



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS



CARLISE HANNEL FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS PARA
LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS A BASE DE TITÂNIO E
COLÁGENO**

DISSERTAÇÃO - MESTRADO

PATO BRANCO
2019

CARLISE HANNEL FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS PARA
LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS A BASE DE TITÂNIO E
COLÁGENO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos”

Professora Orientadora: Dr^a. Patrícia Teixeira Marques.

Co-orientadora: Dr^a. Mariana de Souza Sikora

PATO BRANCO
2019

F383d Ferreira, Carlise Hannel.
Desenvolvimento de biomateriais para liberação de fármacos a base de titânio e colágeno. -- 2019.
63 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Teixeira Marques
Coorientador: Prof. Dr. Mariana de Souza Sikora
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2019.
Bibliografia: f. 59 - 63.

1. Materiais biomédicos. 2. Titânio. 3. Análise cinética. I. Marques, Patrícia Teixeira, orient. II. Sikora, Mariana de Souza, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 85

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

***"DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS A
BASE DE TITÂNIO E COLÁGENO"***

Autora

Carlise Hannel Ferreira

Esta dissertação foi apresentada às 14 horas do dia 18 de fevereiro de 2019, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Materiais– no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Patricia Teixeira Marques
UTFPR/PB
Orientadora

Profa. Dra. Márcia Margarete Meier
UDESC/Joinville
Examinadora

Prof. Dr. Francisco Trivinho Strixino
UFSCar/Sorocaba
Examinador

Profa. Mariana de Souza Sikora
UTFPR/PB
Examinadora

Visto da Coordenação

Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais Jusselene e Carlos e ao meu irmão Matheus e a toda família que me apoiaram todos esses anos e não me deixaram desanimar nas dificuldades dessa caminhada. Ao meu namorado João Augusto que acreditou em mim, e em nós passando toda essa caminhada comigo, não me deixando desanimar.

As minhas orientadoras Professoras Dra. Patrícia Teixeira Marques e Dra. Mariana de Souza Sikora, por terem me ensinado e por acreditarem em mim e no nosso projeto, sendo sempre muito atenciosas e dispostas a ajudar e retirar quaisquer dúvidas. A Dra. Vidiany por todo os ensinamentos nesses últimos anos, sem eles esse trabalho não poderia ser desenvolvido.

A minha companheira de pesquisa Anna Paulla Simon, que sem ela essa pesquisa seria mais árdua, me dando forças e compartilhando dos experimentos e aprendizados comigo.

Aos amigos que fiz durante essa caminhada, e aos que já faziam parte dela, Gabrielle Calegari, Renata Déda que compartilharam dos dias comigo e minha amiga Michelli Mandelli que mesmo de longe me apoiava e me incentivava.

A todos que me auxiliaram nos laboratórios em que realizei análises, como a Central de Análises (UTFPR-PB), Laboratório de Química (UTFPR-PB), UFSCar, Laboratório de Análises Clínicas do Biocentro e ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) no Centro Nacional de Pesquisas de Energia e Materiais (CNPEM) e Centro de Análise da UTFPR-PB. Este trabalho foi apoiado pela UTFPR [PAPCDT 06/2016 e 07/2017]. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, assim como à Coordenação do Curso de Bacharelado em Química.

E, por fim, a todos que não fiz menção acima, mas que de alguma forma me auxiliaram em todo meu percurso, muito obrigada!

RESUMO

FERREIRA, Carlise Hannel. Desenvolvimento de biomateriais para liberação de fármacos a base de titânio e colágeno. 2019. 63 f Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Área do conhecimento: Química de Materiais) Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2019.

No presente estudo, os revestimentos de TiO_2 desenvolvidos em um meio eletrolítico à base de etilenoglicol e SBF foram investigados como dispositivos de liberação de fármacos. Os nanotubos foram preparados a partir do titânio puro Ticp e da liga Ti_6Al_4V . A fim de retardar a liberação do medicamento (ciprofloxacina), o colágeno foi utilizado como barreira difusional. Após a síntese e o recobrimento os materiais foram caracterizados em relação à morfologia, microestrutura e ângulo de contato para os *coatings*. Na caracterização morfológica observou-se um diâmetro interno dos NTs cerca de 10 nm menor para a liga em relação aos NTs crescidos no titânio puro. Na caracterização microestrutural notou-se um maior aumento no tamanho do cristalito para os filmes finos crescidos no Ticp. Além disso, no estudo do ângulo de contato observa-se que para ambos os substratos o tempo de anodização influenciou igualmente na molhabilidade, diminuindo a molhabilidade com o aumento do tempo de anodização. A análise da cinética de liberação indica que a liberação do CIPRO ocorre através de mecanismos mistos, onde a liberação no início segue a cinética de Fick e então, a interação da droga com a superfície do óxido retardando o tempo de liberação. Os biomateriais obtidos da liga apresentaram tempos de liberação da droga mais longos em comparação com os do titânio puro, isso provavelmente é devido a maior área superficial da liga dado pela melhor auto-organização. Nos ensaios biológicos o halo de inibição mostrou que para qualquer amostra a inibição do microorganismo é eficiente, cobrindo pelo menos 12 vezes a área correspondente ao implante. Quanto a atividade hemolítica nenhuma das amostras apresentaram caráter tóxico para as células sanguíneas, e a concentração da droga liberada durante o ensaio de liberação permaneceu abaixo da concentração tóxica apresentando uma atividade bacteriostática.

Palavras-chave: Liberação de drogas. Anodização. Biomateriais à base de Ti

ABSTRACT

FERREIRA, Carlise Hannel. Development of nanobiomaterials based on titanium and collagen as a drug release platform. 2019. 63 F. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Área do conhecimento: Química de Materiais) Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2019.

In the present study, TiO₂ coatings grown in an electrolytic medium based on ethylene glycol and PBS were investigated as drug delivery devices. The nanotubes were grown from pure Ti_{cp} titanium and Ti6Al4V alloy. In order to delay the release of the drug (ciprofloxacin), collagen was used as a diffusional barrier. After a synthesis and the coating was characterized in relation to the morphology, microstructure and contact angle for the coatings. In the morphological characterization, it was observed an internal diameter of NTs around 10nm smaller for the alloy in relation to NTs grown without pure titanium. In the microstructural characterization, we noticed a larger increase in crystal size for the thin films grown in Ti_{cp}. Moreover, no study of angle of observation for both substrates the anodization time also influenced a wettability, reducing humidity with increasing anodization time. The release kinetics analysis indicates the release of CIPRO since then with the mechanism of release of the onset of Fick's kinetics and then the interaction of the drug with the surface of the oxide can delay the release time. Biomaterials adhere to the binding to the longer cycle of the drug cycle compared to pure titanium, this is due to the higher surface area of the bond. In biological assays the inhibition halo is for any sample the inhibition of the microorganism is efficient at least 12 times the size of the implant. And for hemocyte hemocyte in vaccines. Toxic to blood cells and the release of the drug released during the holding test below the toxic concentration, a bacteriostatic activity.

keywords: Drug release. Anodization. Ti-based biomaterials.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diagrama representativo da biologia da osseointegração. 1- interface osso/implante, 2- coágulo, 3 e 4- osso danificado, 5-Implante metálico, 6-osso novo, 7e 8- osso firme remodelação óssea, 9-tecido não mineralizado.....22
- Figura 2 - Esquema dos processos que ocorrem durante a anodização de Ti em eletrólitos contendo flúor24
- Figura 3 - Curva eletrolítica do sistema Ti/TiO₂, onde a região a 1 representa a queda abrupta da corrente e formação do óxido barreira, região 2 - nucleação, região 3 - fase estacionária e crescimento dos NTs.....25
- Figura 4 - Fórmula estrutural do Cloridrato de Ciprofloxacino27
- Figura 5 - Estrutura típica da molécula de colágeno (a) Esquematisação de um segmento de hélice tripla de cadeia α de colágeno. (b) Moléculas de tropocolágeno montadas. (c) Fibra de colágeno variando de 10 a 300 nm de diâmetro. (d) Fibras colágenas agregadas formando uma fibra de colágeno com um diâmetro variando de 0,5 a 3 μ m.29
- Figura 6 - Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrado por métodos convencionais de multidosagem (a) e sistema de liberação controlada (b).....31
- Figura 7 - Representação do sistema de anodização poteciostática de Titânio, onde A- Multímetro, B – Fonte de tensão constante (25 V), C – Cuba eletrolítica, síntese realizada sem controle de temperatura em aproximadamente 25 °C.....34
- Figura 8 -Curvas de densidade de corrente (mA cm⁻²) *versus* tempo (s) para amostras anodizadas de acordo com a Tabela 1 (25 V, sem agitação a temperatura ambiente 25 °C) onde (a) T1 e T2 , (b) T1 e T2 com uma aproximação na região da nucleação, (c) A1 e A2 e (d) A1 e A2 com uma aproximação na região da nucleação, todas as amostras sintetizadas em 1 e 2h respectivamente.42

Figura 9 - Imagem dos MEV referentes às amostras tratadas térmicamente a 450 °C, apresentadas na Tabela 2.....	44
Figura 10 - Imagens de MEV da vista Lateral dos NTs na Amostra T1.....	45
Figura 11 - Padrões de DRX para amostras preparadas de acordo com a Tabela 2. As fases são indexadas como (♦) titânio (ICSD # 00-005-0682) e (*) anatase (ICSD # 01-071-1167).....	47
Figura 12 - Ângulo de Contato das amostras referente a Tabela 2.....	48
Figura 13 - Massa cumulativa de cloridrato de ciprofloxacino liberadas das amostras de TiNTs preparadas de acordo com a Tabela 3, (a) T1, (b) T2, (c) A1, (d) A2.....	50
Figura 14 - Placas de Petri mostrando o halo de inibição de S aureus promovido pelas amostras sintetizadas de acordo com a Tabela 3.....	54
Figura 15 - Concentração local de Ciprofloxacina liberada da amostra T1C em função do tempo. As linhas horizontais delimitam as zonas não inibitórias e inibitórias (bacteriostáticas e bactericidas).....	56
Figura 16 - Atividade hemolítica das amostras obtidas de acordo com a Tabela 2, comparada com os substratos metálicos, com o controle negativo (PB) e o controle positivo (Triton-X). As letras no topo das barras referem-se à análise ANOVA. Amostras que compartilha.....	57
Figura 17 - Imagem ilustrativa dos controles e das amostras que ocorreram e não ocorreram a lise dos eritrócitos.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ligas de Titânio em aplicações Biomédicas, normas e microestrutura associadas a cada tipo de liga.	20
Tabela 2 - Formulação da solução de SBF	33
Tabela 3 - Condições experimentais de síntese.....	34
Tabela 4 - Matriz de planejamento das condições de preparação das amostras.....	37
Tabela 5 - Parâmetros extraídos do processamento de dados. Diâmetro interno de nanotubos obtido por análise de imagem (15 NTs), ângulo de contato e tamanho de cristalito obtido por análise de DRX usando a equação de Scherrer.	45
Tabela 6 - Parâmetros obtidos a partir da adequação de dados experimentais ao modelo de Korsmeyer–Peppas, tempo de liberação e halo de inibição com os devidos tratamentos estatísticos	52
Tabela 7 - MIC para <i>S. aureus</i>	55

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI – *Brain-Heart Infusion*

CIMs – Concentrações Inibitórias Mínimas

CIPRO – Cloridrato de Ciprofloxacino

DRX - Difractometria de Raio-X

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MIC – Concentração Mínima Inibitória

NTs – Nanotubos

PB- Tampão Fosfato

SBF - Simulated Body Fluid

S. aureus – Staphylococcus aureus

Ti_{cp} – Titânio Puro

Ti₆Al₄V – Liga de Titânio

TiO₂ - Dióxido de Titânio

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Biomateriais	18
3.2	Osseointegração	21
3.3	Anodização	23
3.3.1	Modificação da Superfície	26
3.4	Cloridrato de Ciprofloxacino	26
3.5	Colágeno	28
3.6	Liberação de fármacos	30
4	MÉTODOS	33
4.1	Síntese Anódica dos Materiais	33
4.2	Caracterização dos “coatings”	35
4.3	Molhabilidade	35
4.4	INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DO FÁRMACO	36
4.5	HALO DE INIBIÇÃO	38
4.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – MIC	39
4.7	HEMÓLISE	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1	Crescimento Eletroquímico de Nanotubos de Titânio	41
5.2	Caracterização dos “coatings”	43
5.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	43
5.2.2	Tratamento térmico e DRX	46
5.2.3	Molhabilidade	47
5.3	LIBERAÇÃO DA DROGA	49
5.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	53
5.4.1	Halo de Inibição	53
5.4.2	Concentração Mínima Inibitória- MIC	54

5.4.3	Atividade Hemolítica.....	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59

1 INTRODUÇÃO

Os seres humanos enfrentam uma capacidade limitada em se autorregenerar, como as falhas relacionadas a traumas ou a doenças. Para restauração das funções mecânicas e biológicas, vários materiais são estudados para serem introduzidos no corpo humano como implantes, enxertos ósseos ou outros dispositivos biomédicos (GURTNER; CALLAGHAN; LONGAKER, 2007). A aplicação de biomateriais sintéticos para esse tipo de situação apresenta inúmeras vantagens. Estas incluem o baixo risco de contaminação por bactérias e vírus.

A escolha de um biomaterial segue critérios específicos, sendo regida por propriedades que incluem biocompatibilidade, resistência à corrosão, degradabilidade controlada, módulo de elasticidade, resistência à fadiga e muitos outros (HABAZAKI et al., 2007). Os biomateriais mais utilizados nesses casos são polímeros, cerâmicas, compósitos e os metais. Estes materiais podem ser usados para substituir alguma parte do corpo, mas a natureza do material utilizado é dada pela necessidade e localização que será implantada. Nesse sentido, em próteses que necessitam de maior resistência mecânica são comumente utilizados biomateriais metálicos.

Quanto aos biomateriais metálicos, as pesquisas associadas ao titânio e suas ligas são motivadas principalmente por algumas características únicas desse material, como baixa compressão, baixa corrosão (HABAZAKI et al., 2007), baixa toxicidade e módulo de elasticidade mais próximo do osso humano. (HOLZAPFEL et al., 2012).

Quanto aos biomateriais metálicos, as pesquisas associadas ao titânio e suas ligas são motivadas principalmente por algumas características únicas desse material, como baixa compressão, baixa corrosão (HABAZAKI et al., 2007), baixa toxicidade e módulo de elasticidade mais próximo do osso humano. (HOLZAPFEL et al., 2012).

Estudos sobre biomateriais à base de titânio mostram uma capacidade reduzida na compatibilidade sanguínea e bioatividade (GUEHENNEC et al., 2008). Atualmente, a nanotecnologia apresenta uma oportunidade para a modificação

superficial de metais, criando revestimentos projetados para melhor desempenho dos materiais existentes, como aplicações biomédicas (SPERLING et al., 2005).

Ultimamente, vários estudos têm mostrado que a nanotexturização do titânio e suas ligas pode aumentar a biocompatibilidade do implante e facilitar o processo de osseointegração (GUEHENNEC et al., 2008; HABAZAKI et al., 2007; KUBIES et al., 2011), devido a morfologia que imita a estrutura óssea humana.

