

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**MARIANA CHIOCHETA BUENO**

**ESTUDO E SÍNTESE DE BIOMATERIAL HÍBRIDO BIOCAMPATÍVEL  
TiO<sub>2</sub>/COLÁGENO PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACO**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO  
2018**

**MARIANA CHIOCHETA BUENO**

**ESTUDO E SÍNTESE DE BIOMATERIAL HÍBRIDO BIOCAMPATÍVEL  
TiO<sub>2</sub>/COLÁGENO PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana de Souza Sikora

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Teixeira Marques

**PATO BRANCO  
2018**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço por todo amor, carinho e dedicação a minha mãe Lucimara Chiocheta, me apoiando em momentos difíceis e desanimadores nas dificuldades desta jornada, essa conquista é nossa! E a toda minha família que me apoiaram todos esses anos.

A minha orientadora Mariana de Souza Sikora, por ter me auxiliado em nosso projeto desde a iniciação científica até o TCC, sempre disponível para retirar minhas dúvidas, obrigada pela paciência. E a Patrícia Teixeira Marques por ter me co-orientado.

Aos meus amigos que fiz nesta caminhada, e aos que já estavam presentes que de alguma forma contribuíram para o final desta etapa.

Por fim, a Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao departamento de química por terem me passado seus conhecimentos. Um muito obrigada a todos que fizeram parte dessa jornada.

## TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Estudo e síntese de biomaterial híbrido biocompatível TiO<sub>2</sub>/colágeno para liberação de fármaco**, foi considerado aprovado de acordo com a ata da banca examinadora N<sup>o</sup> 3.2.2018 de 2018.

Fizeram parte da banca os professores

Mariana de Souza Sikora

Vidiany Aparecida Queiroz Santos

Liliam Cristina Angelo

## RESUMO

BUENO, Mariana Chiocheta. Estudo e síntese de biomaterial híbrido biocompatível TiO<sub>2</sub>/Colágeno para liberação de fármaco. 2018. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 2018.

Neste trabalho foram sintetizados filmes de TiO<sub>2</sub> nanoestruturados a 20 e 50 °C em meio eletrolítico contendo fluido corporal simulado. Após a síntese os filmes foram utilizados como matriz para a incorporação de fármaco e biomoléculas. Os filmes foram incorporados com cefazolina sódica e para diminuir a taxa de liberação utilizou-se o colágeno como barreira difusional. Sistemas de entrega de medicamentos oferecem inúmeras vantagens quando comparados aos métodos convencionais, tendo em vista que a adição de um polímero natural como o colágeno, aumenta a biocompatibilidade, além de se mostrar uma eficiente membrana de barreira difusional. O MEV, apresentou que houve a formação de estruturas nanotubulares em ambas as condições de síntese, entretanto, o filme obtido à 50 °C apresentou uma morfologia mais homogênea e sem material residual sobre a superfície. Nos ensaios de liberação observou-se que os materiais obtidos à 50 °C apresentaram uma menor taxa de liberação do fármaco. Além disso, o colágeno do tipo I serviu como uma barreira difusional, diminuindo a velocidade de liberação do fármaco por unidade de tempo para ambas as condições de síntese. Para o teste de osseointegração *in vitro*, a análise de DRX confirma o crescimento de fluorapatita, proveniente da hidroxiapatita nos substratos obtidos em ambas as temperaturas. Já no ensaio de hemólise, todos os biomateriais sintetizados não apresentaram atividade hemolítica severa, ou seja, os eritrócitos permaneceram intactos na solução, e a hemoglobina permaneceu suspensa indicando que não provocam hemorragia local. De uma forma geral, biomateriais obtidos à 50 °C, mostraram-se uma boa alternativa para aplicação como implantes comerciais, uma vez que são biocompatíveis, auxiliam na osseointegração e são eficientes na liberação de fármaco por um período prolongado.

**Palavras chave:** Biomaterial, Colágeno, Osseointegração.

## ABSTRACT

BUENO, Mariana Chiocheta. Study and synthesis of biocompatible hybrid biomaterial TiO<sub>2</sub> / Collagen for drug release. 2018. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 2018.

In this work, nanostructured TiO<sub>2</sub> films were synthesized at 20 and 50 ° C in electrolytic medium containing simulated body fluid. After synthesis the films were used as matrix for the incorporation of drug and biomolecules. The films were incorporated with sodium cefazolin and to reduce the rate of release the collagen was used as the diffusional barrier. Drug delivery systems offer numerous advantages when compared to conventional methods, since the addition of a natural polymer such as collagen increases biocompatibility, as well as an efficient diffusional barrier membrane. SEM showed that nanotubular structures were formed in both conditions of synthesis, however, the film obtained at 50 ° C presented a more homogeneous morphology with no residual material on the surface. In the release assays it was observed that the materials obtained at 50 ° C showed a lower rate of drug release. In addition, type I collagen served as a diffusional barrier, decreasing the release rate of the drug per unit of time for both conditions of synthesis. For the in vitro osseointegration test, the XRD analysis confirms the growth of fluorapatite from the hydroxyapatite on the substrates obtained at both temperatures. In the hemolysis assay, all the biomaterials synthesized did not present severe hemolytic activity, that is, the erythrocytes remained intact in the solution, and the hemoglobin remained suspended indicating that they did not cause local hemorrhage. In general, biomaterials obtained at 50 ° C have been shown to be a good alternative for application as commercial implants, since they are biocompatible, assist in osseointegration and are efficient in the release of the drug for a prolonged period.

**Keywords:** Biomaterial, Collagen, Osseointegration.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:(a) Esquematização de um segmento de hélice tripla de colágeno. (b) Moléculas de tropocolágeno montadas. (c) Fibra de colágeno. (d) Fibras colágenas agregadas formando um feixe de fibras. ....	15
Figura 2: Processo de anodização eletroquímica e possíveis morfologias anódicas: I) eletropolimento de metais, II) formação de óxidos anódicos compactos, III) óxidos auto-ordenados (nanotubos ou nanoporos), IV) formação rápida de nanotubos de óxidos (desorganizados), V) ordenadas nano-camadas porosas. Nanotubos de TiO <sub>2</sub> altamente ordenados (na vista superior e lateral) com estrutura ondulada (direita) na superfície do metal quando os tubos são removidos. FONTE: (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011b).....	18
Figura 3: (a) Diagrama esquemático da liberação do fármaco via mecanismo de difusão das estruturas porosas para a solução padrão (solução salina tamponada com fosfato, meio PBS), (b) gráficos conceituais apresentando curvas de liberação cumulativa de difusão livre e restrita em relação ao tempo, mostrando diferentes características de liberação, ou seja, explosão, ordem zero (caso ideal), combinada primeira e ordem zero e, finalmente, liberação de droga sensível a estímulos do TNT. FONTE: (SINN AW; KURIAN; LOSIC, 2014) .....	20
Figura 4: Arranjo de hidroxiapatita de carbonato e colágeno na formação de tecidos duros em osso cortical e trabecular. Fonte: (VALLET-REGÍ; GONZÁLEZ-CALBET, 2004) .....	22
Figura 5: Representação do esquema de anodização potencioestática de titânio. Fonte: Autor.....	23
Figura 6: Esquema de incorporação do fármaco (cefazolina sódica). Fonte: Construído a partir de material disponibilizado por Laboratory Equipment Archives.	25
Figura 7: Esquema de adição de uma película fina, composta por colágeno do tipo I. Fonte: Construído a partir de material disponibilizado por Laboratory Equipment Archives.....	26
Figura 8: Secagem das amostras T20F, T20FC, T50F, T50FC. Fonte: Autor.....	26
Figura 9: Representação do teste de hemólise. Fonte: Autor. ....	29
Figura 10: Curva eletroquímica referente a amostra sintetizada em solução organo-aquosa contendo 0,75% (m/m) de NH <sub>4</sub> F à 50 °C, no tempo de anodização de 2 h. Fonte: Autor.....	31

Figura 11: Curvas eletroquímicas (replicas) referentes às amostras sintetizadas em solução organo-aquosa contendo 0,75% (m/m) de NH <sub>4</sub> F à 20 °C, no tempo de anodização de 20 minutos. Fonte: Autor.....	33
Figura 12: Curvas eletroquímicas (replicas) referentes às amostras sintetizadas em solução organo-aquosa contendo 0,75% (m/m) de NH <sub>4</sub> F à 50 °C, no tempo de anodização de 20 minutos. Fonte: Autor.....	33
Figura 13: MEV referente as amostras sintetizadas em solução organo-aquosa a 25 V por 20 minutos: T20, T20F, T20FC, T50, T50F e T50FC. Fonte: Autor.....	34
Figura 14: MEV da amostra de colágeno extraído do tendão bovino. Fonte: Autor. .	36
Figura 15: Espectro infravermelho de colágeno solúvel em ácido de tendão bovino usando duas proporções de tendão bovino. Fonte: Autor. ....	36
Figura 16: Liberações do fármaco e fármaco mais colágeno, a partir dos nanotubos de dióxido de titânio, em solução tampão fosfato (PBS). Fonte: Autor. ....	38
Figura 17: Difratoograma da superfície de Titânio (T20), incorporado com fármaco (T20F) e incorporado com fármaco mais deposição de colágeno (T20FC). Fonte: Autor.....	41
Figura 18: Difratoograma da superfície de Titânio (T50), incorporado com fármaco (T50F) e incorporado com fármaco mais deposição de colágeno (T50FC). Fonte: Autor.....	41
Figura 19: Atividade hemolítica dos substratos. Fonte: Autor .....	43
Figura 20: Atividade hemolítica dos substratos de titânio puros. Fonte: Autor.....	43
Figura 21: Atividade hemolítica dos substratos incorporados com fármaco CS. Fonte: Autor.....	44
Figura 22: Atividade hemolítica dos substratos incorporados com fármaco CS e colágeno. Fonte: Autor .....	44

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Composição da matriz óssea. ....	21
Tabela 2: Parâmetros de incorporação a serem analisados nas temperaturas de 20°C e 50°C .....	26
Tabela 3: Formulação para solução SBF .....	28
Tabela 4: Diâmetro e espessuras dos nanotubos em ambas as condições estudadas. Fonte: Autor .....	34
Tabela 5: Média e desvio- padrão de ambas as condições na liberação "burst" .....	37
Tabela 6: Porcentagem de hemólise comparadas ao controle positivo (Triton X) e ao controle negativo (PB).....	42

**SUMÁRIO**

<b>RESUMO.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>9</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>3 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
3.1 BIOMATERIAIS .....	14
3.2 COLÁGENO.....	15
3.4 DIÓXIDO DE TITÂNIO.....	16
3.5 LIBERAÇÃO DE FÁRMACO.....	19
3.6 OSSEOINTEGRAÇÃO .....	20
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 SÍNTESE ELETROQUÍMICA .....	23
4.2 EXTRAÇÃO DE COLÁGENO.....	24
4.3 INCORPORAÇÃO .....	25
4.4 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO .....	27
4.5 ENSAIO DE OSSEOINTEGRAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	27
4.6 ENSAIO DE HEMÓLISE .....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
5.1 SÍNTESE ELETROQUÍMICA .....	31
5.2 CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO.....	35
5.3 LIBERAÇÃO DO FÁRMACO .....	37
5.4 ENSAIO DE OSSEOINTEGRAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	39
5.5 ENSAIO DE HEMÓLISE .....	42
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Há décadas pesquisadores vêm dedicando esforços para encontrar materiais com características adequadas para restauração e substituição de tecidos ósseos no corpo humano. A classe que se destaca para estas características, são os biomateriais, pois são úteis para reconstituição ou substituição de tecidos naturais do corpo. Entretanto, nem sempre o organismo aceita os materiais implantados o que preocupa os médicos e faz com que muitos pacientes tenham infecções e voltem à mesa de cirurgia.

Dentre os materiais utilizados como implantes ortopédicos e odontológicos, destacam-se o Titânio e suas ligas, sendo que estes materiais são também chamados de biomateriais metálicos. Devido a substituição de tecidos duros, como os ossos, a classe de materiais mais utilizada são os metais, por apresentarem módulo de elasticidade próximo ao do tecido ósseo humano, resultando numa vasta categoria de propriedades mecânicas como elasticidade, molhabilidade, resistência a corrosão, compatibilidade bioquímica, dentre outros (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005).

Outra aplicação é para a reparação de tecido ósseo com o auxílio de sistemas de liberação de fármacos, empregando o recobrimento dos implantes com fibras de materiais poliméricos (biopolímeros) aumentando também a biocompatibilidade.

O conceito de biocompatibilidade é considerado aquele material totalmente agregado ao corpo humano. Ou seja, o organismo não reconhece à presença do implante como um corpo estranho. Deste modo, o implante seria tão bem “recebido” pelo organismo que poderia se imaginar a existência de um tecido completamente homogêneo composto pelo próprio tecido e pelo biomaterial (ALMEIDA FILHO, 2012).

