

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA DEPARTAMENTO DE QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



HIDROXIAPATITA MESOPOROSA PURA E MODIFICADA ORGANICAMENTE COM GRUPOS NITROGENADOS – SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E USO COMO CARREADORA DE FÁRMACOS



OBERTO GRANGEIRO DA SILVA

João Pessoa - PB – Brasil Outubro/2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA DEPARTAMENTO DE QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

HIDROXIAPATITA MESOPOROSA PURA E MODIFICADA ORGANICAMENTE COM GRUPOS NITROGENADOS – SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E USO COMO CARREADORA DE FÁRMACOS

nn

Oberto Grangeiro da Silva

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de doutor em química.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Gardênnia da Fonseca Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Rosa Valéria de S. Amorim Ao grande **Deus** dedico este trabalho em um humilde ato de agradecimento pelas grandes obras em minha vida acadêmica. Agradeço ainda por ter colocado ao meu lado as pessoas certas durante esta caminhada.

Dedico ainda este trabalho aos meus pais, **Tarcizio (in memória) e** Marie, que me direcionaram nos bons caminhos da vida valorizando a dignidade e o respeito. A minha esposa e amiga Edilene, a quem tanto amo, que sempre esteve presente nos momentos de alegrias e dificuldades. Aos **meus irmãos e irmã** a quem tanto amo.

AGRADECIMENTOS

✓ Às Profa. Dra Maria Gardênia da Fonseca e Profa. Rosa Valéria de S.
 Amorn pela orientação, confiança e oportunidade a mim prestada, permitindo a realização deste e de outros trabalhos;

 ✓ Aos professores do LCCQS, Dra. Luiza Nokuto Hirota Arakaki, Dr. José Geraldo de Paiva Espínola, Dr. Severino Francisco de Oliveira por toda colaboração, apoio e incentivo;

Á Profa Dra Vandeci Dias dos Santos (UEPB) e seu esposo Prof. Dr.
 Afrânio Gabriel (UFPB) pelos incentivos e grande amizade;

 ✓ A todos os colegas do laboratório, que fazem ou fizeram parte da equipe durante o desenvolvimento deste: Albaneide, Ana Paula, Ricardo, Vera, Edson, Kaline, Ulysses, Michele, Cássio, Edson, Ramon, Cláudia, Franklin, Valdir, André, Victor Hugo, Jaqueline, Evandro, Evelyne, Handerson, Vaeldo, Hundemberg, Israel, Dariston, Andréa, Mirela, Marcia, Ane, Joseane, Fernanda, Sol, Aline, Camila e Ariane.

✓ Aos funcionários Marcos Pequeno, Rogério e Lucia pelo apoio oferecido;

✓ Aos amigos Albaneide, Ana Paula, Ricardo, Emanuel (LTM), Ulysses e
 Vera, Marcia, Ane e Fernanda pela grande amizade;

✓ Á CAPES pelo apoio financeiro;

 ✓ Ao Laboratório de Termoquímica de Materiais (LATMAT) do IQ/Unicamp na pessoa do Prof. Dr. Cláudio Airoldi;

 ✓ Ao amigo Ramon, Vaeldo, Kaline do IQ/Unicamp (LATMAT) pelo encaminhamento das minhas amostras;

A Welligton (LAQA) pelas ánalises de UV e colaboração

RESUMO

Título: Hidroxiapatita Mesoporosa Pura e Modificada Organicamente com Grupos
Nitrogenados – Síntese, Caracterização e Uso como Carreadora de Fármacos
Autor: Oberto Grangeiro da Silva
Orientador: Profa. Dra. Maria Gardênnia da Fonseca
Co-orientador: Prof.ª Dr.ª Rosa Valéria de S. Amorim
Palavras chaves: Sólidos mesoporosos, Hidroxiapatita, Liberação Controlada de Fármacos.

Materiais mesoporosos apresentam um arranjo de poros ordenados e uma distribuição de poros muito estreita aliada a altas áreas superficiais, que são características estruturais interessantes para adsorção e liberação de moléculas bioativas. Outra característica relevante desses sólidos é a presença dos grupos hidroxilas livres nas paredes dos poros que podem reagir com grupos orgânicos funcionais. Os sólidos mesoporosos têm sidos sintetizados pelo uso de esceficas moléculas atuando como direcionadores na polimerização. Neste contexto, o presente trabalho descreve a síntese de hidroxiapatita mesoporosa utilizando caseína como um novo direcionador. As matrizes mesoporosas foram funcionalizadas covalentemente com aminopropil-, propiletilenodiamino-, propildietilenotriaminotrimetoxissilano. Os fosfatos precursores e derivados das reações de silanização foram caracterizados pelas técnicas de adsoção de N₂, análise elementar, difração de Raios-X, espectroscopia na região do infravermelho, RMN CP/MAS de ³¹P e ¹³C, termogravimetria e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os sólidos precursores e modifcados foram aplicados para estudos de emissão da soroalbumina bovina (BSA) em solução aquosa. BSA foi escolhida como molécula modelo. As isotermas obtidas através da adsorção de N2 demonstraram que as características estruturais da hidroxipatita mesoporosa podem ser controladas modificando parâmetros, tais como temperatura de calcinação, pH de síntese e concentração do surfactante. Estas isotermas também indicam que a caseína é um promissor biosurfactante na síntese de fosfatos de cálcio mesoporosos, obtendo áreas superficiais de 106 m².g⁻¹, cujo valor é superior aos dados disponíveis na literatura. Os resultados comprovaram que a extração do surfactante foi realizada durante o processo de lavagem dos sólidos, este fato credencia a caseína como um excelente biosurfactante na síntese de materiais mesoestruturados. A modificação superficial da hidroxiapatita mesoporosa com os agentes sililantes nitrogenados diminuiu consideravelmente a cinética de liberação da BSA. Os sólidos organicamente funcionalizados apresentaram uma taxa de liberação mais lenta, que diminuindo à medida que a cadeia orgânica do agente sililante aumentou. Isto mostra que os grupos orgânicos presentes neste sólido agem como uma barreira temporária que evita a rápida liberação da BSA. As isotermas de liberação de BSA mostraram perfis de liberação em duas etapas, uma liberação rápida inicial seguida por uma mais lenta, o que caracteriza que estes materiais se adequaram ao modelo de liberação através do mecanismo de difusão proposto por Higuchi.

ABSTRACT

Title: Pure Mesoporous Hydroxyapatite and Modified Organically with Nitrogencontaining Groups - Synthesis, Characterization and Use as Drug Delivery Materials

Author: Oberto Grangeiro da Silva

Supervisor 1: Profa. Dra. Gardênnia Maria da Fonseca

Supervisor 2: Profa. Dra. Valéria de S. Amorim

Keyswords: Mesoporous solids, Hydroxyapatite, Controlled Drug Release

Mesoporous materials present a highly ordered porous arrangement with narrow pore size distribution and high specific surface area, which are interesting features for adsorption and release of bioactive molecules. Another important feature of these solids is the presence of free hydroxyl groups on the pore walls that can react with functional organic moieties. Mesoporous solids have been synthesized by using specific molecules as templates which had to controlled polymerization in reactions. Thus, the present thesis describes the synthesis of mesoporous hydroxyapatite by using casein as a novel template. The mesoporous solids were with 3-aminepropyl-, 3-propylethylenediamine-, functionalized 3propyldiethylenetriaminetrimethoxysilanes. The precursor and the modified phosphates derived from the silanization reactions were characterized by N₂ adsorption, elemental analysis, X-ray diffraction, infrared spectroscopy, solid state ³¹P and ¹³C NMR, thermogravimetry and scanning electron microscopy (SEM). Both regular and mesoporous hydroxyapatites were studied on their ability to uptake and release bobine soroalbumine (BSA) from aqueous solutions. BSA was chosem as model guest compound. The nitrogen adsorption isotherms showed that structural aspects of the mesoporous hydroxyapatite are controlled by tuning experimental parameters, such as the calcination temperature, surfactant concentration, and pH. These isotherms also showed that casein is a promising biotemplate for synthesizing mesoporous calcium phosphates with improved values of specific surface area, such as 106 m² g⁻¹, which are higher than those found in the literature for analogous materials. Additionally, the template extraction was carried out during the washing process with water only, which avoided the need of spending time and energy with the calcinations step, and confirmed casein as an excellent template/surfactant in the synthesis of mesostructured materials. The BSA release kinetics decreased considerably as the silane amount increased on the silica surface. The organofunctionalized solids showed a lower BSA release rate, which decreased as the organic length chain increased. Thus, the amount of the organic groups, which contains nitrogen basic centers and interacts with BSA, controls the release process. The isotherms for releasing BSA showed a two step profile, with a fast release at the beginning, followed by a slower release rate, which fit the diffusion model proposed by Higuchi.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	02
1.1. OBJETIVOS	05
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
2.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DROGAS	07
2.1.1 Principais Mecanismos de Controle da Liberação de Fármacos	11
2.1.1.1 Difusão	11
2.1.1.2 Erosão	14
2.1.1.3 Expansão	15
2.1.1.4 Osmose	16
2.1.2 Cinética de Liberação de Drogas	17
2.2 HIDROXIAPATITA	19
2.3 MATERIAS POROSOS	23
2.3.1 Materiais Mesoporosos Ordenados	24
2.3.1.1 Métodos de síntese	28
2.2.1.1.1 Método do "Soft Template"	29
2.2.1.1.2 Método do "Hard Template"	32
2.4. UTILIZAÇÃO DE MATERIAIS MESOPOROSOS ORDENADOS NA	
LIBERAÇÃO DE DROGAS	36
2.4.1 Fatores que afetam a cinética de liberação de drogas em materiais	s com
estrutura mesoporosa	37
2.4.1.1 Diâmetro dos poros versus tamanho da molécula da droga	38
2.4.1.2 Natureza química das paredes dos poros – funcionalização da	
superfície	39
2.4.1.3 Área superficial	43
2.5 FOSFATOS DE CÁLCIO MESOPOROSOS	43
2.6 CASEÍNA	46
2.6.1 Micelas de caseína	50
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	57
3.1 REAGENTES	57
3.2 SOLVENTES	57
3.2.1 Purificação dos Solventes	58

3.3 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA MESOPOROSA	58
3.4 REAÇÃO DE SILANIZAÇÃO	.59
3.5 ENSAIOS DE ADSORÇÃO DE BSA NAS MATRIZES MESOPOROSAS	.60
3.5.1 Efeito do Tempo	60
3.5.2 Efeito da Concentração	62
3.5.3 Efeito do pH	62
3.6 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DE BSA NAS MATRIZES MESOPOROSAS	63
3.7 CARACTERIZAÇÕES	63
3.7.1 Adsorção de N ₂	63
3.7.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho, IV	64
3.7.3 Ánalise Elementar	64
3.7.4 Análise Termogravimétrica	.64
3.7.5 Difração de Raios-X	65
3.7.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética no Estado Sólido	65
3.7.7 Microscopia Eletrônica de Varredura	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	.67
4.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	67
4.1.1 Adsorção de N ₂	67
4.1.1.1 Efeito do Tratamento Témico Pós-Síntese	.74
4.1.1.2 Efeito do pH e da Concentração de Caseína	.78
4.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho e análise elementar	.82
4.1.3 Termogravimetria	87
4.1.4 Difração de Raios-X	94
4.1.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética no Estado Sólido	.96
4.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura	97
4.2 MATRIZES MODIFICADAS ORGANICAMENTE	98
4.2.1 Adsorção de N ₂	98
4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho e análise elementar	101
4.2.4 Difratometria de Raios-X	105
4.2.3 Termogravimetria	106
4.2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética no Estado Sólido de	
¹³ C	108
4.3 ENSAIOS DE ADSORÇÃO DE SORO ALBUMINA BOVINA – BSA	110

4.3.1 Influência do Tempo de Contato e da Concentração de BSA	110
4.3.2 Influência do pH	114
4.4 ESTUDO DA LIBERAÇÃO DA SORO ALBUMINA BOVINA – BSA	115
5. CONCLUSÕES	122
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Tipos diferentes de perfis de liberação para drogas8
Figura 2.2 - Concentração de uma droga modelo no sangue com (a) dosagem
tradicional da droga e (b) dosagem com liberação controlada9
Figura 2.3 – Liberação controlada de drogas a partir de um dispositivo de
reservatório típico: sistemas implantável ou oral (acima), sistema transdérmico
(abaixo)12
Figura 2.4 - Liberação de droga a partir de um sistema típico de matriz para
liberação controlada13
Figura 2.5 – Sistema de liberação controlada utilizando um campo magnético
oscilante13
Figura 2.6 – Mecanismo de configuração fechada de ferrogéis devido à agregação
de nanopartículas de magnetita sob ação de um campo magnético, provocando a
diminuição da porosidade do ferrogel14
Figura 2.7 - Degradação do microesferas de PLGA impregnadas com ibuprofeno por
erosão de volume (acima) e erosão superficial (abaixo)15
Figura 2.8 - Inchamento do hidrogel sensível ao pH (a) aniônico e (b) catiônico16
Figura 2.9 – Liberação de fármacos do sistema osmoticamente controlado17
Figura 2.10 – Raiz quadrada de Higuchi versus tempo para o estudo da liberação do
ibuprofeno a partir de materias microporosos e mesoporosos (\circ) MCM-41a; (∇) c-
MCM-41a; (∎) mSBA-3; (◊) μSBA-1 (●) μSBA -319
Figura 2.11 - Raio- X de um quadril com implantes de biocimento de hidroxiapatita
impregnada com antibióticos para o tratamento de artroplastia de quadril21
Figura 2.12 – O modelo das folhas dobradas de kanemita24
Figura 2.13 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das
estruturas pertencentes à família M41S: (a) MCM-50 (lamelar), (b) MCM-41
(hexagonal), e (c) MCM-48 (cúbica)25
Figura 2.14 - Conceito geral para a síntese de sílica mesoporosa com templete
micelar25
Figura 2.15 – Representação esquemática dos diferentes tipos de interação entre a
espécie inorgânica e o surfactante27

Figura 2.16 - Esquema da formação da estrutura inorgânica mesoporosa através da
rota LTC
Figura 2.17 - Representação do mecanismo cooperativo utilizando brometo de
cetiltrimetilamônio (C ₁₉ H ₄₂ BrN, CTAB) como surfactante
Figura 2.18 - Método de moldagem empregada na obtenção do carvão mesoporoso
ordenado (CMK-3) a partir da sílica mesoestruturada SBA-15. Etapa 1: impregnação;
etapa 2: carbonização
Figura 2.19 - Síntese dos materiais de carbono mesoporosos: (a) CMK-1 de MCM-
48, (b) CMK-3 do SBA-1534
Figura 2.20 - Esquema da formação da estrutura inorgânica mesoporosa através da
intercalação de um sólido lamelar por moléculas ou íons
Figura 2.21 - Liberação controlada de Ibuprofeno em MCM-41 com diferentes
tamanhos de poros
Figura 2.22 - Funcionalização pós-síntese de SBA-15 usando
organotrietoxisilanos40
Figura 2.23 - Liberação in vitro de ibuprofeno por SBA-15 organicamente
funcionalizada com grupos amina preparado por diferentes métodos41
Figura 2.24 – Esquema representativo da interação de moléculas de ibuprofeno
(esquerda) sobre uma parede de um poro de SBA-15 organicamente funcionalizada
pelo método pós - síntese e, da interação de moléculas de BSA (esquerda) sobre
uma parede de um poro de SBA-15 organicamente funcionalizado pelo método
síntese direta42
Figura 2.25 – Estrutura molecular da α - e β -caseína. Em destaque um resíduo de
prolina48
Figura 2.26 - Posições do resíduo do fosfato nas caseínas bovinas, indicando o
cluster do fosfoserila
Figura 2.27 – Formação do agregado micelar51
Figura 2.28 - A estrutura da micela de caseína através do modelo de sub-micelas,
mostrando os C-terminal das κ-caseína projetadas na extremidade da
micela53
Figura 2.29 - Ilustração da formação de redes no modelo de Holt. Alfa-caseína
(ambos α_{S1} - e α_{S2} -caseínas) é mostrado como bifuncional, beta é monofuncional. O
nanoaglomerados fosfato de cálcio é desenhado contendo 4 sítios para a facilitar a

Figura 3.2 - Sistema utilizado para modificação das hidroxiapatitas mesoporosas..60 Figura 3.3 - Espectro UV/vis da BSA-GB 250......61

Figura 4.1 - Isotermas de adsorção dos sólidos $HC_{1,0/7,0}$ calcinados a 573 K(a), 773 K(b) e 873 K(c), com taxa de aquecimento de 2 K.min⁻¹ (•), 10 K.min⁻¹ (•) e 25 K.min⁻¹ (•) em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa não calcinada (•)...70 **Figura 4.2** - Isotermas de adsorção dos sólidos $HC_{1,0/8,0}$ (a); $HC_{1,0/11,0}$ (b); $HC_{5,0/7,0}$ (c); $HC_{5,0/8,0}$ (d) e $HC_{5,0/11,0}$ (e) calcinados a 573 K com taxa de aquecimento de 10 K.min⁻¹ (•) em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa não calcinada (•)...71

Figura 4.3 – Esquema representativo da condensação capilar de N_2 (•) em

Figura 4.8 - Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ do sólido HC_{1,0/7,0} calcinado a 773 K com taxa de aquecimento de 25 K.min⁻¹ sob atmosferas de oxigênio (I) e Figura 4.9 – Influência do pH e da concentração de caseína sobre a área superficial de BET para as matrizes mesoporosas sintetizadas com concentração de caseína de 1 mg.ml⁻¹ (\blacksquare) e 5 mg.ml⁻¹ (\bullet)......78 Figura 4.10 - Relação dos raios das micelas de caseína com pH.......80 Figura 4.11 - Distribuição de tamanho de poros das matrizes mesoporosas calcinadas a 573 K com taxa de aquecimento de 10 K.min.⁻¹ e sintetizadas a utilizando concentração de caseína de 1mg.ml⁻¹ (a) e 5mg.ml⁻¹(b) a pH de 7,0 (∎), 8,0 (●) e 11,0 (▲)......81 Figura 4.12 - Espectro na região do Infravermelho dos sólidos HC_{1.0/7.0} tratados termicamente com taxa de aquecimento de 2 K.min.⁻¹(I), 10 K.min.⁻¹ (II) e 25 K.min.⁻¹ (c) e calcinados a 573 K(d), 773 K(c) e 873 K(b) em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa não calcinada (a)......82 Figura 4.13 - Espectro na região do Infravermelho dos sólidos mesoporosos HCxySL sintetizados utilizando concentrações de caseína de 1 mg.ml⁻¹ (I) e 5 mg.ml⁻¹ (II) a pH's de 7,0 (c), 8,0 (b) e 11,0 (a).....85 Figura 4.14 – Curva termogravimétrica TG (-) e DTG (-) das hidroxiapatitas puras (Hap) não mesoporosa (a) em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa HC_{5.0/11} Figura 4.15 - Curvas termogravimétricas dos sólidos HC_{1.0/7.0} tratados termicamente com taxa de aquecimento de 2 K.min.⁻¹(I), 10 K.min.⁻¹ (II) e 25 K.min.⁻¹ (c) e calcinados a 573 K (b), 773 K (c) e 887 K (d) em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa não calcinada (a)......89 Figura 4.16 – Curva termogravimétrica TG (I) e DTG (II) dos sólidos mesoporosos *HC*_{1.0}*SL* sintetizados a pH's de 7,0 (c), 8,0 (b) e 11,0 (a)......91 Figura 4.17 – Curva termogravimétrica TG (I) e DTG (II) dos sólidos mesoporosos *HC*_{5.0}*SL* sintetizados a pH's de 7,0 (c), 8,0 (b) e 11,0 (a).....91

em comparação com o sólido não funcionalizado (■)......100 **Figura 4.26 -** Espectros na região do infravermelho para as hidroxiapatitas Hap mesoporosa (I) e sua forma mesoporosa (II) modificadas pelos silanos N (b), NN (c) e NNN (d) em comparação com as matrizes não funcionalizadas (a)......101

Figura 4.31 – RMN CP/MAS de 13 C das hidroxiapatitas organofuncionalizadas (a) HAp-N, (b) HAp-NN e (c) HAp-NNN......109 Figura 4.32 - Influência do tempo na adsorção de BSA nas hidroxiapatitas Hap (I) e $HC_{5.0/11}$ (II) e suas formas organofuncinalizadas com os agentes sililantes N (a), NN (b) e NNN (c) em comparação com os sólidos não funcionalizados (d).....111 Figura 4.33 - Influência da concentração na adsorção de BSA nas hidroxiapatitas Hap (I) e HC_{5.0/11} (II) e suas formas organofuncinalizadas com os agentes sililantes N (a), NN (b) e NNN (c) em comparação com os sólidos não funcionalizados (d)..112 Figura 4.35 - Influência da pH na adsorção de BSA nas hidroxiapatitas Hap (I) e $HC_{5.0/11}$ (II) e suas formas organofuncinalizadas com os agentes sililantes N (a), NN (b) e NNN (c) em comparação com os sólidos não funcionalizados (d).....114 Figura 4.36 - Perfis de liberação de BSA das hidroxiapatitas Hap (I) e HC_{5.0/11} (II) e suas formas organofuncinalizadas com os agentes sililantes N (a), NN (b) e NNN (c) em comparação com os sólidos não funcionalizados (d), utilizando PBS como meio reacional......116

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Vantagens potencias da utilização do sistema de liberação controlada
de fármacos10
Tabela 2.2 - Desvantagens potencias da utilização do sistema de liberação
controlada de fármacos11
Tabela 2.3 - Principais compostos de fosfato de cálcio
Tabela 2.4 – Características das micelas de caseína
Tabela 4.1 - Resultados de adsorção de N2 para as hidroxiapatitas mesoporosas
sintetizadas com concentração de caseína 1mg.ml ⁻¹ a pH 7,068
Tabela 4.2 - Resultados de adsorção de N2 para as hidroxiapatitas mesoporosas
sintetizadas com concentração de caseína 1 mg.ml ⁻¹ a pHs 8,0 e 11,0 e 5 mg.ml ⁻¹ a
pHs 7,0; 8,0 e 11,069
Tabela 4.3 – Influência da temperatura de calcinação sobre a área superficial de
microporos obtidas pelo método plote t para as matrizes mesoporosas Hap-
CAS _{1,0/7,0}
Tabela 4.4 – Dados de síntese de alguns fosfatos de cálcio mesoporosos
encontrados na literatura79
Tabela 4.5 - Bandas de absorção na região do infravermelho da hidroxiapatita83
Tabela 4.6 - Análise elementar de carbono (C), Hidrogênio (H), Nitrogênio (N) do
sólido HC _{1,0/7,0} , após processos de lavagem e tratamento térmico pós-síntese em
comparação com a amostra não calcinada (*)84
Tabela 4.7 - Análise elementar de carbono (C), Hidrogênio (H), Nitrogênio (N) do
sólido HCxySL
Tabela4.8–Percentuaisdasperdasdemassaatravésdascurvas
termogravimétricas do sólido HC1,0/7,0, após tratamento térmico pós-síntese em
comparação com a amostra não calcinada (*)90
Tabela 4.9 – Percentuais das perdas de massa através das curvas
termogravimétricas dos sólidos $HC_{1,0/7,0}SL$, $HC_{1,0/8,0}SL$, $HC_{1,0/11}SL$, $HC_{5,0/7,0}SL$,
HC _{5,0/8,0} SL e HC _{5,0/11} SL
Tabela 4.10 - Resultados de adsorção de N ₂ para as hidroxiapatitas mesoporosas
HC _{5,0/11} organofuncionalizadas100

Tabela 4.11 - Análise elementar de carbono (C), Hidrogênio (H), Nitrogênio (N) e relação molar C/N experimental das hidroxiapatitas puras não mesoporosas organofuncionalizadas......103 Tabela 4.12 - Análise elementar de carbono (C), Hidrogênio (H), Nitrogênio (N) e C/N experimental das relação molar hidroxiapatitas mesoporosas organofuncionalizadas......103 Tabela 4.13 – Percentuais das perdas de massa através das curvas termogravimétricas dos sólidos Hap e HC_{5.0/11} modificada com os silanos N, NN e Tabela 4.14 – Valores de R da linearização das isotermas de dessorção de BSA segundo o modelo de Higushi.....119

SÍMBOLOS E ABREVIAÇÕES

Нар	Hidroxiapatita
DCPA	Fosfato dicálcio anidro
DCPD	Fosfato dicálcio dihidratado
OCP	Fosfato octacálcio
Ca–dHap	Hidroxiapatira deficiente em cálcio
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
α-TCP	Fosfato α- tricálcio
β-TCP	Fosfato β- tricálcio
TecCP	Fosfato tetracálcio
μm	Unidade micrometro
рН	Potencial hidrogeniônico
DRX	Difratometria de raios – X
к	Temperatura em Kelvin
mol	Unidade mol
dm ³	Unidade decímetro cúbico
mg	Unidade miligrama
g	Unidade grama
cm ³	Unidade centímetro cúbico
min	Unidade minuto
h	Hora
Nf	Quantidade de material adsorvido
Ni	Quantidade de de BSA inicial
Ns	Quantidade de BSA após o equilíbrio
Abs	Absorbância
B.E.T	Brauner, Emmet e Teller
B.J.H	Barret, Joyner e Halend
S _{BET}	Área Superficial de BET
Dp	Diâmetro de poro
Vp	Volume de poro
N	3-Aminopropiltrimetoxissilano
NN	

NNN	3-Propildietilenotriaminotrimetoxissilano
Нар–N	Hidroxiapatita silanizada com o silano N
Hap-NN	Hidroxiapatita silanizada com o silano NN
Hap-NNN	Hidroxiapatita silanizada com o silano NNN
НСху	Hidroxiapatita mesoporosa
HCxy-N	HCxy silanizada com o silano N
HCxy-NN	HCxy silanizada com o silano NN
HCxy-NNN	HCxy silanizada com o silano NNN
RMN	Ressonância magnética nuclear
CP	Polarização cruzada
MAS	Rotação do ângulo mágico
S	segundo
тG	Termogravimetria
DTG	Derivada termogravimétrica
δ	Deformação angular
ν	Deformação axial
nm	Unidade nanômetro
BSA	Soralbumina Bovina
PBS	
PI	Ponto isoelétrico
MCM	Concentração micelar crítica



1. INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas três décadas, tem havido um crescimento rápido na área de administração de medicamentos, na busca de novos sistemas de liberação controlada de drogas, uma vez que sistema de liberação controlada oferece algumas vantagens sobre os métodos convencionais que liberam o agente ativo em curto período de tempo. Algumas delas são: manutenção de níveis constantes do fármaco no organismo, implicando em uma maior eficiência na utilização do agente; aplicação do agente diretamente no sítio de ação, produzindo altas concentrações localizadas e evitando efeitos colaterais sistêmicos, já que o medicamento é, na maior parte, liberado localmente; menos frequência de administração do agente ativo, aumentando o conforto do paciente e a eficácia do tratamento (LINARES e BRIKGI, 2006). Nos últimos anos, diversos materiais, naturais e sintéticos têm sido testados como sistemas carreadores de drogas, incluindo polímeros naturais (colágeno, albumina, gelatina, agarose, alginato, carragenina, ácido hialurônico, dextrana, quitosana, ciclodextrinas); plástico (poliéster, poliamidas, polianidrido, polímeros acrílicos) (OLIVEIRA e LIMA, 2006); sílica (MANZANO et al, 2008); nanotubos de carbono (HILDER e HIL, 2008); zeólitas (HORCAJADA et al, 2006) e cimentos de fosfatos de cálcio (SUDO et al, 2008; SOUZA et al, 2008; YU et al, 2009; ANDERSON et al, 2005). Cada um deles apresenta características próprias que os tornam adequados para o uso em determinadas regiões do corpo ou determinadas drogas.

Em geral, um substrato potencial a ser usado como carreador de droga tem que ter a habilidade para incorporar uma droga, retê-la em um local designado e específico, e liberá-la progressivamente com o tempo dentro de tecidos circunvizinhos. São vantagens adicionais se estes materiais forem biodegradáveis (GINEBRA et al, 2006). Fosfatos de cálcio são excelentes candidatos para serem utilizados como dispositivos de liberação controlada, pois apresentam boa biocompatibilidade e propriedades osteocondutoras aliada a possibilidade de serem sintetizados em baixas temperaturas. Sistemas de liberação de fármacos à base de fosfatos de cálcio estão sendo muito investigados, principalmente no que se diz respeito à sua liberação *in vitro* com compostos tais como hormônios de crescimento, antibióticos, antiinflamatórios e quimioterápicos (HEYMANN e

PASSUTI, 1999). Em sistemas de liberação controlada de drogas envolvendo fosfatos de cálcio, apesar de apresentarem boa biocompatibilidade, à porosidade dessas matrizes é altamente heterogênea, o que torna um grande desvantagem, uma vez que não garante uma distribuição homogênea da droga através da matriz, afetando assim a taxa de liberação (GINEBRA et al, 2006). Portanto, a necessidade de suprir essa desvantagem tem conduzido a melhoras nesse campo através da utilização de materiais mesoporosos, quimicamente homogêneos, que possuem porosidade bem definida.

Desde a descoberta de materiais como sílica mesoporosa ordenada em 1992, a síntese e aplicações de sólidos mesoporosos tem recebido atenção intensiva, devido à sua estrutura altamente ordenada, variados tamanhos de poros e alta área superficial. Na última década, os materiais mesoporosos têm encontrado muitas aplicações, sobretudo nas áreas de separação, catálise, sensores e dispositivos (TAGUCHI e SCHUTH, 2005), entretanto devido à estrutura mesoporosa estável e propriedades superficiais bem definidas, materiais mesoporosos parecem ideais para encapsulamento de drogas farmacêuticas, proteínas e outras moléculas biogênicas. Nos últimos anos, o emprego de materiais mesoporosos para encapsulação e ainda liberação de uma variedade de moléculas de interesse farmacêutico vem sendo estudado (HARTMANN, 2005; YIU et al, 2005).

O aumento da área superficial resultado da nanoporosidade pode contribuir na capacidade de uma matriz mesoporosa no carregamento de drogas (FAN et al, 2007). Áreas superficiais elevadas e grandes volumes de poros geralmente têm sido exigidos para a utilização em adsorventes, e, além disso, o controle do tamanho dos poros aumenta a possibilidade de utilizar os compostos mesoestruturados para a adsorção seletiva de biomoléculas de tamanho nanômetrico (IKAWA et al, 2008).

Aliadas as propriedades estruturais e texturais encontradas nos materiais mesoporosos, ainda é possível funcionalizar sua superfície, tornando-o mais eficiente e seletivo como matriz carreadora de drogas, uma vez que ancoramento de grupos funcionais amina sobre matrizes mesoporosas causam mudanças no tamanho dos poros e a interação entre drogas e substrato, resultando em menor carregamento de drogas e taxa de liberação lenta, o que é desejável (WANG, 2009).

