

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade
Departamento de Física, Química e Matemática
Programa de Pós Graduação em Ciência dos Materiais

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO UTILIZANDO
NANOTUBOS DE TiO₂

Lígia Cristina Camargo Dias*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências dos Materiais da Universidade Federal de São Carlos campus Sorocaba como requisito para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Trivinho-Strixino

Co-orientadora: Profa. Dra. Marystela Ferreira

*Bolsista CAPES

SOROCABA – SP – 2020

Dias, Lígia Cristina Camargo

Desenvolvimento de um sistema de liberação utilizando nanotubos de TiO₂ / Lígia Cristina Camargo Dias -- 2020. 59f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Francisco Trivinho Strixino

Banca Examinadora: Mariana de Souza Sikora; Giovanni Pimenta Mambrini

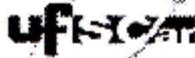
Bibliografia

1. Biomaterias; Revestimento; Anodização; Nanotubos; sistema de liberação controlada.. I. Dias, Lígia Cristina Camargo. 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 Ligia Cristina Camargo Dias, realizada em 24/07/2020.

Comissão Julgadora:


Prof. Dr. Francisco Trivinho Strixino (UFSCar)


Profa. Dra. Mariana de Souza Sikora (UTFPR)


Prof. Dr. Giovanni Pimenta Mambrini (UFSCar)

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.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR - Sorocaba), ao Programa de Pós Graduação em Ciência dos Materiais, ao corpo docente e discente que permitiram esta oportunidade em minha vida e contribuíram para minha formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Código de financiamento: 001) que me mantém com financiamento científico para que eu possa concluir o trabalho.

Ao grupo GPSM-Nano pelo acolhimento, apoio, ensinamentos e compartilhamento de informações e local de trabalho, o grupo foi essencial para a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Francisco Trivinho Strixino por conceder a oportunidade de realizar este estudo, por ter paciência e compreensão, e ser um professor próximo que sempre esteve presente e disposto para o que eu precisasse. Agradeço também a minha co-orientadora, Profa. Marystela Ferreira e a Profa. Mariana Sikora, pela contribuição e auxílio no processo do trabalho.

Agradeço também ao LaPTec - UNESP e CNPEM - LNNano pela disposição do laboratório para as micrografias de FE-SEM, e também em especial a pesquisadora Lory (UNESP) pela análise e tratamento de algumas micrografias de FE-SEM realizadas na UNICAMP-Campinas.

Agradeço também aos professores Adriana Delgado, Walter R. Waldman e Giovanni P. Mambrini pelas aulas maravilhosas, pelos conselhos pessoais e acadêmicos, e ajuda com o trabalho.

A minha Família por me dar apoio, incentivo emocional e financeiro, amor incondicional, e toda a torcida para que eu concluísse esse projeto.

Aos meus colegas de laboratório que dividiram muito tempo e momentos únicos nesta caminhada.

As minhas amigas Andressa, Paula e Yasmin, Patrícia, por me acompanharem desde o início, me aturando e me ajudando muito.

E finalizo agradecendo a Deus, por me permitir.

RESUMO

Materiais para implantes a base de Titânio estão sendo comumente utilizados na área da biomedicina devido à sua atrativa biocompatibilidade e suas propriedades mecânicas que contribuem para um melhor desempenho do material. Esta dissertação desenvolve uma metodologia para síntese de nanotubos de TiO_2 (NT's) aplicando-o para o estudo na liberação controlada de fármacos. Utilizou-se a liga $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ previamente polida para formação do revestimento nanotubular a partir da anodização potencioestática (25V/90min) em meio contendo íons fluoreto com adição de solução de fluido corporal simulado (SBF), seguido de um tratamento térmico para a formação da fase anatase do TiO_2 . Esse sistema foi utilizado como sistema carreador do anti-inflamatório, um dos princípios ativos do fármaco Ibuprofeno. Esse foi inserido nos nanotubos pelo método *TopFilling* e sua liberação foi acompanhada por espectroscopia ultravioleta visível (UV-Vis) por um período de 7 dias. Foram analisadas 3 tipos de amostras: $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ polido (AT), após a anodização (ATA), e após o tratamento térmico (ATT). Análises realizadas por microscopia eletrônico de varredura (MEV) dos nanotubos demonstrou que os mesmos possuem diâmetros entre 54nm e 57nm. A fase anatase foi comprovada por Difração de Raio - X (DRX). A molhabilidade foi investigada através do ângulo de contato, que apresentou valores de ângulo de contato em $128,5^\circ \pm 0,8^\circ$ para a amostra AT, $78,4^\circ \pm 0,6^\circ$ para a ATA, $16,4^\circ \pm 0,5^\circ$ para a ATT, indicando a variação da molhabilidade em função do tipo de tratamento da amostra. Observou-se no sistema de liberação uma diferença de quantidade de concentração inicial e final de Ibuprofeno, em porcentagem, sendo possível verificar diferença na liberação entre as amostras, o que altera a cinética de liberação em função do tempo. A variação do teste de liberação do Ibuprofeno aponta a importância do tratamento de superfície para retardar a liberação do fármaco, que pode ser um fator importante na carreamento de fármacos.

Palavras-chave: Biomaterias; Revestimento; Anodização; Nanotubos; sistema de liberação controlada.

ABSTRACT

Titanium-based implants are being commonly used in the field of biomedicine due to their attractive biocompatibility and their mechanical properties that contribute to a better performance of the material. This dissertation develops a methodology for the synthesis of TiO₂ nanotubes (NT's) applying it for the study in the controlled release of drugs. The previously polished Ti6Al4V alloy was used to form the nanotubular coating from potentiostatic anodization (25V / 90min) in a medium containing fluoride ions with the addition of a simulated body fluid solution (SBF), followed by a thermal treatment to form the phase anatase of TiO₂. This system was used as a carrier system for the anti-inflammatory, one of the effects of the active pharmaceutical agent of the drug Ibuprofen. This drug was inserted in the nanotubes by the TopFilling method and its release was accompanied by visible ultraviolet spectroscopy (UV-Vis) for 7 days. Three types of samples were analyzed: Ti6Al4V polished (AT), after anodizing (ATA), and after anodizing and post heat treatment (ATT). Analyzes performed by scanning electron microscopy (SEM) of the nanotubes demonstrated that they have diameters between 54nm and 57nm. The anatase phase was confirmed by X-Ray Diffraction (XRD). Wettability was investigated through the contact angle, which showed contact angle values of 128.5° ± 0.8° for the AT sample, 78.4° ± 0.6° for the ATA, 16.4° ± 0.5° for ATT, indicating the variation in wettability depending on the type of treatment of the sample. It was observed in the release system a difference in the amount of initial and final concentration of Ibuprofen, in percentage, being possible to verify the difference in the release between samples, which alters the release kinetics as a function of time. The variation of the Ibuprofen release test points to the importance of surface treatment to delay the release of the drug, which can be an important factor in carrying drugs.

Keywords: Biomaterials; Coating; Anodizing; Nanotubes; Drug Release System.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - Ângulo de Contato

ASM - Sociedade Americana de Metais

ASTM - Sociedade Americana de Testes e Materiais

AT - Amostra de Ti_6Al_4V

ATA - Amostra de Ti_6Al_4V anodizada

ATT - Amostra de Ti_6Al_4V anodizada com tratamento térmico

CH - Quitosana

CM - Carboximetilcelulose

DRX - Difração de Raio - X

HA - Hidroxapatita

ISO -Organização Internacional para Normatização

MEV - FE - Microscopia Eletronica de Varredura com Feixe de Elétrons

NH_4F - Fluoreto de amônio

PBS - Tampão Fosfato Salino (Phosphate Buffer Solution)

Ti_6Al_4V - Liga de titânio

TiNT's - Nanotubos de titânio

TiO_2 - Dióxido de titânio

TT - Tratamento Térmico

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

UNESP - Universidade Estadual de São Paulo

UV-Vis - Espectroscopia ultravioleta na região do visível

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática dos eventos biológicos decorrentes da inserção de um bioimplante.....8
- Figura 2** - Curva cronoamperométrica referente à anodização potencioestática do titânio em meio de etilenoglicol contendo íons fluoreto. 11
- Figura 3** - Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por: a) métodos convencionais de multi-dosagem e (b) em sistema de liberação controlada. 14
- Figura 4** - Estrutura Química do Ibuprofeno 16
- Figura 5** - Esquema de sistema de anodização: A) Fonte; B) Multímetro; C) Célula eletroquímica; D) Banho termostático. 18
- Figura 6** - Esquema do sistema de liberação construído (em 2 etapas sequenciais de análise). ($t =$ tempo de análise e $t' > t$).24
- Figura 7** - Curva cronoamperométrica obtida durante o processo de anodização potencioestática: A - Observação das etapas da anodização; B - Observação da ausência de etapas de anodização.29
- Figura 8** - Imagens de MEV-Fe das amostras: a) AT; b) ATA; c) ATT.32
- Figura 9** - Imagens de ângulo de contato: a) AT; b) ATA; c) ATT.....33
- Figura 10** - Difractogramas das análises de DRX: AT, ATA e ATT.35
- Figura 11** - Curva de calibração com extrações de máximo de absorbância em 222nm em função da concentração de Ibuprofeno em solução etanólicas de PBS. Destaque: espectros de absorbância do Ibuprofeno revelando a banda em 222nm característica da substância.....36
- Figura 12** - Curvas de liberação de Ibuprofeno em 168 horas - Amostras AT, ATA, e ATT.38
- Figura 13** - Gráficos de absorção versus concentração para a liberação de ibuprofeno para as amostras AT, ATA e ATT, respectivamente.40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ligas de Titânio em aplicações biomédicas, normas e microestrutura associadas a cada tipo de liga.	6
Tabela 2 - Concentração iônica do plasma sanguíneo humano em comparação com a solução de SBF. Legenda: [Ci] Concentração iônica (mM).	13
Tabela 3 - Condições controladas no sistema de anodização para crescimento do filme de nanotubos de TiO ₂	19
Tabela 4 - Quantidade e elementos constituintes da solução de SBF proposta por Kokubo <i>et al</i> [38]	20
Tabela 5 - Tempos de coleta de alíquotas para as análises de Ibuprofeno.	24
Tabela 6 – Soluções etanólicas estoque de Ibuprofeno em PBS utilizadas para construção da curva de calibração.	25
Tabela 7 - Média de diâmetros de nanotubos após análise das micrografias pelo software ImageJ® e valores de ângulos de contato de cada categoria de amostra.	31
Tabela 8 - Valores referentes as concentrações de Ibuprofeno indicadas pelas absorvâncias através da espectrometria UV-Vis.	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Biomateriais	5
2.2 Ossointegração	7
2.3 Tratamento de superfície	9
2.4 Sistema de liberação de fármaco	13
2.4.1 Ibuprofeno	15
2.5 Objetivo Geral	16
2.5.1 Objetivos Específicos	16
3. METODOLOGIA	17
3.1 Síntese do filme de nanotubos de TiO ₂	17
3.1.1 Anodização Potenciostática	17
3.1.2 Tratamento Térmico	19
3.2 Caracterizações	20
3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	20
3.2.2 Ângulo de Contato	20
3.2.3 Difração de Raio X	21
3.3 Incorporação e Liberação de Fármaco	21
3.3.1 Preparação da modina	21
3.3.2 Teste de Liberação	22
3.3.3 Curva de calibração	24
4. RESULTADO E DISCUSSÕES	26
4.1 Fabricação anódica de revestimento de nanotubos de TiO ₂	26
4.2 Caracterização do filme	29
4.2.1 Morfologia e molhabilidade	29

4.2.2 Estrutura	33
4.3 Testes de liberação.....	34
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

Dentre as várias áreas da ciência, a biomedicina é uma das mais estudadas por impactar diretamente na qualidade de vida das pessoas. Dentro dessa área, os biomateriais mais utilizados nessas aplicações são os polímeros, cerâmicas, compósitos e metais, que são escolhidos de acordo com a necessidade.

Dentre esses materiais, os metais, e em destaque o titânio e suas ligas, estão sendo explorados principalmente como implante odontológicos e ortopédicos por apresentarem características mecânicas atrativas como baixa compressão e baixa corrosão [1], além de um módulo de elasticidade semelhante aos ossos e por apresentar baixa toxicidade aumentando seu potencial para aplicações biomédicas [2].

O titânio tem propriedades atrativas em sua forma metálica, porém, com o tratamento adequado de sua superfície, é possível mimetizar a interação do implante atribuindo outras propriedades ao material [3] o que o torna mais semelhante com a parte inorgânica óssea, facilitando a regeneração e a implantação do material à matéria viva [4], além de aumentar a sua resistência a corrosão[5].

Há diversas formas de modificar a superfície do metal, como as utilizadas por Zhang *et al.* [6] que utilizaram o método térmico. Já Chavadej *et al.*[7] e Daothong *et al.* [8] adotaram o método de micro emulsão e vaporização química. Entretanto, uma metodologia muito comum é a anodização potencioestática [9], por ser economicamente viável e trazer resultados positivos como o aumento da resistência a corrosão[3] e a possibilidade de mimetizar a superfície do osso e aumentar a biocompatibilidade do implante.

Contudo, esses implantes e enxertos implantáveis modificados ainda podem falhar após sua colocação cirúrgica, o que resulta em complicações do pós-operatório e que estão relacionadas com falha na formação de tecido da integração, infecções bacterianas, rejeição do organismo, ou osteomielite [10].

A partir dessas falhas, é interessante investigar o comportamento dos nanotubos de Titânio (NT's) em um sistema de carreação de fármacos, possibilitando assim, os tratamentos pós-cirúrgicos de forma pontual [11] e assim, suprimindo os métodos convencionais de administração de fármacos, podendo contribuir com a diminuição de rejeição do implante. Essa opção de carreamento é ideal na injeção de fármacos antibióticos e anti-inflamatórios que são empregados

como estratégia na prevenção de infecções bacterianas, apontadas como uma das complicações mais graves neste tipo de procedimento [12]. Desta forma, com a elaboração de revestimento nanotubular de TiO_2 , é possível preencher estes NT's com fármacos desejados e controlar o tempo e a quantidade de liberação deste medicamento no local onde o dispositivo foi implantado. Além disso, com a vantagem da liberação do fármaco no local de forma física ou química, é possível criar uma zona de inibição de microrganismos ao redor do implante [13].

Dentro desse contexto, o intuito desse trabalho foi utilizar uma metodologia para a síntese e tratamento de superfícies metálicas possibilitando seu revestimento com nanotubos de TiO_2 , a partir da liga $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$, que apresenta suas principais características estruturais e morfológicas para utilização em implantes. Em seguida, é realizado um estudo da liberação do fármaco Ibuprofeno em meio salino tamponado, sendo estes NT's preenchidos pelo fármaco com o anti-inflamatório previamente, e investigando-se a cinética de liberação conforme as etapas do tratamento superficial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMATERIAIS

Estudos com biomateriais utilizados para implantes ósseos e ortodônticos estão sendo vastamente explorados. Sendo assim os materiais mais utilizados são os cerâmicos, polímeros, metais e os mais recentes os compósitos [14].