Segundo MACAK et al., (2007), a modificação superficial do titânio metálico pelo método eletroquímico se mostra muito eficaz, cumprindo as necessidades físicas, químicas e biológicas em implantes. Estudos sobre a interação do material do nanotubo de dióxido de Titânio com relação a um ambiente biorelevante são de significância muito alta no quesito de biocompatibilidade e bioaceitação.

Gulati et al, (2011), discute a possibilidade de melhorar as propriedades de biocompatibilidade de próteses de titânio para aplicações ortopédicas, revestindo as estruturas nanotubulares com drogas redutoras de infecção. Dentre os fármacos de

interesse para a incorporação em implantes ortopédicos, destaca-se a cefazolina sódica (CS), pois é um antibiótico indicado para o tratamento de infecções graves, como profilaxia cirúrgica, onde a administração profilática da cefazolina no pré-operatório, intra-operatório e pós-operatório pode reduzir a incidência de algumas infecções pós-operatórias, em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos classificados como potencialmente contaminados. Pela ANVISA, o uso profilático da cefazolina pode também ser eficaz em pacientes cirúrgicos nos quais uma infecção no local da cirurgia pode representar um grave risco.

Sistemas de liberação de fármacos contribuem na ciência para o avanço da saúde humana, pois oferecem vantagens quando são comparados ao método convencional. Devido à baixa concentração de fármaco na corrente sanguínea há a diminuição da toxicidade e aumento do tempo de permanência de circulação da droga no organismo, fazendo com que não haja grande risco de infecção pós-operatória.

O propósito geral de um implante é restaurar ou substituir partes do corpo danificadas ou órgãos perdidos, transplantando suportes de apoio com células apropriadas que, em combinação com biomoléculas, geram novos tecidos. A nanotexturização de titânio por meio da síntese de nanotubos de dióxido promove uma modificação na superfície do implante tornando-o viável para aplicações como dispositivos de liberação lenta, além de fornecer uma superfície propícia à adesão de células ósseas.

Neste sentido, este estudo tem como objetivo, a nanotexturização de titânio por meio da síntese de nanotubos de dióxidos de titânio por anodização potenciostática, em meio organo-aquoso contendo fluido corporal simulado. Após a síntese, investigou-se a viabilidade do biomaterial para liberação do fármaco cefazolina sódica. Com o objetivo de retardar a liberação do fármaco, foi adicionada uma camada externa de colágeno tipo I extraído de tendão bovino.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo principal estudar a síntese e caracterização do biomaterial híbrido TiO<sub>2</sub>/Cefazolina sódica/Colágeno, bem como avaliar sua biocompatibilidade e taxa de liberação do fármaco.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a influência da temperatura de síntese no diâmetro dos nanotubos;
- Realizar a incorporação do antimicrobiano cefazolina sódica e de colágeno tipo I;
- Realizar ensaios de osseointegração *in vitro* usando fluido corporal simulado (SBF);
- Caracterizar os biomateriais híbridos sintetizados por microscopia eletrônico de varredura (MEV) e difração de raio X (DRX);
- Estudar a atividade hemolítica dos biomateriais;
- Investigar a cinética de liberação do fármaco por meio de curvas de fração cumulativa de massa liberada em função do tempo.

### 3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

#### 3.1 BIOMATERIAIS

Segundo (WILLIAMS, 2009), biomaterial é definido 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 em sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo.

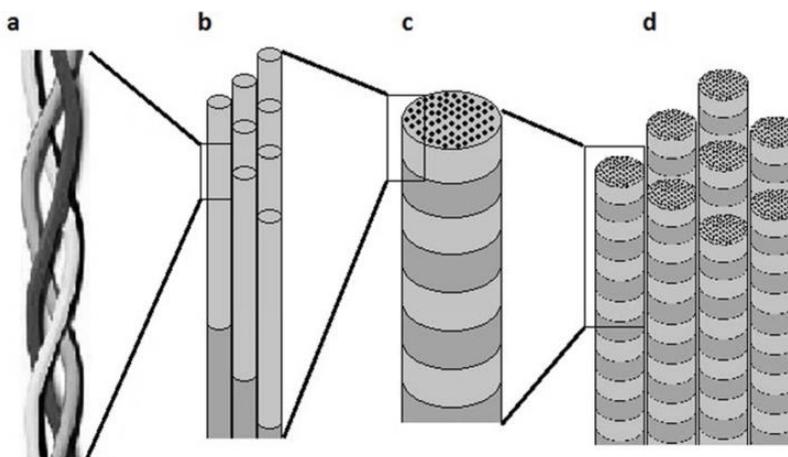
“Estão associados exclusivamente ao domínio dos cuidados de saúde e têm uma interface com os tecidos ou componentes dos tecidos. É uma substância que foi projetada para assumir uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, por meio do controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, em medicina humana ou veterinária” (WILLIAMS, 2009).

Biomateriais foram introduzidos na ortopedia durante a década de 1960. Eles têm alta resistência à compressão e rigidez, são altamente biocompatíveis, bioativos e responsivos ao tecido. São diversas as classes existentes nos biomateriais, podem ser constituídos de vários componentes, desde biovidros, metais e polímeros, dependendo da característica requerida à uma determinada aplicação, de modo que os efeitos colaterais sejam os mínimos possíveis e que induzam a biocompatibilidade e bioaceitação (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005), JIN et al., 2016). Os materiais poliméricos, cuja aplicação em áreas biotecnológicas e médicas tem apresentado um crescimento significativo. Os materiais poliméricos naturais, como por exemplo o colágeno, podem ser utilizados como implantes, devido a sua facilidade em ser moldados em variadas formas, como filmes, revestimentos, fibras, tecido e líquidos viscosos (FRIESS, 1997).

### 3.2 COLÁGENO

O colágeno é um polímero biocompatível e bioativo (MORRA et al., 2005). É a classe de proteínas mais abundante presente no corpo humano e sua aplicação é destacada no campo da engenharia de tecidos para melhorar a função tecidual (FRIESS, 1997).

Esta espécie de proteína fibrosa representa cerca de 25-30% em peso da constituição da pele e ossos de mamíferos. Vários tipos de colágenos distintos foram caracterizados, do tipo I ao XXVII, mas ambos apresentam uma estrutura típica de tripla hélice com três subunidades polipeptídicas, essas moléculas de colágeno se juntam devido a sua estrutura molecular semelhante, exemplificadas na Figura 1 (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).



**FONTE: Parenteau-Bareil et al. (2010).**

**Figura 1:(a) Esquemática de um segmento de hélice tripla de colágeno. (b) Moléculas de tropocolágeno montadas. (c) Fibra de colágeno. (d) Fibras colágenas agregadas formando um feixe de fibras.**

Diferentes tipos de colágeno são necessários para conferir características biológicas distintas aos vários tipos de tecidos conjuntivos do corpo (Friess, 1997). O colágeno pode ser extraído de várias fontes, as mais comuns para aplicações em engenharia de tecidos incluem a pele bovina e tendões. Os colágenos formadores de fibrilas são os mais comumente usados na produção de biomateriais, no caso o colágeno do tipo I (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

O colágeno tem despertado grande interesse como biomaterial em uso médico, como prótese e transportador de drogas (FUJIOKA, 1998). Sua principal aplicação em biomateriais é como uma membrana de barreira, para implantes de entrega de drogas (BRADLEY; WILKES, 1977). O colágeno é um dos candidatos

mais úteis para esse fim, e muitos estudos relatam que além do mesmo criar uma barreira difusional, liberando a droga mais lentamente, auxilia na reconstituição do tecido conjuntivo e aumenta a bioaceitação. Formulações farmacêuticas contendo colágeno em forma de gel, filme e esponja são usadas para incorporar compostos de baixo peso molecular, como antibióticos (FUJIOKA, 1998).

### 3.4 DIÓXIDO DE TITÂNIO

O Titânio (Ti), elemento químico, é um metal cinza prateado do Grupo 4 da tabela periódica. É um metal estrutural leve em comparação com outros metais de propriedades mecânicas e térmicas semelhantes, possui excelente resistência à corrosão em muitos ambientes devido à formação de um filme de superfície de óxido passivo, apresentando estados de oxidação +2, +3 e +4, sendo o último o mais estável, o qual é representado pela fórmula química  $TiO_2$ . O  $TiO_2$  também é usado em próteses, como material de implantes porque não reage com tecido e osso apresentando boa biocompatibilidade (ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA, 2018; JIN et al., 2016).

Matrizes de tubos de óxidos auto organizados ou de poros podem ser obtidos por um processo de anodização de um metal, como o Ti, que quando exposto a uma tensão anódica inicia uma oxidação. O desenvolvimento superficial do óxido depende de alguns fatores, como a composição da solução eletrolítica, potencial aplicado, tempo de anodização e temperatura.

Esses nanotubos inorgânicos, são fabricados com a finalidade de explorar as propriedades de materiais, com foco em aplicações biomédicas, fotoquímicas, elétricas e ambientais (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011b).

As superfícies de titânio que são tratadas química ou eletroquimicamente tendem a desenvolver camadas específicas com composição química e porosidade que promovem a osseointegração. Este fenômeno irá desencadear outras reações que irão promover o crescimento do dióxido de Titânio passivo (OLIVEIRA, 2016).

O fator determinante na morfologia do filme é a composição da solução eletrolítica. Geralmente, a formação de nanotubos de  $TiO_2$ , em soluções contendo flúor, favorece o crescimento de nanotubos de  $TiO_2$  através de reações competitivas de formação e dissolução do óxido formado. O campo elétrico aplicado favorece a migração de ânions através do óxido levando à oxidação do metal na interface

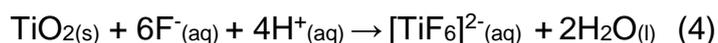
metal/óxido, paralelamente à formação tem-se a dissolução química assistida por campo do óxido formado na interface óxido/solução. A dinâmica entre estes processos controla o diâmetro e a espessura da parede dos nanotubos (DEEN et al., 2014).

A influência da temperatura na superfície dos nanotubos (NTTs), pode ser explicada na relação que a temperatura apresenta sobre a formação da camada de óxido de titânio e sua dissolução química.

Um aumento na temperatura é relacionado com o aumento na taxa de dissolução química. Esta relação é menos clara para a formação eletroquímica do óxido, pois há outros parâmetros que influenciam no sistema, como por exemplo, a concentração de íons  $F^-$ .

Temperaturas elevadas favorecem a essa dissolução, proporcionando uma diminuição na espessura da camada tubular contínua. Em relação a concentração de íons  $F^-$ , a espessura da camada de NTTs aumenta com o aumento da temperatura de anodização até aproximadamente  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , sendo assim, a temperatura influencia no comprimento dos NTTs e depende da concentração de íons  $F^-$  (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011).

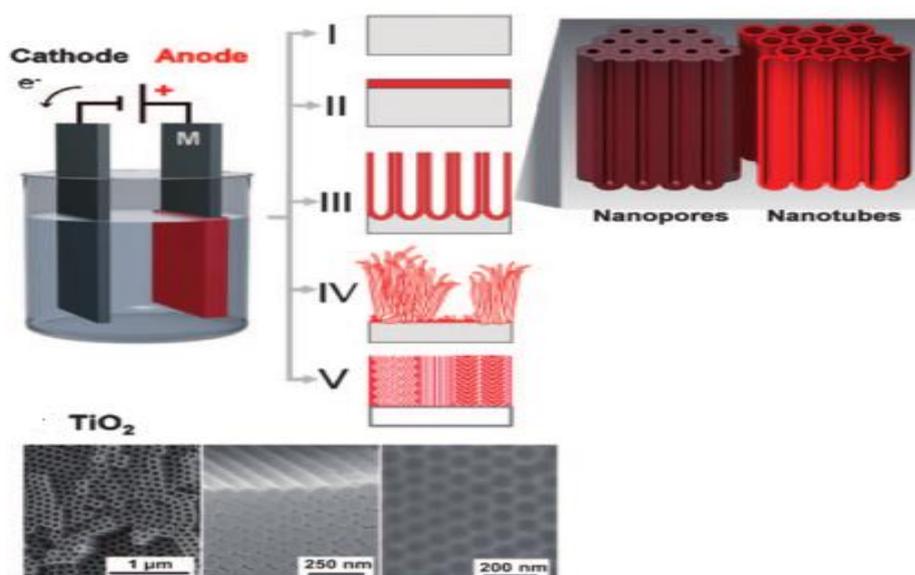
Segundo Deen et. al (2014), as equações abaixo são responsáveis pelo crescimento e formação dos NTTs:



O método de anodização eletroquímica, em meio contendo íons fluoreto, promove a difusão destes íons para o fundo do tubo, onde o complexo solúvel  $[\text{TiF}_6]^{2-}_{(aq)}$  é formado promovendo a dissolução local e crescimento vertical dos nanotubos. A velocidade da reação de oxidação e de dissolução passam a ser determinadas pela corrente aplicada no sistema, permitindo que a superfície de titânio (ou outros metais como Zr e Nb) seja revestida com uma camada de

nanotubos densa e definida. Inicialmente, a dissolução local promove a formação de nanoporos, mas observa-se uma transição desta estrutura para uma estrutura nanotubular, devido a camada rica em fluoreto presente na parede exterior de cada célula individual de  $\text{TiO}_2$ . A célula se movimenta, levando a uma deformação e formação dos nanotubos, graças ao fluxo dos íons que são influenciados pela densidade de corrente e potencial aplicado (BERGER et al., 2011). Este processo de estruturação do óxido superficial é extremamente versátil, levando a uma matriz de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  paralelamente alinhados e com alta área superficial como exemplificado na Figura 2.