Fosfatos de cálcio mesoporosos apresentam uma arranjo de poros ordenados e uma distribuição de poros muito estreita, propriedades que não ocorrem com os fosfatos de cálcio convencionais, unem a versatilidade dos materiais mesoporosos, que são objetos de um números crescente de estudos em aplicações distintas, a interessantes propriedades biológicas dos fosfatos de cálcio convencionais. Entretanto, existem poucos relatos sobre a síntese de fosfatos de cálcio mesoestruturados. A falta de publicações a cerca da síntese de fosfatos de cálcio puro mesoporosos foi atribuída por FAN et al. (2007) a dificuldade de sintetizar óxidos mesoporosos que não sejam à base de sílica, principalmente as espécies de fosfato de cálcio, devido à dificuldade de controle eficiente sobre a cristalização, uma vez que os íons cálcio e fosfato mostram uma tendência de interagir fortemente entre si e, em seguida, não conseguem interagir com as moléculas de surfactante, o que dificulta a preparação de fosfato de cálcio puro mesoestruturado sem subprodutos como outras fases de fosfato de cálcio (IKAWA et al, 2008). Assim sendo, devido a problemas de processamento, um método confiável para a síntese de materiais mesoporosos de fosfato de cálcio de alta área superficial não foi ainda estabelecido (ZHANG et al, 2008), apesar do fato de que na natureza, a biomineralização de fosfatos de cálcio na presença de biosurfactantes (lipídios, acúcares, proteínas e aminoácidos) é comum (SCHMIDT et al, 2006). Um exemplo desta biomineralização de fosfatos de cálcio é o leite, onde fragmentos de fosfato de cálcio coloidal interagem com a caseína (proteína do leite). A caseína por ter atividade anfipática por possuir regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (DE KRUIF e GRINBERG, 2002) e apresentar alta afinidade por fosfato de cálcio (LITTLE e HOLT, 2004) apresenta-se como um promissor biosurfactante na síntese de fosfatos de cálcio mesoporosos.

Nessa direção, o propósito deste trabalho de pesquisa é sintetizar hidroxipatita com porosidade controlada utilizado caseína como agente direcionador de estrutura, modificá-la organicamente visando melhorar as propriedades finais desses sólidos principalmente no que diz respeito à biocombatilidade e sua capacidade como carregadora de fármacos

4

1.1. OBJETIVOS

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo geral a obtenção hidroxiapatita com porosidade controlada na forma pura, utilizado caseína como agente direcionador de estrutura, modificá-la organicamente com grupos nitrogenados visando melhorar as propriedades finais desses sólidos, principalmente no tocante à biocombatilidade e sua capacidade como carregadora de fármacos.

Os objetivos específicos são:

- Sintetizar hidroxiapatitas (Ca₁₀(PO₄)₆.(OH)₂) mesoporosa e não mesoporosa puras e modificadas organicamente com agentes sililantes nitrogenados 3aminopropiltrimetoxissilano; 3-propiletilenodiaminotrimetoxissilano e 3propildietilenotriaminotrimetoxissilano;
- Avaliar parâmetros como: pH, concentração do surfactante, temperatura e atmosfera de calcinação, taxa de aquecimento na síntese das hidroxipatitas mesoporosas;
- Caracterizar os compostos obtidos pelas técnicas de adsorção-dessorção de N₂, espectroscopia na região do infravermelho, análise elementar, termogravimetria, difração de Raios-X, RMN do estado sólido de ³¹P e ¹³C e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a capacidade adsortiva da hidroxiapatita mesoporosa e sua fase não mesoporosa frente à soralbumina bovina (BSA) no tocante aos seguintes parâmetros: pH, tempo, concentração e forca iônica;
- Estudar a liberação da soro albumina bovina (BSA) em condições controladas.



2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DROGAS

Por definição, o termo "sistema de liberação de fármacos" refere-se à tecnologia utilizada para otimizar a liberação de um fármaco, onde o princípio ativo deve ser liberado e/ou absorvido, melhorando a resposta terapêutica. Os tratamentos convencionais utilizados para combater processos infecciosos (soluções, suspensões, pílulas, entre outros) requerem uma administração por um longo período de tempo, visando manter os níveis terapêuticos do fármaco no organismo. Muitas vezes, tais níveis não são alcançados, pois o tratamento não exibe resultados ou apresenta efeitos colaterais, devido à alta concentração do fármaco. A manutenção da concentração do medicamento na corrente sangüínea dentro da faixa terapêutica do medicamento, leva à redução no número de doses requeridas e ao aumento na eficácia do tratamento, pois desta forma diminui a possibilidade de alcançar níveis tóxicos ou subterapêuticos (faixa ineficaz) (DASH, et al, 1998).

Historicamente, as primeiras tentativas de se modificar a liberação de um fármaco foram realizadas quando se revestiam pílulas para mascarar o sabor desagradável dos fármacos. Entre 1940 e 1950, surgiram os primeiros sistemas de liberação modificada, representados por formas farmacêuticas que permitiam a liberação de parte do fármaco no estômago e parte no intestino (ou que evitavam a liberação gástrica). Tais medicamentos eram sensíveis a variáveis fisiológicas. Em 1952, surgiu uma das primeiras formas farmacêuticas de ação prolongada, o Spansule[®], da empresa Smithkline Beecham (RATNER, 1996 citado por SOUZA, 2006). O medicamento consistia de uma cápsula gelatinosa dura, contendo grânulos esféricos de colorações diferentes, correspondendo a revestimentos diferentes. Usando revestimentos de espessuras diferentes, tempos de dissolução poderiam variar, prolongando a ação do agente terapêutico. Estes revestimentos permitiram a liberação inicial da dose terapêutica necessária, seguida da liberação de doses menores, por um período de 10 - 12 horas. Entretanto, a funcionalidade de tais produtos depende do ambiente externo que varia muito de paciente para paciente. Por esta razão a partir da década de 60, muitos esforços foram realizados com o objetivo de desenvolver produtos que são capazes de liberar drogas por cinéticas reproduzíveis e previsíveis. Idealmente, tais produtos não são significativamente afetados pelo ambiente externo, de modo que a variabilidade de paciente para paciente é reduzida (SOUZA, 2006).

Ao longo das últimas décadas, o campo de liberação controlada de drogas experimentou um acelerado desenvolvimento, com diversas organizações a exemplo da CRS, Controlled Release Society e jornais científicos como o Advanced Drug Release, especificamente dedicados a este tema. Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas e aplicadas para se promover uma liberação controlada do fármaco, com o objetivo de regular a sua velocidade de liberação, manter seu nível terapêutico constante por um maior período de tempo, além de direcionar sua ação a um tecido específico. O uso de sistemas de liberação controlada já é uma realidade. Atualmente existem disponíveis no mercado vários exemplos de medicamentos, fertilizantes, aromas e princípios ativos que utilizam este tipo de mecanismo de liberação. Cada um deles apresenta perfis de liberação controlada próprios adequados para cada uso ou determinadas drogas.

Cinco perfis de liberação controlada altamente desejáveis são mostrados Figura 2.1 (HARRIS, 1992 citado por BAJPAI, et al, 2008).



Figura 2.1 - Tipos diferentes de perfis de liberação para drogas. Figura adaptada de HARRIS, 1992 citado por BAJPAI et al, 2008.

Perfil I: Convencional e atrasado, onde a liberação não é constante.

Perfil II: Liberação constante de ordem zero. Polímeros sintéticos ou matrizes inorgânicas ou orgânicas libertam as drogas a uma taxa constante e assim a concentração de droga no fluxo sanguíneo é mantida a um ótimo nível de terapêutico efetivo. Estes são frequentemente chamados de sistemas de liberação de drogas de ordem zero e muitos foram ou estão sendo comercializado para liberação de um grande número de drogas. Os perfis I e II são agora comuns dentro sistemas comerciais.

Perfil III: liberação atrasada seguida por uma liberação significativa e por fim uma liberação constante do agente ativo. Tais sistemas são muito úteis para a liberação de agentes ativos a serem liberadas no período noturno.

Perfil IV: demora na liberação seguida por um pulso da liberação de droga. Isto permite liberar drogas em períodos noturnos ou que requerem pulsação em lugar de liberação constante.

Perfil V: pulsos múltiplos em períodos especificados intermediária entre liberação constante e demorada.

O sistema de liberação controlada de ordem zero, comumente encontrado em vários sistemas de liberação, em comparação com os sistemas convencionais é esquematizado na Figura 2.2.



Figura 2.2 - Concentração de uma droga modelo no sangue com (a) dosagem tradicional da droga e (b) dosagem com liberação controlada. Figura adaptada de GRAHAM,1979 citada por DASH e CUDWORTH,1998.

Com sistemas convencionais tais como comprimidos ou injeções, o nível da droga no sangue segue o perfil mostrado na Figura 2.2a, no qual a concentração aumenta após cada administração da droga e então diminui até a próxima administração, proporcionando variações consideráveis na concentração do fármaco no plasma sanguíneo, podendo não haver efeito farmacológico ou ocasionar intoxicação, pois há uma faixa de concentração efetiva para a ação no organismo. Em sistemas com liberação controlada de drogas, projetado para administração por um período maior, o nível da droga no sangue segue um perfil mostrado na Figura 2.2b, permanecendo constante entre o máximo e mínimo desejado por um longo período de tempo e proporcionando uma pequena variação na concentração do fármaco com o tempo, impossibilitando, dessa forma, inefetividade ou toxicidade.

As Tabelas 2.1 e 2.2 apresentam, respectivamente, vantagens e desvantagens na utilização dos sistemas para liberação controlada de fármacos (SOUZA, 2006).

Tabela 2.1 - Vantage	ens potencia:	s da	utilização	do	sistema	de	liberação	controla	da
de fármacos.									

Vantagens	Comentários
Comodidade para o	Dessa forma não é responsabilidade do paciente a administração de
paciente	sua medicação evitando, assim, descuidos na administração do
	medicamento.
Melhor eficiência	Controlando a taxa de liberação do fármaco, as flutuações da
do tratamento	concentração sanguínea são reduzidas.
Econômico	Tratamento mais rápido e eficaz; Embora o custo inicial do sistema de
	liberação controlada de fármacos seja mais elevado que as formas
	convencionais, o custo médio do tratamento em períodos prolongados
	é menor. Com a menor freqüência das doses, o beneficio terapêutico
	é aplicado e os efeitos colaterais reduzidos, o tempo dispensado
	pelos profissionais da saúde no atendimento, administração e
	monitoração dos pacientes fica reduzido.
Menor quantidade	Redução dos efeitos colaterais, pois o fármaco estaria sempre na
de fármaco	faixa terapêutica;
utilizado	Redução do acumulo de fármaco em tratamentos prolongados

Tabela 2.2 - Desvantagens potencias da utilização do sistema de liberação controlada de fármacos.

Desvantagens Risco de acumulação, se a velocidade de eliminação é lenta; Dificuldade de interromper o tratamento rapidamente no caso de intoxicação grave ou intolerância; Custos iniciais mais elevados que os das formas convencionais; Variabilidade biológica relativa às velocidades de absorção, biotransformação ou

eliminação gerando efeitos tóxicos;

A cinética de liberação depende da integridade da forma farmacêutica.

2.1.1 Principais Mecanismos de Controle da Liberação de Fármacos

Existem vários mecanismos pelos quais a liberação de um fármaco pode ser controlada em um medicamento. Não é raro que um medicamento ou dispositivo apresente mais de um destes mecanismos. A classificação do sistema de liberação controlada de fármacos segundo o mecanismo de liberação é feita tomando-se por base o mecanismo principal. O tipo de mecanismo que controla a liberação do fármaco determina também a sua classificação, podendo ser: sistemas de difusão controlada, sistemas controlados quimicamente, sistemas controlados por expansão e contração, sistemas osmoticamente controlados, etc. (SIMÓ, 2003).

2.1.1.1 Difusão

A difusão molecular através de polímeros e materiais cerâmicos é um meio eficiente, simples e seguro de alcançar a liberação controlada de uma variedade de agentes ativos. Diz-se que um medicamento ou dispositivo age por difusão quando este fenômeno ocorre em alguma fase da liberação e representa um passo decisivo na liberação total do fármaco (SOUZA, 2006).

Os principais dispositivos que utilizam este fenômeno como controladores da liberação do fármaco são do tipo reservatório ou matricial (BAJPAI, et al, 2008). Sistemas de reservatório são dispositivos ocos nos quais no seu interior (caroço) a

droga é dissolvida, droga disolvida é rodeada por uma membrana polimérica. Uma representação esquemática é mostrada em Figura 2.3.



Figura 2.3 – Liberação controlada de drogas a partir de um dispositivo de reservatório típico: sistema implantável ou oral (acima), sistema transdérmico (abaixo). Figura adaptada de BAJPAI et al, 2008.

No sistema reservatório é possível identificar um núcleo diferenciado, que pode ser uma droga sólida, uma solução diluída, ou altamente concentrada dentro de uma matriz. Neste caso, o fármaco encontra-se envolvido por um filme ou uma membrana de um material controlador da taxa de liberação. A única estrutura que efetivamente limita a liberação da droga é a camada de material que envolve o reservatório. Mudanças na natureza e espessura dessa camada promovem alterações na velocidade de liberação da droga. A membrana que envolve o reservatório permite a difusão da droga contida dentro do núcleo para o meio externo. Neste tipo de sistema a taxa de liberação é constante se houver uma concentração constante do fármaco no interior do reservatório. O transporte da droga acontece primeiro através de dissolução da droga na membrana seguido por difusão pela membrana e dessorção do fármaco pelo lado externo da membrana (BAJPAI et al, 2008).

Em sistemas de matriz (nonolítico), a droga é uniformemente dispersa na matriz. Uma desvantagem inerente dos sistemas de matriz é o comportamento de liberação de primeira ordem, o qual sua taxa de liberação diminui continuamente. O dispositivo de matriz (ou monólito) é facilmente formulado e dá uma taxa de liberação inicial mais alta que um dispositivo de reservatório podendo liberar o fármaco a uma taxa quase constante. Um dispositivo de solução monolítico que

contém a droga em solução dentro de uma matriz polimérica pode ser observado na Figura 2.4 (BAJPAI et al, 2008).



Figura 2.4 - Liberação de droga a partir de um sistema típico de matriz para liberação controlada. Figura adaptada de BAJPAI et al, 2008.

Alguns sistemas de liberação por difusão controlada podem ser ativados externamente para liberar mais drogas quando necessário, usando forças, tais como o magnetismo. Em caso particular, nanopatículas magnéticas estão uniformemente dispersas em uma matriz (Figura 2.5). Quando a matriz entra em contato com o sistema biológico, ocorre a difusão normal devido ao gradiente de concentração. Entretanto, sob a exposição de um campo magnético externo oscilante, maior quantidade de droga pode ser rapidamente liberada, devido a este aspecto tais sistemas estão sendo estudados na liberação de drogas em tumores cancerígenos (SOUZA, 2008).



Figura 2.5 – Sistema de liberação controlada utilizando um campo magnético oscilante. Fonte: SOUZA, 2008

Em uma situação diferente, um campo magnético externo causa a compressão das partículas magnéticas embebidas em uma matriz, forçando mais droga a sair da matriz (Figura 2.6) (LIU et al, 2006). A maior vantagem desse tipo de liberação é a possibilidade de manipular a cinética de liberação da droga usando um estímulo externo.



Figura 2.6 – Mecanismo de configuração fechada de ferrogéis devido à agregação de nanopartículas de magnetita sob ação de um campo magnético, provocando a diminuição da porosidade do ferrogel. Fonte: SOUZA, 2008.

2.1.1.2 Erosão

Nestes sistemas, o polímero é degradado por reações químicas hidrolíticas ou interações enzimáticas. À medida que o polímero degrada, a droga é libertada. As vantagens principais de tais sistemas biodegradáveis é a eliminação da necessidade para remoção cirúrgica do suporte, bem como tamanho pequeno e potencial baixo custo. Por outro lado, todos os produtos biodegradáveis como também os metabolitos não devem ser tóxicos nem carcinogênico. Estas exigências não são satisfeitas facilmente devendo ser sujeito a uma escolha cuidadosa (BAJPAI et al, 2008). Estes sistemas são classificados em duas categorias:

- Sistemas de imobilização física: também chamados erodíveis ou biodegradáveis, nos quais o fármaco, fisicamente imobilizado pela rede do material, é liberado após a erosão desta.
- 2. Sistemas de imobilização química: nos quais o fármaco está quimicamente ligado ao esqueleto polimérico (cadeia pendente) ou ele próprio é parte do esqueleto polimérico. A liberação de fármaco destes sistemas é principalmente governada pela cinética de degradação da ligação, sendo,

portanto, específica para cada sistema.

Na Figura 2.7 encontra-se a representação de uma liberação controlada através do sistema de erosão.



Figura 2.7 - Degradação do microesferas de PLGA impregnadas com ibuprofeno por erosão de volume (acima) e erosão superficial (abaixo). Fonte: KLOSE et al, 2008.

2.1.1.3 Expansão

São sistemas monolíticos onde o fármaco se encontra dissolvido ou disperso em um suporte polimérico hidrofílico, com ou sem ligações cruzadas, o qual se expande sem se dissolver quando em contato com o meio aquoso. Estes sistemas são denominados hidrogéis. Em meio aquoso, em apropriado pH e força iônica, os grupos laterais ionizam e desenvolvem cargas fixas na rede polimérica, gerando forças repulsivas eletrostáticas, responsáveis pelo inchamento do hidrogel, controlando desta maneira, a liberação do fármaco. Pequenas mudanças no pH podem resultar em significantes mudanças no tamanho do poro da rede polimérica. Grupos laterais de hidrogéis aniônicos são ionizados acima do pKa da rede polimérica, resultando em inchamento do hidrogel em um pH alto devido a grande força osmótica de inchamento decorrente da presença dos íons. O reverso é o caso dos hidrogéis catiônicos, que incham em pH baixo. Diferenciados inchamentos de hidrogéis iônicos em tampões alcalinos ou ácidos estão apresentados na Figura 2.8 (BAJPAI et al, 2008).



Figura 2.8 - Inchamento do hidrogel sensível ao pH (a) aniônico e (b) catiônico. Fonte: SOUZA, 2008.

O grau de expansão e, portanto a quantidade de fármaco liberada depende do balanço hidrofílico/hidrofóbico da matriz polimérica e do grau das ligações cruzadas. A migração do fármaco para o meio aquoso de um sistema como este implica em um processo de absorção de água e dessorção do fármaco.

2.1.1.4 Osmose

As bombas osmóticas são semelhantes aos dispositivos reservatórios, mas contém um agente osmótico (por exemplo, o próprio fármaco na forma de sal), o qual retira água do meio circundante através de uma membrana semipermeável. Uma pressão é gerada ao longo do dispositivo, o que força a saída do fármaco (em solução) do dispositivo, através de um orifício. Já que o volume do dispositivo
permanece constante e há um excesso de sólido (solução saturada) dentro do dispositivo, a taxa de liberação permanece constante, liberando um volume de solução do fármaco igual ao volume de solvente absorvido (SOUZA, 2006).

Alguns dispositivos funcionam de maneira um pouco diferente. São dispositivos monolíticos ativados osmoticamente (Figura 2.9).



Figura 2.9 – Liberação de fármacos do sistema osmoticamente controlado. Fonte: SOUZA, 2006

Nestes dispositivos, a matriz é constituída por polímero intumescível. As moléculas poliméricas superficiais incham em contato com água e chegam a romperse, formando poros, por onde o fármaco dissolvido pode difundir-se (SOUZA, 2006).

2.1.2 Cinética de Liberação de Drogas

O perfil de liberação controlada é muito importante na concepção do sistema de liberação controlada de drogas. Compreender o processo de carreamento de um medicamento ajuda a fornecer o mecanismo de liberação da droga, de modo a otimizar a cinética de liberação. Geralmente acredita-se que o processo de liberação do fármaco pode ser dividido em quatro etapas consecutivas: a matriz carreadora intumescível no meio de liberação impulsionada pela pressão osmótica decorrentes de gradientes de concentração, dissolução do fármaco, difusão continua da droga através da matriz devido aos gradientes de concentração e difusão, bem como conectividade e transporte no meio de lançamento. Uma ou mais destas etapas pode controlar o processo de liberação da droga (LI et al, 2004). No entanto, para

muitos sistemas de liberação controlada de drogas, o processo de liberação da droga geralmente pode ser modelado com a equação clássica de difusão de Fick integrada com condições adequadas de fronteira ou com as expressões simplificadas de Higuchi.

Higuchi foi o primeiro a derivar uma equação para descrever a liberação de uma droga em uma matriz insolúvel como a raiz quadrada de um processo dependente do tempo com base na difusão de Fickian (Equação (1))

$Q_t = [2DS\varepsilon(A-0.5 S\varepsilon)]^{0.5} \times t^{0.5} = K_H \sqrt{t}$ Equação (1)

onde, Qt é a quantidade de droga liberada no tempo *t*, *D* é o coeficiente de difusão, *S* é a solubilidade do fármaco no meio de dissolução, ε é a porosidade, A é o conteúdo de drogas por centímetro cúbico da matriz, e k_H é a taxa de liberação constante para o modelo de Higuchi. Em geral, o modelo de Higuchi é válido para os sistemas em que a concentração da droga é muito maior do que sua solubilidade (WANG, 2009).

Assim, se a cinética de liberação segue o modelo de Higuchi uma reta é esperada ao plotar o gráfico de Q_t versus t^{1/2}. A maioria dos trabalhos envolvendo cinética de liberação de fármacos em materiais mesoporosos é frequentemente descrita usando o modelo de Higuchi, mostrando um perfil de liberação em duas etapas, uma liberação rápida inicial seguida por uma liberação mais lenta (OGAWA e PLEPIS, 2002).

Uma equação mais abrangente para descrever a cinética de liberação do fármaco a partir de matrizes é geralmente explicada usando o modelo de Korsmeyer-Peppas através da equação (2) (BAJPA, et al, 2003).

$M_t / M_{\infty} = K t^n$

Equação (2)

onde $M_t e M_{\infty}$ denotam a massa acumulada de droga liberada no tempo *t* e no tempo infinito, respectivamente, *k* é uma constante de proporcionalidade e *n* é o índice de liberação, indicativo do mecanismo de liberação da droga. Para n > 0,5 a difusão de Fickian não é observada, quando n = 0,5 representa o mecanismo de difusão de Fickian. O valor de n = 1, mecanismo de transporte da liberação de drogas será de ordem zero. Em geral, no caso de uma matriz em que a liberação é regida pela difusão da droga através da matriz, a cinética de liberação segue a relação

convencional de Higuchi (n = 0,5). A maioria dos trabalhos sobre a cinética de liberação de drogas em materiais mesoporosos é frequentemente descrita usando relação de Higuchi e mostra um perfil de duas etapas de liberação composto por uma explosão inicial, seguido de liberação lenta (QU et al, 2006; DOADRIO et al, 2006; ANDERSSON et al, 2004; DOADRIO et al, 2004) como mostrado na Figura 2.10.



Figura 2.10 – Raiz quadrada de Higuchi versus tempo para o estudo da liberação do ibuprofeno a partir de materias microporosos e mesoporosos (○) MCM-41a; (▽) c-MCM-41a; (■) mSBA-3; (◊) μSBA-1 (•) μSBA -3. Figura adaptada de ANDERSSON et al, 2004.

Em geral, fosfatos de cálcio podem ser designados ao primeiro tipo de dispositivos onde a liberação da droga liberada é controlada por difusão. Embora os fosfatos de cálcio sejam reabsorvíveis, a maioria dos fosfatos de cálcio estudados como liberadores de drogas, a taxa de degradação de matriz é muito mais baixa que a taxa de liberação da droga. Por isso é possível assumir que a liberação de droga é principalmente controlada pelo processo de difusão (GINEBRA et al, 2006).

2.2 HIDROXIAPATITA

Fosfatos de cálcio, CaO- P_2O_5 - H_2O , compreendem uma grande família de compostos com importantes aplicações biológicas (ELLIOT, 1994), e inúmeras

utilizações tecnológicas que vão desde revestimentos de implante, enxertos, suportes e colas para a reparação óssea (MITRI et al, 2005; PINA et al, 2009; PAITAI e DAHOTRE, 2009), e veículos para a liberação controlada de drogas, proteínas e genes (ANADA et al, 2009; LUONG et al, 2009). Além destas importantes aplicações, os fosfatos de cálcio também fornecem o suprimento de fosfatos que são extensamente utilizados na produção de fertilizantes, colunas cromatográficas, indústria de alimentos e na indústria farmacêutica, em cremes dentais (JINAWATH e SUJARIDWORAKUN, 2002). Na Tabela 2.3 são apresentados alguns tipos de fosfatos de cálcio (KAMITAKAHARA et al, 2008). Eles são classificados de acordo com a razão molar Ca/P. Os fosfatos de cálcio com razão molar Ca/P variando entre 0,5 e 2,0 podem ser sintetizados por diversos métodos, sendo que os fosfatos hidratados são sintetizados em temperatura ambiente e os moderadamente elevadas anidros а temperaturas (JINAWATH е SUJARIDWORAKUN, 2002).

Razão molar Ca/P	Composto	Fórmula	Símbolo
0,5	Fosfato monocálcio	Ca(H ₂ PO ₄)2.H ₂ 0	МСРМ
	monohidratado		
0,5	Fosfato monocálcio anidro	$Ca(H_2PO_4)_2$	MCPA
1,0	Fosfato dicálcio dihidratado	CaHPO ₄ .2H ₂ O	DCPD
1,0	Fosfato dicálcio anidro	CaHPO ₄	DCPA
1,33	Fosfato octacálcio	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ .5H ₂ O	OCP
1,5	Fosfato α-tricálcio	Ca ₃ (PO ₄) ₂	α-ΤϹΡ
1,5	Fosfato β-tricálcio	Ca ₃ (PO ₄) ₂	β-ΤϹΡ
1,67	Hidroxiapatita	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Нар
2,0	Fosfato tetracálcio	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	TerCP

Tabela 2.3 - Principais compostos de fosfato de cálcio.Tabela adaptada deKAMITAKAHARA et al, 2008.

P = fosfato; C = cálcio; M = mono; A = anidro, D = di; T = tri; O = octa; Ter = tetra.

Dentre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita (Hap) é o principal componente inorgânico, consistindo com 70% em massa inorgânica, dos tecidos duros (ossos e

dentes) em humanos e animais (PARK e LAKES, 1992 citado por KAMITAKAHARA et al, 2008). A Hap sintética é um material biocompatível (que pode ser implantado ou colocado em contato com tecidos ou órgãos do corpo humano que não provocam qualquer tipo de reação adversa do organismo por rejeição ou contaminação), bioativo (apresenta resposta positiva em termos de aderência e proliferação celular de diferentes tipos de células) e também osteocondutor (permite a formação de ossos sobre a sua superfície, funcionando como suporte ou superfície). No caso da hidroxiapatita natural, é composta por íons em concentrações diversas, tais como: Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, CO₃²⁻, permitindo o controle desses importantes íons nos líquidos corporais através da sua liberação ou armazenamento (SALEH et al, 2004).

Todas estas características, acima citadas, inerentes aos fosfatos de cálcio foram comprovadas através do trabalho de SUDO et al. (2008) utilizando blocos de biocimento de hidroxiapatita impregnados com um coquetel de antibióticos para o tratamento de artroplastia de quadril infetado em sete pacientes, sendo 2 homens e 5 mulheres, com uma idade comum de 65 anos. Todos os pacientes receberam os enxertos cerâmicos impregnados com antibióticos, conforme a Figura 2.11.



Figura 2.11 - Raio-X de um quadril com implantes de biocimento de hidroxiapatita impregnada com antibióticos para o tratamento de artroplastia de quadril. Fonte: SUDO et al, (2008).

Após uma revisão foi comprovada que não havia nenhum evidência de infecção periódica em 6 pacientes.

Devido ao interesse químico e a suas propriedades físicas, as hidroxiapatitas sintéticas encontram várias aplicações, não só como biomaterial, mas também como adsorvente para cromatografia na separação de proteínas e enzimas (SUEN et al, 2004; JOHN e SCHMIDT, 1984), como suporte para liberação controlada de drogas (YANG et al, 2008; SUDO et al. 2008; SANTOS et al, 2009; LEPRÊTRE et al, 2009), como catalisador na síntese de bicombustíveis (TSUCHIDA et al, 2008), como adsorvente na remoção de cátions divalentes dissolvidos em solução (ZHU et al, 2008; DA SILVA et al, 2006; ZHANG et al, 2010) e como sensores de umidade e de CO_2 (NAGAI et al, 1988; WANG et al, 2009).

A composição mineral da Hap estequiométrica pode ser expressa como $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, com uma Ca/P = 1,67. Porém, outras composições estáveis podem ter esta razão estendida para aproximadamente 1,5. Esses materiais são conhecidos como hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHap), cuja fórmula química é $Ca_{10+X}(HPO_4)_X(PO_4)_{6-X}(OH)_{2-X}nH_2O$, onde 0 < x < 1 e n = 0 - 2,5. Essas hidroxiapatitas apresentam cristalinidade baixa e áreas superficiais mais elevadas, assemelhando-se mais com o tecido ósseo humano (VILLORA et al, 2002). Ambos os compostos pertencem a uma série de minerais chamados apatitas.

As hidroxiapatitas podem sofrer substituições isomorfas (iso ou heteroiônica), que podem ser definidas como uma substituição de um íon por outro em uma rede cristalina, mantendo a estrutura básica original (CHIANG et al, 1997). O íon de cálcio pode ser substituído parcialmente por cátions monovalentes (Na⁺, K⁺), divalentes (Sr²⁺, Ba²⁺, Pb²⁺) ou trivalentes (Y³⁺). Entre as substituições aniônicas, as mais significantivas são as de OH⁻ por CO₃²⁻, F⁻ e Cl⁻, e de PO₄³⁻ por CO₃²⁻, AsO₄³⁻ e VO₄³⁻. Algumas substituições ocorrem simultaneamente com outras para que se mantenha o equilíbrio de cargas na apatita, por exemplo, PO₄³⁻ por CO₃²⁻ junto com Ca²⁺ por Na⁺. Os ânions trivalentes do fosfato não podem aceitar vacâncias, provavelmente porque estes são bastante grandes e essas vacâncias desestabilizariam a rede. Por outro lado, os sítios do cátion podem aceitar vacâncias, até um máximo de dois sítios além dos dez existentes nas apatitas estequiométricas (REY, 1998, DOROZHKIN, 1997). A aplicabilidade da hidroxiapatita no campo biomédico está relacionada à sua capacidade estrutural para agir como uma anfitriã para diferentes espécies químicas. Do ponto de vista biológico, o flúor é uma das impurezas mais importantes da hidroxiapatita presente nos tecidos calcificados. O flúor pode ser incorporado à hidroxiapatita por substituição dos grupos OH⁻, tornando a estrutura mais estável e menos solúvel que a hidroxiapatita estequiométrica. A ação do flúor na proteção de cáries dentárias e no tratamento de osteoporose tem sido muito pesquisada. Entretanto certos metais, como alumínio, ferro, cádmio e chumbo podem substituir isomorficamente íons Ca²⁺ no osso, ocasionando certas patologias nos ossos, com sintomas semelhantes ao da osteoporose (MATHEW e TAKAGI, 2001).

2.3 MATERIAIS POROSOS

Materiais porosos com geometrias regulares receberam recentemente muita atenção, tanto em pesquisas científicas como em aplicações práticas devido ao seu grande potencial, tais como catálise, adsorção, separação, sensoriamento remoto, uso medicinal, ecologia e nanotecnologia (FAJULA et al, 2005). De acordo com a classificação feita pela IUPAC (MECCUSKER et al, 2001) sólidos porosos podem ser arranjados em três categorias principais, dependendo do diâmetro (d) dos poros, em micro (d < 2 nm), meso (2 nm < d < 50 nm) e materiais macroporosos (d > 50 nm).