A definição da *American Society of Metals* (ASM) sobre biomateriais são:

"Qualquer substância ou combinação de substâncias (que não sejam drogas ou fármacos), de origem natural ou sintética, que podem ser usadas por qualquer que seja o período de tempo, como parte ou como o todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo humano"

O sucesso de um biomaterial depende da sua interação e reação com o organismo implantado. Assim, a problemática atual são as doenças ósseas causadas por infecções bacterianas e rejeição do implante pelo organismo, pois pode ocorrer devido à baixa resistência a corrosão dos implantes metálicos, que pode resultar na liberação de íons metálicos não compatíveis no organismo, causando reações tóxicas e alérgicas [15].

No que se diz respeito à substituição ou restauração de tecidos doentes ou danificados, os metálicos são os mais adequados se comparados com materiais cerâmicos ou poliméricos, devido à sua resistência mecânica e a corrosão, apresentando alta resistência ao desgaste [16].

Materiais a base de titânio e suas ligas têm recebido interesse significativo nas últimas décadas em função de sua utilização no âmbito de aplicações tecnológicas, destacando-se o emprego destes materiais no desenvolvimento de dispositivos médicos e administração local de drogas [17].

O Titânio e suas ligas são classificados pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM), e pela Organização Internacional de Normatização (ISO) através de suas microestruturas obtendo α (Nitrogênio, Oxigênio, Alumínio, Carbono, etc.), β (Nióbio, Vanádio, Ferro, Manganês, etc.) e $\alpha + \beta$ (sendo a integração de cada um dos compostos na estrutura) [18].

Em específico, a liga Ti_6Al_4V possui em sua composição uma mistura de estabilizadores $\alpha + \beta$, por apresentar Alumínio e Vanádio na sua composição, onde

com essa fusão de estabilizadores faz com que apresente elevada resistência mecânica, aumentando sua elasticidade em comparação com o Titânio puro [19].

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

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

*Liga desenvolvida para aplicações biomédicas ASTM (Sociedade Americana de Testes e Materiais), ISO (Organização Internacional para Normatização).

Para os uma boa eficiência do biomaterial, é necessária uma atuação de rápida cicatrização e uma boa formação da osseointegração. Neste caso, trabalha-se com tratamento de superfície para formar uma camada estável e inerte de TiO_2 , o que diminui a reação do metal com o organismo, dando uma excelente biocompatibilidade por sua morfologia, alta resistência a corrosão e outras propriedades mecânicas [2].

2.2 OSSEOINTEGRAÇÃO

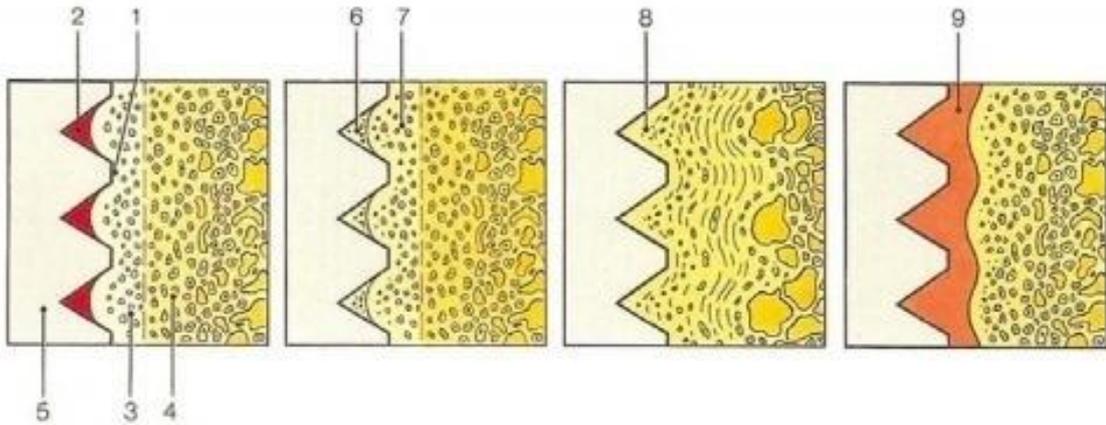
A osseointegração está associada à formação de um novo osso a partir da interação positiva do biomaterial com o osso danificado. Tal processo se resume a uma modelação e remodelação do tecido ósseo.

Os fenômenos químicos e fisiológicos da interface osso/implante são dependentes de fatores como rugosidade e porosidade da superfície do implante, pois este vai permitir uma mimetização da interação entre biomaterial com o osso [18].

As etapas principais da osseointegração são descritas por uma série de reações complexas de caráter biomineralizador, caracterizadas principalmente por três etapas: a osteocondução, neoformação óssea e remodelação. Nestas reações, a superfície de dispositivos médicos é assimilada ao tecido ósseo pela ação das células primárias ósseas (osteoblastos). Na etapa de osteocondução, estas células dirigem-se a interface do tecido ósseo com o biomaterial e sintetizam a matriz orgânica. Esta matriz orgânica é conhecida por servir como sítio para a deposição de íons, como cálcio e fosfato (precursores do mineral Hidroxiapatita (HA)), que passam posteriormente por um processo de mineralização. [20].

Juntamente com o processo demonstrado na FIG.01, reações biomineralizadoras ocorrem na superfície do substrato metálico assimilando a estrutura do tecido ósseo. Essas reações fazem com que íons cálcio e fósforo sejam precipitados na superfície do implante, onde por consequência acontece a formação da Hidroxiapatita (HA).

Figura 1: Representação esquemática dos eventos biológicos decorrentes da inserção de um bioimplante.



Fonte: ÁGREDA; C. G. [3]

De uma forma geral, as etapas da osseointegração são decorrentes a [3]:

- 1- Região de contato entre o osso e o implante;
- 2- Representação de coágulos;
- 3- Região óssea danificada;
- 4- Osso sadio;
- 5- Bioimplante;
- 6- Início da cicatrização;
- 7- Após o início de cicatrização, o tecido ósseo encontra-se em contato direto com o implante, onde já não há mais um tecido intermediário;
- 8- Em caso de resultado negativo ao implante, é formado um tecido não mineralizado, constituído de fibroblastos entre o implante e o osso;
- 9- Possível desenvolvimento conectivo iniciado devido a um trauma excessivo (infecções, carga mecânica, etc).

O grande êxito na utilização de biomateriais a base de titânio, que impacta nas reações de osseointegração, é a sua natureza passivante quando exposto ao oxigênio [21]. Esta natureza faz com que haja a formação espontânea de um filme fino de óxido na superfície do metal proveniente da sua oxidação em ambientes corrosivos, o deixando passivo em relação aquele sistema. Além disso, é importante

ressaltar que para que um biomaterial seja considerado eficiente, deve-se haver uma rápida cicatrização dos tecidos e a superfície do biomaterial deve promover uma boa osseointegração, estimulando o meio a responder de modo positivo, o que é um grande desafio em cirurgias ortopédicas atualmente. Também é importante prevenir a inflamação do implante e obter uma eficiência na integração das superfícies do material, sendo possível melhorar as propriedades do implante de Ti com tratamentos superficiais. Isso é alcançado ao adicionar uma alternativa de administração local de medicamentos através do controle de formação de uma camada de nanotubos de TiO_2 por anodização carregados com fármacos específicos [22].

2.3 TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE

O desenvolvimento de metodologias de tratamento e modificação de superfície metálicas visando a aplicação em biomateriais é vasto [23–30]. Por exemplo, Zhang et al. [6] utilizaram métodos térmicos para atingir esse objetivo, enquanto que Chavadej *et al.*[7] e Daothong *et al.*[8] adotaram o método de micro emulsão e vaporização química respectivamente. Contudo, a metodologia mais comum é a anodização potencioestática [9,23–26,29,31–33], por ser economicamente viável e trazer resultados como o aumento da resistência a corrosão pelo aumento da área de trabalho do material [3] e facilitando a biocompatibilidade do implante.

Sabe-se que o tecido ósseo é composto por duas componentes principais; sendo o, material orgânico o que permite uma certa flexibilidade diante de possíveis tensões; e o material inorgânico, composto principalmente por Hidroxiapatita (HA) responsável por uma maior rigidez. Quando o material metálico passa por anodização, sua texturização assemelha-se muito a parte orgânica, promovendo o reconhecimento e aceitação do material pelo organismo [4].

O controle das variáveis de anodização possibilita adotar uma texturização da superfície para adequar o crescimento de estruturas com dimensões nanométricas com características escolhidas, mimetizando a estrutura óssea [34] e levando à otimização de propriedades como rugosidade e molhabilidade adequadas. Dessa

forma, é necessário compreender o processo de anodização. Nesse procedimento o metal é submetido à oxidação eletroquímica. Pode ser conduzida a potencial constante (modo potenciostático) ou a corrente constante (modo galvanostático). Um sistema de anodização convencional é constituído por uma fonte de alimentação que aplica a energia ao sistema que está conectado a célula eletrolítica, contendo o metal (Titânio), nesse caso o anodo com pólo positivo, e os contra-eletrodos (pólos negativos) constituídos de materiais inertes ou que apenas serão condutores da reação de redução da água (no caso a platina). Em um eletrólito adequado se aplica uma diferença de potencial ou uma corrente constante entre o anodo e o catodo que resulta em reações de redução e oxidação. Assim, no anodo há a formação de uma camada de óxido sobre a superfície do Titânio. A célula eletroquímica é mantida a temperatura constante por meio de um sistema de recirculação termostático, que controla a temperatura do sistema.

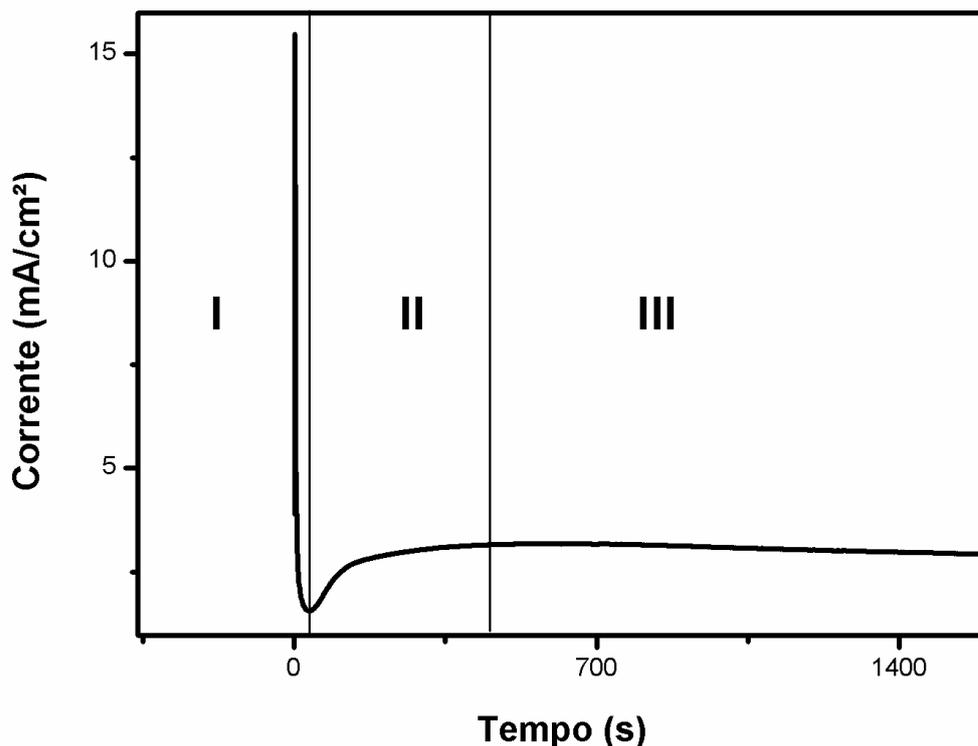
Por causa da polarização dos eletrodos, cátions do eletrólito, como os íons H^+ , são reduzidos nos contra-eletrodos gerando H_2 . Em conjunto a este processo, o eletrodo de titânio é polarizado positivamente, fazendo com que este atraiam íons negativos presentes na solução, em geral íons F^- , OH^- e O^{2-} [20], que irão participar dos processos oxidativos da superfície do anodo.

No processo de anodização do Ti visando a formação de nanotubos de TiO_2 , a inserção de íons fluoreto em meios contendo baixas porcentagens de água (0,5 a 10,0%) em soluções orgânicas viscosas nas gerações posteriores culminaram no alto ajuste das condições de anodização levando a produção de nanoarquiteturas na superfície do anodo, sendo considerada como solução ideal para ser utilizada no tratamento de superfície para implantes [20]. De fato, a presença de íons F^- é capaz de dissolver parcialmente o óxido, processo crucial na formação da porosidade no filme e, possivelmente, atua para sustentar a porosidade durante a formação dos nanotubos (NT's), essa formação se dá com a adição de meios viscosos com baixa porcentagem de água, como soluções orgânicas de etilenoglicol [35].

O método potenciostático induz a formação de óxidos ou "*coatings*" nanoestruturados permitindo a texturização dos substratos de maneira semelhante à morfologia encontrada no osso humano, sendo assim essa nanoestrutura favorece a osseointegração. A oxidação eletroquímica de metais, neste caso, referente a

anodização do titânio em meio líquido contendo íons fluoreto, pode ser observada pelas curvas eletroquímicas, também chamadas de cronoamperogramas [18] (FIG.2). Nestas curvas, é possível visualizar as diferentes etapas da formação do nanotubos.

Figura 2 - Curva cronoamperométrica referente à anodização potencioestática do titânio em meio de etilenoglicol contendo íons fluoreto.



Fonte: Simon e Sikora [20]

Pode-se observar na região (I) um decréscimo abrupto da corrente devido ao aumento da resistência elétrica causado pelo espessamento da camada de óxido barreira. Tal processo é caracterizado por uma oxidação induzida do titânio quando se polariza positivamente com um potencial constante. Nesta primeira região acontece a formação de uma fina camada de óxido chamado “óxido barreira” que recobre toda a superfície do metal. Na região (II) observa-se que a corrente para de diminuir seguido de um pequeno aumento. Isso ocorre devido às reações de oxidação e dissolução ocasionadas pela ação dos íons fluoreto presentes no eletrólito que levam a solubilização local do óxido barreira e do metal, por meio da

formação do complexo $[\text{TiF}_6]^{2-}$ (que é solúvel no meio eletrolítico) gerando locais de dissolução ativos do metal. Nessa segunda região e após a formação do complexo solúvel, estruturas nanotubulares se formam gerando os precursores dos nanotubos de TiO_2 . Posteriormente, o sistema passa a alcançar a região (III), onde se observa uma fase estacionária, sem variação expressiva de corrente, e que ocorre o aumento da profundidade e comprimento dos nanotubos formados a medida que o metal e o óxido em sua base são dissolvidos no processo de dissolução ativa pelo campo elétrico [35].

Dessa forma, espera-se que a arquitetura nanotubular combinada com sua composição (TiO_2) possam ser utilizados com plataformas de ancoragens e formação de camadas de hidroxiapatita (HA). As matrizes de nanotubos de TiO_2 podem ser produzidas na fase anatase após recozimento aumentando a possibilidade de formação de HA sobre essas estruturas [36].