As análises da anodização potencioestática são feitas através das curvas cronoamperométricas (curva da corrente elétrica *versus* tempo do experimento). A formação dos NNTs é descrita como uma diminuição abrupta da corrente elétrica nos primeiros instantes do processo, devido à formação progressiva do óxido superficial.



**Figura 2: Processo de anodização eletroquímica e possíveis morfologias anódicas:** I) eletropolimento de metais, II) formação de óxidos anódicos compactos, III) óxidos auto-ordenados (nanotubos ou nanoporos), IV) formação rápida de nanotubos de óxidos (desorganizados), V) ordenadas nano-camadas porosas. Nanotubos de  $\text{TiO}_2$  altamente ordenados (na vista superior e lateral) com estrutura ondulada (direita) na superfície do metal quando os tubos são removidos. **FONTE:** (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011b).

Nanotubos de  $\text{TiO}_2$  podem contribuir para uma melhor adesão celular pois auxiliam a osseointegração e ancoragem óssea, entretanto, essa mesma estrutura de superfície pode induzir o acúmulo e proliferação de bactérias na superfície do implante causando rejeição e até mesmo a perda do mesmo. Técnicas de

modificação de superfícies tem sido desenvolvidas buscando auxiliar na osseointegração e também visando amenizar essa rejeição. (OLIVEIRA, 2016).

Segundo GULATI; AW; LOSIC, (2011), uma solução para esse problema é o revestimento com antibióticos nos NNTs, para modificar a superfície do implante, evitando o crescimento bacteriano.

### **3.5 LIBERAÇÃO DE FÁRMACO**

Vários polímeros estáveis ou degradáveis têm sido notavelmente testados para entrega local de medicamentos nos ossos. O esperado de materiais selecionados para liberação de fármacos nos ossos é que sejam acessíveis e exibam características de liberação previsíveis, mecânica e biologicamente compatíveis com o tecido ósseo local, se ligando quimicamente e fisicamente ao osso. Além disso, estes materiais devem ser reabsorvidos lentamente, facilitando uma nova formação óssea através da fixação, multiplicação e crescimento de células ósseas, chamadas de osteoblastos (GULATI; AW; LOSIC, 2011).

Das várias categorias de medicamentos pesquisadas para liberação local, os antibióticos ocupam uma seção importante. O fornecimento local de medicamentos oferece várias possibilidades para evitar efeitos colaterais graves, como: evitar infecções; reduzir hospitalização; reduzir despesas médicas; liberar a droga de forma sustentável; manter altas concentrações do medicamento localmente; reduzir a presença de drogas na circulação sanguínea sistêmica e manter a estabilidade do período mais longo da droga, dentre outros. Portanto, é essencial buscar a liberação local de medicamentos para melhorar a eficácia e acelerar o processo de cura (SOUNDRAPANDIAN; SA; DATTA, 2009).

Segundo SINN AW; KURIAN; LOSIC, (2014), o transporte de drogas não pode mais ser controlável, a partir do momento em que o implante é inserido no interior do corpo. Portanto, é vital planejar estratégias apropriadas para modular a liberação do fármaco, regulando o mecanismo de difusão. Além disso, os critérios que devem ser considerados para uma boa eficiência terapêutica incluem: a seleção correta de medicamentos, dosagem otimizada da droga, taxa de liberação constante da droga, duração da liberação, tamanho do implante, morfologia e a natureza do local do implante.

A liberação de fármacos a partir de estruturas nanotubulares em contato com soluções fisiológicas é governada por um mecanismo de difusão, onde a liberação do fármaco se dá a partir da transferência de massa do mesmo a partir dos nanotubos para a solução. Este processo é influenciado por um número de fatores, como por exemplo, a interação interfacial entre as moléculas do fármaco e a superfície do implante, dimensões dos poros ou tubos e pH do meio, exemplificados na Figura 3.

A liberação do tipo ordem zero é a estratégia de liberação mais desejável (SINN AW; GULATI; LOSIC, 2011), pois produz a mais alta estabilidade de dosagem e se assemelha à situação ideal em que a droga é liberada em uma taxa uniforme e constante, independente do tempo e concentração.

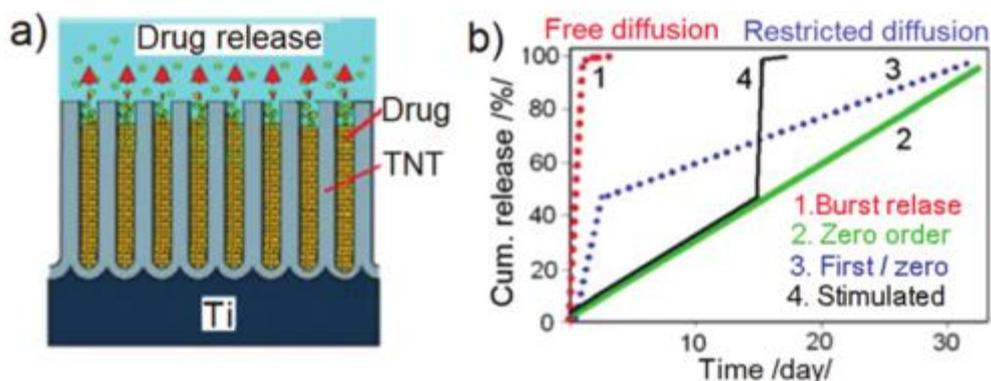


Figura 3: (a) Diagrama esquemático da liberação do fármaco via mecanismo de difusão das estruturas porosas para a solução padrão (solução salina tamponada com fosfato, meio PBS), (b) gráficos conceituais apresentando curvas de liberação cumulativa de difusão livre e restrita em relação ao tempo, mostrando diferentes características de liberação, ou seja, explosão, ordem zero (caso ideal), combinada primeira e ordem zero e, finalmente, liberação de droga sensível a estímulos do TNT. FONTE: (SINN AW; KURIAN; LOSIC, 2014)

### 3.6 OSSEOINTEGRAÇÃO

Implantes estão diretamente associados ao fenômeno de osseointegração, devido a uma conexão direta e estrutural entre o tecido ósseo vivo e organizado e um implante funcional. As modificações nas superfícies dos implantes de titânio têm aumentado o contato entre o osso e o implante, auxiliando no processo de osseointegração. Após a implantação, os primeiros eventos que ocorrem na interface osso-implante determinam a falha ou o sucesso do mesmo (RENZ, 2007).

A matriz óssea é precisamente composta de duas fases principais, nomeadamente, orgânica (proteína) e inorgânica (mineral). Essas fases têm

múltiplos componentes que consistem de, em proporções decrescentes, minerais, colágeno, água, proteínas não colágenas, lipídios, elementos vasculares e células. A composição geral do osso é dada pela Tabela 1.

**Tabela 1: Composição da matriz óssea.**

<b>FASE INORGÂNICA</b>	<b>%m (aprox.)</b>	<b>FASE ORGÂNICA</b>	<b>%m (aprox.)</b>
<b>Hidroxiapatita</b>	60	Colágeno	20
<b>Carbonato</b>	4	Água	9
<b>Citrato</b>	0.9	Proteínas não-colagênicas	3
<b>Sódio</b>	0.7	Outros traços: polissacarídeos, lipídeos, citocinas	-
<b>Magnésio</b>	0.5	Células ósseas primárias: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos	-
<b>Outros traços: Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup></b>	-	-	-

Fonte: Adaptado de (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005)

O mineral ósseo é composto principalmente de hidroxiapatita carbonatada sólida inorgânica (HA). Isso equivale a 65% da massa óssea total, e a proteína óssea é composta principalmente de colágeno e suas moléculas são ligadas formando cadeias lineares que, por sua vez, são dispostas em fibras, conforme Figura 4. O colágeno também fornece uma estrutura na qual minúsculos cristais de HA são incrustados fortalecendo o osso (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005, VALLET-REGÍ; GONZÁLEZ-CALBET, 2004).

O processo de formação óssea inicia-se pela ação dos osteoblastos, células especiais que sintetizam e liberam a matriz de colágeno na forma de uma substância gelatinosa, a osteóide, que é posteriormente mineralizada pela deposição controlada de fosfato de cálcio. Os osteoblastos permanecem presos dentro da fase mineral, evoluindo em direção aos osteócitos que mantêm a atividade de formação óssea (VALLET-REGÍ; GONZÁLEZ-CALBET, 2004).

A combinação de hidroxiapatita com colágeno vem sendo sugerida pois o colágeno constitui-se um agente de união biocompatível e reabsorvível, responsável pela prevenção da migração das partículas cerâmicas até a incorporação pelos tecidos, além de ser um bom suporte para o crescimento celular (BET; GOISSIS; PLEPIS, 1997).

ABE et. al(1990), introduziram um método biomimético de deposição de apatitas por precipitação heterogênea, simulando as condições biológicas para obtenção do biomaterial desejado, em condições ambientes. Além disso, com esta técnica pode-se recobrir implantes com diferentes fases de fosfatos de cálcio, as quais possuem características benéficas para ocorrência da osseointegração. Este método consiste em colocar o substrato a ser recoberto em uma solução sintética (“SBF - Simulated Body Fluid”) de composição iônica semelhante à do plasma sanguíneo, metodologia descrita por (KOKUBO, 1991a).

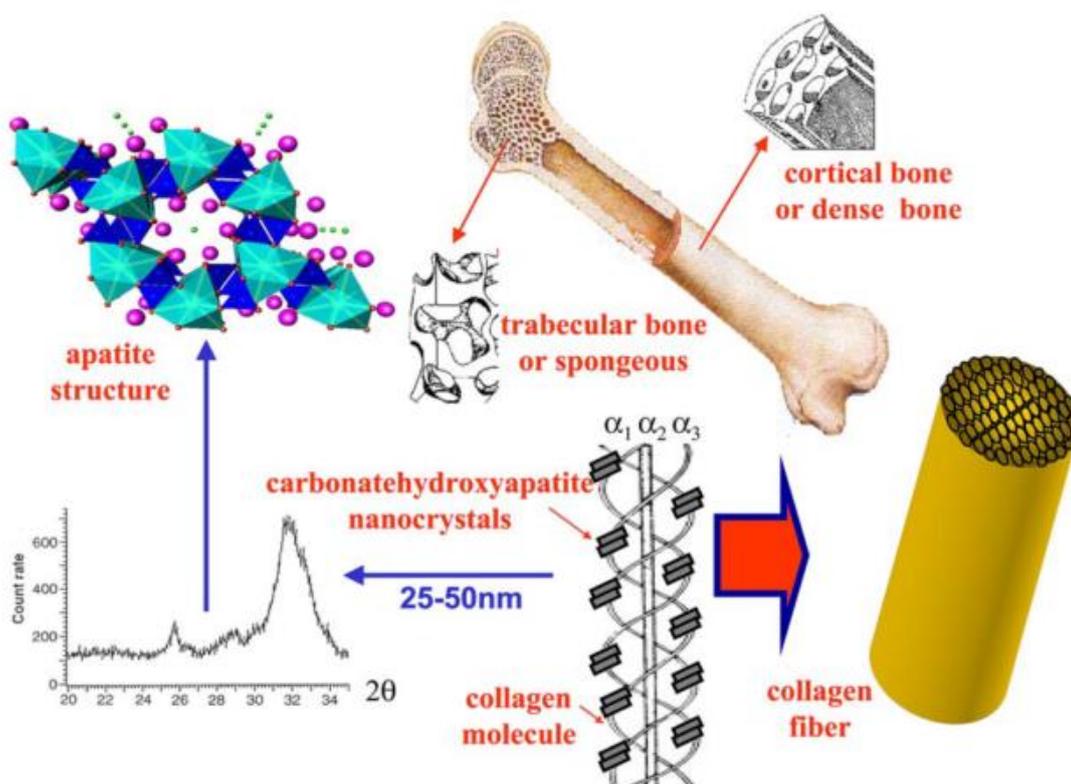


Figura 4: Arranjo de hidroxiapatita de carbonato e colágeno na formação de tecidos duros em osso cortical e trabecular. Fonte: (VALLET-REGÍ; GONZÁLEZ-CALBET, 2004)

Recentemente, nosso grupo de pesquisa depositou um pedido de patente de uma nova solução eletrolítica contendo SBF para a obtenção dos nanotubos de  $\text{TiO}_2$  (SIMON; SIKORA, 2018). Observou-se que a síntese do óxido neste eletrólito aumenta a molhabilidade dos biomateriais, bem como facilita a deposição de hidroxiapatita nos ensaios *in vitro*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 SÍNTESE ELETROQUÍMICA

O processo de anodização foi realizado por um sistema composto por: fonte, célula eletroquímica e multímetro. Como ânodo (eletrodo de trabalho), utilizou-se uma placa de titânio de 10 mm x 15 mm e como contra eletrodo, foi utilizado um par de eletrodos de platina postos paralelamente em relação ao eletrodo de trabalho. Ambos os eletrodos foram conectados a uma fonte de tensão, conforme exemplificado na Figura 5. Aplicou-se uma diferença de potencial constante de 25 V durante 20 minutos em uma solução organo-aquosa constituída de etilenoglicol e fluoreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{F}$ ) 0,75% m/m, contendo 9 % (v/v) de água e 1 % (v/v) de SBF (SIMON; SIKORA, 2018).



