.

Os três pós apresentam uma morfologia semelhante e típica de pós de fosfatos tricálcicos calcinados [87]. Como seria de esperar, todos os pós apresentam algum grau de aglomeração, resultante da junção de várias partículas finas por forças de atração de Van-der-Waals. Além disso, é também visível a agregação de partículas, mais acentuada no caso do pó comercial, justificando a presença de partículas com tamanhos superiores neste pó quando comparados com o P1 e P2, como verificado na Figura 11. A presença de agregados é comumente observada neste tipo de pós devido às altas temperaturas de calcinação utilizadas que

promove uma forte coesão de partículas, pelo que se pode pôr a hipótese que o pó comercial terá sido calcinado a temperaturas superiores a 1000°C. Comparando os dois pós sintetizados em laboratório, P1 e P2, não se verificam diferenças significativas nas distribuições e geometrias das partículas, não sendo muito perceptível a presença de duas populações de partículas distintas no caso do pó bimodal P2 (Figura 12B), como se verificou na Figura 11. De acordo com as distribuições de tamanhos de partícula apresentados na Figura 11, as micrografias confirmam que os pós P1 e P2 apresentam partículas com menores dimensões quando comparados com o PC.

4.2. Avaliação da compatibilidade da Levofloxacina com o líquido de presa dos cimentos

A Figura 13 apresenta os espectros de FTIR-ATR de soluções preparadas apenas com LEVO, com AC e da mistura de AC com LEVO (AC_LEVO). Estes ensaios foram efetuados para avaliar a interação do fármaco com o AC (líquido de presa dos cimentos) com intuito de verificar a integridade da LEVO em contacto com o líquido de presa.

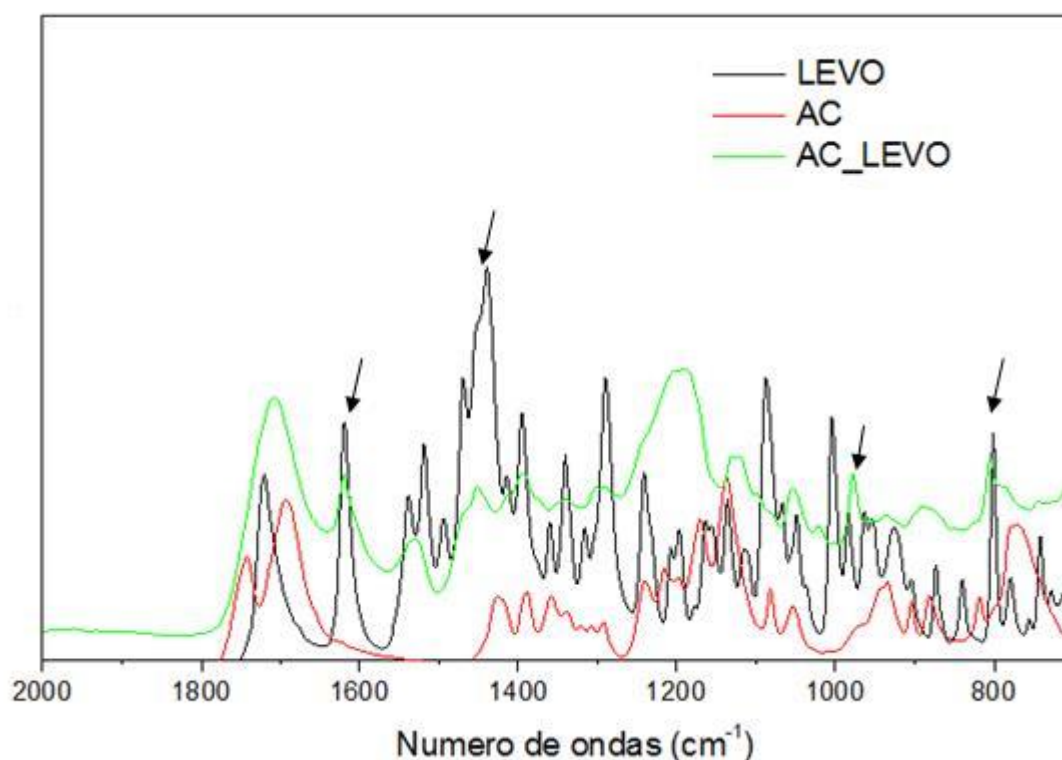


Figura 13: Espectros de FTIR-ATR da solução de Levofloxacina (LEVO), de ácido cítrico (AC) e de uma mistura de AC com LEVO (AC_LEVO).

A existência de sobreposição de picos na LEVO e no AC dificulta a análise da mistura de ambos. Porém, é de notar que alguns dos picos referentes à LEVO a $\sim 800, 980, 1290, 1436, 1520, 1535$ e 1618 cm^{-1} , permaneceram após a combinação com o ácido cítrico (espectro AC_LEVO) embora menos intensos. Com base nestes resultados, poderá adiantar-se que, aparentemente, a presença do AC não interfere na integridade da LEVO. No entanto, seriam necessários ensaios adicionais, como por exemplo, RMN (Ressonância Magnética Nuclear), Espectroscopia Raman, que permitissem comprovar este facto.

4.3. Caracterização das pastas cimentícias

Quando se pretende desenvolver um cimento que seja moldável ou injetável, o tempo de presa é dos principais parâmetros a avaliar. Quando a reação de presa nos cimentos é muito rápida, o tempo de manuseamento é muito reduzido, e consequentemente poderão formar-se cimentos com estruturas irregulares devido à falta de tempo para o arranjo e acomodação das partículas. Desta forma, o tempo de presa deve ser adequado de modo a permitir o seu manuseamento, um bom empacotamento entre as partículas e consequentemente uma boa resistência mecânica nos cimentos [89].

Neste trabalho em particular, pretendeu-se desenvolver cimentos, com e sem o fármaco incorporado, com um tempo de presa inicial suficiente, de modo a manter a fluidez necessária para permitir um enchimento completo das microcavidades dos moldes de microagulhas sólidas. Para tal, seleccionou-se uma solução aquosa com 20 wt% de AC como agente retardador da reação e estudaram-se diferentes razões líquido/pó, de forma a obter um tempo de presa adequado, para permitir um fácil manuseamento da pasta cimentícia durante o processo de vazamento.

Os tempos de presa iniciais (IST) e finais (FST) obtidos para as diferentes composições cimentícias (Tabela 5 apresentada no Capítulo 3, secção 3.2.3), com e sem o fármaco levofloxacina estão apresentados na Figura 14. Relativamente às quantidades de líquido de presa testadas, os resultados obtidos estão de acordo com o previsto. Segundo a literatura, baixas razões líquido/pó dão origem a diminuição de tempos de presa iniciais e finais (IST e FST) das pastas cimentícias, assim como a resistências mecânicas superiores nos cimentos finais [90]. Como se pode verificar através da Figura 14, os cimentos produzidos com a razão líquido/pó = $0,36 \text{ mL.g}^{-1}$ (CC-0.36 e CC_LEVO-0.36) “prenderam” mais rapidamente que

os restantes produzidos com uma razão líquido/pó = 0,4 mL.g⁻¹, para todos os pós estudados. É de notar ainda, que os cimentos preparados com o pó comercial, com e sem o fármaco, (CC-0.4, CC-0.36, CC_LEVO-0.4, CC_LEVO-0.36), apresentam tempos de presa (IST e FST) muito mais longos, para as mesmas razões líquido/pó, quando comparados com os restantes cimentos. Estas variações devem-se às diferenças dos tamanhos e distribuição de tamanhos de partícula dos pós iniciais.

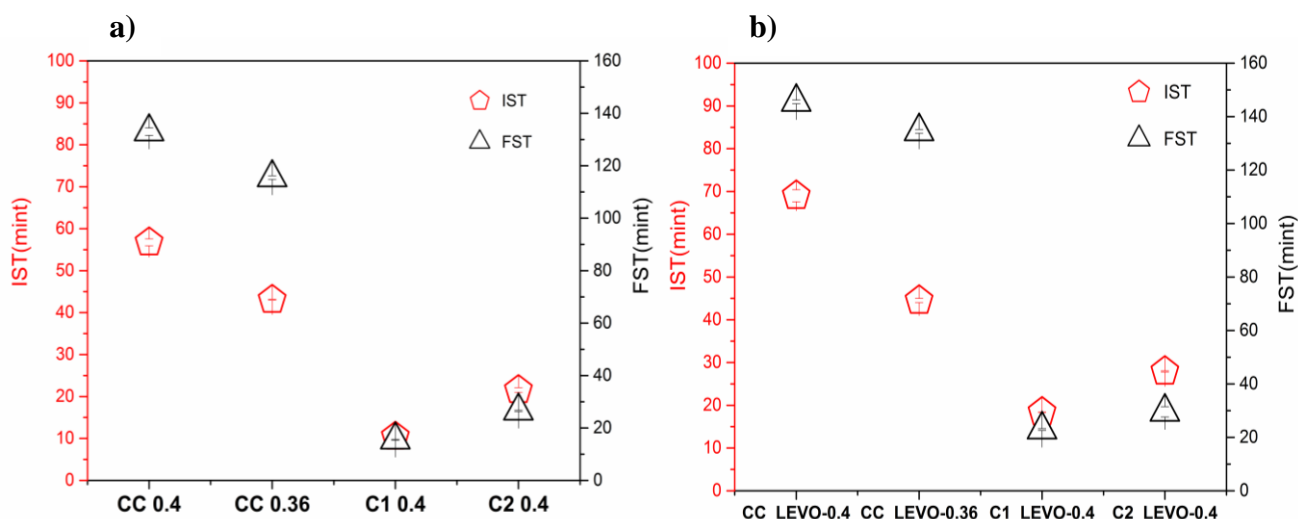


Figura 14: Tempos de presa inicial (IST) e final (FST) das pastas cimentícias: (a) sem levofloxacina; (b) com levofloxacina.

O PC apresenta partículas com tamanhos superiores e consequentemente áreas superficiais específicas inferiores, sendo consequentemente menos reativo. Para além disso, partículas com áreas superficiais inferiores necessitam de menores quantidades de líquido para a sua molhabilidade, o que justifica os tempos de presa iniciais mais longos, para os cimentos preparados com o pó comercial, mesmo com razão líquido/pó inferior. Desta forma, foi possível observar durante a preparação deste cimento, que ao adicionar a mesma quantidade de líquido de presa adicionada nos outros cimentos, este apresentava um aspeto muito mais fluido comparativamente com os outros cimentos, demorando assim muito mais tempo para solidificar.

No que concerne aos cimentos incorporados por LEVO, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos sobre os cimentos de fosfatos de cálcio incorporados com fármacos [91–93]. De acordo com a literatura, a combinação de CPCs com um antibiótico altera os tempos de

presa dos mesmos e conseqüentemente, as suas propriedades físico-químicas e mecânicas [91]. Neste trabalho verificou-se um ligeiro aumento nos tempos de presas (IST e FST) de todos os cimentos testados com LEVO (Figura 14b) quando comparados com os cimentos sem LEVO (Figura 14a) e para ambas as razões líquido/pó utilizadas.

O tempo de presa inicial mínimo obtido foi de, aproximadamente, 11 minutos para a pasta cimentícia C1-0.4 na ausência de LEVO, sendo um bom indicativo de que todas as pastas poderão ter fluidez adequada durante o tempo necessário para o enchimento dos micromoldes.

No entanto, pode prever-se que a pasta cimentícia com as características mais adequadas para o enchimento dos micromoldes serão as que foram obtidas com o PC, uma vez que apresentou um comportamento fluido durante mais tempo. No entanto, este resultado não é suficiente por si só para concluir que o PC será o mais satisfatório para a aplicação pretendida, uma vez que é necessário obter um compromisso entre um tempo de presa inicial adequado e resistências mecânicas no cimento final suficientemente elevadas, que permitam obter microagulhas facilmente desmoldáveis e capazes de perfurar a pele sem se danificarem.

4.4. Caracterização dos cimentos

As Figura 15 (a) e (b) apresentam os difratogramas obtidos por DRX dos diferentes cimentos sem e com LEVO, respetivamente. As fichas JPDCS utilizadas foram as seguintes: 04-009-3876 para β -CPP; 04-011-5377 para MCPM; 04-009-3755 para DCPA e 04-013-3344 para DCPD.

A Figura 16 apresenta a quantificação das fases cristalinas presentes em cada amostra usando um método semi-quantitativo de refinamento RIR (*Relative Intensity Ratio*), partindo dos difratogramas obtidos na Figura 15.