Nesse sentido, o processo anódico é uma técnica de modificação de superfície que pode ser utilizada com grande sucesso para tais melhorias de biomateriais à base de titânio (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005; EHRENFEST et al., 2010). Através desse processo, os filmes apresentam nanoestruturas que modificam sua interação com o corpo, por propriedades miméticas ou de adaptação da superfície promovendo uma alta interação com células osteoblásticas (RIEGER et al., 2015). No entanto, há também um aumento na interação com microorganismos patogênicos, como o *S. aureus* (ORAPIRIYAKUL et al., 2018). A proliferação desses microrganismos na superfície do implante afeta o processo de osseointegração, causando a rejeição do implante.

Essa modificação agrega proteção contra corrosão e até mesmo áreas específicas que induzem a deposição de espécies de interesse biológico e de carga de drogas. O carregamento de medicamentos com antibióticos pode ser a chave para reduzir as altas taxas de rejeição provocadas pela proliferação de células bacterianas e formação de biofilme.

Essas drogas, quando administradas localmente, oferecem diversas vantagens, atuando *in situ* para minimizar a quantidade de droga utilizada, reduzindo as chances de toxicidade sistêmica (YAO; WEBSTER, 2009). Além disso, se uma baixa taxa de liberação é alcançada, é possível criar uma zona de inibição de microorganismos ao redor do implante. Esse processo de liberação lenta pode ser obtido por meio de barreira física ou química (LYRA et al., 2007).

Muitos trabalhos (MOHAN; ANANDAN; RAJENDRAN, 2016; UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2018; WEI et al., 2013) mostraram a adição de quitosana como uma barreira difusional. Embora seja um biomaterial já conhecido, a quitosana é um material exógeno para o corpo humano. Assim, uma alternativa atraente para uso como barreira difusional seria uma macromolécula presente em organismos humanos. Nesse sentido, uma possibilidade para esse fim seria o uso de colágeno, que é uma proteína presente no tecido conjuntivo além de participar ativamente do

processo de osseointegração. No presente estudo, o colágeno será utilizado como agente retardador, promovendo a liberação retardada do fármaco.

Neste sentido, este trabalho tem como objetivo avaliar as condições de síntese e caracterizar os revestimentos de dióxido de titânio obtidos a partir do titânio e sua liga Ti_6Al_4V , utilizando o método de anodização eletroquímica potencioestática. Os revestimentos sintetizados foram utilizados como reservatório para um fármaco antimicrobiano modelo. Para retardar a liberação do fármaco, as amostras foram revestidas com colágeno e uma solução de fármaco e colágeno. A cinética de liberação do fármaco, bem como a atividade antimicrobiana e a hemotoxicidade dos biomateriais também foram investigadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo principal a síntese eletroquímica de filmes de dióxido de titânio (TiO_2) recobertos com colágeno, para estudo da cinética de liberação de cloridrato de ciprofloxacino.

2.2 Objetivos específicos

- Síntese de revestimentos nanoestruturados de TiO_2 a partir de substratos de titânio (ASTM F67 e ASTM F136) utilizando o método eletroquímico conhecido como anodização potencioestática;
- Incorporação do fármaco antimicrobiano cloridrato de ciprofloxacino no interior da nanoestrutura formada;
- Obtenção de materiais híbridos contendo o fármaco e colágeno com o objetivo de diminuir a velocidade de liberação do fármaco;
- Estudo da liberação do fármaco;
- Estudo da influência da composição do revestimento na molhabilidade do material;
- Estudo da atividade antimicrobiana dos materiais sintetizados frente a bactéria *S. aureus*

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

Vem se estudando a muitos anos materiais que possam substituir tecidos ósseos do corpo humano sem que seja utilizado enxertos de origem animal. A utilização de materiais sintéticos na regeneração do tecido ósseo, como uma alternativa aos enxertos ósseos, é relevante, pois eles não danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005). Sendo assim os materiais sintéticos mais utilizados são os cerâmicos, polímeros, metais e os mais recentes os compósitos (JIN et al., 2016).

Os biomateriais podem ser definidos mais amplamente como:

“Qualquer substância ou combinação de substâncias que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte ou como todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo” (WILLIAMS, 1999).

Os biomateriais utilizados como substitutos do tecido ósseo devem possuir características peculiares, sendo biocompatíveis, biodegradáveis e osteocondutivos onde promovem a formação de osteoblastos para o local lesado (CHEN et al., 2009). No que se diz respeito a substituição ou restauração de tecidos duros doentes ou danificados, a classe de materiais mais utilizados são os metais, por apresentarem algumas propriedades muito parecidas com as do tecido ósseo humano (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005), os materiais metálicos são os mais adequados se comparados aos materiais cerâmicos ou poliméricos, devido a sua resistência mecânica, alta resistência a peso e corrosão e alta resistência ao desgaste (STAIGER et al., 2006).

Os materiais poliméricos, tais como polietileno e silicone, apresentam baixa resistência mecânica, boa elasticidade, baixa densidade, são aplicados na produção de tendões artificiais, e como parafuso absorvível em fratura pequeno porte (PRADO, 2017)

As cerâmicas e vidros, como porcelanas e vidros bioativos, apresentam excelente biocompatibilidade e são resistentes ao desgaste e a corrosão, contudo apresentam pequena resistência limitando seu uso, sendo assim mais utilizado como enchimento ósseo. Outra classe utilizada são os compósitos, como as fibras de carbono que apresentam boa biocompatibilidade, resistência à corrosão e altas tensões, sendo encontrados em válvulas cardíacas e alguns implantes ortopédicos, porém são materiais de alto custo de fabricação (PRADO, 2017).

Já os primeiros biomateriais metálicos utilizados para a restauração óssea foram os de aço inoxidável e as ligas de cobalto e cromo, por volta de meados do século XX (CHARNLEY, 1960). A principal característica desses biomateriais é seu potencial de grande resistência à corrosão no ambiente in vivo, porém também apresentam boa resistência mecânica, além de alta resistência à fadiga, à tração e à fratura (STAIGER et al., 2006). A partir desses primeiros biomateriais produzidos, novas ligas metálicas, como as de titânio, tem sido produzida a fim de melhorar suas propriedades de resistência mecânica e anticorrosão.

O titânio e suas ligas estão cada vez mais sendo utilizados para esse fim, por apresentarem a formação de uma película de óxido não reativo em sua superfície podendo ter estrutura porosa ou não.

O titânio pode ser classificado, devido a sua microestrutura em α , $\alpha + \beta$, β como é descrito na Tabela 1. O Titânio comercialmente puro (Ti_{cp}) possui estrutura hexagonal compacta denominada de fase alfa, e a adição de elementos como Nitrogênio, Oxigênio, Alumínio e Carbono estabilizam a fase $Ti-\alpha$. (Essas ligas apresentam maior resistência à corrosão do que as demais ligas, porém apresentam limitações quanto à resistência a baixas temperaturas. Já elementos como o Nióbio, Vanádio, Ferro e Manganês são β estabilizantes, onde a estrutura sofre uma transformação para cúbica de face centrada, e essas ligas apresentam características únicas de baixo módulo de elasticidade e elevada resistência à corrosão (AZEVEDO, 2003). A liga $Ti6Al4V$ possui em sua composição uma mistura de estabilizadores $\alpha + \beta$, por apresentar Alumínio e Vanádio na sua composição, onde com essa fusão de estabilizadores faz com que apresente elevada resistência

mecânica, aumentando sua elasticidade em comparação com o Titânio puro (MOHAMMED; KHAN; SIDDIQUEE, 2014).

Tabela 1 - Ligas de Titânio em aplicações Biomédicas, normas e microestrutura associadas a cada tipo de liga.

Liga	Normas	Microestrutura
Titânio comercialmente puro	ASTM F67, ISO 5832-2	α
Ti-6Al-4V ELI	ASTM F136, ASTM F620, ISO 5832-3	$\alpha + \beta$
Ti-6Al-4V	ASTM F1108, ASTM F1472	$\alpha + \beta$
Ti-6Al-7Nb*	ASTM F1295, ISO 5832-11	$\alpha + \beta$
Ti-5Al-2.5Fe*	ISO 5832-10	$\alpha + \beta$
Ti-5Al-3Mo-4Zr*	-	$\alpha + \beta$
Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0.2Pd*	-	$\alpha + \beta$
Ti-15zn-4Nb-2Ta-0.2Pd*	-	$\alpha + \beta$
Ti-13Nb-13Zr*	ASTM F1713	β
Ti-12Mo-6Zr-2Fe*	ASTM F1813	β
Ti-15Mo*	-	β
Ti-16Nb-10Hf	-	β
Ti-15Mo-5Zr-3Al	-	β
Ti-15Mo-2.8Nb-0.2Si-0.26O	-	β
Ti-35Nb-7Zr-5Ta*	-	β
Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr*	-	β
Ti-40Ta*	-	β
Ti-50Ta*	-	β

*Liga desenvolvida para aplicações biomédicas

ASTM (Sociedade Americana de Testes e Materiais), ISO (Organização Internacional para Normatização)

Fonte: (AZEVEDO, 2003)

Os biomateriais utilizados na regeneração óssea, independentemente de serem permanentes ou biodegradáveis, naturais ou sintéticos, necessitam ser biocompatíveis e osteoindutivos, porosos, integrativos e mecanicamente compatíveis com o osso nativo para que ocorra uma boa osseointegração.

3.2 Osseointegração

A osseointegração está associada à formação de um novo tecido ósseo sobre implante. Esse processo está ligado a modelação e remodelação do tecido ósseo (modificação ou reestruturação da estrutura interna óssea: óssea compacta e estrutura óssea esponjosa). Esse fenômeno está ligado às propriedades físico-químicas superficiais dos materiais utilizados em implantes. Pesquisas recentes indicam que o desenvolvimento de superfícies texturizadas podem aumentar a eficiência do processo, influenciando diretamente a interface osso/implante, aumentando a qualidade da formação do tecido ósseo formado (HAYASAKI; SOUSA, 2006).

A descoberta da osseointegração aconteceu por volta de 1965 na Universidade de Gotemburgo (Suécia) com o Professor Per-Ingvar Brånemark [S.I] em seu grupo de pesquisa, onde descobriu-se o fenômeno da osseointegração estudando a interação entre medula óssea e o sangue com potencial de cicatrização e de remodelação. Para alcançar este objetivo fosse realizado um experimento utilizando-se de uma pequena câmara de titânio inserida cirurgicamente na tíbia de coelhos para estudar o fluxo sanguíneo no osso. Notou-se que a câmara acabou tornando-se parte integral do tecido ósseo e que não poderia ser reutilizada, sendo chamado então esse fenômeno de osseointegração.

Sabe-se que o tecido ósseo é composto por duas fases principais, a matriz orgânica, conferindo ao osso uma certa flexibilidade diante de algumas tensões, e a matriz inorgânica, que é composta pelo mineral hidroxiapatita (HA), que faz com que o osso apresente uma maior rigidez e possa ser submetido a grandes compressões. As propriedades mecânicas do sistema osso/implante dependem da rugosidade e da porosidade da superfície do material para favorecer o crescimento ósseo. Diante disso o processo de anodização faz com que o implante, devido a sua texturização se assemelhe com a parte inorgânica do tecido ósseo (BEU et al., 2017), sendo assim o estudo com titânio passou a ter mais atenção.

Após a implantação da prótese, as primeiras reações que acontecem entre o implante e os tecidos orgânicos são reguladas por uma pequena quantidade de plasma liberado pelos vasos sanguíneos. Esse fenômeno é o início para osseointegração, podendo ser explicado de acordo com o diagrama apresentado na

Figura 1, onde a região 1 mostra o contato entre a superfície do metal com o osso, na região 2 é demonstrado a formação de um coágulo, que está presente entre as roscas do parafuso e o osso danificado onde se formou durante o trauma mecânico e térmico da operação. Esse coágulo é absorvido entre duas a três semanas, na região 3 e 4 que apresenta o osso danificado pelo trauma mecânico e térmico e o osso sadio respectivamente, o implante metálico é observado na região 5. Após o período de cicatrização, o coágulo antes apresentado na região 2, é reabsorvido pelo organismo e torna o osso novo como demonstrado na região 6. Nesta etapa há uma revascularização, desmineralização e remineralização, que aos poucos vai sendo reabsorvido e substituído por um osso mais firme que tem a capacidade de se adaptar ao formato do implante, que é representado na região 7. Após o período inicial de cicatrização, o tecido ósseo fica em contato direto com o implante, sem que haja um tecido intermediário e a região mais próxima ao implante sofre remodelação óssea como pode ser observado na região 8. Por fim a região 9 ilustra um caso de insucesso do implante metálico, onde um tecido não mineralizado é formado entre o implante e o osso (RENZ; OLIVEIRA; HÜBLER, 2007).

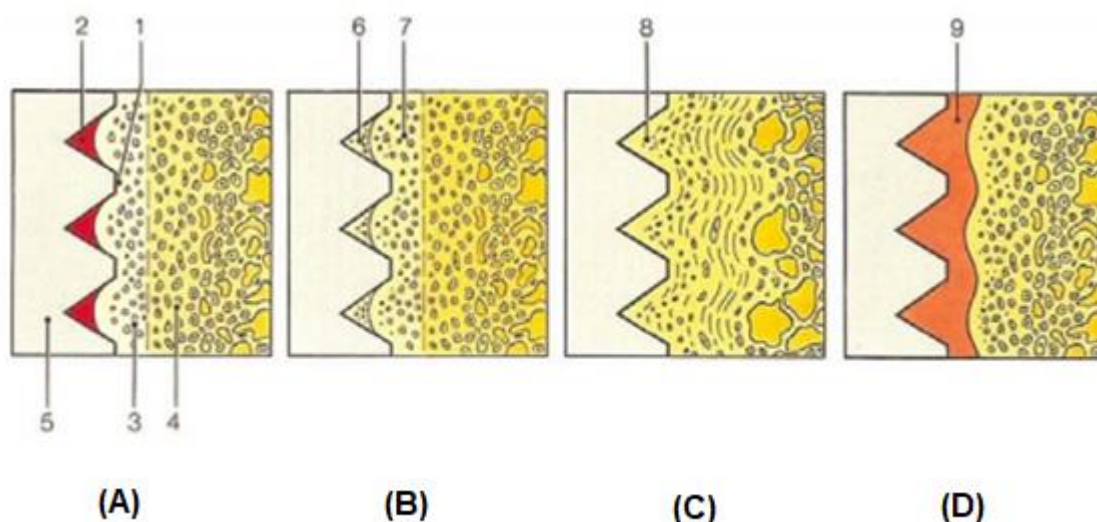


Figura 1 - Diagrama representativo da biologia da osseointegração. 1- interface osso/implante, 2- coágulo, 3 e 4- osso danificado, 5-Implante metálico, 6-osso novo, 7e 8- osso firme remodelação óssea, 9-tecido não mineralizado.

Fonte : (RENZ; OLIVEIRA; HÜBLER, 2007)

Juntamente com o processo demonstrado na Figura 1, reações biomineralizadoras ocorrem na superfície do substrato metálico assimilando a estrutura do tecido ósseo. Para que essa estrutura metálica seja mimetizada ao osso humano o processo anódico é empregado.

3.3 Anodização

Dentre as técnicas existentes para a modificação de superfície, a anodização é utilizada para o crescimento de filmes de óxidos sobre a superfície de titânio, através de um processo eletroquímico relativamente simples e de um custo baixo, fazendo com que a sua área superficial seja aumentada (REGONINI et al., 2013). Essa técnica é muito recomendada devido à formação de um óxido com alta ordenação dos nanotubos formados na sua superfície.