Figura 5: Representação do esquema de anodização potencioestática de titânio. Fonte: Autor.

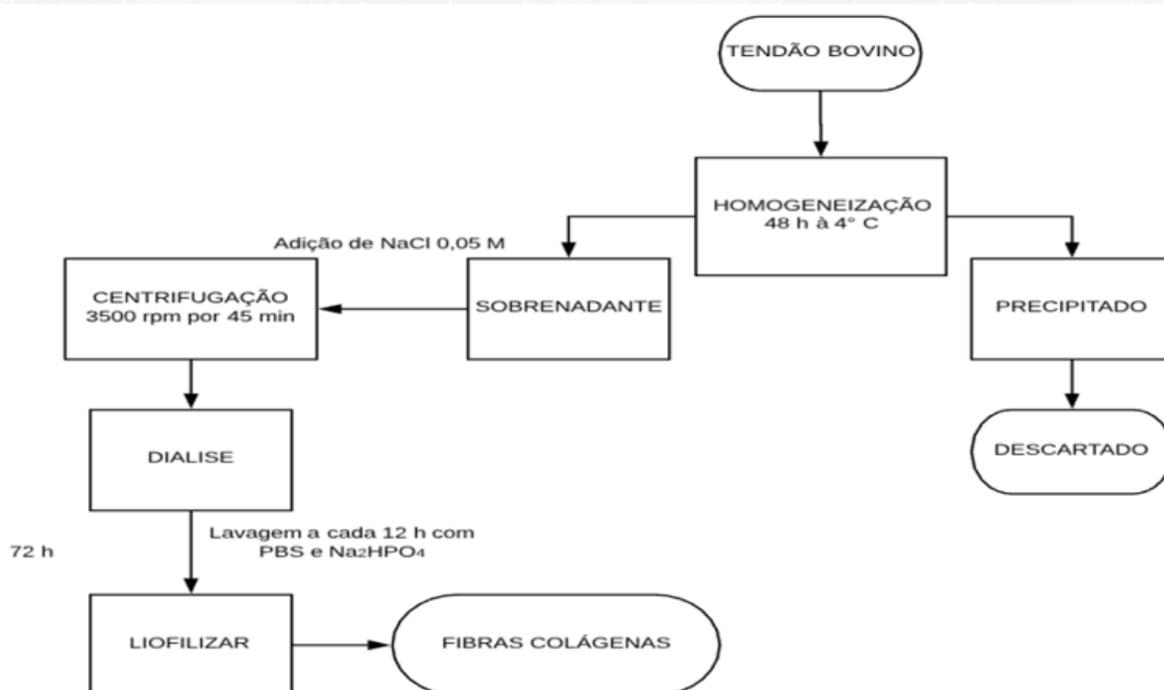
O parâmetro de síntese analisado foi a temperatura do banho, investigando duas temperaturas de síntese, 20 e 50°C, pois há estudos positivos utilizando temperaturas próximas. De acordo com Macak et al., (2007), a temperatura influencia diretamente no diâmetro dos nanotubos e na espessura da camada formada.

Em relação ao diâmetro dos nanotubos, tem-se que com o aumento da temperatura de anodização, é obtido uma menor espessura dos NNTs por

consequência da taxa de dissolução química do óxido (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011).

## 4.2 EXTRAÇÃO DE COLÁGENO

Tendão bovino limpo, foi liofilizado e cortado em pedaços de 1 cm<sup>2</sup> e em seguida, foi imerso em 500 mL de uma solução de ácido acético 3,5 mol/L contendo 5 g/L de pepsina. Utilizou-se esta enzima, pois a mesma auxilia na precipitação do colágeno. O sistema permaneceu sob agitação contínua, a temperatura de 4°C, por um período de 48 horas até a formação de um gel. Após 48 horas no refrigerador, o gel obtido foi filtrado e posteriormente precipitado em 350 mL de uma solução com NaCl 0,05 mol/L, onde pode-se observar a precipitação do colágeno. O sobrenadante foi coletado e centrifugado à 3500 rpm por 45 minutos (DE CASTRO et al., 2014). Na purificação, o excesso de sal e ácido acético presente no colágeno, foi removido por diálise, onde o precipitado foi dialisado contra Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 mol/L e Tampão Fosfato (PBS) durante 72 h (12 h cada) sob 4°C, exemplificados no Fluxograma 1. Após a purificação, as fibras colágenas foram liofilizadas. As amostras foram caracterizadas por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) e Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).



Fluxograma 1: Processo de extração de colágeno. Fonte autor.

### 4.3 INCORPORAÇÃO

A incorporação do fármaco (CS), foi realizada após a síntese descrita na etapa anterior (item 4.1). Incorporou-se a droga utilizando metodologia “top filling”, através de adsorção física, onde 10  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 10  $\text{mg mL}^{-1}$  de cefazolina sódica foram adicionados sobre a superfície dos filmes de modo a incorporar 1  $\text{mg}$  por filme de  $\text{TiO}_2$  (GULATI; AW; LOSIC, 2011). Foram investigadas 2 condições de incorporação, como apresentado na Tabela 2. A primeira condição consiste apenas na incorporação do fármaco (Figura 6). A segunda condição consistiu na avaliação da liberação retardada do fármaco, onde adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 2  $\text{g L}^{-1}$  de colágeno do tipo I e 2% m/v de ácido acético sobre o material incorporado, de forma a criar uma camada fina de colágeno que atue como barreira difusional (Figura 7). Utilizou ácido acético na solução, pois o colágeno só é solúvel em meio ácido, devido ao seu método de extração (BET; GOISSIS; PLEPIS, 1997).

Posteriormente à incorporação, todas as amostras foram levadas a estufa com circulação de ar a uma temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$  para a secagem completa dos solventes (Figura 8).



**Figura 6: Esquema de incorporação do fármaco (cefazolina sódica). Fonte: Construído a partir de material disponibilizado por Laboratory Equipment Archives**



**Figura 7: Esquema de adição de uma película fina, composta por colágeno do tipo I. Fonte: Construído a partir de material disponibilizado por Laboratory Equipment Archives**

**Tabela 2: Parâmetros de incorporação a serem analisados nas temperaturas de 20°C e 50°C**

Condições de incorporação	Temperatura 20 °C	Temperatura 50 °C
Dióxido de titânio incorporado com fármaco	T20F	T50F
Dióxido de titânio incorporado com fármaco e colágeno	T20FC	T50FC



**Figura 8: Secagem das amostras T20F, T20FC, T50F, T50FC. Fonte: Autor**

As propriedades dos biomateriais antes e após a incorporação, foram averiguadas em microscópio eletrônico de varredura – (SEM-FEG ENV) (FEI

Quanta) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) presente no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Foram avaliadas ampliações que variam de 5000 a 200000 x, com o objetivo de verificar a morfologia, possíveis modificações estruturais promovidas pela variação de temperatura e pela incorporação do fármaco e do colágeno.

#### **4.4 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO**

O ensaio de liberação *in vitro* do fármaco foi realizado em solução tampão fosfato (PBS), pH 7,4 e os biomateriais incorporados foram imersos em 5 mL desta solução. No monitoramento da liberação inicial, também conhecida como *burst* foram retiradas alíquotas de 0,5 mL em intervalos de 1, 4, 7, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 e 300 minutos. O volume retirado foi substituído por nova solução de PBS para a manutenção da condição *sink*, condição que é mantida para evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste (GIBALDI; FELDMAN, 1967).

A quantidade de fármaco liberada, foi quantificada usando espectroscopia UV-Vis no comprimento de onda de 270 nm, comprimento do grupo cromóforo do fármaco (CS). A concentração do CS foi calculada com base na curva de calibração obtida para o fármaco em solução de PBS.

Após a quantificação da massa liberada, construiu-se uma curva de porcentagem de massa cumulativa liberada em função do tempo para cada condição experimental investigada. A porcentagem em massa foi calculada pela massa cumulativa de fármaco liberada em PBS, dividida pela quantidade total de fármaco incorporado.

#### **4.5 ENSAIO DE OSSEOINTEGRAÇÃO *IN VITRO***

Após a incorporação, os filmes foram submersos em uma solução de SBF, preparada de acordo com Kokubo (1991). Na preparação de 1000 mL de solução SBF, utilizou-se 750 mL de água ultra-pura, e os sais correspondentes na Tabela 3. Os mesmos foram diluídos em banho-maria em ordem correspondente ao da Tabela 3, à temperatura de 37 °C, sob agitação até a dissolução completa dos sais. É necessário a etapa de ajuste do pH resultante para pH 7,40, com solução de

ácido clorídrico, antes de realizar a aferição do volume em um balão volumétrico, pois um dos sais é agente tamponante, tornando a solução básica.

Como a solução recém preparada é superconcentrada, para verificar sua estabilidade, esta deve ser mantida sob refrigeração por no mínimo 6 horas e ser armazenada em um frasco âmbar. Se ocorrer precipitação, a solução deve ser descartada, devido a concentração que será menor que a original, não podendo simular a deposição de hidroxiapatita (HA) no corpo humano.

Na realização do teste de imersão, as amostras incorporadas foram secas em estufa, à temperatura de 30 °C e em seguida, adicionadas à solução de SBF a 37 °C. Os substratos (amostras incorporadas) e a solução de PBS permaneceram imersas durante duas semanas, para que os cristais de HA se desenvolvessem na superfície dos biomateriais, conforme descrito pela metodologia de Kokubo (1991). Posteriormente é feita a análise de difração de raio X para a confirmação da deposição deste mineral sintético na superfície dos nanotubos de TiO<sub>2</sub>.

**Tabela 3: Formulação para solução SBF**

<b>Substância</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Água</b>	750 mL
<b>NaCl</b>	7,996 g
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	0,350 g
<b>KCl</b>	0,224 g
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O</b>	0,228 g
<b>MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	0,305 g
<b>1 kmol/m<sup>3</sup> HCl</b>	40 cm <sup>3</sup>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,278 g
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,071 g
<b>(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub></b>	6,057 g
<b>1 kmol/m<sup>3</sup> HCl</b>	Volume adequado ao ajuste de pH

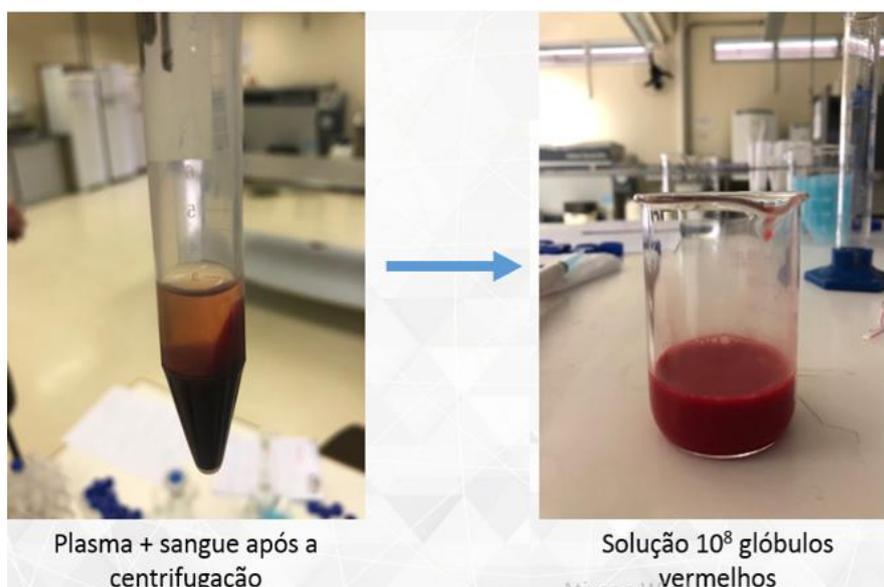
**FONTE: KOKUBO 1991**

#### **4.6 ENSAIO DE HEMÓLISE**

O ensaio hemolítico foi realizado de acordo com Bulmus et. al.,(2003) adaptado para o filme de TiO<sub>2</sub>. Neste ensaio, um volume de 4 mL de sangue

humano foi recolhido em um frasco contendo EDTA, para que o sangue não coagule, e em seguida, o mesmo foi centrifugado por 10 minutos sob refrigeração. O plasma foi removido e os eritrócitos lavados três vezes em uma solução salina 0,9%, de acordo com Bulmus et al. (2003). Após a lavagem final, os eritrócitos foram ressuspensos em tampão fosfato 100 mM (PB) no pH 7,4 e diluídos para 10% de sua concentração inicial, o que resultou em uma solução com  $10^8$  eritrócitos por 200  $\mu$ L (Figura 9). Em tubos Falcon de 15 mL, os NNTs de  $\text{TiO}_2$  foram misturados em 2,4 mL de PB e 0,6 mL de solução de hemácias  $10^8$  células/200  $\mu$ L (BULMUS, 2003; PALANIVELU; RUBAN KUMAR, 2014), em seguida, incubados por 1 h a 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm a 6 °C. Após a centrifugação, os eritrócitos intactos e as células globulares vermelhas rompidas são eliminadas, enquanto a hemoglobina permanece suspensa na solução. O sobrenadante é coletado e a absorbância é medida a 541 nm, cromóforo da hemoglobina. Utilizaram-se soluções de Triton-X (1% em massa) como controle positivo para hemólise e tampão fosfato a um pH apropriado como controle negativo.

