

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CAMPUS SOROCABA

CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE - CCTS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS



PAULA PRENHOLATTO LOPES

SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS À PARTIR DE FILMES

NANOTEXTURIZADOS DE TiO₂

Sorocaba

2021

PAULA PRENHOLATTO LOPES

**SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS À PARTIR DE FILMES
NANOTEXTURIZADOS DE TiO₂**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Orientação: Prof. Dr. Francisco Trivinho-Strixino

Financiamento: CAPES

Sorocaba

2021

Lopes, Paula Prenholatto

Sistema de liberação de substâncias a partir de filmes nanotexturizados de TiO₂ / Paula Prenholatto Lopes -- 2021.
73f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Francisco Trivinho Strixino
Banca Examinadora: Mariana de Souza Sikora, Walter Ruggeri Waldman
Bibliografia

1. Nanotubos de titânio. 2. Liberação de fármacos. I. Lopes, Paula Prenholatto. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Paula Prenholatto Lopes, realizada em 30/08/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Francisco Trivinho Strixino (UFSCar)

Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman (UFSCar)

Profa. Dra. Mariana de Souza Sikora (UTFPR)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. À minha mãe Solange, pelo cuidado e dedicação, que me deram esperança para seguir. Ao meu pai Sergio, pela sua presença que significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades concedidas durante minha caminhada na universidade, por sempre estar ao meu lado me iluminando e me protegendo.

Agradeço também aos meus pais por todo o apoio, dedicação e por sempre confiarem em mim.

Ao meu orientador, prof^o. Dr. Francisco Trivinho-Strixino, pelo empenho dedicado à elaboração não somente deste trabalho, mas pelos quase 7 anos que tenho tido a oportunidade de desenvolver outros estudos junto ao seu grupo e sua coordenação. Obrigada por acreditar em mim.

A prof^a. Dr^a. Mariana S. Sikora e a Anna Paulla Simon pelas dicas, reuniões, apoio concedido e por cederem seu tempo para me ajudar com este trabalho.

Aos amigos de laboratório e do grupo de pesquisa por toda ajuda e conhecimento compartilhado. Em especial a Patrícia S. Araújo e a Yasmin B. Pissolitto, pela amizade e incentivo. Também dedico um agradecimento especial aos alunos que já passaram pelo grupo, em especial a Lory C. Carossi, pelo apoio com esse trabalho.

Aos colegas e professores do programa, por me proporcionarem o conhecimento no processo de minha formação acadêmica.

A minha amiga de longa jornada da química e agora, da vida, Blenda Orsi, por compartilhar de todas as experiências acadêmicas comigo, sempre me ouvindo e me apoiando.

A CAPES pela bolsa concedida.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação, o meu muito obrigada.

*O sucesso nasce do querer, da determinação
e da persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo
não atingindo o alvo, quem busca e vence
obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis*

(José de Alencar)

RESUMO

LOPES, P. P. Sistema de liberação de substâncias à partir de filmes nanotexturizados de TiO₂. 2021. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Materiais – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2021.

Pesquisas envolvendo sistemas de liberação de fármacos baseados em nanotubos de TiO₂ sugerem um grande potencial como plataforma a ser utilizada na área biomédica, principalmente devido à sua biocompatibilidade. Os fármacos carregados nas nanoestruturas também constituem uma parte importante do tratamento pós-operatório para combater a rejeição da prótese por adesão bacteriana. Focar em agentes terapêuticos naturais para combater infecções microbianas parece ser uma fonte alternativa promissora. Os fitoquímicos presentes nas plantas medicinais, desempenham um papel importante na determinação da atividade microbiana. O presente estudo visa modificar a superfície do Ti comercialmente puro (99,5%) por meio da formação de nanotubos de TiO₂ por oxidação anódica. A solução eletrolítica usada contém íons fluoreto e solução de Fluido Corporal Simulado (SBF) melhorando a biocompatibilidade da superfície. As amostras foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e ângulo de contato (CA). Após a formação dos nanotubos, solução aquosa de azul de metileno e soluções etanólicas de extrato de própolis verde (ApisFlora® 70%) e eugenol (Biodinâmica®) foram utilizadas como agentes antimicrobianos e depositadas sobre as amostras com e sem nanotubos, para posterior comparação. Além disso, foi verificado o efeito do recobrimento das amostras com uma camada do biopolímero Alginato. O teste de liberação dos agentes terapêuticos foi realizado em solução tampão fosfato (PBS) a 37°C. As alíquotas analisadas foram retiradas do sistema em tempos pré-determinados e analisadas no espectrofotômetro UV-vis para obter a curva de liberação de cada substância. As amostras apresentaram uma liberação inicial brusca seguido de uma fase de estabilização, indicando a liberação das substâncias carregadas. O recobrimento com Alginato serviu como uma barreira difusional, otimizando o controle da liberação de modo a retardar a liberação brusca inicial e aumentando o tempo total de entrega do azul de metileno, da própolis verde e do eugenol ao meio.

Palavras-chave: Nanotubos de TiO₂. Anodização. Liberação de fármacos. Azul de Metileno. Própolis. Eugenol.

ABSTRACT

Researches involving drug delivery systems based on TiO₂ nanotubes suggest a great potential as a platform to be used in the biomedical area, mainly due to its biocompatibility. The drugs loaded in the nanostructures also constitute an essential part of the post-operative treatment to combat the rejection of the prosthesis by bacterial adhesion. Focusing on natural therapeutic agents to mitigate microbial infections seems to be a promising alternative source. Furthermore, the phytochemicals present in medicinal plants play an essential role in determining antimicrobial activity. The present study aims to modify the surface of the commercial Ti (99.5%) by forming TiO₂ nanotubes by anodic oxidation. The used electrolyte solution containing fluoride ions and solution of Simulated Body Fluid. The samples were characterized with Scanning Electron Microscopy and Contact Angle. After nanotubes formation, aqueous solutions of methylene blue and alcoholic solutions of green propolis extract (Apis Flora® 70%) and eugenol (Biodinâmica®) were used as antimicrobial agents and they were deposited on top of the samples with and without nanotubes, for further comparison. Also, the effect of samples coated with a layer of Alginate was verified. The process of releasing the substances was carried out in PBS buffer solution at 37°C. The aliquots removed at predetermined times were analyzed on the UV-vis spectrophotometer to obtain the release curve of each substance. The released samples showed an initial burst followed by a stabilization phase, indicating the release of loaded substances. The Alginate coating acted as a diffusional barrier, optimizing release control to delay the initial burst and increase the total delivery time of methylene blue, green propolis, and eugenol.

Keywords: TiO₂ nanotubes. Anodization. Drug Delivery. Methylene Blue. Propolis. Eugenol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama representativo do processo de osseointegração.....	18
Figura 2 - Célula eletrolítica.....	19
Figura 3 – Representação esquemática da formação dos nanotubos de TiO ₂	20
Figura 4 - Curva de anodização potenciostática típica do titânio com densidade de corrente em função do tempo.	21
Figura 5 - Diagrama esquemático da liberação do fármaco via mecanismo de difusão das estruturas nanotubulares para a solução padrão.	25
Figura 6 - Comparação das variações de concentração de drogas administradas por (a) terapia convencional e (b) liberação controlada de fármacos.	26
Figura 7 - Estrutura química do Azul de Metileno (AM).....	27
Figura 8 - Estrutura química do Eugenol (4-alil-2-metoxi fenol).	29
Figura 9 - Alterações no recobrimento polimérico quando submetidos a meio aquoso: 1) plataforma de nanotubos carregada com fármaco e revestida com camada polimérica; 2) hidratação da camada polimérica e relaxamento da matriz; 3 e 4) aumento da hidratação e início da erosão; 5) aumento da erosão da matriz e 6) desmembramento das cadeias de polímeros e liberação do fármaco.	31
Figura 10 - Estrutura química dos monômeros α -L guluronato (G) e β -D manuronato (M). .	33
Figura 11 - Interações de ligação entre os íons de Ca ²⁺ e o grupo –COO ⁻ para formação do gel de Alginato de Cálcio.	34
Figura 12 – Esquema representativo do processo de anodização.....	37
Figura 13 - Aparato utilizado para carregar as plataformas com o fármaco de interesse.	40
Figura 14 - Ilustração do processo de fabricação das plataformas de TiO ₂ -NT carregadas com as substâncias de interesse e recobertas com camada polimérica.	41
Figura 15 - Representação esquemática do teste de liberação in vitro das substâncias.	42
Figura 16 - Curva típica da anodização do titânio em regime potenciostático, com eletrólito contendo NH ₄ F/H ₂ O/SBF em Etilenoglicol, aplicando 20 V no anodo, por 1200 s. Temperatura mantida constante à 50 °C.	44
Figura 17 – Micrografias e ângulo de contato das amostras de titânio anodizadas em regime potenciostático.	46
Figura 18 – A) Comprimento de onda característico e B) curva analítica do Azul de Metileno.	48

Figura 19 – Comparação da A) entrega acumulativa (M_t/M_∞) de Azul de Metileno em função do tempo para amostras de NT/AM e NT/AM/alg com B) entrega acumulativa (mg) de Azul de Metileno em função do tempo para amostras de NT/AM e NT/AM/alg.....	48
Figura 20 - Curvas da entrega acumulativa (M_t/M_∞) de Azul de Metileno em comparação com as curvas com o ajuste do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (KP).....	50
Figura 21 – A) Comprimento de onda característico e B) curva analítica do extrato de própolis verde.	51
Figura 22 – Comparação da A) entrega acumulativa (M_t/M_∞) de própolis em função do tempo para amostras de NT/prop, NT/prop/alg, Ti/prop e Ti/prop/alg com a B) entrega acumulativa (ppm) de própolis em função do tempo para amostras de NT/prop, NT/prop/alg, Ti/prop e Ti/prop/alg.	52
Figura 23 - Relaxamento da matriz polimérica por infiltração do meio aquoso no processo de liberação do fármaco.	54
Figura 24 - Curvas da entrega acumulativa (M_t/M_∞) de própolis verde em comparação com as curvas com o ajuste do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (KP).	56
Figura 25 – A) Comprimento de onda característico e B) curva analítica do eugenol.	57
Figura 26 – Comparação da A) entrega acumulativa (M_t/M_∞) de eugenol em função do tempo para amostras de NT/eug, NT/eug/alg, Ti/eug e Ti/eug/alg com a B) entrega acumulativa (ppm) de eugenol em função do tempo para amostras de NT/eug, NT/eug/alg, Ti/eug e Ti/eug/alg.	57
Figura 27 - Curvas da entrega acumulativa (M_t/M_∞) de eugenol em comparação com as curvas com o ajuste do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (KP).	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração iônica do SBF em comparação com o plasma sanguíneo humano..	22
Tabela 2 - Principais compostos fenólicos encontrados no extrato de própolis verde.	29
Tabela 3 – Estudos sobre o recobrimento de biomatrizes com barreiras difusionais e seus respectivos resultados na liberação dos fármacos aprisionados.	32
Tabela 4 - Interpretação do mecanismo difusional de liberação de filmes poliméricos.	35
Tabela 5 - Ordem, quantidades e reagentes necessários para preparar 1000mL de SBF.	37
Tabela 6 - Concentrações das soluções diluídas em PBS para a construção da curva analítica das substâncias.	39
Tabela 7 - Soluções de azul de metileno, própolis verde e eugenol utilizadas para carregar as amostras.	40
Tabela 8 - Conjunto de amostras* prontas para o teste de liberação.	41
Tabela 9 - Tempos pré-estimados de liberação para trocar a amostra de tubo Falcon.	42
Tabela 10 – Coeficientes da equação de Korsmeyer-Peppas (KP) para as plataformas carregadas com Azul de Metileno e o tempo de liberação do fármaco em 30 min de teste, de acordo com a equação.	50
Tabela 11 - Coeficientes da equação de Korsmeyer-Peppas (KP) para as plataformas carregadas com própolis verde e o tempo de liberação do fármaco em 30 min de teste, de acordo com a equação.	55
Tabela 12 - Coeficientes da equação de Korsmeyer-Peppas (KP) para as plataformas carregadas com eugenol e o tempo de liberação do fármaco em 30 min de teste, de acordo com a equação.	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVOS GERAIS	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1	NANOTUBOS DE TiO₂	16
3.1.1	Biomateriais	16
3.1.2	Biocompatibilidade e osseointegração	17
3.1.3	Modificação superficial	18
3.1.4	Propriedades dos nanotubos de TiO ₂	23
3.1.4.1	Dimensão dos nanotubos	23
3.1.4.2	Molhabilidade	24
3.2	LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	24
3.2.1	Azul de Metileno	27
3.2.2	Própolis	28
3.2.3	Eugenol	29
3.2.4	Recobrimento polimérico dos nanotubos de TiO ₂	30
3.2.4.1	Alginato	32
3.2.5	Modelos cinéticos	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	PARTE I – OBTENÇÃO DA PLATAFORMA DE TiO₂-NTs	36
4.1.1	Preparo das amostras de Titânio	36
4.1.2	Anodização	36
4.1.3	Caracterização dos TiO ₂ -NTs	38
4.1.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
4.1.3.2	Ângulo de contato (CA)	38
4.2	PARTE II – PRODUÇÃO DAS PLATAFORMAS COM FÁRMACO PARA LIBERAÇÃO	38
4.2.1	Calibração dos fármacos	38
4.2.2	Carregamento do fármaco	39

4.2.3	Recobrimento polimérico	40
4.2.4	Teste de liberação	42
4.2.5	Modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (KP).....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	DESENVOLVIMENTO DOS TiO₂-NTs.....	44
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS TiO₂-NTs.....	45
5.3	TESTE DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	47
5.3.1	Azul de Metileno (AM)	47
5.3.2	Própolis.....	51
5.3.3	Eugenol.....	56
6	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

Dentre os materiais nanoestruturados que vêm se destacando, os óxidos metálicos estão em evidência nas últimas décadas (Davis, 2002; Luc e Jiao, 2016), principalmente por suas propriedades ópticas, catalíticas, eletrônicas e biológicas (Shankar *et al.*, 2009). Em especial, o dióxido de titânio (TiO_2) tem atraído muita atenção pelas suas características físicas e químicas. Quando o metal é submetido a processos hidrotérmicos (Chen *et al.*, 2002), sol-gel (Jung *et al.*, 2002), crescimento semeado (Tian *et al.*, 2003) e anodização eletroquímica (Mor *et al.*, 2003) é possível obter o TiO_2 com morfologia nanotubular.

De todas as rotas de preparo citadas, a síntese eletroquímica é o melhor método para alcançar os nanotubos de TiO_2 auto-organizados. O primeiro trabalho reportando a formação de estruturas nanoporosas em titânio, foi feito por Zwilling e demais pesquisadores em 1999, utilizando eletrólito suporte composto por íons fluoreto (Zwilling *et al.*, 1999). Desde então, vários trabalhos foram publicados aprimorando a técnica, havendo uma grande evolução no que tange a morfologia dos filmes, com a vantagem de se controlar parâmetros de formação dos nanotubos, como concentração do eletrólito, tempo, temperatura, potencial aplicado, entre outros (Cai *et al.*, 2005; Ruan *et al.*, 2005; Sulka *et al.*, 2010).

Atualmente os nanotubos de TiO_2 ganham relevância na área biomédica, com particular interesse como plataforma de imobilização de fármacos, para liberação controlada, uma vez que o material em questão é biocompatível, indicando menor irritabilidade no caso de próteses, além de sua resistência mecânica e estabilidade química (Chen *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2014). Assim, por meio dessa técnica, o fármaco é aprisionado no interior dos nanotubos e, quando submetidos a soluções fisiológicas, podem ser liberados no meio (Losic *et al.*, 2015).

Porém, a liberação por superfícies com nanotubos preenchidos por fármacos é de difícil controle, o que torna bastante útil a realização de um tratamento subsequente para recobrir, prolongar e controlar o tempo de liberação. Para isso, a modificação da superfície com revestimento biopolimérico, pode ajudar na previsibilidade da liberação (Gulati *et al.*, 2012; Kumeria *et al.*, 2015).

Hoje em dia, uma grande variedade de trabalhos exhibe diversos tipos de medicamentos a serem carregados, os mais citados são as classes de anti-inflamatórios e antibióticos (Doadrio *et al.*, 2015; Gulati *et al.*, 2012; Jarosz *et al.*, 2016; Popat *et al.*, 2007). Porém, há também intensos estudos sobre o uso e prescrição inadequada de antibióticos, fazendo com que espécies bacterianas contraiam resistência a ação desses fármacos. Nesse sentido, a procura por terapias alternativas tem aumentado significativamente (Yoshikawa, 2003). É onde se encontram alternativas como as plantas medicinais, as quais são ricas em metabólitos secundários. As

substâncias fitoquímicas derivadas dessas plantas possuem propriedades antimicrobianas, como alcaloides, flavonoides, terpenoides, entre outros e sua concentração, composição e estrutura química desempenharão um papel importante na atividade anti-inflamatória e antibiótica (Saha, Pramanik e Biswas, 2020).

Portanto, o presente trabalho tem por interesse o estudo na modificação de superfície do titânio, como um biomaterial, por meio do processo de anodização potencioestática com eletrólito contendo solução de Fluido Corporal Simulado (SBF). Em posse dos nanotubos, como alternativa aos antibióticos tradicionais, o azul de metileno e agentes terapêuticos naturais, como o extrato de própolis verde e eugenol, foram imobilizados no interior dos filmes nanoestruturados de TiO_2 . Para melhorar o controle da liberação dos fármacos, foi analisado também o comportamento das plataformas carregadas, recobertas com o biopolímero alginato.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral do presente trabalho é a construção de uma matriz nanoestruturada de TiO_2 crescida em substrato de titânio comercialmente puro, propícia para fins biomédicos de implante, sintetizadas a partir do processo de anodização eletroquímica. Posteriormente, como alternativa a antibióticos tradicionais, o azul de metileno e agentes terapêuticos naturais, como o extrato de própolis verde e o eugenol, deverão ser imobilizados no interior dos nanotubos e recobertos com uma camada polimérica de alginato. Sendo assim, o estudo tem por prioridade verificar a influência das matrizes nanotubulares, bem como a ação do revestimento de polímero nos ensaios de liberação *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Confeccionar matrizes nanoestruturadas de TiO_2 a partir do processo de anodização eletroquímica.
- ✓ Caracterização da morfologia das nanoestruturas sintetizadas.
- ✓ Estudar as melhores condições de concentração das substâncias para que sejam inseridas nas matrizes.
- ✓ Desenvolvimento de metodologia para carregamento das substâncias nas matrizes.
- ✓ Analisar o perfil de liberação de cada fármaco, azul de metileno, própolis verde e eugenol, para cada matriz a ser estudada (com e sem nanotubos, com e sem revestimento polimérico).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 NANOTUBOS DE TiO₂

3.1.1 Biomateriais

Um biomaterial pode ser definido como qualquer substância capaz de substituir tecidos do corpo. Tais substâncias, que não fármacos, podem ser de origem natural ou sintética e utilizadas por qualquer período de tempo, de maneira segura e fisiologicamente aceitável (Williams, 1999).

Atualmente, os biomateriais são aplicados em diversas áreas mas, principalmente, nos domínios médicos e odontológicos, com o emprego de bioimplantes para fins cirúrgicos e terapêuticos. Os implantes irão desempenhar funções compatíveis com o tecido a ser substituído, atendendo exigências em relação as suas propriedades como biocompatibilidade, resistência mecânica e à corrosão e toxicidade (Abdallah *et al.*, 2017). Desta forma, além de reparar o funcionamento de tecidos ou órgãos, é primordial entender as relações entre as propriedades e micro ou nanoestruturas dos biomateriais e como elas se dão frente ao ambiente biológico.

Uma ampla diversidade de materiais pode ser utilizada como matéria-prima para produção de biomateriais. Aqueles de origem sintética ganham destaque na engenharia de manufatura como, por exemplo, cerâmicas (Fazli-Abukheyli, Rahimi e Ghaedi, 2019), polímeros (Lei *et al.*, 2019), compósitos (García-lizarribar *et al.*, 2018) e metais (Tahmasebifar *et al.*, 2016).

A classe dos metais é utilizada largamente para a fabricação de implantes cirúrgicos graças ao seu desempenho mecânico, como alta resistência à fadiga e à fratura. Tal característica é inerente a esta classe de material e pode propiciar um desempenho satisfatório a longo prazo quando submetidos a aplicações de carga de tração e compressão. Por esse motivo, os metais são empregados nas áreas de ortopedia e odontologia como componentes estruturais objetivando o reforço ou substituição de tecidos rígidos. As peças mais comuns feitas a partir dos metais compreendem fios, parafusos e placas dentárias, próteses para substituição óssea e de articulações (Poinern, Brundavanam e Fawcett, 2012; Sumita, Hanawa e Teoh, 2004).