A anodização é um processo eletroquímico no qual um metal é submetido à oxidação. Pode ser conduzida à potencial constante (modo potenciostático) e a corrente constante (modo galvanostático). Um sistema de anodização convencional é constituído por uma fonte de energia conectada ao metal (neste caso o titânio), também chamado de eletrodo de trabalho (pólo positivo), onde acontece a oxidação. Como contra-eletrodos (pólo negativo), são usados materiais inertes como a platina, que fazem o papel de receber os elétrons, promovendo a redução dos íons H^+ em solução.

O método de síntese, embora apresente efeitos sobre a superfície do metal, o que de fato estabelece a morfologia do filme é a natureza da solução eletrolítica utilizada. Na anodização contendo fluoreto, o campo elétrico aplicado na interface do metal com o óxido, promove o transporte dos íons de Ti^{4+} , do substrato de Titânio para a interface óxido/solução, onde se combinam com os íons F^- para a formação do complexo Hexafluoreto de Titânio $[TiF_6]^{2-}$ (Figura 2). Ânions como O^{2-} , OH^- que são provenientes da dissociação da água e o F^- migram para o ânodo, com isso no cátodo ocorre a formação de bolhas de hidrogênio. A presença de íons F^- é capaz de dissolver parcialmente o óxido, processo crucial na formação da porosidade no filme e, possivelmente, atua para sustentar a porosidade durante a formação dos

nanotubos (NT), essa formação ocorre com a adição de meios viscosos com baixa porcentagem de água, como soluções orgânicas de etilenoglicol (REGONINI et al., 2013).

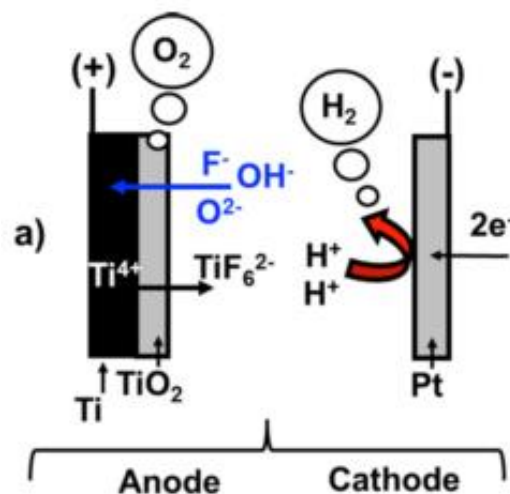
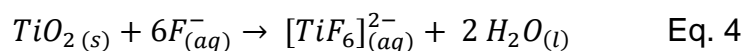
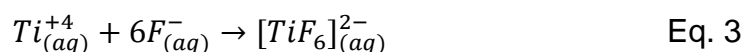
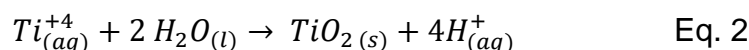


Figura 2 - Esquema dos processos que ocorrem durante a anodização de Ti em eletrólitos contendo flúor

Fonte: (REGONINI et al., 2013)

A formação de crescimento dos nanotubos em soluções eletrolíticas contendo fluoreto pode ser descrita pelas equações abaixo:



O método potencioestático induz a formação de óxidos ou “*coatings*” nanoestruturados permitindo a texturização dos substratos de maneira semelhante à morfologia encontrada no osso humano, sendo assim essa nanoestrutura favorece a osseointegração. A oxidação eletroquímica de metais, como o Titânio e Alumínio, pode ser observada pelas curvas eletroquímicas, também chamadas e cronoamperogramas, como é observado na Figura 3.

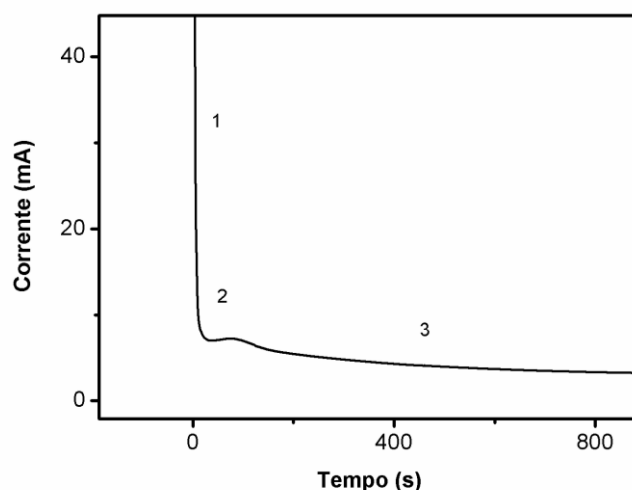


Figura 3 - Curva eletrolítica do sistema Ti/TiO₂, onde a região a 1 representa a queda abrupta da corrente e formação do óxido barreira, região 2 - nucleação, região 3 - fase estacionária e crescimento dos NTs.

Fonte: Própria

Pode-se observar na região (1) um decréscimo abrupto da corrente devido ao aumento da resistência do filme oferecido pela camada de óxido à passagem dos elétrons, sendo este processo uma característica conhecida na oxidação induzida do Titânio quando se aplica potencial constante. Nesta primeira região acontece a formação de uma fina camada de um óxido chamado barreira que recobre toda a superfície do metal, esse óxido atua como barreira para elétrons. Na região (2) acontece um pequeno aumento da corrente, nessa região o óxido barreira formado anteriormente possui uma fina camada e devido a solução eletrolítica conter NH₄F, os íons fluoreto atacam o óxido, levando então a solubilização local do óxido barreira e a formação do complexo [TiF₆]²⁻ (que é solúvel no meio eletrolítico), é nessa segunda região e após a formação do complexo que as estruturas se formam variando de poros à nanotubos apresentando uma maior área superficial. Seguindo esse acontecimento da formação das estruturas porosas o sistema passa para a região (3), onde se observa uma fase estacionária, não ocorrendo grandes variações da corrente no sistema, e é nessa fase que ocorre o aumento de comprimento dos nanotubos formados (REGONINI et al., 2013).

Após serem definidos os fatores como a composição da solução eletrolítica, potencial aplicado, tempo de anodização e temperatura, o que irá determinar a espessura e o diâmetro da camada de nanotubos é o tempo de anodização.

Conforme esse tempo aumenta, há o começo da dissolução na parte superior do nanotubo provocando o colapso do mesmo, após 2 horas de anodização. Esse colapso leva à formação de “*spikes*” ou “*clusters*”, os quais mudam significativamente a morfologia do filme formado (MACAK et al., 2007).

3.3.1 Modificação da Superfície

O objetivo dos tratamentos de superfícies é o estabelecimento de uma ligação química e mecânica do osso ao material do implante. Geralmente cria-se uma superfície rugosa com a finalidade de aumentar a área superficial do material, e a adesão da interface osso/implante, a anodização tem sido proposta para modificar a superfície do material, no propósito de uma melhor e mais rápida osseointegração.

Os tratamentos de superfícies têm sido utilizados nos implantes de titânio. Esses tratamentos envolvem desde tratamentos puramente mecânicos que visam o aumento da rugosidade superficial até tratamentos químicos que envolvem mudanças estruturais na camada de óxido. Mais especificamente a modificação da superfície faz com que o material utilizado mimetize o osso humano influenciando na formação da matriz óssea (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005). Essas modificações permitem não somente a recuperação mais rápida e eficaz, mas também uma melhor fixação na interface osso/implante.

Devido a essas modificações pela anodização, a formação das estruturas nanotubulares, faz com que aumente a superfície do material permitindo a introdução de fármaco nessas estruturas, afim de melhorar o processo de aceitação do material pelo paciente.

3.4 Cloridrato de Ciprofloxacino

A produção de implantes com estruturas nanotubulares está sendo aplicada não apenas por melhorar as propriedades da superfície do metal, pois as rugosidades das nanoestruturas no TiO₂ provocam a adesão de células

osteoblásticas e células bacterianas. Sendo assim, essas superfícies texturizadas vêm sendo estudadas para a incorporação e liberação continuada de fármacos, proteínas ou hormônios, além do que possibilitam o controle da interface osso/implante (BAUER et al., 2013; GONGADZE et al., 2011).

A descoberta de antibióticos representou um avanço na medicina nas últimas décadas, onde possibilitou o controle de muitas bactérias patogênicas. Atualmente são conhecidas centenas de antibióticos, dentre estes destaca-se o cloridrato de ciprofloxacino que é um antimicrobiano de largo espectro.

O cloridrato de ciprofloxacino é o ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-1,4 dihidroquinolina-3-carboxílico, segundo a nomenclatura da IUPAC, sendo um antibiótico da família das quinolonas e da classe das fluorquinolonas também classificado como de segunda geração. Essa classificação se dá pela incorporação do átomo de flúor no composto, apresentando em sua fórmula estrutural com anel heteroaromático, contendo nitrogênio e um carbono na oitava posição (Figura 4) caracterizando uma quinolona verdadeira. A atividade antimicrobiana do composto está associada à presença da função ácido carboxílico e a cetona na estrutura e também a substituição do nitrogênio, onde sem essas características a atividade se torna praticamente nula (CAZEDEY, 2009).

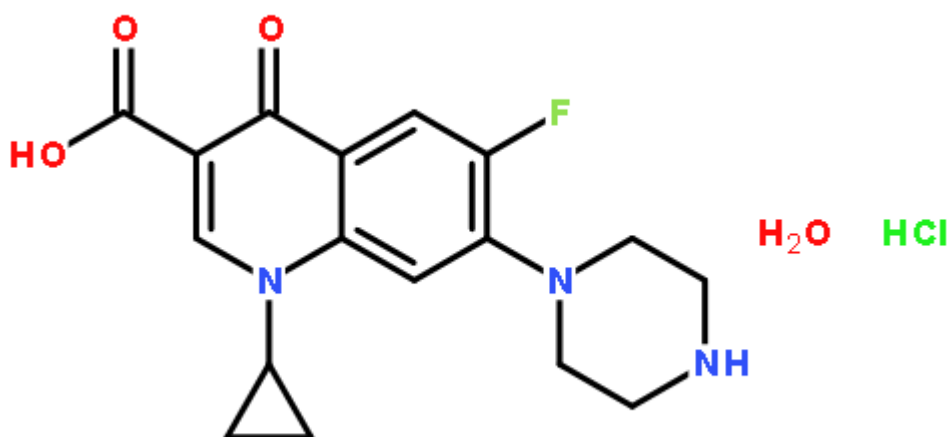


Figura 4 - Fórmula estrutural do Cloridrato de Ciprofloxacino

Fonte (SOUZA; ALMEIDA; COURI, 2004)

O ciprofloxacino é eficaz contra bactérias resistentes aos aminoglicosídeos, penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas e outros antibióticos, sendo esta eficácia para preparação de fluorquinolonas diretamente ligada ao seu mecanismo de ação (SOUZA; ALMEIDA; COURI, 2004).

3.5 Colágeno

As técnicas de liberação controlada utilizam uma “barreira” física ou química para que aconteça uma liberação lenta da dose do fármaco em questão. Esses métodos de obtenção têm sido utilizados para formar essa barreira nas formas farmacêuticas sólidas, incluindo a utilização de revestimentos, incrustação do fármaco na matriz de cera ou plástica, microencapsulação, ligação química a resinas de permutação iônica e incorporação em uma bomba osmótica (LYRA et al., 2007). Uma forma de retardar a liberação do medicamento é a utilização de uma molécula que tenha afinidade com aquelas que já existem no corpo humano.

O colágeno é uma macromolécula composta por um grupo de 29 proteínas que são encontradas no tecido conjuntivo, contém cadeias peptídicas de aminoácidos como glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina (WEWA; ASSEL, 2008). É uma proteína fibrosa, onde as cadeias peptídicas são organizadas paralelamente, formando então as fibras de colágeno, proporcionando resistência e elasticidade encontradas nos ossos, tendões, cartilagens, veias, pele, dentes e músculos (WEWA; ASSEL, 2008).

O termo colágeno é derivado das palavras gregas Kolla (cola) e Genno (produção) e literalmente tem sido empregado como matéria-prima na produção de cola animal, sendo que isso constitui 30% da matéria orgânica do corpo dos animais, e 60% das proteínas totais do corpo (PRESTES, 2012). Sua síntese ocorre dentro das células em pequenas porções e é levado para fora da célula com ajuda de enzimas polimerizantes. Sua estrutura é uma tripla-hélice como pode ser observado na Figura 5.

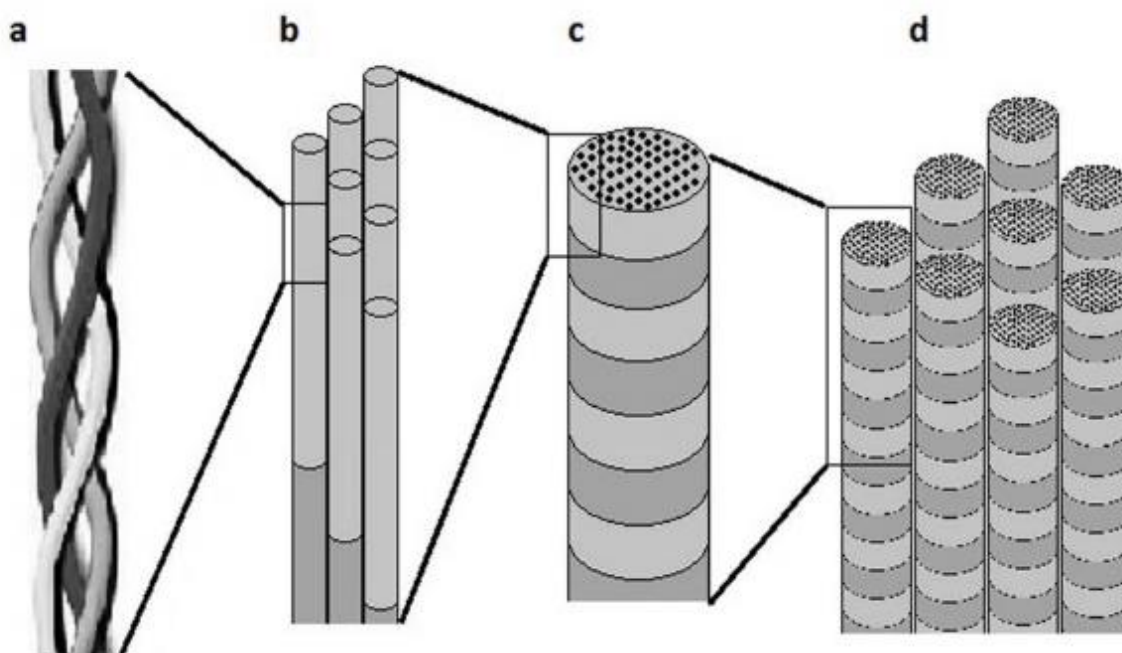


Figura 5 - Estrutura típica da molécula de colágeno (a) Esquemática de um segmento de hélice tripla de cadeia α de colágeno. (b) Moléculas de tropocolágeno montadas. (c) Fibra de colágeno variando de 10 a 300 nm de diâmetro. (d) Fibras colágenas agregadas formando uma fibra de colágeno com um diâmetro variando de 0,5 a 3 μm .