Um membro bem conhecido da classe dos microporosos são as zeólitas. Estes são aluminossilicatos naturais ou sintéticos que apresentam elevada área superficial e estreita distribuição de tamanho de poros, decorrentes do seu sistema de poros cristalograficamente definido. Esses aluminossilicatos possuem sistemas de microporos abertos e elevada estabilidade térmica (CIESLA e SCHUETH, 1999). Essas propriedades são as responsáveis pela diversidade de aplicações destes materiais, como adsorventes, catalisadores, suportes de catalisadores, craqueamento de petróleo, etc. No entanto, apesar da grande quantidade de trabalhos dedicados às zeólitas, suas dimensões e acessibilidades dos poros ficaram restritas à escala sub-nanométrica. Isso limitou a aplicação desses sistemas de poros a moléculas pequenas. Durante a década passada, um importante esforço

foi focado na obtenção de materiais porosos com tamanho de poros maiores, sobretudo, mesoporos como uma solução à limitação imposta pelos microporos das zeólitas (SOLER-LLIA et al, 2002).

2.3.1 Materiais Mesoporosos Ordenados

Em 1990, KURODA e colaboradores relataram a primeira preparação de uma sílica mesoporosa com tamanho e distribuição de poro uniforme a partir do polissilicato lamelar kanemita. Inicialmente compósitos orgânico-inorgânicos foram formados por intercalação do polissilicatos em camadas utilizando surfactantes. Em seguida, com o tratamento térmico ocorre a transformação para a fase hexagonal através da condensação dos grupos silanóis. O material obtido foi designado FSM-16 (*Folded Sheet Materials*) - material de folha dobrada (INAGAKI, et al, 1993), que está representado na Figura 2.12.



Figura 2.12 – O modelo das folhas dobradas de kanemita. Figura adaptada de INAGAKI et al, 1993.

Um avanço significativo na investigação de materiais mesoporosos veio em 1992, quando os cientistas da Mobil Corporation descobriram e descreveram a família de materiais M41S (*Mobil 41 Synthesis*) de silicato/aluminosilicato com estruturas de poros uniformes e excepcionalmente largos. Os materiais desta família apresentam alta área superficial específica com diferentes arranjos de poros conhecidos como fase hexagonal, *P6mn* (MCM-41), apresentando um sistema de

poros unidirecional, fase cúbica, *Ia3d* (MCM-48) e fase lamelar (MCM-50), que sofre colapso quando é calcinada para remoção do tensoativo (VINU et al, 2006). Na Figura 2.13 são apresentadas as imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das estruturas do grupo de materiais mesoporosos pertencentes à família M41S: (a) MCM-50 (lamelar), (b) MCM-41 (hexagonal), e (c) MCM-48 (cúbico). Dentre as fases estáveis dos membros da família M41S, o MCM (*Mobil Composition of Matter*) - 41 é a mais estudada devido à facilidade de síntese quando comparada com a MCM-48. Estes materiais apresentam altas áreas superficiais (~1000 m²/g) e distribuição uniforme de tamanho de poros, na faixa de mesoporos, variando de 2 a 10 nm (SOUZA, 2007).



Figura 2.13 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das estruturas pertencentes à família M41S: (a) MCM-50 (lamelar), (b) MCM-41 (hexagonal), e (c) MCM-48 (cúbica). Destaque: desenho ilustrativo. A escala é a mesma para todas as imagens. Figura adaptada de SOUZA, 2007.

Como ilustrado na Figura 2.14, os materiais mesoporosos da família M41S foram preparados através da utilização de agentes direcionadores (templates), responsáveis pela arquitetura do esqueleto inorgânico.



Figura 2.14 - Conceito geral para a síntese de sílica mesoporosa com templete micelar. Figura adaptada de VINU et al, 2006.

Esses agentes são, em geral, moléculas volumosas contendo cabeças polares e caudas apolares. Assim, quando preparadas em solução, formam micelas, em torno das quais ocorre a condensação do precursor inorgânico para formação da estrutura mesoporosa. Finalmente, o direcionador é removido, por métodos adequados, tais como calcinação, conduzindo a uma rede de sílica mesoporosa.

Muitos estudos têm sido realizados para uma plena e total elucidação do mecanismo de formação da mesofase. Dentre eles se destaca os trabalhos de FIROUZI e colaboradores (FIROUZI et al, 1997), que sugeriram que a densidade de carga das espécies inorgânicas determina de que maneira o surfactante se associa ao silicato. Assim, pode-se dizer que a densidade de carga determina a distância entre as cabeças polares do surfactante, o tipo de confinamento e a energia das interações intermoleculares das espécies inorgânicas. Desta maneira, as mesoestruturas são formadas ajustando-se a densidade de cargas com a geometria do surfactante e a concentração dos componentes. Tendo como base este modelo, HUO e colaboradores (HUO et al, 1994) empregando diversas fontes inorgânicas, prepararam materiais mesoporosos e propuseram cinco caminhos diferentes de síntese:

 Rota S⁺I⁻: É utilizando como direcionador um surfactante catiônico com a fonte da estrutura para as espécies inorgânicas carregadas negativamente.

2) Rota S⁻¹⁺: É utilizando como direcionador um surfactante aniônico com a fonte da estrutura para as espécies inorgânicas carregadas positivamente.

26

3) Rota S⁺ X⁻ I⁺: O surfactante e a espécie inorgânica estão carregadas positivamente na presença de uma espécie de carga oposta que age como um contra íon.

4) Rota S⁻ X⁺ I⁻: O surfactante e a espécie inorgânica estão carregadas negativamente na presença de uma espécie carregada positivamente agindo como um contra íon.

5) Rota S^ol^o: O surfactante utilizado é não iônico e o meio favorece para a neutralidade da espécie inorgânica onde a interação entre as mesmas será por pontes de hidrogênio ou dipolo.

A representação esquemática destes tipos de interação encontra-se na Figura 2.15.



Figura 2.15 – Representação esquemática dos diferentes tipos de interação entre a espécie inorgânica e o surfactante. Fonte: HUO et al, 1994

De acordo com o tipo de direcionador e com o tipo de interação deste com a fonte do material pode ser obtidos diferentes estruturas mesoporosas.

Desde a descoberta no início dos anos 90 dos materiais da família M41S, uma variedade de materiais mesoporosos e estratégias de síntese têm sido desenvolvidas. Um exemplo desses materiais é a sílica mesoporosa hexagonal (HMS) sintetizada por TAVET e PINAVAIA em 1995 utilizando aminas neutras como template, este mataterial possui uma estrutura hexagonal um pouco desordenada e paredes mais espessas, o que lhe conferia maior estabilidade térmica sob calcinação em ar, e um menor tamanho de cristalito, que permite mesoporosidade textural complementares o que melhora o acesso aos mesoporos confinados na estrutura (TAVET e PINAVAIA, 1995). Outro material mesoporoso sintetizado nesta década foi o MSU-1 (Michigan State University), proposto inicialmente por BAGSHAW e colaboradores em 1995 foi sintetizado usando óxido de polietileno (PEO) como agente direcionador de estrutura também possui uma estrutura desordenada em canais. Este material possui paredes dos poros com grande espessura e pequeno tamanho de partícula, devido a poros formados por partículas relativamente pequenas (BAGSHAW et al, 1995).

Em 1998, uma nova família de materiais a base de sílica altamente mesoporosa foi sintetizada por ZHAO e colaboradores em 1998, a qual foi chamada SBA (acronismo dos ácidos Santa Barbara). Sua síntese foi realizada usando copolímero tribloco não-iônico polióxido de etileno (PEO) e polióxido de propileno (PPO) como reagente direcionador da estrutura em meios altamente ácidos (ZHAO et al, 1998). Materiais mesoporosos da familia SBA apresentam maior estabilidade hidrotérmica, em comparação com a de outros materiais mesoporosos uma vez que apresentam poros grandes de paredes espessas altamente ordenadas. Uma variedade de materiais SBA com diferentes fases podem ser encontrada na literatura, como a SBA-1 (cúbica), SBA-11 (cúbica), SBA-12 (hexagonal 3D), SBA-14 (lamelar), SBA-15 (hexagonal 2D) e SBA-16 (estrutura cúbica na forma de gaiola). Dentre as fases estáveis dos membros da família SBA, a fase SBA-15 recebe muita atenção devido as suas características desejáveis (MEYNEN et al, 2009)

Outros sólidos mesoporosos foram sintetizados através de intercalação de materiais lamelares, tais como hidróxidos duplos lamelares, fosfatos metálicos (titânio, zircônio) e argilas (CIESLA e SCHUTH, 1999). E mais recentemente, Carbono Mesoporoso Ordenado (CMK-n) formado a partir do preenchimento dos nanoespaços de uma matriz inorgânica mesoporosa, geralmente zeólitas ou sílicas meso ou macroporosas, por um precursor de carbono (hidrocarbonetos, açúcares e outros) seguido pela remoção do molde rígido modelos através de calcinação ou lixiviação química (VELOSO e RANGEL, 2009).

2.3.1.1 Métodos de síntese

Do ponto de vista da fabricação de materiais mesoporosos, diversos métodos foram desenvolvidos. Entretanto, dois tipos de estratégias usadas na síntese de materiais mesoporosos merecem atenção: primeiro método, conhecido como método do "Soft Template", e o segundo o método conhecido como método do "Hard Template" ou Método de Moldagem Sequencial (XIA et al, 2009).

2.3.1.1.1 Método do "Soft Template"

O Método do "soft template" baseia-se no direcionamento da estrutura inorgânica através da utilização de surfactantes. É um método intuitivo e aborda vários aspectos de outros mecanismos propostos. Ele é dividido em dois caminhos ou rotas, nas quais ou a fase líquido-cristalina está intacta antes da adição das espécies inorgânicas ou a adição das espécies inorgânicas produz o ordenamento das micelas de surfactantes diluídas (SOLER-ILLIA et al, 2002).

O primeiro deles, proposto por BECK e colaboradores em 1992 é conhecido como direcionamento por cristal líquido (LTC). Neste método, usam-se como agentes direcionadores de estrutura moléculas orgânicas (surfactantes) formadas por uma parte hidrofóbica, que consiste de compostos alifáticos ou hidrocarbonetos, e outra parte hidrofílica, polar, que interage fortemente com a água e são constituídos geralmente por grupos hidroxila, carboxílicos e iônicos (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Quando a concentração de surfactante atinge a concentração micelar crítica (CMC), as moléculas do tensoativo irão formar agregados chamados, micelas. As micelas são formadas através do contato dessas moléculas com meio aquoso, onde as partes hidrofóbicas, devido à repulsão com o solvente, voltam-se para o centro e os grupos da cabeça, hidrofílicos, permanecem na superfície para maximizar a interação com a água ou outros contra-íons. Quando a concentração de surfactante em solução aumenta, a repulsão entre as micelas diminui e estas se agrupam gerando micelas cilíndricas. Após a formação das micelas, as espécies inorgânicas, interagem com o grupo polar do surfactante e polimerizam ao longo da estrutura micelar formando a mesoestrutura híbrida. Finalmente, o direcionador é removido através de calcinação ou por extração com solvente, utilizando, por exemplo, etanol. Como consequência da remoção do surfactante forma-se uma rede de cavidades que haveria na estrutura da matriz que determinam as propriedades físico-químicas dos materiais, tais como a espessura da parede, topologia, simetria, estrutura da parede e sistema de distribuição de poros (VALLET-REGI´ et al, 2008).

A Figura 2.16 mostra as etapas de formação de um sólido mesoporoso através da síntese "Soft Template".





De acordo com o segundo mecanismo, proposto por FIROUZI et al. (1995), a interação dos ânions silicato com a micela de surfactante induz à formação dos cilindros e ao arranjo silicato/micela para formar a fase hexagonal. É a denominada *rota cooperativa*. Antes da adição dos precursores inorgânicos, moléculas do surfactante estão em equilíbrio dinâmico com seus agregados micelares esféricos e/ou cilíndricos. Quando da adição da fonte de sílica, ânions silicato deslocam os contra-íons originais do surfactante, como uma consequência direta da diminuição da área ocupada pelas cabeças polares catiônicas do surfactante, devido à diminuição da repulsão entre as mesmas. Dessa forma, estruturas orgânico-inorgânicas são geradas e se organizam numa mesofase, a qual antecede a polimerização e formação da sílica mesoporosa. Uma representação esquemática da rota cooperativa é apresentada na Figura 2.17.



Figura 2.17 - Representação do mecanismo cooperativo utilizando brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) como surfactante.

Existem várias discussões sobre a exatidão de uma ou outra rota. A primeira rota do mecanismo LCT ainda é muito questionada por vários trabalhos na literatura (COLEMAN e ATTARD, 2001; BOISSIÈRE et al, 2001), principalmente pelo fato de que as concentrações de surfactante empregadas estariam abaixo da concentração micelar crítica (CMC) necessária para a formação das estruturas suportes para os silicatos. Hoje, sabe-se que não é necessário que haja uma fase líquida cristalina pré-formada para a formação do MCM-41, mas os detalhes atuais de formação do MCM-41 ainda não estão completamente claros.

A rota cooperativa mostra-se mais adequada do que a primeira rota do mecanismo LCT, principalmente porque não está restrito a concentrações específicas do surfactante, além de que soluções de silicato são sistemas complexos de espécies oligoméricas e ânions poliméricos, cuja composição e concentração podem influenciar a fase de cristal líquido do direcionador (SOUZA, 2006).

A síntese através da rota "Soft Template" não está limitada à síntese de materiais a base de silício com estrutura mesoporosa. Pode ser utilizada para a síntese de novos materiais mesoporosos com elementos diferentes. SCHMIDT et al (2006) relataram a síntese de fosfato de cálcio mesoporoso utilizando mono-n-dodecil fosfato (($C_{12}H_{25}OP$)(O)(OH)₂, MDP) como template e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) como co-surfactante. Os autores observaram a formação uma estrutura lamelar, com partículas na forma de bastonetes, com área de superfície, tamanho de poro e volume poros de 90 m²/g, 2,8 nm e 0,11 cm³/g, respectivamente, formada por a combinação de várias fases de fosfato de cálcio, incluindo apatita, brushita e fosfato octacálcio.

Seguindo esta mesma abordagem, ZHANG et al (2008) relataram a preparação um fosfato de cálcio mesoestruturado utilizando ácido fenilfosfônico (PhP), que foi usado tanto como fonte de fósforo e template, dodecil sulfato de sódio (SDS) foi incorporado para melhorar a estabilidade da estrutura porosa resultante. O fosfato mesoporoso sintetizado apresentou tamanho dos poros, área superficial e volume de poros de 15,91 nm, 72 m² g⁻¹ e 0,569 cm³ g⁻¹, respectivamente.

2.3.1.1.2 Método do "Hard Template" ou Moldagem Sequencial

O método da moldagem sequencial normalmente é utilizado para preparar materiais de carbono ordenados, CMK-x, permitindo o controle preciso da porosidade.

Nesse processo, o sólido é formado ao redor da molécula do molde (template), geralmente zeólitas e sílicas meso e macroporosas, através de uma ligação física entre o molde e o precursor de carbono (hidrocarbonetos, açúcares e outros). As cinco etapas básicas envolvidas no processo de moldagem são: preparação do molde inorgânico; impregnação do molde com um precursor de carbono; polimerização do precursor; carbonização do material orgânico e remoção do molde inorgânico (VINU et al, 2006). Essas etapas são ilustradas na Figura 2.18, mas várias modificações podem ser realizadas em cada uma das etapas.



Figura 2.18 - Método de moldagem empregada na obtenção do carvão mesoporoso ordenado (CMK-3) a partir da sílica mesoestruturada SBA-15. Etapa 1: impregnação; etapa 2: carbonização. Fonte: VELOSO e RANGEL, 2009.

A etapa de impregnação, também chamada infiltração, envolve a introdução do precursor de carbono na estrutura porosa do molde (ou matriz) e pode ser realizada por duas rotas distintas: a rota gasosa e a líquida. Por sua vez, a carbonização pode ocorrer em diferentes temperaturas, na faixa de 700-1000 °C. O controle dessas variáveis permite a obtenção de materiais de carbono com propriedades químicas e texturais pré-determinadas, para diferentes aplicações (VELOSO e RANGEL, 2009).

A rota gasosa é um método derivado do processo de deposição química a vapor (CVD, Chemical Vapour Deposition), no qual o substrato é exposto a um ou mais precursores, que reagem e/ou se decompõem na sua superfície, produzindo o depósito desejado. Nessa rota, são utilizados hidrocarbonetos voláteis (etileno, propileno, benzeno e outros) como precursores de carbono. A degradação térmica é realizada na superfície quente do molde (substrato) resultando em uma deposição pirolítica do carbono; frequentemente são formados subprodutos voláteis (principalmente hidrogênio). Na etapa final do processo, o molde é extraído por um agente químico adequado, geralmente ácido fluorídrico, ácido clorídrico ou hidróxido de sódio (VELOSO e RANGEL, 2009).

Na rota líquida, os poros do molde são preenchidos com um precursor no estado líquido, um polímero (resina fenólica e outros) ou pré-polímero (álcool furfurílico, pirrol, sacarose e outros), que se polimeriza nos poros com a ajuda de um

catalisador. A sacarose é mais frequentemente utilizada devido ao seu baixo custo e pela possibilidade de se obter carbonos porosos com ordenamento estrutural e propriedades texturais satisfatórias. Em seguida, o compósito molde/precursor é carbonizado. Por último, o molde é removido, como na rota anterior (VELOSO e RANGEL, 2009).

O material de carbono formado por esse processo resulta em uma réplica inversa do molde (o esqueleto do molde inorgânico corresponderá à porosidade do material), conforme Figura 2.19.



Figura 2.19 - Síntese dos materiais de carbono mesoporosos: (a) CMK-1 de MCM-48, (b) CMK-3 do SBA-15. Figura adaptada de VINU et al, 2006.

Esse processo de replicação não somente define a porosidade do material como também a morfologia e o tamanho das partículas. Nesse sentido, a escolha do material inorgânico utilizado como molde determinará as seguintes características do material obtido: o tamanho de poro, que estará condicionado às características do esqueleto do molde (espessura da parede); a morfologia, podendo ser sintetizados materiais porosos com grande variedade de morfologias (esferas, cápsulas, cilindros, tubos, biomorfologias e outros) e, o tamanho de partícula, sendo obtidos materiais de carbono porosos com tamanho muito uniforme, desde 100 nm até vários mícrons (VINU et al, 2006).

A síntese moldagem sequencial não está limitada à síntese de materiais de carbono com estrutura mesoporosa. Pode ser utilizada para a síntese de novos

materiais mesoporosos com elementos diferentes do carbono. Um dos exemplos de sucesso desta rota é a síntese de nitreto de carbono mesoporosos, que foi recentemente relatada por VINU et al, (2005). Para síntese de nitreto de carbono mesoporoso, a sílica mesoporosa SBA-15, usada como template, foi impregnada com uma mistura etilenodiamina e tetracloreto de carbono como fonte de carbono e o compósito obtido foi então tratado termicamente em fluxo de nitrogênio. O nitreto de carbono mesoporoso foi recuperado após a dissolução da estrutura de sílica com ácido fluorídrico. A estrutura de nitreto de carbono mesoporoso exibiu uma estreita distribuição de tamanho dos poros com área superficial específica e volume de poros de 505 m².g⁻¹ e 0,55 cm³g⁻¹, respectivamente.

FAN et al (2007) sintetizaram um cimento de fosfato de cálcio nanoporoso utilizando a rota "hard template". Nesta síntese eles impregnaram SBA-15, que serviu como template, com sacarose na presença de ácido sulfúrico, a mistura resultante foi seca e carbonizada a 1173 K em atmosfera de N₂ e, finalmente, para a obtenção do carbono mesoporoso (CMK-3) o template foi removido através do tratamento com uma solução de HF 10%. Em um procedimento típico os nanoporos do CMK-3 foram preenchidos por fontes de cálcio e fósforo. A remoção do molde de carbono foi realizada através de calcinação a 873 K em ar por 6h, o que levou a formação da biocêramica de fosfato de cálcio mesoporoso com estutura de tamanho dos poros, área superficial e volume de poros de aproximadamente 30 nm, 27 m²g⁻¹ e 0,27 cm³.g⁻¹, respectivamente.

XIA et al, (2009) sintetizaram uma hidroxiapatita de cálcio policristalina mesoporosa via rota "hard template". Primeiramente, CMK-3 foi sintetizado pela impregnação de sacarose em SBA-15, a qual foi posteriormente carbonizada a 1173 K sob atmosfera de N_2 e, finalmente, para a obtenção do carbono mesoporoso (CMK-3), o template foi removido através do tratamento com uma solução de NaOH 1 M. Em um segundo momento, proporções estequiométricas de cálcio e fósforo foram precipitadas em presença de CMK-3 em pH de 10 - 11, e em seguida o precipitado foi sinterizado a 873 K por 8 h em ar para remover o template de carbono. Finalmente, foi obtida uma Hidroxiapatita, branca e macia, com tamanho dos poros, área superficial e volume de poros de 2,73 nm, 42,43 m² g⁻¹ e 0,12 cm³ g⁻¹, respectivamente.

Além dos métodos de síntese Soft Template", e "Hard Template" ou Método de Moldagem Seqüencial, acima descritos. Sólidos mesoporosos podem ser obtidos através de intercalação de materiais lamelares, tais como hidróxidos duplos lamelares, fosfatos e óxidos metálicos (titânio, zircônio) e argilas (CIESLA e SCHUTH, 1999). Nesse processo, moléculas ou íons são intercalados em sólidos lamelares em condições hidrotermais, os quais esfoliam a estrutura lamelar formando nanofolhas que por sua vez dão origem a nanotubos (MEYNEN et al, 2009). Essas etapas são ilustradas na Figura 2.20.



Figura 2.20 - Esquema da formação da estrutura inorgânica mesoporosa através da intercalação de um sólido lamelar por moléculas ou íons. Figura adaptada de MEYNEN et al, 2009.

2.4 UTILIZAÇÃO DE MATERIAIS MESOPOROSOS ORDENADOS NA LIBERAÇÃO DE DROGAS

Ao longo das últimas três décadas, tem havido um crescimento rápido na área de administração de medicamentos, na busca de novos sistemas de liberação controlada de drogas. Materiais naturais e sintéticos têm sido testados e se propõem como componentes de novos dispositivos na liberação controlada de drogas e muitos esforços têm sido feito para sintetizar materiais com propriedades biológicas, tecnológicas e mecânicas com aplicação na liberação controlada de drogas (CAVALLARO et al, 2004). Nos últimos anos, diversos materiais foram utilizados como sistemas carreadores de drogas, incluindo polímeros naturais (colágeno, albumina, gelatina, agarose, alginato, carragenina, ácido hialurônico, dextran, quitosana, ciclodextrinas); plástico (poliéster, poliamidas, polianidrido, polímeros acrílicos) (OLIVEIRA e LIMA, 2006); sílica (MANZANO et al, 2008); nanotubos de carbono (HILDER e HIL, 2008); zeólitas (HORCAJADA et al, 2006) e cimentos de

fosfatos de cálcio (SUDO et al, 2008; SOUZA et al, 2008; YU et al, 2009; ANDERSON et al, 2005). Cada um deles apresenta características próprias que os tornam adequados para o uso em determinadas regiões do corpo ou determinadas drogas.

Em geral, um substrato potencial a ser usado como carreador de droga tem que ter a habilidade para incorporar uma droga, retê-la em um local designado e específico, e liberá-la progressivamente com o tempo dentro de tecidos circunvizinhos. São vantagens adicionais se estes materiais forem biodegradáveis (GINEBRA et al, 2006). Em sistemas baseados em sílica, as drogas são adsorvidas em sílica disponível comercialmente. No entanto, mistura direta de sílica-gel e drogas resultam, muitas vezes, na dispersão heterogênea de drogas através do gel, o que pode afetar a taxa de liberação da droga entre diferentes amostras (TOURNE-PETEILH et al, 2003). Estudos relatados nos últimos anos têm mostrado que algumas microesferas de quitosana reticuladas são citotóxicas e podem comprometer a biocompatibilidade de materiais com ligações cruzadas (LI et al, Em sistemas de liberação controlada de drogas envolvendo fosfatos de 2004). cálcio, apesar de apresentarem boa biocompatibilidade, a porosidade dessas matrizes é altamente heterogênea, devido à composição química complexa, o que apresenta como grande desvantagem a dificuldade de garantir distribuição homogênea da droga através da matriz, afetando assim a taxa de liberação (GINEBRA et al, 2006). Portanto, a necessidade de suprir essa desvantagem tem conduzido a melhoras nesse campo através da utilização de materiais mesoporosos, quimicamente homogêneos, que possuem porosidade bem definida.

2.4.1 Fatores que afetam a cinética de liberação de drogas em materiais com estrutura mesoporosa.

Desde a descoberta de materiais como sílica mesoporosa ordenada em 1992, síntese e aplicações de sólidos mesoporosos tem recebido atenção intensiva, devido a sua estrutura altamente ordenada, variados tamanhos de poros e alta área superficial. Na última década, os materiais mesoporosos têm encontrado muitas aplicações na separação, catálise, sensores e dispositivos (TAGUCHI et al, 2005). Devido à estrutura mesoporosa estável e propriedades superficiais bem definidas, materiais mesoporosos parecem ideais para encapsulamento de drogas farmacêuticas, proteínas e outras moléculas biogênicas. Nos últimos anos, o emprego de materiais mesoporosos para encapsulação e ainda liberação de uma variedade de moléculas de interesse farmacêutico vem sendo estudado (HARTMANN, 2005; YIU et al, 2005). Tem sido demonstrado que drogas de massa molecular pequena ou grande podem ser aprisionado dentro dos mesoporos por um processo de impregnação e liberados através de um mecanismo de difusão controlada.

Vários fatores podem influenciar o carreamento de drogas ao longo de uma matriz inorgânica mesoporosa, dentre eles pode-se citar: a estrutura dos poros, funcionalidade de superfície, morfologia, tamanho da molécula da droga e solvente para o carreamento da droga. Maiores áreas superficiais e tamanhos dos poros favorecem o carreamento de drogas. Ancoramento de grupos funcionais amino sobre matrizes mesoporosas causam mudanças no tamanho dos poros e a interação entre drogas e substrato, resultando em menor carregamento de drogas e taxa de liberação lenta (WANG, 2009).

2.4.1.1 Diâmetro dos poros versus tamanho da molécula da droga

A morfologia dos poros pode determinar o tipo de moléculas que podem caber nele e, portanto, classifica a molécula a ser usada no processo de adsorção. A superfície específica é um parâmetro que também influencia as propriedades de adsorção do material. Parece razoável acreditar que o tamanho dos poros deve afetar a quantidade da droga absorvida, bem como a facilidade na liberação desta droga na matriz. Comparando materiais mesoporosos do tipo MCM-41 com diferentes diâmetros de poros (2,5; 1,9; 1,6; 1,5 nm), a quantidade de ibuprofeno adsorvida depende do tamanho dos poros da matriz. Conforme a Figura 2.21, o diâmetro de poro tem uma forte influência na taxa de liberação das moléculas. Materiais que apresentam maiores diâmetros de poro liberam mais rapidamente as moléculas, comparando-se a aqueles com menores diâmetros (HORCAJADA et al, 2004). Esta liberação muito rápida, dependendo do fármaco, pode não ser uma característica desejada (SLOWING et al, 2008). Entretanto, outra investigação conduzida por ANDERSSON et al, (2004) também mostrou a conclusão semelhante para a estrutura de poros.



Figura 2.21 - Liberação controlada de Ibuprofeno em MCM-41 com diferentes tamanhos de poros. Fonte: HORCAJADA et al, 2004.

HORCAJADA et al, (2004) realizaram uma investigação centrada sobre a influência do tamanho dos poros da MCM-41 sobre a taxa de liberação de ibuprofeno. Este estudo revelou que a taxa de liberação de ibuprofeno em uma simulação com uma solução com Fluido Corporeo Simulado (SBF) diminuiu com a diminuição do tamanho dos poros na faixa de 2,5 - 3,6 nm

IZQUIERDO-BARBA et al, (2005) investigaram MCM-48 e *LP-la3d* com ibuprofeno e eritromicina para estudos de sistemas de liberação controlada. Os resultados mostraram que os MCM-48 e *LP-la3d* são carreadores efetivos na liberação controlada de drogas. A taxa de liberação de drogas diminuiu com a diminuição do tamanho dos poros da matriz.

2.4.1.2 Natureza química das paredes dos poros – funcionalização da superfície.

MCM-41 como um dos materiais mesoporosos sintetizados mais importantes, foi primeiramente utilizado como matriz para liberação controlada de drogas. Matrizes de MCM-41 mostram mesoporos hexagonais e cilíndricos. A estrutura da parede dos poros consiste de uma rede desordenada de pontes de siloxano e grupos de silanol livres que poderiam agir como núcleos hospedeiros para reagir com espécies químicas adequadas, comportando-se como uma matriz para a adsorção e liberação controlada de moléculas orgânicas. Outros grupos de materiais mesoporosos com maior tamanho dos poros, como SBA incluindo SBA-15, SBA-16, SBA-1, SBA-3, HMS e MSU também foram utilizados para liberação controlada de droga (WANG, 2009). Na Figura 2.22 mostra algumas formas de funcionalização de superfície através do método pós – síntese utilizando usando organotrietoxisilanos.



Figura 2.22 - Funcionalização pós - síntese de SBA-15 usando organotrietoxisilanos. Fonte: HUMPHREY e WRIGHT, 2005.

Funcionalização de matrizes mesoporosas com grupos orgânicos permitem um controle preciso sobre as propriedades de superfície e tamanho dos poros dos materiais mesoporosos para aplicações específicas (STEIN e MELDE, 2000). Funcionalização de materiais mesoporosos pode alterar o tamanho dos poros e as propriedades hidrofílicas/hidrofóbica da superfície. Várias investigações foram conduzidas sobre o uso da silanização para modificar os sólidos mesoporosos, 40 MCM-41 (QU et al, 2006; ZENG et al, 2006, ZENG et al, 2005) e SBA-15 (DOADRIO et al, 2006; SONG et al, 2005) para liberação controlada de drogas. SONG et al, (2005), constataram que o tipo de agente sililante e o método de síntese utilizado vão afetar as taxas de ancoramento e liberação de drogas ao estudar SBA-15 funcionalizada com grupos amino. Neste estudo foi funcionalizada a sílica mesoporosa SBA-15 com grupos amino através dos métodos pós-síntese (PS2), síntese direta (OPS2) e SBA-15 pura calcinada (PS0). Ibuprofeno (IBU) e soro albumina bovina (BSA) foram selecionados como drogas modelo para liberação com SBA-15 modificado. Foi revelado que a capacidade de adsorção e comportamentos de liberação destes modelos de fármacos foi altamente dependente das propriedades de superfície dos diferentes materiais SBA-15. A taxa de liberação controlada encontrada para o ibuprofeno a partir da SBA-15 funcionalizada póssíntese foi efetiva, quando comparada com a da SBA-15 pura e SBA-15 funcionalizada por síntese direta (Figura 2.23), devido à interação iônica entre grupos carboxílico do ibuprofeno e grupos amina na superfície da SBA-15. No entanto, a SBA-15 funcionalizada através do método de síntese direta foi mais favorável para a adsorção e liberação da BSA, o que segundo os autores se deve ao grande número de interações eletrostáticas e hidrofílicas entre a BSA e a matriz de SBA-15 funcionalizada (Figura 2.24).