Se as amostras apresentam atividade hemolítica, as hemácias são rompidas, permitindo que a hemoglobina escape para a solução.



**Figura 9: Representação do teste de hemólise. Fonte: Autor.**

A atividade hemolítica é calculada através da porcentagem de hemólise, dada pela equação a seguir:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco})}{\text{absorbância do controle positivo}} \times 100$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE ELETROQUÍMICA

Através das curvas cronoamperométricas, que mostram a variação da corrente elétrica (mA) pelo tempo (s), destaca-se que na condição de temperatura de 50° C aplicada a um tempo de anodização de 2 horas, tempo proposto no projeto de trabalho de conclusão de curso, não houve comportamento estacionário, indicando infiltração e corrosão do substrato, devido a temperatura da solução eletrolítica e a quantidade de íons cloreto presentes na solução, pois neste parâmetro a cinética de dissolução do óxido acelerou, devido a presença dos íons, formando uma camada de óxido compacta, ou superfícies com corrosão acentuada e morfologia heterogênea (Figura 10). Deste modo, reduziu-se o tempo de anodização para 20 minutos, pois pela Figura 10, até este tempo o filme não apresenta indícios de corrosão extrema, apesar de ser tempo de síntese menor, acaba sendo positivo para o processo até a formação dos NNTs.

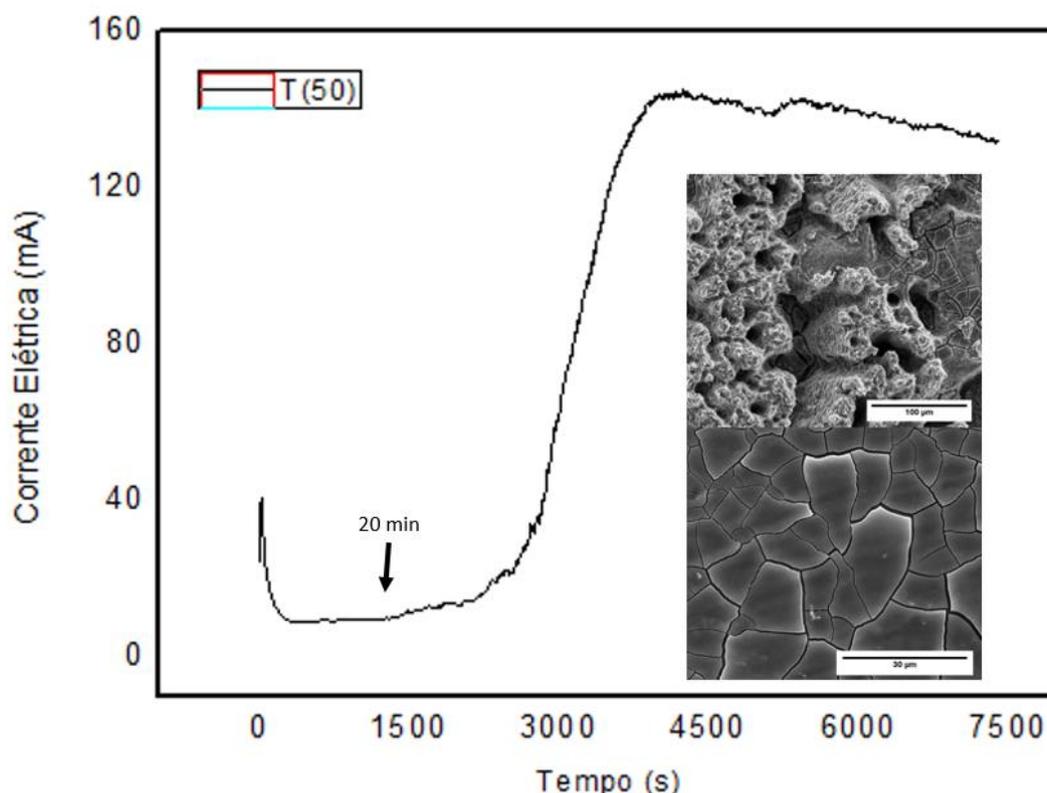


Figura 10: Curva eletroquímica referente a amostra sintetizada em solução organo-aquosa contendo 0,75% (m/m) de  $\text{NH}_4\text{F}$  à 50 °C, no tempo de anodização de 2 h. Fonte: Autor.

Através das curvas cronoamperométricas é possível observar três estágios: no primeiro ocorre uma formação da camada de óxido, em seguida, no segundo estágio, há um leve aumento da corrente elétrica na curva eletrolítica devido a nucleação dos nanotubos. Após o mínimo de corrente o sistema atinge o estado estacionário, onde há o crescimento vertical e alinhado dos nanotubos, atingindo o terceiro estágio, onde a densidade de corrente é estabilizada quando o equilíbrio das reações de oxidação e dissolução são alcançadas (MACAK et al., 2007).

Os perfis cronoamperométricos das curvas obtidas das Figura 11, Figura 12, apresentam características similares citadas na literatura (REGONINI et al., 2013).

Como na solução organo-aquosa tem-se a presença de íons fluoreto, há o ataque desses íons, solubilizando a barreira de óxido e levando à formação do complexo  $[\text{TiF}_6]^{2-}(\text{aq})$ . Nesta região, há nucleação das estruturas que variam de nanoporos a NNTs. Em seguida, há um leve aumento da corrente elétrica na curva eletroquímica, que é detectada em função da exposição do metal, ou onde o óxido possua uma região de menor espessura. Observa-se que nesta região da Figura 12, devido a cinética de dissolução do óxido ser maior, o comportamento potênciodinâmico torna-se diferente da Figura 11, ou seja, a intensidade dos picos são diferentes. Isto ocorre por influência da temperatura do banho potenciostático ser maior, o que resulta em materiais com uma maior área superficial e conseqüentemente uma menor espessura e maior diâmetro dos NNTs.. Conforme demonstrado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, pode-se observar que com o aumento da temperatura, o diâmetro dos nanotubos aumentou, porém não há diferença significativa estatisticamente.

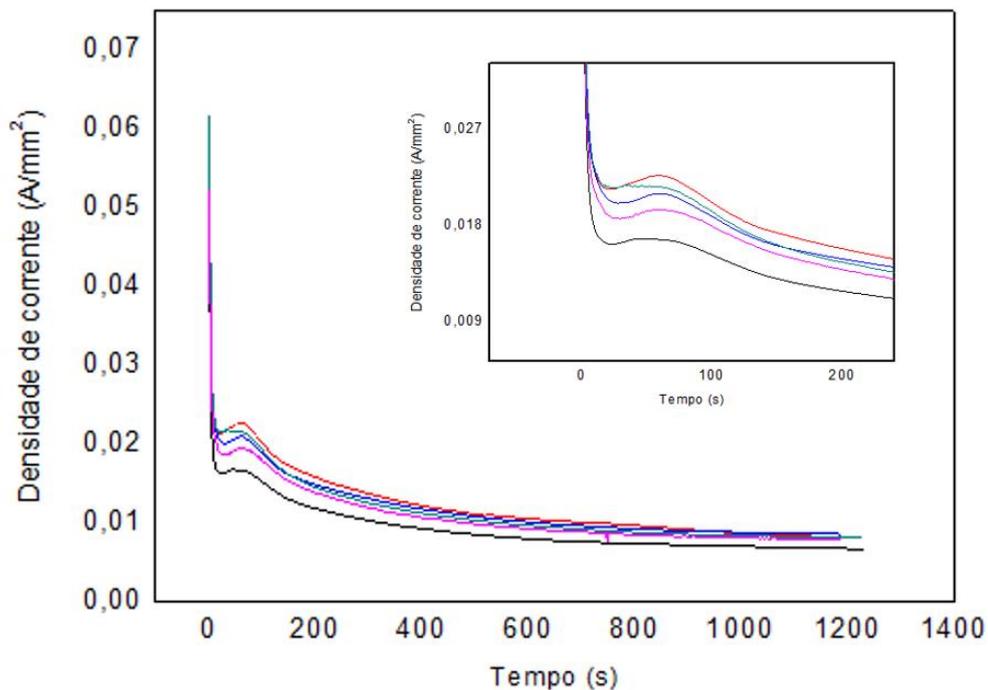


Figura 11: Curvas eletroquímicas (replicas) referentes às amostras sintetizadas em solução organo-aquosa contendo 0,75% (m/m) de  $\text{NH}_4\text{F}$  à 20 °C, no tempo de anodização de 20 minutos. Fonte: Autor.

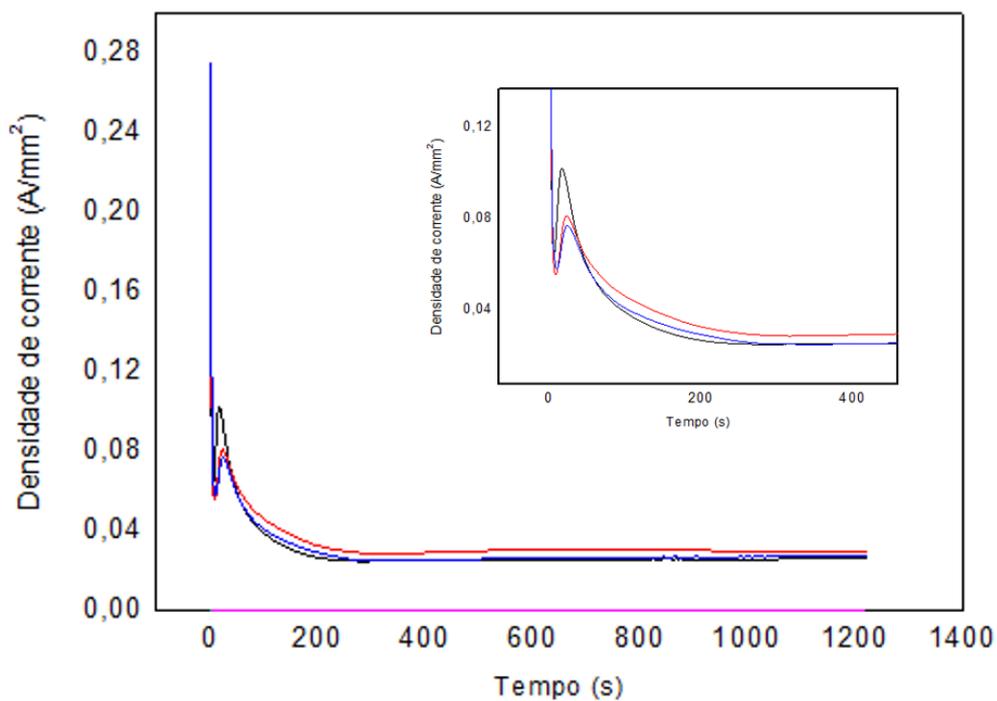


Figura 12: Curvas eletroquímicas (replicas) referentes às amostras sintetizadas em solução organo-aquosa contendo 0,75% (m/m) de  $\text{NH}_4\text{F}$  à 50 °C, no tempo de anodização de 20 minutos. Fonte: Autor.