Nas últimas décadas, o titânio e suas ligas tem sido cada vez mais utilizados como biomateriais para fabricação de bioimplantes que buscam, principalmente, a fixação de fraturas. O crescente emprego desse metal deve-se às suas propriedades mecânicas, baixa densidade, baixo módulo de elasticidade em comparação com outros materiais metálicos, alta resistência

à corrosão *in vivo* com a camada de óxido passiva (TiO_2) que se forma na interface metal/osso e alta biocompatibilidade, o que representa vantagens importantes para aplicações médicas (Cheng *et al.*, 2018; Mu *et al.*, 2018; Somsanith *et al.*, 2018).

3.1.2 Biocompatibilidade e osseointegração

A biocompatibilidade dá-se quando os tecidos biológicos entram em contato com um material específico e não exibe qualquer tipo de experiência inflamatória, tóxica, alérgica, irritante ou de fundo carcinogênico (Kao *et al.*, 2007).

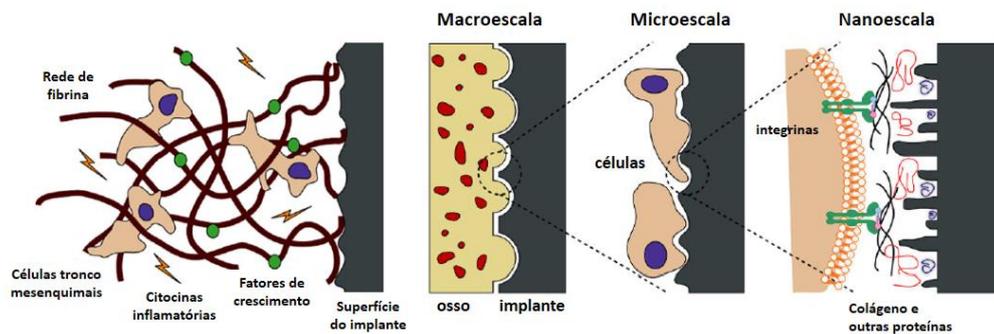
Para um material ser biologicamente ambientado com êxito e com função de longa duração, além da compatibilidade, demanda uma superfície bioativa para suportar quaisquer mecanismos biológicos compreendidos no fenômeno da rejeição. Dentro desse contexto, o titânio, com sua extensa aplicação tanto em aparelhos médicos quanto em implantes dentários, ocupa um lugar de destaque e de importância na fabricação de implantes e, principalmente, na osseointegração (Yu *et al.*, 2015).

O processo de osseointegração envolve vários eventos biológicos que determinam a estabilidade mecânica e o resultado do implante. Desde a adsorção de proteínas e formação de coágulo na superfície do biomaterial, até o reconhecimento biológico pelas células mesenquimais e osteoblastos. O ponto chave do processo está no contato direto entre a superfície do implante e o tecido ósseo. Desta forma, acredita-se que a presença da resposta fibrótica pode ser evitada pelo controle das propriedades da superfície do implante, tais como o aumento da rugosidade para promover uma perfeita osseointegração (Gittens *et al.*, 2015).

Logo depois da colocação do implante, as células macrófagas e neutrófilas, são incumbidas da limpeza do sítio recém operado. As células tronco mesenquimais oriundas da medula óssea e do sangue, também estão presentes nessa primeira fase. Quando expostas às citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, esse tipo de célula se diferencia e dá origem a outros diversos tipos celulares como osteoblastos, fibroblastos e condrócitos. A diferenciação celular decorrerá dos aspectos do ambiente biológico e da superfície do implante, iniciando a formação óssea. Quando o implante torna-se estável e a rede de fibrina fortemente constituída, desencadeia a estruturação do osso em duas orientações: na superfície do osso ao redor ao implante (osteogênese distante) e diretamente na superfície do implante (osteogênese de contato). Para que haja o sucesso da osseointegração, a osteogênese de contato deve ocorrer e a superfície do implante deve propiciar essa situação. O remodelamento ósseo é a próxima etapa para a osseointegração, mediado pelos osteoclastos, os quais vão reabsorver o osso recém

formado para fixar as microfraturas existentes e preparar a superfície para formação de um novo osso. No caso dos nanotubos de titânio, sua nanotopografia mimetiza as condições necessárias aos osteoblastos para a formação de um novo tecido ósseo, sendo esse processo de suma importância no sucesso do implante (Gittens *et al.*, 2015). O diagrama apresentado na **Figura 1** representa a biologia da osseointegração.

Figura 1 - Diagrama representativo do processo de osseointegração.



Fonte: adaptado de Gittens *et al.*, 2015

3.1.3 Modificação superficial

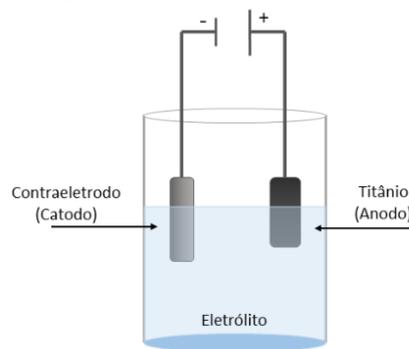
Diferentes fatores devem ser levados em consideração de acordo com o tipo de aplicação desejada ou da localização do dispositivo a ser implantado. Como por exemplo, a hemocompatibilidade de um material é fundamental se o artefato a ser implantado tenha contato direto com a corrente sanguínea, como nos casos de *stents*, cateter, entre outros (Huang *et al.*, 2015, 2017). Já para reparos ou substituições ósseas, é crucial que tal biomaterial tenha uma rápida osseointegração (Bai *et al.*, 2011; Brammer *et al.*, 2009). Assim, com o intuito de aprimorar a atuação dos biomateriais em sistemas biológicos, o tratamento por meio da modificação superficial se faz necessário, uma vez que a resposta dos mesmos depende integralmente das suas interações superficiais.

Para implantes a base de titânio, sua superfície também desempenha um papel muito importante na integração com o corpo humano. Deste modo, a modificação superficial torna-se útil para melhorar sua bioatividade, sua biocompatibilidade e aumentar a resistência à corrosão por meio de parâmetros como sua rugosidade, molhabilidade e energia superficial (Prasad *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2019). Isto posto, existem várias técnicas possíveis para se modificar a superfície de materiais metálicos, como a do titânio, dentre eles, métodos mecânicos, químicos e físicos (Chiu *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2002; Molitor, Barron e Young, 2001). Porém, a síntese eletroquímica é uma das mais utilizadas para o crescimento de filmes de óxido sobre a superfície do titânio. Por meio dos processos anódicos, faz-se com que sua área superficial seja

umentada durante um regime de alto ordenamento de formação dos nanotubos na face do metal (Roy, Berger e Schmuki, 2011).

O processo de anodização do titânio utilizando eletrólito suporte a base de íons fluoreto, foi reportado pela primeira vez por Zwilling e colaboradores em 1999. Tal método consiste na oxidação do metal, o qual pode ser administrado a um potencial constante, chamado de regime potencioestático, ou a uma corrente constante, chamado de regime galvanostático, entre a amostra de titânio (anodo) e o contra eletrodo (catodo) em uma célula eletrolítica. Quando uma tensão é aplicada, os ânions, por meio do campo elétrico, conduzem-se do eletrólito para a interface metal/óxido e os cátions metálicos para a interface óxido/eletrólito (Smith *et al.*, 2013).

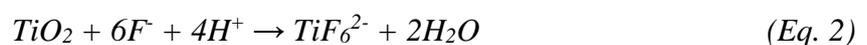
Figura 2 - Célula eletrolítica.



Fonte: Próprio autor

No início do estágio de crescimento do filme, uma camada de óxido compacto é formada, independente se o meio contém íons fluoreto em sua composição. Nessa fase, a formação de tal camada está em concordância com o mecanismo de alto campo. Esse processo deixa os átomos da superfície do titânio expostos aos íons de oxigênio e hidroxilas do eletrólito suporte, reagindo, assim, com o metal, formando a camada de óxido (**Eq. 1**).

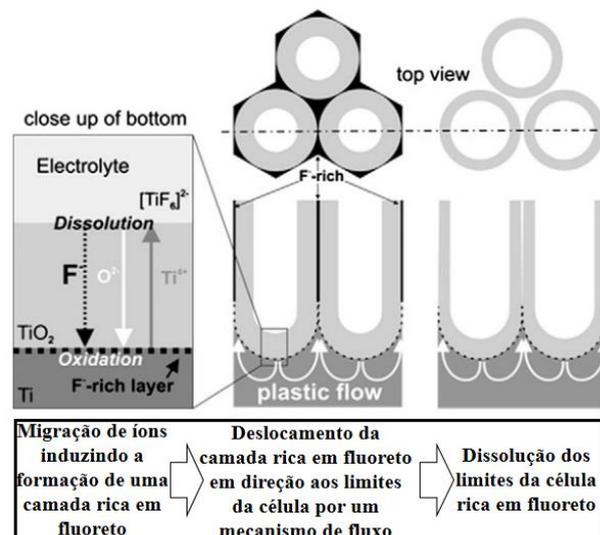
O que se pode observar é que o filme compacto crescido inicialmente, chamado de óxido tipo barreira, é formado em eletrólitos nos quais a solubilidade do mesmo é muito pequena. Para a formação dos nanotubos de TiO_2 é necessário que haja um equilíbrio entre a formação e a dissolução química do óxido promovida pelos íons fluoreto em solução (**Eq. 2**). Esta solubilidade é o principal motivo pelo qual se mantém uma estabilidade na taxa de crescimento do filme, sendo suficiente para fazer as estruturas nanotubulares crescerem na superfície do metal, no caso, do titânio (Kowalski, Kim e Schmuki, 2013; Regonini, 2008).



Indícios do mecanismo de crescimento dos nanotubos foram feitos com a anodização de ligas TiAl, constituídas por uma formação típica de poros, provenientes do alumínio e a formação de nanotubo, vindo do titânio. Sob condições experimentais específicas, estados transitórios distintos foram obtidos de uma morfologia porosa para nanotubular. É possível observar que a transição foi iniciada por uma separação dos poros ao longo dos limites da célula. Há a hipótese de que os limites celulares foram sensibilizados por íons fluoreto acumulados, os quais são propensos à dissolução química. A formação de uma camada rica em fluoreto na interface metal/óxido pode ser atribuída a taxa de migração duas vezes mais rápida dos íons fluoreto na camada barreira no alto campo (fundo do tubo).

Acredita-se que o deslocamento dessa camada para as regiões interporos seja causado por um fluxo do óxido em direção as paredes do tubo. Assim, supõe-se que os três principais processos que determinam a morfologia nanotubular sejam: i) formação induzida pela migração de íons de uma camada rica em fluoreto na interface metal/óxido (parte inferior do tubo); ii) deslocamento dessa camada em direção aos limites das célula por um mecanismo de fluxo; iii) dissolução dos limites das células ricas em fluoreto e formação da morfologia nanotubular (Berger *et al.*, 2011). Tal contexto é representado esquematicamente na **Figura 3**.

Figura 3 – Representação esquemática da formação dos nanotubos de TiO₂.

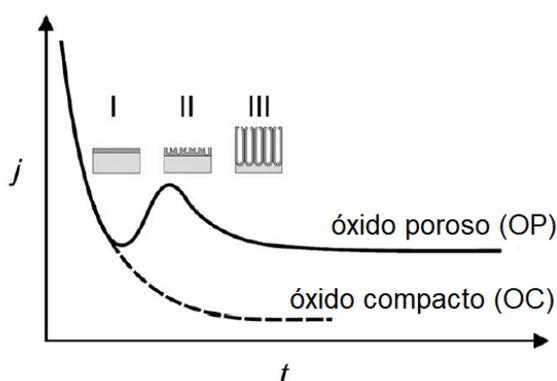


Fonte: adaptado de Berger *et al.*, 2011

O crescimento dos nanotubos pode ser acompanhado também pela curva de anodização, geralmente plotada com a densidade de corrente em função do tempo, no caso de anodizações seguidas pelo regime potencioestático. A camada de óxido porosa ilustrada na **Figura 4-I**, é formada na superfície do metal, a qual sofre um declínio na densidade de corrente, uma vez que ocorre a formação do óxido barreira, cujo qual é compacto e isolante, no substrato de titânio.

Com a inserção dos íons de flúor no eletrólito, outros dois estágios podem ser observados na curva de anodização. O estágio II se refere aos efeitos de tais íons na oxidação, para isso, nessa etapa há um aumento na densidade de corrente em razão da interação do óxido barreira com os íons fluoreto, resultando no processo simultâneo de dissolução do óxido e nucleação dos nanotubos. Posteriormente, no estágio III, a densidade de corrente entra em um estado estacionário, onde a espessura da camada do óxido nanotubular dependerá do tempo de anodização (Roy, Berger e Schmuki, 2011).

Figura 4 - Curva de anodização potencioestática típica do titânio com densidade de corrente em função do tempo.



Fonte: adaptado de Roy, Berger e Schmuki, 2011

Após a anodização, o que se tem é uma membrana de nanotubos de TiO_2 . Yoriya e colaboradores, sugerem que o grau de ordenamento e formação dos nanotubos são afetados pela condutividade do eletrólito. Enquanto o tamanho dos poros é determinado pelo potencial ou corrente aplicados, quando se aumenta a condutividade do eletrólito, ocorre uma mobilidade iônica suficiente para eliminar a competição entre a nucleação dos tubos, como consequência, há uma melhora no processo de dissolução e crescimento do óxido, levando a um tamanho de poro maior e também maior espaçamento entre eles (Yoriya, Bao e Grimes, 2011; Yoriya e Grimes, 2011).

No que se refere aos nanotubos de TiO_2 para aplicação em implantes, deve-se dar atenção a algumas propriedades intrínsecas desse material e que serão primordiais na modulação celular do aparato a ser implantado. A combinação de características morfológicas como diâmetro de poro, espessura do filme, rugosidade, molhabilidade, cristalinidade, entre outros, desempenham um efeito sinérgico atuando sobre fenômenos biológicos que ocorrem em nosso corpo (Liu, Du e Wang, 2016; Zhang *et al.*, 2018).

Além de características morfológicas, a utilização de íons presentes em ambientes biológicos na síntese dos TiO_2 -NTs também tem representado um papel muito importante nas

pesquisas com biomateriais para fins de implante (Ferreira *et al.*, 2019). A solução fisiológica que percorre a parte interna do corpo humano é considerada um ambiente hostil para os metais. É uma solução salina oxigenada, pH de 7,4, com teor de sal de cerca de 0,9% e temperatura aproximada de 37°C. Quando um metal é implantado cirurgicamente no corpo humano, é banhado por esta solução fisiológica e sofre dissolução química devido ao ambiente complexo e corrosivo (Mudali, Sridhar e Raj, 2003).

No início da década de 90, Kokubo e colaboradores, identificaram uma camada de fosfato de cálcio formada, sob um biovidro no Fluido Corporal Simulado (SBF), como sendo apatita cristalina. Tal formação de apatita “*in vivo*” na superfície do biovidro poderia ser reproduzida no SBF com concentrações iônicas semelhantes à do plasma sanguíneo (Kokubo, 1991). Desde a proposta inicial, a solução foi sendo modificada e aprimorada buscando tal similaridade associado a estabilidade e reprodutibilidade na formação de apatita em materiais sintéticos (Kokubo e Takadama, 2006). A **Tabela 1** mostra as concentrações iônicas presentes no SBF em comparação com as encontradas no plasma sanguíneo.

Tabela 1 - Concentração iônica do SBF em comparação com o plasma sanguíneo humano.

Íon	Concentração iônica (mM)	
	Plasma sanguíneo	SBF
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ⁺	1,5	1,5
Ca ²⁻	2,5	2,5
Cl ⁻	103,0	147,8
HCO ₃ ⁻	27,0	4,2
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5
pH	7,2 – 7,4	7,4

Fonte: adaptado de Kokubo e Takadama, 2006

As soluções de Fluido Corporal Simulado (SBF) tem sido uma alternativa largamente utilizada para avaliar a bioatividade de implantes artificiais no corpo humano. Tal fluido proporciona um ambiente com uma concentração iônica próxima à de fluidos corporais e mantém estável o valor de pH de algumas regiões do corpo (Mutlu e Oktay, 2013). Nesse sentido, a fim de melhorar a biocompatibilidade do material anodizado e promover a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas na superfície do óxido nanoestruturado,

pesquisas exibem metodologias onde o SBF é incorporado no eletrólito em pequenos volumes (Simon *et al.*, 2019).

3.1.4 Propriedades dos nanotubos de TiO₂

3.1.4.1 Dimensão dos nanotubos

As nanoestruturas de óxido formadas pelo processo de anodização, geralmente são ordenadas e aderidas ao substrato metálico, apresentando dimensões semelhantes entre si. A fim de melhorar a osseointegração de implantes metálicos, é necessário levar em consideração a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas nas nanoestruturas formadas. Tal processo pode ser diretamente motivado por alterações na espessura e no diâmetro dessas nanoestruturas (Jalali *et al.*, 2015).

Estudos *in vivo* mostraram que TiO₂-NTs com aproximadamente 100 nm de diâmetro apresentam boas taxas de formação óssea. Lee e colaboradores, apresentaram um trabalho de melhora na osseointegração para implantes dentários utilizando nanotubos de TiO₂ carregados com rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2). Para isso, o titânio foi anodizado a 60 V, obtendo nanotubos de diâmetro variando entre 70 nm a 110 nm. Ao compararem os resultados obtidos com resultados de implantes comerciais, foi observado uma taxa média maior de contato entre as superfícies osso-implante para aquelas amostras nanotexturizadas e funcionalizadas, seguidas daquelas apenas nanotexturizadas (Lee *et al.*, 2015).

Além da melhora da integração óssea com estudos *in vivo*, pesquisadores avaliaram a prevenção da osteomielite apresentando estudos com TiO₂-NTs. Os nanotubos foram carregados com gentamicina e possuíam diâmetro interno médio de 125 nm. As amostras foram implantadas em coelhos e separadas em 4 grupos dos quais haviam nanotubos de TiO₂ carregados com gentamicina, titânio com gentamicina, nanotubos de titânio sem carregamento e titânio sem carregamento. Os grupos que haviam nanotubos apresentaram uma melhor osseointegração. Como os TiO₂-NTs possuem uma boa microestrutura de óxido para o crescimento de novos ossos, tais matrizes são capazes de influenciar as interações proteicas e os componentes do osso para uma ligação óssea rápida e permanente (Liu *et al.*, 2017).

3.1.4.2 Molhabilidade

Com a mudança da morfologia das amostras anodizadas, outros parâmetros dependentes das dimensões de tais nanoestruturas podem comprometer a adesão celular em implantes metálicos. É o caso da molhabilidade da superfície, a qual tem relação direta com as propriedades biológicas dos TiO₂-NTs, influenciando na interação celular com a matriz implantada. Em geral, é mostrado em alguns trabalhos que com uma maior molhabilidade, mais facilmente as proteínas essenciais para o processo de adesão celular são adsorvidas na superfície do metal/óxido, o que influencia positivamente a biocompatibilidade do material a ser implantado (Spriano *et al.*, 2018).

Considerando a molhabilidade, estudos mostraram que por meio do processo de anodização e síntese dos TiO₂-NTs, o ângulo de contato da superfície diminui em comparação com o substrato compacto de titânio sem o óxido. Isso pode ser explicado pelo aumento da energia da superfície e também pelo aumento da área de contato com a formação dos NTs, gerando maior hidrofiliabilidade e induzindo uma melhora na área disponível para interações celulares (Fathi, Akbari e Taheriazam, 2019; Roguska *et al.*, 2016). Durante o processo de anodização é possível controlar alguns parâmetros que podem afetar a molhabilidade da superfície. Um estudo divulgou que para maiores tensões aplicadas, encontram-se maiores diâmetros de tubos de titânio e maiores espessuras do óxido em questão. Tal fenômeno resulta diretamente no aumento da hidrofiliabilidade (Liu, Du e Wang, 2016).

Em estudos realizados com TiO₂-NTs de 110 nm, gelatina foi imobilizada no interior das nanoestruturas intermediada por uma camada de polidopamina, a fim de criar uma superfície biofuncionalizada para modular o comportamento de células osteoblásticas. Neste trabalho, os autores também ressaltam que após o processo de anodização, as amostras passaram por tratamento térmico, o que acabou conferindo uma maior molhabilidade, obtendo uma superfície superhidrofílica. Com a inserção da camada intermediária de dopamina e posteriormente a gelatina, o ângulo de contato aumentou, porém, ainda com a característica hidrofílica, alcançando ângulo de 46,7°. Assim, os resultados exibiram um método satisfatório no que tange a disseminação, proliferação e diferenciação celular dos osteoblastos nesse meio (Lai, Jin e Qiao, 2017).