Mesmo com a morfologia e estrutura do material estando de acordo para a aplicação, outros fatores, como a presença de íons específicos, também proporcionam uma melhor biocompatibilidade. Isso é demonstrado pela maior estabilidade e ancoramento do material ao organismo quando íons Mg^{2+} são inseridos na estrutura dos nanotubos de diversas matrizes, impactando na molhabilidade e indução da deposição de HA [37].

Nesse sentido, uma metodologia apresentada no trabalho de Simon *et al.* [20,32,33] emprega uma formulação de solução eletrolítica contendo fluido corporal sintético (SBF) idealizado por Kokubo *et al.* [38] que possui íons encontrados em fluidos corporais dos seres humanos (TAB. 02), sendo responsáveis pela interação e crescimento de filmes que irão facilitar a osseointegração. Assim, a aplicação dessa metodologia provoca a inserção destes íons no revestimento, tendendo a estimular a osseointegração e a biocompatibilidade. Essa metodologia será empregada no desenvolvimento dos materiais nanotexturizados deste trabalho.

Tabela 2 - Concentração iônica do plasma sanguíneo humano em comparação com a solução de SBF. Legenda: [Ci] Concentração iônica (mM).

	[C _i] (mM)							
	<i>Na</i> ⁺	<i>K</i> ⁺	<i>Mg</i> ²⁺	<i>Ca</i> ²⁺	<i>Cl</i> ⁻	<i>HCO</i> ₃ ⁻	<i>HPO</i> ₄ ³⁻	<i>SO</i> ₄ ²⁻
Plasma Sanguíneo Humano	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Solução de SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Fonte: SIMON, A.P.[39]

Contudo, apesar da solução de SBF ser corrosiva ao metal do substrato (em função aos íons de cloreto), quando empregado em pequenas quantidades (na metodologia, substitui-se uma pequena porcentagem do eletrólito pela solução de SBF), pode ser utilizado para o fornecimento de espécies presentes naturalmente no organismo, como Cálcio, Magnésio e Fosfato, podendo ser usada para aumentar a proximidade da constituição química do organismo, promoção de maiores taxas de biocompatibilidade e osseointegração de células ósseas ou mesmo a otimização da molhabilidade e morfologia [39].

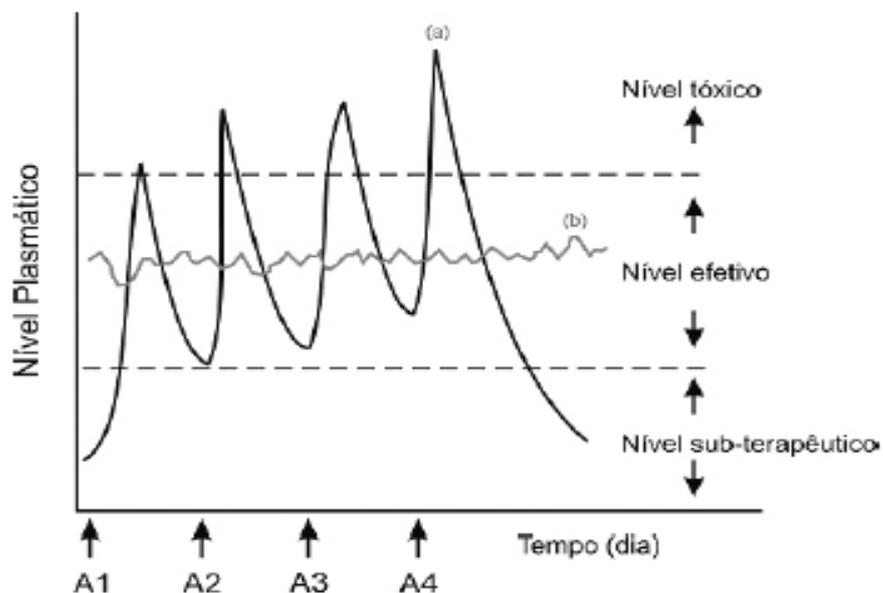
2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Sistemas de liberação de fármacos podem ser classificados de diversas maneiras: liberação retardada, repetida, controlada, sustentada, entre outras [13]. No entanto, o termo “liberação controlada” é mais empregado para se referir a qualquer tipo de sistema de liberação, pois este não especifica o mecanismo de liberação. O uso dos NT's de TiO₂ como plataforma de armazenamento e liberação são mais adequados para a biocompatibilidade para implantes devido topografia do revestimento ser semelhante ao do osso [40]. No entanto, inevitavelmente, esta topografia também permite o crescimento de microrganismos na superfície, sendo identificado mais um motivo para a produção de implantes com adição de medicamentos anti-inflamatórios e antibióticos [41]. Sendo assim, essas superfícies texturizadas vêm sendo estudadas para a incorporação e liberação controlada de

fármacos, proteínas ou hormônios, além do que possibilitam o controle da interface osso/implante [42,43].

Os métodos de administração de medicamentos atualmente alcançados pela sociedade, cuja liberação do fármaco é prolongada, requerem administrações mais frequentes e com mais quantidade de droga em relação às formas de liberação controlada, além de obter certa instabilidade de concentração com o uso de 11 medicamentos via oral em comparação ao sistema de liberação localizado e ativo (FIG. 03), neste caso, no bioimplante [13].

Figura 3 -Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por: a) métodos convencionais de multi-dosagem e (b) em sistema de liberação controlada.



Fonte: Lyra, Magaly *et. al.* [13].

A FIG.03 representa a performance do medicamento com a ingestão no método convencional e no método de liberação controlada diretamente no local. Visualiza-se que quando o remédio é administrado de forma convencional acontece uma variação de concentração de fármaco no organismo, o que acaba ultrapassando o limite de toxicidade e o nível em que se torna ineficaz, sendo necessário prolongar o uso de medicamento. Já utilizando a administração local, não

temos essa variação tão visível entre os níveis, sendo possível controlar a quantidade a ser liberada para manter no nível efetivo ao organismo, assim sem a necessidade de aumentar a quantidade e/ou prolongar o tempo de tratamento

Pode-se citar algumas vantagens em relação aos métodos que liberam em um curto intervalo de tempo o agente ativo, dentre estas podemos enumerar [44]:

- (1) Níveis constantes da substância no organismo, resultando em uma maior eficiência do fármaco, sendo assim necessita-se de uma quantidade inferior do agente ativo para se produzir o mesmo efeito dos métodos convencionais;
- (2) Aplicação do fármaco diretamente no local de ação, evitando, então, efeitos colaterais maiores quando esse fármaco atua em outras regiões do organismo;
- (3) Menor frequência de administração do fármaco no organismo do paciente, aumentando o conforto e a sua eficácia, evitando também doses tóxicas ao organismo.

Nos últimos anos, esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de tecnologias ao sistema de liberação retardado de drogas. Materiais nanotubulares, vêm sendo extensamente estudados devido ao fato de possuírem uma grande superfície para suportar a droga, em geral vem sendo utilizados para melhorar a entrega da droga no tecido alvo, reduzindo a toxicidade para outras células [45].

2.4.1 IBUPROFENO

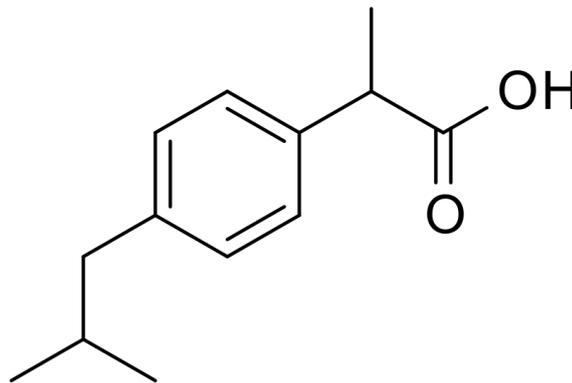
Dentre uma vasta gama de fármacos passíveis de estudos de liberação, o Ibuprofeno (fármaco anti-inflamatório não esteróide, com efeitos analgésicos, antipiréticos) se notabiliza por ter aplicação tanto em sistemas que possuam um perfil de atuação rápida quando se objetiva efeitos antitérmicos e analgésicos [46]. O medicamento é comercializado ao público e são comumente utilizados para tratar inflamações, febre e dor.

Os tratamentos convencionais por vias aéreas podem se mostrar insuficientes, pois a droga não chega 100% ao local, neste caso cirúrgico, conseqüentemente, é

necessário ingerir doses mais altas, o que acaba afetando outros órgãos, como os ocasionados no sistema digestivo.

Assim sendo, uma alternativa para a entrega de medicamento diretamente no local afetado através da superfície do biomaterial é a utilização de uma plataforma para liberação controlada, como os NT's [47].

Figura 4 - Estrutura Química do Ibuprofeno



2.5 OBJETIVO GERAL

O trabalho tem como objetivo a síntese de nanotubos de TiO_2 (NT's) a partir da liga $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ utilizando-os para o estudo da liberação controlada de Ibuprofeno em meio salino tamponado.

2.5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Síntese do revestimento nanoestruturado de TiO_2 a partir de sua liga $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$, utilizando o método eletroquímico de anodização potenciostática em meio de etilenoglicol contendo íons de fluoreto e SBF;
- ❖ Caracterização morfológica através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV - morfologia), estrutural por Difração de Raio-X (DRX - estrutura), e ângulo de contato (AC - molhabilidade) dos nanotubos produzidos;

- ❖ Incorporação de Ibuprofeno na amostra sem tratamento superficial e no revestimento de nanotubos através do método *Top Filling*;
- ❖ Investigação dos transientes de liberação do Ibuprofeno dos nanotubos, verificando sua eficiência como plataforma de liberação.

3 METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE DO FILME DE NANOTUBOS DE TiO_2

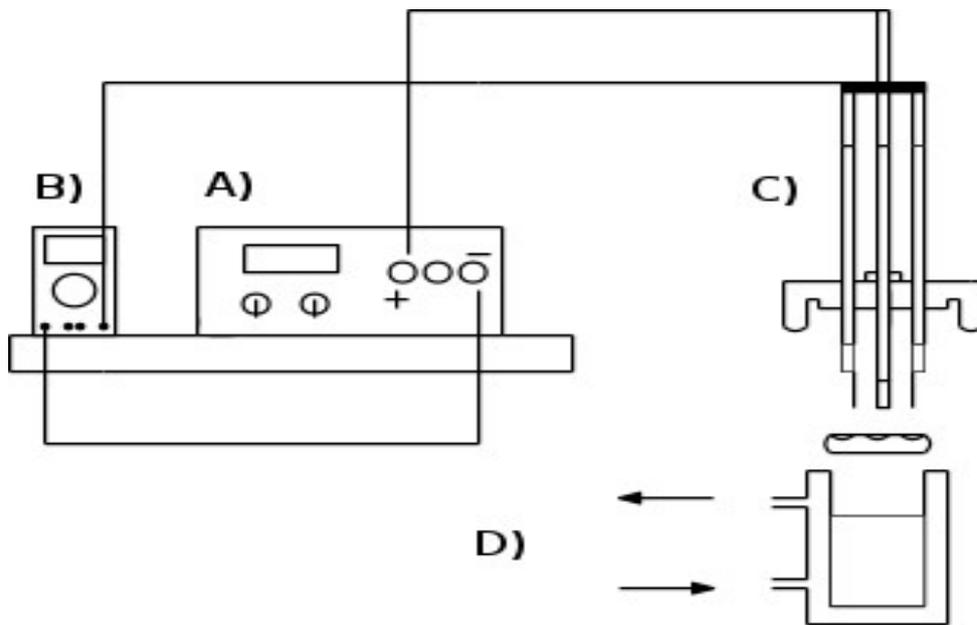
A síntese dos filmes de nanotubos de TiO_2 foi realizada utilizando substratos da liga $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$. As amostras foram limitadas por dimensões de 15,0mm x 10,0mm e 2,0 mm de espessura. As amostras foram previamente polidas com lixas de granulometria de 400mm, 600mm e 1200mm, respectivamente, e em seguida lavadas com água ultrapura obtida por sistema Sartorius e secas na temperatura ambiente.

Para a modificação da superfície dos metais foi utilizado o método de anodização potencioestática, seguido por tratamento térmico para ativar a fase anatase do TiO_2 .

3.1.1 ANODIZAÇÃO POTENCIOSTÁTICA

Para o método de anodização, utilizou-se um sistema contendo uma fonte de corrente/tensão DC (Sourcemeter 2410 - Keithley, UFSCar Sorocaba), uma célula eletrolítica, banho termostático, dois contra eletrodos de platina (15mm x 10mm), e o eletrodo de trabalho que é a amostra de $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ previamente cortada, polida e limpa. A figura 05 ilustra o sistema utilizado. O eletrólito, junto com a metodologia de anodização, foi desenvolvido a partir do trabalho de Simon A. [20] que é constituído por 90% (v/v) de etilenoglicol contendo 0,75% (m/m) de fluoreto de amônio (NH_4F), 9% (v/v) de água ultra pura, e 1% (v/v) de SBF. A quantidade de eletrólito utilizada para cada etapa de tratamento de superfície do metal foi de 50mL. As condições utilizadas no processo de anodização estão sumarizadas na Tabela 3.

Figura 5 -Esquema de sistema de anodização: A) Fonte; B) Multímetro; C) Célula eletroquímica; D) Banho termostático.



Fonte: Simon A. [20].

Tabela 3 - Condições controladas no sistema de anodização para crescimento do filme de nanotubos de TiO_2 .

Condições utilizadas para anodização potencioestática de TiO_2	
Voltagem	25 V
Temperatura	40°C
Tempo	5400 segundos
Quantidade de eletrólito	50 mL

A solução de fluido corporal sintético (SBF) foi preparada a partir da metodologia de Kokubo *et al.* [38]. Os compostos e as quantidades utilizadas encontram-se na Tabela 04.

Tabela 4 - Quantidade e elementos constituintes da solução de SBF proposta por Kokubo *et al* [38]

Solução de fluido corpóreo sintético (SBF)	
Elementos	Quantidades (para 1 L de SBF)
Água ultra pura	750 mL
NaCl	7,996 g
NaHCO ₃	0,350 g
KCl	0,224 g
K ₂ HPO ₄	0,228 g
MgCl ₂	0,305 g
Solução de HCl(2,2x10 ⁻⁴ mol/L)	25 ml
CaCl ₂	0,278 g
Na ₂ SO ₄	0,071 g
(CH ₂ OH) ₃ CNH	6,057 g
Solução de HCl (2,2x10 ⁻⁴ mol/L)	Finalizar com algumas gotas até alcançar pH 7,4

É importante ressaltar que para esta solução, deve-se adicionar os elementos na ordem que estão dispostos na tabela, buscando diluir e dissolver por completo um componente antes de adicionar o seguinte. Como são utilizados diversos tipos de sais, os mesmo podem vir a precipitar, sendo necessário realizar cuidadosamente cada etapa de mistura para obter homogeneidade da solução.

3.1.2 TRATAMENTO TÉRMICO

O tratamento térmico foi feito em um forno tipo muffle, onde as amostras anteriormente anodizadas foram acomodadas em cadinhos com tampas. A temperatura de tratamento para a transformação dos nanotubos de TiO₂ amorfos para a fase anatase é de 450°C. Para atingir esta temperatura, uma rampa de aquecimento foi realizada com taxa de 2°C/min, e mantidas a 450°C por um período de 2 horas. Após esse tempo a mufla foi desligada e o resfriamento ocorreu naturalmente até a temperatura ambiente por um período de 6 horas.