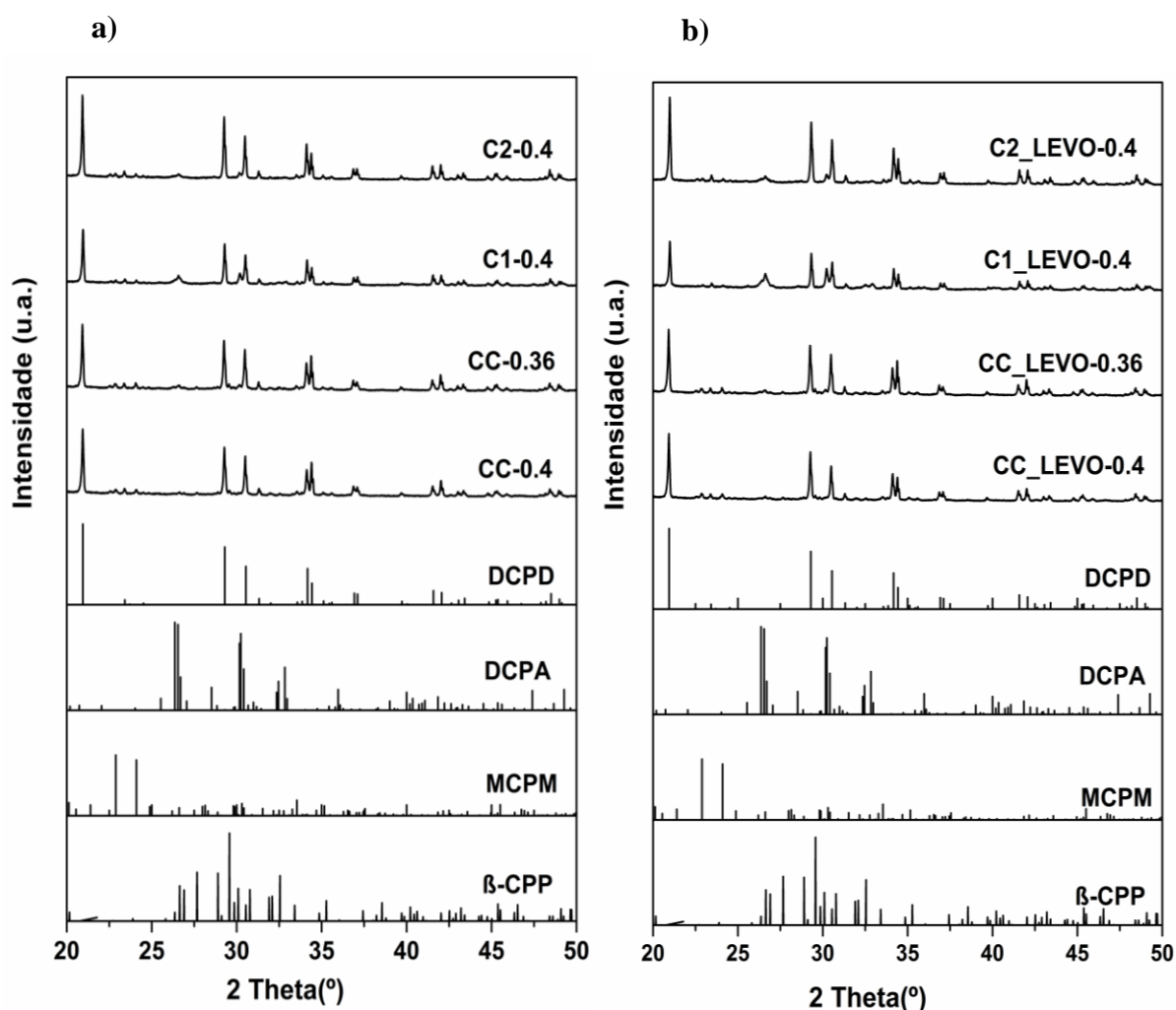


Figura 15: Difratoogramas obtidos por DRX das fases presentes nos cimentos a) sem levofloxacina e b) com levofloxacina.

Os resultados mostram que, para todas as formulações de cimentos estudadas, houve formação de brushite como fase predominante com algum teor de MCPM que não reagiu. A presença indesejada do MCPM poderá estar relacionada com a não homogeneidade dos componentes durante a mistura das pastas cimentícias e com o tamanho de partícula do mesmo. O MCPM utilizado apresenta tamanhos de partícula superiores aos pós de β -TCP, o que torna mais difícil a sua dissolução completa durante a reação. Também é possível observar a formação de alguma percentagem de monetite nas seguintes composições: CC - 0.36 e CC_LEVO-0.36 com quantidades semelhantes em ambos; C1-0.4 e C1_LEVO - 0.4 com quantidades bastante superiores na presença de LEVO; e C2-0.4 e C2_LEVO-0.4 com um ligeiro aumento na presença de LEVO.

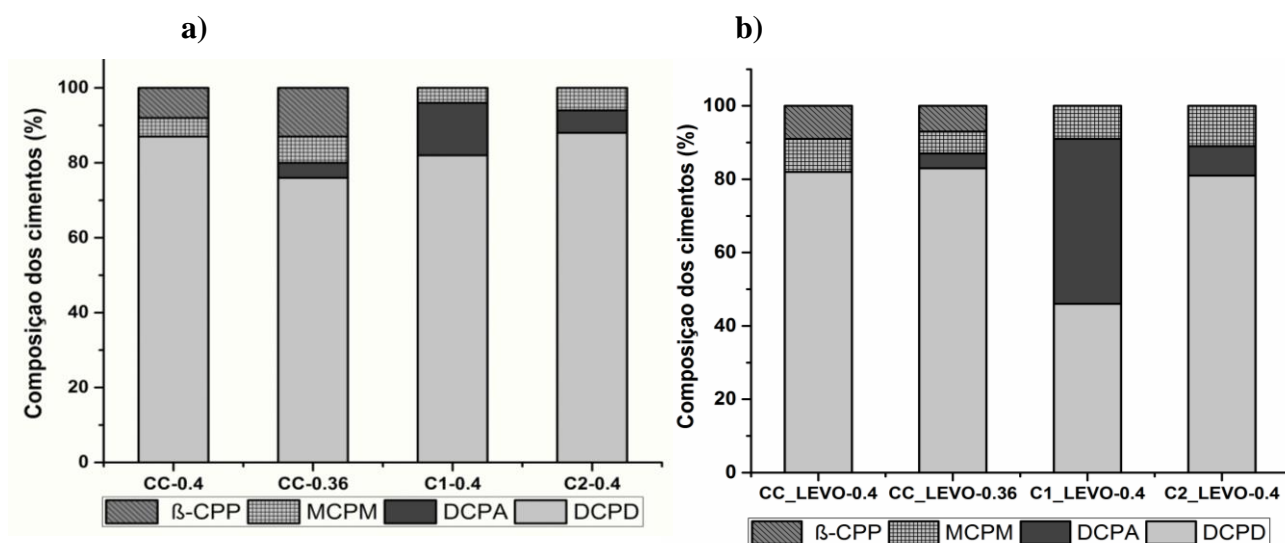


Figura 16: Composições das fases cristalinas dos cimentos obtidas por DRX: **a)** sem levofloxacina e **b)** com Levofloxacina.

A formação de monetite (DCPA) pode estar associada a vários fatores que podem atuar em simultâneo, tais como viscosidade, razão líquido/pó, distribuição de tamanhos de partícula e morfologia das partículas (Figura 12). Para uma mesma razão líquido/pó de $0.4 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, partículas maiores necessitam de menos líquido para a sua molhabilidade, aumentando a fluidez do sistema, deixando mais líquido livre essencial para a formação da fase brushítica (contém 2 moléculas de água na sua constituição), o que explica a ausência de monetite no CC-0.4 com e sem LEVO. Para a mesma composição, diminuindo a razão líquido/pó a viscosidade da pasta aumenta, a quantidade de líquido livre é inferior, com propensão à formação de monetite (fase anidra). O tamanho e morfologia das partículas (Figuras 11 e 12), a sua capacidade de empacotamento e a resultante viscosidade da pasta, justificam a presença de monetite nas composições C1-0.4 e C2-0.4, com quantidades superiores na presença de LEVO para ambos, com maior evidência na composição C1 (Figura 15). De facto, a presença de LEVO aumenta a viscosidade das pastas em todas as composições, embora esta não tenha sido medida (observação visual).

Como já foi referido, neste trabalho, pretendeu-se produzir cimentos que após a presa, apresentassem resistências mecânicas suficientemente elevadas, permitindo assim produzir microagulhas sólidas que possibilitem a perfuração da pele sem se danificarem. A resistência

mecânica dos cimentos é influenciada por dois fatores, tais como: (i) fases cristalinas presentes e (ii) empacotamento de partículas. Estas são dependentes fundamentalmente, dos tamanhos e distribuição de tamanhos de partículas dos pós de partida, composição do líquido de presa e razões líquido/pó utilizadas [60, 70].

A Figura 17 apresenta os resultados das resistências à compressão dos cimentos com (a) e sem levofloxacina (b) bem como as respectivas porosidades (c e d).

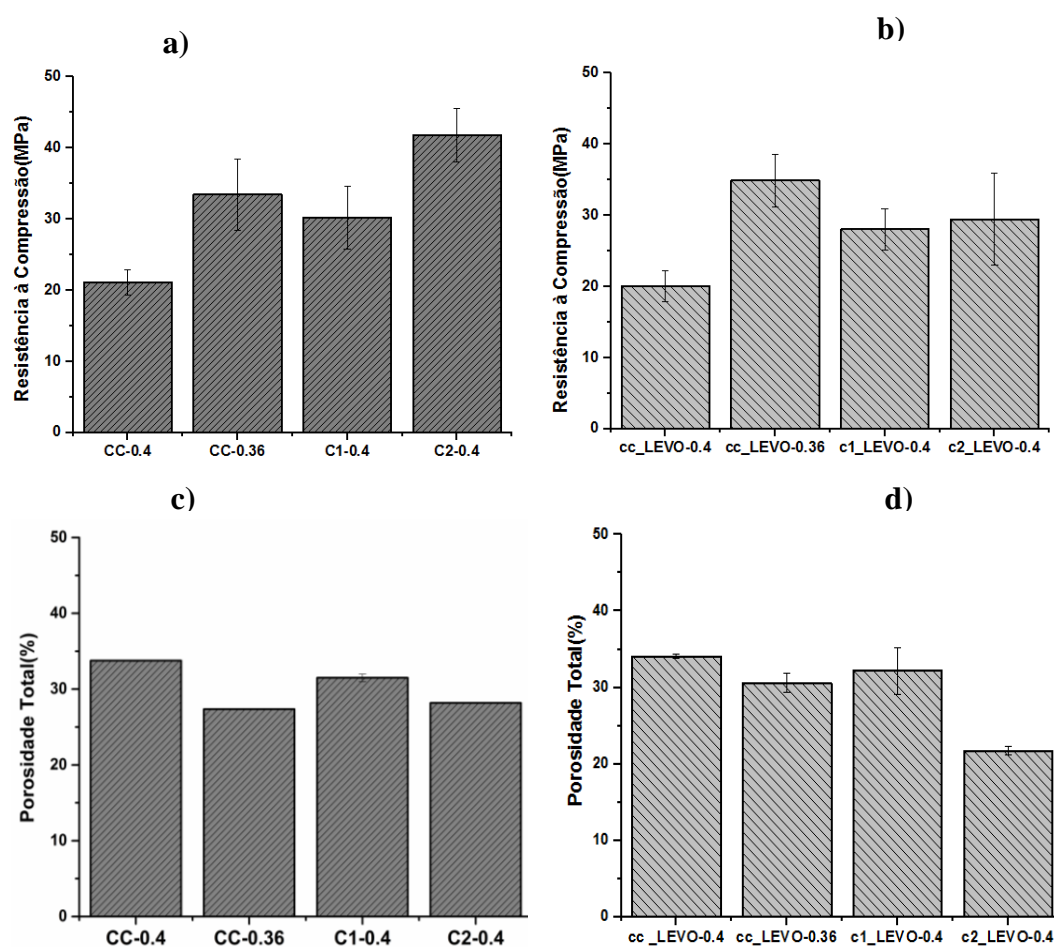


Figura 17: Resistência à compressão dos cimentos: a) sem levofloxacina; b) com a levofloxacina; Porosidade total dos cimentos c) sem levofloxacina e d) com levofloxacina.

Os valores de resistência à compressão são relativamente elevados para a aplicação pretendida. Quando comparados com os valores obtidos por Cai et al. [15], aproximadamente 25 MPa, no presente trabalho para a mesma RLP (0.4 mL.g^{-1}) obteve-se um valor máximo de resistência à compressão de ~41 MPa para o cimento C2-0.4 e um mínimo de ~21 MPa para o cimento CC-0.4. Por outro lado, também para a mesma RLP os cimentos obtidos a partir dos pós P1 e P2 apresentam resistências à compressão superiores quando comparados com os cimentos obtidos a partir do PC, seguindo a mesma tendência na presença de LEVO. Uma vez mais o tamanho e distribuição de tamanhos de partícula têm aqui uma função preponderante. Os tamanhos de partícula superiores do PC relativamente a P1 e P2 dão origem a um sistema mais fluido, com um empacotamento de partículas menos eficaz, resultando num cimento mais poroso (Figura 17c, d) e conseqüentemente com propriedades mecânicas inferiores (Figura 17a, b). Comparando os resultados dos cimentos C1 e C2, verifica-se que o C2 apresenta resistência à compressão superior ao C1, na presença ou na ausência de LEVO. Estas diferenças podem ser explicadas pela distribuição de tamanhos de partícula dos pós. O C2, apresentando uma distribuição bimodal, dá origem a um empacotamento de partículas mais denso, onde as partículas mais pequenas podem ocupar os espaços intersticiais deixados pelas partículas maiores [94, 95] diminuindo a porosidade do cimento final (Figura 17 c,d). Para a mesma composição, a diminuição da razão líquido/pó resulta numa diminuição da resistência à compressão, como seria de esperar [90]. Muitos trabalhos desenvolvidos já demonstraram que o aumento da RLP provoca uma diminuição nas propriedades mecânicas dos cimentos. Por outro lado, a razão líquido/pó tem uma relação direta com a porosidade nos cimentos de fosfatos de cálcio, isto é, o aumento da razão líquido/pó nos cimentos provoca um aumento da porosidade nos mesmos e, conseqüentemente, a diminuição das propriedades mecânicas.