3.2 LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

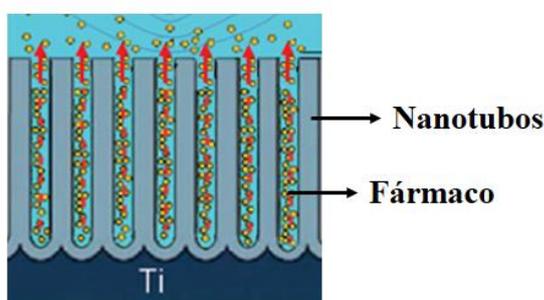
Na década de 60, Judah Folkman iniciou os estudos envolvendo liberação controlada de fármacos, por meio de pequenos implantes com material impregnado de substâncias ativas, em

animais. Uma década depois, com o advento da nanotecnologia, foi possibilitado os estudos direcionando o fármaco direto para o sítio específico a ser tratado (Hoffman, 2008). Assim, vários materiais começaram a ser utilizados na liberação de fármacos, como polímeros biodegradáveis, nanopartículas, metais, moléculas lipídicas. Tais materiais respondem sob certos estímulos, como pH e temperatura, os quais liberam as drogas para o meio (Ganta *et al.*, 2008).

O fornecimento de medicamentos ao organismo, geralmente envolve um veículo no qual o princípio ativo é dispersado. Antigamente, a maioria desses veículos eram selecionados a fim de se facilitar a dosagem fornecida ao paciente e até mesmo pela maneira com a qual o fármaco era feito, porém, percebeu-se que o portador do medicamento poderia desempenhar um papel fundamental na atividade da droga distribuída (Vies, Van Der, 1975).

Atualmente, com os estudos acerca dos nanotubos de TiO₂ e suas aplicações para bioimplantes, é possível, por meio de sua geometria, utilizá-lo como uma cápsula de aprisionamento da substância de interesse e utilizá-lo como plataforma de liberação controlada de fármacos (Lai *et al.*, 2017; Wang, Q. *et al.*, 2017), como sugere a **Figura 5**.

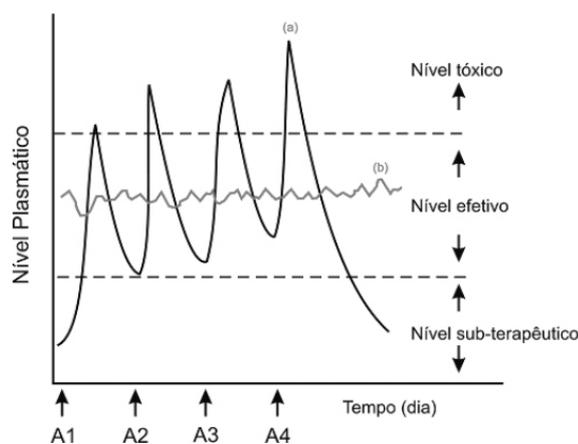
Figura 5 - Diagrama esquemático da liberação do fármaco via mecanismo de difusão das estruturas nanotubulares para a solução padrão.



Fonte: adaptado de Aw e Losic, 2013

Porém, ainda hoje administrados em pacientes, os métodos convencionais são desenvolvidos para liberar rapidamente o agente ativo ou terapêutico. Nesse tipo de terapia, a concentração da droga na corrente sanguínea aumenta até atingir um nível máximo de dissolução e então decai, sendo requerida a ingestão de uma nova dose para aumentar os níveis de concentração. Com isso, atualmente, sistemas de liberação de fármacos representam uma abordagem promissora no campo biomédico, evitando efeitos colaterais por minimizar a toxicidade, controlar a dose da droga sem que haja diluição e, conseqüentemente, aumentar sua eficácia (Wang *et al.*, 2015).

Figura 6 - Comparação das variações de concentração de drogas administradas por (a) terapia convencional e (b) liberação controlada de fármacos.



Fonte: Lyra *et al.*, 2007

A liberação controlada de fármacos vem sendo estudada como uma alternativa para infecções relacionadas aos cuidados de saúde, também conhecidas como infecções hospitalares, as quais são uma ameaça a segurança do paciente pós-operado, por exemplo. Apesar das taxas de sucesso dos implantes serem dependentes do processo de osseointegração, o cuidado com os mesmos compreende a prevenção de infecções bacterianas após a implantação no organismo, a fim de evitar novos agravos cirúrgicos (Popat *et al.*, 2007).

Nas infecções associadas ao uso de biomateriais implantáveis, os microrganismos se aderem fortemente sobre a superfície do implante, dando início a uma complexa comunidade microbiana aderente chamada de biofilme. Tais biofilmes representam mais de 80% das infecções microbianas no corpo, incluindo àquelas causadas por próteses e dispositivos de fixação interna. Estudos apontam que *Pseudomas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis* podem facilmente formar biofilmes, principalmente, sobre parafusos ortopédicos a base de titânio (Gao *et al.*, 2014; Veerachamy, Yarlagaadda e Manivasagam, 2014).

Nesse sentido, a fim de conter infecções, a classe dos anti-inflamatórios e antibióticos são algumas das mais estudadas quando o assunto é liberação controlada de fármacos com nanotubos de TiO_2 (Doadrio *et al.*, 2015; Fathi, Akbari e Taheriazam, 2019; Jarosz *et al.*, 2016; Pawlik *et al.*, 2017). Porém, há também intensos estudos sobre o uso e prescrição inadequada de antibióticos, fazendo com que espécies bacterianas contraíam resistência a ação desses fármacos. Assim, a procura por terapias alternativas tem aumentado significativamente (Spellberg *et al.*, 2008; Yoshikawa, 2003).

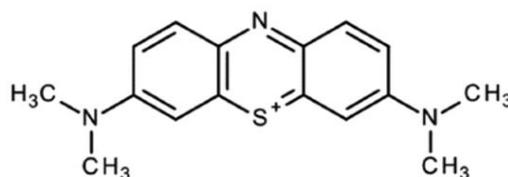
Deste modo, pesquisadores estão trabalhando e demonstrando o uso de nanopartículas metálicas incorporadas nos filmes nanotexturizados de TiO₂ para aproveitar suas propriedades bactericidas. As NPs oferecem uma grande área superficial e podem ser bastante úteis em uma alternativa para o tratamento antimicrobiano (Gunpath *et al.*, 2018; Jia *et al.*, 2016). Porém, a devida atenção deve ser dada a esse material, uma vez que a liberação e acúmulo de NPs metálicas pode desencadear uma resposta tóxica ao organismo humano, levando a uma osteólise por conta da abrasão do tecido ósseo que circunda o implante (Mijnendonckx e Leys, 2013).

À vista disso, outros estudos surgem focando seu interesse em agentes terapêuticos naturais. As plantas medicinais são fontes abundantes de metabólitos secundários, os quais possuem propriedades antimicrobianas, como taninos, alcaloides e flavonoides e, a concentração, composição, estrutura e grupos funcionais desses fitoquímicos, serão importantes na determinação de sua atividade anti-inflamatória e antibiótica (Saha, Pramanik e Biswas, 2020; Somsanith *et al.*, 2018).

3.2.1 Azul de Metileno

O azul de metileno (AM), um corante fenotiazínico, de molécula catiônica, hidrofílica, vem sendo estudado recentemente por suas propriedades biológicas e empregado como um fármaco fotossensível em terapias alternativas. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), é um exemplo de aplicação do tal corante, onde a ativação pela luz conduzirá as moléculas do AM a situações de grande instabilidade química que só serão estabilizadas quando houver a transferência de energia do corante para as moléculas do meio. Assim, irão formar, na presença de oxigênio, íons peróxido e radicais livres, os quais promoverão uma série de espécies reativas de oxigênio (EROs), suscitando o efeito citotóxico sobre as células-alvo (George e Kishen, 2007; Longo e Azevedo, 2010).

Figura 7 - Estrutura química do Azul de Metileno (AM).



Fonte: Schmidt *et al.*, 2015

Atualmente essa terapia tem sido utilizada, principalmente para infecções locais e superficiais, como lesões na cavidade bucal e na pele (Felgenträger *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013) e contra uma ampla gama de microrganismos relacionados a patologias orais, incluindo *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* e *E. coli* (Magacho *et al.*, 2020), *P. gingivalis*, *A.*

actinomycetemcomitans e *S. mutans* (Huang *et al.*, 2019). Outras características do azul de metileno fazem dele um dos principais representantes para a aplicação dessa terapia, como intensa absorção da região de 660 nm, o que o situa na janela fototerapêutica para TFDa, baixa toxicidade, baixo custo e rendimento satisfatório de oxigênio singlete, o qual é responsável pela morte celular (Wainwright, 2007).

3.2.2 Própolis

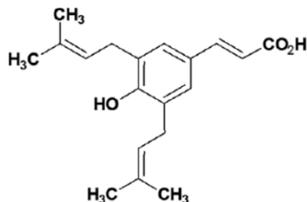
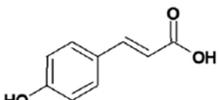
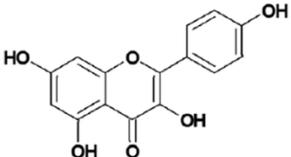
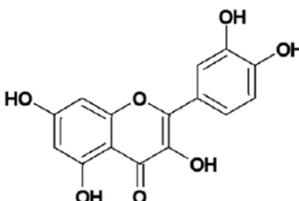
A própolis é o material utilizado pelas abelhas do tipo *Apis mellífera* para a manutenção e segurança da colmeia. É um produto complexo, de natureza resinosa, feito a partir dos botões florais e outros vegetais e, posteriormente, enriquecido com secreções salivares e enzimáticas das próprias abelhas (SEBRAE, 2014).

Dos inúmeros medicamentos de origem natural produzidos no Brasil, encontram-se os extratos etanólicos de própolis. Estes extratos são amplamente utilizados para tratar diversas enfermidades como, infecções bacterianas, virais e fúngicas, também usado como cicatrizante e anti-inflamatório, além de propriedades antioxidantes e anticancerígenas. Isso se deve à sua baixa toxicidade e utilização como antimicrobiano alternativo à inibição de micro-organismos resistentes a antibióticos convencionais (Coelho *et al.*, 2007). Sua composição geral é feita de cerca de 50-55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e em menor quantidade substâncias orgânicas e inorgânicas (Miyataka *et al.*, 1997).

Os compostos fenólicos são substâncias orgânicas que representam os principais constituintes bioativos da própolis. Estes metabólitos abrangem uma classe de compostos químicos contendo pelo menos um anel benzênico ligado à um grupo hidroxila. Os flavonoides representam a classe mais importante de fenólicos presentes na própolis e são responsáveis pelos principais efeitos biológicos da mesma (Park, Alencar e Aguiar, 2002).

A variabilidade dos compostos fenólicos na própolis depende de sua origem botânica, época do ano e região de produção. Um dos tipos mais conhecidos é a própolis verde, originária do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) e destaca-se pela sua composição com presença majoritária do flavonoide artepelin C (**Tabela 2**), o qual não é encontrado em outras variedades de própolis (Cottica *et al.*, 2011; Park, Alencar e Aguiar, 2002). Estudos apontam que a atividade antimicrobiana desse grupo de própolis é aumentada justamente pela presença do artepelin C, cuja eficácia tem sido comprovada contra diversos patógenos (Coelho *et al.*, 2007; Neto *et al.*, 2009).

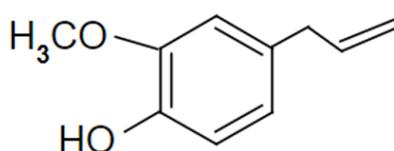
Tabela 2 - Principais compostos fenólicos encontrados no extrato de própolis verde.

Composto	Estrutura química
Artepelin C	
Ácido cumárico	
Kaempferol	
Quercetina	

Fonte: adaptado de Szliszka *et al.*, 2011

3.2.3 Eugenol

O eugenol (4-alil-2-metoxi fenol) é um composto aromático encontrado em óleos essenciais de canela, cravo, noz-moscada, louro e manjerição. Apresenta atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antioxidante, sendo usado, principalmente, na odontologia como componente de seladores e outros produtos anti-sépticos de higiene (Moura, Rabello e Pereira, 2013).

Figura 8 - Estrutura química do Eugenol (4-alil-2-metoxi fenol).

Fonte: Chouhan, Sharma e Guleria, 2017

A utilização de eugenol para tratamentos dentários não é novidade e vem sendo estudada e utilizada na forma de uma pasta formada por ZnO e eugenol, conhecida como ZOE, como um material obturador de canal para dentes decíduos (Khadijah *et al.*, 2019; Koch *et al.*, 2013). Sua

ação antibacteriana advém da inibição da síntese de enzimas extracelulares e ruptura da estrutura da parede celular dos microrganismos que tiver contato (Devi *et al.*, 2010). Resultados inibitórios sobre o *Streptococcus mutans*, bactéria causadora da cárie dentária, revelam que o ZOE possui um bom efeito antibacteriano (Moura, Rabello e Pereira, 2013).

Uma de suas principais indicações está relacionada com a capacidade analgésica, uma vez que, em baixas dosagens, o eugenol é um inibidor da ação do P2X₃, bloqueando irreversivelmente a condução nervosa e impedindo a condução sináptica a nível neuromuscular (Li *et al.*, 2008).

Pesquisadores observaram que óleos essenciais como o eugenol, podem ser empregados como princípio ativo de sanitizantes para inibição microbiana em baixas concentrações. Tal estudo reforça os resultados positivos contra patógenos em geral, tendo aplicações inclusive industriais (Beraldo, Daneluzzi e Scanavacca, 2013).

3.2.4 Recobrimento polimérico dos nanotubos de TiO₂

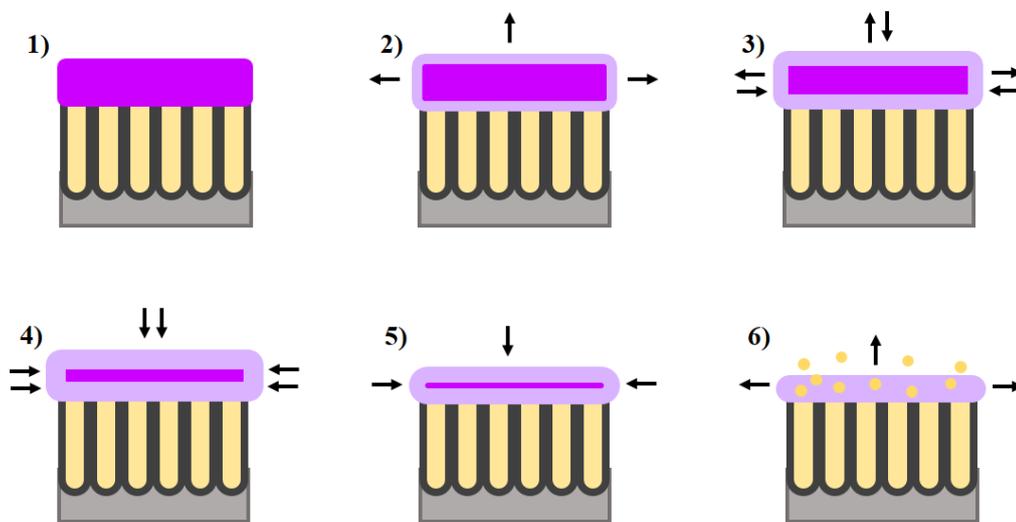
Como dito anteriormente, a arquitetura nanotubular do TiO₂ tem servido como reserva de medicamentos para serem liberados *in situ*. Porém, a liberação por superfícies com nanotubos preenchidos por fármacos é de difícil controle, o que torna bastante útil a realização de um tratamento subsequente para recobrir, prolongar e controlar o tempo de liberação (Kumeria *et al.*, 2015).

Os revestimentos poliméricos desempenham relação direta com a taxa de liberação do fármaco e esse fenômeno pode ser associado as interações superficiais do óxido nanoestruturado carregado. Assim, a morfologia dos nanotubos, a molhabilidade da superfície e a solubilidade do polímero empregado parecem exercer um efeito sinérgico importante, o qual refletirá no tempo total de liberação do fármaco (Ferreira *et al.*, 2019; Simon *et al.*, 2021).

A modificação da superfície com revestimento polimérico, forma finas películas biocompatíveis sobre os nanotubos carregados com fármacos, gerando assim características previsíveis de liberação. Os materiais retardantes que podem ser aplicados para revestimentos farmacêuticos hidrofílicos dividem-se em derivados da celulose, polímeros do ácido acrílico e os mais utilizados, polímeros não-celulósicos naturais, como o agar-agar, alginatos, gomas e a quitosana. Para esses últimos, quando a matriz hidrofílica entra em contato com o meio de dissolução, absorve água, principalmente por meio dos poros de seu sistema. Quando o sistema torna-se hidratado, ocorre o relaxamento das cadeias poliméricas e uma camada externa gelatinosa é formada. Após a primeira hidratação do polímero, a água que penetra na matriz, nessa fase, é por via da camada de gel gerada, a qual pode sofrer erosão com o passar do tempo.

Assim que a infiltração de água supera um valor máximo, ou seja, quando a relação água/polímero aumenta e a relação polímero/polímero diminui, as cadeias poliméricas se desmembram e o fármaco sofre o processo de difusão por entre os espaços alargados da matriz (Lopes, Lobo e Costa, 2005).

Figura 9 - Alterações no recobrimento polimérico quando submetidos a meio aquoso:
 1) plataforma de nanotubos carregada com fármaco e revestida com camada polimérica; 2) hidratação da camada polimérica e relaxamento da matriz; 3 e 4) aumento da hidratação; 5) intumescimento da matriz e 6) desmembramento das cadeias de polímeros e liberação do fármaco.



Fonte: Próprio autor

Gulati e colaboradores, fizeram estudos com dois polímeros biodegradáveis e antibacterianos, quitosana e poli(ácido lático-co-glicólico), quanto à sua capacidade de prolongar o tempo de liberação do fármaco nos nanotubos e produzir propriedades favoráveis de adesão às células ósseas. Dependendo da espessura do polímero, foi demonstrada uma melhora significativa nas características de liberação do fármaco. Também foi observada excelente adesão aos osteoblastos e proliferação celular em nanotubos revestidos com os polímeros, em comparação com nanotubos não revestidos. Esses resultados sugerem que os implantes modificados com polímeros são capazes de administrar um medicamento no local do osso por um período prolongado e com cinética previsível (Gulati *et al.*, 2012).

Além de retardar a liberação de substâncias, recobrimentos poliméricos também vem sendo estudados para otimizar a bioatividade de implantes por meio da melhora na adesão celular na superfície de TiO₂-NTs. Pesquisas foram realizadas imobilizando gelatina no interior de nanotubos intermediada por uma camada de polidopamina. O carregamento da gelatina

permitiu um decréscimo no valor do ângulo de contato de 54,3° para 46,7°, deixando a amostra mais hidrofílica, o que vários estudos reportam como uma vantagem, uma vez que superfícies hidrofílicas promovem a rápida adesão, proliferação e diferenciação celular. Dessa forma, os resultados se mostraram favoráveis no que diz respeito a biocompatibilidade do material aplicado para implantes ortopédicos e ortodônticos.

Assim, o uso de recobrimentos poliméricos como barreira difusional mostra grande potencial em modular e sustentar a ação terapêutica do fármaco ao longo do tempo. Na **Tabela 3** estão listados alguns estudos que fizeram uso de barreiras difusionais, bem como a comparação dos resultados obtidos no prolongamento da liberação das substâncias carregadas.

Tabela 3 – Estudos sobre o recobrimento de biomatrizes com barreiras difusionais e seus respectivos resultados na liberação dos fármacos aprisionados.

Matriz	Fármaco	Recobrimento	Liberação			Ref
			Período	Sem recobrimento	Com Recobrimento	
TiO ₂ -NT	Vancomicina	Fibroína de seda	1 dia	100%	50%	(Fathi, Akbari e Taheriazam, 2019)
TiO ₂ -NT	Gentamicina	Quitosana	7 dias	26,1%	17,6%	(Feng <i>et al.</i> , 2016)
TiO ₂ -NT	Ciprofloxacino	Colágeno	7 min	100%	85%	(Ferreira <i>et al.</i> , 2019)
Ti	Vancomicina	Colágeno	30h	92%	85%	(Ionita <i>et al.</i> , 2017)
TiO ₂ -NT	5-fluorouracil	Lipossomos	41 dias	100% (6 camadas)	93% (24 camadas)	(Khoee, Khoee e Lotfi, 2019)
TiO ₂ -NT	Ibuprofeno	PLGA	7 dias	100%	45% (10 camadas)	(Wang, T. <i>et al.</i> , 2017)
TiO ₂ -NT	Interleucina (IL)-4	Alginato/ Quitosana	3 dias	65,4% (sem reticulação)	20,9% (com reticulação)	(Yin <i>et al.</i> , 2019)

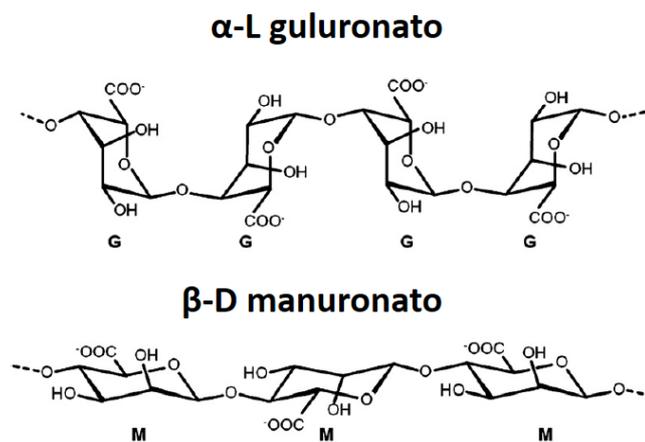
Fonte: Próprio autor

3.2.4.1 Alginato

O alginato é um polímero polianiônico, de origem natural, que vem sendo usado em aplicações biomédicas por conta da sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, baixo custo e

pelas suas propriedades de formação de gel em contato com cátions bi e polivalentes. É extraído de algas marinhas marrons, incluindo, por exemplo, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata* e *Laminaria japonica*, é comercialmente disponível na forma de sal (alginato de sódio) e solúvel em água. A estrutura do alginato é composta por dois monômeros, o β -D manuronato (M) e o α -L guluronato (G), unidos por ligações glicosídicas (1,4) em proporções e disposições variáveis, os quais irão influenciar suas propriedades (Bajpai e Sharma, 2004; Lee e Mooney, 2012; Pepperman, Kuan e McCombs, 1991; Sugawara, Imai e Otagiri, 1994).