3.2 CARACTERIZAÇÕES

Para as caracterizações dos revestimentos, foram comparadas 3 tipos de amostras: as amostras controle que são ligas Ti_6Al_4V (AT) que passaram apenas pela etapa do polimento; as amostras de Ti_6Al_4V polidas e anodizadas (ATA) que já apresentam nanotubos; e as amostras de Ti_6Al_4V polidas, anodizadas e com tratamento térmico (ATT). Análises como MEV, DRX e ângulo de contato permitiram observar mudanças morfológicas e estruturais conforme as etapas de tratamento de superfície.

3.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia das amostras foram analisadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) onde utilizou-se o equipamento Supra 365 da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) campus Sorocaba. As amostras foram analisadas com ampliação de 30.000 vezes, aceleração de 20 keV e distância focal de 10mm, verificando as transições e diferenças da morfologia entre as etapas do experimento.

As micrografias foram analisadas com o software ImageJ® para registra da variação e distribuição de tamanhos de nanotubos.

3.2.2 ÂNGULO DE CONTATO

Para os testes de molhabilidade foi utilizado o método de ângulo de contato (AC) utilizando o equipamento Hamé-hart 250 Standart (UFSCar Sorocaba). O ângulo obtido é o ângulo que se forma entre a gota de água e a superfície do material, identificando dessa forma as propriedades de molhabilidade das amostras. O valor do ângulo final é feita através da média de 30 medidas realizadas de cada amostra analisada.

3.2.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Para as análises estruturais do material utilizou-se o equipamento de Difração de Raios X (DRX), Modelo Shimadzu X-Ray Diffractometer 6100 (UFSCar - SOROCABA). O equipamento foi configurado para rastrear da faixa entre 20° - 90° com passo de 0,02° (10 segundos por passo) e ângulo theta fixo em 10° para se obter uma seção de maior irradiação do filme de óxido nanotexturizado, com radiação da borda do Cu k alfa (1,5418 Å) a 40kV e 30mA. Para a comparação de resultados, foi utilizado cartas de difração da Base de Dados de Estrutura de Cristais Inorgânicos (ICSD), sendo procurados cartas de Titânio e seus óxidos mais comuns, como Anatase (que é a fase inorgânica de interesse).

3.3 INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

3.3.1 INCORPORAÇÃO DO IBUPROFENO NAS AMOSTRAS

O fármaco utilizado é o comercial, encontrado em farmácia de manipulação, contendo pureza de 99,9%, massa molar = 206,29 g/mol e fórmula molecular $C_{13}H_{18}O_2$. Trabalhou-se com 10% em peso, assim foi dissolvido 5mg em 50mL de etanol com a obtenção de uma concentração de $4,8 \times 10^{-4}$ mol/L (100mg/L), baseada na metodologia de Sulka *et al.* [48].

Esta solução contendo o fármaco foi despejada por gotejamento em cima da superfície dos nanotubos. Esta metodologia é conhecida como método *TopFilling* [11]. Foi adicionado um total de 5mL na superfície das amostras analisadas (AT, ATA, ATT) mantidas em temperatura branda utilizando uma chapa de aquecimento. A solução foi aplicada com micropipeta de 100µL (o gotejo foi feito lentamente para o líquido não escorresse pelas bordas das amostras, concentrando apenas na área anodizada onde se encontram os nanotubos). Essa etapa foi repetida 10 vezes, sempre com uma quantidade de 100µL por vez. Após essa primeira etapa, a solução foi seca naturalmente ao ar, e este processo foi repetido novamente por 5 vezes,

totalizando 5mL de solução etanólica precursora de Ibuprofeno, depositada sobre cada amostra [48].

3.3.2 TESTE DE LIBERAÇÃO

Para o estudo da liberação de fármaco foi adaptado um sistema de acordo com o trabalho de Campos, P.P [49], os tempos e os arranjos experimentais para os ensaios foram organizados em duas etapas: a primeira onde os tempos de medição ocorreram entre 10 segundos e 30 minutos, e a segunda etapa com tempo maior que 1 hora nos ensaios de liberação. Para a primeira etapa as amostras foram organizadas em béqueres de 10mL e na segunda etapa em tubos Falcon de 15mL. Esse conjunto de recipientes foi colocado em um banho termostático adequado com para manter a temperatura constante em 37°C, sendo monitorada a temperatura do banho e da solução análise conforme esquema apresentado na figura 06. O ensaio de liberação foi feito imergindo o substrato de teste em 6mL de solução de tampão salino (Saline Phosphate Buffer - PBS) de pH 7,4 preparado pela mistura de NaCl 150mmol/L⁻¹, NaHPO₄ 6mmol/L⁻¹, e KH₂PO₄ 150mmol/L⁻¹, a temperatura de 37°C. A liberação do fármaco foi acompanhada utilizando medidas de Espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-vis) no equipamento Espectrofotômetro UV-Vis-NIR UV-3600 Plus da Shimadzu(UFSCar Sorocaba). A varredura de comprimentos de onda foi realizada no intervalo de absorbâncias entre 200nm e 300nm, buscando a banda de absorção característico do Ibuprofeno em 222nm. As leituras das intensidades de absorção foram realizadas a partir do tempo em que a amostra ficou em contato com a solução de PBS de acordo com a Tabela 05, totalizando 7 dias de tempo total de ensaio de liberação. O esquema experimental construído para a realização das análises está desenhado na Figura 6, onde se observa o arranjo em cada uma das duas etapas de períodos de liberação (Análise I e Análise II):

Análise I: a amostra de TiO₂ contendo nanotubos e o Ibuprofeno foi colocada dentro de um becker inicialmente (para facilitar o manuseio). Posteriormente, todos os béqueres de 10mL foram colocados dentro de um Becker maior de capacidade

de 1L no banho termostático, e com o auxílio de uma pinça, a amostra foi sendo transportada de becker para becker conforme o tempo de cada análise;

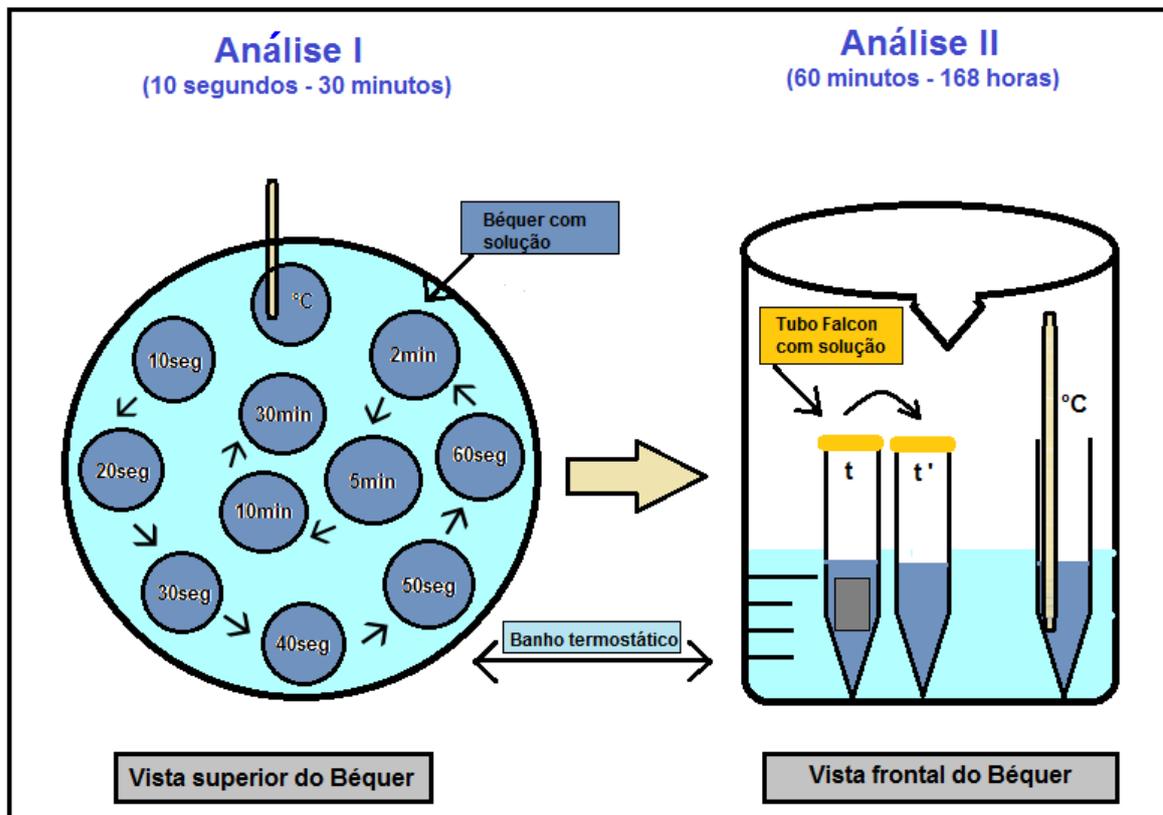
Análise II: em seguida, as amostras foram acomodadas em tubos Falcon com volume maior de solução PBS, pois observou-se após as primeiras medidas, que duram 1 hora, se fosse mantido no Becker de menor volume, a solução de PBS evaporava e alterava o volume total podendo ocasionar um erro da análise.

Na FIG. 06, as flechas indicam o sentido do trajeto da amostra durante o período de análises nos determinados tempos.

Tabela 5 - Tempos de coleta de alíquotas para as análises de Ibuprofeno.

Segundos	10 - 20 - 30 - 40 - 50 - 60
Minutos	2 - 5 - 10 - 30 - 60
Horas	2 - 5 - 8 - 11 - 14 - 24 - 36 - 48 - 60 - 72 - 84 - 96 - 108 - 120 - 132 - 144 - 156 - 168

Figura 6 - Esquema do sistema de liberação construído (em 2 etapas sequenciais de análise). (t = tempo de análise e $t' > t$).



Fonte: autoria própria.

3.3.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para estabelecer uma relação entre concentração e a intensidade de absorvância apresentada pelo medicamento presente na solução, foi elaborada uma curva de calibração obtida pela absorvância em 222nm coletada para diferentes soluções com concentrações conhecidas. Como solução padrão (linha de base) foi utilizada uma solução de PBS + álcool etílico, pois são as mesmas substâncias precursoras da solução estoque contendo o fármaco e a intenção é medir a absorvância da substância Ibuprofeno sem interferência dos eluentes.

A partir da solução padrão estoque de 10% em peso (contendo 5mg do medicamento em 50mL de álcool etílico) temos a concentração de 100mg/Lou $4,84 \times 10^{-4}$ mol/L de Ibuprofeno [47]. A intenção dessa curva analítica é obter uma faixa de variação de concentração de Ibuprofeno linear entre o mínimo e o máximo possível após os ensaios de liberação, sabendo que cada amostra contém uma quantidade fixa de Ibuprofeno previamente depositada. Dessa forma foram escolhidas 5 concentrações diferentes que percorrem essas faixas entre o mínimo mensurável e máximo possível de concentração de Ibuprofeno liberado após um tempo máximo de ensaio de liberação. A curva foi utilizada para validar o ensaio de liberação e possibilitar a construção de curvas de liberação em função da quantidade de fármaco liberada em mg.

Foi utilizado o equipamento de Espectrofotômetro UV-Vis-NIR UV-3600 Plus da Shimadzu (UFSCar Sorocaba) para identificar a absorvância de cada amostra, assim, possibilitando a comparação do Ibuprofeno liberado do revestimento.

Tabela 6 – Soluções etanólicas estoque de Ibuprofeno em PBS utilizadas para construção da curva de calibração.

Soluções Estoque	Concentração final de Ibuprofeno em PBS (mg/L)
1	9,09
2	18,18
3	27,27

4	36,36
5	45,45

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 FABRICAÇÃO DE REVESTIMENTO DE NANOTUBOS DE TiO_2

Através da anodização potencioestática em Titânio há a formação do material nanoestruturado, permitindo a texturização da superfície do metal mimetizando a estrutura da superfície do osso, melhorando a interação e aumentando assim a sua bioatividade, facilitando a osseointegração após um implante.

As etapas de crescimento dos NT's podem ser acompanhadas pela curva cronoamperométrica que corresponde ao registro das variações de densidade de corrente em função do tempo de anodização (Figura 7).

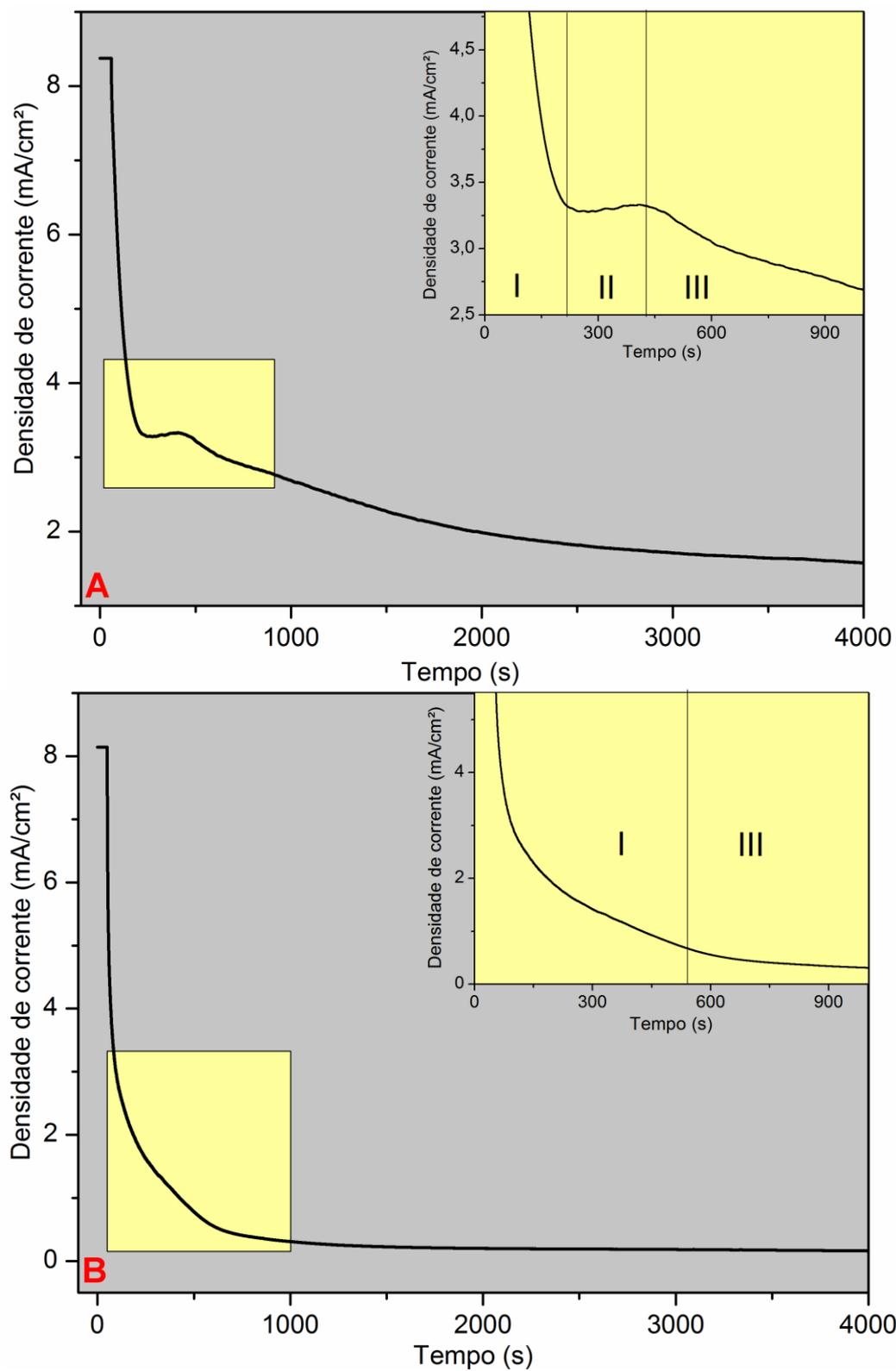
O comportamento da curva cronoamperométrica (FIG. 7A) segue o padrão encontrado na literatura, onde pode-se observar as três regiões da formação do óxido de titânio. Na região I é onde ocorre a queda da densidade de corrente, pois há um aumento da resistência pelo óxido formado, atuando como uma barreira para a passagem da corrente. Na região II, o óxido previamente formado começa a se dissolver junto com a formação dos primeiros nanotubos e sua nucleação, ocasionando um aumento de corrente e sua estabilização em torno de um valor. Essa alteração da taxa de variação da densidade de corrente está relacionada com um aumento de área superficial ativa e com processos de dissolução ativa do óxido junto com ânions de F^- . Após um determinado tempo de processo, a corrente volta a subir até atingir um valor estacionário (região III), que é quando o crescimento e a dissolução do filme atingem um estado estacionário que corresponde a formação de uma estrutura nanotubular vertical [35,50].