No entanto, todos os valores de resistência à compressão obtidos poderão ser suficientemente adequados para a aplicação pretendida. De facto, o aumento ou diminuição da resistência mecânica e da porosidade dos CPCs dependem da aplicação pretendida. Atualmente, vários estudos em CPCs estão a ser desenvolvidos para estudar a influência da porosidade na libertação de fármacos quando estes são incorporados nas suas matrizes [92, 96, 97]. Cimentos com elevada macroporosidade poderiam ser uma forte opção para a incorporação e posterior libertação de fármacos [98]. Neste trabalho, aparentemente e tendo em conta os resultados obtidos, não se verificaram alterações muito significativas a nível de propriedades

mecânicas e nem mesmo da porosidade dos CPCs, com a incorporação da levofloxacina (ver figura 17 c e d).

Estes resultados estão em concordância com a composição de fases dos cimentos obtidas por DRX. De acordo com a literatura, a presença da fase DCPA diminui a resistência mecânica dos cimentos [60]. Surpreendentemente, este facto não foi comprovado pelos resultados obtidos, uma vez que não se verificou qualquer relação entre o teor de monetite e as propriedades mecânicas/porosidade (ver Figuras 15 e 17). O facto da distribuição do tamanho de partículas e o seu consequente empacotamento se sobreporem ao efeito da presença da monetite nas propriedades mecânicas, poderá ser a explicação para este resultado.

As Figuras 18 a) e b), apresentam as micrografias obtidas por SEM, da superfície de fratura dos cimentos sem e com LEVO, respetivamente, para as diferentes amostras. Para cada cimento foram efetuadas duas ampliações, 50 e 2000 X. As micrografias de menor ampliação dão informação sobre a microestrutura, nomeadamente a presença de maior ou menor porosidade, enquanto nas micrografias de maior ampliação é possível observar os cristais com diferentes formas e tamanhos das várias amostras. Segundo Ginebra et al. (2012), os cristais em forma de lâmina largas e cristais mais longos dizem respeito aos cristais de DCPD e aos cristais de MCPM (Figura 18). Como seria de esperar, todos os cimentos apresentam porosidade, resultantes dos espaços livres entre os diferentes cristais formados durante a reação de presa. Poros em formato circular poderão ser resultantes de bolhas de ar formadas durante o processo de moldagem e/ou durante a mistura das pastas, mais visíveis nos cimentos contendo LEVO (C1 e C2) devido ao aumento da viscosidade das pastas nestas condições. Os poros mais alongados poderão ser resultantes da dissolução dos cristais de MCPM. As partículas de MCPM sendo mais densas e maiores que as do β -TCP, ao dissolverem-se deixam espaços causando algumas imperfeições na microestrutura dos cimentos.

Para a mesma RLP de $0,4 \text{ mL.g}^{-1}$, comparando o CC-0.4 com os C1-0.4 e C2-0.4, é possível verificar que o CC apresenta uma estrutura com tamanhos de poro mais elevados e cristais com tamanhos superiores. Estes resultados confirmam o menor empacotamento de partículas no CC, tornando-o num cimento mais poroso e mecanicamente mais fraco, como foi concluído na análise de resistência à compressão e de porosidade, apresentando 21 Mpa de resistência mecânica à compressão e 34% de porosidade (ver Figura 17c). Por outro lado, o cimento C2-0.4 apresenta, uma estrutura mais densa e uniforme resultante de um melhor

empacotamento de partículas, justificando assim os seus valores de porosidade (~28 %) e resistência à compressão (~41 Mpa). Diminuindo a RLP no CC é possível verificar uma diminuição da porosidade, de acordo com os resultados apresentados na Figura 17.

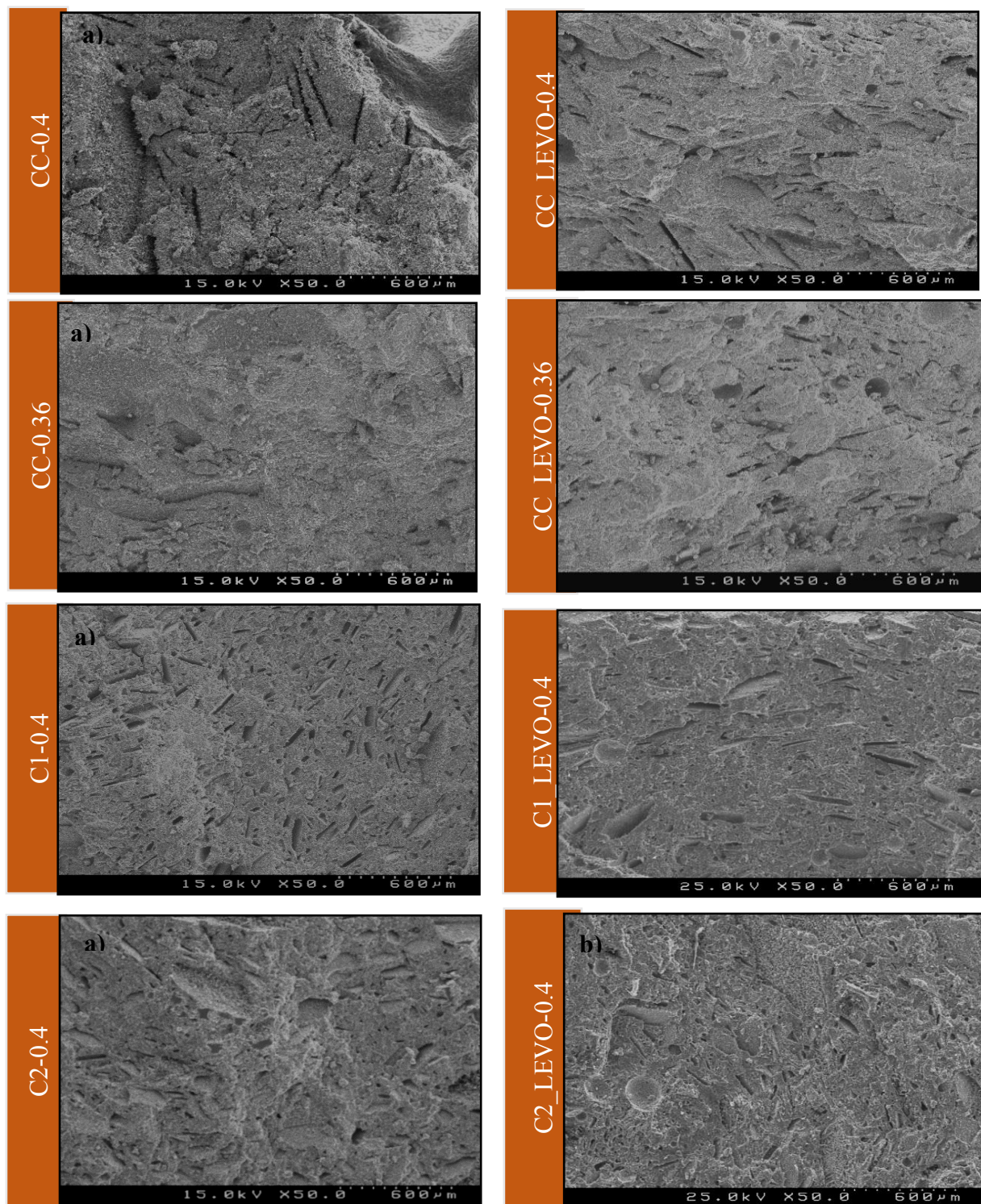


Figura 18: Microestruturas dos cimentos a) sem e b) com o fármaco levofloxacina.

Relativamente aos cimentos preparados com adição de LEVO (Figuras 18 b), são visíveis partículas com tamanhos mais pequenos quando comparados com os cimentos sem LEVO, para a mesma composição. Suspeitou-se que as referidas partículas poderiam ser derivadas do fármaco ou então que este possa ter interferido, de alguma forma, no crescimento dos outros cristais presentes nas matrizes dos cimentos. Desta forma, foi feito um mapeamento EDS/EDX (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) à superfície das amostras cimentícias em SEM (resultados não apresentados), de forma a verificar a natureza de tais partículas e a distribuição da LEVO ao longo do cimento. No entanto, não foi possível observar a presença de elementos representativos da levofloxacina, nomeadamente F e N com esta técnica, provavelmente devido à baixa quantidade presente, estando estes elementos abaixo do nível de deteção da técnica.

4.5. Estudo da Libertação da Levofloxacina

Devido a características como a excelente biocompatibilidade e à semelhança da composição química com a parte mineral óssea, os fosfatos de cálcio são os substitutos ósseos mais amplamente utilizados em engenharia de tecido ósseo [96]. Recentemente, estes biocerâmicos, especialmente a hidroxiapatite e os fosfatos tricálcicos tornaram-se alvo de muitos estudos devido à possibilidade de serem utilizados, além de substitutos ósseos, simultaneamente como sistemas para libertação controlada de fármacos utilizados no tratamento de diferentes patologias ósseas, tais como a osteoporose [99], tumores ósseos ou osteomielite [80]. O desempenho de qualquer dispositivo de libertação de fármacos depende de muitos fatores entre os quais a microestrutura do biomaterial (a área de superfície, a permeabilidade e a porosidade), a capacidade de degradação da matriz e a solubilidade do fármaco. No caso dos CPCs, uma primeira questão a considerar é a distribuição do fármaco na sua estrutura [98]. Os CPCs são materiais porosos e apresentam uma baixa taxa de calor libertado durante a reação de presa permitindo assim a incorporação de vários tipos de fármacos incluindo antibióticos [92], agentes anti-tumorais [93], fatores de crescimento [100], proteínas [101] e peptídeos antimicrobianos [102].

Embora a porosidade possa ser uma limitação para as aplicações que requerem elevada resistência mecânica, é uma propriedade fundamental na utilização dos CPCs para veiculação de fármacos em sistemas de libertação controlada [48, 59]. Devido à presença de porosidade, a incorporação de fármacos nos CPCs não é apenas à superfície mas sim em

toda a matriz do cimento e em grandes quantidades, uma vez que uma estrutura muito porosa apresenta uma maior área superficial específica [58].

Neste trabalho, testou-se o antibiótico levofloxacina, indicado para o tratamento de infecções bacterianas, designadamente do osso (osteomielite) [104]. Desta forma, a libertação da levofloxacina a partir dos cimentos de fosfatos de cálcio foi avaliada a partir de amostras cilíndricas (Φ 6×12 mm) e com aproximadamente 700 mg de massa. Foram realizados estudos *in vitro* da libertação da levofloxacina a partir de cimentos com diferentes composições, como descrito anteriormente (Capítulo 3, secção 3.2.5). A Figura 19 apresenta a curva de calibração utilizada para a determinação das concentrações de LEVO durante os testes de libertação nas diferentes amostras analisadas.

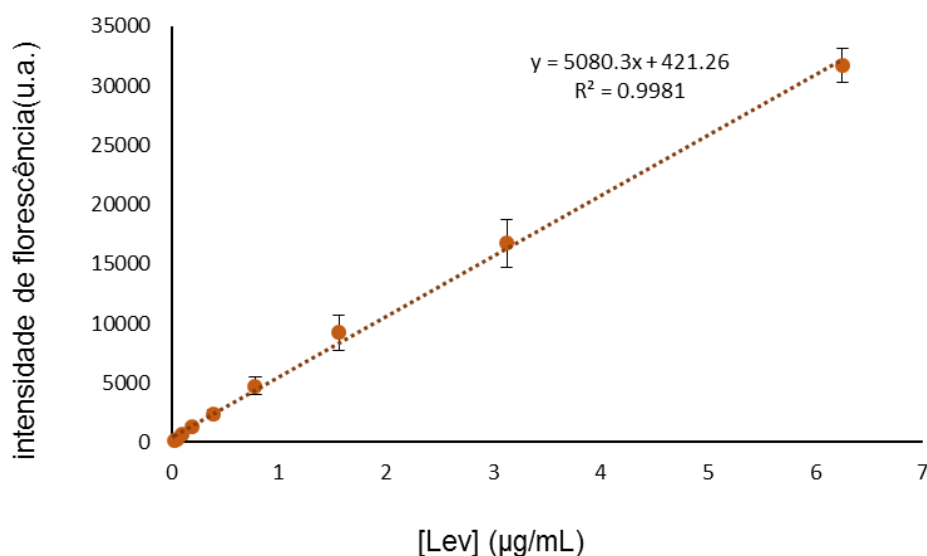


Figura 19: Curva de calibração da levofloxacina (n=3).

Sendo a porosidade um ponto-chave na libertação de fármacos através deste tipo de materiais, foram desenvolvidos CPCs com diferentes porosidades (Figura 17d), através de alteração de parâmetros como a distribuição de tamanho de partículas dos pós e a razão líquido/pó, com o objetivo de compreender e mostrar a influência dos mesmos na libertação da LEVO. As Figuras 20 e 22 apresentam os perfis de libertação da Levofloxacina em percentagem (%) e em massa (mL.g^{-1}) para os diferentes tempos estudados.

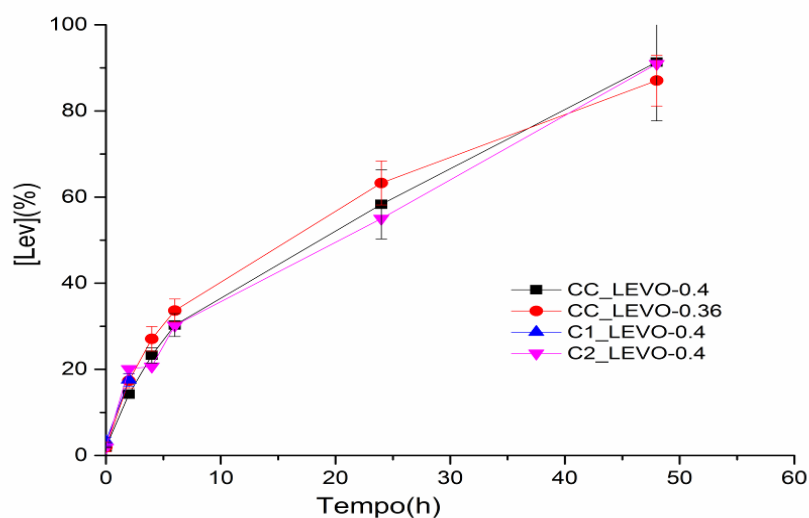


Figura 20: Perfis de liberação da levofloxacina, em percentagem, a partir dos cimentos CC_LEVO-0.4, CC_LEVO-0.36, C1_LEVO-0.4 e C2_LEVO-0.4, nos tempos 0,2,4,6,24 e 48 horas em PBS (n=3).