Figura 2.23 - Liberação in vitro de ibuprofeno por SBA-15 organicamente funcionalizada com grupos amina preparado por diferentes métodos, PS0, PS2, e OPS2. Figura adaptada de SONG et al, 2005.

Os resultados demonstram claramente que o método de pós-síntese é adequado, uma vez que pode facilmente fornecer uma maior quantidade de grupos funcionais que o método de síntese direta.



Figura 3.24 – Esquema representativo da interação de moléculas de ibuprofeno (esquerda) sobre uma parede de um poro de SBA-15 organicamente funcionalizada pelo método pós-síntese e, da interação de moléculas de BSA (esquerda) sobre uma parede de um poro de SBA-15 organicamente funcionalizada pelo método síntese direta. Fonte: SONG et al, 2005.

A modificação orgânica com o grupo aminopropil de dois materiais MCM-41 com diferentes tamanhos de poros foi realizado por MUNOZ et al, (2003) a fim de controlar a taxa de liberação de ibuprofeno a partir da matriz de sílica mesoporosa. Foi constatado que o procedimento de funcionalização é determinante, tanto na adsorção da droga bem como em seu perfil de liberação. Uma taxa mais lenta de liberação tem sido observada por um método de duas etapas, calcinação e funcionalização. ZENG et al, (2005) realizaram um estudo semelhante utilizando MCM-41 modificado por grupos orgânicos aminopropil como sistema de liberação controlada de aspirina. Os resultados mostraram que as propriedades de liberação deste sistema foram afetadas pela quantidade de grupos aminopropil na parede dos poros e a estrutura ordenada de materiais mesoporosos.

DOADRIO et al. (2006), relataram a funcionalização da SBA-15 para a liberação controlada de medicamentos. Foram comparadas amostras calcinadas e as amostras funcionalizadas com cadeias longas do grupo alquila como o octiltrimetoxisilano e octadeciltrimetoxisilano em matérias para liberação. As amostras foram carregadas com o antibiótico macrolídeo eritromicina e os testes de

liberação foram realizados *in vitro*. Foi observado que a taxa de liberação diminui com o aumento da população de grupos hidrofóbicos, -CH₂.

2.4.1.3 Área superficial

Estruturas mesoporosas que possuem a mesma simetria, mas áreas superficiais diferentes apresentam capacidades distintas de adsorção e liberação de fármacos. Um estudo realizado por BALAS et al, (2006) com duas matrizes de sílica mesoporosas, MCM-41 de área 1157 m²g⁻¹ e SBA-15 de área 719 m²g⁻¹, na liberação do alendronato. Os resultados mostraram que a quantidade de aledronato adsorvida foi maior no MCM-41, que possui a maior área superficial. O mecanismo de liberação foi o mesmo para os dois materiais, o transporte de difusão através dos mesoporos. Após 24 horas, 55 % do alendronato haviam sido liberados em ambas as sílicas.

ANDERSSON et al, (2004) preparam uma série de sílicas mesoporosas ordenados com diferentes tamanhos de poros, conectividade de poros e geometria dos poros, incluindo MCM-41, SBA-3 e SBA-1, como matrizes de transporte de sistemas de liberação controlada de drogas. Ibuprofeno foi usado como droga modelo e os processos de liberação foram monitorados sob condições de *in vitro*. O grau de carregamento da droga foi dependente da área superficial específica e do diâmetro dos poros da matriz hospedeira. O processo de liberação encontrado foi principalmente por difusão controlada, mas claras diferenças foram observadas entre os materiais estudados, o qual foi atribuído principalmente às diferenças na conexão e da geometria dos poros dos materiais e à estabilidade aquosa da matriz.

2.5 FOSFATOS DE CÁLCIO MESOPOROSOS

Fosfatos de cálcio, CaO-P₂O₅-H₂O, devido a sua semelhança química com o componente mineral do osso e dos tecidos duros dos mamíferos, apresentam boa biocompatibilidade e propriedades osteocondutora, o que os torna desejáveis como materiais para implantes e como agentes de liberação controlada de drogas e biomoléculas (DOROZHKIN e EPPLE, 2002). Muitos grupos de pesquisa têm

relatado a adsorção de biomoléculas sobre a superfície de fosfatos de cálcio, no entanto, as interações entre biomoléculas e a superfície de fosfato de cálcio é limitada devido à baixa área superficial encontrada nos fosfatos de cálcio convencionais (IKAWA et al, 2009).

O aumento da área superficial resultado da nanoporosidade pode contribuir na capacidade de uma matriz fosfática no carregamento de drogas (FAN et al, 2007). Áreas de superfície elevada e grandes volumes de poros geralmente têm sido exigidos para a utilização em adsorventes, e, além disso, o controle do tamanho dos poros aumenta a possibilidade de utilizar os compostos de fosfato de cálcio para a adsorção seletiva de biomoléculas de tamanho nanômetrico (IKAWA et al, 2008). Fosfatos de cálcio mesoporosos com um arranjo de poros ordenados e uma distribuição de poros muito estreita, propriedades que não ocorrem com fosfatos de cálcio convencionais, unem a versatilidade dos materiais mesoporosos, que são objetos de um números crescente de estudo em aplicações distintas, a interessantes propriedades dos fosfatos de cálcio convencionais.

Atualmente, a maioria das pesquisas têm sido focadas no processo para obter biomateriais com macroestrutura com varias morfologias (filmes, esferas, etc) ou macroporos para o intercrescimento natural de ossos (DOROZHKIN e EPPLE, 2002). No entanto, existem poucos relatos sobre fosfatos de cálcio com nano ou mesoestruturas.

A falta de publicações a cerca da síntese de fosfatos de cálcio puro mesoporosos foi atribuída por FAN et al, (2007) a dificuldade de sintetizar óxidos mesoporosos que não sejam à base de sílica, principalmente as espécies de fosfato de cálcio. Segundo os mesmos autores, a escassez de publicações esta relacionada à dificuldade de controle eficiente sobre a cristalização, uma vez que os íons cálcio e fosfato mostram uma tendência de interagir fortemente entre si e, em seguida, não conseguem interagir com as moléculas de surfactante, o que dificulta a preparação de fosfato de cálcio puro mesoestruturado sem subprodutos como outras fases de fosfato de cálcio (brushita, monetita, fosfato tricálcico, apatita, e assim por diante) (IKAWA et al, 2008).

Segundo SCHMIDT et al, (2006) existem três desafios principais na síntese de fosfatos de cálcio mesoporosos: (1) produção de partículas de tamanho nano ou

micro, (2) formação de mesoporos ordenados e (3) gerar um material estável com uma área superficial relativamente alta após remoção do template.

Apesar dessas dificuldades vários grupos de pesquisa têm reportado a síntese de fosfatos de cálcio mesostruturados, geralmente com áreas superficiais variando de 20 - 60 m².g⁻¹, preparados via rotas "soft template" utilizando surfactantes aniônico (ZHANG et al. 2010), catiônico (YAO et al. 2003; PRÉLOT e ZEMB, 2005; SCHMIDT et al ,2006) e neutro (IKAWA, 2008; IKAWA 2010; ZHAO e MA, 2005) e via rota "hard template" utilizando CMK-3 como template (FAN et al; 2007; XIA et al, 2009). No entanto, devido a problemas de processamento, um método confiável para a síntese de materiais mesoporosos de fosfato de cálcio de alta área superficial não foi ainda estabelecido (ZHANG et al, 2008), apesar do fato de que na natureza, a biomineralização de fosfatos de cálcio na presença de biosurfactantes (lipídios, açúcares, proteínas e aminoácidos) é comum em sistemas biológicos (SCHMIDT et al, 2006). Um exemplo desta biomineralização de fosfatos de cálcio é o leite, onde fragmentos de fosfato de cálcio coloidal interagem com a caseína (proteína do leite). A caseína por ter atividade anfipática por possuir regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (DE KRUIF e GRINBERG, 2002) e apresentar alta afinidade por fosfato de cálcio (LITTLE e HOLT, 2004) apresenta-se como um promissor biosurfactante na síntese de fosfatos de cálcio mesoporosos.

YAO et al, (2003) relataram a primeira síntese bem sucedida de hidroxiapatita mesoporosa utilizando um surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (C₁₉H₄₂BrN, CTAB). Eles produziram bastonetes de Hidroxiaptita de 0,5 - 1 μ m de comprimento e 50 - 100 nm de espessura. No entanto, a porosidade de seus materiais era baixa. Eles relataram volumes de poros de 0,0113 cm³/g, que correspondem a frações de volume de poros de 0,0036 e área superficial de 14 m²/g.

KITAMURA et al, (2005) produziram um fosfato octacálcio de alta porosidade (49 - 73%). No entanto, os seus materiais foram não homogêneos e compostos de misturas de agregados de grandes partículas esféricas (diâmetro > 100 μ m) e cristais na forma de agulhas. Tamanho dos poros foi também não uniforme com mesoporos e macroporos reduzindo a área superficial para um valor de 50 m²/g.

PRÉLOT e ZEMB (2005) utilizaram uma mistura de surfactantes catiônicos; (polioxietileno oleil éter fosfato) e (brometo de miristiltrimetilamônio) na síntese de

uma hidroxiapatita mesoporosa e avaliaram a influência da calcinação na estabilidade final da mesoestrutura desse material. Após calcinação a 673 K, a área superficial encontrada foi de cerca de 130 mg².g⁻¹, entretanto a mesoestrutura hexagonal sofreu colapso. Por outro lado, para as amostras calcinadas em maiores temperaturas (723 K, 773 K e 873 K), as áreas superficiais específicas encontradas foram ainda menores, na faixa de 20 a 30 m².g⁻¹. A diminuição da área superficial específica para este material foi atribuída ao colapso da estrutura do híbrido surfactante-hidroxiapatita, uma vez que a hidroxiapatita é estável a estas temperaturas.

SCHMIDT et al, (2006) relataram a síntese de fosfato de cálcio mesoporoso utilizando mono-n-dodecil fosfato ((C₁₂H₂₅OP)(O)(OH)₂, MDP) como template e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) como co-surfactante. Na síntese utilizando apenas MDP observaram a formação uma estrutura lamelar, com partículas na forma de bastonetes, formada por a combinação de várias fases de fosfato de cálcio, incluindo apatita, brushita e fosfato octacálcio. No entanto, esta estrutura em camadas não era estável após calcinação. A adição de CTAB na mistura reacional promoveu a formação de uma estrutura lamelar na forma de bastonete mais longa e mais espessa com área de superfície, tamanho de poro e volume poros de 90 m²/g, 2,8 nm e 0,11 cm³/g, respectivamente. Segundo os mesmos autores o aumento da estabilidade térmica do material após a adição de CTAB se dá ao fato que este co-surfactante ajuda a dirigir a montagem de micelas e reforçar a estrutura mesoporosa.

IKAWA et al, (2009) reportaram recentemente, com sucesso, a síntese de fosfatos de cálcio mesoestruturado com diferentes razões molares Ca/P preparados utilizando 4-dodecildietilenotriamina e ácido N-Lauroil-L-glutâmico como surfactantes. Com base na investigação de isotermas de adsorção-dessorção de N₂ a área superficial BET, o volume de poros e o diâmetro dos poros foram, respectivamente, 140 m².g⁻¹, 0,47 cm³.g⁻¹ e 7,1 nm.

2.5 CASEÍNA

Caseína, uma proteína da família de fosfoproteínas, formam o maior componente protéico na maioria dos leites e representam aproximadamente 80% da

proteína total no leite (FOX e BRODKORB, 2008). A principal função das caseínas no leite é o transporte eficiente de cálcio, fosfato e de proteínas da glândula mamária para o recém-nascido (MULLER-BUSCHBAUM et al, 2007).

A caseína foi isolada pela primeira vez em 1883 por Hammersten por precipitação isoelétrica em pH 4,6. Nesta época ele conclui que a caseína isoelétrica era homogênea. Entretanto, mais tarde, com base nas diferenças de solubilidade em sistemas aquosos, vários autores sugeriram que a caseína isoelétrica é heterogênea, o que foi confirmado em 1939 por Mellander através de estudos eletroforéticos, que mostrou que a caseína isoelétrica é uma mistura de três proteínas, que chamou α -, β - e κ -caseína. Essas proteínas foram fracionadas por Warner (1944) e por von Hipp, Groves, Custer e McMeekin (1952). Waugh e von Hippel (1956) utilizaram CaCl₂ para determinar as frações solúveis e insolúveis da caseína. A primeira fração, insolúvel, que representou 85% da caseína total, continha α - e β -caseína (Figura 2.25), enquanto que a fração solúvel continha uma proteína previamente desconhecida, que Waugh e von Hippel (1956) chamaram κ -caseína (FOX e BRODKORB, 2008).



Figura 2.25 – Estrutura molecular da α - e β -caseína. Em destaque um resíduo de prolina. Figura adaptada de SZYK-WARSZYNSKA et al, 2009.

α-Caseína é uma mistura de duas proteínas, α_{S1} -caseína e α_{S2} -caseína (ANNAN e MANSON, 1969). Os componentes da caseína, α_{s1} -, α_{s2} -, β-, e κ-caseína, existem nas proporções aproximadamente de 4:1:4:1 por peso. (LIU e GUO, 2009). α_{s1} -, α_{s2} -Caseínas constituem 40% e 10%, respectivamente, do teor de caseína do leite e geralmente são chamados de α_s -caseínas. β-Caseína, composta por 38% do conteúdo total de caseína no leite (SAHU et al, 2008).

 α_{S1} -Caseína tem massa molecular (MM) de 23.000 Dalton. A cadeia é constituída a partir de 199 aminoácidos com 17 resíduos de prolina, com diâmetro molecular de 9 nm. Tem duas regiões hidrofóbicas, contendo todos os resíduos de prolina, separados por uma região polar, a qual contém todos os oito grupos serilfosfato e é extremamente carregada. α_{S2} -Caseína tem massa molecular (MM) de 24.000 Dalton. A cadeia é constituída a partir de 207 resíduos de aminoácidos e 10 resíduos de prolina. As cargas negativas estão concentradas próximo aos

terminais de nitrogênio e as cargas positivas próximo dos terminais de carbono. Ambas as caseínas podem ser precipitadas em níveis muito baixos de cálcio. A massa molecular da β -caseína é de 24.000 Dalton. Tem 209 resíduos de aminoácidos e 35 resíduos de prolina. A região N-terminal é hidrofílica e altamente carregada, e a região C-terminal é uma região hidrofóbica. Esta proteína anfifílica atua como uma molécula de detergente. É menos sensível á precipitação com cálcio. Seu diâmetro molecular é de 7,5 nm. A massa molecular (MM) da κ -caseína é de 19.000 Dalton, apresentando 169 resíduos de aminoácidos e 20 resíduos de prolina. Esta caseína é muito resistente à precipitação com cálcio e é responsável pela estabilização de outras proteínas e agregados micelares (WALSTRA e JENNESS, 1984 citado por SZYK-WARSZYNSKA et al, 2009).

 α_s -Caseínas são as maiores proteínas de caseína, contendo 8 - 10 grupos serilfosfato, enquanto a β-caseína contém cerca de 5 resíduos de serilfosfato, e é mais hidrofóbica que a α_s -caseína e κ -caseína. Devido ao fato das α_s -caseínas e β caseínas serem altamente fosforiladas, elas são muito sensíveis à concentração de sais de cálcio, ou seja, elas precipitam com excesso de ions Ca²⁺. Ao contrário das outras caseínas, κ-caseínas são glicoproteínas, apresentado apenas um grupo fosfoserina. Assim, elas são estáveis na presença de íons cálcio, e consequentemente desempenham um papel importante na proteção das outras caseínas a precipitação e tornam mais estável as estrututuras micelares (PHADUNGATH, 2005 e FARRELL et al, 2004). A Figura 2.26 apresenta as estruturas das moléculas de $\alpha_{s-1}\beta$ - e κ - caseína com relação à presença e posições dos grupos serilfosfato.

Em resumo, a caseína pode ser entendida como copolímeros em blocos, constituída de blocos com altos níveis de resíduos hidrofóbicos ou hidrofílicos de aminoácidos. Consequentemente, as caseínas exibem uma tendência forte de se moldarem em micelas esféricas (NARAMBUENA et al, 2005).

No leite, a caseína existe como grandes partículas coloidais, 150 - 300 nm de diâmetro, chamados "micelas de caseína". Muitas das propriedades tecnologicamente importantes de leite, por exemplo, cor branca, estabilidade ao calor ou etanol e coagulação por coalho, são devido às propriedades das micelas de caseína (FOX e BRODKORB, 2008). As micelas de caseína receberam muita atenção em muitos campos, tais como alimentos, cosméticos e a medicina (LIU e

GUO, 2009), e é por isso que houve um grande incentivo econômico e tecnológico para caracterizar suas propriedades e elucidar a sua estrutura.

Figura 2.26 - Posições dos resíduos serilfosfato nas caseínas bovinas, indicando o cluster do fosfoserila. Figura adaptado de PHADUNGATH, 2005.

2.5.1 Micelas de caseína

Embora a palavra "micela" ser geralmente usada para descrever os agregados de moléculas anfipáticas, classificadas com sabões. A palavra "micele" ou "micela" (diminutivo do latim, mica, que significa miolo,) foi criada por Nageli e Schwendener em 1877, para descrever agregados moleculares ou partículas cristalinas de celulose, que consideravam serem os blocos de construção das células vegetais. Para eles as micelas eram consideradas a primeira fase na transição de moléculas sem vida para o protoplasma vivo, eles desenvolveram uma teoria micelar da vida (STRICK, 2000 citado por FOX e BRODKORB, 2008).

Atualmente, os físico-químicos usam o termo "micela" para descrever agregados de moléculas anfipáticas (por exemplo, tensoativos, detergentes, sabões) - caracterizadas por dois grupos moleculares com diferentes características - uma cabeça (geralmente polar) hidrofílica e uma cauda (geralmente carbonada) hidrofóbica - que dinamicamente se associam espontaneamente em solução aquosa a partir de certa concentração micelar crítica (CMC), formando grandes agregados moleculares de dimensões coloidais, as micelas.

Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma de monômeros; quando a concentração está acima, porém próxima da CMC, existe um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas (MANIASSO, 2001) (Figura 2.27). A CMC depende da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições experimentais (força iônica, contra-íons, temperatura, etc).



Figura 2.27 – Formação do agregado micelar. Figura adaptada de MANIASSO, 2001.

As propriedades gerais das micelas de caseína atualmente são bem estabelecidas. As principais características são resumidas na Tabela 2.4.

A natureza e a estrutura das micelas de caseína têm sido extensivamente estudadas, mas sua exata estrutura ainda permanece em debate. Vários modelos para a estrutura das micelas de caseína têm sido propostos nos últimos 50 anos e os progressos têm sido regularmente revistos (OLIVEIRA e TIMM, 2007).

O modelo mais comumente aceito é o modelo de sub-micela proposto inicialmente por Morr em 1967 e revisto por Slattery e Evard (1973), Schmidt (1980) e Walstra (1984) (ROLLEMA, 1992 citado por PHADUNGATH, 2005). Este modelo sugere que as micelas de caseína são construídas de subunidades aproximadamente esféricas, as sub-micelas. A composição das sub-micelas é variável e o tamanho é na faixa de 12 - 15 nm de diâmetro, cada sub-micela tem 20 - 25 moléculas de caseína. As sub-micelas são mantidas juntas por interações hidrofóbicas entre as proteínas e por ligações de fosfato de cálcio.

Propriedades	Valor	
Diâmetro	120 nm (variando de 50 – 500 nm)	
Área superficial	8 x 10 ⁻¹⁰ cm ²	
Volume	2,1 x 10 ⁻¹⁵ cm ³	
Densidade (hidratado)	1,0632 g.cm ⁻³	
Massa	2,2 x 10 ⁻¹⁵ g	
Conteúdo de água	63 %	
Hidratação	3,7 g de H ₂ O.g ⁻¹ proteína	
Voluminosidade	44 cm ³ .g ⁻¹	
Massa molecular (hidratada)	1,3 x 10 ⁹ Da	
Massa molecular (desidratada)	5 x 10 ⁸ Da	
Numero de peptídeos	5 x10 ³	
Numero de partículas por mL de leite	$10^{14} - 10^{16}$	
Superfície das micelas por mL de leite	5 x 10 ⁴ cm ³	
Distância livre significativa	240 nm	
Concentração micelar crítica (CMC)	1mg.mL ⁻¹	
Ponto isoeletrônico	4,6	

Tabela 2.4 – Propriedades das micelas de caseína. Tabela adaptada de FOX e BRODKORB, 2008.

Existem dois tipos principais de sub-micelas; um consistindo principalmente em α_s - e β -caseínas, onde as regiões hidrofóbicas estão dirigidas para o centro da sub-micela, outro tipo consistindo de α_s - e κ -caseínas, que é mais hidrofílico, devido aos resíduos de açúcares presentes na κ -caseína. As κ -caseínas estão localizadas na extremidade das micelas com a parte hidrofílica do C-terminal saliente na superfície das micelas para formar uma camada "peluda", que vai evitar a agregação de novas sub-micelas por repulsão eletrostática. A camada peluda também é considerada responsável pela estabilidade das micelas contra floculação (WALSTRA, 1999). A Figura 2.28 mostra a estrutura das micelas da caseína a partir do modelo sub-micelas.


Figura 2.28 - A estrutura da micela de caseína através do modelo de sub-micelas, mostrando os C-terminal das κ-caseína projetadas na extremidade da micela. Figura adaptada de WALSTRA, 1999.

Segundo HOST (1994), o fosfato de cálcio está na forma de nanoclusters interagindo com os sítios da caseína e aglomerados de fosfoserina das α_{S} - e β -caseínas sensíveis a cálcio. Devido ao fato que as α_{S1} - e α_{S2} -caseínas têm mais grupos serilfosfato, provavelmente, no caso da α_{S1} -caseína, elas são capazes de entrelaçar as estruturas de nanoclusters de fosfato de cálcio (Ca₉(PO₄)₆) em uma rede tridimensional, constituindo um caminho previsto para o modelo de polimerização das sub-micelas. Este mecanismo proposto de formação das sub-micelas sugere que o fosfato de cálcio coloidal (Ca₉(PO₄)₆) desempenha um papel integrador na micelas (HORNE, 2006), conforme ilustrado na Figura 2.29.

Estudos realizados por MCMAHON et al, (1998), usando técnicas de espalhamento de raios-X e nêutrons em micelas de caseína determinaram que os nanoclusters de fosfato de cálcio coloidal apresentam um raio de 2,3 nm, e estão rodeados por 49 peptídeos formando uma camada 1,6 nm de espessura.

Segundo TUINIER e KRUIF (2002), a estabilidade estérica das micelas de caseína é gerada por uma camada externa relativamente esparsa de κ -caseína em forma de escova (Figura 2.28) a qual se constitui na fração hidrofílica da caseína, que interage com a água e impede a agregação das micelas.



Figura 2.29 - Ilustração da formação de redes no modelo de Holt. Alfa-caseína (ambas α_{S1} - e α_{S2} -caseínas) é mostrado como bifuncional, enquanto a β -caseína é monofuncional. Os nanoaglomerados de fosfato de cálcio são desenhados contendo 4 sítios para facilitar a ilustração. A ligação alfa para diferentes nanoclusters atua como ponte para permitir que a cadeia cresça. Na parte inferior direita, é ilustrado um nanoaglomerado fechado e cercado por cadeias beta monofuncionais. Na distribuição aleatória das moléculas de caseína, isso é facilmente possível. Observe como a cadeia de nanoclusters é cercada por regiões hidrofóbicas pendentes (azul) das caseínas. Fonte: HORNE, 2006.

Diferentemente das outras caseínas, a κ -caseína é uma glicoproteína e possui apenas um grupo fosfoserina (Figura 2.26), sendo, portanto, estável na presença de íons de cálcio e assumindo importante papel na estabilidade da micela de caseína, pois, apesar do fosfato de cálcio atuar como um agente estruturante, se não houver κ -caseína, a agregação das sub-micelas continuará até à formação de um gel ou de um precipitado (OLIVEIRA e TIMM, 2007).

O modelo de sub-micela produzido por Holt e melhorado por Tuinier e Kruif mostra grande coerência com a microscopia eletrônica de transmissão de DALGLEISH et al. (2004) conforme Figura 2.30, as quais sugerem que a superfície da micela de caseína é mais complexa que uma simples esfera rígida coberto por "pêlos" relativamente curtos. As micrografias parecem mostrar que a micela é constituída de estruturas tubulares, presumivelmente de caseínas, que se projetam a partir do volume da micela. Esses túbulos são cerca de 20 nm de diâmetro, que é consistente com as dimensões das nanopartículas de fosfato de cálcio/caseína proposto por Holt. As micrografias parecem mostrar representações detalhadas da superfície das partículas, com muitos detalhes, entretanto, não foram capazes de mostrar os "pelos" de moléculas κ -caseína na superfície, no entanto, é observado que há um tipo bem definido de estruturas cilíndricas ou tubulares entre 10 e 20 nm de diâmetro, projetando-se na superfície da partícula, conforme sugerido por TUINIER e KRUIF (2002).



Figura 2.30 - Micrografia eletrônica de uma micela de caseína. Escala = 200 nm. Fonte: DALGLEISH et al. (2004)



3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES

Foram utilizados neste trabalho os seguintes reagentes, todos sem purificação prévia:

- ✓ Fosfato de amônio (QEEL, PA) $(NH_4)_2HPO_4$;
- ✓ Cloreto de cálcio (CROSS, PA) CaCl₂.2H₂O;
- ✓ Caseína (REAGEN);
- ✓ Imidazol (MERK) $C_3H_4N_2$;
- ✓ Ácido clorídrico (VETEC) HCI;
- ✓ Cloreto de amônio (MERK) NH₄CI;
- ✓ Ácido fosfórico (MERK) H₃PO₄;
- ✓ Nitrato de prata (VETEC) AgNO₃;
- ✓ 3-aminopropiltrimetoxissilano (ALDRICH, 98%, PA) $C_6H_{17}O_3NSi$;
- ✓ 3-propiletilenodiaminotrimetoxissilano (ALDRICH, 98%, PA) $C_8H_{22}O_3N_2Si$;
- ✓ 3-propildietilenotriaminotrimetoxissilano (ALDRICH, 98%, PA) C₁₀H₂₇O₃N₃Si;
- ✓ Dihidrogenofosfato de potássio (REAGEN) KH₂PO4;
- ✓ Hidrogenofosfato disódico (SIGMA ALDRICH) NaHPO₄.2H₂O;
- ✓ Soro albumina bovina (SIGMA ALDRICH) BSA;

3.2 SOLVENTES

Os seguintes solventes foram utilizados:

- ✓ Xileno (MERCK) C₆H₄(CH₃)₂
- ✓ Álcool etílico (CHEMCO) CH₃CH₂OH
- ✓ Acetona (CHEMCO) (CH₃)₂CO
- ✓ Éter etílico (CHEMCO) (CH₃CH₂)₂O
- ✓ Água deionizada, obtida através de deionizador Permution

3.2.1 Purificação dos Solventes

A acetona, o álcool etílico e o éter etílico foram tratados com óxido de cálcio, que foi calcinado previamente a 1173K por 12 h e, em seguida, refluxados, destilados e armazenados em frascos apropriados. O xileno foi tratado com óxido de cálcio, também calcinado a 1173K por 12 h e em seguida tratado com sódio metálico por uma hora antes de ser refluxado e destilado. O xileno purificado foi conservado em vidro escuro.

3.3 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA MESOPOROSA

A síntese da hidroxiapatita mesoporosa foi realizada partindo de soluções de iguais volumes contendo 0,033 mol de fosfato de amônio ($(NH_4)_2HPO_4$) e 0,056 mol de cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O) numa razão molar Ca/P = 1,67.

Em um procedimento típico, inicialmente 250 cm³ de uma solução aquosa de caseína de concentrações 1 e 5 mg/cm⁻³, foram preparadas com soluções tampões: Imidazol/HCI pHs 7,0 e 8,0 e NH₄Cl/NH₄OH pH 11,0. Essas suspensões foram adicionadas a um balão de fundo redondo de três bocas com capacidade de 1000 cm⁻³, conectado a dois funis de adição e na terceira boca a conexão com o agitador mecânico, conforme Figura 3.1.



Figura 3.1 - Sistema utilizado para síntese das mesoestruturas híbridas Hap-CASxy.

Inicialmente, 250 cm³ da solução de caseína foi agitada vigorosamente a uma velocidade de 1400 rpm por 1 h, a temperatura ambiente, onde observou-se a formação de uma suspensão espumosa, caracterizando a formação de micelas. Em seguida, a agitação foi diminuída a 200 rpm e adicionou-se simultaneamente, gota-agota, com vazão de 2 cm³.min⁻¹, 250 cm³ das soluções aquosas de cloreto de cálcio (0,056 mol) e de fosfato de amônio (0,033 mol). Após a completa adição dessas soluções, o precipitado formado foi envelhecido sob agitação e temperatura ambiente por 15 h. Em seguida, o precipitado obtido foi filtrado e lavado abundantemente com água deionizada durante 5 dias até o teste de cloreto, verificado com a solução de AgNO₃, desse negativo. Finalmente, o produto foi seco a 373 \pm 10 K em estufa, por 24 horas, para eliminação da água. Os sólidos obtidos foram denominados de *HCxy*, onde *x* representa a concentração de caseína e *y* o pH de síntese.

Após secos os híbridos mesoestruturados *HCxy*, foram calcinados a temperaturas de 573, 773 e 873 K por 6 horas sob atmosferas de oxigênio e nitrogênio com taxas de aquecimento 2, 10 e 25 K.min⁻¹ para a retirada do surfactante e obtenção da estrutura mesoporosa.

Para efeito de comparação foi realizada uma síntese controle da hidroxiapatita não mesoporosa (Hap) nas mesmas condições, sem o uso do surfactante, a pH 11. O sólido obtido foi denominado Hap.

3.4 REAÇÃO DE SILANIZAÇÃO

As reações seguiram o método de silanização heterogêneo em condições anidras (DA SILVA et al, 2007). Na etapa de funcionalização, 2,0 g do sólido HCxy que apresentou maior área superficial específicas, previamente seco a 393 K sob vácuo foi suspenso em 100 cm³ de xileno, em um balão de fundo redondo de três bocas com capacidade de 250 cm³, conectado com condensador de refluxo, com um *topper* para entrada de N₂ e com agitador mecânico (Figura 3.2). Sob agitação à temperatura de 373 K em atmosfera de N₂, adicionou-se 5 ml de um dos agente sililantes: 3-aminopropiltrimetoxissilano (N); 3-propiletilenodiaminotrimetoxissilano (NN) ou 3-propildietilenotriaminotrimetoxissilano (NNN). A suspensão foi mantida sob refluxo a 373 K durante 48 h, sendo, após resfriada, filtrada e o sólido obtido

lavado com xileno, etanol, acetona e éter etílico, respectivamente e seco sob vácuo por 48 h a 393 K. As diversas matrizes obtidas foram nomeadas como: *HCxy-N; HCxy-NN e HCxy-NNN*.