Entretanto, podemos observar na curva apresentada na Figura 7B que não há todas as etapas mencionadas anteriormente. Em outros óxidos anódicos nanoestruturados, como a Alumina Anódica Porosa (AAP) [9], as etapas de formação dos nanoporos são bem distintas na curva de crescimento. Contudo, no caso dos NT's de TiO_2 nem sempre essas etapas são visualizadas na curva cronoamperométrica. Isso não impede a formação dos NT's, o que será demonstrado mais à frente na caracterização morfológica das amostras preparadas.

A ausência da etapa de transição entre o crescimento do óxido barreira (decaimento abrupto da densidade de corrente até um mínimo de valor) e a formação e nucleação dos nanotubos (crescimento brando da densidade de corrente passando por um máximo local e atingindo um valor estacionário) reside no fato que as reações de formação e dissolução do óxido são governadas por inúmeras variáveis sistêmicas, como mecanismos de transporte iônico (difusional, migracional e convectivo), transporte de cargas e íons nas fases de óxido e metal, flutuações térmicas, variação de contorno dos processos que estão ocorrendo (área superficial, linhas de campo elétrico) entre outras. A medição de corrente por si só é algo complexo e traz acoplado a somatória do efeito de todos esses processos. Assim, em algumas condições de contorno é possível registrar mais intensamente algum processo, e em outras condições, a variação de densidade de corrente mascara essas flutuações. Ainda assim, o registro da curva cronoamperométrica é eficaz, pois permite observar grandes flutuações quando algum processo está fora de controle, como um processo de corrosão ativa ou curto circuito está ocorrendo, podendo o operador interromper o processo antes da finalização do tratamento de superfície, que pode levar algumas horas, em alguns casos.

Em busca de uma superfície de revestimento para aplicação em biomateriais, sua estrutura morfológica, estrutural e sua interação com meio aquoso é importante para avaliar seu desempenho como bioimplante. Assim, suas principais caracterizações são a microscopia eletrônica de varredura, ângulo de contato e Difração de Raio-X.

Figura 7 - Curva cronoamperométrica obtida durante o processo de anodização potencioestática: A - Observação das etapas da anodização; B - Observação da ausência de etapas de anodização.



Fonte: Autoria própria

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO FILME DE NANOTUBOS DE TiO₂

As condições experimentais fixadas no processo de anodização estão diretamente relacionadas com as características que o revestimento irá apresentar ao final do procedimento de tratamento de superfície efetuado pela anodização potencioestática. Assim, técnicas como MEV, DRX e AC foram utilizadas para analisar as propriedades morfológicas, microestruturais e superficiais do filme de nanotubos de TiO₂.

4.2.1 MORFOLOGIA E MOLHABILIDADE

A análise dos resultados do MEV apresenta a morfologia do revestimento sintetizado, ou seja, através deste método, é possível investigar como ficou a superfície das amostras (FIG.08). Quanto a molhabilidade do material (FIG.09), essa medida se refere a facilidade que um fluido tem em aderir ou se espalhar em uma superfície sólida, apresentada na Fig.08. Esse fenômeno é dado por três diferentes forças que atuam entre o material e o líquido em questão, as forças de tensão superficial do líquido, as de tensão superficial do sólido e as de tensão interfacial [51].

De acordo com a Figura 8A, observa-se que a superfície de Ti previamente polida apresenta uma superfície lisa e algumas marcas oriundas do processo de polimento mecânico. Nas micrografias apresentadas nas Figuras 8B e 8C é possível observar a nanotexturização de toda a superfície das amostras decoradas com NT's.

Ao observar os nanotubos formados, para as amostras ATA e ATT, podemos observar uma tendência de formação de NT's homogênea. Isso ocorre porque a composição heterogênea da liga favorece um melhor crescimento das nanoestruturas [52]. No caso, a presença de outros elementos de liga favorece o mecanismo de formação dos nanotubos.

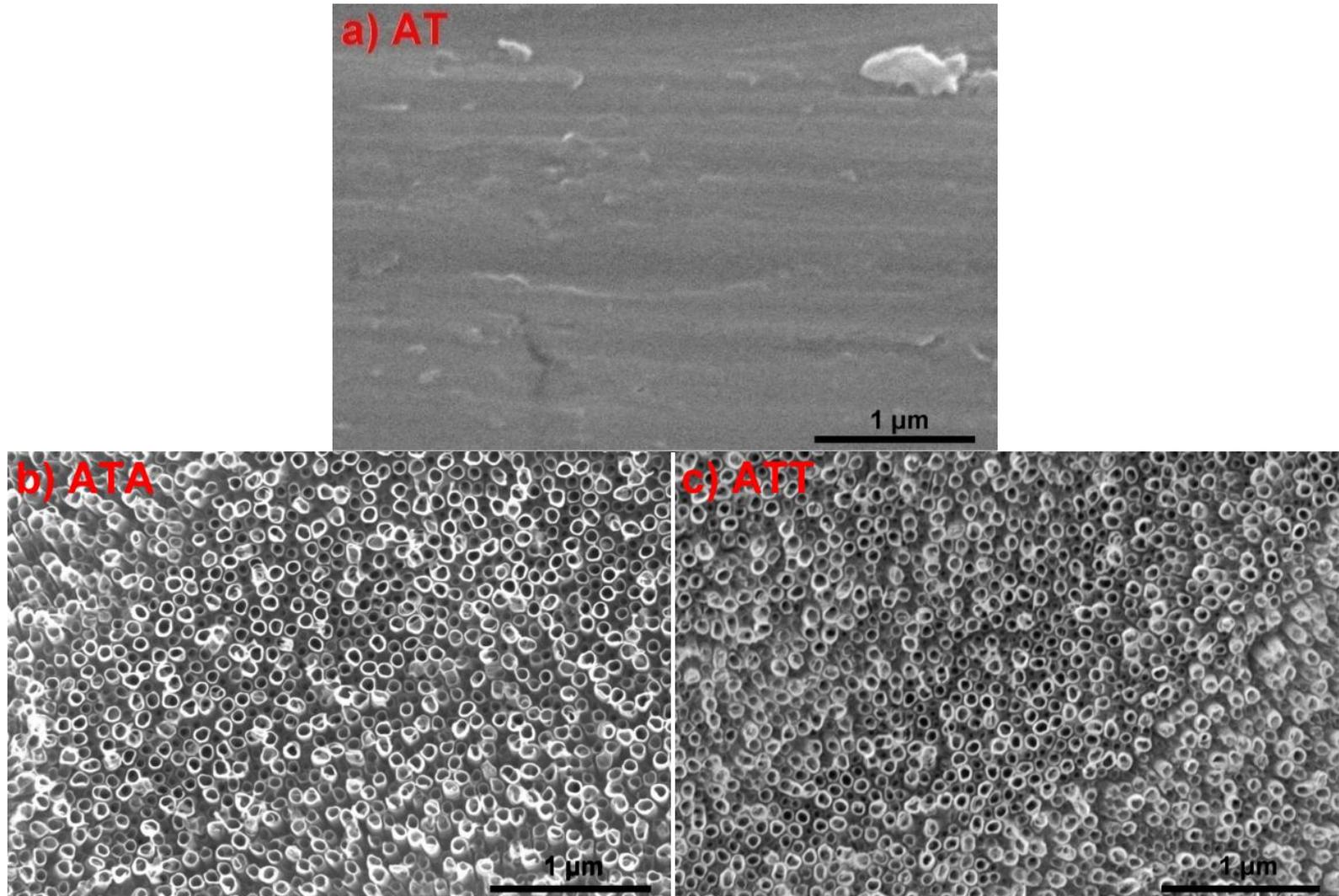
A análise da distribuição de tamanhos de nanotubos demonstrou algumas variações que estão apresentadas na Tabela 7. Observa-se que os diâmetros médios são semelhantes e que o tratamento térmico posterior não afetou a morfologia típica da superfície dos nanotubos. No entanto, observa-se que o tratamento térmico diminuiu a dispersão de tamanhos de diâmetros, o que demonstra uma melhoria da morfologia após o tratamento.

Tabela 7 - Média de diâmetros de nanotubos após análise das micrografias pelo software ImageJ® e valores de ângulos de contato de cada categoria de amostra.

Amostra	Média de diâmetro de nanotubos (nm)	Ângulo de Contato (CA)
AT	-	128,5° ± 0,8°
ATA	57,2 ± 13,1	78,4° ± 0,6°
ATT	54,2 ± 3,8	16,4° ± 0,5°

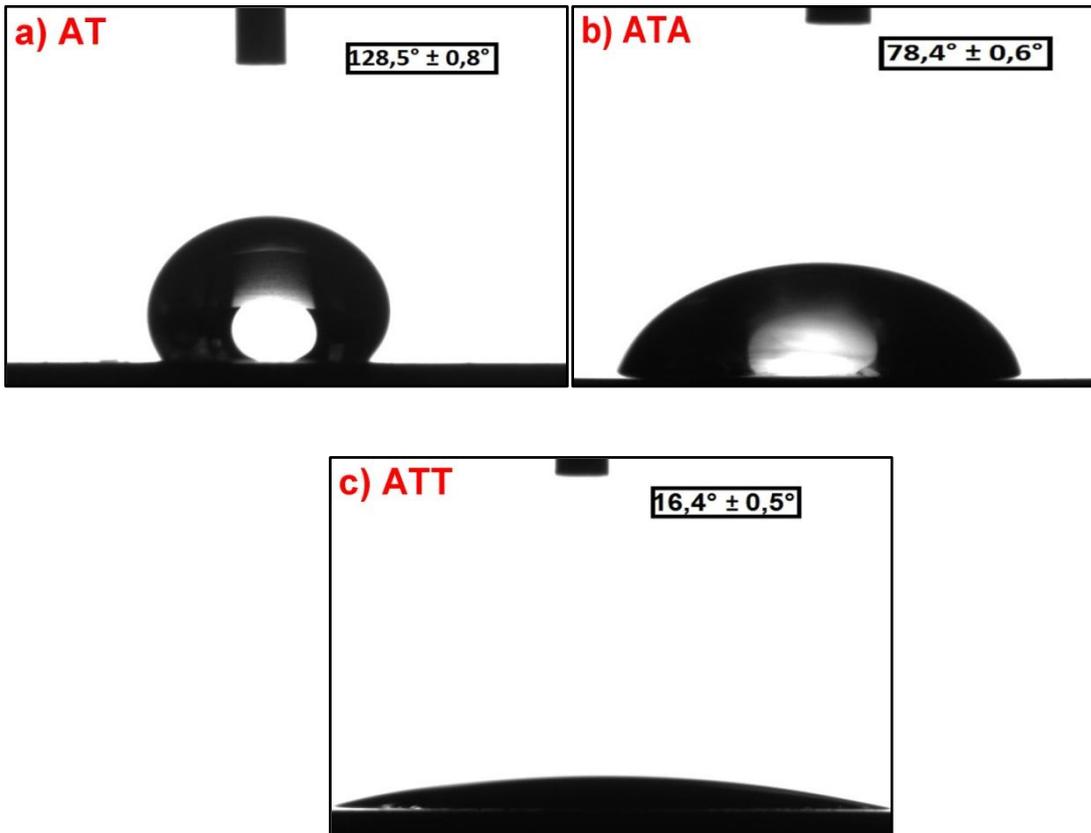
Para a aplicação desse material em bioimplantes é necessário alguns requisitos, como a magnitude do diâmetro de nanotubos, que nesse caso precisa estar dentro de uma determinada faixa de valor. Revestimentos de nanotubos com diâmetros internos menores que 100nm são mais eficazes na adesão celular e apresentam melhor osseointegração [18,20,39], portanto os resultados aqui apresentados apontam para materiais com grande potencial de adesão celular. Contudo, para que o sistema seja eficaz para o carregamento posterior liberação de algum fármaco, outros requisitos são necessários, o que nos leva para a segunda análise, de ângulo de contato, onde pode se verificar a molhabilidade da superfície das amostras.

Figura 8 - Imagens de MEV-Fe das amostras: a) AT; b) ATA; c) ATT.



Fonte: Autoria própria.

Figura 9 - Imagens de ângulo de contato: a) AT; b) ATA; c) ATT.



Fonte: Autoria própria (UFSCar - Sorocaba)

Os ângulos de contato medidos demonstram que para cada etapa de tratamento do metal, a superfície modifica suas propriedades superficiais passando de uma superfície menos hidrofílica para uma superfície mais hidrofílica entre a amostra de Ti com a superfície somente polida mecanicamente, com a presença dos NT's e com a presença dos NT's após tratamento térmico. O interessante é notar que mesmo com uma diferença pequena em morfologia as amostras texturizadas com NT's sofrem grande influência da etapa de tratamento térmico. Isso é resultado da transição estrutural do TiO_2 da fase amorfa para a fase anatase, que apresenta características de propriedades de superfície bem distintas.

Segundo aponta Ferreira, S. [18] amostras mais hidrofílicas são mais eficientes para a introdução do fármaco em seu interior (caso seja utilizado em forma líquida aquosa) e adesão ao osso humano, demonstrando assim que a amostra ATT nesse caso pode ser mais adequada para sua utilização como dispositivo de

liberação. No entanto, mesmo as amostras que apresentam menos molhabilidade, como a ATA, podem ser utilizadas como sistemas de liberação, como será demonstrado mais a frente.