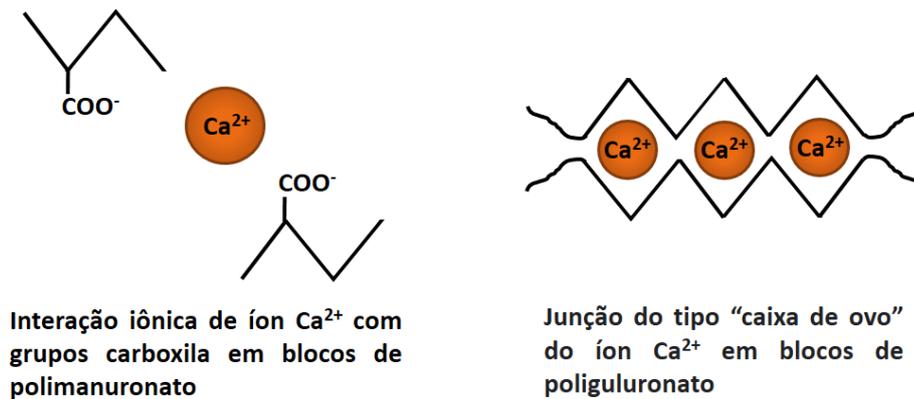
Figura 10 - Estrutura química dos monômeros α -L guluronato (G) e β -D manuronato (M).



Fonte: adaptado de Lee e Mooney, 2012

Em contato com íons de cálcio, por exemplo, o alginato forma estruturas ordenadas e tridimensionais pelo processo de gelificação ionotrópica. Uma ligação cruzada é estabelecida quando os ânions do alginato de sódio encontram os íons de cálcio (Ca^{2+}), formando junções entre as cadeias pelo mecanismo de ligação cooperativa dos íons entre dois blocos GG alinhados de duas cadeias de alginato ou pela formação do gel com cadeias MM unidas através de íons cálcio (**Figura 11**). A formação do alginato de cálcio é um processo rápido e é determinada pela velocidade de difusão dos íons Ca^{2+} na matriz do alginato de sódio (Gombotz e Wee, 1998; Liakos *et al.*, 2013).

Figura 11 - Interações de ligação entre os íons de Ca^{2+} e o grupo -COO^- para formação do gel de Alginato de Cálcio.



Fonte: adaptado de Bajpai e Sharma, 2004.

3.2.5 Modelos cinéticos

Tratando-se de liberação controlada de fármacos, uma das formas de avaliar e comparar novos sistemas de plataformas desenvolvidos é por meio do uso de equações gerais que podem traduzir matematicamente a curva de dissolução do fármaco no meio, determinando assim alguns parâmetros da cinética de liberação *in vitro* do fármaco e contribuindo para o melhor entendimento das interações fármaco-plataforma (Costa e Lobo, 2001; Ferreira, M. V. *et al.*, 2019).

A liberação de medicamentos em plataformas nanotubulares, quando em contato com o meio aquoso, é governada por um mecanismo de difusão. Esse processo é influenciado por uma série de fatores, como o tamanho da molécula do fármaco, interação entre fármaco e superfície do implante, dimensão dos nanotubos, pH do meio, polaridade, taxa de dissolução do fármaco, entre outros.

O modelo básico é descrito como um processo de difusão de acordo com a primeira lei de Fick. Para esse modelo, é desprezado o fator de degradação ou erosão das plataformas que carregam o fármaco, nesse caso os TiO_2 -NTs, uma vez que essas matrizes são materiais com dimensões fixas. Esse modelo estimará a mudança de concentração em relação ao tempo devido a difusão. Outros modelos existentes são baseados e desenvolvidos a partir da equação de Fick (Aw, Moom Sinn, Kurian e Losic, 2014).

$$\text{Difusão Fickiana:} \quad d\Phi / dt = D(d^2\Phi/dx^2) \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{Ordem zero:} \quad Q_t = Q_0 + k_0 t \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\text{Primeira ordem:} \quad \ln Q_1 = \ln Q_0 - k_1 t \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\text{Higuchi:} \quad Q_t = k_H t^{0,5} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\text{Weibull:} \quad \log[-\ln(1 - m)] = \beta \log(t - T_i) - \log a \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\text{Korsmeyer-Peppas:} \quad M_t / M_\infty = k t^n \quad (\text{Eq. 8})$$

Os parâmetros se referem a: Φ concentração em relação ao volume ou mol; t , tempo; D , coeficiente de difusão; x , comprimento ou espessura das nanoestruturas; Q_t , quantidade de fármaco liberado no tempo t ; Q_0 , quantidade inicial de fármaco carregado nas nanoestruturas; k_0 , k_1 , k_H , constantes de taxa de liberação; m , fração acumulada de fármaco; β , parâmetro de forma; a , parâmetro de escala; T_i , parâmetro de localização; M_t/M_∞ , fração do fármaco liberado no tempo t ; k , constante de taxa de liberação; n , expoente de liberação usado para caracterizar diferentes liberações com matrizes nanotubulares (Aw, Moom Sinn, Kurian e Losic, 2014).

Para sistemas com adição de material polimérico como, por exemplo, o recobrimento dos TiO₂-NTs, alguns fatores podem afetar o processo de difusão do fármaco por essa barreira. É o caso da mobilidade da cadeia, intercruzamento das cadeias, densidade de reticulação, cristalinidade, porosidade, presença de cargas e solubilidade do fármaco no polímero. A difusão do fármaco por meio dos géis inchados dependerá do tamanho das espécies químicas que sofrerão a difusão e da malha polimérica formada pelas cadeias macromoleculares. Assim sendo, o modelo mais utilizado para retratar a cinética de liberação de fármacos recobertos com camada polimérica, é o modelo de Korsmeyer-Peppas (KP). Korsmeyer e colaboradores desenvolveram um modelo simples, semi-empírico, relacionando exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo decorrido (Eq. 8) (Korsmeyer e Peppas, 1981; Peppas e Sahlin, 1989a). O valor de n é usado para caracterizar diferentes mecanismos de liberação, como pode ser visto na (Tabela 4).

Tabela 4 - Interpretação do mecanismo difusional de liberação de filmes poliméricos.

Expoente de liberação (n)	Mecanismo de transporte do fármaco	Taxa como função do tempo
0,5	Difusão Fickiana	$t^{-0,5}$
$0,5 < n < 1,0$	Transporte anômalo	t^{-n-1}
1,0	Transporte Caso-II	Liberação de ordem zero
Maior que 1,0	Transporte Super Caso-II	t^{-n-1}

Fonte: Costa e Lobo, 2001

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PARTE I – OBTENÇÃO DA PLATAFORMA DE TiO₂-NTs

4.1.1 Preparo das amostras de Titânio

As amostras foram obtidas, inicialmente, a partir de uma folha de titânio comercialmente puro, com 99,5% de pureza onde foi recortado de forma retangular com dimensões medias de 14 x 18 x 0,3 mm. Os cortes foram feitos com o auxílio de um alicate de acordo com o tamanho necessário para posteriormente anodizar as amostras.

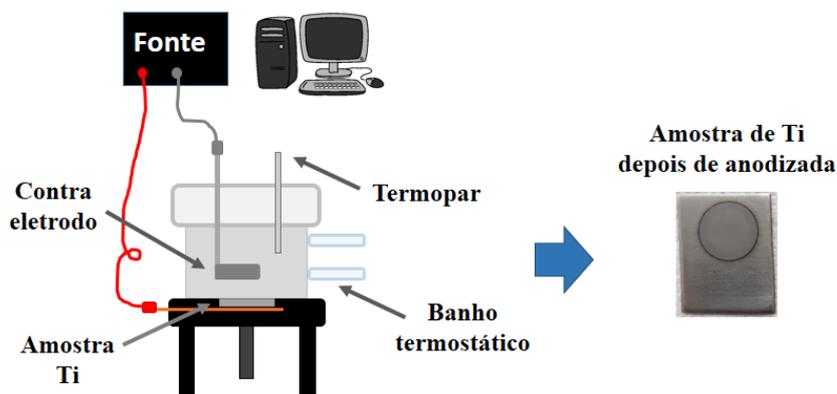
Após o corte, as amostras foram polidas mecanicamente com cinco tipos diferentes de lixa d'água, nessa ordem, #320, #400, #600, #800, #1200 e água destilada. Após cada um dos lados serem lixados com um tipo de lixa, a amostra foi sendo virada 90° para então começar um novo polimento, com uma nova lixa, até que as marcas deixadas pela lixa no metal não pudessem mais ser observadas.

Posteriormente, desengordurou-se as amostras com uma mistura de água destilada e detergente, a uma temperatura de 60°C, agitando-se durante 30 minutos, a uma velocidade de 2% no agitador IKA de modelo C-MAG HS4. Desse modo, após o desengorduramento, lavou-se as amostras com água destilada. Então as amostras foram submetidas a uma imersão em acetona ultrapura, também agitando-as a uma velocidade de 2%, durante 30 min.

4.1.2 Anodização

As amostras de Titânio comercialmente puro foram anodizadas em regime potencioestático, com uma célula eletrolítica composta por um contra eletrodo de platina, aplicando 20V durante 1200 segundos à 50°C, em um sistema sem agitação. O eletrólito utilizado para síntese é constituído de 0,8% m/m de NH₄F, 10% v/v H₂O Milli-Q, 0,5% SBF, em etilenoglicol.

Figura 12 – Esquema representativo do processo de anodização.



Fonte: Próprio autor

Para a solução de SBF com pH de 7,4, as proporções de cada reagente foram seguidas a partir da metodologia proposta por Kokubo e Takadama, 2006. Para 1000 mL de solução foram utilizadas as seguintes quantidades, respeitando a ordem de cada reagente inserido na solução, na mesma ordem da **Tabela 5**.

Tabela 5 - Ordem, quantidades e reagentes necessários para preparar 1000mL de SBF.

Reagentes	Quantidade
NaCl	8,035g
NaHCO ₃	0,355g
KCl	0,225g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,231g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311g
1,0 molL ⁻¹ HCl	39mL
CaCl ₂	0,292g
Na ₂ SO ₄	0,072g
Tris	6,118g
1,0 molL ⁻¹ HCl	0-5mL (correção de pH)

Fonte: Próprio autor

4.1.3 Caracterização dos TiO₂-NTs

4.1.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a caracterização por MEV, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura **FEI Quanta 650 FEG–High Resolution FE-SEM**. As imagens foram analisadas para se determinar a distribuição de diâmetros internos (D_i) dos nanotubos utilizando o software *ImageJ*.

4.1.3.2 Ângulo de contato (CA)

Para análise de molhabilidade das amostras de TiO₂-NTs, foram feitas medidas no goniômetro de modelo Ramé-Hart, 100-00, que por meio de uma câmera CCD captura a imagem da gota depositada sobre a amostra. As medidas foram realizadas utilizando água Milli-Q a temperatura ambiente. Para 2 amostras analisadas, anodizadas sob as mesmas condições, foram feitas 30 medidas para cada, em intervalos de 0,001 segundos.

4.2 PARTE II – PRODUÇÃO DAS PLATAFORMAS COM FÁRMACO PARA LIBERAÇÃO

4.2.1 Calibração dos fármacos

Antes de iniciar o processo de liberação, foi preciso obter as curvas analíticas de cada substância. Para o Azul de Metileno (AM), foi feita uma solução aquosa de concentração inicial 0,32 g L⁻¹ e, à partir dela, diluições em PBS para 5 mL totais foram feitas. A varredura foi realizada no intervalo de absorbâncias entre 400 a 700 nm, valores próximos de 660 nm estavam sendo buscados (Wainwright, 2007). Para a própolis verde, foi feita uma solução etanólica 1% v/v e diluições em PBS para 5 mL totais também foram efetuadas, a varredura ocorreu de 240 a 600 nm, buscando valores próximos de 300 nm (Coelho *et al.*, 2007; Szliszka *et al.*, 2011). Da mesma forma, para o eugenol, uma solução etanólica 0,2 % v/v foi usada de partida para a diluição em PBS em 5 mL totais, a varredura foi feita de 240 a 600 nm, buscando valores perto de 280 nm (Piletti *et al.*, 2017; Woranuch e Yoksan, 2013). As concentrações das diluições realizadas para as três substâncias estudadas (Azul de Metileno, extrato de própolis verde e eugenol) estão listadas na **Tabela 6**.

Todas as medidas foram realizadas no espectrofotômetro de ultravioleta-visível UV-VIS-NIR 3600, da fabricante Shimadzu. As curvas analíticas obtidas são resultados de triplicatas.

Tabela 6 - Concentrações das soluções diluídas em PBS para a construção da curva analítica das substâncias.

Azul de Metileno	Própolis	Eugenol
Concentração (mg L ⁻¹)	Concentração (ppm)	Concentração (ppm)
3,23	3,5	4
6,52	7	12
9,88	14	20
13,3	42	32
16,8	70	40
20,4	112	52
24,1	140	60
27,8	168	72
35,5	210	80
43,6	280	100

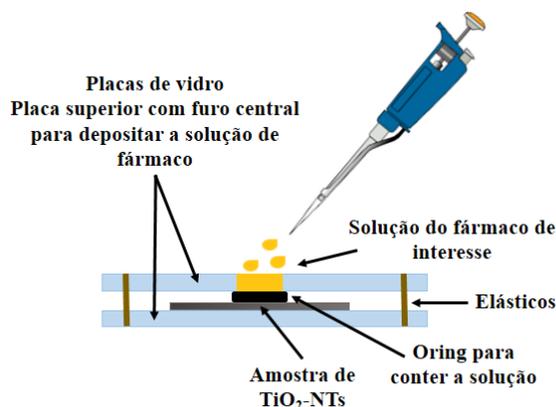
Fonte: Próprio autor

4.2.2 Carregamento do fármaco

Após as amostras contendo nanotubos estarem prontas, as plataformas seguiram para serem carregadas com as substâncias de interesse. Os testes iniciais foram feitos com o Azul de Metileno (AM) (Neon, P.A.), a fim de estudar e aprimorar a metodologia de calibração da substância e carregamento das plataformas. Para isso, foi feita uma solução aquosa de AM (**Tabela 7**), a qual foi sendo inserida de 100 em 100 μL nas plataformas, via método “*Top filling*”, até completar o volume de 700 μL totais. As inserções foram feitas com a amostra dentro de uma placa de Petri, em chapa aquecedora a 30°C e em ambiente escuro, para evitar a fotodegradação do AM.

Já para os testes com a própolis verde e o eugenol, para o carregamento das plataformas, foi utilizado um aparato de vidro com um orifício central onde a amostra de titânio foi inserida no centro desse aparato e com o auxílio de uma pipeta automática foi-se colocando a solução de interesse até completar o volume total desejado. Após esse processo, as amostras foram retiradas do aparato de vidro e foram secas ao ar livre.

Figura 13 - Aparato utilizado para carregar as plataformas com o fármaco de interesse.



Fonte: Próprio autor

As soluções das substâncias de interesse foram diluídas em etanol para facilitar o manuseio. Tanto a própolis quanto o eugenol foram obtidos comercialmente através de farmácias de manipulação. A própolis utilizada é um extrato alcoólico 70%, da marca ApisFlora® e o eugenol obtido é da marca Biodinâmica®. Na **Tabela 7** está descrito a concentração das soluções feitas a partir da própolis e do eugenol, bem como as quantidades de solução etanólica inseridas nos nanotubos e as reais quantidades das substâncias de interesse que foram depositadas nas amostras. Para a própolis foi pipetado 10 µL por vez na amostra, com pequenos intervalos de uma inserção para outra, até completar o volume total de 150 µL. Já para o eugenol, o volume de 10 µL total foi pipetado de uma só vez na amostra.

Tabela 7 - Soluções de azul de metileno, própolis verde e eugenol utilizadas para carregar as amostras.

Substâncias	Solução	Quantidade de solução inserida nas amostras	Quantidade da substância de interesse inserida nas amostras
Azul de Metileno	0,32 g L ⁻¹	700 µL	0,2 mg
Extrato alcoólico de Própolis Verde ApisFlora® 70%	1% v/v	150,00 µL	1,05 µL ou 210 ppm
Eugenol Biodinâmica®	10% v/v	10,00 µL	1,00 µL ou 200 ppm

Fonte: Próprio autor

4.2.3 Recobrimento polimérico

O Alginato de sódio utilizado é da marca Protanal® e foi feita uma solução aquosa contendo 0,5% m/v. Para o CaCl₂, foi feita uma solução aquosa 0,01 molL⁻¹. As duas soluções

foram misturadas numa proporção 3:2, respectivamente, em um agitador magnético. Foram pipetados 100 μ L dessa mistura pronta e diretamente depositados na superfície carregada com os fármacos na amostra para fazer o recobrimento. A secagem foi feita ao ar livre, tendo duração de aproximadamente 14h até o teste de liberação.

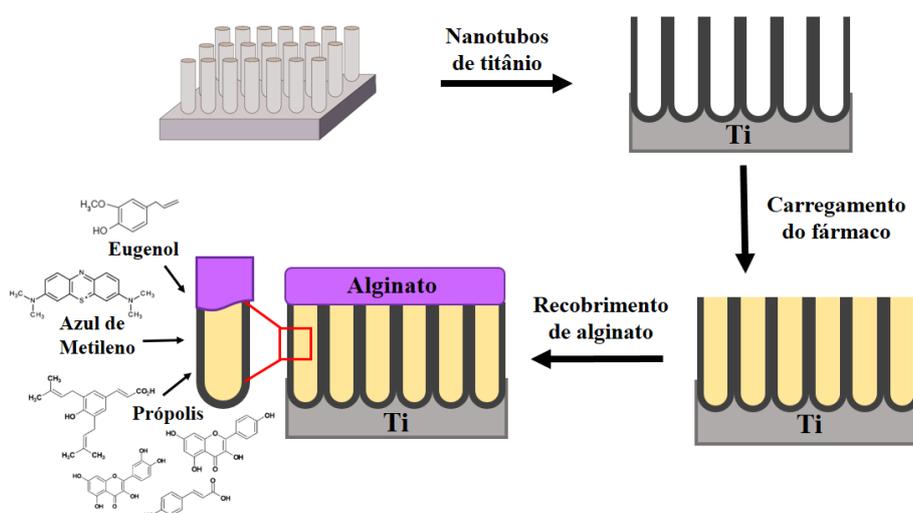
As plataformas prontas para serem levadas ao teste de liberação são mostradas a seguir, na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Conjunto de amostras* prontas para o teste de liberação.

Amostras	Substrato	Substância carregada	Recobrimento
NT/AM	Nanotubos	Azul de Metileno	-
NT/AM/alg	Nanotubos	Azul de Metileno	Alginato
Ti/prop	Polido	Própolis verde	-
Ti/prop/alg	Polido	Própolis verde	Alginato
NT/prop	Nanotubos	Própolis verde	-
NT/prop/alg	Nanotubos	Própolis verde	Alginato
Ti/eug	Polido	Eugenol	-
Ti/eug/alg	Polido	Eugenol	Alginato
NT/eug	Nanotubos	Eugenol	-
NT/eug/alg	Nanotubos	Eugenol	Alginato

*Todas as amostras levadas para o teste de liberação são duplicatas. Fonte: Próprio autor.

Figura 14 - Ilustração do processo de fabricação das plataformas de TiO₂-NT carregadas com as substâncias de interesse e recobertas com camada polimérica.



Fonte: Próprio autor

4.2.4 Teste de liberação

O teste de liberação das substâncias foi conduzido com a submersão das amostras prontas em tubo Falcon com 5 mL de solução tampão fosfato (PBS) de pH 7,4, contendo NaCl, KCl, Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , como reporta Fathi, Akbari e Taheriazam, 2019. Os tubos Falcon ficaram em banho-maria, dentro de um béquer, a 37°C. O teste ocorreu em um sistema de “rodízio”, onde a amostra era colocada em um tubo e em tempos pré-estimados (**Tabela 9**), mudava-se a mesma de tubo e aguardava o seu intervalo de liberação até ser mudada para um outro novo tubo (**Figura 15**).

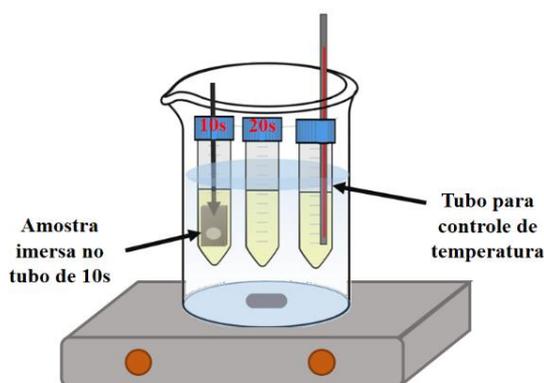
Tabela 9 - Tempos pré-estimados de liberação para trocar a amostra de tubo Falcon.

Segundos	Minutos	Horas
10	2	2
20	5	5
30	10	8
40	30	11
50	60	24
60		

Fonte: Próprio autor

Ao final do teste de liberação, haviam 16 tubos Falcon, cada um correspondente a um tempo. Conforme a amostra ia trocando de tubo, o tubo anterior, com a substância já liberada nele, era fechado e armazenado em uma caixa devidamente tampada, a fim de não entrar luz. Todo o processo de liberação também foi realizado em ambiente com pouca iluminação para evitar o processo de degradação do azul de metileno, da própolis e do eugenol.

Figura 15 - Representação esquemática do teste de liberação *in vitro* das substâncias.



Fonte: Próprio autor

Em posse dos 16 tubos contendo as devidas quantidades das substâncias liberadas, uma alíquota de 3 mL de cada tubo era retirada e levada para análise no UV-vis. A varredura foi

realizada nos intervalos de absorvâncias já mencionados anteriormente para o estudo da calibração das substâncias. Para a construção das curvas de liberação, as equações da reta obtidas nas curvas analíticas das respectivas substâncias, foram utilizadas. Em posse dos valores do coeficiente angular (b) e coeficiente linear (a) da reta, mais as absorvâncias retiradas da análise no UV-vis para as alíquotas com os fármacos (y), foi possível achar os valores de concentração em cada tempo (x) (**Eq. 9**). Como o teste de liberação foi feito em um sistema de “rodízio”, os valores de absorvância encontrados para cada tempo, no tratamento de dados, foi somado a absorvância no tempo anterior, obtendo-se então a curva de liberação característica para cada amostra.

$$y = a + bx \quad (\text{Eq. 9})$$

Para a obtenção das curvas de liberação, a normalização dos dados foi feita (M_t/M_∞). É importante citar que, uma vez que todos os filmes foram feitos sob as mesmas condições e, portanto, possuem volumes equivalentes, foi considerado que a análise de massa é igual a análise de concentração para os testes de liberação feitos com a própolis verde e o eugenol. Isso permitirá a posterior comparação das curvas de liberação dessas substâncias.

4.2.5 Modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (KP)

Para o ajuste do modelo cinético em cima das curvas experimentais de liberação, foi feita uma regressão linear usando 60% dos pontos da curva de liberação (pontos iniciais). A regressão foi baseada no modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (KP), portanto a equação utilizada foi:

$$\ln (M_t/M_\infty) = n \ln t + \ln k \quad (\text{Eq. 10})$$

Em posse dos parâmetros da reta obtida, o coeficiente linear representa a constante cinética k e, o coeficiente angular da reta, representa o expoente difusional n . Sendo assim, os valores de k e n achados para cada curva de liberação foram lançados na **Eq. 8**, alcançando assim o modelo cinético de cada plataforma.

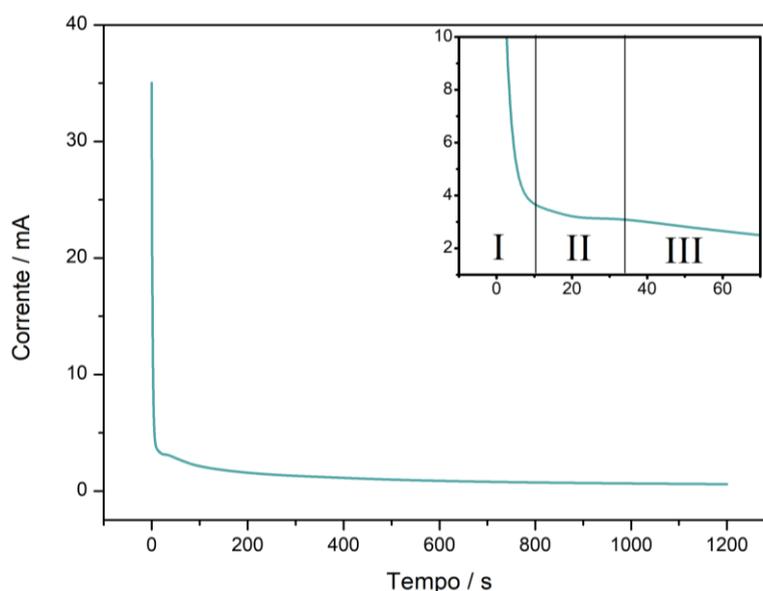
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DOS TiO₂-NTs

Para a produção das plataformas de TiO₂ nanoestruturadas, foi realizada a anodização em regime potenciostático, ou seja, foi fixado um valor de potencial, no caso, 20 V, e a corrente que passa pelo material variou com o tempo, como pode ser observado na **Figura 16**, uma curva típica das amostras de titânio anodizadas.

Figura 16 - Curva típica da anodização do titânio em regime potenciostático, com eletrólito contendo NH₄F/H₂O/SBF em Etilenoglicol, aplicando 20 V no anodo, por 1200 s.

Temperatura mantida constante à 50 °C.



Fonte: Próprio autor

A **Figura 16** representa a curva cronoamperométrica de todas as amostras utilizadas nesse trabalho, uma vez que não houve mudanças nas condições de síntese dos nanotubos, as curvas de anodização mantiveram-se semelhantes entre si.

A curva apresentada pode ser dividida em três estágios, os quais representam o crescimento do filme de óxido nanoestruturado em cima do substrato de titânio. O estágio I refere-se ao início da anodização, quando a corrente decai rapidamente devido a formação de um filme de óxido compacto e isolante na superfície do metal. O processo de oxidação tem continuidade por conta de íons como O²⁻, OH⁻, Ti⁴⁺ e F⁻ que se movem por essa camada de óxido barreira e atuam na porosidade do material pela presença dos íons fluoreto. O segundo estágio consiste, nesse caso, em um leve aumento da corrente, onde a nucleação dos poros continua progredindo. Isso ocorre uma vez que o F⁻ interage com o óxido deixando-o poroso,

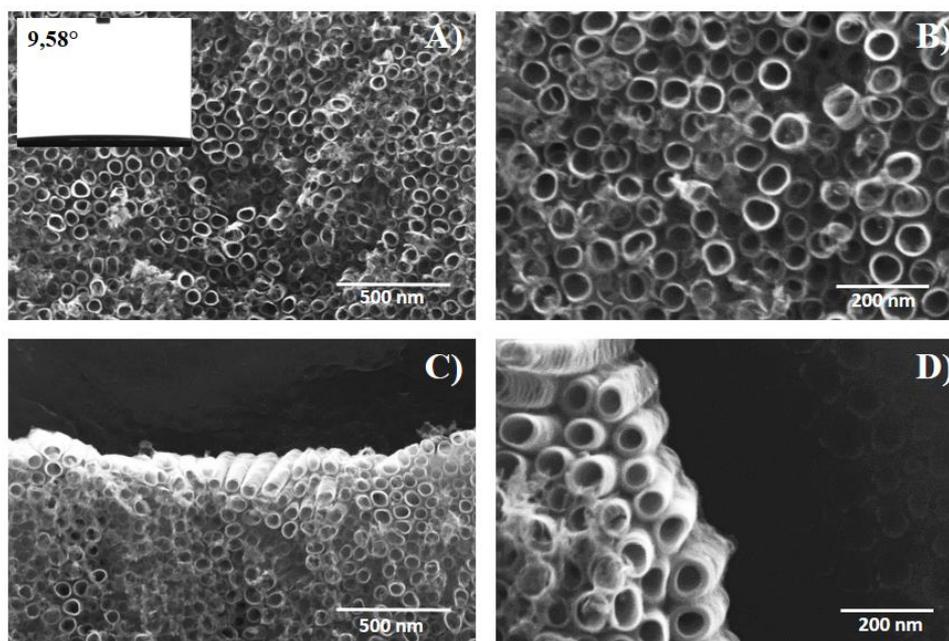
com isso, há uma diminuição na resistência da camada barreira e esses poros ficam acessíveis para as espécies iônicas em solução interagirem. Essa etapa consiste na transição entre o início da nucleação de poros para a formação de estruturas tubulares. Finalmente no estágio III o sistema atinge um estado estacionário, onde a formação dos TiO₂-NTs é alcançada. A taxa de formação do óxido na interface metal/óxido e a taxa de dissolução química na interface óxido/eletrólito são iguais (Regonini *et al.*, 2013).

Ainda com respeito a curva cronoamperométrica apresentada, é possível observar que houve o decaimento do potencial e no estágio II, não houveram transformações tão importantes na corrente. Alguns estudos trazem a influência da temperatura do eletrólito na síntese dos TiO₂-NTs como sendo um dos possíveis fatores, uma vez que o segundo estágio da curva, seria considerado um momento crítico de formação das nanoestruturas tubulares. Em seu trabalho, Prida e colaboradores, identificaram que o eletrólito em temperaturas mais baixas inibia a formação dos nanotubos (Prida *et al.*, 2007). Já para temperaturas mais altas, como é o caso do presente trabalho (50 °C), é necessário ter em vista a viscosidade do eletrólito que será afetada por esse fator. Uma menor viscosidade, relativa ao aumento de temperatura, pode aumentar a migração de íons, especialmente os íons fluoreto, principal responsável pela dissolução do TiO₂, e pode aumentar também o ataque de íons presentes na solução de Fluido Corporal Simulado (SBF) (Wang *et al.*, 2009). Contudo, enfatiza-se que os resultados finais obtidos para as plataformas de TiO₂-NTs estão em concordância com os demais trabalhos citados.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS TiO₂-NTs

Após a anodização, as amostras foram caracterizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e ângulo de contato (CA). Fica evidenciado na **Figura 17** que por meio dos processos anódicos aos quais as amostras foram submetidas, foi possível o crescimento do filme de óxido nanoestruturado.

Figura 17 – Micrografias e ângulo de contato das amostras de titânio anodizadas em regime potenciostático.



Fonte: Próprio autor

Os valores de diâmetro obtidos a partir das imagens de micrografia, revelam que $D_i = 63,04 \pm 3,76$ nm. Para o crescimento do óxido nanoestruturado, alguns parâmetros durante a anodização devem ser levados em conta. Como citado na seção anterior, a temperatura do eletrólito é um dos fatores que podem alterar a formação do óxido, dado que a mudança na viscosidade da solução, altera as taxas de transporte de massa. No que diz respeito os diâmetros dos nanotubos, principalmente, o potencial aplicado, terá dependência com esse parâmetro do óxido, sendo diretamente proporcional a relação entre potencial e diâmetro. Estudos mostram potenciais de 20V a 60V aplicados e nanotubos que variam de diâmetros internos de 20 nm a 120 nm (Heidari Khoee, Khoee e Lotfi, 2019; Tian *et al.*, 2015).

Para fins de bioimplantes, Lv e colaboradores estudaram a influência dos diâmetros dos nanotubos no comportamento osteogênico de células humanas retiradas do tecido adiposo (hASCs). Na preparação das amostras de titânio, aplicaram potenciais de 10V, 20V e 25V, obtendo diâmetros de tudo de 50 nm, 70 nm e 100 nm, respectivamente. Os melhores resultados observados na questão de diferenciação osteogênica de hASCs celular foram para TiO_2 -NTs de 70 nm (Lv *et al.*, 2015). Com isso, pode-se inferir que os resultados obtidos de D_i para as amostras produzidas nesse trabalho, estão de acordo com o levantamento bibliográfico feito e atendem, nesse parâmetro, as características propícias para plataformas de bioimplantes.

Já para a análise de ângulo de contato, os resultados obtidos foram de $9,58 \pm 0,63^\circ$. A molhabilidade dos TiO₂-NTs desempenham um papel crucial para as aplicações biomédicas desse material. Um óxido com características hidrofílicas promove uma maior adsorção de proteínas e melhora a resposta celular na superfície do implante, uma vez que a interação entre os fluidos biológicos e o biomaterial em questão, será otimizada com a hidrofiliabilidade dos nanotubos. Essa capacidade de absorver água pode ser atribuída ao aumento da área superficial garantida pelo processo de anodização e formação do óxido nanoestruturado. Além disso, o eletrólito utilizado, contendo NH₄F, faz com que compostos de flúor formados durante a anodização, os quais são solúveis em água, estejam presentes na superfície do óxido, podendo aumentar a hidrofiliabilidade das amostras (Roguska *et al.*, 2016; Shin *et al.*, 2011).

5.3 TESTE DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Para o estudo das quantidades liberadas de própolis verde e de eugenol carregadas nos nanotubos, foi considerado que a análise de massa é igual a análise de concentração, ou seja, uma vez que todos os filmes foram feitos sob as mesmas condições, então possuem volumes equivalentes:

$$C = m / V \quad (\text{Eq. } 10)$$

Onde C é a concentração em g/mL, m é a massa em g e V o volume em mL.

Assim, um dos parâmetros para elaboração das curvas de liberação foi dado por M_t/M_∞ , que é a fração do fármaco liberado no intervalo de tempo t, onde M_t é a quantidade de cada substância liberada no intervalo de tempo t e M_∞ é a quantidade total de cada substância liberada após tempo infinito (Korsmeyer e Peppas, 1981). Isso permite que os testes de liberações possam ser comparados independentemente da quantidade de carga inicial carregada nos nanotubos.

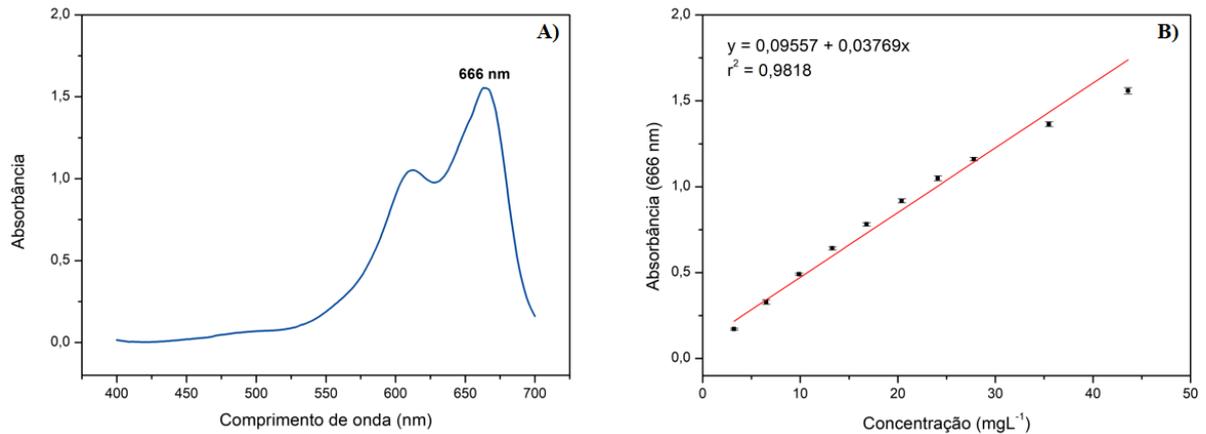
5.3.1 Azul de Metileno (AM)

Os primeiros testes foram feitos com o Azul de Metileno (AM), a fim de conhecer e estruturar uma metodologia acerca de todos os processos relativos a confecção, calibração e liberação das plataformas carregadas, para posteriormente aplicar a outras substâncias, como o extrato de própolis e o eugenol. Para isso, a substância foi submetida a alguns testes no UV-vis, à partir de uma solução $0,32 \text{ gL}^{-1}$, com sucessivas diluições em tampão PBS, como já descrito anteriormente. Para estudar o perfil de liberação do fármaco, os valores obtidos de absorbância do AM foram cruzados com as concentrações conhecidas das diluições, alcançando-se assim, a

curva analítica. Com base nessa curva, a concentração obtida para cada tempo foi achada, traçando-se, dessa forma, o transiente de liberação do AM das amostras.

A **Figura 18** traz as informações pertinentes ao valor máximo de absorbância, em 666 nm, obtido para a concentração de $43,6 \text{ mgL}^{-1}$ de AM em PBS na varredura inicial (**Figura 18 A**) e a curva analítica (**Figura 18 B**) construída a partir de valores de diluição do AM (**Tabela 6**).

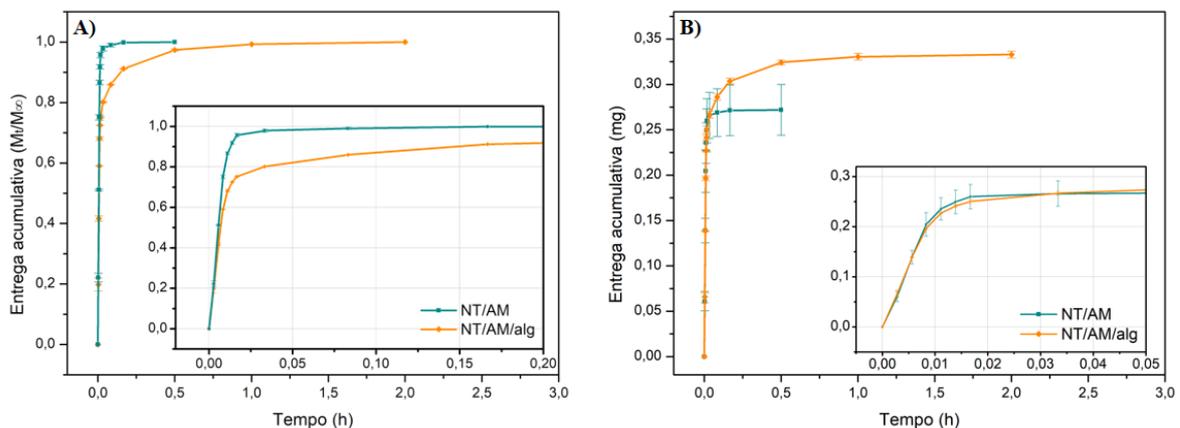
Figura 18 – A) Comprimento de onda característico e B) curva analítica do Azul de Metileno.



Fonte: Próprio autor

Pretendia-se a princípio verificar a influência do recobrimento polimérico no tempo total de entrega e no *burst* inicial das plataformas carregadas com AM. Para isso testes iniciais foram feitos com amostras de TiO_2 -NTs sem o alginato (NT/AM) e com a cobertura de alginato (NT/AM/alg). Os resultados da liberação podem ser vistos na **Figura 19**.

Figura 19 – Comparação da A) entrega acumulativa (M_t/M_∞) de Azul de Metileno em função do tempo para amostras de NT/AM e NT/AM/alg com B) entrega acumulativa (mg) de Azul de Metileno em função do tempo para amostras de NT/AM e NT/AM/alg.



Fonte: Próprio autor

A **Figura 19 A** traz o perfil de liberação do AM, com dados normalizados (M_t/M_∞), podendo-se comparar, primeiramente, o efeito do alginato na liberação inicial da substância. A amostra NT/AM/alg consegue diminuir o *burst* e, com isso, aumentar o tempo total de entrega. Para a amostra NT/AM a liberação total ocorre em 30 minutos, já quando os nanotubos são recobertos com a camada de polímero, o tempo total de entrega aumenta para 2 horas. Em concordância com dados da literatura, o recobrimento polimérico leva a diminuição das taxas de liberação, atuando como uma barreira difusional. O fármaco aprisionado nas plataformas, nesse caso, o Azul de Metileno, só passará para o meio externo, depois que a matriz polimérica tiver absorvido água e relaxado suas cadeias (Korsmeyer e Peppas, 1981; Peppas e Sahlin, 1989b). Portanto, este resultado demonstra que a cobertura de alginato induz taxas mais lentas de liberação do AM.

Para além da verificação da influência de alguns parâmetros das plataformas, é importante ter um entendimento global da situação de liberação. Para isso, a **Figura 19 B** traz o perfil de liberação do Azul de Metileno, porém com dados não normalizados, sendo o eixo y a entrega acumulativa em miligramas do soluto. O que chama a atenção para esses resultados é a quantidade de soluto liberada. Inicialmente, é necessário lembrar que a quantidade de Azul de Metileno carregada em cada plataforma é de 0,2 mg. Porém, o que se verifica, é uma quantidade maior de massa entregue no meio, tanto das plataformas sem o recobrimento, com entrega de 0,27 mg, como das plataformas recobertas, entregando 0,33 mg de AM. Como o experimento mostrado é fruto de duplicatas e esse fenômeno se repete para todas as amostras testadas, o que pode-se inferir sobre o ocorrido é em relação, principalmente, a calibração das pipetas automáticas utilizadas no carregamento do fármaco. Em decorrência desse fato, evidencia-se a importância de normalizar esses valores para realizar as demonstrações comparativas.