Para efeito de comparação foi realizada uma reação controle com a hidroxiapatita não mesoporosa (Hap) nas mesmas condições. Os sólidos obtidos foram denominados Hap-N, Hap-NN e Hap-NNN.



Figura 3.2 - Sistema utilizado para modificação das hidroxiapatitas mesoporosas.

3.5 ENSAIOS DE ADSORÇÃO DE BSA NAS MATRIZES MESOPOROSAS.

3.5.1 Efeito do Tempo

A obtenção das isotermas de adsorção foram feitas pelo método da batelada (ARAKAKI et al, 2003) em que amostras de aproximadamente 50,0 mg das hidroxiapatitas mesoporosa (*HCxy*) ou convencional (Hap) puras ou modificada organicamente (*HCxy-N; HCxy-NN; HCxy-NNN; Hap-N; Hap-NN e Hap-NNN*) foram suspensas em 20,0 cm⁻³ de uma solução aquosa de BSA de concentração de 1000 ppm preparada em tampão pH 7,2 (0,067 mol.L⁻¹ KH₂PO₄/0,067 mol.L⁻¹ Na₂HPO₄.2H₂O). A suspensão foi, então, mecanicamente agitada em um banho termostatizado a 298 K por tempos variados de 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60,

90 e 120 min. Passado os intervalos de tempo pré estabelecidos, as suspensões foram filtradas e alíquotas dos sobrenadantes foram removidas e diluídas. Por sua vez, as quantidades de BSA remanescentes foram quantificadas por espectroscopia de UV/Vis através do "*método de Bradford*" (BRADFORD, 1976) utilizando comprimento de onda de 595 nm, conforme ilustrado na Figura 3.3. As medidas de concentração foram realizadas em um espectrofotômetro UV/Vis da HP, modelo 8453. Assim, foi possível determinar a quantidade de material adsorvido (Nf) por grama de sólido pela diferença entre a quantidade de BSA inicial (Ni) e após o equilíbrio estabelecido (Ns) pela a equação: Nf = (Ni – Ns)/m.

O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de "Coomassie brilliant blue" BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm, conforme espectro apresentado na Figura 3.3 (ZAIA et al, 1998).



Figura 3.3 - Espectro UV/vis da BSA-BG-250.

3.5.2 Efeito da Concentração

As isotermas de adsorção foram obtidas utilizando-se o método de batelada (ARAKAKI, et al., 2003). Para a adsorção, 50,0 mg da hidroxiapatita mesoporosa pura (*HCxy*) ou convencional (Hap) puras ou modificada organicamente (*HCxy-N; HCxy-NN; HCxy-NN; Hap-N; Hap-NN e Hap-NNN*) foram suspensos em 20,0 cm³ de solução aquosa de BSA, cujas concentrações variaram de concentração de 100 a 2000 ppm preparada em tampão de pH 7,2 (0,067 mol.L⁻¹ KH₂PO₄/0,067 mol.L⁻¹ Na₂HPO₄.2H₂O). As suspensões foram mecanicamente agitadas durante um tempo previamente estabelecido de 20 minutos, em uma mesa agitadora á temperatura de 298 K. Os sólidos resultantes foram separados por filtração e alíquotas dos sobrenadantes foram removidas e diluídas. Por sua vez, as quantidades de BSA remanescentes foram quantificadas por espectroscopia de UV/Vis como descrito no item 3.5.1.

3.5.3 Efeito do pH

A obtenção das isotermas de adsorção a vários pH's foram feitas pelo método de bateladas em que amostras de aproximadamente 50,0 mg da hidroxiapatita mesoporosa pura (*HCxy*) ou convencional (Hap) puras ou modificada organicamente (*HCxy-N; HCxy-NN; HCxy-NNN; Hap-N; Hap-NN e Hap-NNN*) foram suspensas em 10,0 cm³ de uma solução aquosa de BSA 1000 ppm e 10,0 cm⁻³ da solução tampão. Foram utilizados 4 pH's diferentes preparados a partir dos seguintes tampões: CH₃COOH 0,1mol.L⁻¹/CH₃COONa 0,1mol.L⁻¹ pH's 5,0 e 6,0; Imidazol 0,2 mol.L⁻¹/HCI 0,1mol.L⁻¹ pH's 7,0 e 8,0. As suspensões foram mecanicamente agitadas durante um tempo previamente estabelecido de 20 minutos, em uma mesa agitadora a temperatura de 298 K. Os sólidos resultantes foram separados por filtração e alíquotas dos sobrenadantes foram removidas e diluídas. Por sua vez, as quantidades de BSA remanescentes foram quantificadas por espectroscopia de UV/Vis como descrito no item 3.5.1.

3.6 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DE BSA NAS MATRIZES MESOPOROSAS.

Nesses ensaios, inicialmente 200,0 mg da hidroxiapatita mesoporosa (*HCxy*) ou convencional (Hap) puras ou modificada organicamente (*HCxy-N; HCxy-NN; HCxy-NN; Hap-N; Hap-NN e Hap-NNN*) foram suspensas em 80,0 cm³ de uma solução aquosa de BSA 2000 ppm. As suspensões foram mecanicamente agitadas durante um tempo previamente estabelecido de 20 minutos, sob condições ideais pré estabelecidas de pH, em uma mesa agitadora a temperatura de 298 K. Os sólidos resultantes foram separados por filtração e alíquotas dos sobrenadantes foram removidas e diluídas. Por sua vez, as quantidades de BSA remanescentes foram quantificadas por espectroscopia de UV/Vis como descrito no item 3.5.1.

Depois de filtrados os sólidos, previamente secos a 343 K sob vácuo, foram suspensos em 80,0 cm³ de solução aquosa formada por PBS (tampão fosfato de pH 7,4 produzido a partir de KH₂PO₄ 0,067 mol.L⁻¹/Na₂HPO₄.2H₂O 0,067 mol.L⁻¹, o qual tenta imitar o meio fisiológico)/água nas proporções 1/0 e 0/1. A suspensão foi, então, mecanicamente agitada em um banho termostatizado a 298 K por 72 horas. Em períodos previamente estabelecidos de 2 em 2 h alíquotas de 1ml do sobrenadante foram removidas e diluídas. Por sua vez, as quantidades de BSA remanescentes foram quantificadas por espectroscopia de UV/Vis como descrito no item 3.5.1. As alíquotas retiradas do sobrenadante foram automaticamente substituídas por volumes iguais da solução aquosa PBS/água.

3.7 CARACTERIZAÇÕES

3.7.1 Adsorção de N₂

As características dos poros das amostras foram analisadas usando um equipamento Micromeritics ASAP 2010, o qual é composto por um sistema de adsorção física automatizado que fornece dados de equilíbrio de adsorção e dessorção. As amostras mesoporosas puras foram desgasificadas por 2 horas a 200°C, antes de cada ensaio. Os dados de volume adsorvido e dessorvido em várias pressões relativas foram utilizados para gerar informações sobre a área superficial de BET, área superficial de micro e mesoporos, distribuição e tamanho médio de

poros. As medidas de área superficial especificam e do parâmetro C foram baseados nas teorias de Brunaer-Emmett-Teller (BET) (BRUNAUER et al, 1938). As análise de poros e volumes total de poros foram obtidos pelo método de Barret-Joyner-Halanda (BJH) (BARRET et al, 1951)

3.7.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos através do espectofotômetro de marca Bomem, modelo MB-Series, com transformada de Fourier, utilizando pastilhas de KBr com 1% de amostra, na região de 4000 a 400 cm⁻¹, com resolução 4 cm⁻¹ e 32 acumulações. Esta técnica serviu para confirmação dos grupos químicos presentes nos fosfato de cálcio puro e nos modificados com os agentes sililantes: 3-aminopropiltrimetoxissilano (N); 3-propil etilenodiaminotrimetoxissilano (NN) ou 3-propildietilenotriaminotrimetoxissilano (NNN), bem como na confirmação da retirada do surfactante por calcinação.

3.7.3 Análise Elementar

Os teores de carbono, nitrogênio e hidrogênio foram determinados usando um analisador de microelementar da Perkin-Elmer modelo PE 2400. Esta técnica foi utilizada para determinação dos grupos amino presentes nos fosfatos modificados com os agentes sililantes.

3.7.4 Análise Termogravimétrica

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas em uma Termobalança, marca DuPont, modelo 1090, em um intervalo de 300 a 1200 K, com razão de aquecimento 0,16 K.min⁻¹, em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 cm³.min⁻¹, em cadinho de platina utilizando uma massa de aproximadamente 10 mg dos sólidos. Esta técnica foi utilizada para avaliação da perda de massa dos compostos com o aumento da temperatura, avaliando assim a estabilidade térmica dos fosfatos de cálcio puros e organicamente modificados.

3.7.5 Difração de Raios-X.

As medidas de difração de Raios-X foram realizadas em um difratômetro Shimadzu modelo XD3A, trabalhando com uma diferença de potencial no tubo de 30KV e uma corrente elétrica de 20 mA. A varredura foi feita na faixa de 2θ de 5 a 60 graus. A radiação utilizada foi a KαCu. Todas as medidas foram realizadas através do método do pó.

Estas medidas foram importantes para identificar a cristalinidade do material, o tipo de fosfato obtido e se houve possíveis modificações estruturais nos materiais após a retirada do surfactante.

3.7.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido.

Os espectros no estado sólido de RMN de ³¹P e ¹³C com polarização cruzada (CP) e rotação do ângulo mágico (MAS), foram obtidas no espectrômetro AC300/P Bruker operando a 75 MHz para o ³¹P com tempo de contato de 10 ms, tempo de aquisição de 45 ms e intervalo de pulso de 10 s e 128 acumulações com faixa de 80 a - 80 ppm. O ácido fosfórico foi usado como referência para calibrar a escala de deslocamento químico. Para o ¹³C com tempo de aquisição 3 s, tempo de contato 3 ms e com faixa de 0 a 220 ppm. Os espectros de RMN foram úteis para avaliação dos grupamentos orgânicos nos materiais após o processo de organofuncionalização.

3.7.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura por detecção de elétrons secundários em um microscópio jeol JSTM – 300, onde as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro e fita de carbono por metalização em um instrumento de Plasma Science. Estas medidas foram importantes para detectar a morfologia das partículas.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo geral é sintetizar hidroxipatita com porosidade controlada utilizado caseína como agente direcionador de estrutura, modificá-la organicamente visando melhorar as propriedades finais desses sólidos principalmente no que diz respeito à biocombatilidade e sua capacidade como carreadora de fármacos. Neste capítulo constam os resultados e discussões deste estudo, que foram divididos em quatro partes: 1) análise das matrizes mesoporosas obtidas; 2) análise das matrizes mesoporosas modificadas organicamente obtidas a partir da reação dos agentes sililantes nitrogenados de cadeia crescente; 3) ensaio de adsorção de soralbumina bovina (BSA) no tocante a parâmetros como: pH, tempo e concentração ; 4) a quarta e última parte deste capítulo se constitui de um ensaio de liberação controlada de BSA em alguns sólidos mesoporosos aqui reportados.

4.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS

4.1.1 Adsorção de N₂

Os sólidos mesoporosos por apresentarem estrutura altamente ordenada, variados tamanhos de poros e alta área superficial possuem diversas aplicações, dentre elas a liberação controlada de drogas. Esta aplicação depende das características estruturais aliadas a uma alta área superficial quais. A adsorção de N₂ em várias pressões relativas pode gerar informações sobre a área superficial de BET, área superficial de micro e mesoporos, distribuição e tamanho médio de poros.

Nas Tabelas 4.1 e 4.2 são apresentados os resultados obtidos das medidas de adsorção de N₂, para as hidroxiapatitas mesoporosas sob diferentes condições de síntese e pós-síntese.

Conforme se observa na Tabela 4.1 as matrizes mesoporosas sintetizadas utilizando concentração de caseína de 1mg.ml⁻¹ e pH 7,0 foram todas calcinadas em temperaturas de 573, 773 e 873 K com taxas de aquecimento de 2, 10 e 25 K.min⁻¹. Através dos resultados obtidos com estes materiais constatou-se que as

maiores áreas superficiais e os menores diâmetros de poros, características desejáveis para materiais com aplicação em dispositivo de liberação controlada de fármacos, foram encontradas nos sólidos tratados, pós-síntese, a temperatura de calcinação de 573 K e taxa de aquecimento de 10 K.min⁻¹ (Tabela 4.2). Tais condições consideradas ideais serviram como base para o tratamento pós-síntese dos demais sólidos (Tabela 4.2).

Analisando as Tabelas 4.1 e 4.2 pode-se contatar que todos os materiais sintetizados neste trabalho apresentam áreas superficiais de BET (~ 55 a ~ 106 m².g⁻¹) elevadas quando comparadas com aquelas encontradas na literatura para os fosfatos de cálcio mesoporoso, bem como em comparação a hidroxiapatita convencional, onde sua área superficial de BET é de apenas 18 m².g⁻¹. Estes dados comprovam ser possível a obtenção de fosfatos de cálcio mesoestruturados utilizando a caseína como surfactante.

Condições de Síntese				Caracterização Textural		
		Temperatura	Taxa de			
Conc.	<u>л</u> ц	Calcinação	Aquecimento	S_{BET}	Vp	Dp
Caseína	pri	em O ₂	Calcinação	(m²/g)	(cm ³ /g)	(nm)
		(K)	(K/min.)			
		-	-	52,6*	0,278*	17,90*
	7,0		2	52,0	0,285	16,00
		573	10	54,0	0,309	16,52
			25	51,6	0,269	16,00
1ma/ml			2	45,0	0,261	20,21
nng/nn		773	10	45,4	0,273	20,55
			25	50,0	0,278	18,00
			2	42,2	0,284	25,06
		873	10	44,8	0,289	23,23
			25	42,3	0,262	23,72

Tabela 4.1 - Resultados de adsorção de N_2 para as hidroxiapatitas mesoporosas sintetizadas com concentração de caseína 1mg.ml⁻¹ a pH 7,0.

 S_{BET} = área superficial específica, Vp = volume de poros, Dp = diâmetro de poros e * = amostra sem tratamento pós-síntese.

Tabela 4.2 - Resultados de adsorção de N ₂ para as hidroxiapatitas mes	oporosas
sintetizadas com concentração de caseína 1mg.ml ⁻¹ a pHs 8,0 e 11,0 e 5	mg.ml⁻¹ a
pHs 7,0; 8,0 e 11,0.	

Condições de Síntese			Caracterização Textural			
		Temperatura	Taxa de			
Conc.	ъН	Calcinação	Aquecimento	S_{BET}	Vp	Dp
Caseína	рп	em O ₂	Calcinação	(m²/g)	(cm ³ /g)	(nm)
		(K)	(K/min.)			
	8.0	-	-	67,2*	0,189*	9,98*
1ma/ml	0,0	573	10	68,8	0,180	13,73
	11,0	-	-	82,4*	0,267*	13,10*
		573	10	83,4	0,237	14,70
	70	-	-	66,6*	0,215*	15,90*
	7,0	573	10	67,8	0,169	15,42
5ma/ml	8,0	-	-	84,1*	0,193	10,05
Jing/iiii		573	10	86,1	0,185	10,62
	11.0	-	-	106,2*	0,370*	12,72*
	11,0	573	10	106,5	0,384	12,95

 S_{BET} = área superficial específica, Vp = volume de poros, Dp = diâmetro de poros e * = amostra sem tratamento pós-síntese.

Analisando os dados de área superficial específica de BET apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2, observar-se que o tratamento pós-síntese (calcinação) utilizado para extração do surfactante não afetou praticamente os valores das áreas superficiais específica de BET, nem mesmo a temperaturas elevadas de 873 K. Diante disso, pode-se propor que a extração do surfactante foi realizada durante o processo de lavagem dos sólidos, este fato credencia a caseína como um excelente biosurfactante na síntese de materiais mesoestruturados, uma vez que sua extração é simples e ecologicamente correta, pois dispensam o uso de solventes orgânicos e/ou gastos de energia através do processo de calcinação, comuns na extração de surfactantes comerciais. As isotermas de adsorção de nitrogênio dos sólidos tratados pós-síntese sob diferentes condições são mostradas nas Figuras 4.1 e 4.2.



Figura 4.1 - Isotermas de adsorção dos sólidos $HC_{1,0/7,0}$ calcinados a 573 K(a), 773 K(b) e 873 K(c), com taxa de aquecimento de 2 K.min⁻¹ (•), 10 K.min⁻¹ (•) e 25 K.min⁻¹ (•) em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa não calcinada (•).

Observando as Figuras 4.1 e 4.2, pode-se constatar que todos os sólidos apresentam isotermas do tipo IV, características de materiais mesoporosos de acordo com a classificação BDDT e exibem histerese do tipo H3, conforme classificação da IUPAC (TEIXEIRA et al, 2001). Essas características são relacionadas aos materiais com poros que apresentam formato de cunha, cone e/ou placas paralelas. A posição das pressões relativas, P/P₀, de inflexão entre 0,70 a 1,0 confirma esta característica estrutural de poros (TEIXEIRA et al, 2001). Mais uma vez pode-se observar, com base nas Figuras 4.1 e 4.2, que o tratamento térmico pós-síntese não modificou a conformação estrutural geral das isotermas de

adsorção de N₂, o que fortalece a hipótese da retirada do surfactante durante o processo de lavagem dos sólidos.



Figura 4.2 - Isotermas de adsorção dos sólidos $HC_{1,0/8,0}$ (a); $HC_{1,0/11,0}$ (b); $HC_{5,0/7,0}$ (c); $HC_{5,0/8,0}$ (d) e $HC_{5,0/11,0}$ (e) calcinados a 573 K com taxa de aquecimento de 10 K.min⁻¹ (•) em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa não calcinada (•).

Duas regiões bem distintas das isotermas de adsorção são observadas nas Figuras 4.1 e 4.2: o processo inicial de adsorção ocorre em monocamadas a baixas pressões, seguindo de adsorção em multicamadas com o aparecimento do ponto de inflexão a partir de P/P₀ igual a 0,7. Neste ponto, a quantidade de gás adsorvido aumenta abruptamente com pequena variação de pressão devido á condensação das moléculas do adsorbato abaixo de sua pressão de vapor nos mesoporos primários. Na Figura 4.2e podemos observar uma terceira região distinta da isoterma de adsorção de N₂. Acima de P/P₀ igual a 0,9 as curvas se tornam assintóticas, comportamento característico de condensação capilar em mesoporos secundários, assim como mostrado na Figura 4.3.



Figura 4.3 – Esquema representativo da condensação capilar de N_2 (•) em mesoporos secundários (a) e principais (b) em formato de cone e/ou cunha.

A forma bem definida da etapa de preenchimento dos poros, nos ramos de adsorção e dessorção, indicam a uniformidade dos diâmetros de poros para a maioria destes materiais. Amplas histereses evidenciam um tipo de poro em formato de cunha ou cone. Este tipo de poro possui uma extremidade fechada e outra aberta, sendo que a última apresenta um raio maior que o corpo do poro, conforme Figura 4.3.

Todos estes materiais, aqui investigados, apresentam essas características gerais, mas diferem entre si quando suas isotermas são examinadas de forma quantitativa. Algumas diferenças podem ser observadas nas isotermas de adsorção em função da temperatura de calcinação utilizada (Figura 4.4). As posições dos pontos de inflexão nos ramos de adsorção deslocam-se em direção às pressões de preenchimento de poros mais altas, ou seja, menor inclinação do ponto de inflexão, referente à condensação capilar, à medida que a temperatura de calcinação

aumenta, indicando que em amostras calcinadas a temperaturas maiores ocorre um aumento na diversidade de tamanhos dos poros.



Figura 4.4 - Isotermas de adsorção dos sólidos $HC_{1,0/7,0}$ calcinados com taxa de aquecimento de 2 K.min⁻¹ (a), 10 K.min⁻¹ (b) e 25 K.min⁻¹ (c), a temperaturas de aquecimento de 573 K(\blacksquare), 773 K(\bullet) e 873 K(\blacktriangle).

A inclinação da curva na região de condensação capilar reflete a distribuição do tamanho de poros: quanto mais suave for à inclinação, maior a heterogeneidade de dimensões dos poros na amostra (KRUK et al, 1999). Uma vez que no processo de adsorção cada incremento no coeficiente P/P₀ provoca um aumento da área do poro recoberta pela fase condensada, em função do diâmetro capilar, o comportamento observado confirma também que poros maiores são formados a temperaturas de calcinação mais altas, conforme se observa na Figura 4.5 para a distribuição de tamanhos de poros de BJH destes materiais. É importante ressaltar que a possibilidade de controle da estrutura, como variação do tamanho de poros, é

mais uma das características que tornam estes materiais atraentes como matrizes para dispositivos de liberação controlada de fármacos.

4.1.1.1 Efeito do Tratamento Témico Pós-Síntese.

Os gráficos de distribuição de tamanho de poros obtidos pelo método BJH para as amostras mesoporosas $HC_{1,0/7,0}$ são apresentados na Figura 4.5.



Figura 4.5 - Distribuição de tamanho de poros de BJH das matrizes mesoporosas $HC_{1,0/7,0}$ tratados termicamente com taxa de aquecimento de 2 K.min.⁻¹(a), 10 K.min.⁻¹ (b) e 25 K.min.⁻¹ (c) e calcinados a 573 K(\blacksquare), 773 K(\bullet) e 873 K(\blacktriangle).

Observa-se uma distribuição de tamanho de poros muito estreita, na ordem de 15 a 20 nm para todos os sólidos, o que segundo a classificação feita pela IUPAC (MECCUSKER et al, 2001) caracteriza materiais tipicamente mesoporosos com arranjo estrutural bem ordenado. Esta característica torna estes materiais muito importantes para aplicação como dispositivo para liberação controlada de fármacos, comportamento que está relacionado com o controle cinético da liberação por meio dos poros das matrizes.

Analisando os dados da Tabela 4.1 pode-se observar que a temperatura de calcinação, bem como a taxa de aquecimento não afetaram apreciavelmente as áreas superficiais específicas de BET para estes materiais. Por outro lado, com base na Figura 4.5 pode-se constatar que a temperatura de calcinação efeta o tamanho médio dos poros; poros maiores são formados a temperaturas de calcinação mais elevadas, como evidenciado pelo deslocamento dos picos da distribuição de poros de BJH, ilustrado na Figura 4.5.

Através da Figura 4.5, nota-se um deslocamento do diâmetro médio de poros para valores maiores em função do aumento da temperatura de calcinação. Este resultado associado à diminuição da área recoberta por microporos (Tabela 4.3) indica a ocorrência de um processo de coalescência entre os poros de menores diâmetros, para a formação de maiores poros e diminuindo a quantidade destes com o aumento da temperatura de calcinação (KRUK et al, 1999).

Para os sólidos $HC_{1,0/7,0}$ a elevação da temperatura de calcinação resultou além do aumento médio no tamanho dos poros, um pequeno acréscimo na área superficial de BET (Figura 4.6).



Figura 4.6 – Influência da temperatura de calcinação sobre a área superficial de BET para as matrizes mesoporosas $HC_{1,0/7,0}$ tratadas termicamente com taxa de aquecimento de 2 K.min.⁻¹(\blacksquare), 10 K.min.⁻¹ (\bullet) e 25 K.min.⁻¹ (\blacktriangle).

Tabela 4.3	 Influên 	icia da	a tempera	atura d	e calc	inaç	ão sobre	a área superfic	ial de
microporos	obtidas	pelo	método	t-plot	para	as	matrizes	mesoporosas	Нар-
CAS _{1,0/7,0} .									

Taxa de Aquecimento	Temperatura	Área superficial de		
Calcinação	Calcinação	microporos (Sµp)		
(K/min.)	(K)	(m²/g)		
	573	4,944		
2	773	3,114		
	873	3,077		
	573	5,874		
10	773	4,275		
	873	3,576		
	573	4,944		
25	773	3,934		
	873	3,426		

No tocante ao feito da taxa de aquecimento utilizada no tratamento térmico pós-síntese sobre as características texturais das matrizes mesoporosas, apresentada na Figura 4.7, pode-se observar que não houve nenhuma modificação estrutural significativa nas isotermas de adsorção e dessorção de N₂, bem como na distribuição de tamanhos de poros de BJH, Figura 4.7 (destaque). Estes dados confirmam, mais uma vez, que a extração do surfactante foi realizada durante o processo de lavagem dos sólidos e que o tratamento pós-síntese pouco interferiu nas propriedades texturais desses sólidos.



Figura 4.7 - Isotermas de adsorção de N₂ para os sólidos HC_{1,0/7,0} calcinadas a 573 K(a), 773 K(b) e 873 K(c) com taxas de aquecimento de 2 K.min⁻¹ (●), 10 K.min⁻¹
(▲) e 25 K.min⁻¹ (▼) em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa não calcinada (■). Figura em destaque representa a distribuição de tamanho de poros de BJH dessas matrizes mesoporosas.

Além da temperatura de calcinação e taxa de aquecimento avaliados, durante o tratamento térmico pós-síntese, foi avaliado o efeito da atmosfera de calcinação sobre as propriedades texturais dessas matrizes mesoporosas, conforme Figura 4.8. Nesta etapa foram utilizadas duas atmosferas; a primeira de caráter oxidante e a segunda de caráter inerte, utilizando como gases de arrasto oxigênio e nitrogênio, respectivamente. Analisando a Figura 4.8 pode-se observar que a atmosfera de calcinação não afetou as propriedades texturais dos sólidos mesoporosos no tocante a parâmetros como: áreas superficiais específicas de BET, isotermas de adsorção e dessorção de N₂, bem como na distribuição de tamanhos de poros de BJH, Figura 4.8 (destaque).



Figura 4.8 - Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ do sólido $HC_{1,0/7,0}$ calcinado a 773 K com taxa de aquecimento de 25 K.min⁻¹ sob atmosferas de oxigênio (\blacksquare) e nitrogênio (\bullet).

4.1.1.2 Efeito do pH e da Concentração de Caseína

Analisando os dados de área superficial específica de BET e da distribuição do diâmetro de poros de BJH apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2 bem como na Figura 4.9 observa-se que o pH e a concentração da caseína apresentam-se como dois fatores de extrema importância na síntese de hidroxiapatitas mesoporosas utilizando caseína como agente direcionador de estrutura.



Figura 4.9 – Influência do pH e da concentração de caseína sobre a área superficial de BET para as matrizes mesoporosas sintetizadas com concentração de caseína de 1 mg.ml⁻¹ (\blacksquare) e 5 mg.ml⁻¹ (\bullet).

Analisando a Figura 4.9 podemos observar que área superficial específica de BET aumentou consideravelmente em todos os sólidos com o aumento do pH e da concentração da caseína no processo de síntese. As variações mais marcantes observadas da área superficial de BET foram de 54,0 para 83,4 m².g⁻¹ para os sólidos HC_{1,0} e de 67,8 para 106,2 m².g⁻¹ nos sólidos HC_{5,0}, ambos calcinados a 573 K com taxa de aquecimento de 10 K.min.⁻¹, quando o pH de síntese aumentou de 7,0 para 11,0 respectivamente.

Na Tabela 4.4 encontramos um resumo de alguns trabalhos publicados na literatura no tocante aos métodos de síntese e resultados de áreas superficiais obtidas de alguns fosfatos de cálcio mesoporosos em comparação com os dados obtidos nesse trabalho. Vale salientar que todos os materiais sintetizados neste trabalho apresentam áreas superficiais de BET (~ 55 a ~ 106 m².g⁻¹) elevadas quando comparadas com aquelas encontradas na literatura para os fosfatos de cálcio mesoporosos, bem como em comparação a hidroxiapatita convencional, onde sua área superficial de BET é em torno de 18 m².g⁻¹. Estes dados credencia a excelente biosurfactante na síntese de caseína como um materiais mesoestruturados.

Método de Síntese	Direcionador de Estrutura	Área Superficial de BET	Referência
	Caseína	106m ² .g ⁻¹	Nosso trabalho
Soft Template	Brometo de cetiltrimetilamônio	14 m ² .g ⁻¹	YAO et al, (2003)
	Polioxietileno oleil éter fosfato + Brometo de miristil trimetilamônio	30 m ² .g ⁻¹	PRÉLOT et al, (2005)
	Mono-n-dodecil fosfato + Brometo de cetiltrimetilamônio	90 m²/g	SCHMIDT et al,(2006)
	4-Dodecildietilenotriamina e Ácido N-Lauroil-L-glutâmico	140 m ² .g ⁻¹	IKAWA et al, (2009)
	Ácido fenilfosfônico + Dodecil sulfato de sódio	72 m ² g ⁻¹	ZHANG et al, (2008)
Hard	CMK-3	27 m ² g ⁻¹	FAN et al, (2007)
Template	CMK-3	42 m ² g ⁻¹	XIA et al (2009)

Tabela 4.4 – Dados de síntese de alguns fosfatos de cálcio mesoporosos encontrados na literatura.

Apesar de estáveis, as micelas de caseína, não apresentam uma estrutura fixa. Mudanças de temperatura, pH, força iônica e imposição a altas pressões leva a mudanças na distribuição dos tamanhos das micelas de caseína e provavelmente, á percentagem de sub-estruturas (MADADLOU et al, 2009).

A pH 7,0, pH próximo ao valor teórico do PI (o PI médio da caseína é de 4,8) da caseína, a carga líquida das moléculas de caseína é quase zero o que diminui a repulsão eletrostática entre as moléculas, aumentando as interação hidrofóbicas entre as moléculas nas micelas, tornando a estrutura micelar mais compacta e, consequentemente, a diminuição do raio micelar (Figura 4.10). Além desta maior interação das moléculas de caseína dentro da estrutura micelar com a diminuição do pH, as próprias micelas apresentam uma tendência de interagir fortemente entre si, (LIU e GUO, 2008) retardando, assim, o processo de transferência de massa entre a solução e o substrato, o que dificulta a interação fosfato de cálcio – surfactante, prejudicando a formação da estrutura mesoporosa.



Figura 4.10 - Relação dos raios das micelas de caseína com pH. Fonte: LIU e GUO (2008).

Entretanto, a pH's mais altos , pH igual a 11,0, a desprotonação do grupo carboxílico do ácido aspártico (Asp) e resíduos do ácido glutâmico (Glu) dão origem a muitas mudanças na formação das micelas de caseína, incluindo repulsões eletrostáticas, destruição de pontes salinas e formação de regiões de cargas isoladas, eventualmente conduzindo à uma estrutura micelar mais solta e de maior raio (Figura 4.10) (LIU e GUO, 2008). A baixa força de atração entre as moléculas de caseína nas micelas com o aumento do pH, reflete em uma baixa atração entre 80

as estruturas micelares o que favorece o processo de transferência de massa entre a solução e o substrato, o que beneficia a interação fosfato de cálcio – surfactante, melhorando a formação da estrutura mesoporosa.

Ao avaliarmos o efeito do pH e da concentração de caseína sobre o distribuição de tamanho de poros de BJH, mostrado na Figura 4.11, podemos observar que ambos os fatores contribuíram para o aumento da quantidade de poros nessas matrizes, isto pode ser constatado através do aumento da área dos picos de distribuição de diâmetro de poros de BJH a medida que o pH e a concentração de caseína aumentam. Em pH 7,0 por as micelas de caseína apresentarem alta atração mútua, dificultam a interação fosfato de cálcio - surfactante, prejudicando, assim, a formação da estrutura mesoporosa, sendo assim, é de esperar que o número de poros na matriz fosfática seja limitado, bem como com o aumento da concentração seja observado um aumento da quantidade de micelas e de caseína consequentemente um aumento do número de poros. Entretanto, a pH 11, como as micelas apresentam baixa capacidade de interação entre si facilitam a combinação da fase fosfática com a caseína o que promovem melhor formação da estrutura mesoporosa. Assim, é de esperar que sólidos sintetizados a pH 11,0 apresentem um número maior de poros, bem como com o aumento da concentração de caseína seja observado um aumento da quantidade de micelas e consequentemente um aumento do número de poros.