Fonte: (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010)

O colágeno pode ser classificado quanto a sua estrutura como estriado (fibroso), não fibroso (formador de rede), microfibrilar (filamentoso) e associado às fibrilas, e também classificado quanto ao tipo onde é dividido em grupos. O colágeno do tipo I é o mais abundante, encontrado nos tendões, na cartilagem fibrosa, no tecido conjuntivo frouxo comum, no tecido conjuntivo denso, é constituída de 3 cadeias peptídicas duas cadeias iguais α_1 e uma cadeia α_2 (PRESTES, 2012). Estas três cadeias se entrelaçam através de ligações de hidrogênio formando uma estrutura conhecida como tripla hélice.

Esse grupo de proteínas pode ser dividido em colágeno hidrolisado e colágeno natural (gelatina) sendo obtidos dos aminoácidos. A diferença principal entre o colágeno hidrolisado e o colágeno natural é que o hidrolisado é mais facilmente absorvido e assimilado, sendo solúveis em água ou em salmoura apresentando entre 84 e 90% de proteínas (PRESTES, 2012).

O colágeno será estudado como uma matriz para a liberação controlada devido a sua degradação não ser tóxica. A característica de insolubilidade do colágeno não hidrolisado em água limita seu uso com suporte de drogas.

3.6 Liberação de fármacos

Na década de 50 iniciaram-se os estudos do processo de liberação lenta de substâncias biologicamente ativas, tendo em vista que antes disso não se conheciam materiais que pudessem liberar moléculas com uma elevada massa molecular (KWON; BAE; KIM, 1991). Para que isso possa ser possível faz-se necessário a utilização de uma barreira física na superfície no biomaterial, sendo assim o uso de colágeno ou quitosana faz com que esse método de liberação seja mais eficaz.

Atualmente existem variados sistemas de liberação de fármacos, aparecendo expressões para defini-los como liberação retardada (RETARD), repetida, controlada (CR), sustentada (SR), entre outras. A indústria farmacêutica vem fazendo uso de novas tecnologias para o sistema de liberação controlada de fármacos, que leva em consideração a maneira que o agente que é liberado independentemente dos fatores externos e tendo uma cinética de liberação bem estabelecida (RAJGOR et al., 2011). Esse método oferece algumas vantagens em relação aos métodos que liberam em um curto intervalo de tempo o agente ativo, destaca-se a seguir algumas (RAJGOR et al., 2011):

(1) Níveis constantes da substância no organismo, resultando em uma maior eficiência do fármaco, sendo assim, necessita-se de uma quantidade inferior do agente ativo para se produzir o mesmo efeito comparados aos métodos convencionais, que não apresentam uma barreira difusional;

(2) Aplicação do fármaco diretamente no local de ação, evitando então efeitos colaterais maiores;

(3) Menor frequência de administração do fármaco no organismo do paciente, aumentando o conforto e a sua eficácia, evitando também doses tóxicas ao organismo.

Os métodos de liberação retardada, cuja liberação do fármaco é prolongada, requerem administrações menos frequentes da droga em relação às formas convencionais eliminando o desconforto da administração parenteral de várias doses do agente bioativo no paciente.

Como é visto na Figura 6 no primeiro caso (a) ocorre a liberação do fármaco nas formas convencionais. O ponto máximo da curva é representado pelo aumento

da concentração do fármaco na corrente sanguínea, já no ponto mínimo o nível do medicamento que está sendo administrado não está sendo eficaz, essa variação faz com que não tenha efeitos farmacológicos ou então que ocorra a intoxicação do organismo. Já no caso (b) ocorre a liberação controlada do fármaco, essa curva não apresenta grandes variações na administração do fármaco sendo assim os níveis do medicamento no organismo se mantem constantes apresentando vantagens em relação ao primeiro método (LYRA et al., 2007).

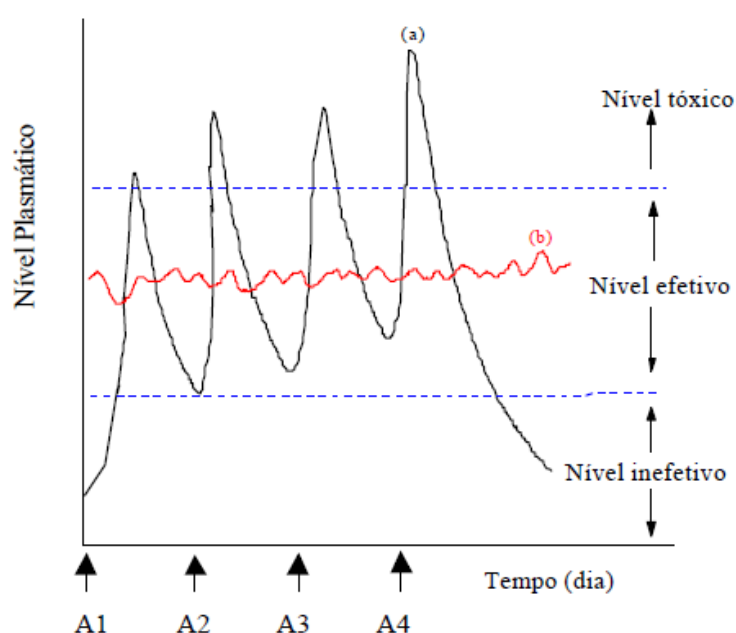


Figura 6 - Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrado por métodos convencionais de multidose (a) e sistema de liberação controlada (b).

Fonte: (LYRA et al., 2007)

O sistema de liberação retardada de fármacos é promissor em relação ao aumento da eficácia terapêutica da droga através da manutenção de níveis dos fármacos dentro da faixa terapêutica, diminuindo significativamente a toxicidade e reduzindo a necessidade de várias doses, em relação ao sistema convencional; isso leva conseqüentemente à melhor adaptação do paciente ao tratamento.

Nos últimos anos, esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de tecnologias ao sistema de liberação retardado de drogas. Materiais nanotubulares, vêm sendo extensamente estudados devido ao fato de possuírem uma grande

superfície para suportar a droga, em geral vem sendo utilizados para melhorar a entrega da droga no tecido alvo, reduzindo a toxicidade em relação as células (UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2018).

Uma variedade de polímeros (sintéticos e naturais), podem ser utilizados no desenvolvimento de um sistema de liberação retardada, tendo como condição não ser tóxicos e apresentarem uma boa biodisponibilidade, pelo menos nos tecidos que vão entrar em contato direto (YAO; WEBSTER, 2009).

4 MÉTODOS

4.1 Síntese Anódica dos Materiais

A síntese dos coatings de TiO_2 foi realizada usando dois tipos de substratos, o Ti_{cp} (T) e sua liga $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ (A) com 0,4 mm e 2,0 mm de espessura respectivamente. As placas foram limitadas a 15 mm x 10 mm, submetidas a um polimento com uma lixa de carbo de silício (1200 mesh) e em seguida lavadas com água destilada e secas em temperatura ambiente.

Para a anodização utilizou-se um sistema de anodização contendo uma fonte de tensão de 25 V (MPC303D), um multímetro (MD-6510) e uma célula eletrolítica (Figura 7). Como eletrodo de trabalho (anodo) foram utilizadas placas de Ti (Ti_{cp} e $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$) e um par de contra eletrodos de platina, todos dispostos paralelamente.

A síntese foi realizada em um reator de anodização com capacidade de 100 cm^3 , sem controle de temperatura e sem agitação do sistema. A solução eletrolítica utilizada foi adaptada da metodologia desenvolvida por (MACAK et al., 2007) e é constituída de etilenoglicol contendo 0,75% m/m de fluoreto de amônio (NH_4F), 9% v/v de água e 1% v/v de SBF (Tabela 2).

Tabela 2 - Formulação da solução de SBF

Reagentes	Quantidade
Água	750 mL
NaCl	7.996 g
NaHCO_3	0.350 g
KCl	0.224 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.228 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.305 g
1 kmol/ m^3 HCl	40 cm^3
CaCl_2	0.278 g
Na_2SO_4	0.071 g
$(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$	6.057 g
1 kmol/ m^3 HCl	Volume adequado
	Ajuste de pH

Fonte: (KOKUBO, 1991).

As sínteses foram realizadas em 1 e 2 h de anodização, com posterior tratamento térmico em mufla a 450 °C, usando uma rampa de aquecimento de 2 °C/min, permanecendo 2 horas nessa temperatura para a transição do óxido amorfo para sua fase cristalina anatase. As condições experimentais de síntese e as respectivas nomenclaturas utilizadas são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições experimentais de síntese

	Substrato	Tempo (horas)
T1	Titânio puro	1
T2	Titânio puro	2
A1	Liga de Titânio	1
A2	Liga de Titânio	2

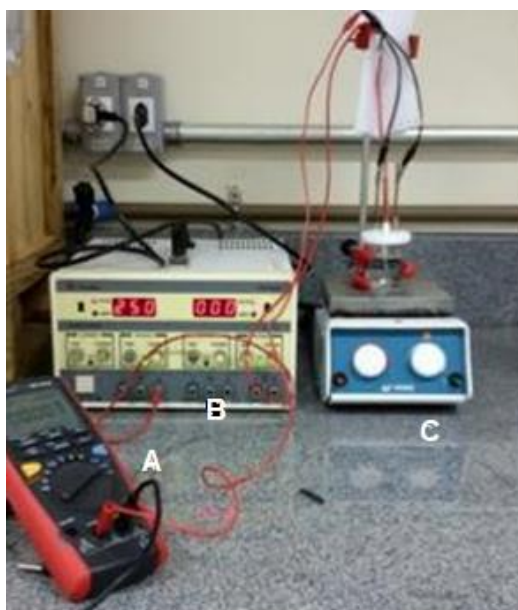


Figura 7 - Representação do sistema de anodização poteciostática de Titânio, onde A- Multímetro, B – Fonte de tensão constante (25 V), C – Cuba eletrolítica, síntese realizada sem controle de temperatura em aproximadamente 25 °C.

Fonte: **Própria**

4.2 Caracterização dos “coatings”

As propriedades do material foram caracterizadas por técnicas instrumentais. A morfologia da superfície foi analisada com o auxílio de Microscópio Eletrônico de Varredura (Quanta 650 FEG) com ampliações que varia de 5.000 a 100.000 x. As amostras foram analisadas antes da incorporação de fármaco e colágeno, onde foram medidos o diâmetro interno de quinze NTs pelo software ImageJ e posteriormente tratado estatisticamente com ANOVA e Tukey.

Para a análise estrutural, utilizou-se a técnica de Raio-X (DRX) (Rigazu, MiniFlex 600) operando entre os ângulos 20° a 80° (2 Theta) no modo de varredura contínua, com velocidade de 2° por minuto, radiação Cu $k\alpha = 1,5406 \text{ \AA}$, e potência de 40 kV e 150 mA. O tamanho do cristalito foi avaliado pela equação de Scherrer (SCHERRER, 1918) apresentada na equação 5, onde τ é o diâmetro médio do cristalito, K é uma constante que depende da forma das partículas, neste estudo foi usado o valor usual (0,9), λ é o comprimento de onda da radiação eletromagnética, B é a largura da metade da altura o pico de difração e θ é o ângulo de difração de Bragg.

$$\tau = \frac{K \cdot \lambda}{B \cdot \cos\theta} \quad (5)$$

4.3 Molhabilidade

A determinação da molhabilidade do material é definida pela capacidade de um líquido permanecer em uma superfície sólida. Para a determinação do ângulo de contato, a metodologia utilizada foi adaptada de (SABONIS; NAUJOKAITIS; ARLAUSKAS, 2015), onde mediu-se o ângulo de contato estático entre a superfície do TiO₂ e a superfície da gotícula de água usando o Medidor de Ângulo de Contato Hamé-hart 250 Standart (UFSCar). As medidas foram fotografadas com uma câmera

acoplada ao equipamento. As amostras foram iluminadas pelo lado de trás e um volume de 0,5 μL de água deionizada foi gotejado sobre a amostra, o ângulo de contato foi medido durante 60s logo depois que se coloca a gota na superfície, pois a camada nano porosa pode absorver parte do líquido. Após serem tiradas as fotos as imagens foram tratadas e os ângulos de contato foram medidos pelo software ImageJ e tratados estatisticamente por ANOVA.

4.4 INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

Neste estudo o Cloridrato Ciprofloxacino (CIPRO) foi utilizado como droga modelo. Para a incorporação do fármaco, utilizou-se a técnica de *top filling* (preenchimento dos NTs com fármaco com micropipetas), método de adsorção física adaptada da metodologia de (FENG et al., 2016). Um conjunto de 12 *coatings* foi subdividido em três conjuntos de quatro amostras, onde no conjunto 1 as amostras foram carregadas somente com o medicamento. No conjunto 2, as amostras foram carregadas com a droga e depois revestida com o colágeno. No terceiro conjunto as amostras foram carregadas por uma solução mista de colágeno e CIPRO, nas mesmas concentrações do conjunto 2 (MOHAN; ANANDAN; RAJENDRAN, 2016).

A solução de fármaco utilizada foi de CIPRO (10 g/L), onde foram pipetados em cima da superfície metálica 50 μL dessa solução em cada face do “*coating*”, totalizando 1 mg. Uma solução de colágeno 2 g/L com 2% m/v de ácido acético foi adicionada sobre os filmes incorporados com fármaco. Uma solução mista de CIPRO com colágeno também foi utilizada, onde foi dissolvido na solução de colágeno anteriormente preparado uma quantidade da droga para formar uma solução mista de 10g/L e colágeno. Após cada incorporação, os filmes foram submetidos a uma secagem em estufa a 30 °C com circulação de ar. Após a incorporação do fármaco e da camada de colágeno os *coatings* foram nomeados conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Matriz de planejamento das condições de preparação das amostras

Grupo	Amostras	Substrato	Tempo de Anodização (h)	Cobertura
1	T1D	T	1	Cipro
	T2D	T	2	
	A1D	A	1	
	A2D	A	2	
2	T1C	T	1	Cipro + Colágeno
	T2C	T	2	
	A1C	A	1	
	A2C	A	2	
3	T1S	T	1	Solução de Cipro + Colágeno
	T2S	T	2	
	A1S	A	1	
	A2S	A	2	

O estudo da liberação do ciprofloxacino foi realizada por imersão das amostras em 5 mL de água ultrapura (Mili-Q) mantidos a 37 °C em um banho termostático segundo a metodologia adaptada do Gulati (GULATI et al., 2016). Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas em tempos de 1, 4, 7, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 e 300 minutos, sendo substituídos por 0,5 mL de água ultrapura fresca para manter a condição sink (ABDOU, 1990; MARCOLONGO, 2003). As quantidades liberadas pelo fármaco foram investigadas usando espectroscopia ultravioleta-visível (Shimadzu, UV-1800) a 241 nm, diluindo as amostras em água ultrapura para seguir a lei de Lambert-Beer. A quantidade de droga liberada no tempo foi determinada a partir da curva de calibração do CIPRO. A massa de em cada tempo foi quantificada pela equação 6.

$$\Delta M(t) = M_5(t) - M_{0,5}(t) \quad (6)$$

Onde M_5 é a massa em 5 mL e $M_{0,5}$ a massa na alíquota de 0,5 mL. A Massa liberada pela matriz no tempo t ($M_t(t)$) pode ser calculada pela equação 7.

$$M_t(t) = M_5(t) - \Delta M(t - 1) \quad (7)$$

Sendo assim no tempo de 1 min a massa liberada das matrizes de nanotubos é igual a massa em $M_5(t=1)$, já para os outros tempo de ensaio de liberação, houve a retirada da alíquota para a determinação da massa e a adição de Água MiliQ fresca, variando a concentração de CIPRO. Assim, a massa de fármaco no tempo em questão é calculada pela eq. 7, onde pode ser vista como a diferença das massas calculadas para o tempo e a massa que ficou do tempo anterior.