Os perfis de liberação da levofloxacina apresentados na Figura 20 e 22 foram determinados nos tempos, 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h e 48 h, com exceção para o cimento C1_LEVO-0.4 (sendo apenas determinados os tempos 0h e 2h). Embora todas as amostras apresentassem alguma degradação superficial durante o tempo de imersão em PBS, notando-se algumas partículas em suspensão, as amostras referentes ao cimento C1_LEVO-0.4, apresentaram ao fim de 2 h uma degradação superior sendo detetadas algumas fissuras nas amostras, como se pode verificar nas imagens da Figura 21. Desta forma, não se continuaram os ensaios para estes cimentos para tempos superiores a 2 h. Presume-se que a rápida degradação destes cimentos esteja relacionada com a não homogeneidade dos mesmos resultantes das condições do processo de secagem (possíveis variações de humidade).

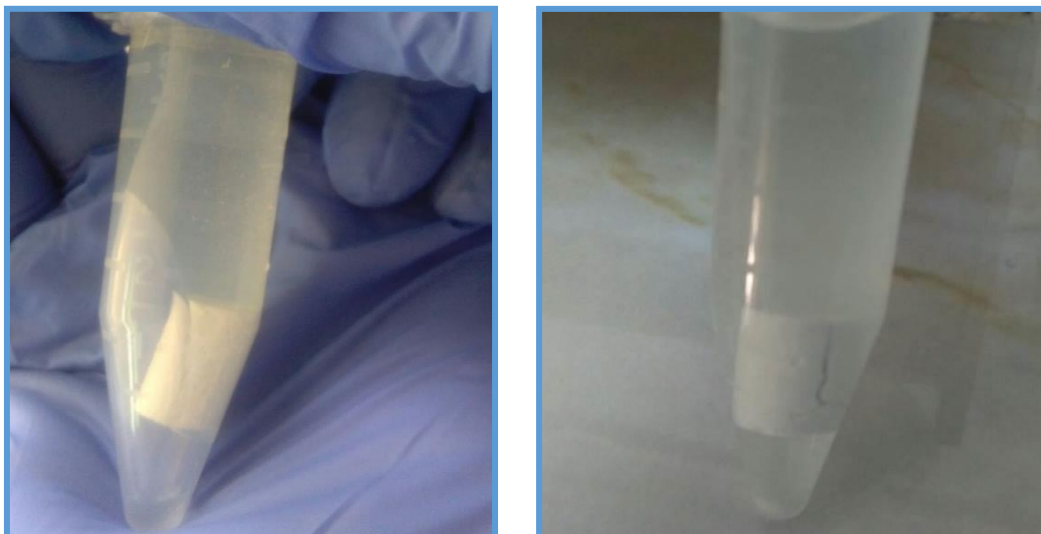


Figura 21: Imagens que ilustram a degradação dos cimentos C1_LEVO-0.4 durante 2 h de imersão em PBS.

Como mostram as Figuras 20 e 22, os perfis de liberação para as diferentes composições dos cimentos foram muito semelhantes. A liberação da levofloxacina foi relativamente rápida para todos os tipos de cimentos, verificando-se uma liberação superior a 30 % ao fim de 6 h e superior a 80 % ao fim de 48 h de imersão em PBS em todos os cimentos. Uma vez que as diferenças observadas na cinética de liberação do fármaco, das diferentes formulações de cimentos, foram pouco significativas, não é, deste modo, possível relacionar a influência da porosidade na taxa de liberação da levofloxacina. Ou seja, a diferença de porosidade entre as formulações não foi suficiente (Figura 17c e 17d) para influenciar de forma distinta a liberação do fármaco. Ao fim de 5 dias de imersão em PBS (120 h, resultados não apresentados), verificou-se que não ocorreu variação na concentração de LEVO em PBS, ou seja, não ocorreu qualquer liberação de LEVO no intervalo de tempo de 48 h a 120 h. Isto pode ser explicado, pela pouca quantidade de levofloxacina ainda presente na matriz dos cimentos, sendo necessário, provavelmente, mais tempo de incubação para a sua completa difusão.

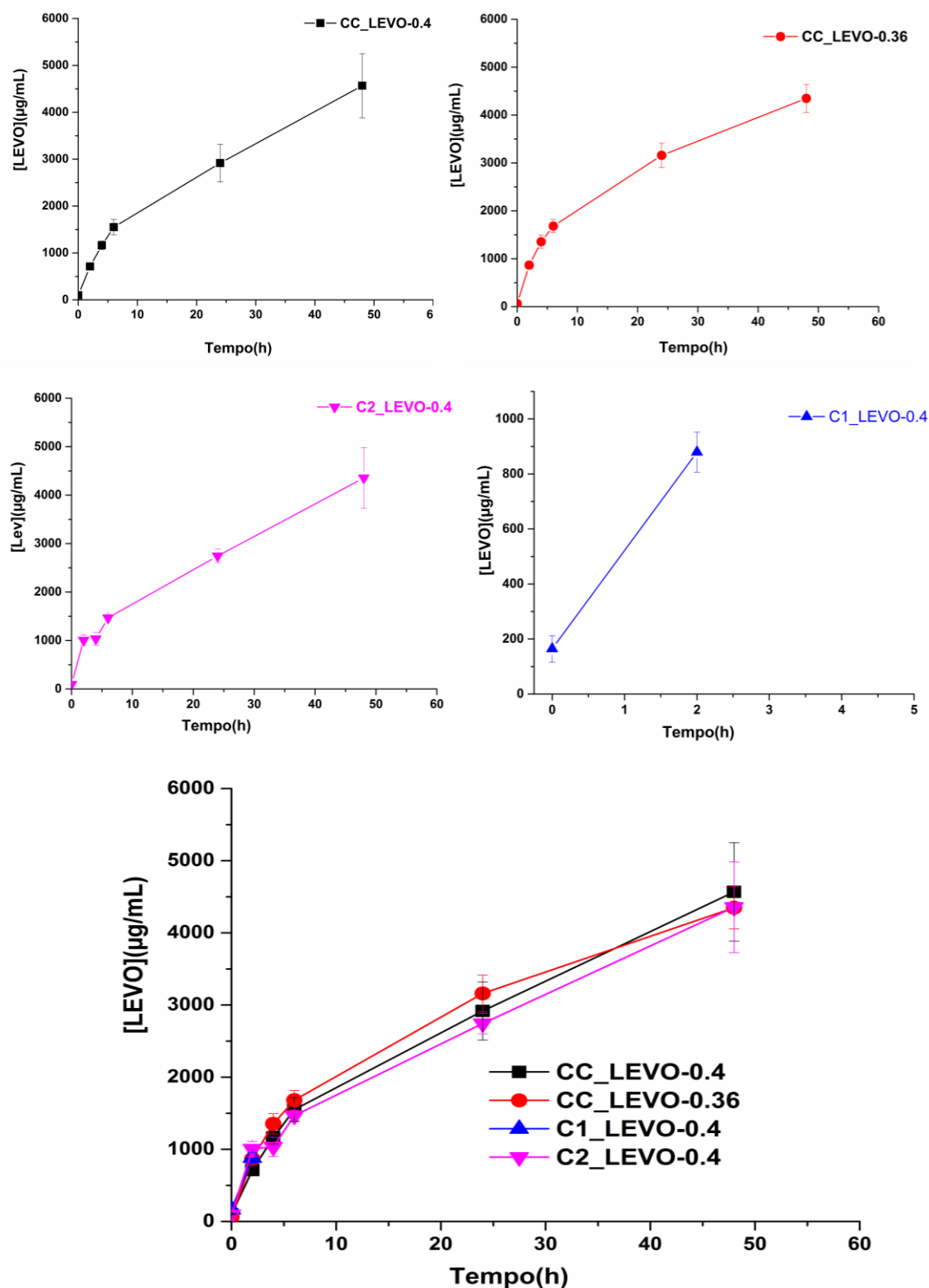


Figura 22: Perfis de liberação da levofloxacina a partir dos cimentos CC_LEVO-0.4, CC_LEVO-0.36, C1_LEVO-0.4 e C2_LEVO-0.4, nos tempos 0, 2, 4, 6, 24 e 48 horas em PBS.

A inexistência de uma correspondência entre a porosidade dos cimentos e a taxa de libertação do fármaco pode explicar-se pela relação entre o tamanho dos poros dos cimentos e o tamanho das partículas da levofloxacina. Mesmo sendo verificadas diferenças na porosidade total dos cimentos (Figura 17d) e tamanho de poros (Figura 18), estes tamanhos poderão ser todos suficientemente elevados para que as partículas de LEVO difundam facilmente através deles para a solução. Por outro lado, durante o processo de secagem pode ocorrer migração da LEVO da matriz dos cimentos para a sua superfície, aumentando aí a sua concentração, dando origem a uma rápida difusão para o PBS, justificando taxas de libertação semelhantes em todas as amostras.

De facto, existem estudos que já demonstraram que a cinética de libertação dos fosfatos de cálcio pode ser controlada por alteração de poros [105, 106]. M. Bohner e seus colaboradores produziram CPCs, da formulação β -TCP + MCPM, incorporados com o antibiótico sulfato de gentamicina. Efetuaram ensaios de libertação em PBS (pH=7.4) e testaram a influência de iões sulfato e a presença de aditivos poliméricos nas propriedades dos cimentos (propriedades mecânicas, taxa de libertação, porosidade). Os autores observaram que, a taxa de libertação do fármaco sulfato de gentamicina foi fortemente influenciada pela presença de iões sulfato nos cimentos e pela porosidade. O aumento do teor de iões sulfato causou uma diminuição na taxa de libertação do fármaco, devido à microestrutura mais fina obtida nos cimentos induzida pela presença dos respetivos iões. Em relação à porosidade, quando esta foi aumentada de 38 % para 69 %, a libertação de gentamicina quase triplicou [105].

Com intuito de avaliar as possíveis alterações da matriz dos cimentos, após o teste de libertação, todas as formulações de cimentos, depois de secas, foram observadas por SEM. As imagens da micrografia das superfícies de fratura obtidas encontram-se na Figura 23b. Curiosamente, comparando as imagens obtidas antes e depois do teste de libertação, Figuras 23a e 23b, existe uma ligeira diferença a nível dos microporos e da limpidez dos cristais presentes nas matrizes dos cimentos. As imagens relativas às matrizes dos cimentos após imersão em PBS (Figuras 23b) exibem cristais com um aspeto mais límpido quando comparados com os cristais presentes nas matrizes dos cimentos antes da imersão em PBS (Figura 23a).

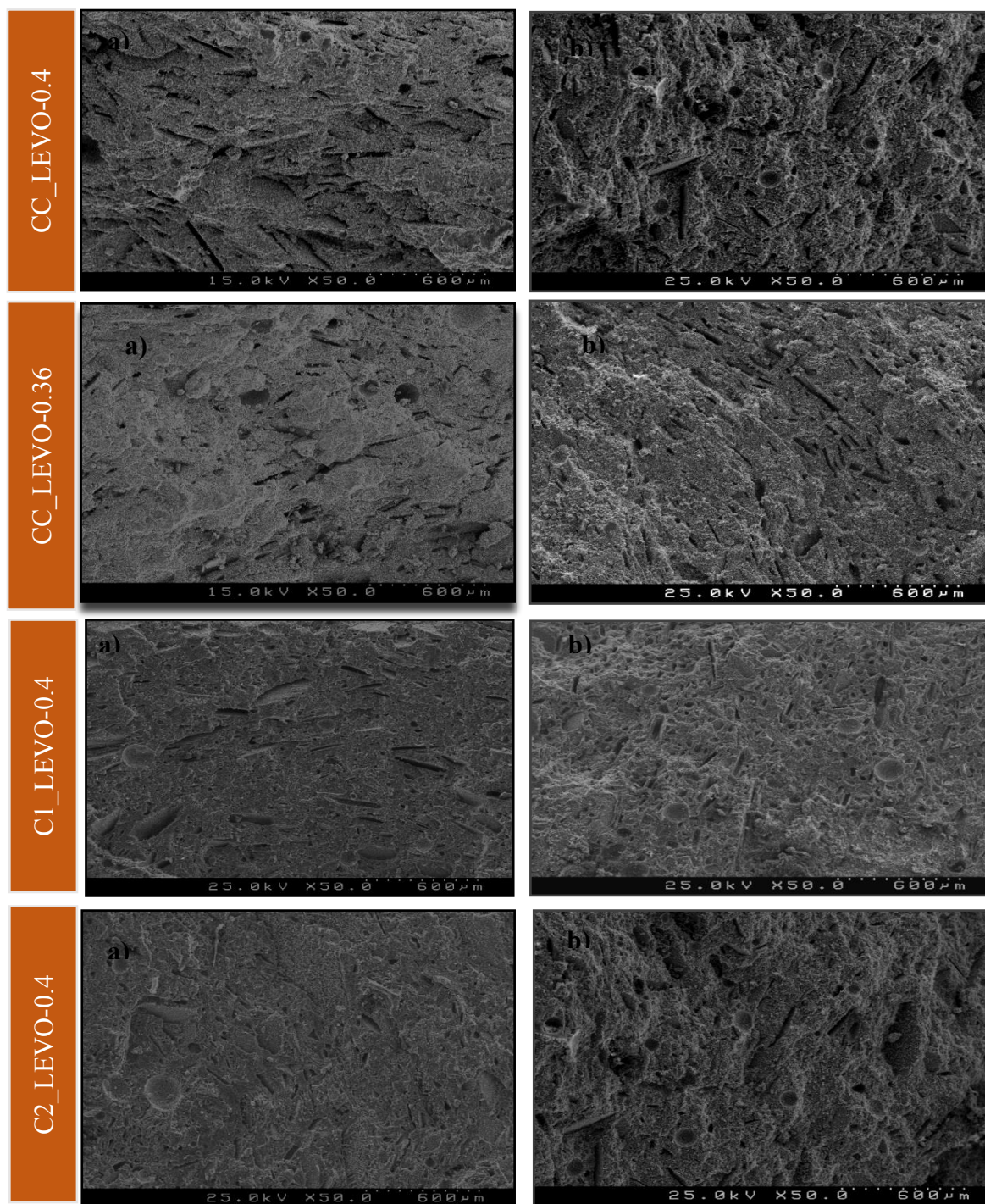


Figura 23: Microestruturas dos cimentos com o fármaco: a) antes do teste de libertação e b) depois do teste de libertação.