Figura 4.11 - Distribuição de tamanho de poros das matrizes mesoporosas calcinadas a 573 K com taxa de aquecimento de 10 K.min.⁻¹ e sintetizadas a utilizando concentração de caseína de 1mg.ml^{-1} (a) e 5mg.ml^{-1} (b) a pH de 7,0 (**•**), 8,0 (**•**) e 11,0 (**▲**).

4.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho e análise elementar

A análise dos espectros na região do infravermelho aliada à análise elmentar de carbono, hidrogênio e nitrogênio são ferramentas importantes para a avaliação qualitativa e quantitativas da presença de grupos orgânicos e inorgânicos (fosfatos). A Figura 4.12 apresenta os espectros para as hidroxiapatitas sintetizadas utilizando caseína como agente direcionador de estrutura.



Figura 4.12 - Espectro na região do Infravermelho dos sólidos HC_{1,0/7,0} tratados termicamente com taxa de aquecimento de 2 K.min⁻¹(I), 10 K.min⁻¹ (II) e 25 K.min⁻¹ e calcinados a 573 K(c), 773 K(b) e 873 K(a) em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa não calcinada (d).

Nestes espectros, observa-se uma banda em torno de 3500 cm⁻¹, que foi atribuída às vibrações de estiramento de grupos OH, tanto da água adsorvida quanto dos grupos OH dos fosfatos, e sua deformação aparece em torno de 1640 cm⁻¹. Uma banda larga aparece na região entre 3700 e 2500 cm⁻¹ atribuída à água fisicamente adsorvida e outra em torno de 1620 cm⁻¹ é relativa à deformação angular do grupo OH de água fisissorvida. Outras bandas foram observadas em torno de 1100, 1000 e 950 cm⁻¹ correspondentes à deformação assimétrica de grupo PO₄³⁻, em torno 850 cm⁻¹ associada ao estiramento P-O(H) em HPO₄²⁻. A banda visualizada próximo a 600 cm⁻¹ corresponde à deformação assimétrica P-O de grupo PO₄³⁻ e a banda em torno de 550 cm⁻¹, corresponde à deformação assimétrica P-O(H) de grupo HPO₄²⁻. (RAMAKRISSHHNAN e ARULDHAS, 1986).

A Tabela 4.5 traz um resumo das absorções observadas no espectro para a hidroxiapatita mesoporosa.

d	droxiapatita.Tabela adaptada de RAMAKRISSHHNAN e ARULDHAS, 1986.				
	Região de Absorção (cm ⁻¹)	Designação			
	3700 – 2500	ν O-H de H ₂ O adsorvida e O-H de grupos OH			
	1620	δ O-H de H ₂ O adsorvida			
	1087	v P-O do grupo PO_4^{3-}			
	1030	v P-O do grupo PO_4^{3-}			
	956	ν P-O do grupo PO ₄ ³⁻			
	865	v P-O(H) do grupo HPO_4^2			
	640	δ O-H de grupo OH			
	610	δ P-O do grupo PO_4^{3-}			
	560 - 450	δ P-O(H) do grupo HPO ₄ ²⁻			

Tabela 4.5-Bandas de absorção na região do infravermelho dahidroxiapatita.Tabela adaptada de RAMAKRISSHHNAN e ARULDHAS, 1986.

Todos estes materiais, aqui investigados, apresentam essas características gerais, mas diferem entre si quando seus espectros são examinados de forma quantitativa. Algumas diferenças podem ser observadas nos espectros de IV em função da temperatura de calcinação utilizada (Figura 4.12). Além destas bandas características da fase inorgânica da hidroxiapatita, podemos observar a presença bandas de pequena intensidade, relativas à vibração de estiramento assimétrico e

simétrico do grupo C-H, respectivamente, em 2938 e 2853 cm⁻¹ e uma banda de estiramento C-H em 1465 cm⁻¹ (SILVERSTEIN, 1990), que indicam a presença de moléculas de surfactante na matriz fosfática. Estas bandas estão presentes em maior intensidade nos sólidos calcinados, entretanto, à medida que a temperatura de calcinação aumenta ocorre uma diminuição gradual da intensidade dessas bandas, podendo ainda ser observadas nos materiais calcinados a temperaturas de 572 K e 773 K indicando a retirada parcial do surfactante nestes sólidos a estas temperaturas. Podemos observar que a 873 K de temperatura estas bandas estão totalmente ausentes, indicando a retirada total do surfactante.

Ainda avaliando a Figura 4.12, pode-se observar que a quantidade da material orgânico referente à cadeia da molécula do surfactante nestes sólidos é muito pequena, mesmo para o sólido não calcinado. Dados de análise elementar, disponíveis na Tabela 4.6, corroboram com estas observações, o que nos leva a crer que a extração do surfactante foi realizada durante o processo de lavagem dos sólidos.

Tabela 4.6 - Análise elementar de carbono (C), Hidrogênio (H), Nitrogênio (N) do sólido $HC_{1,0/7,0}$, após processos de lavagem e tratamento térmico pós-síntese em comparação com a amostra não calcinada (*).

	Temperatura	Taxa de Aquecimento				
Amostra	Calcinação	Calcinação Calcinação		%H	%N	
	(K)	(K/min.)				
	-	-	0,78*	0,54*	0,16*	
		2	0,68	0,77	0,16	
	573	10	0,69	0,39	0,20	
		25	0,68	0,49	0,15	
	HC _{1,0/7,0} 773	2	0,55	0,46	0,31	
1101,0/7,0		10	0,54	0,48	0,25	
		25	0,56	0,49	0,15	
		2	0,23	0,16	0,13	
	873	10	0,16	0,50	0,10	
		25	0,16	0,48	0,12	

* = amostra sem tratamento pós-síntese

Apesar dos sólidos apresentarem resquícios de agente direcionador em sua estrutura após tratamento térmico, conforme dados da Figura 4.12 e Tabela 4.6, esta quantidade é muito pequena uma vez que praticamente não alterou a área superficial específica de BET, conforme dados discutidos no item 4.4.1.

Na tentativa de elucidar a suspeita da saída parcial do surfactante durante o processo de lavagem, foram sintetizados novos sólidos obedecendo as mesmas condições iniciais de síntese, entretanto os mesmos não passaram pelos processos de lavagem e tratamento térmico pós-síntese.

Na Figura 4.13 temos os espectros para as hidroxiapatitas mesoporosas sintetizadas que não passaram pelos processos de lavagem e tratamento térmico pós-síntese. Estes sólidos foram denominados HCxySL, onde x representa a concentração de caseína e y o pH de síntese.



Figura 4.13 - Espectro na região do Infravermelho dos sólidos mesoporosos *HCxySL* sintetizados utilizado concentrações de caseína de 1 mg.ml⁻¹ (I) e 5 mg.ml⁻¹ (II) a pH's de 7,0(c); 8,0(b) e 11,0(a).

Confrontado os dados exibidos nas Figuras 4.12 e 4.13 para os espectros na região de infravermelho da hidroxiapatita mesoporosa. A princípio, percebe-se uma grande similaridade do conjunto de bandas em todos os espectros. Em geral os sinais provenientes do esqueleto inorgânico e dos resquícios do agente direcionador se mantiveram, entretanto, os sólidos que não passaram pelos processos de lavagem e tratamento térmico pós-síntese, ocorrem um aumento na

intensidade das bandas relativas à vibração de estiramento assimétrico e simétrico do grupo C-H, que ocorrem respectivamente, em 2938 e 2853 cm⁻¹ e uma banda de estiramento C-H em 1465 cm⁻¹ (SILVERSTEIN, 1990).

Analisando estas figuras de forma mais quantitativa baseando-se nos dados da análise elementar, disponíveis na Tabela 4.7, observa-se que ocorre uma diminuição acentuada da quantidade de material orgânico, proveniente do agente direcionador, à medida que os sólidos são lavados exaustivamente com água, o que comprova a retirada quase total do surfactante da rede inorgânica mesoporosa, com apenas o processo de lavagem do sólido. Este fato credencia a caseína como um excelente surfactante na síntese de materiais mesoestruturados, uma vez que sua extração é simples e ecologicamente correta, pois dispensa o uso de solventes orgânicos e/ou gastos de energia através do processo de calcinação, comuns na extração de surfactantes comerciais.

Condições de s	Análise elementar			
Conc. Caseína	рН	%C	%H	%N
	7,0	2,15	1,99	1,15
1 mg.ml⁻¹	8,0	2,29	2,13	0,89
	11,0	3,19	2,32	1,17
	7,0	5,45	2,20	2,26
5 mg.ml⁻¹	8,0	7,95	2,14	2,99
	11,0	14,07	3,00	3,11

Tabela 4.7 - Análise elementar de Carbono (C), Hidrogênio (H), Nitrogênio (N) do sólido *HCxySL*.

Analisando o efeito do pH e da concentração de caseína no processo de síntese destes materiais mesoporosos, conforme dados apresentados na Figura 4.13 e na Tabela 4.7, podemos observar um aumento gradual na quantidade de material orgânico, proveniente do surfactante, a medida que o pH de síntese tornase mais alcalino. Este comportamento pode ser explicado conforme discussão no item 4.1.1.2. A baixa força de atração entre as moléculas de caseína nas micelas com o aumento do pH, reflete em uma baixa atração entre as estruturas micelares o que favorece o processo de transferência de massa entre a solução precursora de fosfato de cálcio e as micelas de caseína, beneficiando a formação da estrutura mesoporosa e consequentemente gerando híbridos com alto índice de grupos orgânicos, conforme Figura 4.12 e Tabela 4.7.

4.1.3 Termogravimetria

As curvas termogravimétricas foram utilizadas para investigarmos o comportamento térmicos dos fosfatos de cálcio.

Na Figura 4.14, encontram-se as curvas termogravimétricas e suas derivadas atribuídas a hidroxiapatita pura não mesoporosa em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa $HC_{5,0/11}$ calcinada a 573 K com taxa de aquecimento de 10 K.min⁻¹.



Figura 4.14 – Curva termogravimétrica TG (-) e DTG (-) das hidroxiapatitas puras (Hap) não mesoporosa (a) em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa $HC_{5,0/11}$ calcinada a 573 K com taxa de aquecimento de 10 K.min⁻¹ (b).

Como pode ser visto na Figura 4.14 que as amostras da hidroxiapatita pura não mesoporosa (Figura 4.14a) quanto à hidroxiapatita mesoporosa tiveram três etapas de perda de massa. No caso da hidroxiapatita (Hap) não mesoporosa; a primeira etapa de perda de massa de 300 a 498 K é atribuída à evaporação de água adsorvida na superfície e nos poros do material, cuja porcentagem da perda de massa nesta etapa é de aproximadamente 0,19 %. A segunda etapa de 498 a 1073

K é atribuída à condensação dos grupos OH dos cristais de hidroxiapatita, na qual observa-se uma porcentagem da perda de massa nesta etapa de aproximadamente 1,6 %. Uma terceira etapa de perda observada acima de 1073 K é relacionada à decomposição da hidroxiapatita e consequentemente da grande perda dos grupos OH. Uma quarta e última etapa, não observada neste gráfico, pois excede a faixa de temperatura usada neste experimento, acima de 1493K relacionada à decomposição da hidroxiapatita e consequentemente conversão em trifosfato de cálcio. Estas observações de perda de massa durante o processo de aquecimendo estão de acordo com a sucessão de decomposição da hidroxiapatita descrita por ADOLFSSON, et al (1999), os quais informaram que as reações decomposição da hidroxiapatita e quações:

 $Ca_{10}(PO_{4})_{6}(OH)_{2} \rightarrow Ca_{10}(PO_{4})_{6}(OH)_{2-2x}O_{x} + xH_{2}O \qquad (acima de1073 K)$ $Ca_{10}(PO_{4})_{6}(OH)_{2-2x}O_{x} \rightarrow 3Ca_{3}(PO_{4})_{2} + CaO + (1 - x)H_{2}O \qquad (acima de 1493K)$

Para a hidroxiapatita mesoporosa (HC_{5,0/11}) observa-se as mesmas etapas, com perdas de massa de 4,85; 2,73 e 1,38 %, respectivamente. Avaliando esses dados de forma quantitativa pode-se dizer que a diferença entre as perdas de massa nesta etapa entre as hidroxiapatitas mesoporosa e não mesoporosas estão relacionadas à quantidade de grupos OH presentes nos materiais. A hidroxiapatita mesoporosa por possuir área superficial especifica maior que a amostra não mesoporosa, apresenta maior quantidade de grupos OH, tanto na superfície como no interior dos poros, o que lhes confere uma maior perda de massa. Este aumento do numero de hidroxilas (OH) para os materiais mesoporosos pode explicar o alto índice de moléculas de água adsorvida nestes materiais no inicio da decomposição térmica (primeira etapa).

Na Figura 4.14 encontram-se as curvas termogravimétricas atribuídas as sólidos $HC_{1,0/70}$ após tratados térmico pós-síntese em comparação com a matriz não tratado termicamente.

Confrontando os dados exibidos nas Figuras 4.14 e 4.15 para curvas termogravimétricas da hidroxiapatita mesoporosa tratadas termicamente em comparação com as formas pura não mesoporosa e mesoporosa sem tratamento pós-síntese. A princípio, percebe-se uma grande similaridade das etapas de perdas em todas as curvas termogravimétricas. Em geral as três etapas de perda
de massa atribuídas à decomposição térmica do esqueleto inorgânico se mantiveram, entretanto, para a segunda etapa de perda de massa de 498 a 1073K atribuída inicialmente à liberação de água adsorvida nos poros dos materiais, nesta etapa ocorre também à decomposição térmica do surfactante, que ocorre em temperaturas acima de 468 K (LIMA e AIROLDI, 2002), conforme Figura 4.17.

Algumas diferenças podem ser observadas nas curvas termogravimétricas obtidas para os sólidos mesoporosos $HC_{1,0/70}$ em função da temperatura de calcinação utilizada, conforme a Figura 4.15.



Figura 4.15 - Curvas termogravimétricas dos sólidos HC_{1,0/7,0} tratados termicamente com taxa de aquecimento de 2 K.min.⁻¹(I), 10 K.min.⁻¹ (II) e 25 K.min.⁻¹ (c) e calcinados a 573 K (b), 773 K (c) e 887 K (d) em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa não calcinada (a).

Em uma primeira avaliação observa-se que a quantidade de perda de massa para todos os sólidos é praticamente a mesma, independentemente da temperatura de calcinação utilizada no processo pó-síntese, o que corrobora com os dados de análise elementar expostos na Tabela 4.6. Entretanto ao avaliarmos de forma quantitativa os dados de perda de massa na segunda etapa (decomposição térmica da caseína), expostos na Tabela 4.8, observa-se uma diminuição gradual de perda de massa à medida que se aumenta a temperatura de calcinação em comparação com o sólido não tratado termicamente, confirmando que a temperaturas de 573 K e 773 K a saída da caseína agente não ocorre totalmente.

A degradação do agente direcionador termina até a temperatura de 873 K, pois tanto os espectros de infravermelho (Figura 4.12) quanto à análise elementar (Tabela 4.7) das amostras calcinadas nesta temperatura não evidenciam a presença de cadeias carbônicas de caseína. Outra evidência da total degradação da molécula da caseína a esta temperatura pode ser observada ao analisarmos a Figura 4.18, relativa à sua decomposição térmica.

Tabela 4.8 – Percentuais das perdas de massa através das curvas termogravimétricas do sólido $HC_{1,0/7,0}$, após tratamento térmico pós-síntese em comparação com a amostra não calcinada (*).

Condições de síntese		Etapas de perda de massa			
Amostra	Taxa de Aquecimento Calcinação (K/min.)	Temperatura Calcinação (K)	% 300 – 498 (K)	% 498 - 1010 (K)	% 1010 – 1150 (K)
	-	-	2,55*	4,93*	1,00*
	2 K.min ⁻¹	573	3,80	3,70	1,20
		773	3,77	3,29	1,14
		873	3,90	2,49	1,25
		573	3,14	2,06	1,20
1,0/7,0	10 K.min ⁻¹	773	2,66	1,84	1,34
		873	1,90	1,64	1,26
		573	3,30	2,32	0,48
	25 K.min ⁻¹	773	2,92	1,68	1,23
		873	2,40	1,33	1,13

* = amostra sem tratamento pós-síntese

Nas Figuras 4.16 e 4.17 temos as curvas termogravimétricas e suas derivadas para as hidroxiapatitas mesoporosas sintetizadas com concentração de caseína de 1mg.ml^{-1} ($HC_{1,0}$) e 5mg.ml^{-1} ($HC_{5,0}$), respectivamente e que não passaram pelos processos de lavagem e tratamento térmico pós-síntese (HCxySL).



Figura 4.16 – Curva termogravimétrica TG (I) e DTG (II) dos sólidos mesoporosos $HC_{1,0}SL$ sintetizados a pH's de 7,0 (c), 8,0 (b) e 11,0 (a).



Figura 4.17 – Curva termogravimétrica TG (I) e DTG (II) dos sólidos mesoporosos $HC_{5,0}SL$ sintetizados a pH's de 7,0 (c), 8,0 (b) e 11,0 (a).

Analisando os dados exibidos nas Figuras 4.16 e 4.17 para as curvas termogravimétricas das hidroxiapatitas mesoporosas (*HCxySL*) em comparação com sua forma lavada e calcinada (Figura 4.15), a princípio observa-se um aumento gradual na perda de massa à medida que o pH de síntese torna-se mais alcalino, bem como a quantidade do direcionador torna-se maior. Este aumento na perda de

massa está associado a um acréscimo da quantidade de material orgânico, proveniente do agente direcionador, nesses híbridos, corroborando com os dados de espectroscopia de infravermelho e análise elementar, que indicam um maior número de moléculas imobilizadas para estes sólidos à medida que o pH torna-se mais alcalino.

Quando se avalia estas curvas termogravimétricas de forma quantitativa em função do tipo de tratamento pós-síntese, em geral, as três etapas de perda de massa atribuídas à decomposição térmica do esqueleto inorgânico se mantiveram quase inalteradas, entretanto, algumas diferenças podem ser observadas. A primeira delas é o aparecimento de uma etapa de perda de massa secundária entre 498 a 870 K associada à termodecomposição da caseína (PUREVSUREN e DAVAAJAV, 2001). Confrontando os dados fornecidos pela análise elementar (Tabela 4.7) com as perdas de massa das curvas termogravimétricas desses sólidos (Tabela 4.9) e tendo como base a curva termogravimétrica da caseína (Figura 4.18), pode-se associar esta etapa de perda de massa secundária, exclusivamente a saída da caseína dos poros da matriz fosfática.



Figura 4.18 – Curva termogravimétrica TG (-) e DTG (-) da caseína.

Conforme se observa na Tabela 4.9, há um aumento da perda de massa pronunciado para os híbridos sintetizados a pH 11 em relação aos sólidos sintetizados utilizando pH 7,0, principalmente na segunda etapa de perda de massa, relativa a decomposição térmica da caseína, o que indica um aumento na quantidade de caseína com o aumento do pH, conforme discutido no item 4.1.1.2, uma vez que uma maior quantidade de grupos orgânicos ancorados resultam numa maior degradação térmica. Este aumento na perda de massa está associado a um acréscimo da quantidade de material orgânico, proveniente do agente direcionador, nesses híbridos, corroborando com os dados de espectroscopia de infravermelho (Figura 4.13) e análise elementar (Tabela 4.7), que indicam um maior número de moléculas imobilizadas para estes sólidos à medida que o pH torna-se mais alcalino. Ao se observar a Tabela 4.9, nota-se um aumento da perda de massa nas etapas três e quatro, relacionadas à decomposição do esqueleto inorgânico da hidroxiapatita e consequentemente condensação dos grupos OH, à medida que o pH de síntese torna-se mais alcalino.

Tabela 4.9 – Percentuais das perdas de massa através das curvas termogravimétricas dos sólidos $HC_{1,0/7,0}SL$, $HC_{1,0/8,0}SL$, $HC_{1,0/11}SL$, $HC_{5,0/7,0}SL$, $HC_{$

	Etapas de perda de massa			
Amostra	% 300 – 498 (K)	% 498 - 870 (K)	% 870 - 1055 (K)	% 1055 - 1200 (K)
HC _{1,0/7,0} SL	7,90	4,92	1,48	1,14
HC _{1,0/8,0} SL	4,10	5,82	1,80	1,52
HC _{1,0/11} SL	5,36	7,12	2,53	1,69
HC _{5,0/7,0} SL	6,57	11,08	4,36	1,52
$HC_{5,0/8,0}SL$	8,98	12,08	4,56	1,52
HC _{5,0/11} SL	11,88	21,89	7,87	0,72

Esta maior perda de massa está relacionada com o aumento da área superficial de BET para estes sólidos. Matrizes mesoporosas sintetizadas a pH mais alcalino apresentam maior área superficial de BET, conforme discutido no item 4.1.1.2, e consequentemente apresentam maior quantidade de grupos OH, tanto na superfície como no interior dos poros, o que lhes confere maior perda de massa nessas etapas. Este aumento do numero de hidroxilas (OH) para os materiais mesoporosos com o aumento do pH de sintese pode explicar também o alto índice

de moléculas de água adsorvida nestes materiais no inicio da decomposição térmica (primeira etapa).

4.1.4 Difração de Raios-X

O método mais conveniente e rápido para identificação de fases cristalinas de sólidos é a difratometria de raios-X. Por isso, se tornou fundamental a caracterização dos materiais mesoporosos utilizando difratometria de raios-X. O difratograma padrão de uma rede cristalina é característico da substância estudada e a posição das linhas de difração é independente da presença de outras fases na amostra. A técnica não é destrutiva e apenas pequenas quantidades da amostra em pó são suficientes para a identificação da fase cristalina presente.

Na Figura 4.19, têm-se o difratograma da hidroxiapatita convencional não mesoporosa com todos os índice de Miller (hkl) conforme encontrado na literatura (ELLIOT, 1994).



Figura 4.19 – Difratograma da hidroxiapatita pura não mesoporosa

Com base no difratograma de raios-X da Figura 4.19, observa-se que na Figura 4.20, todos os sólidos sintetizados, com ou sem agente direcionador, formaram sólidos monofásicos, nos quais a única fase observada foi a da hidroxiapatita. Pode-se observar também que após o tratamento térmico póssíntese das matrizes de hidroxiapatita, empregando diferentes temperaturas de calcinação, não houve nenhuma mudança estrutural significativa das mesmas, uma vez que não foi observado nenhum deslocamento em seus picos característicos.



Figura 4.20 – Difratograma de raios-X dos sólidos $HC_{1,0/7,0}$ calcinados a 573 K (I), 773 K (II) e 873 K (III), com taxa de aquecimento de 2 K.min⁻¹ (b), 10 K.min⁻¹ (c) e 25 K.min⁻¹ (d) em comparação com a hidroxiapatita mesoporosa não calcinada (a).

Além de avaliarmos o efeito do tratamento térmico pós-síntese sobre a cristalinidade desses sólidos, outros fatores empregados na síntese também foram estudados, dentre eles o efeito do pH e da concentração de caseína, entretanto nenhuma mudança estrutural significativa em seus difratograma de raios-X foi observa, por esta razão seus difragramas não são expostos nesse trabalho.

4.1.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo ³¹P no Estado Sólido

Os fosfatos de cálcio possuem diversas aplicações. Estas aplicações dependem das características estruturais da superfície nas quais, a concentração e natureza dos grupos P-OH são de grande importância. A espectroscopia de RMN de ³¹P no estado sólido permite distinguir os átomos de fósforo envolvidos.

Os espectros de RMN de ³¹P da hidroxiapatita pura não mesoporosa e sua forma mesoporosa, foram obtidos utilizando-se a técnica da polarização cruzada e rotação do ângulo mágico, CP/MAS. Estas técnicas minimizam as interações anisotrópicas dipolo-dipolo, permitindo a obtenção de espectros de RMN em sólidos com uma qualidade aproximadamente igual àquela obtida usualmente em líquidos (MEHERING, 1983).

O espectro de RMN CP/MAS de ³¹P da matriz de hidroxiapatita não mesoporosa, é apresentado na Figura 4.21.



Figura 4.21 – Espectro de RMN CP/MAS de ³¹P para a Hidroxiapatita não mesoporosa. Onde P4 indica pontes dos grupos (PO)₄P tetraedros e P3 indica grupos P-OH livres do tipo (PO)₃POH.

A Figura 4.21 mostra dois picos de ressonância característicos da hidroxiapatita, o primeiro, intenso em δ igual a 2,8 ppm, atribuído a estrutura de pontes dos grupos (PO)₄P tetraedros, cujo sinal de ressonância é indicado como P4.

E um segundo de menor intensidade atribuído ao aparecimento de grupos P-OH livres do tipo (PO)₃POH, o sinal atribuído tem denominação das espécies P3, com valores próximos de –0,2 ppm. As bandas satélites dispostas simetricamente em ambos os lados do pico central, sugerem caráter anisotrópico para o composto (TSENG, et al, 2008; MIQUEL, et al, 1990). O único fosfato de cálcio descrito na literatura que apresenta este deslocamento químico é a hidroxiapatita, sugerindo conjuntamente com o difratograma de raios-x, à formação da fase da hidroxiapatita.

4.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das hidroxiapatitas não mesoporosa, bem como sua forma mesoporosa foram acompanhadas por microscopia eletrônica de varredura, conforme Figura 4.22.



Figura 4.22 – Microscopia Eletrônica de Varredura para a hidroxiapatita pura não mesoporosa. A barra representa 1 µm.

Pode-se observar na Figura 4.22 uma uniformidade nas partículas do fosfato, onde estas formam aglomerados. Podemos observar também que as partículas têm formato de bastonetes. Na Figura 4.23 encontra-se uma micrografia com as medidas de tamanho de partículas variando entre 212 e 308 nm.



Figura 4.23 – Micrografia da hidroxiapatita pura não mesoporosa, apresentando as medidas do tamanho das partículas. A barra representa 0,5 μm.

4.2 MATRIZES MODIFICADAS ORGANICAMENTE

Dentre os sólidos sintetizados, foi escolhido apenas o sólido $HC_{5,0/11}$ para ser organofuncionalizado e posteriormente aplica no sistema de liberação controlada de BSA, uma vez que o mesmo apresenta uma elevada área superficial (106 m².g⁻¹) e um tamanho médio de poros de 12,7 nm. Áreas de superfície elevada e grandes volumes de poros geralmente têm sido exigidos para a utilização em adsorventes, e, além disso, o controle do tamanho dos poros aumenta a possibilidade de utilizar os compostos de fosfato de cálcio para a adsorção seletiva de biomoléculas de tamanho nanômetrico (IKAWA et al., 2008).

Aliadas as propriedades estruturais e texturais que os fosfatos de cálcio, tanto convencionais como mesoporosos, apresentam, ainda é possível funcionalizar sua superfície, tornando-o mais eficiente e seletivo como matriz no carreamento de drogas.

4.2.1 Adsorção de N₂

A técnica de adsorção de gases foi utilizada para confirmar a ocorrência da modificação da superfície do HC_{5,0/11} com os agentes sililantes.

As isotermas obtidas para as amostras mesoporosas organofuncionalizadas com os agentes sililantes: 3-aminopropiltrimetoxissilano (N); 3propiletilenodiaminotrimetoxissilano (NN) ou 3-propildietilenotriaminotrimetoxissilano (NNN) são apresentadas na Figura 4.24. É importante observar que as formas das isotermas de adsorção para as amostras organofuncionalizadas são similares aquelas das matrizes puras. Entretanto, o volume total de N₂ adsorvido decresce para todas as pressões relativas, indicando a presença dos agentes sililantes adsorvidos na rede do material.



Figura 4.24 - Isotermas de adsorção dos sólidos HC_{5,0/11} organofuncionalizado com os agentes sililantes N (●), NN (▲) e NNN (▼) em comparação com o sólido não funcionalizado (■).

Como mostrado na Figura 4.24, o ramo das isotermas característico de preenchimento de poros dos materiais modificados organicamente decrescem à medida que a cadeia orgânica do agente sililante aumenta. Ambos os resultados implicam que a funcionalização ocorreu tanto na superfície quanto dentro dos poros, o que reduziu o volume de poros, e como a dispersão dos agentes sililantes na matriz foi uniforme, a estrutura do poro permaneceu intacta. Podemos observar que o preenchimento do poro é relacionado ao aumento da cadeia orgânica do agente sililante, o que corroboram com os dados fornecidos pela Figura 4.25 e Tabela 4.10.



Figura 4.25 - Distribuição de tamanho de poros de BJH das matrizes mesoporosa HC_{5,0/11} organofuncionalizado com os agentes sililantes N (●), NN (▲) e NNN (▼) em comparação com o sólido não funcionalizado (■).

Como pode ser observado na Tabela 4.10, os resultados mostram que a imobilização dos agentes sililantes conduz a um decréscimo no diâmetro de poro (Dp), área superficial (S_{BET}) e volume de poros (Vp) à medida que a cadeia carbônica do agente sililante aumenta.

Tabela 4.10 - Resultados de adsorção de N₂ para as hidroxiapatitas mesoporosas HC_{5,0/11} organofuncionalizadas

Amostra	S _{BET}	Vp	Dp
Amostra	(m²/g)	(cm ³ /g)	(nm)
HC _{5,0/11}	106,5	0,384	12,9
HC _{5,0/11} N	86,0	0,340	12,0
HC _{5,0/11} NN	63,9	0,285	11,2
HC _{5,0/11} NNN	43,4	0,261	10,1

Dp = diâmetro de poro, S_{BET} = área superficial e Vp = volume de poros

Analisando a Figura 4.25, observa-se que a distribuição de tamanho de poros de BJH quase não é afetada pela imolilização dos agentes sililantes nas matrizes mesoporosas $HC_{5,0/11}$. Entretanto um desvio no tamanho médio dos poros de 0,75 nm é observado, sugerindo que as moléculas dos agentes sililantes

ancoradas dentro dos canais não ocupam completamente o espaço disponível, de modo que ainda há algum espaço para a adsorção de N₂.

4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho e análise elementar

Os espectros das hidroxiapatitas pura não mesoporosa e mesoporosa, bem como a série de sólidos modificados pelos agentes sililantes nitrogenados estão mostrados na Figura 4.26.



Figura 4.26 - Espectros na região do infravermelho para as hidroxiapatitas mesoporosa, HCxy (I) e sua forma não mesoporosa, Hap (II) modificadas pelos silanos N (b), NN (c) e NNN (d) em comparação com as matrizes não funcionalizadas (a).