Para a construção dos gráficos de ensio de liberação (massa acumulativa) é calculada através da equação 8.

$$M_a(t) = \sum_{t=1}^{\infty} M_t(t) \quad (8)$$

4.5 HALO DE INIBIÇÃO

As placas sintetizadas e incorporadas foram submetidas a testes com a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para o inóculo uma alçada de células ativas foi transferida para uma placa de BHI (Infusão cérebro e coração) e cultivadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 h. A concentração de inóculo foi padronizada com auxílio da escala de Mc Farland 0.5 (10^8 UFC/mL). Para a análise, 100 µL do microrganismo primeiramente padronizados e diluídos a 10^6 UFC/mL em meio BHI líquido foram dispersos na superfície da placa de Petri contendo ágar nutriente, com a ajuda de uma alça de Drigalski de vidro. Os *coatings* sintetizados foram colocados no centro da placa para a investigação da formação do halo de inibição. As placas de Petri ficaram incubadas por 18 h em uma temperatura de 36-37°C, após esse tempo foram realizadas as medidas dos halos de inibição com a ajuda do Software ImageJ, que serão expressos em mm.

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – MIC

A determinação de MIC foi investigada pela técnica de diluição em caldo Mueller-Hinton de acordo com o CLSI (Instituto de Padrões Clínico e Laboratorial) ((CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE), 2015; KRICHEN et al., 2015), com finalidade de determinar a concentração de droga já previamente caracterizada em ensaio de liberação, se são eficientes para a morte ou somente para inibição das células de *S. aureus*, utilizada como bactéria modelo.

O ensaio de microdiluição foi realizado em placas de Elisa, onde foram preenchidos os poços com 200 µL de Mueller-Hinton, 200 µL de solução antibiótica (cloridrato de ciprofloxacino) e 5 µL de bactérias (padronizadas por McFarland 10^8 UFC / mL. Para os controles foram preenchidos os poços com 200 µL de água salina (controle positivo) e 200 µL da solução de fármaco em grande concentração (controle negativo). As placas foram incubadas a 37 ° C por 20 horas. Após a incubação, foram reveladas adicionando 20 µL de solução de Resazurina (0,01% m / m) por 2h. Após esse período o aparecimento da cor vermelha é indicativo que o microorganismo não foi inibido, enquanto a cor azul indica morte ou inibição bacteriana. Uma fração da solução proveniente dos poços azuis foi inoculada em placas de Petri contendo ágar nutriente e incubadas a 37 ° C por 20 horas. Após a incubação, as placas foram avaliadas quanto ao crescimento de colônias de *S. aureus*. As placas que apresentaram o crescimento da bactéria provêm de uma concentração bacteriostática e as que não apresentam correspondem à uma concentração bactericida.

4.7 HEMÓLISE

Para ensaio de atividade hemolítica sangue de adultos saudáveis voluntários, foram coletados em laboratório de análises clínicas (Biocenter) na cidade de Pato Branco – PR em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). O sangue coletado foi transportado a Universidade Tecnológica Federal do Paraná sob refrigeração e seguidamente centrifugados a 6 °C em 4000 RPM (Rotações por

minutos) durante 10 minutos, para a separação dos eritrócitos (precipitado) e plasma, sendo o último descartado.

Para o ensaio de hemólise foi seguida a metodologia de (BULMUS et al., 2003). Para tanto, os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina (150 mM), sendo centrifugados a cada lavagem. Após a lavagem final, foram ressuspensos a 10% m/v de sua concentração original em tampão fosfato de potássio 100 mM (PB) (Tampão fosfato), produzindo uma solução de 10^8 de eritócitos.

Em tubos Falcon de 15 mL, foram adicionados 2,4 mL de PB, 0,6 mL da solução de eritrócito e a as amostras anodizadas, seguidamente incubadas a 37°C por 1h. Após a incubação, os tubos foram centrifugados seguindo a metodologia citada acima. As membranas de eritrócitos que são rompidas liberam a hemoglobina para a solução, tornando o sobrenadante vermelho. O sobrenadante é então coletado para leitura de absorvância em 541 nm, comprimento de onda característico da hemoglobina. Soluções Triton-X (1% m/m) (positivo) e PB (negativo) foram usados como controles. A atividade hemolítica pode ser calculada pela equação 9 abaixo, seguindo a metodologia de (PALANIVELU; RUBAN KUMAR, 2014). Este estudo foi realizado de acordo com os padrões éticos do comitê de ética local (processo número 02153418.2.0000.5547).

$$\% \text{ Hemolise} = \frac{\text{Absorbancia para a amostra}}{\text{Absorbancia para o controle positivo}} \times 100\% \quad (9)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Pesquisas constantes na busca por materiais que possibilitem a substituição óssea são de grande importância para profissionais da área da saúde. O titânio como elemento metálico vem sendo utilizado para inclusão no corpo humano devido sua capacidade em resistir à corrosão, sua excelente resistência mecânica, estabilidade química e biocompatibilidade (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005). É o metal mais usado em implantes.

Com a evolução dos estudos em implantes, não basta o titânio ser apenas um material inerte, mas sua superfície deve proporcionar ao organismo um resultado que acelere o processo regenerativo do tecido ósseo. A modificação da superfície para formação de nanotubos de TiO_2 em substratos de Titânio surge como opção por ser fácil de se sintetizar e ser um material inerte, permitindo então o armazenamento de fármacos como antibióticos que serão liberados gradativamente no exato local onde são necessários.

5.1 Crescimento Eletroquímico de Nanotubos de Titânio

Para indução da formação das nanoestruturas, o Ti_{cp} e sua liga $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ foram submetidos a uma anodização potencioestática, permitindo assim a texturização dos substratos de maneira que induza mimetização da estrutura porosa óssea humana, a nanotexturização tem como objetivo aumentar a bioatividade do material, permitindo assim uma melhor osseointegração do material no corpo humano.

A oxidação eletroquímica de metais como o Titânio, pode ser acompanhada pelas curvas cronoamperométricas, que são obtidas através do processo de anodização e podem ser observadas na Figura 8, onde é apresentada para ambos os substratos (T e A).

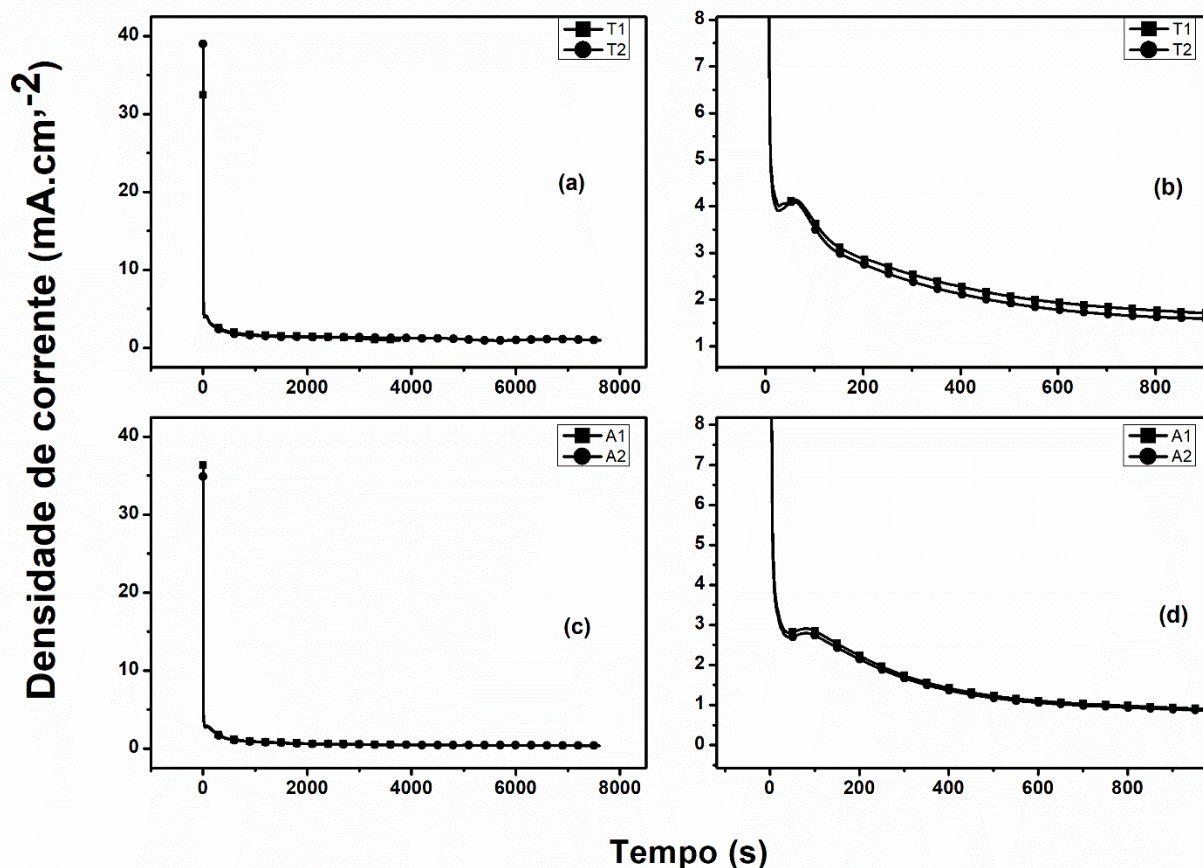


Figura 8 -Curvas de densidade de corrente (mA cm⁻²) versus tempo (s) para amostras anodizadas de acordo com a Tabela 1 (25 V, sem agitação a temperatura ambiente 25 °C) onde (a) T1 e T2 , (b) T1 e T2 com uma aproximação na região da nucleação, (c) A1 e A2 e (d) A1 e A2 com uma aproximação na região da nucleação, todas as amostras sintetizadas em 1 e 2h respectivamente.

Fonte: Própria

O comportamento obtido para as amostras mostradas na Figura 8 segue o padrão encontrado na literatura. Como pode-se notar, as curvas de ambos os substratos para os dois tempos distintos são muito semelhantes. Ela pode ser dividida em três regiões. Na primeira região acontece uma queda abrupta de densidade de corrente, chegando até a um patamar mínimo, isso se dá devido ao aumento gradual da resistência oferecida pelo óxido que atua como barreira para a passagem de elétrons. Na região 2, à medida que o crescimento de óxido pelo transporte iônico se torna difícil, ocorre a nucleação dos nanotubos (abertura de canais). Nucleação fornece menos vias resistivas para a corrente e aumenta a área de superfície do óxido. A presença de fluoreto no meio eletrolítico promove a

dissolução do óxido através da formação do complexo $[\text{TiF}_6]^{-2}$. Na região 3, as reações de formação e dissolução atingiram um estado estacionário que corresponde ao crescimento vertical da estrutura nanotubular (MACAK; TSUCHIYA; SCHMUKI, 2005; REGONINI et al., 2013).

Nas inserções da Figura 8, pode-se notar que a nucleação dos nanotubos ocorre em valores de corrente mais altos para o substrato de titânio do que para a liga. No entanto, ambos os substratos têm um perfil anódico semelhante no eletrólito utilizado. A superfície de revestimento pode desempenhar um papel importante no mecanismo de osseointegração entre o implante e o corpo humano. Nesse sentido, o estudo de suas propriedades estruturais como morfologia, microestrutura e ângulo de contato é de extrema importância para avaliar seu desempenho como biomaterial.

5.2 Caracterização dos “*coatings*”

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A caracterização da superfície do substrato metálico, resultou em uma morfologia típica de NTs homogêneos e perpendicularmente alinhados para ambos os substratos (Fig. 9), indicando um tratamento eficiente para todas as amostras. Através das imagens de MEV, os *coatings* sintetizados em diferentes substratos, apresentam alterações na sua morfologia quanto ao tamanho do diâmetro interno dos NTs (dados apresentados na Tabela 5). As amostras sintetizadas em substrato de Ticp (Titânio puro) apresentam diâmetro interno de aproximadamente 64 e 66 nm para as amostras sintetizadas a 1 e 2 horas respectivamente. Já para as amostras sintetizadas no substrato $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ apresentando o diâmetro interno de aproximadamente 54 e 56 nm para os sintetizados em 1 e 2 horas respectivamente.

A Análise ANOVA do diâmetro interno dos nanotubos mostra que não há variação significativa neste parâmetro à medida que o tempo de anodização aumenta de 1 para 2 horas, para ambos os substratos. No entanto, uma variação

significativa deste parâmetro é observada quando o substrato metálico é alterado. Os nanotubos crescidos a partir da liga (A) são cerca de 10 nm menores em diâmetro do que os nanotubos crescidos a partir de titânio (T).

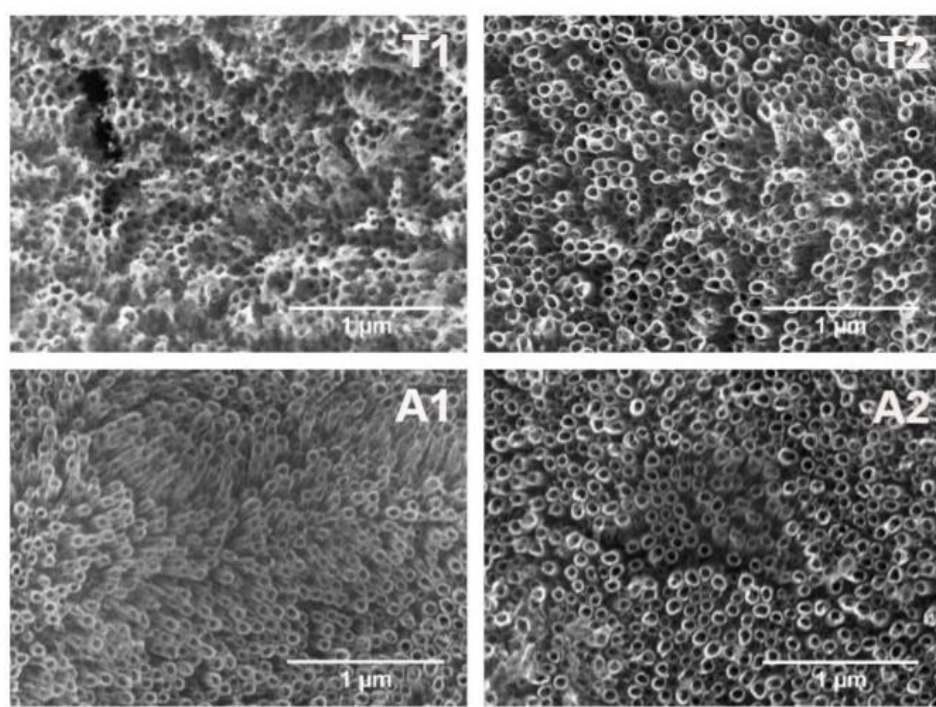


Figura 9 - Imagem dos MEV referentes às amostras tratadas térmicamente a 450 °C, apresentadas na Tabela 2

Fonte: Própria

Segundo Kulkarni e colaboradores os revestimentos de nanotubos com diâmetros internos menores que 100 nm são mais eficazes na adesão celular e apresentam melhor osseointegração, portanto os resultados aqui apresentados apontam para materiais com grande potencial de adesão celular (KULKARNI et al., 2017).

A morfologia dos revestimentos obtidos a partir de A apresenta uma melhor organização de NTs quando comparada à morfologia dos filmes obtidos a partir de T. Isso ocorre porque a composição heterogênea da liga favorece um melhor crescimento das nanoestruturas devido aos $\alpha+\beta$ estabilizadores (MOHAMMED; KHAN; SIDDIQUEE, 2014).

Em relação ao comprimento dos NTs, pode ser medido utilizando o software ImageJ, onde através da vista lateral dos NTs devido ao rompimento da amostra T1 (Fig. 10) pode ser estudada e apresentou um comprimento de aproximadamente 4 μm , essa espessura do óxido se dá na Região 3 apresentada na Fig 9, onde no regime estacionário acontece o crescimento no comprimento dos NTs.

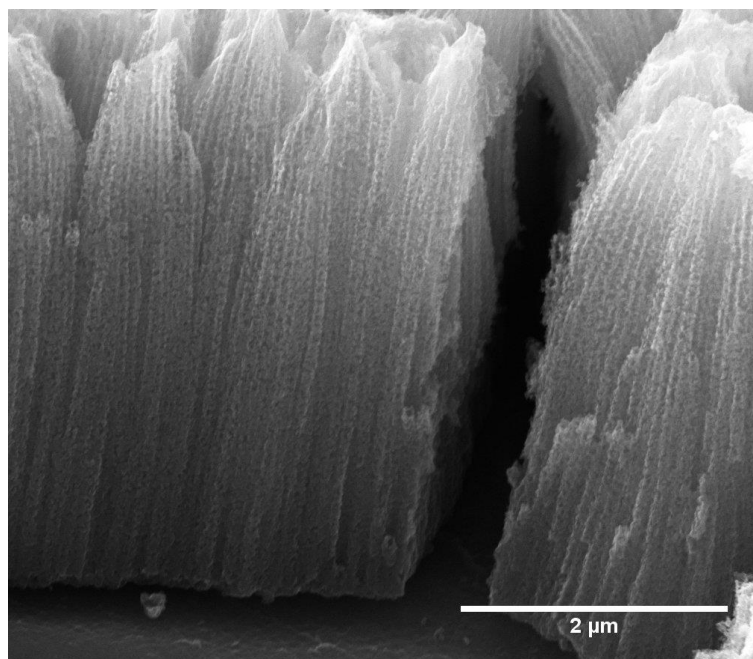


Figura 10 - Imagens de MEV da vista Lateral dos NTs na Amostra T1

Fonte: Própria

Tabela 5 - Parâmetros extraídos do processamento de dados. Diâmetro interno de nanotubos obtido por análise de imagem (15 NTs), ângulo de contato e tamanho de cristalito obtido por análise de DRX usando a equação de Scherrer.

	Diâmetro Interno (nm)	Ângulo de Contato (°)	Tamanho de Cristalito (nm)
T1	64.80 ± 1.65 ^a	47.9 ± 0,06 ^c	18
T2	66.13 ± 0.12 ^a	87.5 ± 0,09 ^a	27
A1	54.63 ± 2.03 ^b	41.2 ± 0,06 ^d	23
A2	56.53 ± 1.59 ^b	83.1 ± 0,07 ^b	19

*Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$), Tukey e Anova.

A infecção persistente e crônica é uma das complicações mais comuns e graves associadas ao implante biomédico. Certas dimensões e cristalinidade podem ser úteis para prevenir a adesão de bactérias e promover a formação óssea. O recozimento térmico diminuiu o número de bactérias aderidas à superfície do Ti. Pode ser em parte porque o tratamento térmico remove o teor de flúor, que tem uma tendência para atrair bactérias. Puckett e colaboradores indicam que os nanotubos com diâmetro de 60 ou 80 nm diminuem o número de bactérias vivas em comparação com os nanotubos de menor diâmetro (PUCKETT et al., 2010).

Todas as amostras apresentaram óxido sem estrutura cristalina definida (amorfo), sendo assim necessário as amostras serem submetidas ao tratamento térmico para a conversão do óxido amorfo para a fase cristalina Anatase.

5.2.2 Tratamento térmico e DRX

Com o aumento da procura de próteses na área médica e ortodôntica, e a necessidade de uma recuperação mais rápida, faz-se necessário que as superfícies dos metais sejam preparadas para que ocorra uma melhor osseointegração. Os implantes precisam influenciar na formação de uma matriz óssea interfacial, com propriedades e estruturas que mimetizam a matriz óssea humana.

A Figura 11 mostra os padrões de DRX para as amostras apresentadas na Tabela 3 após o tratamento térmico. A análise mostra que todas as condições de síntese geram um padrão de DRX bem definido, caracterizado por picos de difração nítidos e estreitos, todos combinando bem com a Base de Dados de Estrutura de Cristais Inorgânicos (ICSD) similar. Os padrões de DRX mostram o titânio hexagonal ICSD # 00-005-0682 e TiO_2 tetragonal (anatase) ICSD # 01-071-1167. Este último sendo facilmente caracterizado pelo pico (101) a $24,2^\circ$.

Aplicando a equação de Scherrer e a largura total até a largura de meia altura (FWHM) do pico (101) da fase anatase, foram calculados os tamanhos de cristalitos na faixa de 18 - 27 nm como está apresentado na Tabela 5. Para revestimentos crescidos a partir de titânio, o aumento do tempo na anodização promoveu um aumento no tamanho do cristalito. No entanto, para revestimentos crescidos a partir

da liga, o aumento do tempo de anodização promoveu uma pequena diminuição no tamanho dos cristais.

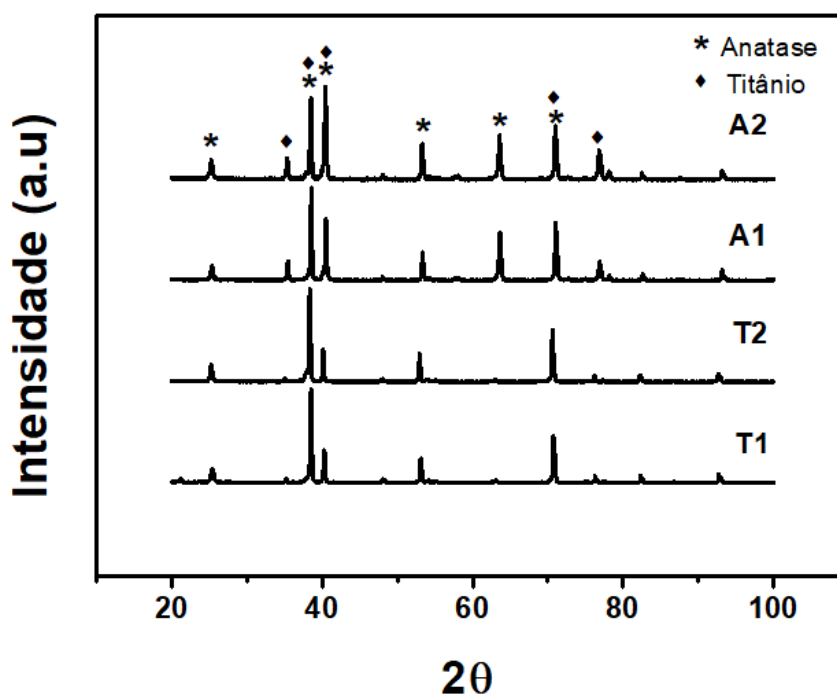


Figura 11 -Padrões de DRX para amostras preparadas de acordo com a Tabela 2. As fases são indexadas como (♦) titânio (ICSD # 00-005-0682) e (*) anatase (ICSD # 01-071-1167).

Fonte: Própria

Os parâmetros estruturais apresentados, como o diâmetro interno dos nanotubos e o tamanho do cristalito, reflete diretamente nas características da superfície do revestimento.

5.2.3 Molhabilidade

Quanto a molhabilidade do material, essa medida se refere a facilidade que um fluido tem em aderir ou se espalhar em uma superfície sólida. Esse fenômeno é dado por três diferentes forças que atuam entre o material e o líquido em questão, as forças de tensão superficial do líquido/sólido, as de tensão superficial do sólido e as de tensão interfacial (MENZIES; JONES, 2010).

Os parâmetros estruturais apresentados, como o diâmetro interno dos nanotubos e o tamanho do cristalito, podem refletir diretamente nas características da superfície do revestimento. Nesse sentido, o ângulo de contato de cada amostra foi medido com água e os resultados também são apresentados na Tabela 5.

Os resultados apresentados mostram mudanças significativas na molhabilidade do material, em função da alteração do ângulo de contato formado entre H₂O/Superfície dos materiais sintetizados, apresentado na Figura 12. Observa-se que há um aumento do ângulo de contato com o tempo de anodização, o que indica a diminuição da molhabilidade.

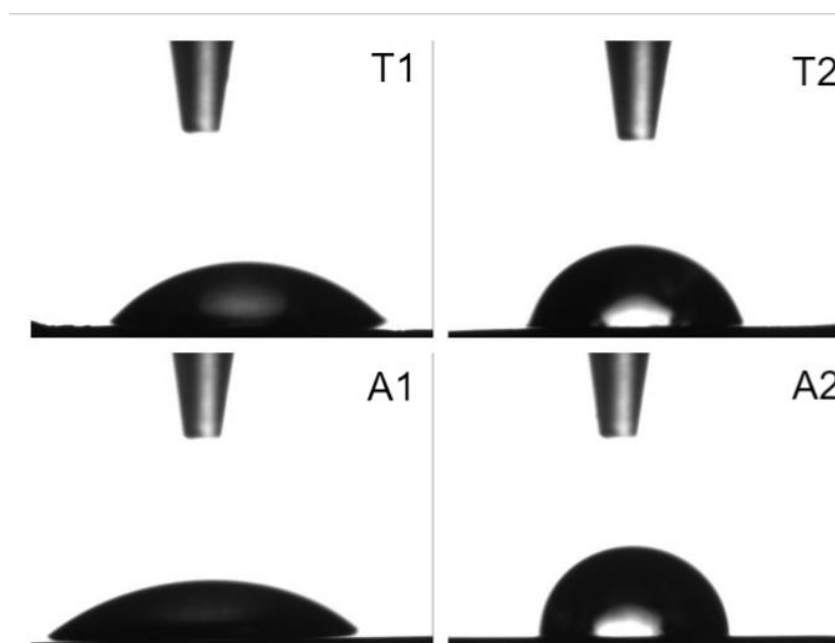


Figura 12 - Ângulo de Contato das amostras referente a Tabela 2

Fonte: Própria

Para filmes desenvolvidos a partir da liga, o ângulo de contato praticamente dobra com o aumento do tempo de anodização de 41,2° para 83,1°, para as amostras sintetizadas em 1h e 2h respectivamente, passando de um material maior molhabilidade para um material de menor molhabilidade apenas com a alteração do tempo de síntese. Referindo-se ao titânio puro, o material também muda de maior molhabilidade para menor molhabilidade, e quase aumentando em duas vezes o tamanho do cristalito em relação ao tempo de anodização.

5.3 LIBERAÇÃO DA DROGA

A presença de nanoestruturas aumentam significativamente a área superficial do material (MACAK et al., 2007), devido a isso o estudo da incorporação de drogas nas nanoestrutura para a entrega direcionada do agente terapêutico no local específico vem sendo bastante estudada (UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2018).

Para o estudo de liberação do fármaco foi considerada a massa acumulativa do CIPRO para todas as amostras como apresentadas na Tabela 4. A Figura 13, apresenta a massa acumulativa de CIPRO liberada a partir das matrizes de TiNTs. Observa-se que em todos os gráficos a massa acumulativa da droga liberada aumenta ao longo do tempo de imersão, como era esperado.

Através do ensaio de liberação observou-se que as amostras (T1D, T2D, A1D, A2D, T1S, T2S, A1S e A2S) apresentaram uma liberação de no máximo 20 min. Com isso se observa que o uso de uma solução mista contendo fármaco e colágeno não foi favorável para diminuir o tempo de liberação do fármaco para nenhuma das condições de síntese.

Aplicando o tratamento estatístico da ANOVA e Tukey, todas as amostras no conjunto 3 são estatisticamente equivalentes às amostras do conjunto 1, onde apenas o fármaco foi adicionado. Este resultado pode indicar que a tensão superficial da solução pode causar dificuldade na entrada desta solução dentro das nanoestruturas. Assim, a solução permanece concentrada apenas na região da superfície do revestimento, subutilizando a grande área de superfície disponível para o carregamento de drogas.

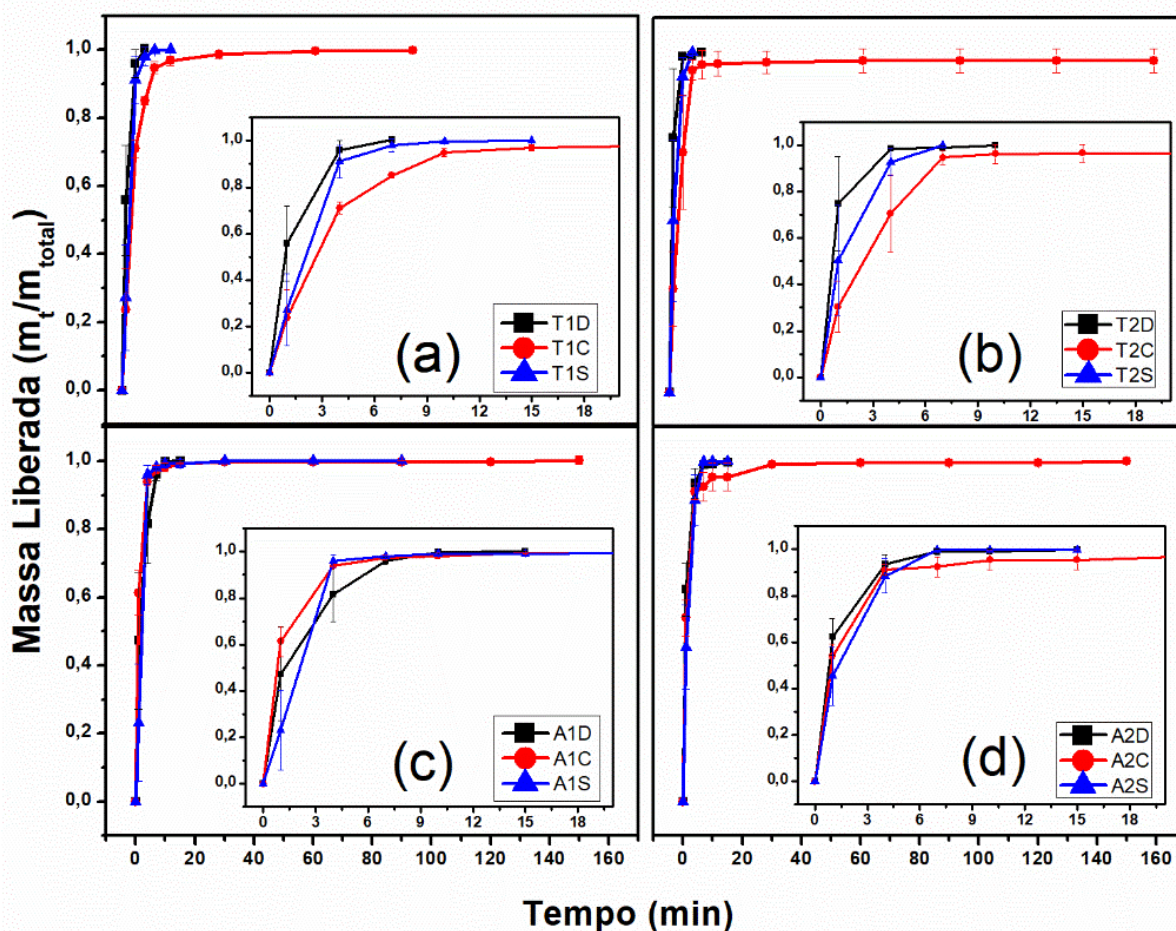


Figura 13 - Massa cumulativa de cloridrato de ciprofloxacino liberadas das amostras de TiNTs preparadas de acordo com a Tabela 3, (a) T1, (b) T2, (c) A1, (d) A2

Fonte: Própria

O teste de Tukey mostrou que as amostras que tiveram os maiores tempos de liberação foram as amostras preparadas a partir da liga. Analisando os dados estruturais das amostras, pode-se observar que a maior variação entre os revestimentos crescidos a partir do titânio e da liga é o diâmetro interno dos nanotubos. Como já discutido, as nanoestruturas formadas a partir da liga apresentam uma maior auto-organização, o que dá a esses revestimentos uma área de superfície maior, sendo isso uma característica interessante para o uso de revestimentos como reservatório de drogas.