4.2.2 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DOS NANOTUBOS DE TiO₂

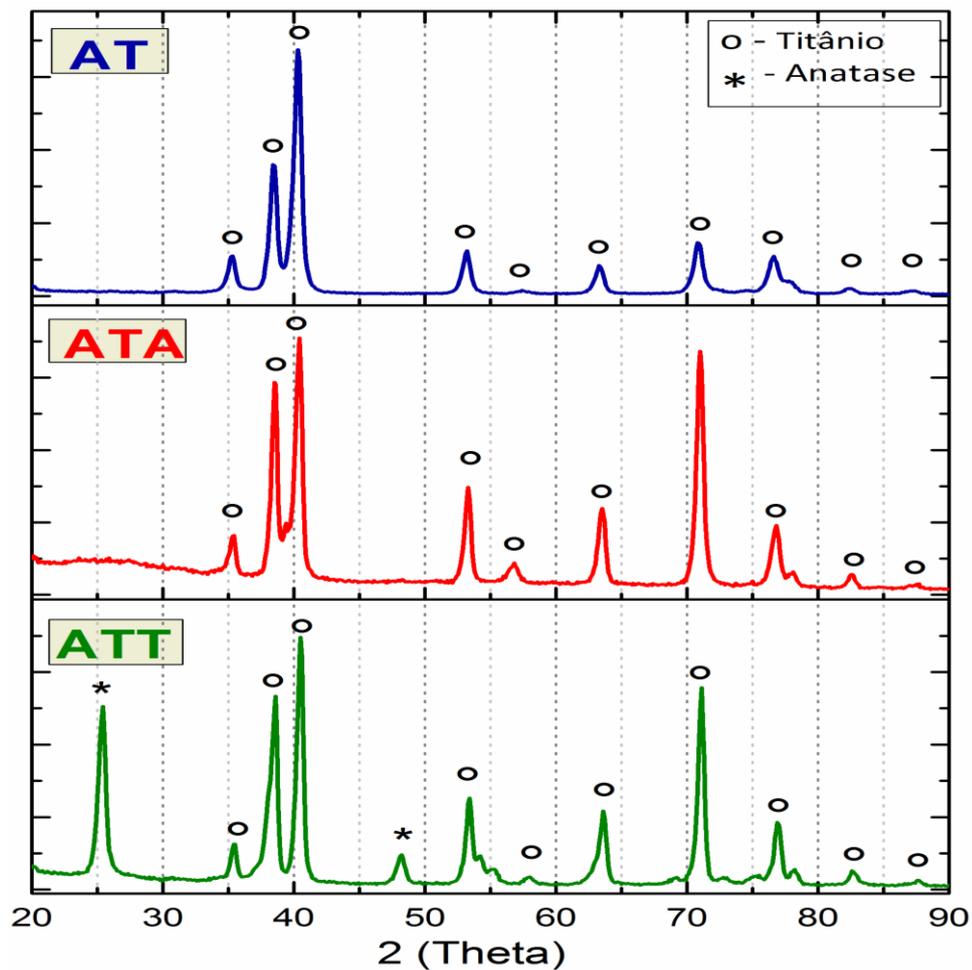
A caracterização estrutural realizada com medidas de difração de raio-x apresenta difratogramas com vários picos de difração de planos que auxiliam na identificação das fases cristalinas presentes em cada categoria de amostras. Entre as etapas de tratamento e formação do revestimento de óxido anódico foi possível observar que as amostras AT e ATA apresentam apenas os picos característicos do substrato metálico de Ti, enquanto que a amostra ATT, apresenta picos referentes as fases anatase de TiO₂.

Os difratogramas demonstram que todas as condições de síntese geram um padrão de DRX bem definido, caracterizado por picos de difração nítidos e estreitos, todos combinando bem com a Base de Dados de Estrutura de Cristais Inorgânicos (ICSD). Para análise e comparação foram utilizados os catálogos: (ICSD: #21-1272) - referente aos picos de titânio apresentado, sendo identificado facilmente pelo seu pico mais intenso que se apresenta em $2\theta = 40^\circ$. O pico da fase cristalina anatase é identificada na amostra que passou por tratamento térmico (ATT) pelo seu principal pico apresentado em $2\theta = 25^\circ$ (ICSD: #44-1294).

Ao dispor a nanoestrutura a temperatura de TT, a fase anatase/rutilo tende a estabilizar provocando um aumento da espessura da parede, como resposta ao aumento no tamanho dos cristalitos, diminuindo os diâmetros dos poros (VAENAS et.al., 2013). Isso explica a redução do tamanho do diâmetro do nanotubo apresentado no MEV.

O ângulo de contato da amostra ATT demonstra que as amostras cujos NT's de TiO₂ se encontram predominantemente na fase anatase apresentam uma maior molhabilidade.

Figura 10 - Difratomogramas das análises de DRX: AT, ATA e ATT.



Fonte: autoria própria.

4.3 TESTES DE LIBERAÇÃO

A partir da determinação das características do revestimento produzido foi conduzido um estudo da utilização da nanoestrutura de TiO_2 nanotubular como plataforma de liberação do fármaco Ibuprofeno, com intuito de aplicação na área biomédica.

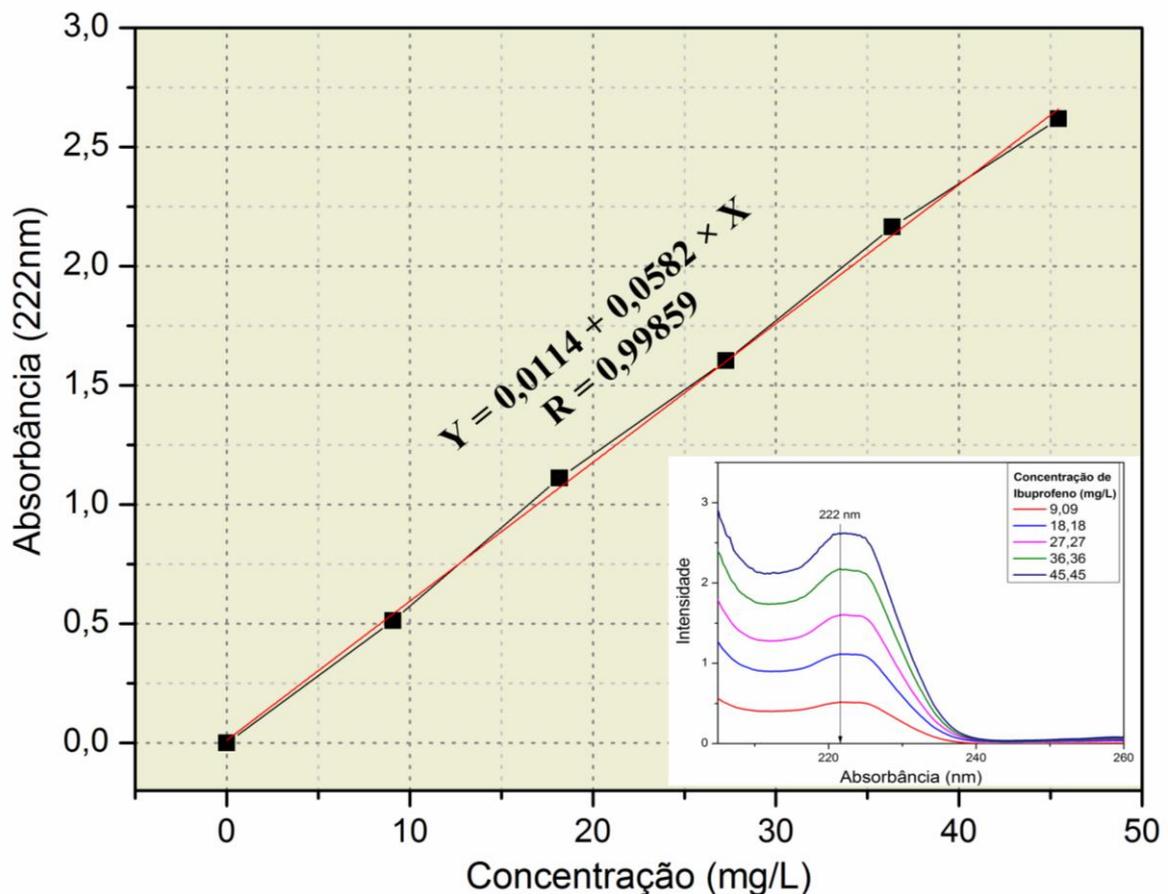
A presença das nanoestruturas superficiais aumentam significativamente a área superficial do material [53], melhorando o potencial de aplicação desses

materiais em implantes e facilitando o processo da etapa de de introdução e liberação do fármaco.

Para os testes de liberação do fármaco Ibuprofeno, previamente inserido nas amostras pelo método de *TopFilling*, foi necessário realizar uma curva de calibração, onde é possível observar as absorvâncias de concentrações conhecidas de Ibuprofeno em meio ao PBS e a faixa correspondente de mínimo e máximo trabalhados nesse projeto.

O comprimento de onda referente ao Ibuprofeno estudado baseia-se na absorção máxima em 222nm.

Figura 11 - Curva de calibração com extrações de máximo de absorvância em 222nm em função da concentração de Ibuprofeno em solução etanólicas de PBS. Destaque: espectros de absorvância do Ibuprofeno revelando a banda em 222nm característica da substância.



Fonte: Autoria própria.

Através do ensaio de liberação, é possível fazer comparações das cinéticas identificadas de cada amostra, possibilitando verificar sua taxa de liberação, a concentração liberada em cada tempo (%) e as alterações de velocidades de liberação ao longo do processo.

Após iniciado o processo de liberação, cada alíquota foi analisada pelo UV-vis, e de acordo com a absorvância adquirida, é possível equiparar o resultado junto a curva de calibração e obter o resultado de liberação que será estudado através de porcentagem.

A partir da curva de calibração é possível observar os valores de intensidade de absorvância correspondente as concentrações que estão apresentados na Tabela 08.

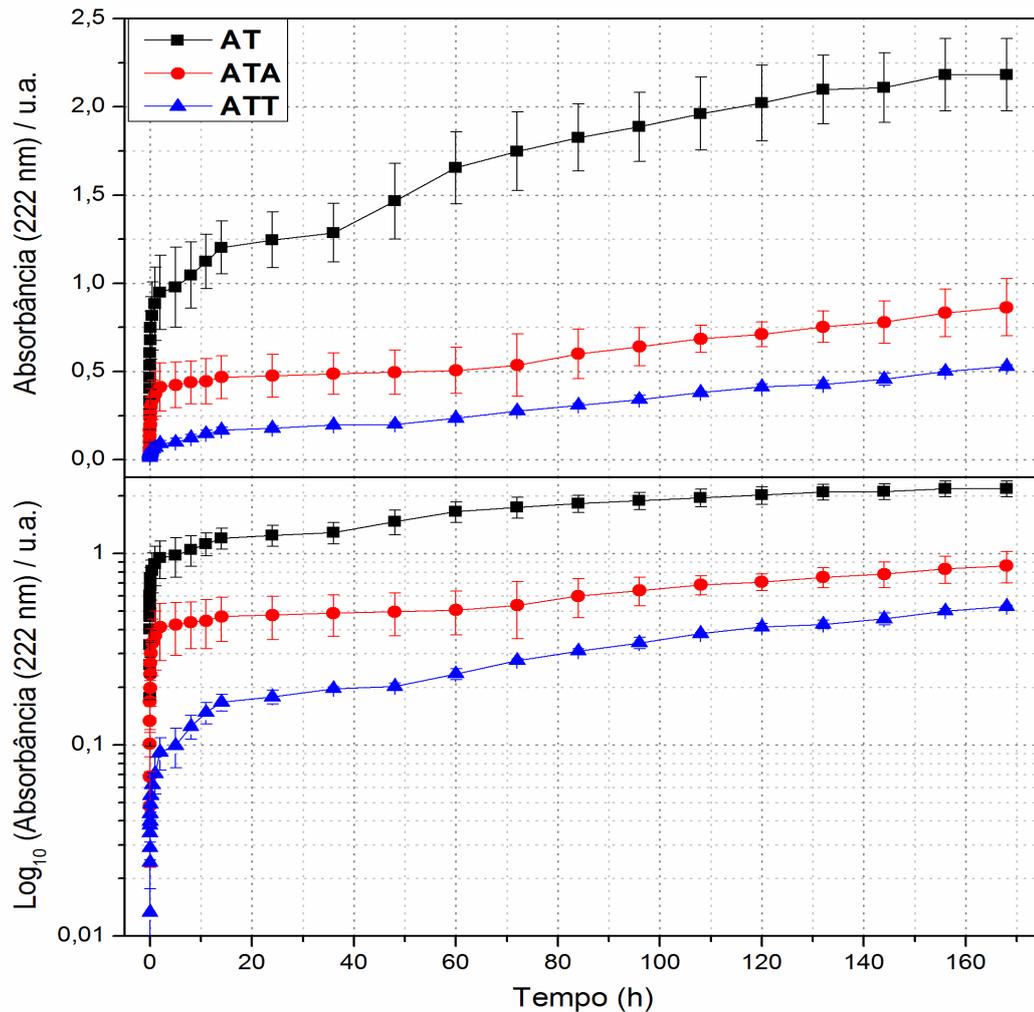
Tabela 8 - Valores referentes as concentrações de Ibuprofeno indicadas pelas absorvâncias através da espectrometria UV-Vis

Concentração (mg/L)	Absorvâncias 222 nm / (u.a.)
0	0
9,09	0,514
18,18	1,112
27,27	1,603
36,36	2,165
45,45	2,618

Na figura 12 a seguir é apresentada a liberação do fármaco e suas características. Os gráficos também apresentam a intensidade de absorvância com configuração logarítmica (Log_{10}) dispostos neste trabalho como forma de analisar melhor as diferentes curvaturas presentes relevantes que identificam a velocidade de liberação. Nesta figura, observa-se principalmente a diferença de quantidade de Ibuprofeno liberado entre as três amostras, as quais foram analisadas em triplicatas. O tempo máximo analisado das amostras foi de 168 horas, totalizando um tempo de ensaio de 7 dias. As diferentes cores das linhas refere-se as amostras AT, ATA, e ATT. A partir da figura é possível comparar inicialmente a quantidade de medicamento liberado dos diferentes revestimentos, nas mesmas condições de liberação, e é possível afirmar que a taxa de liberação da amostra apenas polida

meanicamente e sem nanotubos é maior do que as com tratamento de superfície que apresentam os NT's.

Figura 12 - Curvas de liberação de Ibuprofeno em 168 horas - Amostras AT, ATA, e ATT.



Fonte: autoria própria

Ressalta-se a quantidade mínima e máxima liberada entre as amostras, onde a AT e ATA tem uma liberação maior dentro das 168 horas do que a amostra ATT, que teve um retardo de liberação bem significativo, porém, de acordo com as imagens, observa-se uma cinética mais uniforme do que as primeiras amostras.