Geralmente, a libertação de um fármaco através dos CPCs acontece pelo processo de difusão através da matriz [98]. Desta forma, prevê-se, que o fármaco que aparentemente estaria dissolvido entre e nas superfícies dos cristais, ao difundir-se para a solução de PBS

provocasse a modificação da transparência dos cristais. A nível da morfologia dos cristais, nenhuma alteração óbvia é detetada. Ou seja, as microestruturas compreendem em grande parte cristais DCPD (mineral brushite), descrito anteriormente. Os espectros obtidos pela técnica FTIR (Figura 24) confirmam o mineral brushite como o composto principal na matriz nos cimentos.

Em relação à porosidade total, através das imagens obtidas, não é possível afirmar que se verificou um aumento ou uma diminuição da mesma após o teste de libertação em PBS. Saliente-se que um aumento ou diminuição da porosidade após o ensaio de libertação seria difícil de prever atendendo aos vários fatores a considerar. Por um lado, seria de esperar uma diminuição na porosidade devido à reação de dissolução e precipitação dos cimentos quando imersos em PBS, formando assim novos cristais, que, de certa forma, iriam preencher os espaços vazios na matriz dos cimentos. Por outro lado, devido à degradação e/ou dissolução dos cimentos e/ou levofloxacina durante o tempo de imersão em PBS, podem formar-se mais lacunas nas superfícies dos cimentos aumentando assim a quantidade de poros nos mesmos.

Como referido anteriormente, de forma a identificar a presença do fármaco levofloxacina nos cimentos utilizados para o teste de libertação, analisaram-se os cimentos através da técnica FTIR e os espectros obtidos são apresentados na Figura 24. São apenas apresentados os espectros referentes à formulação de cimento que apresentou melhores características para o enchimento de micromoldes.

De acordo com a literatura, as bandas dos espectros relativos aos cimentos apresentadas na Figura 24 são típicas do mineral brushite [107, 108]. Podem observar-se os modos vibracionais fundamentais dos grupos P-O e P-OH a $\sim 873, 986, 1065, 1139$ e 1650 cm^{-1} , respetivamente. Em relação ao fármaco levofloxacina, por comparações de espectros, não foi possível visualizar nenhum pico que confirmasse a sua presença nos cimentos quer antes ou após libertação. A quantidade de levofloxacina (2.5 wt%) utilizada para a preparação dos cimentos pode ser reduzida comparativamente à massa total do cimento, tornando assim difícil a deteção dos seus grupos funcionais nos cimentos. Testes adicionais seriam necessários para verificar a presença ou ausência de alguma quantidade de LEVO nos cilindros após os testes de libertação do fármaco.

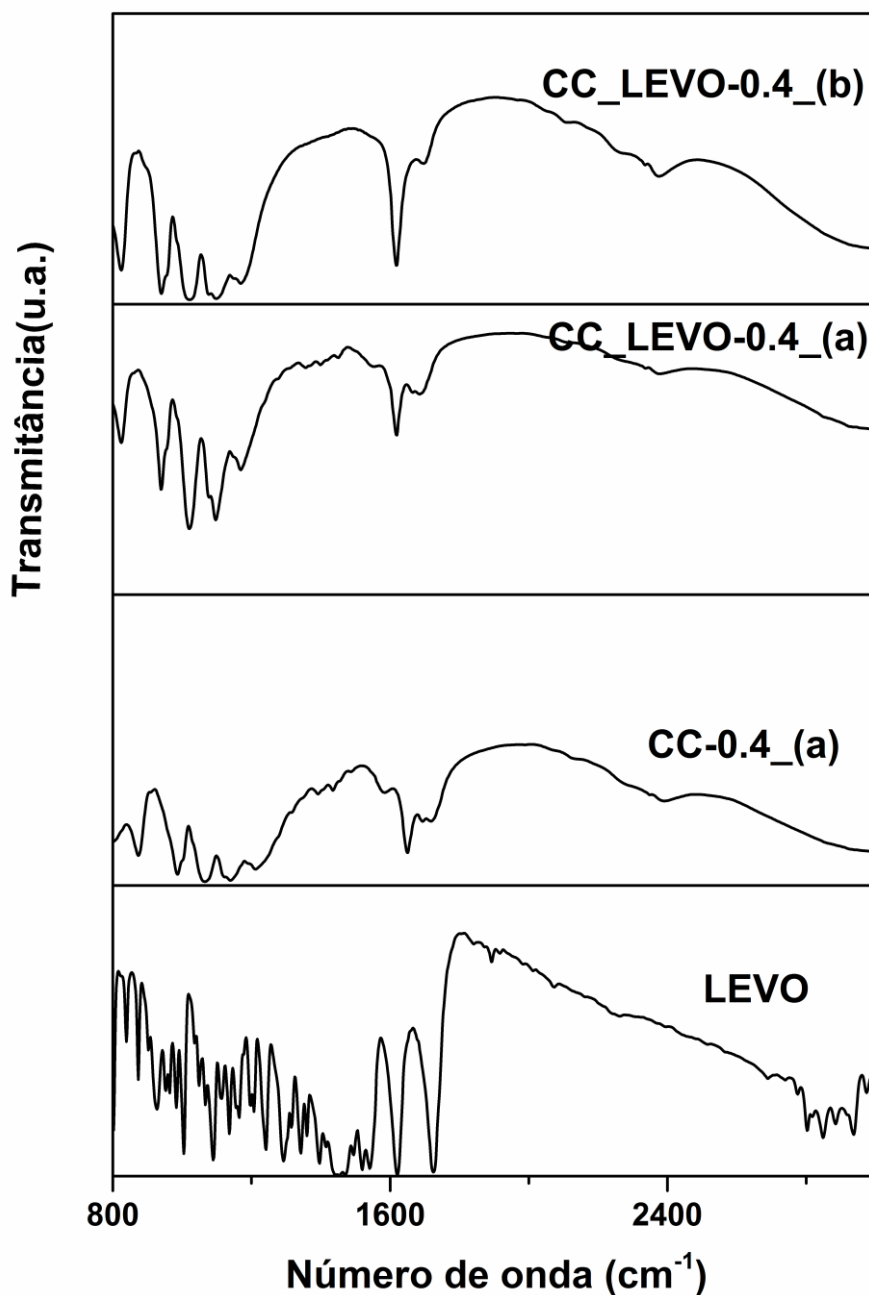


Figura 24: Espectros de FTIR correspondentes a: LEVO = fármaco levofloxacina; CC-0.4= espectro do cimento CC-0.4 sem Levofloxacina; CC_LEVO-0.4_(a) = cimento com levofloxacina antes do teste de liberação; CC_LEVO-0.4_(b) =cimento com levofloxacina depois do teste de liberação,

4.6. Enchimento dos moldes de microagulhas e caracterização das amostras

Os micromoldes usados para o enchimento das pastas cimentícias são à base de silicone (PDMS, polidimetilsiloxano) e foram preparados a partir de madres de microagulhas poliméricas. As imagens das madres e respectivos moldes estão apresentados na Figura 25.

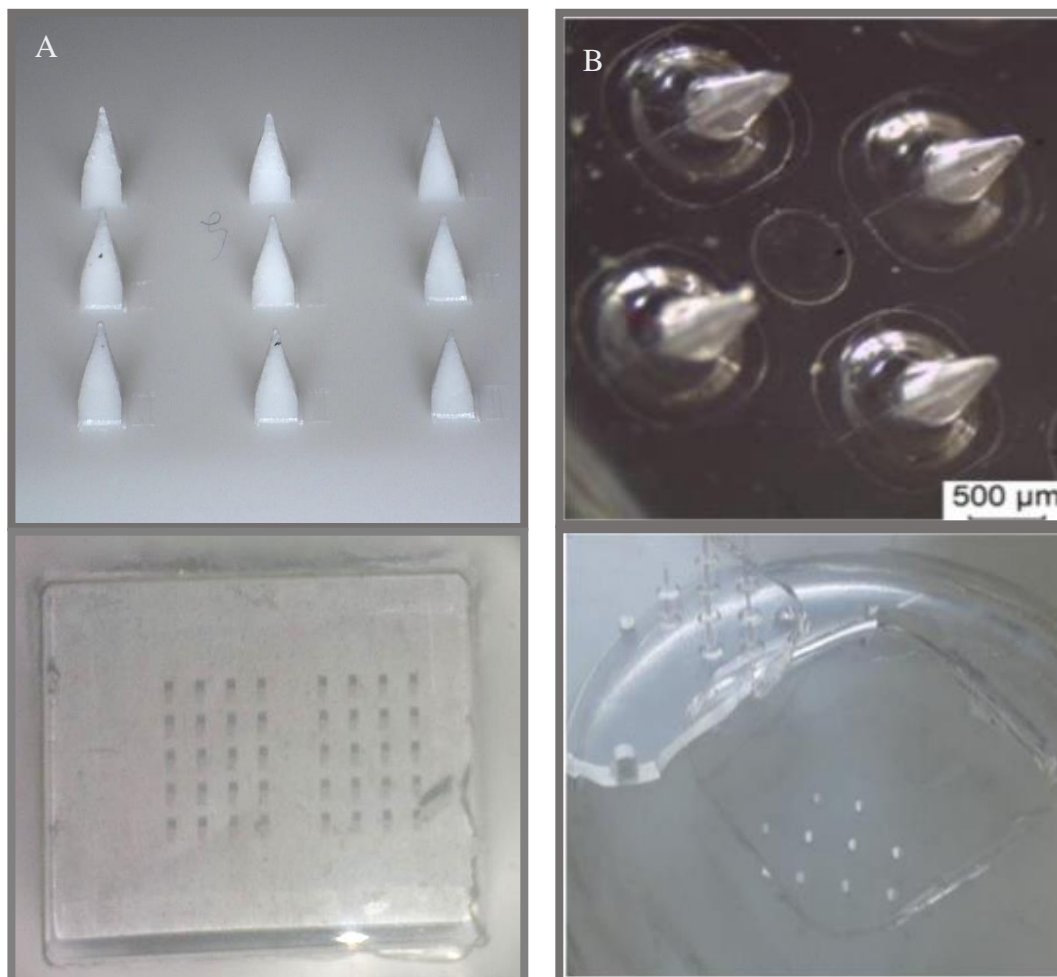


Figura 25: Madres poliméricas de microagulhas sólidas priamidais (A) e cónicas (B), e respectivos micromoldes à base de silicone.

Dimensões da Madre/micromolde A:

- ❖ Comprimento entre 800-900 µm;
- ❖ Diâmetro de base da microagulha entre 400-500 µm;
- ❖ Diâmetro da ponta de entre 40-50 µm;

Dimensões da Madre/micromolde B:

- ❖ Comprimento entre 1000- 1500 µm;
- ❖ Diâmetro de base da microagulha entre 700-800 µm;
- ❖ Diâmetro da ponta entre 15-16 µm

Usando estes micromoldes, procedeu-se ao enchimento com a formulação de cimento que apresentou um melhor compromisso entre viscosidade da pasta, tempo de presa inicial, e taxa de libertação de fármaco, que neste caso, foi o cimento CC_LEVO-0.4. A Figuras 26 apresenta imagens obtidas por microcopia ótica das microagulhas após desmoldagem, com imagens do dispositivo em A e B, e pormenores da matriz de microagulhas A nas imagens C e D.