Matematicamente, as curvas de liberação podem ser descritas a partir de modelos cinéticos, os quais desenharam os mecanismos de transporte do fármaco da plataforma para o meio. O modelo genérico utilizado para tratar os dados obtidos foi o de Korsmeyer-Peppas (KP) (Eq. 8) e as respectivas equações de regressão estão apresentadas na **Tabela 10**. Como mostrado anteriormente, o parâmetro n da equação diz respeito ao tipo de transporte de massa ocorrido na liberação. Com valores menores que 0,5, todas as amostras exibem padrões de difusão seguindo a segunda lei de Fick, ou seja, a liberação do soluto é dada por difusão livre.

Outro parâmetro da equação a ser analisado é o k , a constante cinética, a qual aponta para a taxa de liberação do fármaco inserido nas plataformas. Quanto maior o k , maior a taxa de liberação, ou seja, mais rapidamente ocorre a entrega do fármaco para o meio (Korsmeyer e

Peppas, 1981). Comparando os valores de k nas equações KP da **Tabela 10**, esse comportamento está em concordância com o esperado, uma vez que a amostra sem revestimento polimérico, teve sua liberação total feita em 30 min, enquanto a amostra revestida de alginato, conseguiu prolongar sua liberação para 2h.

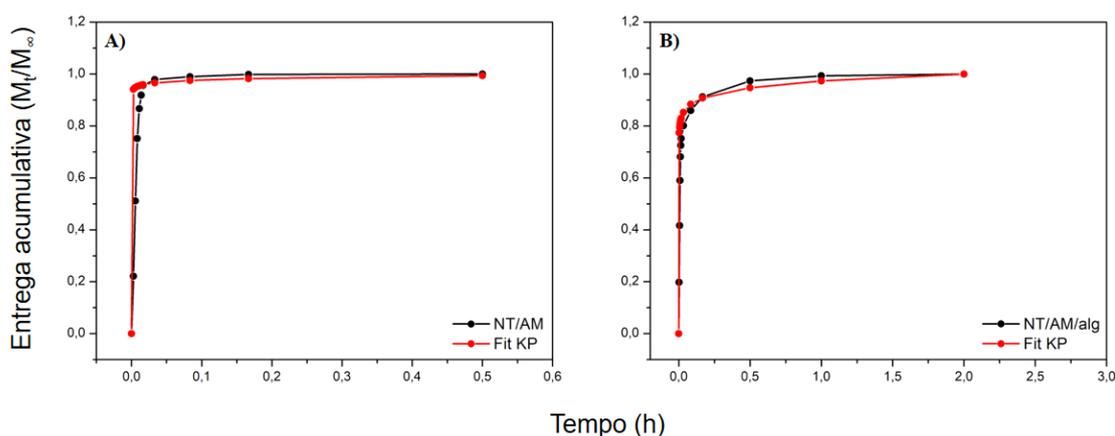
Tabela 10 – Coeficientes da equação de Korsmeyer-Peppas (KP) para as plataformas carregadas com Azul de Metileno e o tempo de liberação do fármaco em 30 min de teste, de acordo com a equação.

Amostra	Equação KP (kt^n)	Fármaco liberado para $t = 30 \text{ min}$ (M_t/M_∞)
NT/AM	$1,0007t^{0,0104}$	0,9935
NT/AM/alg	$0,9733t^{0,0390}$	0,9473

Fonte: Próprio autor

Em posse das equações que descrevem as curvas de liberação do AM, foram lançados nesse modelo matemático os respectivos tempos (t) de análise, achando os valores de M_t/M_∞ para cada tempo. Assim, foi possível obter as curvas teóricas previstas por meio do ajuste do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas. As curvas teóricas em comparação com as curvas experimentais são mostradas na **Figura 20**.

Figura 20 - Curvas da entrega acumulativa (M_t/M_∞) de Azul de Metileno em comparação com as curvas com o ajuste do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (KP).



Fonte: Próprio autor

Por meio da comparação das curvas experimentais com aquelas obtidas a partir das equações de regressão linear, chega-se em um modelo cinético a partir do modelo de KP que descreverá o perfil de liberação do AM de maneira muito próxima. Dividindo-se a curva de liberação em duas partes, a primeira diz respeito aos tempos iniciais, onde a liberação ocorre de forma mais rápida, resultando na saída do fármaco da matriz, por um processo de difusão

livre. A segunda parte, após a fase de início, sugere que o AM continua sendo liberado, porém de forma mais lenta, ou seja, a taxas menores. Tal comportamento pode ser verificado em ambas as amostras, e o ajuste matemático consegue reproduzir esse perfil experimental.

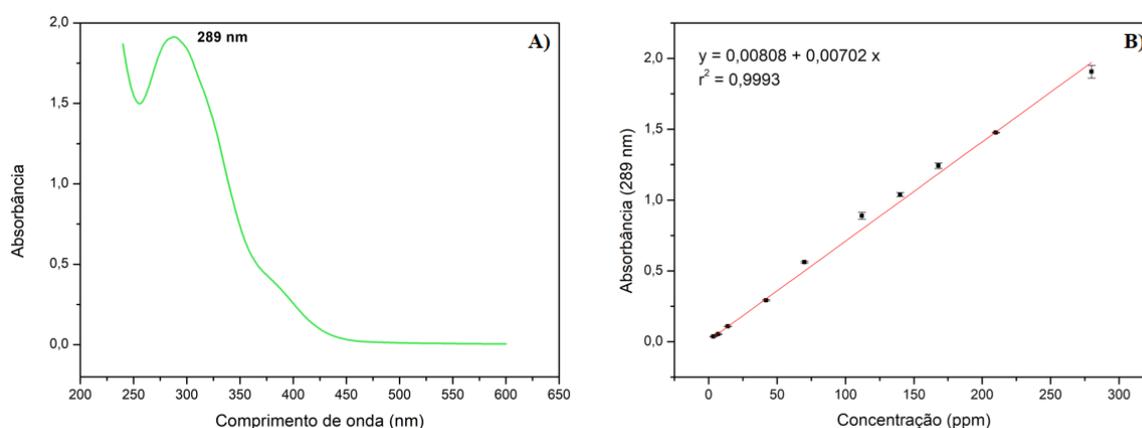
Nesse sentido, ao comparar as duas amostras, a plataforma que apresenta um resultado melhor na liberação do Azul de Metileno, é a plataforma recoberta com alginato. Mesmo que boa parte do fármaco seja desprendida do material logo quando imerso em PBS, uma quantidade do soluto consegue ainda ficar aprisionada na plataforma por conta da interação com as nanoestruturas do óxido e do recobrimento polimérico de alginato e ser liberado de forma mais lenta e gradual nos tempos seguintes.

Assim como o Azul de Metileno, o extrato de própolis verde e o eugenol foram estudados segundo seu perfil de liberação. Porém, além da influência do recobrimento de alginato no aprisionamento dessas substâncias, também foi realizado testes para conferir a atuação dos nanotubos na contenção das substâncias e diminuição do *burst* inicial.

5.3.2 Própolis

Inicialmente, foi feito um estudo com uma solução etanólica de própolis verde 1% v/v a fim de se averiguar a absorção máxima da substância quando submetida a diluições em PBS. Para a banda de absorção máxima, exibida na **Figura 21 A**, foi diluído 200 μ L da solução inicial de própolis em 4,8 mL de PBS, completando assim, no balão volumétrico, um volume total de 5 mL de solução de própolis verde diluída (280 ppm). Já para a curva de calibração (**Figura 21 B**), outras diluições partindo da solução etanólica de própolis 1% v/v foram feitas, variando de 3,5 a 280 ppm.

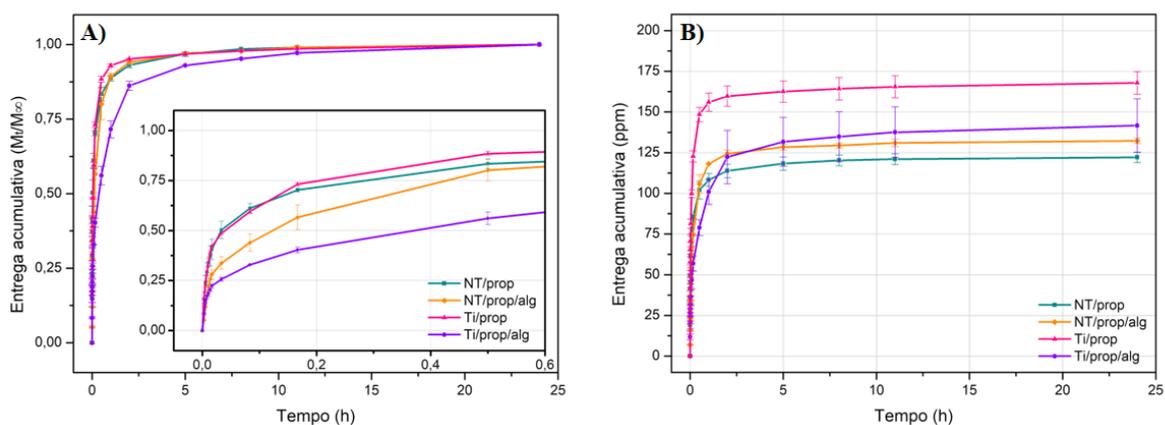
Figura 21 – A) Comprimento de onda característico e B) curva analítica do extrato de própolis verde.



Fonte: Próprio autor

Para observar o perfil de liberação da própolis, a **Figura 22** permite a comparação entre quatro diferentes plataformas, nas quais o própolis foi inserido: plataforma de nanotubos, plataforma de nanotubos recoberta com alginato, plataforma de titânio polido e plataforma de titânio polido recoberta com alginato.

Figura 22 – Comparação da A) entrega acumulativa (M_t/M_∞) de própolis em função do tempo para amostras de NT/prop, NT/prop/alg, Ti/prop e Ti/prop/alg com a B) entrega acumulativa (ppm) de própolis em função do tempo para amostras de NT/prop, NT/prop/alg, Ti/prop e Ti/prop/alg.



Fonte: Próprio autor

Primeiramente, nota-se para todas as amostras que a entrega acumulativa da própolis aumenta com o passar do tempo do teste de liberação. Outro comportamento atribuído a todas as curvas, é a típica liberação em duas fases, caracterizando-se pela presença de uma explosão inicial da substância logo quando a amostra é imersa em PBS seguido de uma estabilização da curva, indicando a entrega da maior parte do fármaco no meio.

Na **Figura 22 A**, os dados foram normalizados (M_t/M_∞) e por isso, um primeiro paralelo será traçado com as plataformas, a partir dessa figura. Comparando os conjuntos de amostras produzidas com nanotubos (NT), é possível observar o efeito do recobrimento de alginato sobre as plataformas, diminuindo a explosão inicial. O mesmo ocorre para o conjunto de amostras de titânio polido (Ti), quando o revestimento de alginato está presente, o *burst* inicial é minimizado. De fato, estudos trazem resultados promissores com diferentes revestimentos poliméricos sobre a superfície carregada dos TiO_2 -NTs. O que ocorre é o prolongamento no tempo total de liberação do fármaco com relação as amostras sem o recobrimento. Kumeria e colaboradores, por exemplo, conseguiram retardar a entrega de gentamicina com recobrimento de quitosana nas 6 primeiras horas de liberação de 77% para 60% (Kumeria *et al.*, 2015).

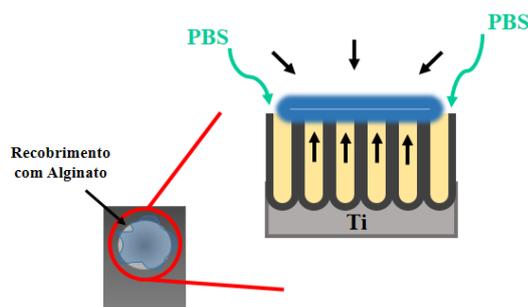
Outra comparação possível, na mesma figura, diz respeito a influência dos nanotubos no aprisionamento da própolis verde. Para amostras com e sem nanotubos, quando não há o revestimento de alginato (NT/prop e Ti/prop), nota-se uma leve atenuação da curva para aquelas plataformas constituídas de óxido nanoestruturado (NT/prop). Isso porque os nanotubos também mediam um processo difusional, o qual é guiado por um gradiente de concentração que permite o transporte e liberação das moléculas do fármaco dos nanotubos para o meio (Aw, M. S., Kurian e Losic, 2014). Esse fator diz respeito ao efeito da capilaridade dos nanotubos. Estudos reportam que materiais hidrofílicos, como no caso das amostras produzidas nesse trabalho, com diâmetros menores, aumentam a infiltração de água nas nanoestruturas, fazendo com que o fármaco seja liberado mais rapidamente (Kulkarni *et al.*, 2016).

Em contraponto com o perfil sem recobrimento, para as amostras com alginato (NT/prop/alg e Ti/prop/alg), aquelas sem nanotubos tiveram um retardo maior na liberação da própolis, indo na direção oposta do que esperava-se. Quando o recobrimento é feito nas matrizes anodizadas, o alginato fica aderido diretamente no óxido, o qual tem por característica ser poroso e, nesse caso, foi mostrado também que ele é hidrofílico. Uma vez que as plataformas são levadas para o teste de liberação e imersas em meio aquoso, o processo de inchamento do polímero pode acontecer não somente pela interface PBS/alginato, mas também pela interface alginato/óxido poroso (**Figura 23**). Dessa forma, o processo de infiltração de água no polímero, cujo qual também é hidrofílico, pode ser facilitado pelas nanoestruturas, gerando um desprendimento maior do fármaco para o meio.

É importante lembrar que o recobrimento das amostras é feito por meio de uma deposição da mistura Alginato de Sódio e Cloreto de Cálcio sobre a área anodizada e, em seguida, espera-se secar totalmente até que se forme um filme, de aspecto seco. Depois do processo de secagem, é possível, por meio de aspectos visuais, observar que esse filme não se estende até as bordas da área anodizada da amostra, deixando certa irregularidade no recobrimento (vide **Figura 23**) e podendo afetar, como já dito anteriormente, a liberação não só da própolis verde, mas das outras substâncias utilizadas nesse trabalho. Essa irregularidade na conformação do filme com aspecto seco também pode ser originada pela não homogeneidade do recobrimento. Isto é, a concentração de Cálcio, responsável pelo processo de gelificação, em algumas áreas pode ser maior que em outras, fazendo com que a espessura do filme seja desigual na plataforma. Contudo, para a comprovação desses pontos levantados sobre o recobrimento, testes mais específicos precisariam ser executados a fim de verificar a influência das irregularidades do filme polimérico na cinética de liberação das substâncias.

Já nas amostras sem a nanotexturização, o titânio é polido previamente e sua superfície lisa pode ajudar na aderência do alginato. Além de não haver nanoestruturas para infiltração de água no sentido substrato/polímero, ou seja, a infiltração ocorre apenas por cima do recobrimento, na interface PBS/alginato.

Figura 23 - Relaxamento da matriz polimérica por infiltração do meio aquoso no processo de liberação do fármaco.



Fonte: Próprio autor

De qualquer forma, isso não significa que plataformas de titânio polido são as mais propícias para serem usadas como biomateriais no caso de substituição óssea. Diversos estudos, inclusive, *in vivo*, mostraram que os nanotubos auto ordenados obtidos a partir do processo de anodização, pode promover uma maior interação com células osteoblásticas, uma vez que há um aumento da área de contato da célula óssea com o implante (Ma *et al.*, 2015; Mu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2016). Somsanith e colaboradores, estudaram o efeito dos nanotubos carregados com própolis em implantes dentários na mandíbula de ratos. As nanoestruturas aumentaram a proliferação e diferenciação de células ósseas, além da própolis conseguir diminuir a expressão de citocinas inflamatórias no local do implante (Somsanith *et al.*, 2018).

Já na **Figura 22 B**, os dados exibidos não passaram pelo tratamento de normalização, nesse caso, é possível ver as quantidades totais liberadas para cada plataforma. Ainda relacionando as plataformas recobertas com alginato, a amostra NT/prop/alg teve uma quantidade total menor de própolis liberada do que a amostra Ti/prop/alg. Uma possível conclusão para esses dados é a influência dos nanotubos no aprisionamento do fármaco e, para ser liberado mais própolis no meio, no caso da amostra com nanotubos, necessitaria de um tempo maior de teste em imersão no PBS. Para as amostras sem nanotubos (Ti/prop/alg), a quantidade total liberada foi maior, uma vez que o único meio de aprisionamento do fármaco era a barreira de alginato, logo, a liberação ficou por conta do inchamento de tal matriz polimérica. Nesse sentido, ainda na **Figura 22 B**, a quantidade total de fármaco entregue pelo conjunto de amostras contendo nanotubos, foram menor no tempo de 24h do que por aquele

conjunto que não contem nanotubos (Ti), corroborando para o princípio de que os nanotubos tiveram papel importante no confinamento da própolis verde.

Para descrever as curvas de liberação matematicamente, o modelo cinético utilizado de Korsmeyer-Peppas (KP) (Eq. 8) conseguiu traçar o mecanismo de transporte da própolis da plataforma para o meio. As respectivas equações de regressão estão apresentadas na **Tabela 11**. Todas as amostras apresentaram valores de expoente difusional (n) menores que 0,5, indicando que as amostras seguem as leis de Fick e exibem padrões de difusão livre.

No caso de amostras recobertas com a camada polimérica de alginato, ainda na **Tabela 11**, uma pequena diferença na entrega do fármaco pode ser notada para aquelas amostras com a presença do polímero em comparação com as sem cobertura, no tempo de 30 min de teste. Como debatido nos artigos, são vários os fatores que podem alterar o processo de difusão da substância a ser liberada pelas matrizes poliméricas. A níveis moleculares, a difusão do soluto depende intrinsecamente do inchaço do gel polimérico para que as espécies consigam permear a malha macromolecular formada para recobrir as amostras (Korsmeyer e Peppas, 1981).

Os valores da taxa de liberação da própolis (k) permitem inferir que aquelas amostras com um k menor, seriam as plataformas com um resultado mais conveniente, dado que a liberação do fármaco é feita de forma mais lenta. Desse modo, assim como visto experimentalmente, as equações do modelo cinético de KP exibem uma taxa de liberação menor para a amostra Ti/prop/alg e o maior valor de k ou a taxa de liberação mais rápida, fica para a amostra que não possui nanotubos, nem foi recoberta com o biopolímero (Ti/prop).

Tabela 11 - Coeficientes da equação de Korsmeyer-Peppas (KP) para as plataformas carregadas com própolis verde e o tempo de liberação do fármaco em 30 min de teste, de acordo com a equação.

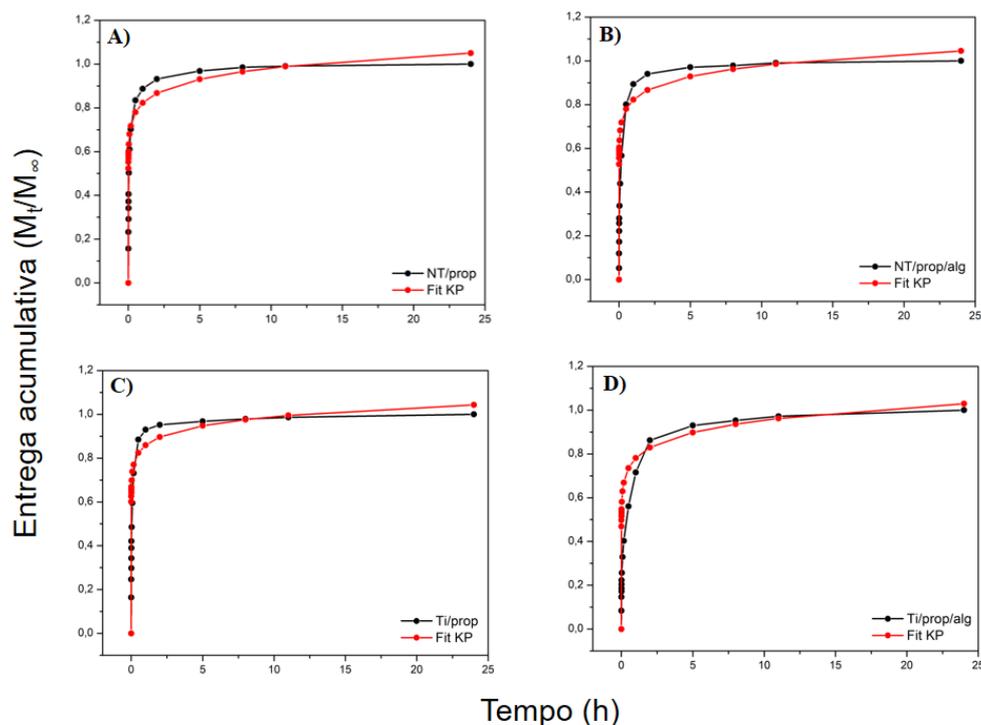
Amostra	Equação KP (kt^n)	Fármaco liberado para $t = 30$ min (M_t/M_∞)
NT/prop	$0,8225t^{0,0768}$	0,7799
NT/prop/alg	$0,8125t^{0,0894}$	0,7637
Ti/prop	$0,8594t^{0,0609}$	0,8239
Ti/prop/alg	$0,7810t^{0,0868}$	0,7354

Fonte: Próprio autor

À partir das equações de KP que descrevem as curvas de liberação da própolis verde, os valores de M_t/M_∞ foram obtidos para cada tempo. Na **Figura 24**, é possível comparar as curvas de liberação normalizadas com as curvas teóricas ajustadas a partir das equações de regressão

do modelo cinético de KP, sugerindo que as equações contidas na **Tabela 11** conseguem descrever as curvas obtidas no teste de liberação.