Para idealizar a quantidade relativa comparando uma amostra da outra, adotou-se o método de porcentagem, onde equiparamos a absorbância máxima da curva de calibração, sendo 100%, com valores adquiridos na liberação, dessa

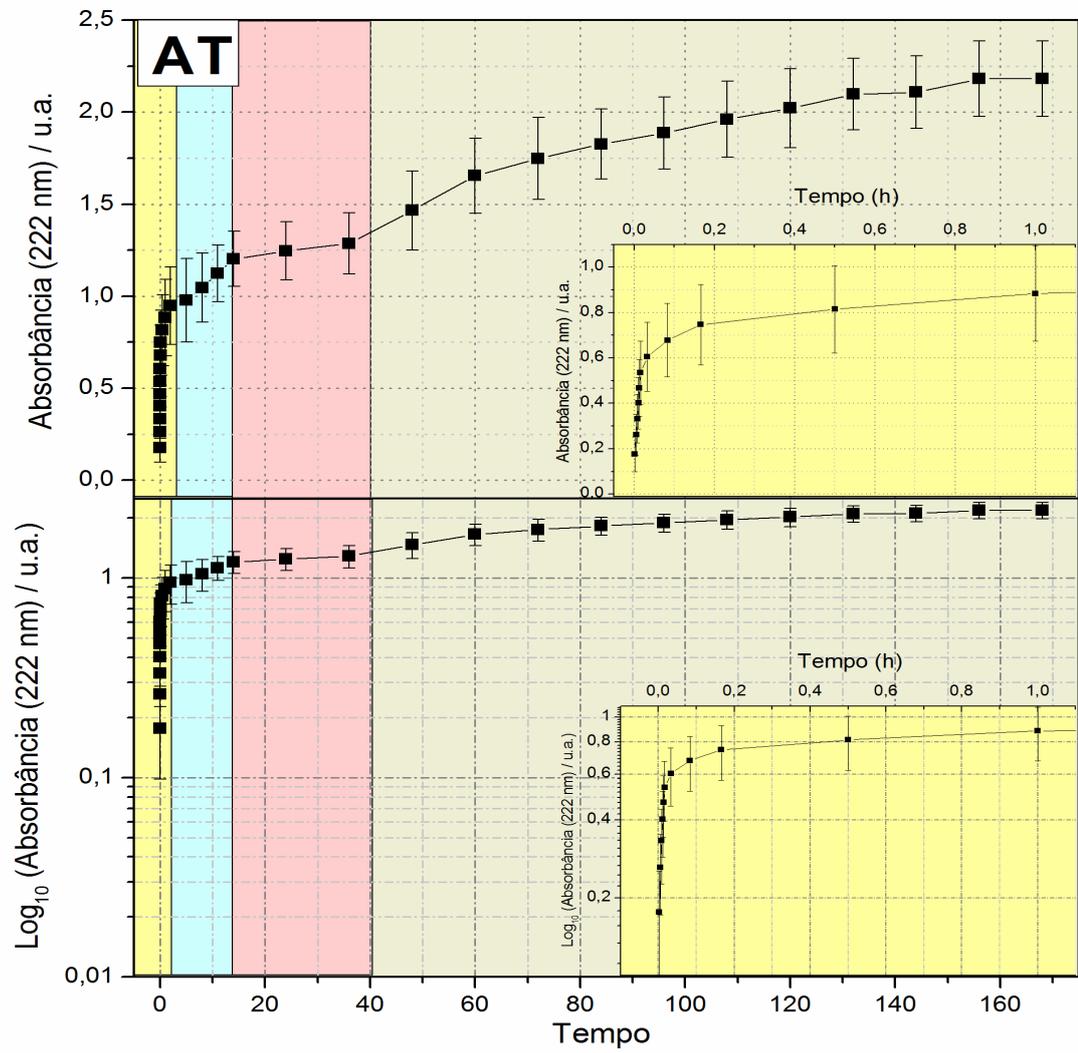
maneira, divide-se o valor de absorvância resultante da liberação com o valor de absorvância máxima da curva de calibração.

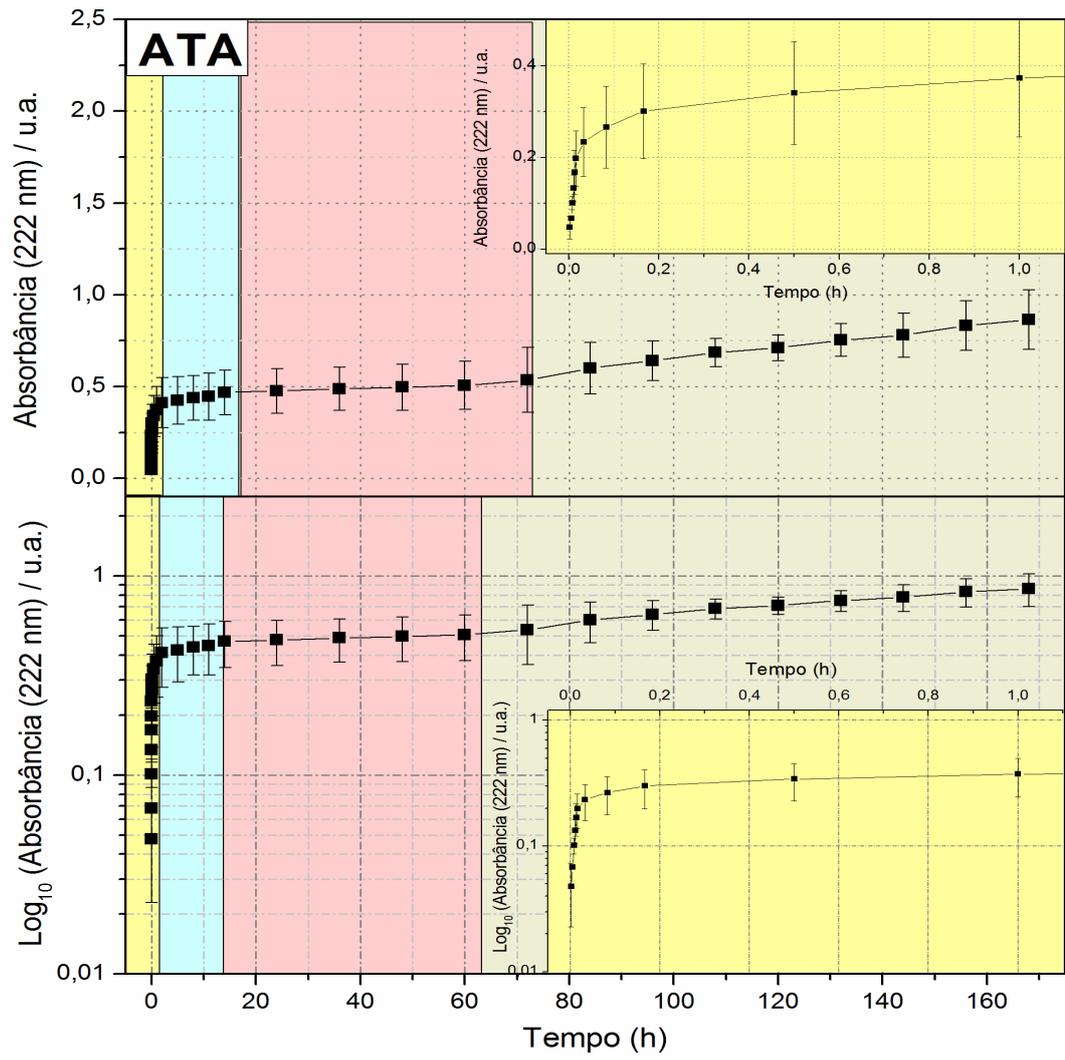
Em sequência, calcula-se que a porcentagem inicial já difere de uma amostra para outra, onde encontramos: 0,5% ; 1,82%; 6,71%, sendo respectivamente das amostras ATT, ATA e AT. Nota-se que o valor de liberação triplica entre ATT para ATA, e mais que triplica de ATA para AT. Da mesma forma com o valor do fim da análise, onde destaca-se que AT chega a 83,3%, já o ATA chega à 33% no período de 7 dias, que já é mais da metade de diferença em relação ao AT. Com tratamento térmico, observa-se uma liberação de 20,2%. Como esperado, os resultados confirmam que a modificação da superfície da camada nanotubular de TiO₂ tem impacto considerável sobre o perfil de liberação.

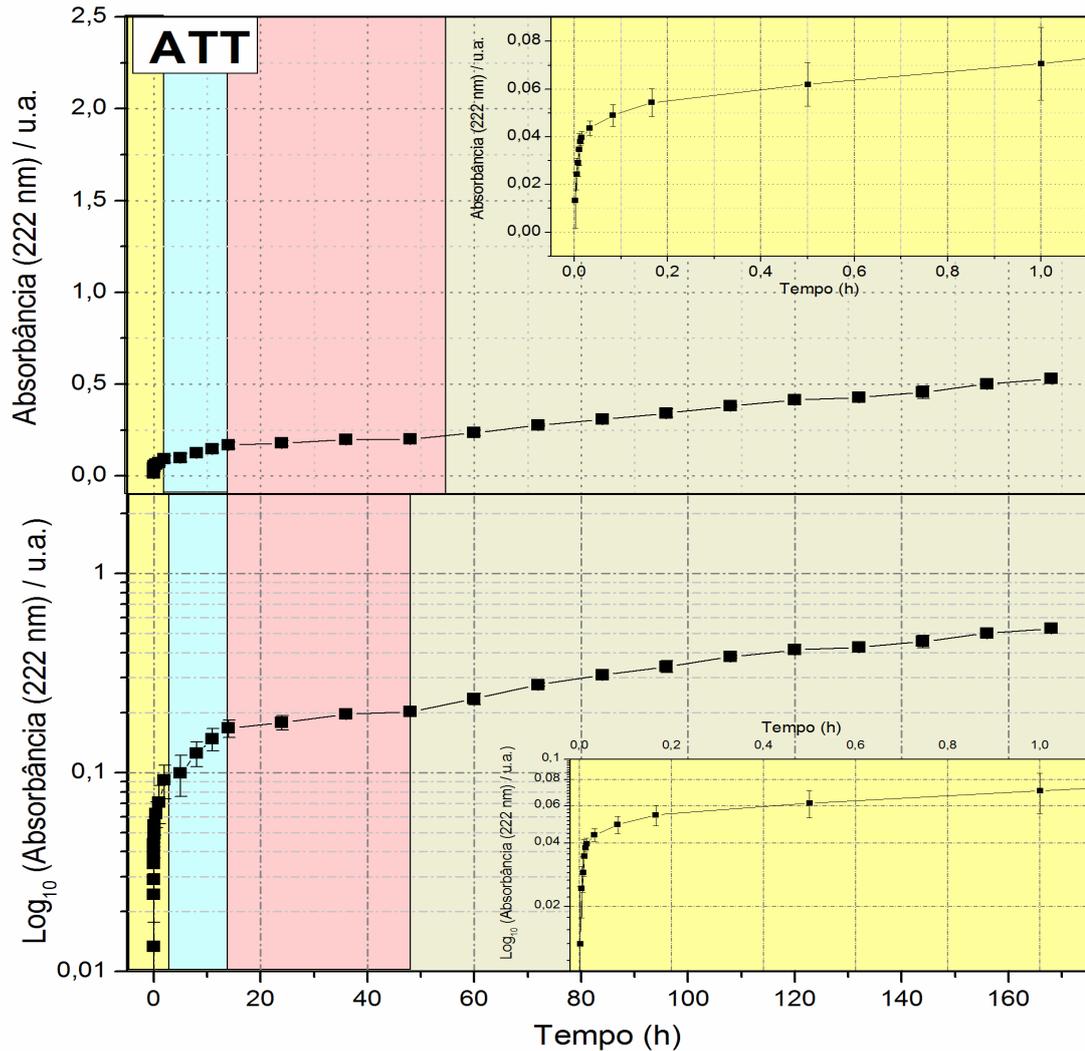
A quantidade de fármaco a ser liberado também pode comprometer quando muito material é inserido, pois além de haver desperdícios, pode causar toxicidade no local, e ainda pode impactar a integração óssea do implante, uma vez que pode inibir também componentes imprescindíveis para essa formação [54]. Assim, uma forma de poder controlar essas quantidades é com a modificação da superfície, como observa-se nos resultados, este pode ser aplicado então para melhorar o carregamento e liberação de drogas que quantifica e atrasa a cinética de liberação.

Losic, D; et.al. (2016) observaram um fator muito importante que é identificado em seu trabalho como liberação *burst*, que é a liberação inicial rápida, considerando o material que está na superfície e/ou que foi incorporado de forma superficial aos nanotubos. A figura 13 apresenta os gráficos de absorção versus concentração de Ibuprofeno para os três filmes analisados, AT, ATA e ATT. Na mesma figura é destacado o período da liberação, que em todas as amostras estão representados os primeiros 11 pontos ou o tempo de 1 hora de duração. Em ATT este valor é bem menor quando comparado a amostra AT, que é a amostra de Ti sem nenhuma modificação superficial, indicando que realmente o fármaco incorporou-se mais profundamente nas amostras com NT's do que na amostra AT, onde o fármaco ficou apenas disperso na superfície.

Figura 13 - Gráficos de absorção versus concentração para a liberação de ibuprofeno para as amostras AT, ATA e ATT, respectivamente.







Fonte: Autoria própria.

A partir os gráficos apresentados de liberação observou-se que o formato das curvas é parecido, entretanto a quantidade de liberação inicial é diferente. Nota-se uma consistência no aumento do período de buffer das amostras, que são considerados os 11 primeiros pontos. Neste caso, as concentrações analisadas em segundos, minutos, até 1 hora, indica um aumento gradativo de liberação que se dá no momento em que a amostra é imergida na solução, o que provavelmente é devido ao desprendimento de Ibuprofeno alocado entre os nanotubos e em sua superfície, portanto o que não incorporou profundamente na estrutura nanotubular. A partir deste ponto, há ainda um aumento significativo da liberação, porém já observa-se uma diferença na liberação, o que indica uma desaceleração, e isto consequentemente durante todo o período do estudo.

As cores diferenciadas do gráfico são referentes aos diferentes ângulos da curva, o que indica velocidades de liberação diferentes. No gráfico é possível compreender melhor essas fases, as amostras indicam 4 curvaturas diferentes durante o processo. Como já proposto, há uma sequência de liberação, onde o mesmo aumenta conforme o tempo, mais em alguns períodos, sua velocidade aumenta ou desacelera, chamando a atenção que na amostra AT, a partir do ponto de 14h até 36h a uma leve desaceleração, que a partir do 48h, há uma aceleração novamente, que permanece até o final; Este comportamento é observado em ATA também de inicia em 14h, mas se estende até 60h e a partir de 72h a velocidade se mantém. Em ATT, a desaceleração é em 14h até 48h, e a partir deste ponto a uma aceleração contínua de liberação.

As amostras estudadas neste trabalho tiveram uma análise de 7 dias, observa-se através das curvas que é necessário prolongar o tempo de análise para alcançar uma maior liberação do fármaco, ou seja, em 7 dias o método utilizado não permite a liberação de todo o fármaco.

Como as amostras ATT tem a liberação mais lenta, é indicado para tratamento com mais durabilidade (ultrapassando os 7 dias), porém com uma menor quantidade liberada no sistema. Já AT e ATA também podem ser aplicados em casos de uma administração do medicamento em média de 7 dias e em doses um pouco mais altas em comparação a ATT.

5 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o cultivo de nanotubos com as propriedades escolhidas foram alcançados, observados através da curva cronoamperométrica. Suas características se alteram conforme as etapas de tratamento, sendo polimento - anodização - tratamento térmico, havendo mudanças na molhabilidade (ângulos: AT $128,5^\circ \pm 0,8^\circ$ - ATA $78,3^\circ \pm 0,6^\circ$ - ATT $16,4^\circ \pm 0,8^\circ$) passando de hidrofóbico para hidrofílico.