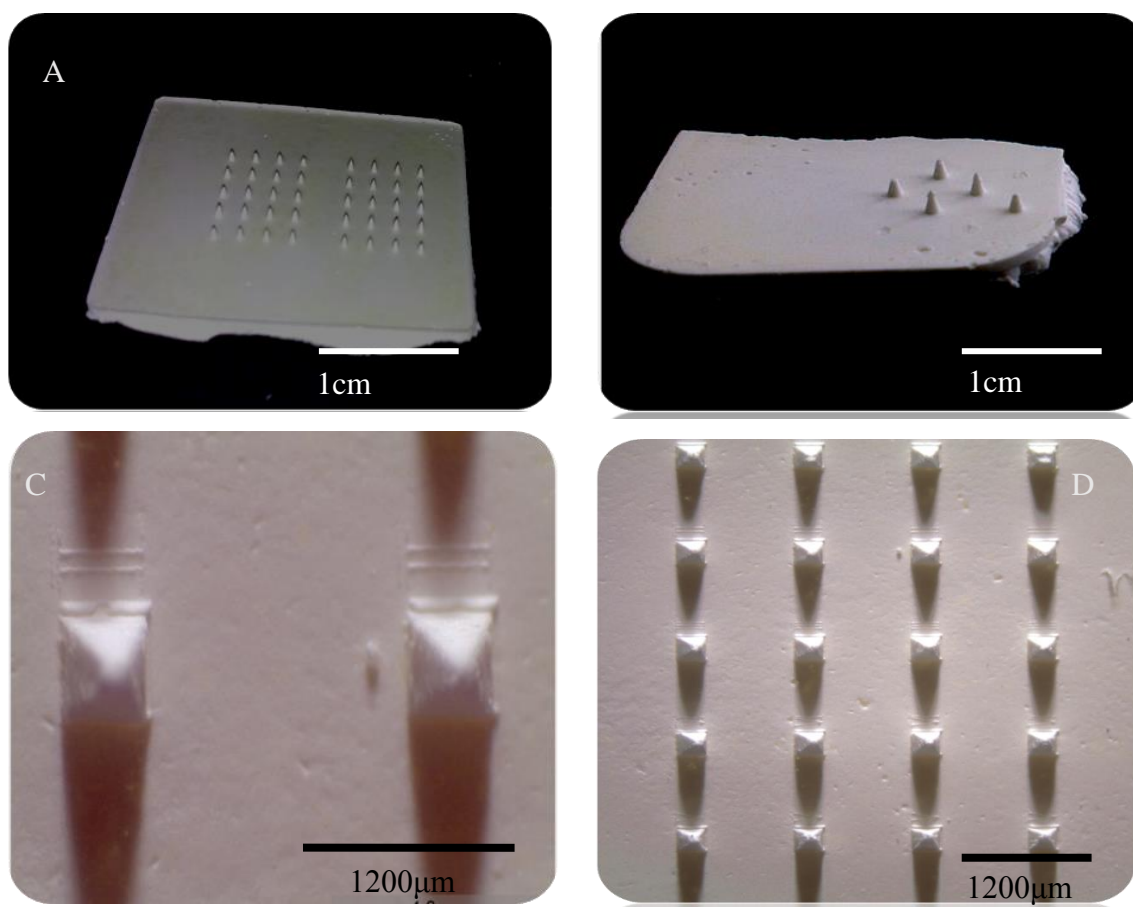


Figura 26: Imagens de microagulhas de cimentos com o fármaco levofloxacina, piramidais (A,C e D) e cónicas (B).

C e D imagens obtidas por lupa.

Analisando as imagens é possível verificar que, com a pasta cimentícia da formulação escolhida, o enchimento das microcavidades foi conseguido com relativa eficácia. Além disso, observa-se a matriz de microagulhas completa proveniente do molde A, indicando que todas as microcavidades foram preenchidas com a pasta cimentícia. Ambos os componentes

A e B foram desmoldados sem fissuras visíveis, mostrando que as propriedades mecânicas obtidas são suficientes para uma desmoldagem apropriada dos microcomponentes.

As microagulhas obtidas a partir dos moldes A e B foram igualmente observadas no SEM, estando as respectivas micrografias apresentadas nas Figuras 27 e 28.

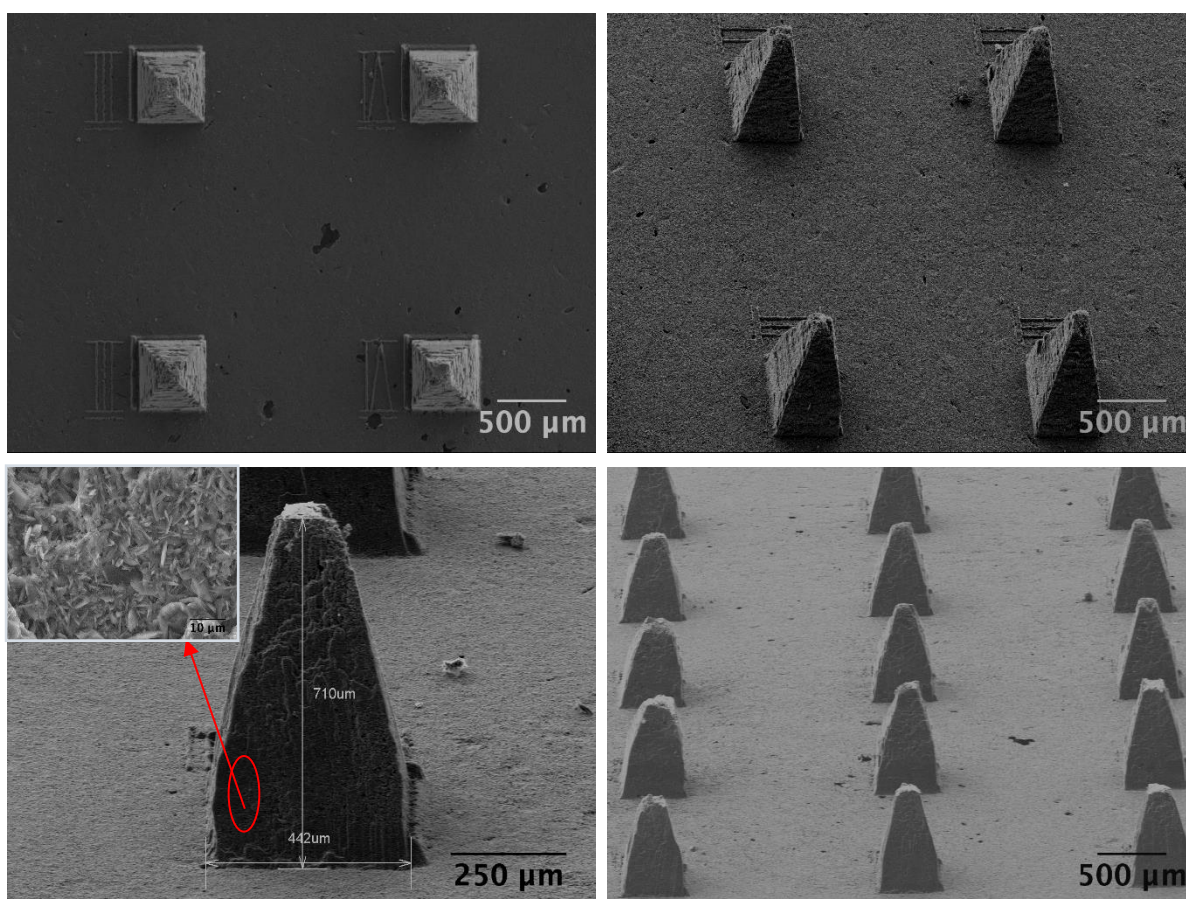


Figura 27: Imagens obtidas por SEM de microagulhas piramidais preparadas com a composição de cimentos CC_LEVO-0.4.

É possível verificar que as microcavidades do molde A com forma piramidal foram maioritariamente preenchidas por completo, originando microagulhas com pontas pontiagudas. No caso do molde B, onde as microagulhas são em forma de cone, de maior comprimento e com ponta bastante mais afiada, o enchimento das microcavidades com as pastas cimentícias foi menos eficaz, sendo possível notar inúmeras imperfeições nas microagulhas nomeadamente, o incompleto enchimento das microcavidades (microagulhas

sem pontas) e algumas microcavidades por encher (a matriz tem 9 microagulhas, foram desmoldadas apenas 5).

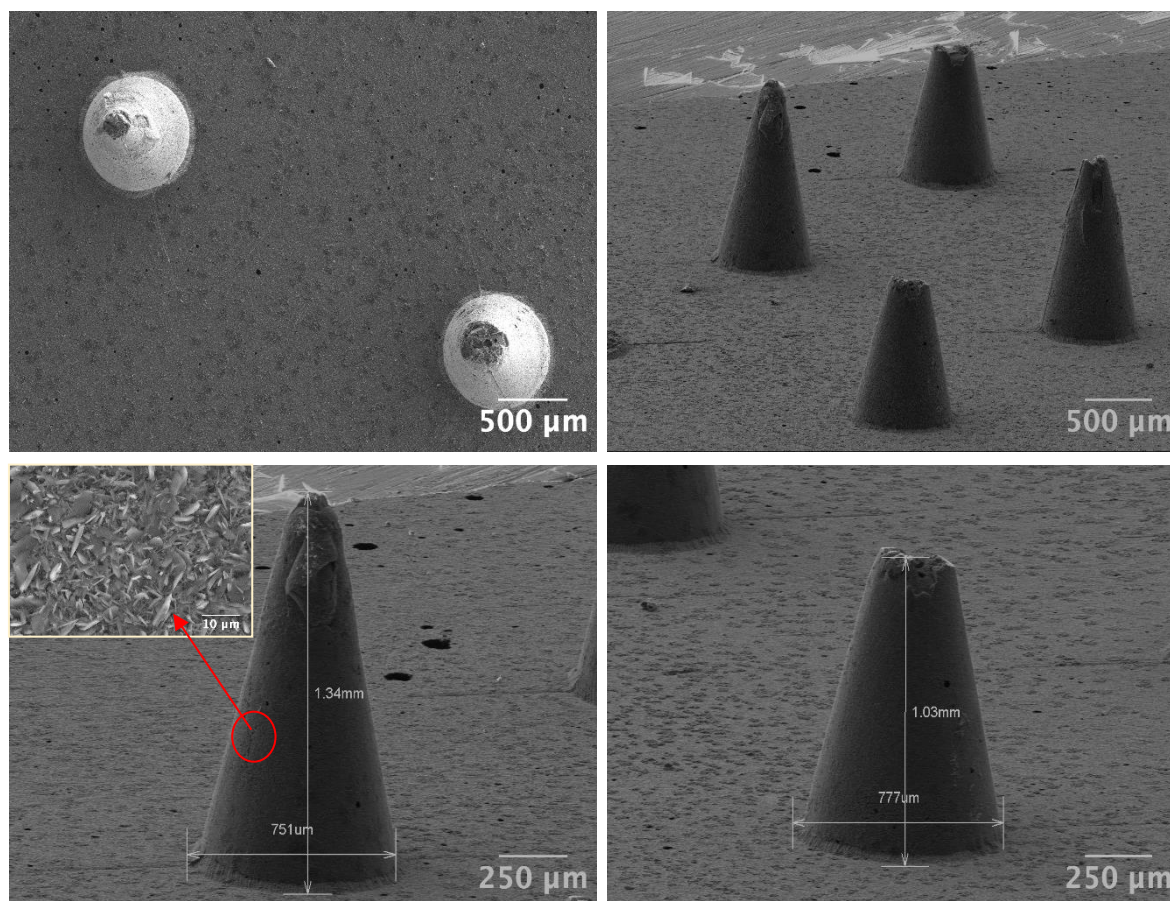


Figura 28: Imagens obtidas por SEM de microagulhas cônicas preparadas com a composição de cimentos CC_LEVO-0, para o micromolde em forma de cone (B).

O incompleto enchimento destas microcavidades, mais pronunciado no molde B, pode dever-se à forma e dimensões das microagulhas, juntamente com a viscosidade das pastas, uma vez que foi já demonstrado em trabalhos anteriores ser um método eficiente para enchimento de microagulhas de base cerâmica partindo de suspensões fluidas e concentradas [109, 110]. Tendo a pasta cimentícia viscosidades elevadas e pós de tamanhos relativamente elevados (PC) quando comparadas com suspensões coloidais, a capacidade de fluxo em maiores profundidades com pontas na ordem dos 15-20 µm é muito reduzida, mesmo com a ajuda do vácuo. Os tamanhos de partícula, quando elevados, impedem fortemente o preenchimento de microcavidades com estas dimensões tão reduzidas, especialmente nas

pontas afiadas. Por outro lado, as microcavidades vazias são resultado das desmoldagens. Sendo o molde B com microagulhas de maior comprimento, torna mais difícil a desmoldagem, resultando numa separação da microagulha da base do componente.

O método de enchimento das microcavidades utilizado neste trabalho (pastas fluídas e sob vácuo), embora tendo resultado para as microagulhas piramidais, pode não ser o método mais indicado para enchimento de microcavidades com pastas cimentícias. Contudo, apesar dos resultados menos favoráveis obtidos, este trabalho propõe um sistema promissor de produção de microagulhas. Comparando com os resultados obtidos por Cai et al. [15] foi possível obter neste trabalho microagulhas com dimensões na ordem de 1 mm de altura (Figura 28, microagulha sem ponta), 5 vezes superiores às obtidas nesse estudo. Estes sistemas apresentam propriedades vantajosas na libertação de fármacos quando comparados com os materiais e processos de fabrico atualmente existentes na produção de microagulhas.

Capítulo 5

Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros

5. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

Tendo em conta o objetivo principal proposto neste trabalho, pode concluir-se que foi possível desenvolver com sucesso pastas cimentícias para o enchimento de micromoldes com formas pontiagudas contendo um fármaco na sua composição. A pasta cimentícia com melhor compromisso entre fluidez e tempo de presa necessários para o enchimento e propriedades mecânicas adequadas para a desmoldagem sem danificação das microagulhas foram as obtidas com o pó comercial.

Resumidamente, dos resultados obtidos nas diferentes etapas podem retirar-se as seguintes conclusões:

- A razão Ca/P e o controlo rigoroso do pH nas sínteses de pós de fosfatos de cálcio são fatores essenciais a controlar para a obtenção de pós de β -TCP puros;
- O líquido de presa utilizado para a preparação dos cimentos (ácido cítrico), não pareceu interferir na integridade da levofloxacina (resultados obtidos pelo FTIR-ATR);
- A razão líquido/pó influencia fortemente as propriedades mecânicas e porosidade dos cimentos;
- A adição da levofloxacina nos cimentos provocou um aumento da viscosidade nas pastas cimentícias e um aumento nos tempos de presa (IST e FST) em todas as formulações de cimentos testados;
- A presença de LEVO não influenciou significativamente as fases formadas nos cimentos;
- A presença de LEVO não influenciou significativamente propriedades mecânicas e porosidade total dos cimentos;
- Todos os cimentos apresentaram valores de resistência à compressão relativamente elevados, apresentando valores superiores a 20 Mpa, o que poderá ser um bom indicativo para a aplicação pretendida (perfuração da pele);
- Em relação à cinética de libertação do fármaco nos cimentos, verificou-se que a libertação foi idêntica para todas as composições de cimentos estudados, verificando-se uma libertação relativamente rápida, cerca de 90 % ao fim de 48 horas;

- Não foi possível observar uma relação entre a taxa de libertação do fármaco com as porosidades obtidas nos cimentos;
- A pasta cimentícia que apresentou melhores propriedades para o enchimento dos micromoldes foi a preparada a partir do pó comercial com uma razão líquido/pó de 0, mL.g⁻¹, CC_LEVO-0.4.

Os resultados obtidos no decorrer desse trabalho mostram que estes microcomponentes apresentam propriedades promissoras para futuras aplicações biomédicas. As microagulhas à base de cimentos de fosfatos de cálcio obtidas por micromoldagem são relativamente fáceis de produzir, tornando assim o custo de produção mais económico. Por outro lado, são materiais não tóxicos que não acarretam problemas ao paciente.

Contudo, apesar dos avanços conseguidos durante este trabalho, existem ainda aspetos que necessitam de ser aprofundados e melhorados. Sugerem-se como trabalhos futuros os seguintes:

- Desenvolver/estudar um método de enchimento de micromoldes mais eficiente para pastas cimentícias com elevada viscosidade;
- Desenvolver moldes em diferentes materiais e com geometria e tamanho de microagulhas diferentes.
- Otimizar o método de mistura dos cimentos de modo a obter uma melhor homogeneidade dos pós com o fármaco, nomeadamente controlar a velocidade de rotação e o tempo;
- Avaliar a distribuição da levofloxacina ao longo dos microcomponentes, de forma a verificar se há ou não migração de LEVO durante a secagem.
- Obter cimentos com porosidade bastante mais fina de forma a conseguir relacionar a porosidade com a taxa de libertação do fármaco.
- Caracterizar mecanicamente as microagulhas;
- Avaliar a capacidade de perfuração na pele das microagulhas de cimentos de fosfatos de cálcio;
- Fazer testes de libertação transdérmica de fármacos utilizando microagulhas de cimentos de fosfatos de cálcio.

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

- [1] N. Sharma, B. Parashar, S. Sharma, and U. Mahajan, “Blooming pharma industry with transdermal drug delivery system,” *Indo Glob. J. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 262–278, 2012.
- [2] D. L. Dhamecha, A. A. Rathi, M. Saifee, S. R. Lahoti, and M. H. G. Dehghan, “Drug vehicle based approaches of penetration enhancement,” *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 24–46, 2009.
- [3] Dipen Patel; Sunita A. Chaudhary; Bhavesh Parmar; Nikunj Bhura, “Transdermal Drug Delivery System: A Review,” *Indian J. Res. Pharm. Biotechnol.*, vol. 1, no. 4, pp. 66–75, 2012.
- [4] V. V. Ranade, “Drug Delivery Systems. 6. Transdermal Drug Delivery,” *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 31, no. 5, pp. 401–418, 1991.
- [5] N. Akhtar, “Microneedles : An Innovative approach to Transdermal Delivery - A Review,” *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 18–25, 2014.
- [6] M. Shakeel, P. D. N, A. R. Ziyaurrahman, B. Akber, S. Bushra, and I. Feb, “Microneedle as a Novel Drug Delivery System: A Review,” *Int. Res. J. Pharm.*, vol. 2, no. 2, pp. 72–77, 2011.
- [7] M. W. Ashraf, S. Tayyaba, and N. Afzulpurkar, “Micro Electromechanical Systems (MEMS) Based Microfluidic Devices for Biomedical Applications,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 12, pp. 3648–3704, 2011.
- [8] S. Indermun, R. Luttge, Y. E. Choonara, P. Kumar, L. C. du Toit, G. Modi, and V. Pillay, “Current advances in the fabrication of microneedles for transdermal delivery,” *J. Control. Release*, vol. 185, no. 1, pp. 130–138, 2014.
- [9] K. van der Maaden, R. Luttge, P. J. Vos, J. Bouwstra, G. Kersten, and I. Ploemen, “Microneedle-based drug and vaccine delivery via nanoporous microneedle arrays,” *Drug Deliv. Transl. Res.*, pp. 397–406, 2015.
- [10] T. Omatsu, K. Chujo, K. Miyamoto, and M. Okida, “Metal microneedle fabrication using twisted light with spin,” vol. Vol. 18, N, pp. 17967–17973, 2010.
- [11] B. Chen, J. Wei, F. E. H. Tay, Y. T. Wong, and C. Iliescu, “Silicon microneedle array with biodegradable tips for transdermal drug delivery,” *Microsyst. Technol.*, vol. 14, no. 7, pp. 1015–1019, 2008.

- [12] G. Li, A. Badkar, S. Nema, C. S. Kolli, and A. K. Banga, “In vitro transdermal delivery of therapeutic antibodies using maltose microneedles,” *Int. J. Pharm.*, vol. 368, no. 1–2, pp. 109–115, 2009.
- [13] K. Lee, C. Y. Lee, and H. Jung, “Dissolving microneedles for transdermal drug administration prepared by stepwise controlled drawing of maltose,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 11, pp. 3134–3140, 2011.
- [14] K. Alyamani and C. Bach, “Intravenous Drugs - Microneedle Patches,” vol. 1, no. 5, pp. 53–60, 2014.
- [15] B. Cai, W. Xia, S. Bredenberg, and H. Engqvist, “Self-setting bioceramic microscopic protrusions for transdermal drug delivery,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 36, p. 5992, 2014.
- [16] E. Verron, I. Khairoun, J. Guicheux, and J.-M. Bouler, “Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review,” *Drug Discov. Today*, vol. 15, no. 13–14, pp. 547–552, 2010.
- [17] J. Z. Hilt and N. A. Peppas, “Microfabricated drug delivery devices,” *Int. J. Pharm.*, vol. 306, no. 1–2, pp. 15–23, 2005.
- [18] A. K. Gaikwad, “Transdermal drug delivery system: Formulation aspects and evaluation,” *Compr. J. Pharm. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–10, 2013.
- [19] J. Gupta, “Microneedles for Transdermal Drug Delivery in Human Subjects Microneedles for Transdermal Drug Delivery in,” *Design*, no. August, pp. 1–227, 2009.
- [20] Y. Perrie and T. Rades, “Controlling drug delivery,” in *Pharmaceutics- Drug Delivery and Targeting*, Second Edi., vol. 8, no. 3, 1999, pp. 1–24.
- [21] N. Roxherd, “A Fully Integrated Microneedle-based Transdermal Drug Delivery System,” School of Electrical Engineering, 2007.
- [22] Y. T. Kim, H. J. Park, H. K. Hong, D. W. Lee, and K. H. Lee, “Microneedle-Mediated Transdermal Delivery of Chondroitin Sulfate,” *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 6, no. 4, pp. 756–761, 2009.
- [23] K. Yan, H. Todo, and K. Sugibayashi, “Transdermal drug delivery by in-skin electroporation using a microneedle array,” *Int. J. Pharm.*, vol. 397, no. 1, pp. 77–83, 2010.
- [24] W. Martanto, S. P. Davis, N. R. Holiday, J. Wang, H. S. Gill, and M. R. Prausnitz,

- “Transdermal delivery of insulin using microneedles in vivo,” *Pharm. Res.*, vol. 21, no. 6, pp. 947–952, 2004.
- [25] E. González González, Y. C. Kim, T. J. Speaker, R. P. Hickerson, R. Spitler, J. C. Birchall, M. F. Lara, R. Hu, Y. Liang, and N. Kirkiles-Smith, “Visualization of plasmid delivery to keratinocytes in mouse and human epidermis,” *Sci. Rep.*, vol. 1, p. 158, 2011.
- [26] E. Gonzalez-Gonzalez, T. J. Speaker, R. P. Hickerson, R. Spitler, M. A. Flores, D. Leake, C. H. Contag, and R. L. Kaspar, “Silencing of reporter gene expression in skin using siRNAs and expression of plasmid DNA delivered by a soluble protrusion array device (PAD),” *Mol. Ther.*, vol. 18, no. 9, pp. 1667–1674, 2010.
- [27] J. C. Harper, S. M. Brozik, J. H. Flemming, J. L. McClain, R. Polsky, D. Raj, G. A. Ten Eyck, D. R. Wheeler, and K. E. Achyuthan, “Fabrication and testing of a microneedles sensor array for p-cresol detection with potential biofuel applications,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 1, no. 7, pp. 1591–1598, 2009.
- [28] Y. C. Kim, J. H. Park, and M. R. Prausnitz, “Microneedles for drug and vaccine delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 14, pp. 1547–1568, 2012.
- [29] K. van der Maaden, W. Jiskoot, and J. Bouwstra, “Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery,” *J. Control. Release*, vol. 161, no. 2, pp. 645–655, Jul. 2012.
- [30] R. S. Desale, K. S. Wagh, A. M. Akarte, D. T. Baviskar, and D. K. Jain, “Microneedle Technology for Advanced Drug Delivery : A Review,” *Int. J. PharmTech Res.*, vol. 4, no. 1, pp. 181–189, 2012.
- [31] J. S. Kochhar, W. J. Goh, S. Y. Chan, and L. Kang, “A simple method of microneedle array fabrication for transdermal drug delivery,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 39, no. January 2012, pp. 1–11, 2012.
- [32] J.-H. Park, S.-O. Choi, R. Kamath, Y.-K. Yoon, M. G. Allen, and M. R. Prausnitz, “Polymer particle-based micromolding to fabricate novel microstructures,” *Biomed. Microdevices*, vol. 9, no. 2, pp. 223–234, 2007.
- [33] P. G. Jung, T. W. Lee, D. J. Oh, S. J. Hwang, I. D. Jung, S. Mi. Lee, and J. S. Ko, “Nickel Microneedles Fabricated by Sequential Copper and Nickel Electroless Plating and Copper Chemical Wet Etching,” *Sensors Mater.*, vol. 20, no. 1, pp. 45–53, 2008.

- [34] R. F. Donnelly, T. R. R. Singh, and A. D. Woolfson, “Microneedle-based drug delivery systems: Microfabrication, drug delivery, and safety,” vol. 17, no. 4, pp. 187–207, 2010.
- [35] S. Bystrova and R. Lutge, “Micromolding for ceramic microneedle arrays,” *Microelectron. Eng.*, vol. 88, no. 8, pp. 1681–1684, 2011.
- [36] K. Ita, “Transdermal Delivery of Drugs with Microneedles—Potential and Challenges,” *Pharmaceutics*, vol. 7, no. 3, pp. 90–105, 2015.
- [37] M. R. Prausnitz, “Microneedles for transdermal drug delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 5, pp. 581–587, 2004.
- [38] N. Tabassum, A. Sofi, and T. Khuroo, “Microneedle Technology: A New Drug Delivery System,” *Int. J. Res. i Pharm. Biomed. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 59–62, 2011.
- [39] M. Paushnitz, M. Allen, and I. Gurjral, “United States Patent: Microneedle device for Extration and sesning of Bodify fluids,” 2008.
- [40] G. Lewis, “Properties of acrylic bone cement: state of the art review,” *J Biomed Mater Res*, vol. 38, no. 2, pp. 155–182, 1997.
- [41] A. Gisep and B. Rahn, “Calcium-Phosphate – Calcium-Sulphate Bone Cements Strucutre and Compression Strength after Setting,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 7, no. 2, pp. 34–35, 2004.
- [42] G. Lewis, “Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty: State-of-the-art review,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 76, no. 2, pp. 456–468, 2006.
- [43] M. Arora, E. K. Chan, S. Gupta, and A. D. Diwan, “Polymethylmethacrylate bone cements and additives: A review of the literature.,” *World J. Orthop.*, vol. 4, no. 2, pp. 67–74, 2013.
- [44] H. R. S. Hosseinzadeh, M. Emami, F. Lahiji, A. S. Shahi, A. Masoudi, and S. Emami, “The Acrylic Bone Cement in Arthroplasty,” in *Arthroplasty-Update*, 2013.
- [45] A. Ślósarczyk, J. Czechowska, Z. Paszkiewicz, and A. Zima, “New bone implant material with calcium sulfate and Ti modified hydroxyapatite,” *J. Achiev. Mater. Manuf. Eng.*, vol. 43, no. 1, pp. 170–177, 2010.
- [46] R. P. Tangri, R. Prasad, a K. Suri, and P. R. Agrawal, “ α -Calcium Sulphate Hemihydrate As Bone Substitute,” *Materials Processing Division*. 2004.
- [47] S. V. Dorozhkin, “Calcium orthophosphate cements for biomedical application,” *J.*

- Mater. Sci.*, vol. 43, no. 9, pp. 3028–3057, 2008.
- [48] M. P. Ginebra, T. Traykova, and J. A. Planell, “Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems : A review,” vol. 113, pp. 102–110, 2006.
- [49] B. Han, P. W. Ma, L. L. Zhang, Y. J. Yin, K. De Yao, F. J. Zhang, Y. D. Zhang, X. L. Li, and W. Nie, “ β -TCP/MCPM-based premixed calcium phosphate cements,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 8, pp. 3165–3177, 2009.
- [50] M. Habib, G. Baroud, F. Gitzhofer, and M. Böhner, “Mechanisms underlying the limited injectability of hydraulic calcium phosphate paste,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 1, pp. 250–256, 2008.
- [51] M. Böhner, “Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery,” *Eur. Spine J.*, vol. 10, no. SUPPL. 2, pp. 114–121, 2001.
- [52] M. Böhner, “Calcium orthophosphates in medicine: From ceramics to calcium phosphate cements,” *Injury*, vol. 31, no. SUPPL. 4, 2000.
- [53] B. Boonchom, “Parallelogram-like microparticles of calcium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$) obtained by a rapid precipitation route in aqueous and acetone media,” *J. Alloys Compd.*, vol. 482, no. 1–2, pp. 199–202, 2009.
- [54] J. R. Sutter, H. McDowell, and W. E. Brown, “Solubility study of calcium hydrogen phosphate. Ion-pair formation,” *Inorg. Chem.*, vol. 10, no. 8, pp. 1638–1643, Aug. 1971.
- [55] M. Landín, R. C. Rowe, and P. York, “Structural changes during the dehydration of dicalcium phosphate dihydrate,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 245–252, 1994.
- [56] G. R. Sivakumar, E. K. Giriya, S. Narayana Kalkura, and C. Subramanian, “Crystallization and Characterization of Calcium Phosphates: Brushite and Monetite,” *Cryst. Res. Technol.*, vol. 33, no. 2, pp. 197–205, 1998.
- [57] S. V. Dorozhkin, “Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications,” *Biomatter*, vol. 1, no. 2, pp. 121–164, 2011.
- [58] J. Benard, “Combinaisons avec le phosphore,” *Nouv. Trait. Chim. Minérale Masson, Paris*, p. 455, 1958.
- [59] J. Lemaitre, A. Mirtchi, and A. Mortier, “Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development,” *Silic. Ind.*, vol. 52, no. 9–10, pp. 141–146, 1987.