Figura 24 - Curvas da entrega acumulativa (M_t/M_∞) de própolis verde em comparação com as curvas com o ajuste do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (KP).



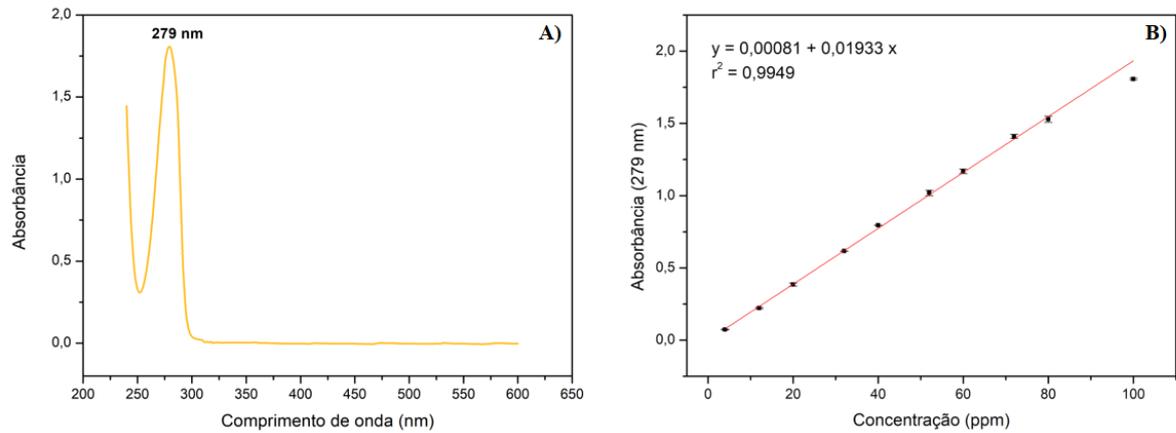
Fonte: Próprio autor

Assim como para as plataformas contendo AM, para a própolis foi possível reproduzir o perfil experimental com os ajustes matemáticos. Ou seja, a característica de explosão inicial com a saída mais rápida da substância da plataforma foi mantida por meio do modelo cinético e, subsequentemente, a liberação mais lenta.

5.3.3 Eugenol

Os mesmos passos repetiram-se para as análises com o eugenol, assim, de início foi feita uma solução etanólica de eugenol 0,2% v/v a fim de se verificar a absorção máxima da substância quando submetida a diluições em PBS. Para a banda de absorção máxima, foi diluído 250 μ L da solução inicial de eugenol em 4,75 mL de PBS, completando o volume total do balão volumétrico para 5 mL (100 ppm). Na curva de calibração, outras diluições partindo da solução etanólica de eugenol 0,2% v/v foram feitas, variando de 4 a 100 ppm.

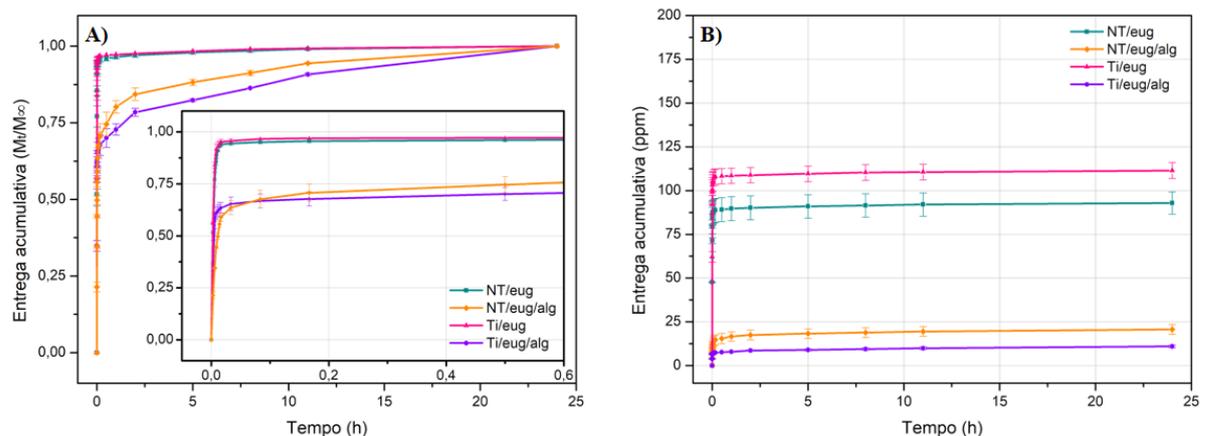
Figura 25 – A) Comprimento de onda característico e B) curva analítica do eugenol.



Fonte: Próprio autor

O perfil de liberação das amostras carregadas com eugenol podem ser observadas na **Figura 26**. Análogo às amostras com própolis, para o eugenol também foram fabricadas quatro tipos plataforma: plataforma de nanotubos, plataforma de nanotubos recoberta com alginato, plataforma de titânio polido e plataforma de titânio polido recoberta com alginato.

Figura 26 – Comparação da A) entrega acumulativa (M_t/M_∞) de eugenol em função do tempo para amostras de NT/eug, NT/eug/alg, Ti/eug e Ti/eug/alg com a B) entrega acumulativa (ppm) de eugenol em função do tempo para amostras de NT/eug, NT/eug/alg, Ti/eug e Ti/eug/alg.



Fonte: Próprio autor

Diferentemente dos testes com a própolis, que foi feito uma solução etanólica “mãe” 1% v/v para estudo de diluições em PBS e conseguiu-se utilizar a mesma solução para carregar as amostras com sucessivas inserções, com o eugenol isso não foi possível. Como dito anteriormente, a solução etanólica utilizada para a construção da curva de calibração foi 0,2% v/v, alcançando o valor máximo de 100 ppm na diluição em PBS (**Figura 25 B**), enquanto a solução feita para preencher as plataformas foi de 10% v/v, utilizando-se 10 μ L dela, o que dá

200 ppm inseridos nas plataformas. Isso ocorreu uma vez que o eugenol é um composto orgânico volátil e, portanto, o método de sucessivas inserções com uma solução menos concentrada não se mostrou eficiente em testes preliminares. Isso porque a cada inserção havia a necessidade de esperar a solução secar em cima do substrato para então realizar uma nova adição do fármaco. Logo, foi necessário concentrar mais a solução e carregar as amostras com um volume menor porém em uma única adição. Mesmo com a modificação da metodologia de inserção do eugenol nas plataformas, era esperado que poderia haver perda do material no processo de secagem.

Nesse sentido, é possível observar na figura sem a normalização dos dados, a quantidade total de eugenol entregue no meio (**Figura 26 B**). Dentre os quatro tipos de plataformas expostas à liberação, no tempo de 24h de teste, o máximo de eugenol entregue foi pouco mais da metade da quantidade total carregada, cerca de 55,7%, pela amostra Ti/eug. Se comparar com a plataforma NT/eug, a qual conseguiu entregar 46,4% no mesmo tempo total de teste, é possível inferir sobre duas possibilidades. A primeira diz respeito justamente a volatilização da camada de eugenol que não conseguiu penetrar nos nanotubos e ficou adsorvida na superfície da amostra, fazendo com que houvesse uma diminuição da quantidade inicial da substância. A segunda implica na capacidade dos nanotubos conseguirem reter o fármaco por mais tempo em seu interior, sendo necessário um tempo maior de imersão em PBS para verificar a entrega do fármaco restante.

Ainda na mesma figura, há um salto das quantidades finais entregues, em 24h, para as amostras com e sem recobrimento de alginato. Para àquelas com recobrimento, a quantidade final entregue foi muito menor do que para as amostras sem a cobertura polimérica. Um dos cenários para que isso tenha ocorrido é, novamente, a volatilização do eugenol. Quando recobertas com o alginato, as amostras precisam ficar secando por cerca de 14h e, ainda que o alginato consiga aprisionar uma parcela do eugenol na amostra, outra grande parte acaba se dissipando no processo, já resultando em uma concentração inicial menor da substância.

Já quando retoma-se para a **Figura 26 A**, com a normalização dos dados (M_t/M_∞), a influência do recobrimento de alginato no *burst* inicial sobre as plataformas carregadas com eugenol fica mais clara. A explosão do fármaco é diminuída para as duas amostras recobertas (NT/eug/alg e Ti/eug/alg) em comparação com aquelas plataformas sem recobrimento. Ainda que ambas tenham conseguido uma atenuação inicial da curva e que bem no início do processo a amostra NT/eug/alg tenha alcançado um ligeiro retardo em relação a plataforma Ti/eug/alg, essa última conseguiu sustentar a liberação com taxas mais lentas durante todo o processo. Como citado para o sistema com a própolis verde, as plataformas com óxido, nesse caso, podem

facilitar a infiltração de água na matriz polimérica, por meio de suas nanoestruturas. Além da infiltração esperada pela parte superior da matriz, a parte inferior, aderida diretamente no óxido, também pode estar sofrendo o processo de intumescimento, fazendo com que o fármaco seja liberado mais rápido. A superfície porosa do óxido é outro fator que pode afetar na aderência do alginato. Para o titânio sem nanotubos, sua superfície polida parece auxiliar na fixação do polímero, retardando a entrega do eugenol.

Ainda com relação ao efeito do alginato no retardo da liberação, pelos motivos citados acima, comparando as amostras NT/eug/alg e Ti/eug/alg é possível considerar a possibilidade do alginato ser o único elemento que media um processo difusional nessas plataformas. Ou seja, nesse caso, os nanotubos não seriam responsáveis por interferir na difusão do fármaco ao meio e não teriam influência nos testes de liberação. O cenário considerado é que uma vez que as plataformas foram recobertas com solução de Alginato de Sódio e Cloreto de Cálcio, no processo de secagem, o fármaco que até então estava aprisionado nas nanoestruturas, pode ser absorvido e incorporado no recobrimento por capilaridade. Logo, o responsável por liberar o fármaco para o meio aquoso seria somente o alginato e não o conjunto nanotubos/alginato, já que grande quantidade do fármaco estaria confinada nas estruturas do polímero e não mais no óxido nanoestruturado. Para a verificação desse efeito, outros testes relacionando a quantidade de fármaco presente no recobrimento de alginato e a quantidade de fármaco presente nos nanotubos, precisariam ser realizados.

As curvas de liberação das amostras carregadas com eugenol também podem ser descritas a partir do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (KP) (Eq. 8). As respectivas equações de regressão seguindo o modelo KP estão apresentadas na **Tabela 12**. Os valores menores que 0,5 do expoente difusional n apontam que a liberação do eugenol foi dada por difusão livre. Outro fator de destaque, para as amostras recobertas, é a diminuição nos valores de k , a constante cinética associada a taxa de liberação, sugerindo que a liberação seguiu de forma mais lenta, diminuindo a explosão inicial do fármaco. Já para as amostras não recobertas, os valores de k aumentam, indicando um *burst* mais agressivo e uma velocidade aumentada da entrega do fármaco.

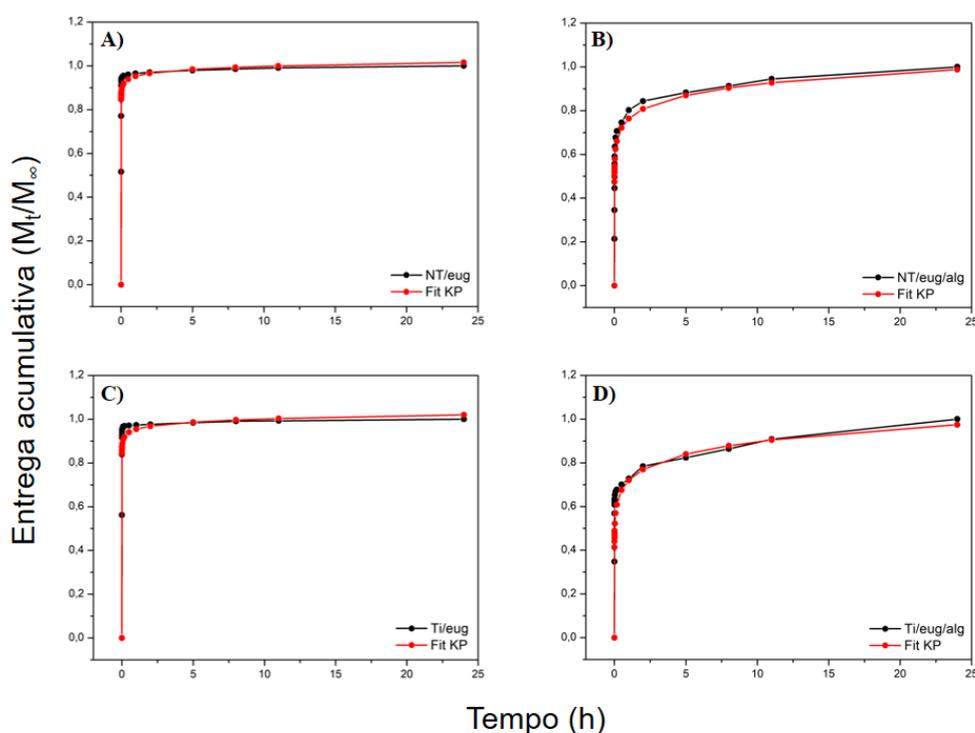
Tabela 12 - Coeficientes da equação de Korsmeyer-Peppas (KP) para as plataformas carregadas com eugenol e o tempo de liberação do fármaco em 30 min de teste, de acordo com a equação.

Amostra	Equação KP (kt^n)	Fármaco liberado para $t = 30 \text{ min}$ (M_t/M_∞)
NT/eug	$0,9524t^{0,0202}$	0,9392
NT/eug/alg	$0,7632t^{0,0811}$	0,7215
Ti/eug	$0,9538t^{0,0209}$	0,9401
Ti/eug/alg	$0,7207t^{0,0948}$	0,6749

Fonte: Próprio autor

À partir das equações listadas na **Tabela 12**, traçou-se as curvas teóricas ajustadas com o modelo cinético de KP. A seguir, na **Figura 27**, são exibidas as curvas de liberação normalizadas para cada plataforma carregada com eugenol em comparação com as curvas teóricas. A comparação entre os perfis das duas curvas permitem inferir que o modelo teórico proposto consegue retratar a liberação experimental.

Figura 27 - Curvas da entrega acumulativa (M_t/M_∞) de eugenol em comparação com as curvas com o ajuste do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (KP).



Fonte: Próprio autor

Para a liberação do eugenol, as curvas também podem ser divididas em duas partes, caracterizando-se a primeira fase por meio de uma liberação mais abrupta, com a entrega do

fármaco seguindo as leis de Fick. A segunda fase, após grande parte da substância já ter sido entregue, caracteriza-se por uma liberação mais lenta. Nesse sentido, ao comparar as quatro amostras, a plataforma que apresenta um resultado superior na liberação do eugenol, diminuindo a taxa de liberação e atenuando o efeito de *burst* inicial, nesse caso, é a plataforma sem nanotubos e recoberta com alginato (Ti/eug/alg). Ressaltando a discussão sobre o efeito dos nanotubos no processo de osseointegração, como citado anteriormente, estudos apontam para um aumento da bioatividade dos TiO₂-NTs em relação ao titânio sem o filme de óxido (Saha *et al.*, 2018). Portanto, para fins biomédicos, ainda que nos testes apresentados, a superfície com titânio liso recoberta com alginato tenha garantido uma liberação tardia do eugenol, a camada passiva de TiO₂ otimiza a biocompatibilidade e resistência a corrosão do material, fatores muito importantes para um material a ser implantado.

6 CONCLUSÕES

Filmes nanotexturizados de TiO₂ crescidos em substrato de Ti comercialmente puro foram confeccionados por meio da técnica de anodização eletroquímica para fins de aplicações biomédicas. Mediante eletrólito contendo íons fluoreto e solução de SBF, entre outros parâmetros aplicados no processo anódico, foi possível obter matrizes com diâmetros internos de $63,04 \pm 3,76$ nm. A investigação da molhabilidade da superfície por meio do ângulo de contato, revelou amostras hidrofílicas, com ângulo de $9,58 \pm 0,63^\circ$.

Nos testes de liberação *in vitro* com o Azul de Metileno (AM), a plataforma de TiO₂-NTs recoberta com o alginato mostrou-se superior em relação a plataforma sem a cobertura polimérica. A amostra que possuía a barreira difusional diminuiu a explosão inicial da substância e aumentou o tempo de liberação de 30 minutos sem o recobrimento, para 2 horas.

Para os agentes terapêuticos naturais, a variação das quantidades finais entregues no meio, em relação a própolis verde e ao eugenol, mostraram a complexidade de se trabalhar com substâncias naturais e imobilizá-las nas plataformas. Quando compara-se amostras com nanotubos e o titânio polido, sem recobrimento, o efeito das nanoestruturas no aprisionamento do fármaco pode ser notado. A quantia final das substâncias entregue quando a amostra possui nanotubos, no intervalo de 24h, é menor do que para aquelas sem nanotubos, o que pode indicar o confinamento parcial do fármaco que ainda não foi liberado. A adição da cobertura polimérica de alginato teve influência na diminuição do *burst* inicial, porém, quando relaciona-se matrizes com e sem nanotubos, as que não possuem nanotubos tem resultados superiores na liberação, com uma explosão inicial menor. A influência das nanoestruturas na infiltração de água na matriz polimérica, pode ter acelerado o processo para que a liberação ocorresse de forma mais rápida.

Portanto, ainda que para a própolis verde e o eugenol, plataformas sem nanotubos e recobertas com alginato tenham garantido uma entrega mais lenta da substância, diminuindo a explosão do fármaco nos tempos iniciais, parece razoável ponderar o uso de titânio sem tratamento superficial para fins biomédicos. A literatura abordada para a construção do presente trabalho afirma por meio de seus resultados que os TiO₂-NTs podem aumentar a adesão, migração e proliferação das células osteoblásticas, otimizando assim, o processo de osseointegração.

Deste modo, investigações mais profundas seriam necessárias para examinar as interações entre o óxido e o polímero alginato, a fim de conseguir um revestimento polimérico associado a uma matriz nanoestruturada capaz de retardar a entrega total das substâncias. Outro fator interessante e importante para o trabalho com agentes terapêuticos naturais, seria o

desenvolvimento de uma metodologia capaz de encapsular tais substâncias antes de serem alocadas nas plataformas de TiO₂-NTs, com a intenção de melhorar o manuseio dos agentes, evitando perdas por volatilização nos processos de secagem e recobrimento e também na degradação da luz.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M. N. *et al.* Strategies for Optimizing the Soft Tissue Seal around Osseointegrated Implants. **Advanced Healthcare Materials**, v. 6, n. 20, p. 1–24, 2017.

AW, MOOM SINN; KURIAN, M.; LOSIC, D. Biomaterials Science nanoporous and nanotubular structures : concepts for controlling drug release. **Biomaterials Science**, v. 2, n. 10, p. 10–34, 2014.

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

AW, M. S.; LOSIC, D. Ultrasound enhanced release of therapeutics from drug-releasing implants based on titania nanotube arrays. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 443, n. 1–2, p. 154–162, 2013.

BAI, Y. *et al.* The effect of annealing temperatures on surface properties, hydroxyapatite growth and cell behaviors of TiO₂ nanotubes. **Surface and Interface Analysis**, v. 43, n. 6, p. 998–1005, 2011.

BAJPAI, S. K.; SHARMA, S. Investigation of swelling / degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. **Reactive & functional polymers**, v. 59, p. 129–140, 2004.

BERALDO, C.; DANELUZZI, N. S.; SCANAVACCA, J. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos 1. v. 2013, p. 436–440, 2013.

BERGER, S. *et al.* The origin for tubular growth of TiO₂ nanotubes: A fluoride rich layer between tube-walls. **Surface Science**, v. 605, n. 19–20, p. L57–L60, 2011.

BRAMMER, K. S. *et al.* Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 8, p. 3215–3223, 2009.

CAI, Q. *et al.* The Effect of Electrolyte Composition on the Fabrication of Self-Organized Titanium Oxide Nanotube Arrays by Anodic Oxidation. **Journal of Materials Research**, v. 20, n. 1, p. 230–236, 2005.

CHEN, Q. *et al.* Trititanate nanotubes made via a single alkali treatment. **Advanced Materials**, v. 14, n. 17, p. 2000–2003, 2002.

CHEN, Z. *et al.* TiO₂ nanotube platforms for smart drug delivery: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 11, p. 4819–4834, 2016.