A princípio, em ambas a figura percebe-se uma grande similaridade do conjunto de bandas em todos os espectros. Em geral os sinais provenientes do esqueleto inorgânico se mantiveram, entretanto, após a reação de funcionalização com os agentes sililantes, ocorre o aparecimento de novas bandas de pequena intensidade, relativas à vibração de estiramento assimétrico e simétrico do grupo C-H, respectivamente, em 2938 e 2853 cm⁻¹ e uma banda larga, relativa a deformação C-H em 1465 cm⁻¹ (SILVERSTEIN, 1980), resultado do efetivo processo de imobilização das moléculas. Também se percebe que, à medida que

há o aumento da quantidade de grupos orgânicos ancorados, ocorre à diminuição da intensidade da banda de estiramento O-H em 3500 cm⁻¹ da hidroxiapatita após a imobilização das moléculas, indicando a reação dos agentes sililantes com estes grupos.

Outro aspecto a ser analisado na Figura 4.25 é diminuição gradativa da banda associada ao estiramento P-O(H) em HPO₄⁻² em 850 cm⁻¹ após a reação de funcionalização com o agente sililante, o que sugere um efetivo processo de imobilização dos agentes sililantes na matriz fosfática. A grande presença dos grupos P-OH na hidroxiapatita demonstrados nos espectros justifica a sua grande reatividade com os agentes sililantes, corroborando com os dados da análise elementar (Tabelas 4.11 e 4.12), que demonstram uma elevada quantidade de grupos orgânicos ancorados, principalmente os sólidos mesoporosos.

Comparando o espectro da matriz mesoporosa contendo o agente sililante 3propildietilenotriaminotrimetoxissilano (NNN) e o espectro da matriz mesoporosa pura (Figura 4.26b), observa-se que ao incorporar o agente sililante na matriz mesoporosa, a banda associada ao estiramento P-O(H) em HPO₄⁻² em 850 cm⁻¹, bem como a banda relativa ao estiramento C-H em 1465 cm⁻¹ sofreram alguns deslocamentos. A banda em torno de 1465 cm⁻¹ deslocou-se para 1398 cm⁻¹ e a banda em torno de 850 cm⁻¹ deslocou para 740 cm⁻¹. Já as demais bandas não sofreram nenhum desvio. Os deslocamentos para diferentes números de ondas podem evidenciar algum tipo de ligação de hidrogênio entre os grupos P-OH da matriz fosfática e os grupos funcionais amino do agente sililante.

A análise elementar das superfícies modificadas, listadas nas Tabelas 4.11 e 4.12, permitiu determinar a quantidade de grupos ancorados nas matrizes inorgânicas e comparar as relações C/N teórica e a obtida experimentalmente. **Tabela 4.11 -** Análise elementar de carbono (C), Hidrogênio (H), Nitrogênio (N) e relação molar C/N experimental das hidroxiapatitas puras não mesoporosas organofuncionalizadas. Onde Qf é densidade de moléculas imobilizadas

	Carbono	Hidrogênio	Nitrogênio	Qf	C/N
Amostra	(%)	(%)	(%)	(mmol.g⁻¹)	(Exp.)
Hap-N	4,21	0,85	1,13	0,87	4,03
Hap-NN	4,20	0,57	1,52	0,54	3,24
Hap-NNN	6,95	0,99	2,73	0,65	2,97

Tabela 4.12 - Análise elementar de carbono (C), Hidrogênio (H), Nitrogênio (N) e relação molar C/N experimental das hidroxiapatitas mesoporosas organofuncionalizadas. Onde Qf é densidade de moléculas imobilizadas.

	Carbono	Hidrogênio	Nitrogênio	Qf	C/N
Amostra	(%)	(%)	(%)	(mmol.g⁻¹)	(Exp.)
HC _{5,0/11} -N	4,99	2,00	1,78	1,27	4,25
HC _{5,0/11} -NN	6,35	2,33	2,68	0,96	2,90
HC _{5,0/11} -NNN	12,0	3,33	4,49	1,10	3,00

Os valores de análise elementar obtidos encontram-se listados nas Tabelas 4.11 e 4.12 que correspondem a hidroxiapatita convencional e sua forma mesoporosa organofuncionalizadas. A partir dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi possível determinar o teor de grupos orgânicos ancorado nestes fosfatos. Assim pelos dados da análise elementar verificou-se que 0,87; 0,54 e 0,65 mmol.g⁻¹ dos agentes sililantes N, NN e NNN, respectivamente foram ancorados as hidroxiapatitas não mesoporosas (Hap), sugerindo a efetividade das reações de silanização. No caso das hidroxiapatitas mesoporosas silanizadas, $HC_{5,0/11}N$, $HC_{5,0/11}NN$ e $HC_{5,0/11}NN$ estes valores foram de 1,27; 0,96 e 1,10 mmol.g⁻¹, respectivamente. Conforme, se observa nas Tabelas 4.12 e 4.13 o aumento do teor orgânico cresce quase linearmente com o aumento da cadeia orgânica para ambas as matrizes, porém a matriz de hidroxiapatita mesoporosa apresentou maior eficácia

no ancoramento dos agentes sililantes do que a hidroxiapatita não mesoporosa. Este comportamento pode ser pressuposto devido à hidroxiapatita mesoporosa, por possuir área superficial especifica maior que a amostra não mesoporosa, apresenta maior quantidade de grupos OH, tanto na superfície como no interior dos poros, o que lhes confere maior capacidade adsortiva. Este aumento do número de hidroxilas (OH) para os materiais mesoporosos pode explicar o alto índice de moléculas dos agentes sililantes ancoradas nesses materiais.

Partindo-se das informações obtidas pela análise elementar realizada, foram propostas que na modificação química das hidroxiapatitas Hap e HC_{5,0/11}N com os agentes sililantes nitrogenados: 3-aminopropiltrimetoxissilano (N); 3- propiletilenodiaminotrimetoxissilano (NN) ou 3-propildietilenotriaminotrimetoxissilano (NNN), pressupõe as seguintes reações, ilustradas nas Figuras 4.27 4.28, onde o agente sililante reage apenas com as hidroxilas tanto superficiais quanto no interior dos poros, gerando com diferentes formas de condensação do grupo metoxi.



Figura 4.27 – Esquema proposto para a matriz Hap e suas formas modificadas com (a) 3-aminopropiltrimetoxissilano (N); (b) 3-propiletilenodiaminotrimetoxissilano (NN) ou (c) 3-propildietilenotriaminotrimetoxissilano (NNN) com diferentes formas de condensação do grupo metoxi.



Figura 4.28 – Esquema proposto para a matriz HC_{5,0/11} e suas formas modificadas com (a) aminopropiltrimetoxissilano (N); (b) etilenodiaminotrimetoxissilano (NN) ou (c) 3-propildietilenotriaminotrimetoxissilano (NNN) com diferentes formas de condensação do grupo metoxi.

A diferença espectroscópica entre as matrizes dos fosfatos de cálcio e os produtos organofuncionalizados demonstram que os híbridos resultantes têm os grupos orgânicos ancorados no esqueleto inorgânico. A reação de silanização mostra-se efetiva, possibilitando produzir novos materiais com propriedades adsortivas diferentes à dos fosfatos originais. Neste sentido, a introdução dos novos centros básicos pode ser explorada para a liberação controlada de fármacos.

4.2.3 Difratometria de raios-X

Nas Figuras 4.29 encontram-se os difratogramas das hidroxiapatitas não mesoporosa (Hap) e sua forma mesoporosa ($HC_{5,0/11}$) organofuncionalizadas com os agentes sililantes N, NN e NNN.



Figura 4.29 - Difratogramas de raios-X para as hidroxiapatitas Hap (I) e $HC_{5,0/11}$ (II) modificadas pelos silanos N (b), NN (c) e NNN (d) em comparação com as matrizes não funcionalizadas (a).

Com base nos difratogramas de raios-X podemos observar que após o ancoramento do agente sililante nas matrizes das hidroxipatitas não houve nenhuma mudança estrutural significativa das mesmas, uma vez que não foi observado nenhum deslocamento em seus picos característicos.

4.2.4 Termogravimetria

As curvas termogravimétricas foram obtidas com o intuito de avaliar a estabilidade térmica dos materiais, assim como quantificar as moléculas imobilizadas juntamente com os dados de análise elementar. As curvas termogravimétricas das hidroxiapatitas pura não mesoporosa e sua forma mesoporosa, bem como a série de sólidos modificados pelos agentes sililantes nitrogenados estão mostrados nas Figuras 4.30.



Figura 4.30 - Curvas termogravimétricas das hidroxiapatitas *Hap* (I) e $HC_{5,0/11}$ (II) modificadas pelos silanos N (b), NN (c) e NNN (d) em comparação com as matrizes não funcionalizadas (a).

Entre a temperatura ambiente até aproximadamente 498 K, ocorre à perda de massa atribuída à saída de moléculas de água, que se encontram fisicamente adsorvidas na superfície através de ligações de hidrogênio.

As curvas termogravimétricas das matrizes funcionalizadas apresentaram uma perda de massa superior em relação aos seus respectivos suportes, no intervalo de aproximadamente 498 a 1010 K (observe a Tabela 4.13). Esta perda de massa está relacionada à decomposição da cadeia orgânica do agente sililante imobilizado, que também adiciona a liberação dos grupos OH remanescentes. Observa-se que a quantidade de perda de massa aumenta nos sólidos modificados em relação as suas respectivas matrizes a medida que a cadeia carbônica do agente sililante aumenta.

Conforme se observa na Tabela 4.13, há um aumento da perda de massa pronunciado para os híbridos formados a partir da hidroxiapatita $HC_{5,0/11}$ em relação ao suporte Hap, uma vez que uma maior quantidade de grupos orgânicos ancorados resultam numa maior degradação térmica. Esse aumento de perda de massa para estes híbridos obtidos a partir da forma mesoporosa $HC_{5,0/11}$ reforça os dados de análise elementar. A hidroxiapatita mesoporosa $HC_{5,0/11}$ por possuir área superficial específica maior que a amostra não porosa, apresenta maior quantidade de grupos OH, tanto na superfície como no interior dos poros, o que lhes confere maior capacidade adsortiva. Este aumento do numero de hidroxilas (OH) para os materiais mesoporosos pode explicar o alto índice de moléculas de água adsorvida nestes materiais no inicio da decomposição térmica (primeira etapa).

Tabela 4.13 – Percentuais das perdas de massa através das curvas termogravimétricas dos sólidos Hap e $HC_{5,0/11}$ modificada com os silanos N, NN e NNN.

Etapas de perda de massa				
%	%	%		
300 – 498	498 - 1010	1010 - 1200		
(K)	(K)	(K)		
0,19	1,60	1,10		
4,01	7,46	1,82		
3,37	9,51	1,91		
6,40	12,00	2,23		
4,85	2,73	1,38		
5,18	8,93	1,73		
6,42	11,98	2,25		
8,82	16,06	2,23		
	Etapa % 300 – 498 (K) 0,19 4,01 3,37 6,40 4,85 5,18 6,42 8,82	Etapas de perda de ma % % 300 - 498 498 - 1010 (K) (K) 0,19 1,60 4,01 7,46 3,37 9,51 6,40 12,00 4,85 2,73 5,18 8,93 6,42 11,98 8,82 16,06		

4.2.5 – Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido de ¹³C

A espectroscopia de RMN CP/MAS de ¹³C no estado sólido é uma ferramenta útil para caracterizar as estruturas dos agentes sililantes ancoradas nos fosfatos de cálcio modificados. Os espectros de RMN CP/MAS de ¹³C no estado sólido para os híbridos orgânico-inorganicos são mostrados na Figura 4.31 para a hidroxiapatita não mesoporosa organofuncionalizadas. Estes dados indicaram que as estruturas das cadeias orgânicas dos agentes sililantes ancorados na superfície destes fosfatos não mudaram sob as condições de síntese empregadas.

A espectroscopia de RMN CP/MAS de ¹³C tem sido bastante usada para caracterizar estruturas de agentes sililantes presos em matrizes inorgânicas. Os espectros de RMN CP/MAS de ¹³C para os híbridos Hap-N, Hap-NN e Hap-NNN

estão ilustrados na Figura 4.31. A numeração dos átomos de carbono é mostrada na estrutura da molécula inserida no espectro.



Figura 4.31 – RMN CP/MAS de ¹³C das hidroxiapatitas organofuncionalizadas (a) HAp-N, (b) HAp-NN e (c) HAp-NNN.

Estes picos estão de acordo com os deslocamentos químicos encontrados na literatura (JOHNSON e JANKOWSKI, 1977; YANG, et al, 1997) para os carbonos em tais vizinhanças. O espectro do sólido Hap-N mostrou três sinais distintos em 10,8; 22,4; 47,2 ppm relacionados aos carbonos C1, C2 e C3, respectivamente, conforme mostra a Figura 4.31. No entanto, para o sólido Hap-NN observaram-se quatro sinais em 8,9; 22,8; 36,8; 46,3 ppm, cujo espectro é similar ao do sólido Hap-NN. O pico 46,3 ppm foi atribuido à presença de ambos os grupos metilenos C3 e C4.

A presença de grupos metoxi não hidrolisáveis originados do agente sililante não pode ser observado, cujo sinal O-C*H₃ é esperado em torno de 50 ppm (JOHNSON e JANKOWSKI, 1977; YANG, et al, 1997), sendo, portanto, o mesmo recoberto pelos os demais picos do sólido Hap-N. De posse nessas informações dos espectros de RMN reforçam a proposta que a modificação química da hidroxiapatita Hap com os agentes sililantes nitrogenados ocorre sem alterações da cadeia orgânica havendo predominância do ancoramento de forma tridentada.

4.3 ENSAIOS DE ADSORÇÃO DE SORO ALBUMINA BOVINA - BSA

Basicamente, o estudo de adsorção na interface sólido-líquido consiste na determinação da mudança de concentração que ocorre quando certa quantidade de sorbato na solução entra em equilíbrio com uma quantidade conhecida do adsorvente. Com base na mudança de concentração do soluto na solução, a quantidade adsorvida de um dado componente pode ser determinada e plotada em função da concentração deste mesmo componente na solução de equilíbrio, obtendo-se uma curva conhecida como isoterma de adsorção.

Os processos de interação de proteínas com sólidos mesoporosos organofuncionalizados levam em conta que, as matrizes contendo grupos aminos têm sido usadas como sorbentes na concentração e isolamento de proteínas, devido à possibilidade de formação de ligação de hidrogênio entre os grupos -COO pendentes na estrutura da proteína e grupos -NH₂ presentes nos agentes sililantes e/ou grupos P-OH pendentes na superfície das hidroxiapatitas (VALLET-REGI´ et al, 2008). Os processos de adsorção foram realizados apenas para os híbridos obtidos através da organofuncionalização das hidroxiapatitas Hap e HC_{5.0/11} com OS sililantes: 3-aminopropiltrimetoxissilano (N): 3agentes propiletilenodiaminotrimetoxissilano (NN) e 3-propildietilenotriaminotrimetoxissilano (NNN), em comparação com sua forma não funcionalizada.

4.3.1 Influência do Tempo de Contato e da Concentração de BSA

As influências do tempo e da concentração foram utilizadas para determinar o tempo e a concentração de equilíbrio onde ocorre a maior capacidade de adsorção

de BSA frente às matrizes de hidroxiapatitas puras, Hap e HC_{5.0/11}, bem como para as suas formas modificadas organicamente, Hap-N, Hap-NN, Hap-NNN, HC_{5.0/11}-N, ,HC_{5.0/11}-NN e HC_{5.0/11}-NNN. Os resultados obtidos para avaliar o efeito do tempo de contato e o efeito da concentração de BSA para esses sólidos estão dispostos nas Figuras 4.32 e 4.33, respectivamente. Ao analisarmos os gráficos, podemos observar que a reação praticamente entra em equilíbrio após um tempo de 20 minutos e um a concentração de 1000 ppm para ambas os sólidos, é importante ressaltar que para a hidroxiapatita original a saturação do sólido só é obtida após 40 minutos. Desta forma escolheu-se o tempo de 20 min para todas as determinações. A diminuição do tempo requerido para o equilíbrio ser alcançado nos sólidos em comparação com o sólido não mesoporoso, Hap, é mesoporosos HC_{5.0/11} atribuída ao fato da hidroxiapatita mesoporosa, HC_{5.0/11}, possuir área superficial específica maior que a amostra não porosa, apresenta maior quantidade de grupos OH, tanto na superfície como no interior dos poros, o que lhes confere maior capacidade adsortiva. Este aumento do numero de hidroxilas (OH) para os materiais mesoporosos pode explicar o alto índice de moléculas de BSA adsorvida nestes materiais. As capacidades de adsorção desses materiais foram de 119 mg.g⁻¹ para o sólido $HC_{5.0/11}$ e 81 mg.g⁻¹ para o sólido Hap.



Figura 4.32 - Influência do tempo na adsorção de BSA nas hidroxiapatitas Hap (I) e HC_{5,0/11} (II) e suas formas organofuncinalizadas com os agentes sililantes N (a), NN (b) e NNN (c) em comparação com os sólidos não funcionalizados (d).

As isotermas de adsorção destes sólidos frente à BSA, no tocante ao efeito da concentração da proteína estão descritas na Figura 4.33. As isotermas obtidas apresentaram basicamente o mesmo tipo de perfil para os vários sólidos estudados, havendo apenas a variação na intensidade de adsorção que está diretamente relacionada com a disponibilidade dos centros básicos de Lewis, conforme apresentado na Figura 4.32. Entre as matrizes mesoporosa, HC_{5,0/11}, modificadas organicamente, a eficiência na adsorção de BSA decresce à medida que o teor de nitrogênio incorporado aumenta. O sólido HC_{5,0/11}-N possui o menor teor de orgânico e é o mais eficiente no processo de adsorção para a BSA, com um valor máximo de adsorção de 581 mg.g⁻¹. Com a diminuição da densidade de moléculas imobilizadas os centros básicos se tornam mais livres favorecendo a interação de moléculas de BSA com os grupo amino. Outra possibilidade é o impedimento estérico gerado pelo maior número de moléculas orgânicas ancoradas pode estar impedindo não só o acesso aos seus sítios básicos de nitrogênio como também, dificultando a entrada nos poros.



Figura 4.33 - Influência da concentração na adsorção de BSA nas hidroxiapatitas Hap (I) e $HC_{5,0/11}$ (II) e suas formas organofuncinalizadas com os agentes sililantes N (a), NN (b) e NNN (c) em comparação com os sólidos não funcionalizados (d).

Analisando as Figuras 4.32 e 4.33 é possível observar que a capacidade adsortiva do sólido mesoporoso, $HC_{5,0/11}$, puro e modificado organicamente frente à BSA é maior que a dos sólidos não mesoporosos, Hap, e sua formas modificadas tanto com relação ao tempo quanto ao efeito da concentração. A hidroxiapatita mesoporosa, $HC_{5,0/11}$, além de possuir área superficial específica maior que a 112

amostra não porosa, apresenta maior quantidade de grupos –NH₂, tanto na superfície como no interior dos poros, o que lhes confere maior capacidade adsortiva. Este aumento do número de centros básicos para os materiais mesoporosos pode explicar o alto índice de moléculas de BSA adsorvida.

A maior quantidade de BSA ancorada na matriz mesoporosa, $HC_{5,0/11}$ silanizada em comparação com sua forma pura não mesoporosa, Hap, pode está relacionada ao ancoramento de grupos funcionais amino sobre hidroxiapatita mesoporosa, o que segundo WANG (2009), a funcionalização de materiais mesoporosos pode alterar o tamanho dos poros e as propriedades hidrofílicas/hidrofóbica da superfície, alterando assim a forma de interação entre a droga e o substrato, resultando em maior carregamento de drogas e taxa de liberação mais lenta. Essa modificação superficial da hidroxiapatita conduziu a uma alteração nas suas propriedades químicas e físicas, diminuindo o tamanho dos poros dificultando, por sua vez, o ancoramento da BSA, uma vez que, o diâmetro da molécula de BSA (Figura 4.34) possui um tamanho é de aproximadamente 10 x 6 nm.



Figura 4.34 – Molécula de Soro Albumina Bovina – BSA. Fonte: VALLET-REGI´ et al, 2008.

As isotermas de adsorção de BSA apresentam um formato signoidal (S) conforme classificação de GILES, et at (1960) indicando que a com o aumento da

concentração as moléculas de BSA sofrem distorções ao longo da molécula orientase sobre a superfície das hidroxiapatitas de forma vertical, conforme descrito por LI et al, 2005 e HU et al, 2005. Esta distorção da cadeia da BSA facilita sua entrada nos poros menores como os encontrados nos sólidos $HC_{5,0/11}$ -N, $HC_{5,0/11}$ -NN e $HC_{5,0/11}$ -NNN.

4.3.2 Influência do pH

O efeito da variação do pH da solução aquosa foi também estudado, no sentido de elucidar sua influência no processo de adsorção de BSA, cujo comportamento para a série das hidroxiapatitas pode ser visto na Figura 4.35. A partir dos dados da Figura 4.35 nota-se que para o todos os sólidos a adsorção de BSA decresce com o aumento dos valores de pH.



Figura 4.35 - Influência da pH na adsorção de BSA nas hidroxiapatitas Hap (I) e HC_{5,0/11} (II) e suas formas organofuncinalizadas com os agentes sililantes N (a), NN (b) e NNN (c) em comparação com os sólidos não funcionalizados (d).

Como visto na Figura 4.35, o aumento do pH foi desfavorável para a adsorção de BSA na faixa de pH de 5 - 8. Tal fenômeno pode ser compreendido sob dois aspectos. Primeiro lugar, a molécula de BSA próximo ao seu ponto isoelétrico (PI = 4,8) a carga líquida das moléculas é quase zero o que diminui a repulsão eletrostática entre elas, aumentando as interações hidrofóbicas, com isso tornando as moléculas de BSA mais compactas, favorecendo, assim, a adsorção, inclusive nos poros para os sólidos mesoporosos organfuncionalizados. Em valores

de pH superior a pH 5,0, a quantidade adsorvida de proteína diminuiu drasticamente. Esta observação é coerente com algumas outras pesquisas onde o máximo de adsorção de soluções de proteínas em meio aquoso foi observado geralmente no ponto isoelétrico (LI et al, 2005 e HU et al, 2005). A diminuição da eficiência de adsorção pode ser causada pelo aumento no tamanho conformacional das moléculas de BSA, devido ao aumento das repulsões eletrostáticas entre as moléculas de BSA, quando ao se desviar do ponto iso-elétrico.

A hidroxiapatita possui cargas superficiais negativas e seu potencial zeta negativo aumenta com o aumento do pH (BOONSONGRIT et al, 2008). Abaixo do ponto isoelétrico a BSA apresenta cargas positivas, logo é de se esperar que a adsorção de BSA seja reforçada em pH ácido devido à interação eletrostática das cargas negativas da hidroxiapatita com as cargas positivas da BSA, entretanto, devido a baixa estabilidade química da hidroxiapatita em pH abaixo de 4,0, nesse trabalho esta faixa de pH não foi utilizada. No entanto, quando o pH é maior que 4,8, a BSA apresenta cargas negativas, e a magnitude dessas cargas negativas aumentam com o aumento de pH. Assim, uma força de repulsão eletrostática entre a hidroxiapatita e a BSA é gerada e reforçada à medida que o pH torna-se mais alcalino, com isso impede a adsorção de BSA na superfície da hidroxiapatita. Este comportamento também foi observado por YANG e ZHANG (2009).

4.4 ESTUDO DA LIBERAÇÃO DA SORO ALBUMINA BOVINA - BSA

A cinética de liberação foi estudada em função do tempo e do meio reacional utilizando água ou PBS (tampão fosfato, pH 7,4) para todas as hidroxiapatitas silanizadas, em comparação com sua forma pura. Os perfis de liberação de cada sistema são apresentados na Figura 4.36 e 4.37. Pode-se observar que esses sistemas apresentam perfis similares, sem a presença de uma primeira liberação pronunciada. Essa liberação inicial é atribuída à dissolução e liberação imediata da porção da proteína BSA localizada na superfície dos sólidos. Ao analisarmos os gráficos, podemos observar que a reação praticamente entra em equilíbrio cinético após um tempo de 20 horas para todos os sólidos.

Nas Figuras 4.36 e 4.37 têm-se os perfis de liberação de BSA em função do tempo utilizando como meio reacional PBS ou água, respectivamente. Ao observar estas figuras constata-se que os sólidos organicamente funcionalizados

apresentaram uma taxa de liberação mais lenta, que diminui mais ainda à medida que a cadeia orgânica do agente sililante aumenta. Isto mostra que os grupos orgânicos presentes neste sólido age como uma barreira temporária e evita a rápida liberação da BSA com o tempo. A presença do agente sililante efetivamente altera o mecanismo de liberação da BSA uma vez que aumenta o número de interações eletrostáticas e hidrofílicas entre a BSA e a matriz funcionalizada. Comportamento similar foi relatado por SONG et al, (2005), ao estudar SBA-15 funcionalizado com grupos amino na liberação de BSA.



Figura 4.36 - Perfis de liberação de BSA das hidroxiapatitas Hap (I) e HC_{5,0/11} (II) e suas formas organofuncinalizadas com os agentes sililantes N (a), NN (b) e NNN (c) em comparação com os sólidos não funcionalizados (d), utilizando PBS como meio reacional.

Ao analisar as Figuras 4.36 e 4.37, obseva-se que as hidroxiapatitas não mesoporosas, Hap, e suas formas organofuncionalizadas apresentam uma taxa de liberação de BSA muito mais rápida que suas respectivas formas mesoporosas. Sólidos mesoporosos por possuírem maiores quantidades de moléculas dos agentes sililantes ancorados em sua estrututura apresentam um número maior de interações de van der Walls entre a BSA e a matriz silanizada, dimuindo, assim, a taxa de liberação de BSA, o que é favorável do ponto de vista da cinética de liberação controlada de drogas.



Figura 4.37 - Perfis de liberação de BSA das hidroxiapatitas Hap (I) e HC_{5,0/11} (II) e suas formas organofuncinalizadas com os agentes sililantes N (a), NN (b) e NNN (c) em comparação com os sólidos não funcionalizados (d) utilizando água como meio reacional.

O meio reacional, sobretudo, os íons fosfato, presentes no PBS desempenham um papel importante no processo de dessorção de BSA em hidroxiapatitas. Como se observa nas Figuras 4.36 e 4.37, isotermas de liberação de BSA utilizando tampão fosfato (PBS) apresentam uma taxa de liberação mais rápida quando comparadas utilizando exclusivamente água. Segundo YANG e ZHANG et al, (2009) íons fosfatos presentes em PBS apresentam maior afinidade com hidroxiapatita em relação a BSA. Assim, íons fosfato adsorvem na superfície da hidroxiapatita impedindo a adsorção de BSA, por sua vez a BSA adsorvida seria dessorvida mais rapidamente da superfície da hidroxiapatita na presença de PBS. Portanto, a concorrência que ocorre entre BSA e íons fosfato na maioria dos sítios de adsorção da BSA adsorvida.

Investigando a cinética de liberação de BSA, a quantidade da proteína liberada para todos os sistemas foi estudada em função da raiz quadrada do tempo (modelo de Higuchi) para determinar o mecanismo de liberação de BSA e comparar diferenças nos perfis de liberação das amostras. Nas Figuras 4.38 e 4.39 encontram-se os perfis da cinética de liberação de BSA para os sólidos puros e organofuncionalizados utilizando água ou PBS como meio reacional.

117



Figura 4.38 - Gráficos do modelo de Higuchi para quantidade de BSA liberada versus raiz quadrada do tempo para o estudo de liberação de BSA das hidroxiapatitas Hap (I) e HC_{5,0/11} (II) e suas formas organofuncinalizadas com os agentes sililantes N (a), NN (b) e NNN (c) em comparação com os sólidos não funcionalizados (d), utilizando PBS como meio reacional.



Figura 4.39 - Gráficos do modelo de Higuchi para quantidade de BSA liberada versus raiz quadrada versus tempo para o estudo de liberação de BSA das hidroxiapatitas Hap (I) e HC_{5,0/11} (II) e suas formas organofuncinalizadas com os agentes sililantes N (a), NN (b) e NNN (c) em comparação com os sólidos não funcionalizados (d) utilizando água como meio reacional.

Um comportamento linear foi observado para todos os sistemas, mostrando uma boa correlação entre as variáveis (Tabela. 4.14), mostrando um perfil de liberação em duas etapas, uma liberação rápida inicial seguida por uma liberação mais lenta, o que caracteriza materiais que se adequaram ao modelo de liberação através do mecanismo de difusão proposto por Higuchi (OGAWA e PLEPIS, 2002).

Tabela 4.14 – Valores de R da linearização das isotermas de dessorção de BSA segundo o modelo de Higushi.

Meio reacional	Amostra	R
	Нар	0,987
	Hap-N	0,994
	Hap-NN	0,987
DRS	Hap-NNN	0,997
FDS	HC _{5,0/11}	0,992
	HC _{5,0/11} N	0,993
	HC _{5,0/11} NN	0,989
	HC _{5,0/11} NNN	0,992
	Нар	0,996
	Hap-N	0,998
	Hap-NN	0,994
ЦО	Hap-NNN	0,989
1120	HC _{5,0/11}	0,998
	HC _{5,0/11} N	0,997
	HC _{5,0/11} NN	0,996
	HC _{5,0/11} NNN	0,998



5. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram ser perfeitamente possível a obtenção de materiais mesoporosos com estrutura ordenada a base de hidroxiapatita. A grande vantagem deste procedimento é a possibilidade de manipular as propriedades texturais através da variação de parâmetros, tais como temperatura de calcinação, pH de síntese e concentração do surfactante.

As isotermas obtidas através da adsorção de N₂ demonstraram que as características estruturais da hidroxiapatita mesoporosa podem ser controladas modificando a temperatura de calcinação. Ao aumentar a temperatura de calcinação observa-se um aumento no diâmetro de mesoporos e uma diminuição no volume de microporos. Estas isotermas também indicam que a caseína é um promissor biosurfactante na síntese de fosfatos de cálcio mesoporosos, obtendo áreas superficiais superiores as encontradas na literatura.

Os dados de adsorção de N_2 , espectroscopia de infravermelho e análise termogravimétrica comprovaram que a extração do surfactante foi realizada durante o processo de lavagem dos sólidos, este fato credencia a caseína como um excelente biosurfactante na síntese de materiais mesoestruturados, uma vez que sua extração é simples e ecologicamente correta, pois dispensam o uso de solventes orgânicos e/ou gastos de energia através do processo de calcinação, comuns na extração de surfactantes comerciais.

A modificação superficial da hidroxiapatita mesoporosa com agentes sililantes nitrogenados diminuiu consideravelmente a área superficial e o diâmetro médio dos poros. Isto mostra que o agente sililante foi ancorado tanto na superfície quanto no interior dos poros.

As hidroxiapatitas mesoporosas apresentaram uma maior capacidade no ancoramento dos agentes sililantes quando comparadas aos sólidos não mesoporosos. Este fato pode estar relacionado às altas áreaa superficiais específica que os materiais mesoporosos apresentam, ou seja, apresentam maior quantidade de grupos OH, tanto na superfície como no interior dos poros, o que confere maior capacidade adsortiva dos grupos orgânicos nitrogenados.

No tocante ao ancoramento de BSA nas matrizes modificadas organicamente, a eficiência na adsorção de BSA decresce à medida que o teor de nitrogênio incorporado aumenta, devido ao aumento número de moléculas orgânicas ancoradas que impedem não só o acesso aos seus sítios básicos de nitrogênio como também, dificultando a entrada nos poros. Outros fatores como pH e força iônica podem influenciar a adsorção de BSA na superfície de hidroxiapatitas.