- [60] A. A. Mirtchi, J. Lemaitre, and N. Terao, "Calcium phosphate cements: study of the β -tricalcium phosphate — monocalcium phosphate system," *Biomaterials*, vol. 10, no. 7, pp. 475–480, 1989.
- [61] M. Bohner, P. Van Landuyt, H. P. Merkle, and J. Lemaitre, "Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 8, no. 11, pp. 675–681, 1997.
- [62] B. R. Constantz, B. M. Barr, I. C. Ison, M. T. Fulmer, J. Baker, L. McKinney, S. B. Goodman, S. Gunasekaren, D. C. Delaney, and J. Ross, "Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 43, no. 4, pp. 451–461, 1998.
- [63] S. V Dorozhkin, "Calcium orthophosphate cements for biomedical application," *J. Mater. Sci.*, vol. 43, no. 9, pp. 3028–3057, 2008.
- [64] C. J. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium orthophosphates: Studies in Inorganic Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 1994.
- [65] M. Bohner, "Reactivity of calcium phosphate cements," *J. Mater. Chem.*, vol. 17, no. 38, p. 3980, 2007.
- [66] C. P. A. T. Klein, K. de Groot, A. A. Drissen, and H. B. M. van der Lubbe, "Interaction of biodegradable β -whitlockite ceramics with bone tissue: An in vivo study," *Biomaterials*, vol. 6, no. 3, pp. 189–192, 1985.
- [67] S. Sarda, E. Fernández, M. Nilsson, M. Balcells, and J. A. Planell, "Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 61, no. 4, pp. 653–659, 2002.
- [68] F. T. Mariño, J. Torres, M. Hamdan, C. R. Rodríguez, and E. L. Cabarcos, "Advantages of using glycolic acid as a retardant in a brushite forming cement," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 83, no. 2, pp. 571–579, 2007.
- [69] F. Tamimi-Mariño, J. Mastio, C. Rueda, L. Blanco, and E. López-Cabarcos, "Increase of the final setting time of brushite cements by using chondroitin 4-sulfate and silica gel," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 18, no. 6, pp. 1195–1201, 2007.
- [70] S. Deb, *Orthopaedic Bone Cements*. England: Elsevier, 2008.
- [71] W. Chen, J. C. Lin, and C. Ju, "Transmission electron microscopic study on setting mechanism of tetracalcium phosphate/dicalcium phosphate anhydrous-based calcium phosphate cement," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 64, no. 4, pp. 664–671, 2003.

- [72] M. Ginebra, E. Fernández, F. Driessens, and J. A. Planell, “Modeling of the Hydrolysis of α -Tricalcium Phosphate,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 82, no. 10, pp. 2808–2812, 1999.
- [73] ASTM, “Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic Cement by Vicat Needle ASTM C191-92 . American Society for Testing and Materials,” *Annual Book of ASTM Standards*. Philadelphia, PA, USA, pp. 158–191, 1993.
- [74] ASTM, “Standard test Method for Time of Setting of Hydraulic Cement Paste by Gillmore Needles ASTM-C266-89.American Society for Testing and Materials,” *Annual Book of ASTM Standards*. Philadelphia, PA, USA, pp. 189–191, 1993.
- [75] K. Ishikawa and K. Asaoka, “Estimation of ideal mechanical strength and critical porosity of calcium phosphate cement,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 29, no. 12, pp. 1537–1543, 1995.
- [76] ASTM, “F451,Standard Specification for Acrylic Bone Cement,” *ASTM International*. West Conshocken, PA, 2008.
- [77] M. P. Hofmann, A. R. Mohammed, Y. Perrie, U. Gbureck, and J. E. Barralet, “High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 1, pp. 43–49, Jan. 2009.
- [78] J. C. Barralet, J.E, T., Gaunt, Wright,J, Gibson, L.R.,Knowles, “Effect of Porosity Reduction by Compaction on Compressive Strength and Microstructure of Calcium Phosphate Cement,” *J. Biomed. Mater. Res.*, no. 63, pp. 1–9, 2002.
- [79] E. B. Minelli and a. Benini, “PMMA as drug delivery system and in vivo release from spacers,” *Infect. Local Treat. Orthop. Surg.*, pp. 79–91, 2007.
- [80] A. D. Hanssen, “Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 437, no. 3, pp. 91–96, 2005.
- [81] S. Gunasekaran, K. Rajalakshmi, and S. Kumaresan, “Molecular Structure , Vibrational Spectroscopic Analysis of Levofloxacin by Density Functional method,” vol. 2, no. 3, pp. 6–9, 2013.
- [82] M. West, B. R. Boulanger, C. Fogarty, A. Tennenberg, B. Wiesinger, M. Oross, S. C. Wu, C. Fowler, N. Morgan, and J. B. Kahn, “Levofloxacin compared with imipenem/cilastatin followed by in adult patients with nosocomial pneumonia: a multicenter, randomized, open-label study,” vol. 25, no. 2, pp. 485–506, 2003.
- [83] I. Sousa, V. Claro, J. L. Pereira, A. L. Amaral, L. Cunha-Silva, B. De Castro, M. J.

- Feio, E. Pereira, and P. Gameiro, "Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper(II) levofloxacin ternary complex," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 110, pp. 64–71, 2012.
- [84] P. M. C. Torres, S. I. Vieira, A. R. Cerqueira, S. Pina, O. A. B. Da Cruz Silva, J. C. C. Abrantes, and J. M. F. Ferreira, "Effects of Mn-doping on the structure and biological properties of β -tricalcium phosphate," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 136, pp. 57–66, 2014.
- [85] P. M. C. Torres, J. C. C. Abrantes, A. Kaushal, S. Pina, N. Döbelin, M. Bohner, and J. M. F. Ferreira, "Influence of Mg-doping, calcium pyrophosphate impurities and cooling rate on the allotropic $\alpha \leftrightarrow \beta$ -tricalcium phosphate phase transformations," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 36, no. 3, pp. 817–827, 2016.
- [86] J. Coates, "Interpretation of Infrared Spectra , A Practical Approach," *Encycl. Anal. Chem.*, pp. 10815–10837, 2000.
- [87] S. Kannan, S. Pina, and J. M. F. Ferreira, "Formation of strontium-stabilized β -tricalcium phosphate from calcium-deficient apatite," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 89, no. 10, pp. 3277–3280, 2006.
- [88] P. M. C. Torres, S. Gouveia, S. Olhero, A. Kaushal, and J. M. F. Ferreira, "Injectability of calcium phosphate pastes: effects of particle size and state of aggregation of β -tricalcium phosphate powders," *Acta Biomater.*, vol. 21, pp. 204–216, 2015.
- [89] F. C. M. Driessens, M. G. Boltong, O. Bermudez, and J. A. Planell, "Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: A pilot study," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 4, no. 5, pp. 503–508, 1993.
- [90] A. A. Mirtchi, J. Lemaître, and E. Hunting, "Calcium phosphate cements: action of setting regulators on the properties of the β -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements," *Biomaterials*, vol. 10, no. 9, pp. 634–638, 1989.
- [91] G. Mestres, K. Kugiejko, D. Pastorino, J. Unosson, C. Öhman, M. Karlsson Ott, M. P. Ginebra, and C. Persson, "Changes in the drug release pattern of fresh and set simvastatin-loaded brushite cement," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 58, pp. 88–96, 2016.
- [92] S. Hesarakı and R. Nemati, "Cephalexin-loaded injectable macroporous calcium phosphate bone cement," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 89, no. 2, pp. 342–352, 2009.

- [93] M. Zhiping Yang, MD; Dong Li, MD; Jian Han, MS; Jianmin Li, MD; Xin Li, MD; Zhenfeng Li, MD; Shuhong Li, “Incorporation-of-methotrexate-in-calcium-phosphate-cement-behavior-and-release-in-vitro-and-in-vivo,” *Orthopedics*, vol. 32, no. 1, 2009.
- [94] C. C. Furnas, “Grading aggregates-I.-Mathematical relations for beds of broken solids of maximum density,” *Ind. Eng. Chem.*, vol. 23, no. 9, pp. 1052–1058, 1931.
- [95] R. J. Farris, “Prediction of the viscosity of multimodal suspensions from unimodal viscosity data,” *Trans. Soc. Rheol.*, vol. 12, no. 2, pp. 281–301, 1968.
- [96] S. Bose, S. Tarafder, J. Edgington, and A. Bandyopadhyay, “Calcium phosphate ceramics in drug delivery,” *Jom*, vol. 63, no. 4, pp. 93–98, 2011.
- [97] Z. Yang, D. Li, J. Han, J. Li, X. Li, Z. Li, and S. Li, “Incorporation of methotrexate in calcium phosphate cement: behavior and release in vitro and in vivo,” *Orthopedics*, vol. 32, no. 1, 2009.
- [98] M.-P. Ginebra, C. Canal, M. Espanol, D. Pastorino, and E. B. Montufar, “Calcium phosphate cements as drug delivery materials,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 12, pp. 1090–1110, Sep. 2012.
- [99] M. Otsuka, Y. Matsuda, A. A. Baig, A. Chhetry, and W. I. Higuchi, “Calcium-level responsive controlled drug delivery from implant dosage forms to treat osteoporosis in an animal model,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 42, no. 3, pp. 249–258, 2000.
- [100] E. J. Blom, J. Klein-Nulend, J. G. C. Wolke, M. a J. van Waas, F. C. M. Driessens, and E. H. Burger, “Transforming growth factor-beta1 incorporation in a calcium phosphate bone cement: material properties and release characteristics,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 59, no. 2, pp. 265–72, 2002.
- [101] X. H. H. K. Weir Michael D., “Osteoblastic Induction on Calcium Phosphate Cement-Chitosan Constructs for Bone Tissue Engineering,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 94, no. 1, pp. 223–233, 2011.
- [102] H. P. Stallmann, R. de Roo, C. Faber, A. V. N. Amerongen, and P. I. J. M. Wuisman, “In vivo release of the antimicrobial peptide hLF1-11 from calcium phosphate cement,” *J. Orthop. Res.*, vol. 26, no. 4, pp. 531–8, 2008.
- [103] M. Espanol, R. A. Perez, E. B. Montufar, C. Marichal, A. Sacco, and M. P. Ginebra, “Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 7, pp. 2752–2762,

- 2009.
- [104] N. Efstathopoulos, “Treatment of experimental osteomyelitis by Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus with bone cement system releasing grepafloxacin,” *Int. J. Care Inj.*, vol. 39, no. 12, p. 1384—1390, 2008.
- [105] M. Bohner, J. Lemaître, P. Van Landuyt, P. Zambelli, H. P. Merkle, and B. Gander, “Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 86, no. 5, pp. 565–572, 1997.
- [106] T. Suzuki, K. Arai, H. Goto, M. Hanano, J. Watanabe, and K. Tomono, “Dissolution tests for self-setting calcium phosphate cement-containing nifedipine,” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 50, no. 6, pp. 741–743, 2002.
- [107] L. Tortet, J. R. Gavarrí, and G. Nihoul, “Study of Protonic Mobility in $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Brushite) and CaHPO_4 (Monetite) by Infrared Spectroscopy and Neutron Scattering,” *J. Solid State Chem.*, vol. 16, no. 132, pp. 6–16, 1997.
- [108] F. Tamimi, J. Torres, R. Bettini, F. Ruggera, C. Rueda, M. López-Ponce, and E. Lopez-Cabarcos, “Doxycycline sustained release from brushite cements for the treatment of periodontal diseases,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 85, no. 3, pp. 707–714, 2008.
- [109] E. M. M. Lopes, “Microagulhas cerâmicas para libertação controlada de fármacos,” Universidade de Aveiro, 2014.
- [110] S. M. Olhero, E. Lopes, and J. M. F. Ferreira, “Fabrication of ceramic microneedles – The role of specific interactions between processing additives and the surface of oxide particles in Epoxy Gel Casting,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 36, no. 16, pp. 4131–4140, Dec. 2016.