CHENG, Y. *et al.* Progress in TiO₂ nanotube coatings for biomedical applications: A review. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 13, p. 1862–1886, 2018.

CHIU, S.-M. *et al.* Photocatalytic activity of doped TiO₂ coatings prepared by sputtering deposition. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 192–193, p. 60–67, 2007.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils — Present Status and Future Perspectives. **medicines**, v. 4, n. 58, p. 1–21, 2017.

COELHO, L. G. V. *et al.* Brazilian Green Propolis on Helicobacter pylori Infection . **Helicobacter**, v. 18, p. 572–574, 2007.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles ´. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.

COTTICA, S. M. *et al.* Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods of Extraction. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 5, p. 929–935, 2011.

DAVIS, M. E. Ordered porous materials for emerging applications. **Nature**, v. 417, n. June, p. 813–821, 2002.

DEVI, K. P. *et al.* Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107–115, 2010.

DOADRIO, A. L. *et al.* Use of anodized titanium alloy as drug carrier: Ibuprofen as model of drug releasing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 492, n. 1–2, p. 207–212, 2015.

FATHI, M.; AKBARI, B.; TAHERIAZAM, A. Antibiotics drug release controlling and osteoblast adhesion from Titania nanotubes arrays using silk fibroin coating. **Materials Science and Engineering C**, v. 103, n. December 2018, p. 109743, 2019.

FAZLI-ABUKHEYLI, R.; RAHIMI, M. R.; GHAEDI, M. Electrospinning coating of nanoporous anodic alumina for controlling the drug release: Drug release study and modeling. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, n. April, p. 101247, 2019.

FELGENTRÄGER, A. *et al.* Hydrogen bond acceptors and additional cationic charges in methylene blue derivatives: Photophysics and antimicrobial efficiency. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

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

FERREIRA, C. H. *et al.* Nanotexturization of Ti-based implants in simulated body fluid: Influence of synthesis parameters on coating properties and kinetics of drug release. **Journal of Materials Research**, v. 34, n. 16, p. 2828–2836, 2019.

FERREIRA, M. V. *et al.* Avaliação do perfil de liberação do fármaco ibuprofeno em membranas simétricas e assimétricas de acetato de celulose: efeito da morfologia. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 823–830, 2019.

GANTA, S. *et al.* A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 126, n. 3, p. 187–204, 2008.

GAO, A. *et al.* The effects of titania nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bacteria and osteoblasts. **Biomaterials**, v. 35, n. 13, p. 4223–4235, 2014.

GARCÍA-LIZARRIBAR, A. *et al.* Composite Biomaterials as Long-Lasting Scaffolds for 3D Bioprinting of Highly Aligned Muscle Tissue. **Macromolecular bioscience**, v. 1800167, p. 1–13, 2018.

GEORGE, S.; KISHEN, A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. **Journal of Biomedical Optics**, v. 12, n. 3, p. 034029, 2007.

GITTENS, A. R. *et al.* Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: Lessons for spine implants. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 8, p. 3363–3371, 2015.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. **Advanced drug delivery reviews**, v. 31, p. 267–285, 1998.

GULATI, K. *et al.* Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for

improved drug elution and osteoblast adhesion. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 449–456, 2012.

GUNPUTH, U. F. *et al.* Anodised TiO₂ nanotubes as a scaffold for antibacterial silver nanoparticles on titanium implants. **Materials Science and Engineering C**, v. 91, p. 638–644, 2018.

HEIDARI KHOEE, M.; KHOEE, S.; LOTFI, M. Synthesis of titanium dioxide nanotubes with liposomal covers for carrying and extended release of 5-FU as anticancer drug in the treatment of HeLa cells. **Analytical Biochemistry**, v. 572, n. March, p. 16–24, 2019.

HOFFMAN, A. S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 3, p. 153–163, 2008.

HUANG, Q. *et al.* Reduced platelet adhesion and improved corrosion resistance of superhydrophobic TiO₂-nanotube-coated 316L stainless steel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 125, p. 134–141, 2015.

_____. Effect of construction of TiO₂ nanotubes on platelet behaviors: Structure-property relationships. **Acta Biomaterialia**, v. 51, p. 505–512, 2017.

HUANG, T. *et al.* Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Antimicrobial efficacy of methylene blue-mediated photodynamic therapy on titanium alloy surfaces in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, n. November 2018, p. 7–16, 2019.

IONITA, D. *et al.* Activity of vancomycin release from bioinspired coatings of hydroxyapatite or TiO₂ nanotubes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 517, n. 1–2, p. 296–302, 2017.

JALALI, N. *et al.* Improving cellular response of titanium surface through electrochemical anodization for biomedical applications: A critical review. **Trends Biomater. Artif. Organs.**, v. 29 (1), p. 86–91, 2015.

JAROSZ, M. *et al.* Nanoporous anodic titanium dioxide layers as potential drug delivery systems: Drug release kinetics and mechanism. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 447–454, 2016.

JIA, Z. *et al.* Bioinspired anchoring AgNPs onto micro-nanoporous TiO₂ orthopedic coatings: Trap-killing of bacteria, surface-regulated osteoblast functions and host responses. **Biomaterials**, v. 75, p. 203–222, 2016.

JUNG, J. H. *et al.* Creation of novel helical ribbon and double-layered nanotube TiO₂ structures using an organogel template. **Chemistry of Materials**, v. 14, n. 4, p. 1445–1447, 2002.

KAO, C. *et al.* The cytotoxicity of orthodontic metal bracket immersion media. **European Journal of Orthodontics**, v. 29, p. 198–203, 2007.

KHADIJAH, S. *et al.* Surface morphological and mechanical properties of zinc oxide eugenol using different types of ZnO nanopowder. **Materials Science & Engineering C**, v. 100, n. January, p. 645–654, 2019.

KHOEE, M. H.; KHOEE, S.; LOTFI, M. Synthesis of titanium dioxide nanotubes with liposomal covers for carrying and extended release of 5-FU as anticancer drug in the treatment of HeLa cells. **Analytical Biochemistry**, v. 572, n. February, p. 16–24, 2019.

KOCH, T. *et al.* Temporary zinc oxide – eugenol cement : eugenol quantity in dentin and bond strength of resin composite. **European journal of oral sciences**, v. 121, p. 363–369, 2013.

KOKUBO, T. Bioactive glass ceramics : properties and applications. **Biomaterials**, v. 12, p. 155–163, 1991.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity ? **Biomaterials**, v. 27, p. 2907–2915, 2006.

KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. **Journal of Membrane Science**, v. 9, p. 211–227, 1981.

KOWALSKI, D.; KIM, D.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes, nanochannels and mesosponge: Self-organized formation and applications. **Nano Today**, v. 8, n. 3, p. 235–264, 2013.

KULKARNI, M. *et al.* Protein interactions with layers of TiO₂ nanotube and nanopore arrays: Morphology and surface charge influence. **Acta Biomaterialia**, v. 45, p. 357–366, 2016.

KUMERIA, T. *et al.* Advanced biopolymer-coated drug-releasing titania nanotubes (TNTs) implants with simultaneously enhanced osteoblast adhesion and antibacterial properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, p. 255–263, 2015.

LAI, M. *et al.* The controlled release of simvastatin from TiO₂ nanotubes to promote osteoblast differentiation and inhibit osteoclast resorption. **Applied Surface Science**, v. 396, p. 1741–1751, 2017.

LAI, M.; JIN, Z.; QIAO, W. Surface immobilization of gelatin onto TiO₂ nanotubes to modulate osteoblast behavior. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 743–749, 2017.

LEE, J. K. *et al.* Improved osseointegration of dental titanium implants by tio₂ nanotube arrays with recombinant human bone morphogenetic protein-2: A pilot in vivo study. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1145–1154, 2015.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate : Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 106–126, 2012.

LEI, B. *et al.* Hybrid polymer biomaterials for bone tissue regeneration. **Frontiers in Medicine**, v. 13, n. 2, p. 189–201, 2019.

LI, H. Y. *et al.* Eugenol Inhibits ATP-induced P2X Currents in Trigeminal Ganglion Neurons. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 12, p. 315–321, 2008.

LIAKOS, I. *et al.* Controlled antiseptic release by alginate polymer films and beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 176–183, 2013.

LIU, D. *et al.* Gentamicin coating of nanotubular anodized titanium implant reduces implant-related osteomyelitis and enhances bone biocompatibility in rabbits. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 5461–5471, 2017.

LIU, G.; DU, K.; WANG, K. Surface wettability of TiO₂ nanotube arrays prepared by electrochemical anodization. **Applied Surface Science**, v. 388, p. 313–320, 2016.

LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B. Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas Effect of photodynamic therapy mediated by methylene blue in cariogenic bacteria. **Revista Clinica de Pesquisa Odontológica**, v. 6, n. 3, p. 249–257, 2010.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada : polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n.

2, p. 143–154, 2005.

LOSIC, D. *et al.* Titania nanotube arrays for local drug delivery: Recent advances and perspectives. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 1, p. 103–127, 2015.

LUC, W.; JIAO, F. Synthesis of Nanoporous Metals, Oxides, Carbides, and Sulfides: Beyond Nanocasting. **Accounts of Chemical Research**, v. 49, n. 7, p. 1351–1358, 2016.

LV, L. *et al.* The nanoscale geometry of TiO₂ nanotubes influences the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by modulating H3K4 trimethylation. **Biomaterials**, v. 39, p. 193–205, 2015.

LYRA, M. A. M. DE *et al.* Sistemas matriciais hidrofilicos e mucoadesivos para liberação controlada de f armacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784–793, 2007.

MA, Y. *et al.* Nanotubes Functionalized with BMP2 Knuckle Peptide Improve the Osseointegration of Titanium Implants in Rabbits. v. 11, n. 2, p. 236–244, 2015.

MAGACHO, C. C. *et al.* Comparison of photodynamic therapy with methylene blue associated with ceftriaxone in gram-negative bacteria; an in vitro study. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 30, p. 101691, jun. 2020.

MIJNENDONCKX, K.; LEYS, N. Antimicrobial silver : uses , toxicity and potential for resistance. **Biomaterials**, v. 26, p. 609–621, 2013.

MIYATAKA, H. *et al.* Evaluation of Propolis. I. Evaluation of brazilian and chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biol. Pharm.**, v. 20, n. 5, p. 496–501, 1997.

MOLITOR, P.; BARRON, V.; YOUNG, T. Surface treatment of titanium for adhesive bonding to polymer composites : a review. **international journal of adhesion & adhesives**, v. 21, p. 129–136, 2001.

MOR, G. K. *et al.* Fabrication of tapered, conical-shaped titania nanotubes. **Journal of Materials Research**, v. 18, n. 11, p. 2588–2593, 2003.

MOURA, I. R. DE; RABELLO, T. B.; PEREIRA, K. F. A influência do eugenol nos procedimentos adesivos. **Revista brasileira de odontologia**, v. 70, n. 1, p. 28–32, 2013.

MU, C. *et al.* Sustained raloxifene release from hyaluronan-alendronate-functionalized titanium nanotube arrays capable of enhancing osseointegration in osteoporotic rabbits. **Materials Science & Engineering C**, v. 82, n. May 2017, p. 345–353, 2018.

MUDALI, U. K.; SRIDHAR, T. M.; RAJ, B. Corrosion of bio implants. **Sadhana**, v. 28, p. 601–637, 2003.

MUTLU, I.; OKTAY, E. Characterization of 17-4 PH stainless steel foam for biomedical applications in simulated body fl uid and arti fi cial saliva environments. **Materials Science & Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1125–1131, 2013.

NETO, T. M. S. *et al.* Susceptibility of Staphylococcus spp . Isolated from Milk of Goats with Mastitis to Antibiotics and Green Propolis Extracts. **Letters in drug design & discovery**, v. 6, p. 63–68, 2009.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of brazilian propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 2502–2506, 2002.

PAWLIK, A. *et al.* Co-delivery of ibuprofen and gentamicin from nanoporous anodic

titanium dioxide layers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 152, p. 95–102, 2017.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 169–172, 1989a.

_____. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, p. 169–172, 1989b.

PEPPERMAN, A. B.; KUAN, J. C. W.; MCCOMBS, C. Alginate controlled release formulations of metribuzin. **Journal of contro**, v. 17, p. 105–112, 1991.

PEREIRA, C. A. *et al.* Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms in vitro. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 3, p. 859–864, 2013.

PILETTI, R. *et al.* Microencapsulation of eugenol molecules by β -cyclodextrine as a thermal protection method of antibacterial action. **Materials Science & Engineering C**, v. 75, p. 259–271, 2017.

POINERN, G. E. J.; BRUNDAVANAM, S.; FAWCETT, D. Biomedical Magnesium Alloys: A Review of Material Properties , Surface Modifications and Potential as a Biodegradable Orthopaedic Implant. **American Journal of Biomedical Engineering**, v. 2, n. 6, p. 218–240, 2012.

POPAT, K. C. *et al.* Decreased *Staphylococcus epidermis* adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. **Biomaterials**, v. 28, n. 32, p. 4880–4888, 2007.

PRASAD, S. *et al.* Biomaterial properties of titanium in dentistry. **Journal of Oral Biosciences**, v. 57, n. 4, p. 192–199, 2015.

PRIDA, V. M. *et al.* Temperature influence on the anodic growth of self-aligned Titanium dioxide nanotube arrays. **journal of magnetism and magnetic materials**, v. 316, p. 110–113, 2007.

REGONINI, D. Anodised TiO₂ Nanotubes: Synthesis , Growth Mechanism and Thermal Stability. p. 1–203, 2008.

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

ROGUSKA, A. *et al.* Improvement of the bio-functional properties of TiO₂ nanotubes. **Applied Surface Science**, v. 388, p. 775–785, 2016.

ROY, P.; BERGER, S.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes: Synthesis and applications. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 13, p. 2904–2939, 2011.

RUAN, C. *et al.* Fabrication of highly ordered TiO₂ nanotube arrays using an organic electrolyte. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 33, p. 15754–15759, 2005.

SAHA, S. *et al.* Interaction of osteoblast -TiO₂ nanotubes in vitro: The combinatorial effect of surface topography and other physico-chemical factors governs the cell fate. **Applied Surface Science**, v. 449, p. 152–165, 2018.

SAHA, S.; PRAMANIK, K.; BISWAS, A. Antibacterial activity and biocompatibility of curcumin/TiO₂ nanotube array system on Ti6Al4V bone implants. **Materials Technology**, v. 00, n. 00, p. 1–12, 2020.

SANTOS, A. *et al.* Drug-releasing implants: Current progress, challenges and perspectives. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 37, p. 6157–6182, 2014.

SCHMIDT, T. F. *et al.* Binding of methylene blue onto langmuir monolayers representing cell membranes may explain its efficiency as photosensitizer in photodynamic therapy. **Langmuir**, v. 31, n. 14, p. 4205–4212, 2015.

SEBRAE. **O mercado da própolis.** Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/\\$File/4612.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/$File/4612.pdf)>. Acesso em: 25 jun. 2021.

SHANKAR, K. *et al.* Recent Advances in the Use of TiO₂ Nanotube and Nanowire Arrays for Oxidative. **J. Phys. Chem. C**, v. 113, n. 16, p. 6327–6359, 2009.

SHIN, D. H. *et al.* Wettability changes of TiO₂ nanotube surfaces. **Nanotechnology**, v. 22, n. 31, 2011.

SIMON, A. P. *et al.* Enhancement of Mechanical Properties and Wettability of TiO₂NT Arrays Formed in Simulated Body Fluid-Based Electrolyte. **Advanced Engineering Materials**, v. 21, n. 12, p. 4–7, 2019.

_____. Multi-step cefazolin sodium release from bioactive TiO₂ nanotubes: Surface and polymer coverage effects. **Journal of Materials Research**, v. 36, n. 7, p. 1510–1523, 2021.

SMITH, Y. R. *et al.* Self-Ordered titanium dioxide nanotube arrays: Anodic synthesis and their photo/electro-catalytic applications. **Materials**, v. 6, n. 7, p. 2892–2957, 2013.

SOMSANITH, N. *et al.* Enhancing of Osseointegration with Propolis-Loaded TiO₂ Nanotubes in Rat Mandible for Dental Implants. **Materials**, v. 11, p. 1–14, 2018.

SPELLBERG, B. *et al.* The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections : A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America AND LACK OF ANTIBIOTIC DEVELOPMENT. **Clinical infectious diseases**, v. 46, p. 155–164, 2008.

SPRIANO, S. *et al.* A critical review of multifunctional titanium surfaces : New frontiers for improving osseointegration and host response , avoiding bacteria contamination. **Acta Biomaterialia**, v. 79, p. 1–22, 2018.

SUGAWARA, S.; IMAI, T.; OTAGIRI, M. The controlled release of prednisolone using alginate gel. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 2, p. 272–277, 1994.

SULKA, G. D. *et al.* Fabrication of nanoporous TiO₂ by electrochemical anodization. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 14, p. 4359–4367, 2010.

SUMITA, M.; HANAWA, T.; TEOH, S. H. Development of nitrogen-containing nickel-free austenitic stainless steels for metallic biomaterials — review. v. 24, p. 753–760, 2004.

SZLISZKA, E. *et al.* Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 38, p. 941–953, 2011.

TAHMASEBIFAR, A. *et al.* Mechanical, electrochemical and biocompatibility evaluation of AZ91D magnesium alloy as a biomaterial. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 687, p. 906–919, 2016.

TIAN, A. *et al.* Nanoscale TiO₂ nanotubes govern the biological behavior of human glioma and osteosarcoma cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 2423–2439,

2015.

TIAN, Z. R. *et al.* Large Oriented Arrays and Continuous Films of TiO₂-Based Nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 41, p. 12384–12385, 1 out. 2003.

VEERACHAMY, S.; YARLAGADDA, T.; MANIVASAGAM, G. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. **Journal of engineering in medicine**, v. 228, n. 10, p. 1083–1099, 2014.

VIES, J. VAN DER. Drug-delivery systems and the biological activity of steroids. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 6, n. 3–4, p. 215–220, 1975.

WAINWRIGHT, M. Phenothiazinium photosensitisers: V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenothiazinium salts. **Dyes and Pigments**, v. 73, n. 1, p. 7–12, 2007.

WANG, J. *et al.* Anodic Formation of Ordered TiO Nanotube Arrays : Effects of Electrolyte Temperature and Anodization Potential Anodic Formation of Ordered TiO 2 Nanotube Arrays : Effects of Electrolyte Temperature and Anodization Potential. **the journal of physical chemistry C**, v. 113, n. 10, p. 4026–4030, 2009.

WANG, Q. *et al.* Recent advances on smart TiO 2 nanotube platforms for sustainable drug delivery applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 151–165, 2017.

WANG, T. *et al.* Controlled release and biocompatibility of polymer/titania nanotube array system on titanium implants. **Bioactive Materials**, v. 2, n. 1, p. 44–50, 2017.

WANG, Z. *et al.* P25 nanoparticles decorated on titania nanotubes arrays as effective drug delivery system for ibuprofen. **Applied Surface Science**, v. 324, p. 621–626, 2015.

WILLIAMS, D. F. **The Williams dictionary of biomaterials**. [s.l.] Liverpool University Press, 1999.

WORANUCH, S.; YOKSAN, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles : I . Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 2, p. 578–585, 2013.

WU, S. *et al.* Microstructure and properties of TiO₂ nanotube coatings on bone plate surface fabrication by anodic oxidation. **Surface and Coatings Technology**, v. 374, n. May, p. 362–373, 2019.

YIN, X. *et al.* Alginate/chitosan multilayer films coated on IL-4-loaded TiO₂ nanotubes for modulation of macrophage phenotype. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 495–505, 2019.

YORIYA, S.; BAO, N.; GRIMES, C. A. Titania nanoporous/tubular structures via electrochemical anodization of titanium: Effect of electrolyte conductivity and anodization voltage on structural order and porosity. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 36, p. 13909–13912, 2011.

YORIYA, S.; GRIMES, C. A. Self-assembled anodic TiO₂ nanotube arrays: Electrolyte properties and their effect on resulting morphologies. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 102–108, 2011.

YOSHIKAWA, T. T. Antimicrobial Resistance and Aging: Beginning of the End of the Antibiotic Era? **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 50, p. 226–229, 2003.

YU, W. *et al.* Mechanisms of stem cell osteogenic differentiation on TiO₂ nanotubes.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 136, p. 779–785, 2015.

ZHANG, L. *et al.* Effect of crystalline phase changes in titania (TiO₂) nanotube coatings on platelet adhesion and activation. **Materials Science and Engineering C**, v. 82, p. 91–101, 2018.

ZHANG, X. *et al.* Enhanced osteogenic activity and anti-inflammatory properties of Lenti-BMP-2-loaded TiO₂ nanotube layers fabricated by lyophilization following trehalose addition. p. 429–439, 2016.

ZWILLING, V. *et al.* Structure and Physicochemistry of Anodic Oxide Films on Titanium and TA6V Alloy. **Surface and Interface Analysis**, v. 27, p. 629–637, 1999.