Tabela 4: Diâmetro e espessuras dos nanotubos em ambas as condições estudadas. Fonte: Autor

Amostra	Diâmetro NNTs	Espessura da parede dos NNTs
T20	$60,977 \pm 8,241$	$11,323 \pm 3,923$
T50	$70,202 \pm 11,376$	$11,074 \pm 3,716$

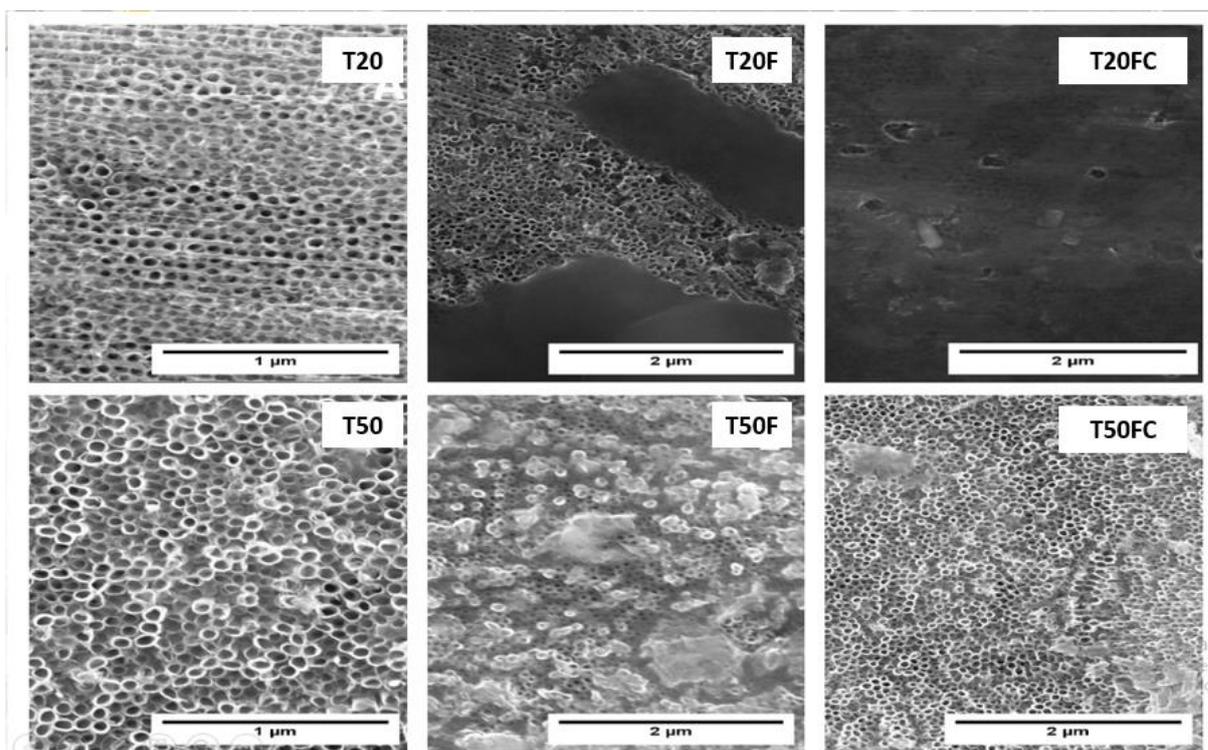


Figura 13: MEV referente as amostras sintetizadas em solução organo-aquosa a 25 V por 20 minutos: T20, T20F, T20FC, T50, T50F e T50FC. Fonte: Autor.

A técnica de MEV foi utilizada tanto para avaliar a morfologia quanto a estrutura dos substratos e óxidos superficiais, nas diferentes condições de síntese do óxido, bem como após a incorporação do fármaco e do colágeno.

Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, é possível observar as micrografias da área superficial das amostras obtidas após a anodização (T20 e T50), após a incorporação de cefazolina (T20F e T50F) e após a incorporação de cefazolina e colágeno (T20FC e T50FC)A cinética de dissolução do óxido é devido a aceleração do eletrólito na presença de íons fluoreto, causando a dissolução do

óxido de forma mais abrupta, em relação à síntese em banho estático, influenciando no acúmulo de óxido na superfície da Figura 13 (T20) que a cinética de dissolução foi mais lenta, não dissolvendo totalmente o óxido.

Na temperatura de 20 °C, observa-se que ocorreu um acúmulo do óxido na superfície dos nanotubos (Figura 13 T20), cujos diâmetro e espessura estão apresentados na **Erro! Fonte de referência não encontrada..** Provavelmente devido à este óxido residual, a incorporação do fármaco e do colágeno concentraram-se na superfície (T20F e T20FC) e não na estrutura interna dos nanotubos. Este resultado influenciará posteriormente na liberação da droga, tornando-se maléfica, pois grande parte da droga será liberada nos primeiros minutos do experimento. Por outro lado, a Figura 13 (T20FC), mostra uma deposição menor de fármaco na superfície, bem como uma película colágeno nos NNTs (SINN AW; GULATI; LOSIC, 2011).

As micrografias dos substratos anodizados a 50 °C apresentaram áreas com formação homogênea de NNTs, com diâmetro uniforme e regulares na área da superfície dos filmes (Figura 13 T50). Já na incorporação do fármaco, devido a ordenação, a maior parte da droga incorporada situa-se na parte estrutural do nanotubo e não na superior, conforme pode ser verificado na Figura 13 (T50F). A Figura 13 (T50FC) confirma a deposição da membrana de barreira de colágeno do tipo I sobre os NNTs.

O substrato, Titânio metálico, foi conduzido a anodização potencioestática, induzindo a formação de nanotubos, permitindo uma texturização semelhante a estrutura encontrada no osso humano (MACAK et al., 2007). Observa-se que a melhor condição de síntese neste estudo, foi na temperatura de síntese eletroquímica anodizada à 50 °C por 20 minutos.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO

A análise de microscopia eletrônica de varredura, Figura 14, confirma a presença de estruturas fibrilares na amostra de colágeno estudada, conforme descrito anteriormente por ABRAHAM et al., (2008).

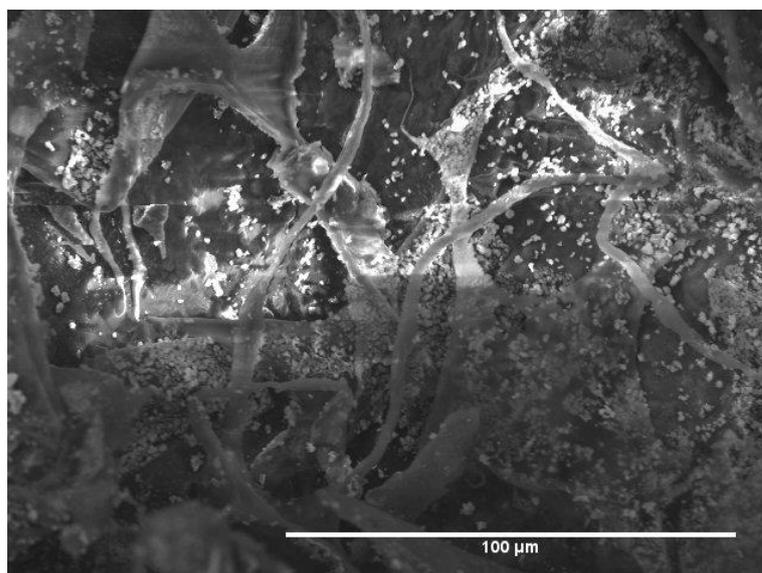


Figura 14: MEV da amostra de colágeno extraído do tendão bovino. Fonte: Autor.

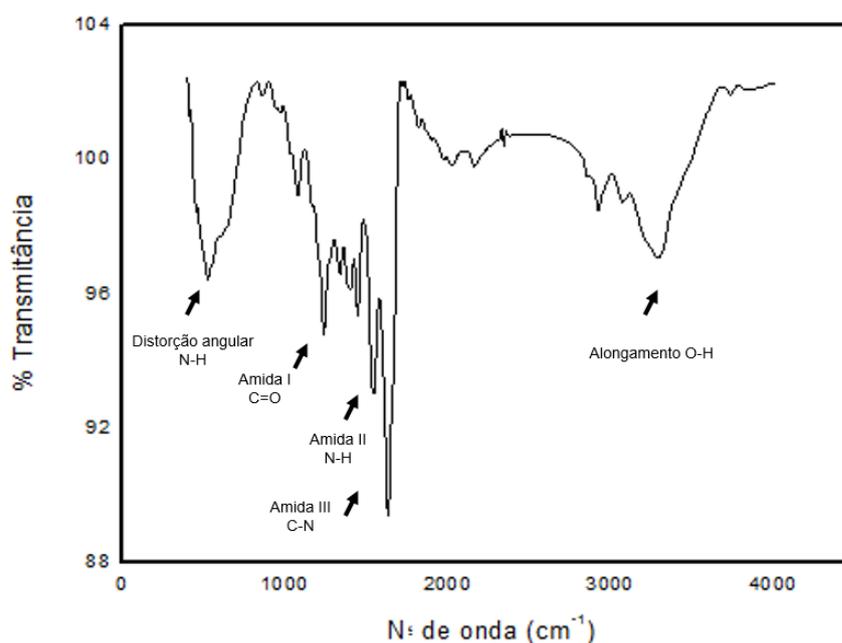


Figura 15: Espectro infravermelho de colágeno solúvel em ácido de tendão bovino usando duas proporções de tendão bovino. Fonte: Autor.

A conformação deste colágeno forma três subunidades polipeptídicas, apresentando uma conformação de hélice tripla e uma estrutura composta de cadeias que são ligadas por uma ligação de hidrogênio forte, elas se ligam devido a sua estrutura molecular semelhante (CHAPMAN et al., 1990).

O espectro vibracional FTIR, Figura 15, mostrou a estrutura da tripla hélice do colágeno, através da relação das absorvâncias medidas entre 1250 e 1450  $\text{cm}^{-1}$ , devidas à função orgânica amida (BET; GOISSIS; PLEPIS, 1997). As amostras de

colágeno mostraram bandas características de colágeno do tipo I. As ligações de hidrogênio entre as proteínas do colágeno ocorrem entre os grupos hidroxila e carboxila, presente nas três cadeias peptídicas e são responsáveis por manter a estabilidade da tripla hélice. Já os grupos da função orgânica amida (I, II, III) apresentam vibrações características na região entre 1530-1630  $\text{cm}^{-1}$ . (CHANG; TANAKA, 2002).

### 5.3 LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

A liberação do fármaco pode ser descrita por fases. A primeira mostra a liberação “burst”, exemplificada na Figura 16, responsável pela difusão das moléculas do fármaco que estão na parte superior, ou seja, na superfície dos NNTs. Nesta etapa ocorre a liberação de grande parte da cefazolina sódica logo nos primeiros minutos do experimento, cerca de 50 %, para os substratos T20F e T20FC, e 30 % para os substratos T50F e T50FC, em solução PB. Esta liberação é dada pela explosão inicial denotada pela parte reta da curva da Figura 15, onde o coeficiente angular é a derivada da concentração que varia diretamente com o tempo.

Pela Tabela 5, pode-se observar que a liberação burst não tem diferença significativa estatisticamente, nota-se que na amostra T20FC, o colágeno atuou como barreira, diminuindo o percentual em 5% nos primeiros minutos de liberação quando comparada a amostra T20F. Para a amostra T50FC, após a liberação *burst* a taxa se tornou constante e diminutiva, e deste modo, o colágeno atuou como barreira difusional nas duas as condições.

Observa-se que para as condições, do fármaco e o fármaco mais colágeno, o comportamento é semelhante, mostrando um pequeno desvio para cada uma, conforme descrito na Tabela 5, onde pode ser evidenciado que o carregamento com colágeno funciona como uma barreira de difusão para o fármaco, diminuindo a taxa de liberação.

**Tabela 5: Média do coeficiente angular  $m$  versus  $t$  e desvio- padrão de ambas as condições na liberação "burst".**

<b>Amostras</b>	<b>Média (%)</b>	<b>Desvio - padrão</b>
<b>T20F</b>	60,87891	6,03917

<b>T20FC</b>	55,28502	5,59899
<b>T50F</b>	35,00188	7,64708
<b>T50FC</b>	38,79411	5,57866

Fonte: Autor.

Já a adição de colágeno, nas duas temperaturas de síntese, serviu como membrana de barreira difusional, fazendo com que a adição de uma película em dispositivos pra entrega de drogas fosse liberada mais lentamente.

Estudos prévios (SIMON; SIKORA, 2018), mostraram que em substratos anodizados em temperaturas elevadas, ou seja, 50 °C, a hidrofobicidade é maior, influenciando na molhabilidade do material. Um filme com maior hidrofobicidade faz com que o fármaco se torne menos solúvel em água, dificultando na dissolução fazendo com que a taxa de liberação diminua. Ao contrário de temperaturas mais baixas, à 20 °C, o material torna-se mais hidrofílico, a água interage mais com o fármaco, fazendo com que dilua o mesmo e a taxa de liberação aumente.

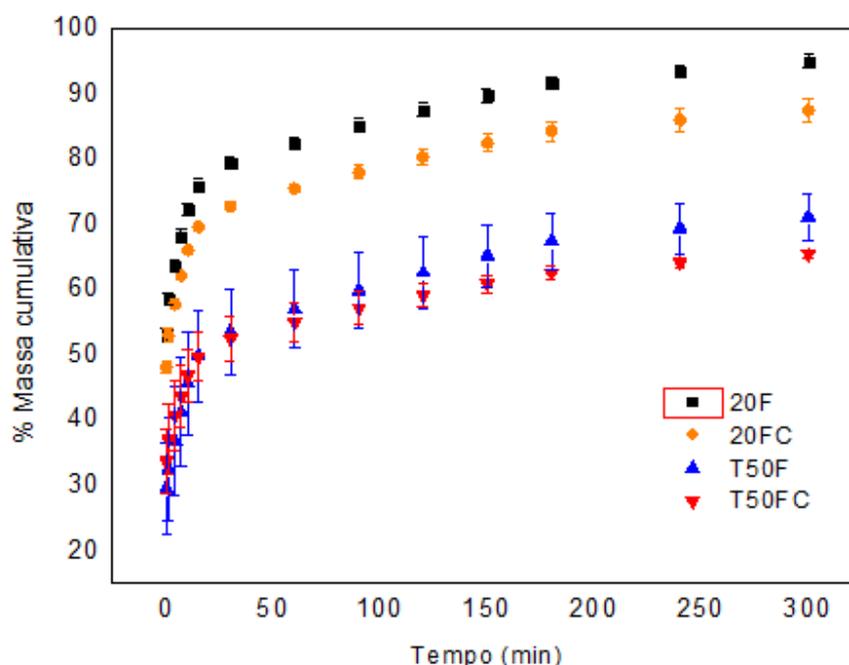


Figura 16: Liberações do fármaco e fármaco mais colágeno, a partir dos nanotubos de dióxido de titânio, em solução tampão fosfato (PBS). Fonte: Autor.

Na segunda fase, a liberação foi mais lenta, conforme apresenta a Figura 16, onde houve uma liberação cumulativa linearmente crescente, e o mecanismo de difusão foi controlado devido as estruturas longas dos NNTs. (AW et al., 2012).

Os perfis de liberação de fármacos a partir dos NNTs para amostras com colágeno depositadas na superfície do filme, resultou em uma liberação mais lenta da droga, em ambas as condições estudadas, conforme pode-se observar claramente na Figura 16. Além disso, outra vantagem deste recobrimento é o fornecimento de propriedades desejáveis ao implante, tal como uma melhor interação, reduzindo o risco de rejeição do implante e aumentando a biocompatibilidade (AW et al., 2012).

Estudos anteriores, mostraram que em outras condições, como mudanças no tempo de anodização (tempos maiores), nas temperaturas próximas a este estudo e com tratamento térmico, o fármaco foi liberado totalmente nos primeiros 7 minutos de experimento (SIMON; SIKORA, 2018). Em contraste com os resultados apresentados neste trabalho, observa-se que mesmo para os filmes sem recobrimento com colágeno, o tempo de liberação foi pelo menos 43 vezes menor, o que indica uma grande otimização das condições de síntese do biomaterial.

Comercialmente, o investimento financeiro diminuiria consideravelmente comparado aos estudos do próprio grupo de pesquisa, além de diminuir o tempo de anodização na síntese eletroquímica, o fármaco não foi liberado 100 % nas 5 horas de experimento, tornando um método mais viável e positivo para o mercado.

Os filmes sintetizados a 50 °C, mostraram uma taxa de liberação da droga menor, a análise da morfologia dos filmes (Figura 13), indica que devido ao fármaco ter sido incorporado mais na estrutura do NNTs, do que na superfície, a taxa liberação foi menor, ao contrário dos filmes sintetizados a 20 °C, onde o a fármaco incorporado, situou-se mais na superfície do NNTs, fazendo com que a taxa de liberação fosse maior.

A liberação do fármaco mostra-se eficiente quando a taxa de liberação é a mais lenta possível, sendo assim, conclui-se que o melhor resultado foi observado para o substrato T50FC.

#### **5.4 ENSAIO DE OSSEOINTEGRAÇÃO *IN VITRO***

O teste de imersão em SBF, simulando o fluido corporal humano, é mensurado pela quantidade de cálcio depositada sobre a superfície do implante. Esta deposição pode ser correlacionada à osseointegração de biomateriais no organismo humano. No caso da anodização, a presença do fluoreto pode induzir a precipitação

da fluorapatita (FA) que pode ser intensificada pela modificação da área superficial do filme (BHADANG; GROSS, 2004).

Os substratos T20 e T50, nas figuras 16 e 17, mostram-se mais favoráveis ao recobrimento com FA, devido a presença dos íons flúor, o mesmo aumenta o grau de supersaturação do fluido corporal simulado, fazendo com que ocorra a nucleação da apatita na superfície do filme, aderindo-se no mesmo, e se ligando ao osso humano KOKUBO, (1991).

Nas figuras 16 e 17, os difratogramas na região entre os ângulos  $2\theta$  34 e 36, observa-se um pequeno pico, que pode ser um indicativo de que houve a deposição de fluorapatita (FA) proveniente da hidroxiapatita (HA), que constitui um mineral ósseo inorgânico proveniente do tecido duro humano. Biomaterias que induzam a formação da FA são interessantes pois promovem a regeneração óssea e consequentemente a bioaceitação (BHADANG; GROSS, 2004).

O flúor é uma das impurezas mais importantes da HA dos tecidos calcificados. Pode ser incorporado a FA substituindo os grupos OH-, tornando a estrutura mais rígida, mais estável e menos solúvel que a hidroxiapatita estequiométrica. A ação do flúor na proteção de cáries dentárias e no tratamento de osteoporose tem sido muito pesquisada (BHADANG; GROSS, 2004).

Para os filmes T20F, T20FC, T50F e T50FC, não houve adesão do mineral sintético FA em uma superfície com adição de um material orgânico, pois os sítios ativos da matriz de óxido já foram ocupados, pelo fármaco e o colágeno.

De qualquer forma o fármaco e o colágeno auxiliam na regeneração de tecidos e na adesão de células, como os osteoblastos, que incluem na síntese de proteínas na matriz extracelular, melhorando na adesão e na ancoragem óssea, auxiliando na osseointegração (JIN et al., 2016).

A nucleação de fosfatos de cálcio, como a HA e a FA, na superfície de óxidos de Titânio apresenta alta relevância em aplicações médicas de biomateriais, pois os nanotubos auxiliam na ancoragem óssea.

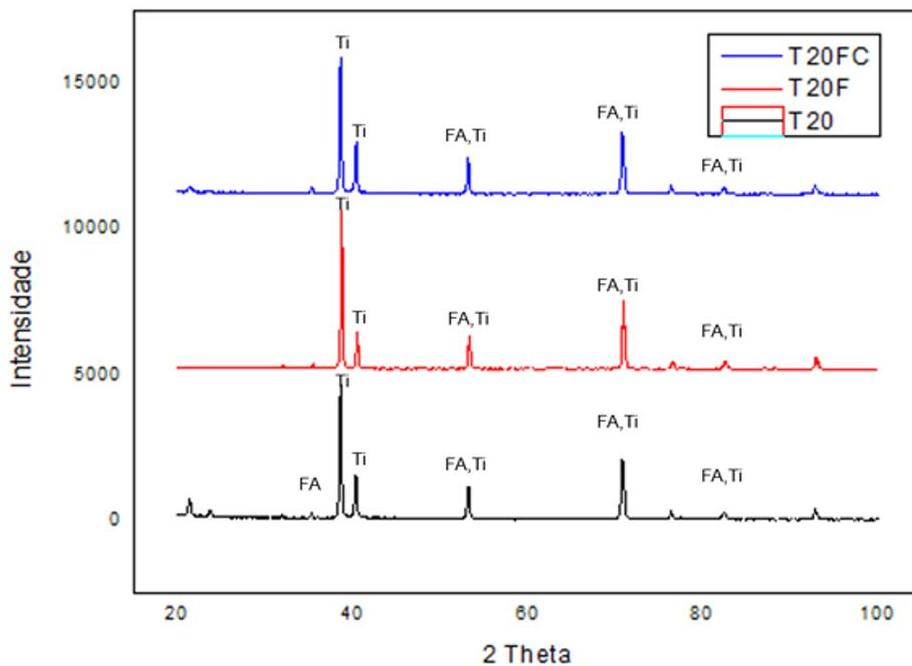


Figura 17: Difratoograma da superfície de Titânio (T20), incorporado com fármaco (T20F) e incorporado com fármaco mais deposição de colágeno (T20FC). Fonte: Autor

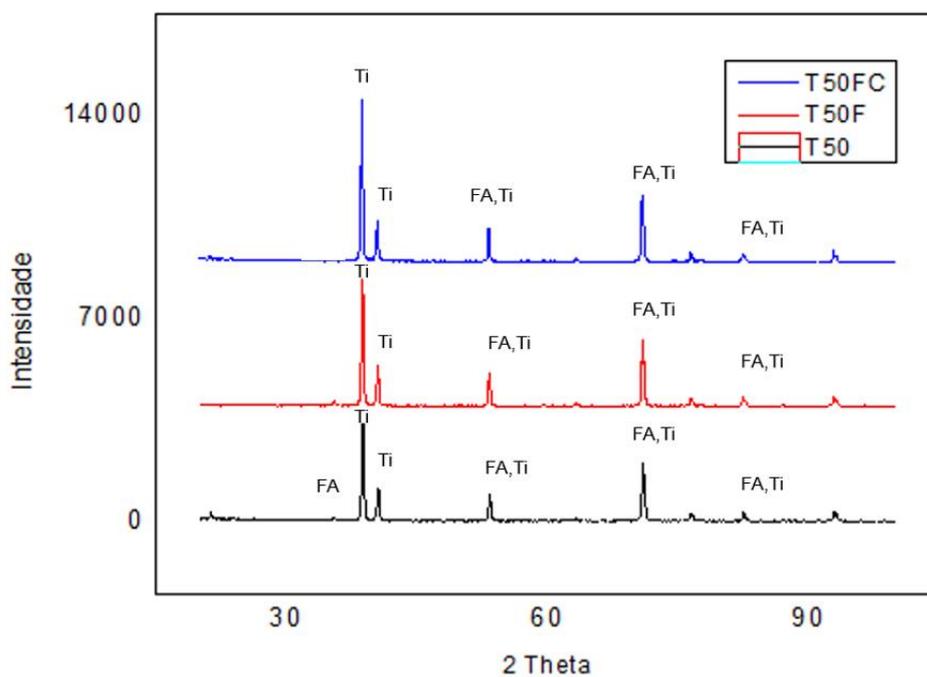


Figura 18: Difratoograma da superfície de Titânio (T50), incorporado com fármaco (T50F) e incorporado com fármaco mais deposição de colágeno (T50FC). Fonte: Autor

## 5.5 ENSAIO DE HEMÓLISE

A atividade hemolítica foi testada em pH 7,4 pois, segundo Bulmus (2003), com o aumento do pH, a capacidade de ruptura da membrana diminui. Sendo assim, a hemólise ocorre dependendo de um equilíbrio apropriado de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, devido ao contato entre  $TiO_2$ /fármaco,  $TiO_2$ /fármaco/Colágeno e os eritrócitos. O efeito de várias amostras em relação a atividade hemolítica é mostrado na Figura 19.

A taxa de hemólise para os filmes T20, na condição da temperatura de 20 °C, é de aproximadamente 4,5 %, com adição de fármaco e colágeno está taxa decaiu para 2,0-1,5 %, aumentando a biocompatibilidade dos filmes, demonstrado pela Tabela 6. Já os substratos na condição de 50 °C, não houve diferença significativa na taxa de hemólise.

Quanto menor é a porcentagem de atividade hemolítica mais biocompatível o filme se torna. Comparando com os valores Palanivelu et. al., (2014), os resultados deste estudo mostraram-se melhores, uma vez que a atividade hemolítica é comparável ao controle negativo, indicando uma atividade hemolítica mínima para as condições sintetizadas.