Com a mudança da cobertura, filmes que foram carregados de fármaco e recobertos com a uma fina camada de colágeno (conjunto 2), retardaram a liberação de CIPRO, passando então 60 e 75 min para as amostras de T2C e T1C, e 150 e

135 min para A2C e A1C respectivamente, isso se deu devido a melhor auto-organização dos TiNTs na superfície da liga. Sendo assim, a relação de liberação retardada da droga Cloridrato de Ciprofloxacino foi encontrada na superfície das amostras onde foram incorporadas com a fina camada de colágeno e não havendo diferença estatística para as amostras sintetizadas em diferentes tempos e sim, para os diferentes substratos, aumentando o tempo para o substrato Ti₆Al₄V.

Sinn e colaboradores, mostraram que a transferência de massa em materiais revestidos com uma fina camada de nanotubos carregado com fármaco é descrito pelo mecanismo de difusão (SINN AW; KURIAN; LOSIC, 2014), sendo influenciada pelo diâmetro interno do nanotubos, interação fármaco-implante, tamanho molecular da droga entre outros.

Para o estudo do mecanismo de liberação dos diferentes recobrimentos de colágeno nas nanoestruturas um modelo cinético que se adequava aos dados experimentais foi estudado. O modelo de Korsmeyer–Peppas, Eq. 10 (SINN AW; KURIAN; LOSIC, 2014)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (10)$$

Onde, M_t/M_∞ é a liberação acumulativa da droga no tempo pelo tempo infinito, k é a constante cinética da liberação e n é o expoente de liberação determinado a partir dos gráficos de liberação.

O método cinético foi utilizado para verificar o tipo de liberação ocorrido em cada amostra e apresentados na Tabela 6, onde o expoente difusional (n) e a constante de liberação (k) são apresentados. Todas as amostras apresentaram valores de expoente difusional entre 0,02 e 0,3, segundo Ritger e Peppas, quando o valor do expoente n está entre esses valores, o mecanismo é considerado difusão Fickiana, valores entre $0,43 < n < 0,85$ são considerados não-Fickianos e valores de $n = 0,85$ são tomados como transporte de caso II (característica constante de relaxamento) (PHILIP L. RITGER, 1987; UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2018).

O valor de k indica a taxa de liberação de fármacos dentro das matrizes de TiNTs, onde valores maiores que k indicam uma liberação mais rápida, e valores

menores, uma liberação mais lenta (Holzapfel et al., 2012). A análise do tempo de liberação e da constante cinética de liberação sugere que a liberação da droga provavelmente ocorra por um mecanismo misto. A análise linear da curva, onde ocorre a liberação rápida da droga, segue uma cinética de Fick. No entanto, após essa fase, o CIPRO continua a ser liberado, mas a uma taxa muito menor.

Tabela 6 - Parâmetros obtidos a partir da adequação de dados experimentais ao modelo de Korsmeyer–Peppas, tempo de liberação e halo de inibição com os devidos tratamentos estatísticos

Amostra	Halo de Inibição	Tempo de Liberação (min)	<i>k</i> (min⁻¹)	<i>n</i>
T1D	16,187 ± 0,65 ^a	7,000 ^c	0,898173	0,0511
T2D	15,340 ± 1,21 ^a	12,50 ^c	0,885989	0,1910
A1D	15,763 ± 0,45 ^a	8,500 ^c	0,601457	0,2069
A2D	14,930 ± 1,30 ^a	11,00 ^c	0,854969	0,0681
T1C	16,316 ± 0,76 ^a	75,00 ^b	0,459323	0,3575
T2C	16,110 ± 1,24 ^a	60,00 ^b	0,334590	0,1910
A1C	14,583 ± 0,32 ^a	135,00 ^a	0,879634	0,0509
A2C	15,405 ± 0,53 ^a	150,00 ^a	0,849991	0,0476
T1S	12,952 ± 0,69 ^a	11,00 ^c	0,793747	0,1028
T2S	12,950 ± 0,13 ^a	7,000 ^c	0,828482	0,0867
A1S	15,142 ± 0,39 ^a	20,00 ^c	0,914077	0,0361
A2S	14,170 ± 2,30 ^a	11,00 ^c	0,740440	0,1378

De acordo com a Tabela 6, o filme com a menor constante cinética é o filme T1C, em tese, este seria o filme que apresentaria o melhor resultado para a liberação do fármaco. No entanto, o tempo total de liberação para essa condição foi de 75 min, metade do tempo de liberação da amostra A2C, que teve uma taxa de liberação inicial maior. Estes resultados sugerem que, embora uma grande quantidade seja facilmente liberada dos revestimentos no momento inicial do ensaio, quando o diâmetro interno dos nanotubos é menor, uma certa quantidade é retida devido à interação do fármaco com a superfície do óxido e / ou devido a um efeito sinérgico entre o óxido, o colágeno e a droga.

Em geral pode-se notar que as amostras do conjunto 2 apresentaram um tempo de liberação em média quase dez vezes maior em relação as amostras do conjunto 1 e 3, isso se dá pela interação fármaco/colágeno com as estruturas morfológicas do material. Isso se dá em função do tempo que o colágeno tem para dissolver no meio até expor a superfície de TiNTs.

5.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Um grande problema encontrado durante a realização de procedimentos cirúrgicos onde há a implantação de materiais ou durante o pós-operatórios, são as infecções causadas por microrganismos naturais do paciente ou até mesmo do local no qual é realizado o procedimento cirúrgico (LIMA; OLIVEIRA, 2010). Materiais a base de TiNTs também possuem um grande potencial para a diminuição de biofilme microbiano, reduzindo a propagação de infecções e doenças principalmente com a utilização de fármaco em sua matriz.

Nessa secção serão estudadas as atividades biológicas do material frente a bactéria *S. aureus*, a concentração mínima inibitória do fármaco utilizado e a atividade hemolítica do material diante da melhor condição de trabalho.

5.4.1 Halo de Inibição

Os resultados da atividade antimicrobiana foram avaliados pelo teste de difusão em Agar, também chamado de halo de inibição (Figura 14). Os resultados da análise de halo de inibição foram analisados pela aferição do diâmetro de inibição do microorganismo e tratados estatisticamente pela ANOVA e Tukey.

A análise estatística dos halos de inibição pelos testes de ANOVA e Tukey mostram que todas as amostras possuem diâmetros de difusão estatisticamente iguais, como pode ser observada na Fig. 14 e apresentados na Tabela 6. Considerando que existem amostras que liberam 100% de massa em 7 min e amostras que liberam até 165 min, esta insignificância estatística é provavelmente

devido ao tempo (18 h) em que as amostras permaneceram em contato com o meio semi-sólido. Um tempo muito mais longo que o tempo total de liberação total da droga.

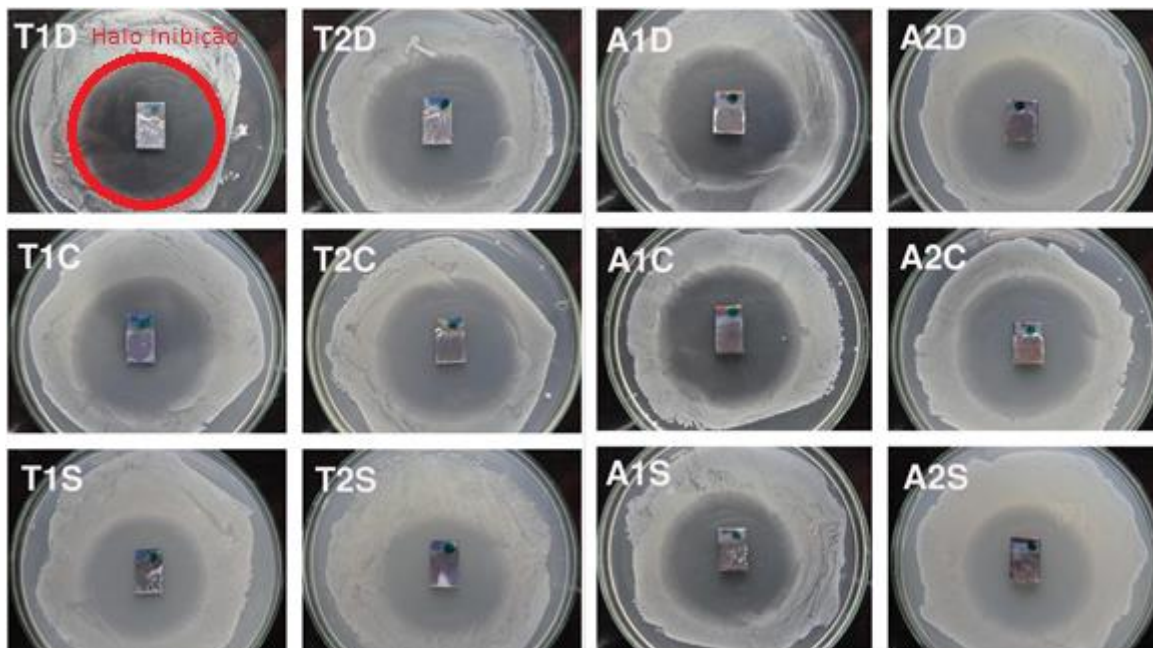


Figura 14 - Placas de Petri mostrando o halo de inibição de *S aureus* promovido pelas amostras sintetizadas de acordo com a Tabela 3

Fonte: Própria

Neste sentido, pode-se concluir que, para a inibição do crescimento de bactérias na região onde o implante é posicionado, todas as condições de síntese mostraram-se eficazes, sendo uma característica importante no desenvolvimento de implantes ósseos, pois estes materiais sintetizados em diferentes tempos e posteriormente recobertos podem impedir a adesão de bactérias, evitando a formação de biofilmes que levam à rejeição do implante (FENG et al., 2016).

5.4.2 Concentração Mínima Inibitória- MIC

A fim de verificar se a quantidade de fármaco liberada pelo material era eficaz e não tóxica para o organismo, obteve-se a Concentração Mínima Inibitória (MIC) e comparou-se com o valor regulado pela ANVISA (1 mg.mL^{-1} para CIPRO) (BAYER,

200AD) (tabela 7). Para todas as condições, a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* estava na faixa bacteriostática ($0,14 \text{ mg.mL}^{-1}$), como pode ser visto na Figura 15.

Tabela 7 - MIC para *S. aureus*

Controle negativo 25	++
mg.mL⁻¹	
5 mg.mL⁻¹	++
4 mg.mL⁻¹	++
3 mg.mL⁻¹	++
2 mg.mL⁻¹	++
1 mg.mL⁻¹	++
0.5 mg.mL⁻¹	++
0.2 mg.mL⁻¹	+
$1.10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$	+
$1.10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$	+
$5.10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$	+
$1.10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$	-
$5.10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$	-
Controle positivo	-
(salina)	

++ Bactericida, + Bacteriostática, - microorganismos não inibidos

Como pode ser visto no perfil de liberação no momento inicial, uma alta quantidade da droga é liberada, no entanto, a concentração ainda está na banda bacteriostática e não é tóxico para o corpo humano. Até o final da liberação, mesmo com a diminuição da concentração local do fármaco, o dispositivo ainda exibe atividade bacteriostática, inibindo o crescimento de células bacterianas na superfície do implante.

Os resultados encontrados nos ensaios de atividade antimicrobiana do microorganismo *S. aureus* foi de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (limite bactericida) valor inferior ao encontrado na literatura.

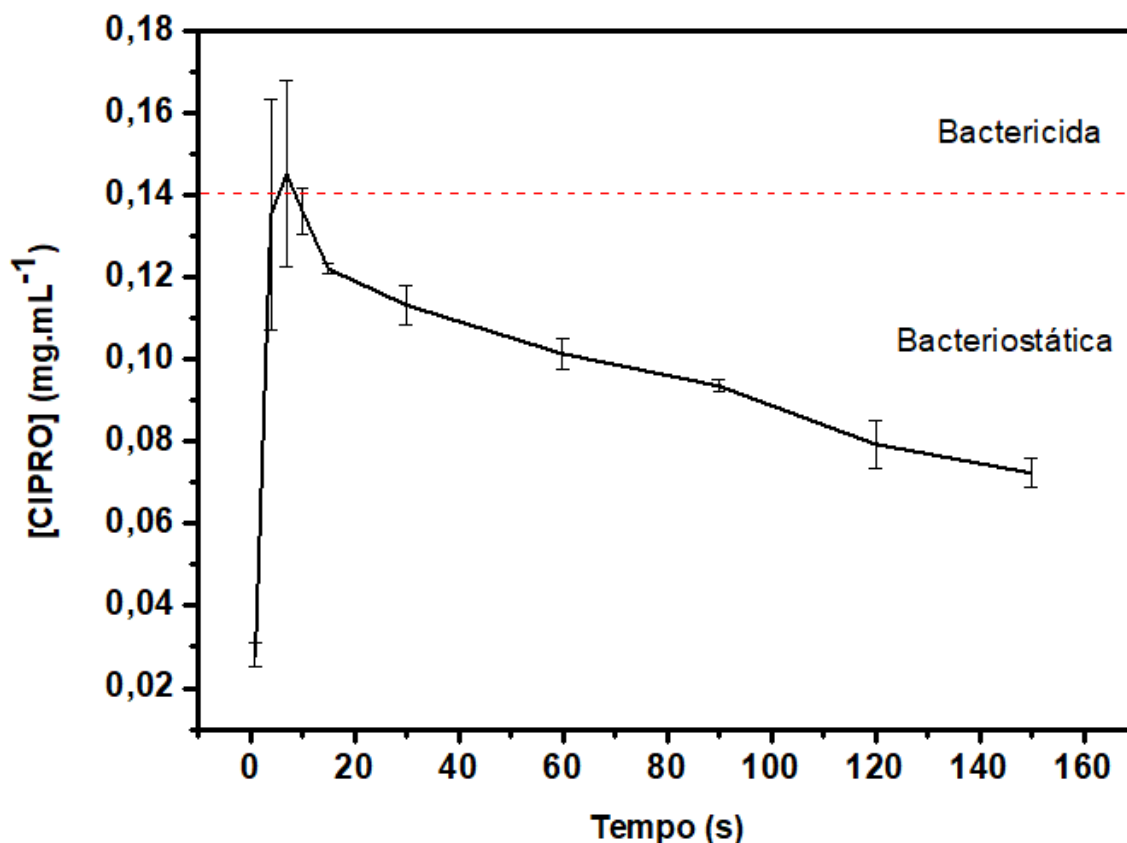


Figura 15 - Concentração local de Ciprofloxacina liberada da amostra T1C em função do tempo. As linhas horizontais delimitam as zonas não inibitórias e inibitórias (bacteriostáticas e bactericidas)

Fonte: Própria

5.4.3 Atividade Hemolítica

Analisando os resultados anteriores, como o tempo de anodização não se mostrou relevante no aumento do tempo de liberação de fármaco as condições escolhidas para o ensaio de atividade hemolítica foram as sintetizadas em 1h. A atividade hemolítica foi estudada para verificar a toxicidade de ambos os substratos (T e A) utilizados como referência, bem como as amostras sintetizadas neste estudo.