Também é possível ver diferença nos diâmetros dos NT's (AT não apresenta - ATA $57,2\text{nm} \pm 13,1\text{nm}$ - ATT $54,2\text{nm} \pm 2,8\text{nm}$), essas alterações interferem no ângulo de contato, mas não foram significativas para a liberação, pois ainda estão dentro da faixa de análise

Na estrutura cristalina do material, analisou-se alteração conforme o tratamento térmico, que através dos picos identificados, observou que em AT e ATA há apenas Titânio, porém em ATT, obtemos a Anatase.

Os resultados do ensaio de liberação do ibuprofeno foram satisfatórios, a inserção do fármaco a partir do método *TopFilling* mostrou-se suficiente para o estudo deste projeto. A partir dos gráficos de liberação, observou que a diferença de velocidade entre as amostras

Na liberação, quando se compara os três tipos de amostras estudadas, é possível concluir que conforme as etapas de tratamento de superfície, ocorre um retardo na liberação do Ibuprofeno, onde se depara com resultados em 168h de: AT (20,2%), ATA (33%), e ATT (83,3%). Isso indica que a velocidade dessa liberação desacelera e acelera em alguns pontos, indicado na FIG. 13 por cores diferentes. O tratamento térmico mostra-se conveniente para uma liberação desacelerada, evitando toxicidade e desperdício, uma vez que induzir uma quantidade de fármaco muito maior do que o necessário possa produzir efeitos colaterais não desejados.

6 REFERÊNCIAS

- [1] H. Habazaki, K. Fushimi, K. Shimizu, P. Skeldon, G.E. Thompson, Fast migration of fluoride ions in growing anodic titanium oxide, 2007.
- [2] J. Huiying, I.K. Lei, Sustained Ibuprofen Release Using Composite Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)/Titanium Dioxide Nanotubes from Ti Implant Surface, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 2271–2280. <https://doi.org/10.1002/jps>.
- [3] C.G. Agreda, Tícp e liga Ti-13Nb-13Zr com diferentes tratamentos de superfície - teste in vitro e in vivo, *Inst. Pesqui. Energéticas e Nucl. São Paulo.* (2013) 8–30.
- [4] E. Dibek Misirlioglu, H. Guvenir, S. Bahceci, M. Haktanir Abul, D. Can, B.E. Usta Guc, M. Erkocoglu, M. Toyran, H.T. Nacaroglu, E. Civelek, B. Buyuktiryaki, T. Ginis, F. Orhan, C.N. Kocabas, Severe Cutaneous Adverse Drug Reactions in Pediatric Patients: A Multicenter Study, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 5 (2017) 757–763. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.02.013>.
- [5] R. Murugan, S. Ramakrishna, Development of nanocomposites for bone grafting, *Compos. Sci. Technol.* 65 (2005) 109–136.
- [6] D. Zhang, T. Yoshida, K. Furuta, H. Minoura, Hydrothermal preparation of porous nano-crystalline TiO₂ electro desorbable solar cells, *J. Photo Chem. Photobiol.* 3 (2004) 159–164.
- [7] S. Chavadej, P. Phuaphromyod, E. Gulari, P. Rangsunvigit, T. Sreethawong, Photo catalytic degradation of 2-propanol by using Pt/TiO₂ prepared by micro emulsion technique, *Chemical Engineering Journal.* 137 (2008) 489.
- [8] S. Daothong, N. Songmee, S. Thongtem, P. Singjai, Size-controlled growth of TiO₂ nanowires by oxidation of titanium substrates in the presence of ethanol vapor, *Scr. Mater.* 57 (2007) 567.
- [9] F. Trivinho-Strixino, J.S. Santos, M. Souza Sikora, 3 - Electrochemical Synthesis of Nanostructured Materials, in: A.L. Da Róz, M. Ferreira, F. de Lima Leite, O.N.B.T.-N. Oliveira (Eds.), William Andrew Publishing, 2017: pp. 53–103. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49782-4.00003-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49782-4.00003-6).
- [10] A.L. Doadrio, A. Conde, M.A. Arenas, J.M. Hernández-López, J.J. De Damborenea, C. Pérez-Jorge, J. Esteban, M. Vallet-Regí, Use of anodized

- titanium alloy as drug carrier: Ibuprofen as model of drug releasing, *Int. J. Pharm.* 492 (2015) 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.046>.
- [11] W. Feng, Z. Geng, Z. Li, Z. Cui, S. Zhu, Y. Liang, Y. Liu, R. Wang, X. Yang, Controlled release behaviour and antibacterial effects of antibiotic-loaded titania nanotubes, *Mater. Sci. Eng. C.* 62 (2016) 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.046>.
- [12] K.C. Popat, M. Eltgroth, T.J. LaTempa, C.A. Grimes, T.A. Desai, Decreased *Staphylococcus epidermis* adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes, *Biomaterials.* 28 (2007) 4880–4888. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.037>.
- [13] M.A.M. De Lyra, J.L. Soares-Sobrinho, M.T. Brasileiro, M.F. De La Roca, J.A. Barraza, O.D.S. Viana, P.J. Rolim-Neto, Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos, *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (2007) 784–793.
- [14] M. Jin, S. Yao, L. Wang, Y. Qiao, A.A. Volinsky, Enhanced bond strength and bioactivity of interconnected 3D TiO₂ nanoporous layer on titanium implants, *Surface and Coatings Technology* (2016) 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.05.038>.
- [15] M. Browne, P.J. Gregson, Metal ion release from wear particles produced by Ti-6Al-4V and Co-Cr alloy surfaces articulating against bone, *Mater. Lett.* 24 (1995) 1–6. [https://doi.org/10.1016/0167-577X\(95\)00082-8](https://doi.org/10.1016/0167-577X(95)00082-8).
- [16] M.P. Staiger, A.M. Pietak, J. Huadmai, G. Dias, Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review, *Biomaterials.* 27 (2006) 1728–1734. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.003>.
- [17] R.J. Tayade, V. Gandhi, Photocatalytic Nanomaterials for Environmental Applications, *Mater. Res. Forum LLC.* 27 (2018) 486.
- [18] C.H. Ferreira, Desenvolvimento de biomateriais para liberação de fármacos a base de titânio e colágeno, Pato Branco, PR, 2019.
- [19] M.T. Mohammed, Z.A. Khan, A.N. Siddiquee, Surface Modifications of Titanium Materials for developing Corrosion Behavior in Human Body Environment: A Review, *Procedia Mater. Sci.* 6 (2014) 1610–1618. <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2014.07.144>.

- [20] A.P. Simon, M., S. Sikora, Eletrólito para síntese eletroquímica de biomateriais a base de titânio, 2018.
- [21] S.A. Fadl- Allah, Q. Mohsen, Characterization of native and anodic oxide films formed on commercial pure titanium using electrochemical properties and morphology techniques, *Appl. Surf. Sci.* Elsevier B.V. 256 (2010) 5849–5855.
- [22] M. Fathi, B. Akbari, A. Taheriazam, Antibiotics drug release controlling and osteoblast adhesion from Titania nanotubes arrays using silk fibroin coating, *Mater. Sci. Eng. C.* 103 (2019) 109743. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109743>.
- [23] M.F. Kunrath, R. Hubler, R.S.A. Shinkai, E.R. Teixeira., Application of TiO₂ Nanotubes as a Drug Delivery System for Biomedical Implants: A Critical Overview, *Chemistry Select.* 3 (2018) 11180–11189. <https://doi.org/10.1002/slct.201801459>.
- [24] A. Santos, M. Sinn Aw, M. Bariana, T. Kumeria, Y. Wang, D. Losic, Drug-releasing implants: current progress, challenges and perspectives, *J. Mater. Chem. B.* 2 (2014) 6157–6182. <https://doi.org/10.1039/C4TB00548A>.
- [25] V.M. Frauchiger, F. Schlottig, B. Gasser, M. Textor, Anodic plasma-chemical treatment of CP titanium surfaces for biomedical applications, *Biomaterials.* 25 (2004) 593–606. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00560-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00560-X).
- [26] A.M.M. Jani, H. Yazid, A.S. Habiballah, A.H. Mahmud, D. Losic, Soft and Hard Surface Manipulation of Nanoporous Anodic Aluminum Oxide (AAO) BT - Nanoporous Alumina: Fabrication, Structure, Properties and Applications, in: D. Losic, A. Santos (Eds.), Springer International Publishing, Cham, 2015: pp. 155–184. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20334-8_5.
- [27] G. Jeon, S.Y. Yang, J. Byun, J.K. Kim, Electrically Actuatable Smart Nanoporous Membrane for Pulsatile Drug Release, *Nano Lett.* 11 (2011) 1284–1288. <https://doi.org/10.1021/nl104329y>.
- [28] E. Gultepe, D. Nagesha, S. Sridhar, M. Amiji, Nanoporous inorganic membranes or coatings for sustained drug delivery in implantable devices, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 305–315. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.003>.
- [29] E.J. Anglin, L. Cheng, W.R. Freeman, M.J. Sailor, Porous silicon in drug

- delivery devices and materials, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1266–1277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.017>.
- [30] D. Losic, M.A. Cole, B. Dollmann, K. Vasilev, H.J. Griesser, Surface modification of nanoporous alumina membranes by plasma polymerization, *Nanotechnology*. 19 (2008) 245704. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/24/245704>.
- [31] A.P. Simon, C.H. Ferreira, A. Rodrigues, J.S. Santos, F.T. Strixino, P.T. Marques, H.E.Z. Junior, M. d. S. Sikora, *TiO₂NT as Platform for Drug Release: The Effect of Film Wettability*, 2019.
- [32] A.P. Simon, V.A.Q. Santos, A. Rodrigues, J.S. Santos, F. Trivinho-Strixino, B.L. Pereira, C.M. Lepienski, M. de S. Sikora, Enhancement of Mechanical Properties and Wettability of TiO₂NT Arrays Formed in Simulated Body Fluid-Based Electrolyte, *Adv. Eng. Mater.* 21 (2019) 1900813. <https://doi.org/10.1002/adem.201900813>.
- [33] C.H. Ferreira, A.P. Simon, V.A.Q. Santos, A. Rodrigues, J.S. Santos, F. Trivinho-Strixino, P.T. Marques, M.D.S. Sikora, Nanotexturization of Ti-based implants in simulated body fluid: Influence of synthesis parameters on coating properties and kinetics of drug release, *J. Mater. Res.* 34 (2019) 2828–2836. <https://doi.org/10.1557/jmr.2019.216>.
- [34] R. Lakes, Materials with structural hierarchy, *Nature*. 361 (1993) 511–515.
- [35] D. Regonini, C.R. Bowen, A. Jaroenworarluck, R. Stevens, A review of growth mechanism , structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes, *Mater. Sci. Eng. R.* 74 (2013) 377–406. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2013.10.001>.
- [36] P. Heinl, L. Müller, C. Körner, R.F. Singer, F.A. Müller, Cellular Ti-6Al-4V structures with interconnected macro porosity for bone implants fabricated by selective electron beam melting, *Acta Biomater.* 4 (2008) 1536–1544. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.03.013>.
- [37] M. Lin, H. Wu, W.C. Xiong, To build a synapse: Signaling pathways in neuromuscular junction assembly, *Development*. 137 (2010) 1017–1033. <https://doi.org/10.1242/dev.038711>.
- [38] T. Kokubo, H. Kim, M. Kawashita, Novel bioactive materials with different mechanical properties, *Biomaterials*. 24 (2003) 2161–2175.

- [39] A.P. Simon, Modificação anódica de implantes a base de titânio e estudo de sua utilização como plataforma para liberação de fármacos, 2019. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [40] U.F. Gunpath, H. Le, R.D. Handy, C. Tredwin, Anodised TiO₂ nanotubes as a scaffold for antibacterial silver nanoparticles on titanium implants, *Mater. Sci. Eng. C*. 91 (2018) 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.074>.
- [41] H. Zhang, X. Huang, Z. Zeng, Metal dichalcogenide nanosheets: Preparation, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 1934–1946. <https://doi.org/10.1039/c2cs35387c>.
- [42] S. Bauer, P. Schmuki, K. Von Der Mark, J. Park, Progress in Materials Science Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces, *Prog. Mater. Sci.* 58 (2013) 261–326. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2012.09.001>.
- [43] E. Gongadze, D. Kabaso, S. Bauer, T. Slivnik, P. Schmuki, U. van Rienen, A. Iglic, Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface, *Int. J. Nanomedicine*. 6 (2011) 1801–1816.
- [44] N. Rajgor, M. Patel, B. Vh, M.P.P. College, N.P. College, S.P.S. Vidhyadham, Implantable Drug Delivery Systems: An Overview, *Surg. Neurol. Int.* (2011) 91–95. <https://doi.org/10.4103/0975-8453.86297>.
- [45] J.M. Unagolla, A.C. Jayasuriya, Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system, *Eur. J. Pharm. Sci.* 114 (2018) 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.012>.
- [46] M. Ferreira, L. Pradela Filho, A. Santos, R. Takeuchi, R. Assunção, Avaliação Do Perfil De Liberação Do Fármaco Ibuprofeno Em Membranas Simétricas E Assimétricas De Acetato De Celulose: Efeito Da Morfologia, *Quim. Nova*. 42 (2019) 823–830. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170409>.
- [47] A. Pawlik, M. Jarosz, K. Syrek, G.D. Sulka, Co-delivery of ibuprofen and gentamicin from nanoporous anodic titanium dioxide layers, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 152 (2017) 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.011>.
- [48] A. Pawlik, R.P. Socha, M. Hubalek Kalbacova, G.D. Sulka, Surface

- modification of nanoporous anodic titanium dioxide layers for drug delivery systems and enhanced SAOS-2 cell response, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 171 (2018) 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.012>.
- [49] P.. Campos, Desenvolvimento de filmes nanoestruturados layer-by-layer com foco em sistemas de materiais sensíveis a estímulos, 2018.
- [50] J.M. Macak, H. Tsuchiya, P. Schmuki, High-Aspect-Ratio TiO₂ Nanotubes by Anodization of Titanium**, in: *Communications*, 2005: pp. 2100–2102. <https://doi.org/10.1002/anie.200462459>.
- [51] K.L. Menzies, L. Jones, The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials, *Optom. Vis. Sci.* 87 (2010) 387–399.
- [52] M.T. Mohammed, Z.A. Khan, A.N. Siddiquee, Surface Modifications of Titanium Materials for developing Corrosion Behavior in Human Body Environment: A Review. *Procedia Materials Science, Int. Conf. Mater.* 6 (2014) 1610–1618.
- [53] J.M. Macak, H. Tsuchiya, A. Ghicov, K. Yasuda, R. Hahn, S. Bauer, P. Schmuki, TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 11 (2007) 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2007.08.004>.
- [54] D. Losic, X.L. Guo, M. Kuang, F. Li, X.Y. Liu, Z.Y. Xin, F. Dong, Engineering of three dimensional (3-D) diatom TiO₂-MnO₂ composites with enhanced supercapacitor performance, *Electrochim. Acta.* 190 (2016) 159–167.