**Tabela 6: Porcentagem de hemólise comparadas ao controle positivo (Triton X) e ao controle negativo (PB).**

<b>Amostras</b>	<b>Atividade hemolítica (%)</b>
<b>Triton X</b>	100
<b>PB</b>	0,804
<b>T20</b>	4,27
<b>T20F</b>	1,82
<b>T20FC</b>	1,59
<b>T50</b>	1,76
<b>T50F</b>	1,38
<b>T50FC</b>	1,46

**Fonte: autor.**

Em ambas as condições, as amostras não sofreram hemólise severa, quando comparados aos controles positivos e negativos (Figura 20, Figura 21, Figura 22), de acordo com Bulmus (2003), não sofrendo a degradação dos eritrócitos.

Os resultados comprovam que os filmes sintetizados apresentaram atividade hemolítica negativa, provando ser um implante de entrega de drogas biocompatível,

não quebrando os eritrócitos, ou seja, não promovendo um hemorragia local após a colocação dos implantes.

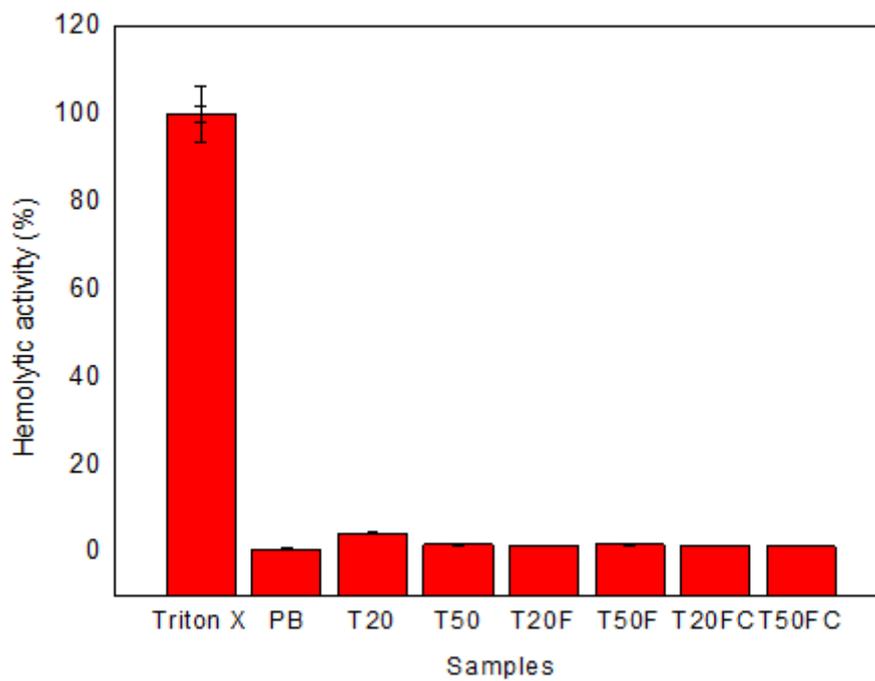


Figura 19: Atividade hemolítica dos substratos. Fonte: Autor

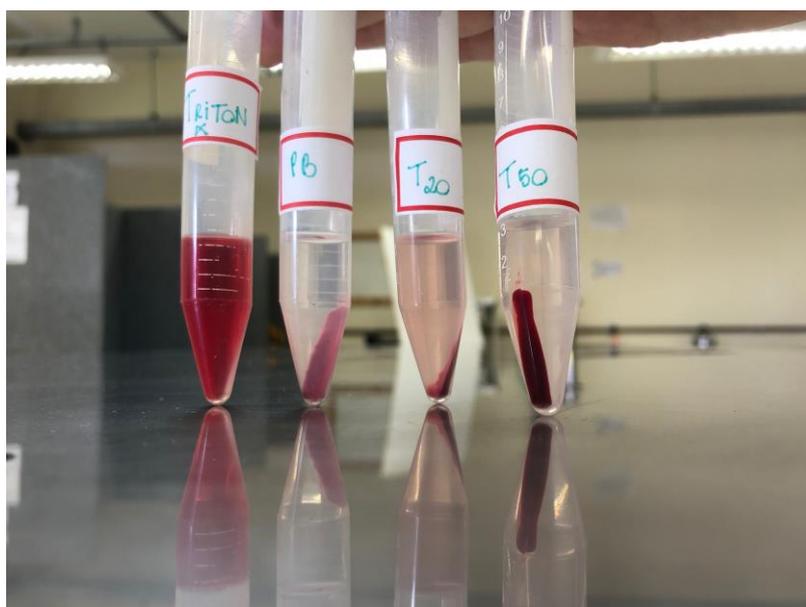


Figura 20: Atividade hemolítica dos substratos de titânio puros. Fonte: Autor

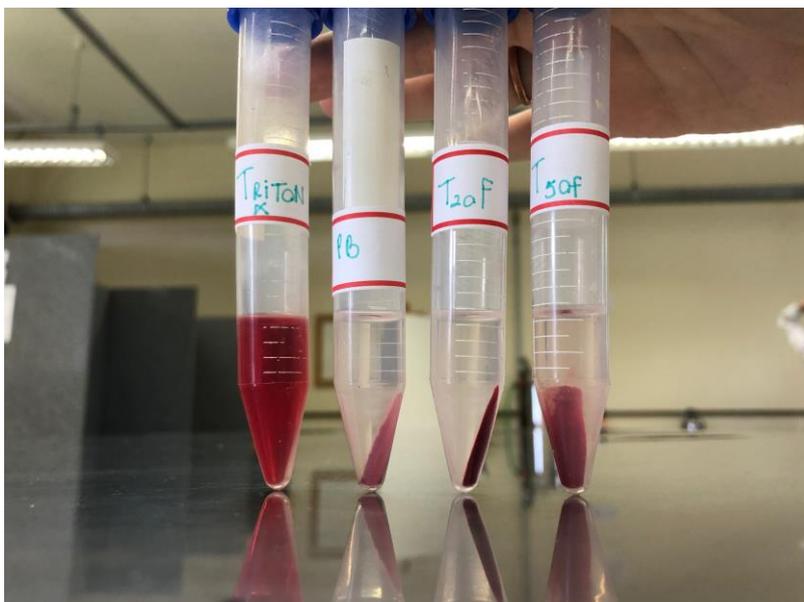


Figura 21: Atividade hemolítica dos substratos incorporados com fármaco CS. Fonte: Autor



Figura 22: Atividade hemolítica dos substratos incorporados com fármaco CS e colágeno. Fonte: Autor

## 7. CONCLUSÃO

Neste estudo, o MEV comprovou a presença de nanotubos em ambas as condições de síntese, a melhor formação foi à 50 °C, devido a velocidade de dissolução do óxido ser maior, não formando um acúmulo de óxido superficial, caso ocorrido na síntese à 20 °C.

Adição de uma membrana de colágeno como barreira, faz com que a taxa de liberação seja mais lenta nas duas condições de síntese estudada, indicando que esta biomolécula é uma boa alternativa para a diminuição da taxa de liberação de fármacos incorporados em implantes. A melhor liberação foi o substrato, T50FC, pois além da adição de uma membrana de barreira como o colágeno, a maior parte do fármaco incorporou-se na estrutura dos NNTs.

A análise de DRX, comprova que houve a deposição do mineral sintético FA, na superfície dos substratos metálicos T20 e T50. Este resultado indica que os filmes sintetizados podem facilitar a adesão de células ósseas, auxiliando no fenômeno de osseointegração

## 6 REFERÊNCIAS

ANVISA. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição**, São Paulo: Ed. NCCLS, v. 23, n. 1, jn. 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)>. Acesso em: 18 jun. 2018.

(**ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA, 2018**). Disponível em: <<https://global.britannica.com/science/titanium>>. Acesso em: 8 jun. 2018.

ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 1, n. 4, p. 233–238, nov. 1990.

ABRAHAM, L. C. et al. Guide to collagen characterization for biomaterial studies. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 87B, n. 1, p. 264–285, 1 out. 2008.

ALMEIDA FILHO, E. DE [UNESP]. Plataforma inorgânica a base de apatitas de interesse biológico visando à liberação controlada de fármacos. **Aleph**, p. 121 f. : il., 20 jan. 2012.

AW, M. S. et al. Characterization of drug-release kinetics in trabecular bone from titania nanotube implants. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4883–4892, 2012.

BERGER, S. et al. The origin for tubular growth of TiO<sub>2</sub> nanotubes: A fluoride rich layer between tube-walls. **Surface Science**, v. 605, n. 19–20, p. L57–L60, 1 out. 2011.

BET, M. R.; GOISSIS, G.; PLEPIS, A. M. DE G. Compósitos colágeno aniônico: fosfato de cálcio. Preparação e caracterização. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 475–477, out. 1997.

BHADANG, K. A.; GROSS, K. A. Influence of fluorapatite on the properties of thermally sprayed hydroxyapatite coatings. **Biomaterials**, v. 25, n. 20, p. 4935–4945, 1 set. 2004.

BRADLEY, W. G.; WILKES, G. L. Some Mechanical Property Considerations of Reconstituted Collagen for Drug Release Supports. **Biomaterials, Medical Devices, and Artificial Organs**, v. 5, n. 2, p. 159–175, 11 jan. 1977.

- BULMUS, V. 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, 5 dez. 2003.
- CHANG, M. C.; TANAKA, J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. **Biomaterials**, v. 23, n. 24, p. 4811–4818, 2002.
- CHAPMAN, J. A. et al. The collagen fibril—A model system for studying the staining and fixation of a protein. **Electron Microscopy Reviews**, v. 3, n. 1, p. 143–182, 1 jan. 1990.
- DE CASTRO, K. C. et al. Obtention and Characterization of Collagen and Chitosan Based Cements for Bone Regeneration. Part 1: Extraction and Characterization of Collagen. **Materials Science Forum**, v. 775–776, n. November, p. 29–33, 2014.
- DEEN, K. M. et al. Effect of electrolyte composition on TiO<sub>2</sub> nanotubular structure formation and its electrochemical evaluation. **Electrochimica Acta**, v. 117, p. 329–335, 20 jan. 2014.
- Friess, W. (1998). Collagen – biomaterial for drug delivery1Dedicated to Professor Dr. Eberhard Nürnberg, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, on the occasion of his 70th birthday.1. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45(2), 113–136. doi:10.1016/s0939-6411(98)00017-4
- FUJIOKA, K. Protein release from collagen matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n. 3, p. 247–266, 1998.
- GIBALDI, M.; FELDMAN, S. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, n. 10, p. 1238–1242, 1967.
- GULATI, K.; AW, M. S.; LOSIC, D. Drug-eluting Ti wires with titania nanotube arrays for bone fixation and reduced bone infection. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, p. 1–6, 2011.
- JIN, M. et al. Enhanced bond strength and bioactivity of interconnected 3D TiO<sub>2</sub> nanoporous layer on titanium implants. **Surface and Coatings Technology**, v. 304, p. 459–467, 25 out. 2016.
- KOKUBO, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. **Biomaterials**, v. 12, n. 2, p. 155–163, 1991.
- MACAK, J. M. et al. TiO<sub>2</sub>nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 11, n. 1–2, p. 3–18, 2007.

MACAK, J. M. et al. TiO<sub>2</sub> nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 11, n. 1–2, p. 3–18, 1 fev. 2007b.

MORRA, M. et al. Surface analysis and effects on interfacial bone microhardness of collagen-coated titanium implants: a rabbit model. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 20, n. 1, p. 23–30, 2005.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, v. 65, n. 15–16 SPEC. ISS., p. 2385–2406, 2005.

OLIVEIRA, L. L. Incorporação de Clorexidina na Superfície da liga Ti-7,5Mo após o crescimento de Nanotubos de TiO<sub>2</sub>. 27 jul. 2016.

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**, v. 3, n. 3, p. 1863–1887, 16 mar. 2010.

REGONINI, D. et al. A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO<sub>2</sub> nanotubes. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 74, n. 12, p. 377–406, 1 dez. 2013.

RENZ, R. P. Avaliação da osseointegração de implantes de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfícies. 2007.

ROY, P.; BERGER, S.; SCHMUKI, P. TiO<sub>2</sub> nanotubes: Synthesis and applications. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 13, p. 2904–2939, 2011a.

ROY, P.; BERGER, S.; SCHMUKI, P. TiO<sub>2</sub> Nanotubes: Synthesis and Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 13, p. 2904–2939, 21 mar. 2011.

SIMON, A. P.; SIKORA, M. DE S. **ELETRÓLITO PARA SÍNTESE ELETROQUÍMICA DE BIOMATERIAIS A BASE DE TITÂNIO**Brazil, 2018.

SINN AW, M.; GULATI, K.; LOSIC, D. Controlling Drug Release from Titania Nanotube Arrays Using Polymer Nanocarriers and Biopolymer Coating. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, p. 477–484, 2011.

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

SOUNDRAPANDIAN, C.; SA, B.; DATTA, S. Organic–Inorganic Composites for Bone Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, p. 1158–1171, 20 dez. 2009.

VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, n. 1–2, p. 1–31, 2004.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897–5909, 2009.