A Fig. 16, apresenta a atividade hemolítica das amostras e dos controles. Como pode-se notar (incluindo metais de referência) para todas as condições, a lise é menor que 6% dos eritrócitos. Este é um resultado interessante porque a fase anatase encontrada nos materiais sintetizados pode não ser inerte às células sanguíneas (ZITTING; SKYTTÄ, 1979). Todas as amostras apresentaram baixo

percentual de hemólise, sendo estatisticamente semelhantes ao controle negativo (PB). A única exceção observada foi a amostra T1S que apresentou pequena atividade hemolítica.

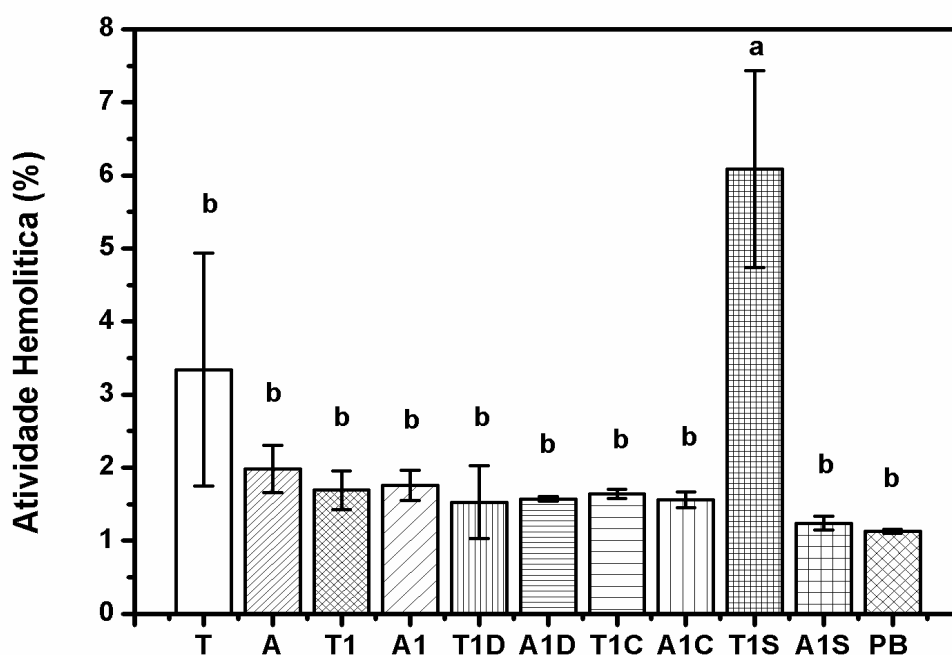


Figura 16 - Atividade hemolítica das amostras obtidas de acordo com a Tabela 2, comparada com os substratos metálicos, com o controle negativo (PB) e o controle positivo (Triton-X). As letras no topo das barras referem-se à análise ANOVA. Amostras que compartilha.

Fonte: Própria

As amostras estudadas foram tratadas estatisticamente onde apresentaram três grupos, a que ocorreu então uma maior porcentagem de rompimento das células (T1S) sanguíneas aproximadamente 6 % das células sofreram a hemólise com a amostra, o controle positivo Triton com 98,54% de hemólise e o terceiro grupo (todas as outras amostras) onde uma pequena porcentagem de células sanguíneas sofreram a lise aproximadamente de 1,5 %, como pode ser observado na figura 17.

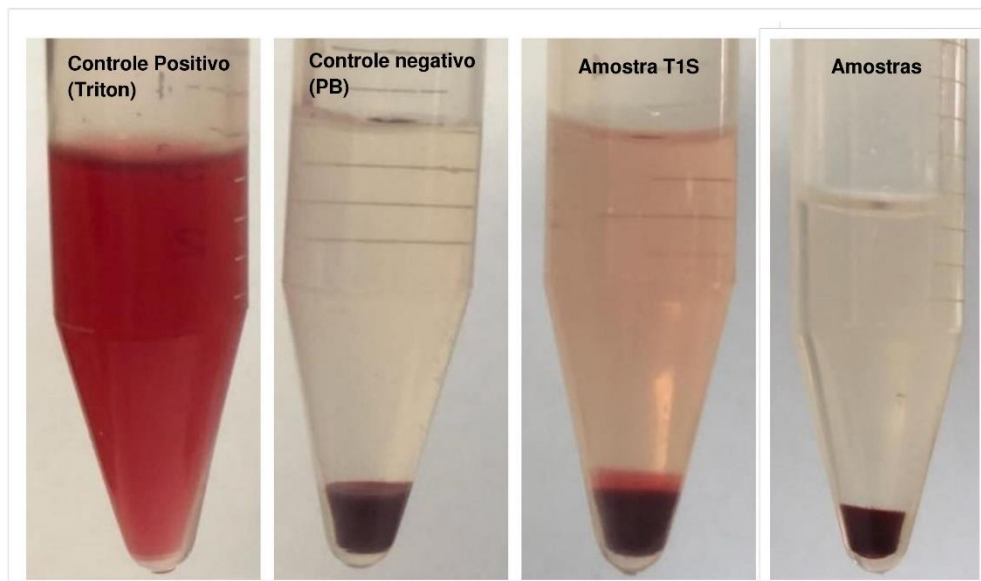


Figura 17 - Imagem ilustrativa dos controles e das amostras que ocorreram e não ocorreram a lise dos eritrócitos.

Fonte: Própria

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostram que o tempo de anodização influencia as propriedades estruturais dos nanotubos obtidos, havendo uma mudança significativa na molhabilidade do revestimento, passando de uma maior molhabilidade para uma menor molhabilidade com o aumento do ângulo nos filmes sintetizados com um maior tempo, tanto para o titânio puro como para a liga. Observou-se que os revestimentos anodizados no substrato Ticp apresentaram um diâmetro interno de 10 nm maior do que aqueles preparados no substrato Ti_6Al_4V . Os resultados do ensaio de liberação do fármaco não mostraram diferença estatística no tempo de liberação entre os filmes sintetizados em 1 e 2 h. Entretanto, a cobertura do revestimento com uma fina camada de colágeno apresentou melhores resultados, suportando tempos mais longos de liberação do fármaco. Os filmes que foram revestidos com a solução mista de CIPRO e colágeno ficaram estatisticamente iguais aos que foram incorporados somente o fármaco, isso ocorre devido a interação fármaco/ colágeno.

Nos ensaios biológicos, o disco de difusão confirmou que não houve crescimento de *S. aureus* próximo ao revestimento. Este resultado indica que a carga de droga dentro dos revestimentos dificulta a formação do biofilme na superfície do metal, desfavorecendo a rejeição dos implantes no interior do corpo humano. Finalmente, a atividade hemolítica não mostrou toxicidade para as células do sangue, o que indica que esta metodologia poderia ser aplicada para o desenvolvimento de novos biomateriais.

REFERÊNCIAS

(CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Approved Standard-Tenth Edition. CLSI document M07-A10.**, v. 35, n. 2, p. 1–87, 2015.

ABDOU, H. M. Dissolution, bioavailability and bioequivalence. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n. 1, p. 185–186, 1990.

AZEVEDO, R. F. C. Microestrutura do titânio e suas ligas para implantes cirúrgicos. **Metalurgia e Materiais**, p. 445 e 446, 2003.

BAUER, S. et al. Progress in Materials Science Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces. **Progress in Materials Science**, v. 58, n. 3, p. 261–326, 2013.

BAYER. **Cipro**. [s.l: s.n.].

BULMUS, V. et al. A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane-disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 93, n. 2, p. 105–120, 2003.

CAZEDEY, E. C. L. **ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE CLORIDRATO ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE CLORIDRATO**. [s.l: s.n.].

CHARNLEY, J. ANCHORAGE OF THE THE FEMORAL PROSTHESIS. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 42B, p. 28–30, 1960.

CHEN, K. et al. Biomaterials Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. **Biomaterials**, v. 30, n. 9, p. 1682–1688, 2009.

FENG, W. et al. Controlled release behaviour and antibacterial effects of antibiotic-loaded titania nanotubes. **Materials Science & Engineering C**, v. 62, p. 105–112, 2016.

GONGADZE, E. et al. Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant

surface. **International Journal of Nanomedicine**, p. 1801–1816, 2011.

GUEHENNEC, L. LE et al. Osteoblastic cell behavior on different titanium implant surfaces Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. **Acta Biomaterialia**, n. June, 2008.

GULATI, K. et al. Drug-releasing nano-engineered titanium implants : therapeutic efficacy in 3D cell culture model , controlled release and stability. **Materials Science & Engineering C**, v. 69, p. 831–840, 2016.

GURTNER, G. C.; CALLAGHAN, M. J.; LONGAKER, M. T. Progress and Potential for Regenerative Medicine. **Annual Review of Medicine**, v. 58, n. 1, p. 299–312, 2007.

HABAZAKI, H. et al. Spark anodizing of β -Ti alloy for wear-resistant coating. **Surface & Coatings Technology**, v. 201, p. 8730–8737, 2007.

HAYASAKI, C. L.; SOUSA, É. A. C. **Modelagem de estruturas ósseas e próteses através do método dos elementos finitos**. XIII SIMPEP. **Anais...**2006

JIN, M. et al. SC. **Surface & Coatings Technology**, 2016.

KRICHEN, F. et al. Extraction, characterization and antimicrobial activity of sulfated polysaccharides from fish skins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 283–289, 2015.

KUBIES, D. et al. The Interaction of Osteoblasts With Bone-Implant Materials : 1 . The Effect of Physicochemical Surface Properties of Implant Materials. **Physiol**, v. 8408, p. 95–111, 2011.

KWON, I. C.; BAE, Y. H.; KIM, S. W. Electrically erodible polymer gel for controlled release of drugs. **Letter to Nature**, p. 291–293, 1991.

LIMA, A. L. L. M.; OLIVEIRA, P. R. D. DE. Atualização em infecções em próteses articulares. **UPDATE ON INFECTIONS IN ARTICULAR PROSTHESIS**, v. 45, n. 6, p. 520–523, 2010.

LYRA, M. A. M. DE et al. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para

Liberación Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, 2007.

MACAK, J. M. et al. TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 11, p. 3–18, 2007.

MACAK, J. M.; TSUCHIYA, H.; SCHMUKI, P. High-Aspect-Ratio TiO₂ Nanotubes by Anodization of Titanium**. In: **communications**. [s.l: s.n.]. p. 2100–2102.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de Medicamento: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectiva na área farmacêutica**. [s.l: s.n.].

MENZIES, K. L.; JONES, L. The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials. **Optometry and Vision Science**, v. 87, n. 6, p. 387–399, 2010.

MOHAMMED, M. T.; KHAN, Z. A.; SIDDIQUEE, A. N. Surface Modifications of Titanium Materials for developing Corrosion Behavior in Human Body Environment: A Review. **Procedia Materials Science**, v. 6, n. Icmpe, p. 1610–1618, 2014.

MOHAN, L.; ANANDAN, C.; RAJENDRAN, N. International Journal of Biological Macromolecules Drug release characteristics of quercetin-loaded TiO₂ nanotubes coated with chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1633–1638, 2016.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, v. 65, p. 2385–2406, 2005.

ORAPIRIYAKUL, W. et al. Antibacterial surface modification of titanium implants in orthopaedics. **Journal of Tissue Engineering**, v. 9, 2018.

PALANIVELU, R.; RUBAN KUMAR, A. Synthesis, characterization, in vitro anti-proliferative and hemolytic activity of hydroxyapatite. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 127, p. 434–438, 2014.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. **materials**, p. 1863–1887, 2010.

PHILIP L. RITGER, N. A. P. A simple equation for description of solute release II. **J. Control. Release**, v. 5, n. 1, p. 37–42, 1987.

PRADO, M. H. **BIOMATERIAIS**. [s.l: s.n.].

PRESTES, R. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos Collagen and Its Derivatives: Characteristics and Applications in Meat Products. p. 65–74, 2012.

PUCKETT, S. D. et al. Biomaterials The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 706–713, 2010.

RAJGOR, N. et al. Implantable Drug Delivery Systems: An Overview. **Surgical Neurology International**, p. 91–95, 2011.

REGONINI, D. et al. A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes. **Materials Science & Engineering R**, v. 74, n. 12, p. 377–406, 2013.

RENZ, R. P.; OLIVEIRA, R. B.; HÜBLER, R. **Avaliação da osseointegração de implantes de Titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfícies**. [s.l: s.n.].

RIEGER, E. et al. Controlled implant/soft tissue interaction by nanoscale surface modifications of 3D porous titanium implants. **Nanoscale**, v. 7, n. August 2017, 2015.

SABONIS, V.; NAUJOKAITIS, A.; ARLAUSKAS, K. Wetting Properties Modification of TiO₂ Layer by Femtosecond UV Pulses. **JLMN-Journal of Laser Micro/Nanoengineering**, v. 10, n. 1, p. 24–28, 2015.

SCHERRER, P. Determination of the size and internal structure of colloidal particles using X-rays. **Math-Phys Klasse**, v. 2, p. 98–100, 1918.

SINN AW, M.; KURIAN, M.; LOSIC, D. Non-eroding drug-releasing implants with ordered nanoporous and nanotubular structures: Concepts for controlling drug release. **Biomaterials Science**, v. 2, n. 1, p. 10–34, 2014.

SOUZA, M. V. N. DE; ALMEIDA, M. V. DE; COURI, M. R. C. Ciprofloxacina, uma importante fluorquinolona no combate ao antraz. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 85, n. 1, p. 13–18, 2004.

SPERLING, C. et al. In vitro hemocompatibility of self-assembled monolayers displaying various functional groups. **Biomaterials**, v. 26, p. 6547–6557, 2005.

STAIGER, M. P. et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. **Biomaterials**, v. 27, p. 1728–1734, 2006.

UNAGOLLA, J. M.; JAYASURIYA, A. C. Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, n. December 2017, p. 199–209, 2018.

WEWA, S. A. M.; ASSEL, T. A. L. Consumption of a Functional Fermented Milk Containing Collagen Hydrolysate Improves the Concentration of Collagen-Specific Amino Acids in Plasma. **Journal of agricultural and food chemistry**, p. 7790–7795, 2008.

YAO, C.; WEBSTER, T. J. Prolonged Antibiotic Delivery From Anodized Nanotubular Titanium Using a Co-precipitation Drug Loading Method. **Wiley InterScience**, n. December 2008, p. 587–595, 2009.