A modificação superficial da hidroxiapatita mesoporosa com os agentes sililantes nitrogenados diminuiu consideravelmente a cinética de liberação da BSA. Os sólidos organicamente funcionalizados apresentaram uma taxa de liberação mais lenta, que diminui à medida que a cadeia orgânica do agente sililante aumenta. Isto mostra que os grupos orgânicos presentes neste sólido age como uma barreira temporária que evita a rápida liberação da BSA com o tempo.

Um comportamento das isotermas de liberação de BSA mostram perfis de liberação em duas etapas, uma liberação rápida inicial seguida por uma liberação mais lenta, o que caracteriza materiais que se adéquam ao modelo de liberação através do mecanismo de difusão proposto por Higuchi.

As hidroxiapatitas mesoporosas sintetizadas utilizando caseína como surfactante apresentam-se como matrizes promissoras na liberação controlada de proteínas, podendo portanto ser utilizada como matriz no carreamento de hormônios (insulina, hormônios do crescimento, hormônios sexuais) ou peptídeos (soro antiofídico).



6. REFERÊNCIAS BIBLIÓGRAFICAS

ADOLFSSON, E.; NYGREN, M.; HERMANSSON, L.; Decomposition Mechanisms in Aluminum Oxide–Apatite Systems, J. Am. Ceram.Soc., 82 (1999), 2909 – 2912.

ANADA, T.; TAKEDA, Y.; HONDA, Y.; SAKURAI, K.; SUZUKI, O.; Synthesis of calcium phosphate-binding liposome for drug delivery; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19 (2009), 4148 - 4150.

ANDERSSON, J.; AREVA, S.; SPLIETHOFF, B.; LINDE N, M.; Sol-gel synthesis of a multifunctional, hierarchically porous silica/apatite composite, Biomaterials, 26 (2005), 6827 – 6835.

ANDERSSON, J.; ROSENHOLM, J.; AREVA, S.; LINDEN, M.; Influences of Material Characteristics on Ibuprofen Drug Loading and Release Profiles from Ordered Microand Mesoporous Silica Matrices, Chem. Mater., 16 (2004), 4160 – 4167.

ANNAN W.D.; MANSON, W.; Fractionation of the α s-casein complex of bovine milk. Journal of Dairy Research, 36 (1969), 259 – 268.

ARAKAKI, L.N.H.; AIROLDI, C,; Ethylenimine in the synthetic routes of a new silylating agent: chelating ability of nitrogen and sulfur donor atoms after anchoring onto the surface of silica gel, Polyhedron, 19 (2000), 367 - 372.

BAGSHAW, S.A.; PROUZET, E.; PINNAVAIA, T.J.; Templating of Mesoporous Molecular Sieves by Nonionic Polyethylene Oxide Surfactants, Science, 269 (1995), 1242 - 1244.

BAJPAI, A.K.; SHUKLA, K.S.; BHANU, S.; KANKANE, S.; Responsive polymers in controlled drug delivery. Progress in Polymer Science, 33 (2008), 1088 – 1118.

BAJPAI, A.K.; BAJPAI, J.; SHUKLA, S.; Release dynamics of tetracycline from a loaded semi-interpenetrating polymeric material of polyvinyl alcohol and poly(acrylamide-co-styrene), Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 14 (2003), 347 – 357.
BALAS, F.; MANZANO, M.; HORCAJADA, P.; VALLET-REGÍ, M.; Confinement and controlled release of bisphosphonates on ordered mesoporous silica-based materials, Journal of american chemical society, 128 (2006), 8116 – 8127.

BARRETT, E.P.; JOYNER, L.G.; HALEND, P.P; The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I - Computations from nitrogen isotherms, 72 (1951), 373 – 340.

BECK JS, VARTULI JC, ROTH WJ,; A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid-crystal templates. J. Am. Chem. Soc., 114 (1992),10834 10843.

BOISSIÈRE, C.; A study of the assembly mechanism of the mesoporous MSU-X silica two-step synthesis, Chemistry of Materials, 13 (2001), 3580 – 3586.

BOONSONGRIT Y.; ABE, H.; SATO, K.; NAITO, M.; YOSHIMURA, M.; ICHIKAWA, H.; YOSHINOBU, F.; Controlled release of bovine serum albumin from hydroxyapatite microspheres for protein delivery system, Materials Science and Engineering: B, 148 (2008), 162 – 165.

BRADFORD, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem., 72 (1976), 248 – 254

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.; TELLER, E.; Adsorption of gases in multimolecular layers, Journal of American Chemical Society, 60 (1938), 309-319.

CAVALLARO, G.; PIERRO, P.; PALUMBO, F.S.; TESTA, F.; PASQUA, L.; AIELLO, R.; Drug Delivery Devices Based on Mesoporous Silicate, Drug Delivery, 11 (2004), 41 – 46.

CIESLA, U.; SCHUTH, F.; Ordered mesoporous materials: Review, Microporous and Mesoporous Materials, 27 (1999), 131 – 149.

COLEMAN, N.R.B.; ATTARD, G.S.; Ordered mesoporous silicas prepared from both micellar solutions and liquid crystal phases, Microporous and Mesoporous Materials, 44 - 45 (2001), 73 – 80.

DALGLEISH, D.G.; SPAGNUOLO, P.A.; GOFF, H.D.; A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy, International Dairy Journal, 14 (2004) 1025 – 1031.

DASH, A.K.; CUDWORTH, G.C.J.; Therapeutic applications of implantable drugs delivery systems, Pharmacol. Toxicol. Met., 40 (1998), 1 – 12.

DA SILVA, O.G.; FONSECA, M.G.; ARAKAKI, L.N.H.; Silylated calcium phosphates and their new behavior for copper retention from aqueous solution, Colloids Surf. A, 301 (2007), 376 – 381.

DA SILVA, O.G.; SILVA FILHO, E.C.; FONSECA, M.G.; ARAKAKI, L.N.H.; AIROLDI, C.; Hydroxyapatite organofunctionalized with silylating agents to heavy cation removal; Journal of Colloid and Interface Science, 302 (2006), 485 – 491

DE KRUIF, C.G.; GRINBERG, V.Y.; Micellisation of α-casein, Colloids Surface A: Physicochem. Eng. Asp., 210 (2002), 183 - 190.

DOADRIO, J.C.; SOUSA, E.M.B.; IZQUIERDO-BARBA, I.; DOADRIO, A.L.; PEREZ-PARIENTE, J.; VALLET-REGI, M.; Functionalization of mesoporous materials with long alkyl chains as a strategy for controlling drug delivery pattern, J. Mater. Chem., 16 (2006), 462 – 466.

DOADRIO, A.L.; SOUSA, E.M.B.; DOADRIO, J.C.; PEREZ-PARIENTE, J.; IZQUIERDO-BARBA, I.; VALLET-REGI, M.; Mesoporous SBA-15HPLC evaluation for controlled gentamicin drug delivery, J. Control Release, 97 (2004), 125 – 132.

DOROZHKIN, S.V.; Surface reactions of Apatite dissolution, J. of Colloid and Interface Sci., 191 (1997), 489 - 497.

ELLIOT, J.C.; Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, Amsterdam: Elsevier, 1994.

FAJULA, F.; GALARNEAU, A.; DI RENZO, F.; Advanced porous materials: New developments and emerging trends, Microporous and Mesoporous Materials, 82 (2005), 227 – 239.

FAN,J.; LEI, J.; YU, C.; TU, B.; ZHAO, D.; Hard-templating synthesis of a novel rodlike nanoporous calcium phosphate bioceramics and their capacity as antibiotic carriers, Materials Chemistry and Physics, 103 (2007), 489 – 493 FARRELL JR., H.M.; JIMENEZ-FLORES, R; BLECK, G.T.; BROWN, E.M.; BUTLER, J.E.; CREAMER, L.K.; Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision, J Dairy Sci., 87 (2004), 1641 – 1674.

FIROUZI, A.; KUMAR, D.; BULL, L.M.; BESIER, T.; SIEGER, P.; HUO, Q.; WALKER, S.A.; ZASADZINSKI, J.A.; GLINKA, C.; NICOL, J.; MARGOLESE, D.I.; STUCKY, G.D.; CHMELKA, B.F.; Cooperative organization of inorganic-surfactant and biomimetic assemblies, Science, 267 (1995), 1138 – 1143.

FIROUZI, A.; ATEF, F.; OERTLI, A. G.; STUCKY, G. D.; CHMELKA, B. F.; Alkaline lyotropic silicate-surfactant liquid crystals, J. Am. Chem. Soc., 119 (1997), 3596 – 3610.

FOX, P.F.; BRODKORB, A.; The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance, International Dairy Journal, 18 (2008), 677 – 684.

GRAHAM N.B.; Polymeric inserts and implants for the controlled release of drugs, Br Poly. J., 10 (1979) 260 - 266. IN: DASH, A.K.; CUDWORTH G.C.; Therapeutic Applications of Implantable Drug Delivery Systems, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 40 (1998), 1 - 12.

GINEBRA, M.P.; TRAYKOVA, T.; PLANELL, J.A.; Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review, Journal of Controlled Release, 113 (2006), 102 – 110.

GILES, C.H.; SMITH, D.; HUITSON, A.; A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical, Journal of Colloid and Interface Science, 47 (1974), 755 - 765

HARRIS, J.M.; Biotechnical and biomedical application. New York: Plenum Press; 1992, p.1 – 13. IN: BAJPAI, A.K.; SHUKLA, K.S.; BHANU, S.; KANKANE, S.; Responsive polymers in controlled drug delivery. Progress in Polymer Science, 33 (2008), 1088 – 1118.

HARTMANN, M.; Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis, Chem. Mater., 17 (2005), 4577 – 4593.

HEYMANN, D.; PASSUTI, N.; Bone substitutes: New concepts, Orthop. Surg. Traumatol., 9 (1999), 179 – 184.

HILDER, T.A.; HIL, J.M.; Carbon nanotubes as drug delivery nanocapsules, Current Applied Physics, 8 (2008), 258 - 261.

HORCAJADA, P.; MÁRQUEZ-ALVAREZ, C.; RÁMILA, A.; PÉREZ-PARIENTE, J.; VALLET-REGÍ, M.; Controlled release of Ibuprofen from dealuminated faujasites, Solid State Sciences, 8 (2006), 1459 – 1465.

HORNE, D.S.; Casein micelle structure: Models and muddles, Current Opinion in Colloid & Interface Science, 11 (2006), 148 – 153

HOLT C.; An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk, Eur Biophys J.; 33 (2004) 421–434.

HUMPHREY H.P.Y.; WRIGHT, P.A.; Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid, J. Mater. Chem., 15 (2005), 3690 – 3700.

HU, J.; LI, S.; LIUB, B.; Adsorption of BSA onto sulfonated microspheres, Biochemical Engineering Journal, 23 (2005), 259 – 263.

IKAWA, N.; HORI, H.; KIMURA,T.; OUMI,Y.; SANO,T.; Unique surface property of surfactant - assisted mesoporous calcium phosphate, Microporous and Mesoporous Materials (2010), Article In Press <u>doi: 10.1016/j.micromeso.2009.09.019</u>

IKAWA, N.; HORI, H.; KIMURA, T.; OUMI, Y.; SANO,T.; Templating Route for Mesostructured Calcium Phosphates with Carboxylic Acid- and Amine-Type Surfactants; Langmuir, 42 (2008), 13113 - 13120.

INAGAKI, S.; FUKUSHIMA, Y.; KURODA, K.; Synthesis of highly ordered mesoporous materials from a layered polysilicate, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 8 (1993), 680 - 682.

IZQUIERDO-BARBA, I.; MARTINEZ, A.; DOADRIO, A.L.; PEREZ-PARIENTE, J.; VALLET-REGI, M.; Release evaluation of drugs from ordered three-dimensional silica structures, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 26 (2005), 365 – 373.

JINAWATH, S.; SUJARIDWORAKUN, P.; Fabrication of porous calcium phosphates, Materials science and engineering C, 22 (2002), 41 - 46.

JOHNSON, L.F.; JANKOWSKI, W.C; Carbon-13 NMR Spectra: A collection of assigned, coded, and indexed spectra, Jonh Wiley & Sons, Inc., 1977.

JOHN, M.; SCHMIDT, J.; High-resolution hydroxyapatite chromatography of proteins, Analytical Biochemistry, 141 (1984), 466-471.

KAMITAKAHARA, M.; OHTSUKI, C.; MIYAZAKI, T.; Behavior of Ceramic Biomaterials Derived from Tricalcium Phosphate in Physiological Condition, Journal of Biomaterials Applications, 23 (2008), 197 – 212.

KITAMURA, M.; OHTSUKI, C.; OGATA, S.; KAMITAKAHARA, M.; TANIHARA, M.; MIYAZAKI, T.; Mesoporous Calcium Phosphate Via Post-Treatment of Alpha-TCP, J. Am. Ceram. Soc., 88 (2005), 822 – 826.

KRUK, M.; JARONIEC, M.;SAYARI, A,;Relations between pore structure parameters and their implications for characterization of MCM-41 using gás adsorption and X-ray diffraction, Chemical Materiales, 11 (1999), 492 – 497.

LEPRÊTRE, S.; CHAI, F.; HORNEZ, J-C; VERMET, G.; NEUT, C.; DESCAMPS, M.; HILDEBRAND, F.H.; MARTEL, B.; Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers; Biomaterials, 30 (2009), 6086 - 6093. LI, S.; HU, J.; LIU, B.; A study on the adsorption behavior of protein onto functional microspheres, J. Chem. Technol. Biotechnol., 80 (2005), 531 – 536.

LI, Z.Z.; WEN, L.X.; SHAO, L.; CHEN, J.F.; Fabrication of porous hollow silica nanoparticles and their applications in drug release control, Journal of Controlled Release, 98 (2004), 245 – 254.

LIMA, C.B.A.; AIROLDI,C.; Layered crystalline calcium phenylphosphonate - synthesis, characterization and n-alkylmonoamine intercalation., Solid State Sciences, 4 (2002), 1321–1329.

LINARES, C.F.; BRIKGI, M.; Interaction between antimibrocial drugs and antacid based on cancrinite-type zeolite, Microp. Mesop. Mater., 96 (2006), 141 - 147.

LITTLE E.M.; HOLT, C.; An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein phosphopeptides, Eur Biophys. J., 33 (2004), 435 - 447.

LIU, Y.; GUO, R.; The interaction between casein micelles and gold nanoparticles, Journal of Colloid and Interface Science, 332 (2009), 265 – 269.

LIU, T-V.; HU, S-H.; LIU, K-H.; LIU, D-M.; CHEN, S-Y.; Preraration and characterization of smart magnetic hydrogels and its use for drug release, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 304 (2006), 397

LUONG L.N.; MCFALLS K.M.; KOHN D.H.; Gene delivery via DNA incorporation within a biomimetic apatite coating, Biomaterials, 30 (2009), 6996 - 7004. MANIASSO, M.; Ambientes micelares em química analítica, Química Nova, 24 (2001), 87 - 93.

MANZANO, M.; AINA, V.; ARE'AN, C.O.; BALAS, F.; CAUDA, V.; COLILLA, M.; M.R. DELGADO, M.R.; VALLET-REG'IA, M.; Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: Effect of particle morphology and amine functionalization, Chemical Engineering Journal, 137 (2008), 30 - 37.

MATHEW, M.; TAKAGI, S., Structures of biological minerals in dental research, Journal of the National Institute of Standards and Technology, 106 (2001), 1035 – 1044.

MCMAHON, D.J.; MCMANUS, W. R.; Rethinking casein micelle structure using electron microscopy, Journal of Dairy Science, 81(1998), 2985 – 2993.

MECCUSKER, L. B.; LIEBAU, F.; ENGELHARDT, G.; Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts, Pure Appl. Chem., 73 (2001), 381 – 394.

MEHERING, M.; Principles of High Resolutin NMR in Solids, Springer, Berlin, 1983.

MEYNEN, V,; COOL, P.; VANSANT, E.F.; Verified syntheses of mesoporous materials, Microporous and Mesoporous Materials, 125 (2009) 170 – 223.

MIQUEL, J.L.; FACCHINI, L.; LEGRAND, A.P.; MARCHANDISE, X.; LECOUFFE, P.; CHANAVAZ, M.; DONAZZAN, M.; REY, C.; LEMAITRE, J.; Clinical Materials, 59 (1990), 115 - 200

MITRI, F.F; YOSHIMOTO, M.; ALLEGRINI JÚNIOR, S.; KOO, S.; CARBONARI, M.J.; KÖNIG JÚNIOR B.; Histological findings in titanium implants coated with calcium phosphate ceramics installed in rabbit's tibias, Annals of Anatomy Anatomischer Anzeiger, 187 (2005), 93 - 98.

MULLER-BUSCHBAUM, P.; GEBHARDT, R,; ROTH, S.V.; METWALLI, E.; DOSTER, W.; Effect of Calcium Concentration on the Structure of Casein Micelles in Thin Films, Biophysical Journal, 93 (2007), 960 – 968.

NAGAI, M.; NISHINO, T.; SAEKI, T.; A new type of CO₂ gas sensor comprising porous hydroxyapatite ceramics, Sensors and Actuators, 15 (1988), 145 – 151.

NARAMBUENA, C.F.; AUSAR, F.S.; BIANCO, I.D.; BELTRAMO, D.M.; LEIVA, E.P.M.; Aggregation of casein micelles by interactions with chitosans: a study by Monte Carlo simulations, J. Agric. Food Chem., 53 (2005) 459 – 463.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M., Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações, Química Nova, 25 (2002), 1 - 13.

OGAWA, C.A.; PLEPIS, A.M.G.; Liberação *in vitro* de cloridrato de ciprofloxacina em compósitos hidroxiapatita: colágeno, Polímeros: Ciência e Tecnologia, 12 (2002), 115 - 122.

OLIVEIRA, R.B.; LIMA, E.M.; Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos, Revista Eletrônica de Farmácia, 3 (2006), 29 - 35.

OLIVEIRA, D.S.; TIMM, C.D.; Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida, Revista portuguesa de ciências veterinárias, 102 (2007), 17 – 22.

PAITAL, S.R.; DAHOTRE, N.B.; Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies, Materials Science and Engineering: Reports, 66 (2009), 1 - 70.

PARK, J.B.; LAKES, R.S.; Biomaterials, 2nd edn, Plenum Press, 1992, New York. IN: KAMITAKAHARA, M., OHTSUKI, C., MIYAZAKI, T., Behavior of Ceramic Biomaterials Derived from Tricalcium Phosphate in Physiological Condition, Journal Of Biomaterials Applications, 23 (2008), 197 - 212

PHADUNGATH, C.; Casein micelle structure: a concise review, Songklanakarin J. Sci. Technol., 27 (1) (2005), 201 - 212

PINA, S.; OLHERO, S.M.; GHEDUZZI, S.; MILES, AW.; FERREIRA, J.F.M.; Influence of setting liquid composition and liquid-to-powder ratio on properties of a Mg-substituted calcium phosphate cement, Acta Biomaterialia, 5 (2009) ,1233 – 1240.

PRELOT, B.; ZEMB T.; Calcium phosphate precipitation in catanionic templates, Materials Science and Engineering C, 25 (2005), 553 – 559.

PUREVSUREN, B.; DAVAAJAV, Y.; Thermal analysis of casein, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 65 (2001), 147 – 152.

QU, F.Y.; ZHU, G.S.; HUANG, S,Y.; LI, S.G.; QIU, S.L.; Effective Controlled Release of Captopril by Silylation of Mesoporous MCM-41, Chemphyschem., 7 (2006), 400 – 406.

RAMAKRISSHHNAN; V.; ARULDHAS, G.; Infrared Physics, 26, 353, 1986

RATNER, B.D.; Biomaterials Science an Introduction to Materials in Medicine, San Diego: Academic Press, 1996, p 484, IN: SOUZA, A. Materiais mesoporosos ordenados aplicados como sistemas de liberação controlada de drogas. *Dissertação de Mestrado, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear*, Belo Horizonte, 2006.

REY, C.; Calcium phosphates for medical applications. In: ZAHID, A.; Calcium phosphates in biological and industrial systems. Boston: Kluwer Academic Publishers, 216, 1998

ROLLEMA, H.S.; Casein association and micelle formation, In Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, 1992: Proteins (ed. P.F. Fox), Elsevier Science Publisher, Ltd., Essex, pp. 111-140. IN: PHADUNGATH, C.; Casein micelle structure: a concise review, Songklanakarin J. Sci. Technol., 27 (1) (2005), 201 - 212

SAHU, A.; KASOJU, N.; BORA, U.; Fluorescence study of the curcumin-casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells, Biomacromolecules, *9* (10) (2008), 2905 – 2912.

SALEH, J.; WILLKE, L.W.; BASSANI, I.A.; KRAETHER, L.; MOLZ, R.F.; SANTOS, L.A.; Obtenção e Avaliação de Hidroxiapatita in vivo, Anais do XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências de Materiais, Porto Alegre – RS, dezembro, 2004.

SANTOS, C.; ROVATH, C.F.; FRANKE, R.P.; ALMEIDA, M.M.; COSTA, M.E.V.; Spray-dried hydroxyapatite-5-Fluorouracil granules as a chemotherapeutic delivery system, Ceramics International, 35 (2009), 509 - 513. SCHMIDT, S.M.; MCDONALD, J.; PINEDA, E.T.; VERWILST, A.M.; CHEN, Y.;

JOSEPHS, R.; OSTAFIN, A.E.; Surfactant based assembly of mesoporous patterned calcium phosphate micron-sized rods, Microporous and Mesoporous Materials, 94 (2006), 330 – 338.

SILVERTEIN, R.M.; BASSER,G.C.; MORRILL,T.C.; Spectrometic Identification of Organic Compounds. John Wiley & Sons Inc., 2^a ed., New York, 1990.

SLOWING, I.I.; VIVERO-ESCOTO, J.L.; WU, C.-W.; LIN, V.S-Y.; Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers, Advanced drug delivery reviews, 60 (2008),1278 – 1288.

SIMÓ, C.; CIFUENTES, A.; GALLARDO, A.; Drug delivery systems: polymers and drugs monitored by capillary electromigration methods, Journal of Chromatography B., 797 (2003), 37 - 49.

SOLER-ILLIA, G.J.A.A.; SANCHEZ, C.; LEBEAU, B.; PATARIN, J.; Chemical strategies to design textured materials: from microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures, Chemical Reviews, 102 (2002), 4093 - 4138.

SONG, S.W; HIDAJAT, K.; KAWI, S.; Functionalized SBA-15 Materials as Carriers for Controlled Drug Delivery: Influence of Surface Properties on Matrix–Drug Interactions, Langmuir, 21 (2005), 9568 – 9575.

SOUZA, A.; SOUSA, K.C.; SOUZA, E.M.B.; Mesoporous silica/apatite nanocomposite: Special synthesis route to control local drug delivery, Acta Biomaterialia, 4 (2008), 671 – 679.

SOUZA, A.; Materiais mesoporosos ordenados aplicados como sistemas de liberação controlada de drogas. Dissertação de Mestrado, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2006.

SOUZA, K.C.; Síntese e caracterização de nanocompósitos de sílica mesoporosa com partículas magnéticas para dispositivos de liberação controlada de fármacos, Dissertação de mestrado, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2007.

STEIN, B.J.; MELDE, R.C..; Hybrid Inorganic-Organic Mesoporous Silicates Nanoscopic Reactors Coming of Age, Advanced Materials, 12 (2000), 1403 – 1419.

STRICK, J.E.; Sparks of life, Cambridge, MA, 2000, USA: Harvard University Press, IN: FOX, P.F.; BRODKORB, A.; The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance, International Dairy Journal, 18 (2008), 677 – 684.

SUDO, A.; HASEGAWA, M.; FUKUDA, A.; UCHIDA, A.; Treatment of Infected Hip Arthroplasty with Antibiotic-Impregnated Calcium Hydroxyapatite, The Journal of Arthroplasty, 23 (2008), 145 - 150.

SUEN, R-B.; LIN, S-C.; HSU, W-H.; Hydroxyapatite-based immobilized metal affinity adsorbents for protein purification, Journal of Chromatography A, 1048 (2004), 31 - 39.

SZYK-WARSZYNSKAA, L.; GERGELYB, C.; JAREKA, E.; CUISINIERC, F.; SOCHAA, R.P.; WARSZYNSKIA, P.; Calcium uptake by casein embedded in polyelectrolyte multilayer, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 10 (2009), 118 – 126.

TAGUCHI, A.; SCHUTH, F.; Ordered mesoporous materials in catalysis, Micropor. Mesopor. Mat., 77 (2005), 1 – 45.

TANEV, P.T.; PINNAVAIA, T.; A Neutral Templating Route to Mesoporous Molecular-Sieves, J. Science, 267 (1995), 865 - 867.

TEIXEIRA, G.V.; COUTINHO, F.M.B.; GOMES, A.S.; Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. Química Nova, v. 24 (2001), 808-181.

TOURNE-PETEILH, C,; BRUNEL, D.; BEGU, S.; CHICHE, B.; FAJULA, F.; LERNER, D.A.; DEVOISSELLE, J.M; Synthesis and characterisation of ibuprofenanchored MCM-41 silica and silica gel, New. J. Chem., 27 (2003), 1415 – 1418.

TSENG, Y-H.; MOU, Y.; CHEN, P-H.; TSAI, T.W.T.; HSIEH, C-I.; MOU, C-Y.; CHAN, J.C.C.; Solid-state P-31 NMR study of the formation of hydroxyapatite in the presence of glutaric acid, Magnetic Resonance in Chemistry, 46 (2008), 330 – 304.

TSUCHIDA, T.; YOSHIOKA, T.; SAKUMA, S.; TAKEGUCHI, T.; UEDA W.; Synthesis of Biogasoline from Ethanol over Hydroxyapatite Catalyst, Ind. Eng. Chem. Res., 47 (2008), 1443 – 1452.

TUINIER, R,; KRUIF, C.G.; Stability of casein micelles in milk. J. Chem. Phys., 117 (2002), 1290 - 1295.

VALLET-REGI', M.; BALAS, F.; COLILLA, M.; MANZANO, M.; Bone-regenerative bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability, Progress in Solid State Chemistry, 36 (2008), 163 – 191.

VELOSO, C.M.; RANGEL, M.C.; Preparação de carbonos porosos por moldagem sequencial: Revisão, Quimica Nova, 32 (2009), 1 - 9.

VILLORA, J.M.; CALLEJAS, P.; BARBA, M.F.; Métodos de síntesis y comportamiento térmico del Hidroxiapatito, Bol. Soc. Esp. Cerám. Vidrio, 41 (2002) 443 - 450.

VINU, A.; MORI, T.; ARIGA, K.; New families of mesoporous materials, Science and Technology of Advanced Materials, 7 (2006), 753 – 771.

VINU, A.; HOSSAIN, K.Z.; ARIGA, K.; Recent advances in functionalization of mesoporous silica, J. Nanosci. Nanotechnol., 5 (2005), 347 - 371.

WALSTRA, P.; JENNESS, R.; Diary Chemistry and Physics, Wiley, New York, 1984. IN: SZYK-WARSZYNSKAA, L.; GERGELYB, C.; JAREKA, E.; CUISINIERC, F.; SOCHAA, R.P.; WARSZYNSKIA, P.; Calcium uptake by casein embedded in polyelectrolyte multilayer; Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 10 (2009), 118 – 126.

WANG, B.; ZHANG, J-J.; PAN, Z-Y.; TAO, X-Q.; WANG, H-S.; A novel hydrogen peroxide sensor based on the direct electron transfer of horseradish peroxidase immobilized on silica–hydroxyapatite hybrid film, Biosensors and Bioelectronics, 24 (2009), 1141 – 1145

WANG, S. Ordered mesoporous materials for drug delivery: review, Microporous and mesoporous materials, 117, (2009), 1 - 9.

XIA, Z.; LIAO, L.; ZHAO, S.; Synthesis of mesoporous hydroxyapatite using a modified hard-templating route, Materials Research Bulletin, 44 (2009), 1626 – 1629.

YANG, J.J.; EL-NAHHAL, I.M.; SSUER, C.I.; MACIEL, G.E.; Synthesis and solid-state NMR structural characterization of polysiloxane-immobilized amine ligands and their metal complexes J. Non-Cristy. Solids., 209 (1997), 19 – 39.

YANG, P.; QUAN, Z.; LI, C.; KANG, X.; LIAN, H.; LIN, J.; Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier, Biomaterials, 29 (2008), 4341 – 4347

YANG, Q.; WANG, S.H.; FAN, P.W.; WANG, F.L.; DI, Y.; LIN, K.F.; XIAO, F.S.; pH-Responsive Carrier System Based on Carboxylic Acid Modified Mesoporous Silica and Polyelectrolyte for Drug Delivery, Chem. Mater., 17 (2005), 5999 – 6003.

YANG, Z.; ZHANG, Z., Adsorption/desorption behavior of protein on nanosized hydroxyapatite coatings: A quartz crystal microbalance study, Applied Surface Science, 255 (2009), 4569 – 4574.

YAO J.; TJANDRA, W.; CHEN, Y.Z.; TAM, K.C.; MA, J.; SOH, B.; Hydroxyapatite nanostructure material derived using cationic surfactant as a template, J. Mater. Chem., 13 (2003), 3053 – 3057.

YIU, H.H.P.; WRIGHT, P.A.; Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic–organic hybrid, J. Mater. Chem., 15 (2005), 3690 – 3700.

YU, C-Y.; YIN, B-C.; ZHANG, W.; CHENG, S-X.; ZHANG, X-Z; ZHUO, R-X. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 68 (2009), 245 - 249.

ZAIA, D.M.A.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J.; Determinação de proteínas totais via espectrofometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes, Química Nova, 21 (1998), 787 – 793.

ZENG, W.; QIAN, X.F.; ZHANG, Y.B.; YIN, J.; ZHU, Z.K.; The drug delivery system of MCM-41 materials via co-condensation synthesis, *Materials Chemistry and Physics*, 97 (2006), 437 – 441.

ZENG, W.; QIAN, X.F.; ZHANG, Y.B.; YIN, J.; ZHU, Z.K.; Organic modified mesoporous MCM-41 through solvothermal process as drug delivery system Materials Research Bulletin, 40 (2005), 766 – 772.

ZHANG, J.; FUJIWARA, M.; XU, Q.; ZHU, Y.; IWASA, M.; JIANG, D.; Synthesis of mesoporous calcium phosphate using hybrid templates, Microporous and Mesoporous Materials, 111(2008), 411 – 416.

ZHANG, Z.; LI, M.; CHEN, W.; ZHU, S.; LIU, N.; ZHU, L.; Immobilization of lead and cadmium from aqueous solution and contaminated sediment using nanohydroxyapatite, Environmental Pollution, 158 (2010), 514 – 519.

ZHAO, Y.F.; MA, J.; Triblock co-polymer templating synthesis of mesostructured hydroxyapatite, Microporous and Mesoporous Materials, 87 (2005), 110 – 117.

ZHAO, D.; HUO, Q.; FENG, J.; CHMELKA, B.F.; STUCKY, G.D.; Multiphase Assembly of Mesoporous-Macroporous Membranes, Chem. Mater., 11 (1998) 1174-1178.

ZHU, R.; YU R.; YAO, J.; MAO, D.; XING, C.; WANG, D.; Removal of Cd²⁺ from aqueous solutions by hydroxyapatite, Catalysis Today, 139 (2008), 94 - 99.

Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo