

LIBERAÇÃO CONTROLADA DE METRONIDAZOL ATRAVÉS DE FILMES DE PVA SOBRE UM SUBSTRATO NANOESTRUTURADO DE TITÂNIO

Pierluigi Piccolo Raso

Projeto de Graduação apresentado ao Curso de Engenharia de Materiais da Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Engenheiro de Materiais.

Orientadora: Paula Mendes Jardim Co-orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Rio de Janeiro Dezembro de 2019

LIBERAÇÃO CONTROLADA DE METRONIDAZOL ATRAVÉS DE FILMES DE PVA SOBRE UM SUBSTRATO NANOESTRUTURADO DE TITÂNIO

Pierluigi Piccolo Raso

PROJETO DE GRADUAÇÃO SUBMETIDO AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS DA ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE **ENGENHEIRO DE MATERIAIS**

Aprovada por:

Prof[®]. Paula Mendes Jardim, D.Sc.

Rinsmilling

Prof^a. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D.Sc.

Prof^a. Renata Antoun Simão, D.Sc.

Juliana de morimento Bunz Dra. Juliana do Nascimento Lunz, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL **DEZEMBRO DE 2019**

Piccolo Raso, Pierluigi

Liberação controlada de metronidazol através de filmes de PVA sobre um substrato nanoestruturado de titânio – Pierluigi Piccolo Raso – Rio de Janeiro: UFRJ/ Escola Politécnica, 2019.

VIII, 48 p.: il; 29,7 cm.

Orientadoras: Paula Mendes Jardim

Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Projeto de graduação – UFRJ/Escola

Politécnica/Engenharia de Materiais, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 44-48.

1. Biomateriais. 2. Nanoestrutura. 3. Implante de Ti.

4. Liberação de fármaco. I. Jardim, Paula Mendes *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Engenharia de Materiais. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais e à minha família, por todo o amor e acompanhamento humano que me deram. Agradeço por terem me permitido seguir desde pequeno uma educação que hoje me possibilita fazer uma análise crítica mínima da sociedade ao redor e por terem provido por ela.

Agradeço a todos os meus professores, mentores e disseminadores do conhecimento em todos os níveis de educação que genuinamente me mostraram o caminho, tenha sido na educação cotidiana ou no ensino formal, desde o estudo mais básico até o ensino superior.

Agradeço ao Marllon e à Marina, que me acompanharam psicologicamente e efetivamente me fizeram desenvolver entendimento e forças para encarar alguns dos meus maiores medos.

Agradeço também a todas as pessoas que constroem e possibilitam a universidade pública, em todos os cargos e níveis hierárquicos, todos os dias.

Agradeço às minhas professoras orientadoras, por terem possibilitado a realização deste trabalho. Agradeço à Juliana, Isabela e Aline por terem me acompanhado nesse projeto e dividido comigo as incertezas, dúvidas e conclusões a que chegamos.

Agradeço à minha namorada Natalie por ter me apoiado e ter sido minha parceira em todos os momentos. Agradeço a amizade de todos os meus amigos :) Fernanda, Yuush, Juan, Henrique, Daniel, Thiago, Clarissa, Otávio, Victor, Karol, Aninha, Müller, Alan, Castor, John; à eterna galera da Metalmat e demais companheiros de UFRJ e companhia, Marcus, Breno, Ruan, Camillinha, Anderson, Gabrielzim, Léo, Eliza, Ana, Antônio, Fernanda, Filipe, Olavo, Felipe, Cenoura, Erick, Erik, Aloízio, Catatau, Leandrão, Débora, Thamy, Larissa, Bruna, Juliana, Bruno, Miguel, Ian, Heitor, Pedro, Renato e os Pedros; ao povo de Aachen, Fernando, Gabi, Cadu, Cacau, Alex, Breno, Lucas, Davi, Bruno, Eric, Leon, Vanessa e Gabriela; agradeço à galera da GDP, do Coral e da Escola de Música, que reavivaram a minha alma.

Resumo do Projeto de Graduação apresentado ao DEMM/EP/UFRJ como parte integrante dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheiro de Materiais

LIBERAÇÃO CONTROLADA DE METRONIDAZOL ATRAVÉS DE FILMES DE PVA SOBRE UM SUBSTRATO NANOESTRUTURADO DE TITÂNIO

Pierluigi Piccolo Raso

Dezembro/2019

Orientadoras: Paula Mendes Jardim e Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Curso: Engenharia de Materiais

A administração sistêmica e os tratamentos cirúrgicos são as maneiras mais utilizadas para se tratar a peri-implantite. No entanto, o tratamento pode ser feito mais eficiente caso se utilize de sistemas de entrega de fármaco, garantindo a assepsia mais eficiente do sítio de implantação, reduzindo a dispersão do fármaco no corpo e permitindo um controle mais fino da dose do fármaco. Também é favorável o uso de tratamentos superficiais nos implantes, de modo a se promover uma melhor osseointegração. O tratamento hidrotérmico do óxido de titânio possibilita a criação de nanoestruturas que privilegiam o desenvolvimento ósseo. O PVA é um polímero biocompatível e biodegradável que pode ser usado como uma barreira física para o controle de liberação de fármaco. O antibiótico metronidazol é um fármaco utilizado para o tratamento da infecção ao redor do implante devido à sua ação contra micro-organismos anaeróbios, presentes neste tipo de quadro clínico. Neste trabalho foi desenvolvido um dispositivo de liberação local baseado em titânio com superfícies bioativas para a aplicação em implantes dentários. Foram produzidas membranas de PVA puro e com metronidazol através de evaporação de solvente, posteriormente submetidas a radiação gama a taxas de 5, 15 e 25 kGy. Foram produzidos também discos de titânio que foram submetidos a tratamento hidrotérmico pela imersão em 200 ml de uma solução aquosa de NaOH 3M em um reator a 150°C por 6 horas; sua superfície nanoestruturada foi então gotejada com 200 µl de solução de metronidazol 5 mg/ml, recoberta com PVA através da técnica de spin coating e posteriormente irradiada a uma taxa de 25 kGy. Tanto os discos quanto as membranas com fármaco foram submetidos a ensaios de liberação; os discos em especial foram analisados através de microscopia eletrônica (MEV e HIM), difração de raios-X e verificação do ângulo de contato. As membranas de PVA puro passaram por um ensaio de inchamento. A taxa de liberação das amostras se estabilizou em torno das primeiras duas horas de ensaio; foi atestada a hidrofilicidade da superfície dos discos.

Abstract of Undergraduate Project presented to DEMM/POLI/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Materials Engineer.

CONTROLLED RELEASE BEHAVIOUR OF A PVA COATED NANOSTRUCTURED TATINIUM SUBSTRATE LOADED WITH METRONIDAZOLE

Pierluigi Piccolo Raso

December/2019

Advisors: Paula Mendes Jardim and Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Course: Materials Engineering

Systemic administration and surgery are the main treatments for periimplantitis. However, there are more efficient alternatives: treatment can be done by drug delivery, which keeps the implantation site directly clean, reduces drug dispersion in the body and allows for finer control of the dosis. It is also possible to use surface treatment to favour a better osseointegration with hydrothermal treatment, which creates nanostructures that boost bone growth. PVA is a biocompatible and biodegradable polymer that can be used as a physical barrier to the controlled release of a drug. Metronidazole is a drug administered in infections around implants due to its effectiveness against anaerobic microorganisms, which are the main cause of peri-implantitis. In this study, a device for local release in dental implants was developed based on titanium with bioactive surfaces. PVA membranes both pure and loaded with metronidazole were produced through casting and irradiated with gamma radiation with 5, 15 e 25 kGy. Titanium discs were cut and went through hydrothermal treatment in a 200 ml NaOH 3M aqueous solution in a reactor under 150°C during 6 hours. 200 µl of metronidazole 5 mg/ml were added to its surface by pipette. The discs then underwent a spin coating of PVA and gamma irradiation with 25 kGy. Release tests were done on the discs and the metronidazole-loaded membranes. Electron microscopy (SEM and HIM), X-ray diffraction and contact angle measurement were also done on the discs. Swelling tests were done on the PVA membranes without metronidazole. The release rate of the samples stabilized after around two hours. The surface of the discs displayed high levels of hydrophilicity.

Sumário

1 Introdução	1
2 Revisão da literatura	2
2.1 Implantologia e osseointegração	2
2.1.1 Histórico da implantologia	2
2.1.2 O fenômeno da osseointegração	3
2.1.3 Falha do implante	5
2.2 Biomateriais	6
2.3 Titânio	7
2.3.1 Titânio elementar e comercialmente puro	7
2.3.2 Tratamentos superficiais	10
2.4 Poli(álcool vinílico) (PVA)	11
2.5 Metronidazol	14
2.6 Entrega de Fármaco (Drug delivery) e liberação controla	ada 15
3 Materiais e Métodos	17
3.1 Membranas poliméricas	
3.2 Tratamento superficial e recobrimento de discos de Ti	19
3.2.1 Tratamento superficial	19
3.2.2 Recobrimento	19
3.3 Reticulação	
3.3.1 Irradiação	
3.3.2 Criogelificação	21
3.4 Caracterização	21
3.4.1 Construção da curva padrão do metronidazol	
3.4.2 Ensaios de liberação	
3.4.3 Ensaio de inchamento	24
3.4.4 Microscopia	24
3.4.5 Ângulo de Contato	24
3.4.6 Difração de Raios-X	25
4 Resultados e Discussão	
4.1 Análise microestrutural	
4.2 Ângulo de contato	
4.3 Ensaio de liberação das membranas de PVA	
4.3.1 Curva Padrão	30

	4.3.2	? Resultados da liberação das membranas de PVA	32
4	4.4 E	nsaio de inchamento das membranas de PVA	33
4	4.5 E	nsaio de liberação dos discos de titânio	34
4	4.6 A	nálise morfológica	37
5	Conc	usão	41
6	Suge	stões para trabalhos futuros	43
7	Refer	ências	44

Capítulo 1

1 Introdução

A ocorrência de infecções ao redor de implantes dentários (peri-implantite) e a falha de ancoragem completa no osso (osseointegração) são duas das causas principais do insucesso da sobrevivência de um implante. Administração sistêmica de antibióticos e procedimentos cirúrgicos constituem a prática estabelecida no tratamento das falhas de implantação; no entanto, com o intuito de tornar os tratamentos mais eficientes e menos invasivos, dada a importância médica e estética dos implantes dentários, faz-se necessário progredir a pesquisa na área. [1]

Respostas possíveis para essas demandas são, respectivamente, a utilização de sistemas de entrega de fármaco (*drug delivery*), para garantir a assepsia mais eficiente do sítio de implantação e a eliminação da necessidade de se dispersar a droga por outras partes do corpo [2], e o tratamento superficial do implante, capaz de compatibilizar de maneira melhor a superfície deste com o crescimento do tecido conjuntivo/ósseo sobre ele, tornando a ancoragem do implante mais segura e melhor integrada com o osso. [3]

Neste trabalho, foi realizada uma análise da literatura e decidiu-se por testar a nanoestruturação do titânio através da síntese hidrotérmica como alternativa para o tratamento superficial e compatibilização da superfície do implante. Para a entrega de fármaco, será estudada a liberação controlada de um sistema de difusão do antibiótico metronidazol, adsorvido às nanoestruturas da superfície do implante, difundido através de um recobrimento superficial biodegradável de poli(álcool vinílico) (PVA).

Capítulo 2

2 Revisão da literatura

2.1 Implantologia e osseointegração

2.1.1 Histórico da implantologia

Denomina-se implantologia a área da medicina dentária dedicada à colocação de implantes dentários, tendo o paciente perdido um ou mais dentes. Historicamente, essa é uma área de conhecimento muito antiga da humanidade, com evidência arqueológica do uso propriamente dito dos primeiros implantes em 600 D.C. pela civilização Maia [4].

A história dos desenvolvimentos mais recentes da implantologia se deve muito ao trabalho do professor sueco Per-Ingvar Brånemark. Durante os anos de 1950 e 1960, com o fim de estudar a formação de vasos sanguíneos na medula de tíbias de modelos *in vivo* e observar o fenômeno da microcirculação sanguínea, ele utilizou micro-câmeras encapsuladas em titânio, que deveriam ser posteriormente removidas do osso. No entanto, ele observou extrema dificuldade na remoção desses aparelhos, o que o levou a investigar a evidência e à subsequente descoberta do fenômeno da osseointegração, que proporcionaria o desenvolvimento das próteses e implantes dentários atuais como nós os conhecemos [5, 6].



Figura 1 - Diferentes modelos de implantes dentários e suas respectivas marcas. [7]

2.1.2 O fenômeno da osseointegração

É possível definir o fenômeno da osseointegração como "a ancoragem direta de um implante através da formação de tecido ósseo ao seu redor sem que haja a formação de tecido fibroso na interface osso-implante". [1]

Para melhor compreensão do processo bioquímico da osseointegração, é necessário separá-lo em três partes distintas: os fenômenos da osteocondução, da neoformação e da remodelação óssea. [8]

No momento de sua instalação, a superfície do implante de titânio entra em contato imediato com o coágulo e as células sanguíneas do sítio de implantação, de modo que as primeiras interações superficiais se dão com essas células, e não com as células ósseas. Decorrente desse primeiro contato e da coagulação do sangue, é formada uma rede de fibrina em torno da superfície do implante; a fibrina é uma proteína que desempenha o papel de resposta imediata à presença de ferimentos no corpo humano, proporcionando a formação de uma malha fina ao redor da lesão que age como matriz provisória para a recuperação e crescimento celular.

Dessa maneira, o primeiro contato das células ósseas se dá com essa camada, e não diretamente com o metal do implante.

A primeira fase da osseointegração, a osteocondução, ocorre justamente quando células osteogênicas, que darão origem ao tecido ósseo, migram para o interior da rede de fibrina. Após o quarto dia posterior à implantação, começa a

ocorrer o estabelecimento do tecido conjuntivo na superfície do implante, que mais tarde servirá de guia para a formação óssea propriamente dita.

Em seguida, em torno da primeira semana após a implantação, tem início a fase da neoformação óssea. Nessa etapa, as células osteogênicas secretam uma matriz orgânica inicialmente sem colágeno, que é uma proteína fundamental para conferir as propriedades mecânicas à matriz extracelular do tecido conjuntivo. Essa matriz proporciona o desenvolvimento do processo de mineralização do osso, fornecendo sítios para a nucleação de fosfato de cálcio e formação do tecido ósseo propriamente dito, com a subsequente formação também do colágeno.

Entre a 8^a e 12^a semanas, ocorre a terceira fase, a da remodelação óssea. Essa fase se caracteriza pela condensação do tecido ósseo em torno do implante e é determinante para a sua estabilidade a longo prazo.

A modificação e adaptação da qualidade da superfície dos implantes podem ser consideradas como alguns dos fatores mais importantes para que ocorra um processo bem sucedido de osseointegração; elas influenciam diretamente na quantidade de área superficial do implante e na capacidade de ancoragem das células à sua superfície, sendo determinantes, portanto, para sua falha ou seu sucesso [5].

Estudos mostram que a hidrofilicidade e a rugosidade da superfície do implante, em escala micro e nanoscópica, ampliam a capacidade de osseointegração e promovem a proliferação celular [5, 9]. Como a escala das células osteoblásticas, das proteínas e elementos que permeiam seus arredores é a mesma dessas rugosidades, adaptar sua superfície nessa escala possibilita a criação de superfícies que promovam a adesão de maiores quantidades dessas proteínas e de outros elementos mediadores do crescimento e diferenciação celular; superfícies hidrofílicas contribuem de maneira semelhante, atraindo e retendo essas proteínas.

2.1.3 Falha do implante

Denomina-se falha do implante a situação em que ele deixa de ser capaz de exercer sua função acima de um nível mínimo aceitável, fato determinado através de uma medição quantitativa de parâmetros que reflitam se os objetivos do implante foram alcançados [10]; as falhas dos implantes podem ser divididas em duas categorias principais: biomecânicas e biológicas. [1]

As falhas biomecânicas ocorrem devido à sobrecarga na interface osso/implante através de hábitos como o ranger dos dentes e o bruxismo (contração involuntária da mandíbula e aperto dos dentes durante o sono) ou de impactos mecânicos no implante ou na mandíbula. Já as falhas biológicas ocorrem associadas à infecção da região do entorno no implante, denominada periimplantite, que pode ser causada pela acumulação da placa bacteriana ou de outras infecções microbianas.

As falhas biológicas podem ser classificadas em primárias e secundárias. As falhas primárias ocorrem nos estágios iniciais da implantação, quando ainda não houve carregamento (antes do posicionamento da prótese) e enquanto o processo de osseointegração ainda não foi completamente concluído, e são decorrentes de infecções dentais resultantes de contaminação durante o procedimento cirúrgico ou de recuperação debilitada do paciente; já as falhas secundárias se dão quando a osseointegração já foi concluída, geralmente após o primeiro ano de vida útil do implante, sendo decorrentes de infecções relacionadas ao acúmulo da placa bacteriana. [10]

Devido ao escopo deste trabalho, este estudo concentra sua atenção nas falhas biológicas ditas iniciais. A relação da peri-implantite com o antibiótico a ser utilizado será melhor detalhada na seção 2.5 do trabalho.

2.2 Biomateriais

Uma das definições mais difundidas do conceito de Biomateriais é a apresentada pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NHI), que os descreve como "qualquer substância ou combinação de substâncias de origem sintética ou natural, que não sejam drogas ou fármacos, que possam ser utilizadas durante qualquer período de tempo, que aumentem ou substituam parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo humano, com o objetivo de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo".[11] São, sucintamente, materiais capazes de substituir tecidos humanos ou complementar suas funções.

Espera-se, portanto, que ao entrar em contato com o ambiente do corpo humano, tal material seja projetado para provocar o mínimo de impacto negativo na saúde do paciente. Dessa maneira, é possível classificar os biomateriais quanto à sua interação com o corpo humano em três grupos principais: biomateriais que sejam biocompatíveis, bioinertes ou bioativos.

Os materiais biocompatíveis são aqueles que, ao entrar em contato com o ambiente corporal, não acarretam nenhuma reação adversa, porém ainda são percebidos pelo sistema como um corpo estranho que, quando implantado, busca isolá-lo, envolvendo-o em uma capa de tecido fibroso, conjuntivo. A formação desse tecido é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão, entre outros por parte do material; a maioria dos metais se enquadra nesse grupo.

Já os materiais bioinertes são aqueles que não reagem bioquimicamente com o tecido ao redor. Isso ocorre porque tais materiais ou liberam uma quantidade muito pequena dos componentes supracitados ou mesmo nenhuma. Mesmo assim, ainda há formação da capa de tecido fibroso, de modo que as células do tecido lesado ao redor do implante não são diretamente substituídas por células com a mesma função, e sim por células do tecido conjuntivo. [12, 13] Apesar de não reagirem quimicamente com o ambiente corporal, é importante ressaltar que o crescimento celular diretamente sobre a superfície desse tipo de biomaterial é possível e ocorre por meio de vínculos físicos das células. Exemplos desse grupo são alguns cerâmicos, como a alumina, a zircônia, o carbono, e o próprio titânio, cuja aplicação será abordada nesse trabalho, além de algumas de suas ligas.

Por último, os materiais bioativos são aqueles que, além de não ocasionarem nenhuma reação adversa do corpo humano, são capazes de se ligar quimicamente aos tecidos ao redor, promovendo ativamente o crescimento celular em suas superfícies. Exemplos de materiais bioativos são o fosfato de cálcio, a hidroxiapatita e cerâmicas vítreas baseadas em fosfato de cálcio. [9] No contexto da implantologia, são esses os materiais que promovem a osseointegração efetiva de um implante.

Além das propriedades decorrentes dessa classificação, é necessário que os biomateriais possuam boa adesão ao tecido adjacente, de modo a atuarem como uma extensão desse, que sejam esterilizáveis e que possuam boa estabilidade química e mecânica para evitar qualquer tipo de resposta alérgica ou inflamatória ou que possa acarretar a perda de suas funções ou até mesmo a rejeição do material. [1]

2.3 Titânio

2.3.1 Titânio elementar e comercialmente puro

Titânio é o 22º elemento da tabela periódica, pertence à família 4B, sendo portanto um metal de transição, e seu símbolo químico é Ti. Sua massa atômica é 47,867 g/mol e sua densidade à temperatura ambiente é 4,54 g/cm³. A condições normais de temperatura e pressão, sua estrutura cristalina é a hexagonal compacta (fase α , HC). Porém, quando aquecido à pressão atmosférica, ocorre uma transformação de fase alotrópica à temperatura de 882,5°C, em que o titânio assume a estrutura cristalina cúbica de corpo centrado (fase β , CCC). Por ser um metal de transição, ele possui valência variável; isso acontece pois metais de transição possuem orbitais eletrônicos d incompletos, cujas energias são muito próximas às dos orbitais s, de modo que há a opção de se perder elétrons de ambas as camadas. [5]

Do ponto de vista da implantologia, o titânio é um material extremamente vantajoso devido ao fato de ser 40% menos denso que o aço comum porém possuir um alto limite de resistência à tração, variando entre 240 e 550 MPa dependendo do grau do titânio comercialmente puro. Seu módulo de elasticidade é compatível ao do

osso humano, o que proporciona uma distribuição mais equilibrada da carga na interface implante-osso em comparação a outros materiais metálicos. Além disso, é um elemento muito reativo, o que faz com que haja a formação muito rápida de uma camada passivadora de óxido (TiO₂) sobre sua superfície; tal óxido possui alta adesão à superfície do titânio, o que confere ao material alta resistência à corrosão e o torna quimicamente inerte. Essa propriedade é justamente o que o faz um material bioinerte, como discutido na seção 2.2. [5]

Além das suas aplicações biomédicas, o titânio começou a ser produzido inicialmente em larga escala no contexto histórico da corrida armamentista e espacial durante a Guerra Fria, na década de 1950, devido à demanda da indústria aeroespacial por materiais mais leves que o aço e mais resistentes à temperatura do que as ligas de alumínio; por possuir um alto ponto de fusão, 1668°C, ele é capaz de suportar temperaturas de até 600°C, mantendo sua estabilidade microestrutural. [5, 14]

O Titânio comercializado sem elementos de liga é disponível em duas formas: titânio de alta pureza e titânio comercialmente puro, ambos possuindo diferentes teores de elementos residuais que afetam suas propriedades. Titânio de alta pureza possui tipicamente metade do conteúdo de oxigênio da versão comercialmente pura, em torno de 0,005% em massa, e seu uso comercial é significativamente mais restrito, dedicado apenas à área de pesquisa. Titânio comercialmente puro é classificado pela ASTM em 4 diferentes "graus" (*grades*, em inglês) [15] tendo como base o conteúdo de impureza do material. Como "pequenas quantidades de impurezas intersticiais afetam consideravelmente as propriedades mecânicas do titânio puro, não é conveniente distinguir os vários graus de titânio não-ligado com base na análise química"[14], e sim através de suas propriedades mecânicas. Não obstante, de modo geral, o conteúdo de impurezas do material aumenta do grau 1 ao grau 4, assim como seu limite de resistência à tração.

Grau ASTM	Limite de Resistência à Tração (MPa)	Limite Elástico 0,2% (MPa)	Módulo de Elasticidade (GPa)	Coef. Poisson	Densidade (g/cm ³)
Grau 1	240	170			
Grau 2	345	280	103	0.31 - 0.36	4.51
Grau 3	440	380		-,,	.,
Grau 4	550	480			

Tabela 1 - Propriedades mecânicas do titânio comercialmente puro. [14,16]

Para a utilização em implantes dentários, utiliza-se mais comumente o grau 4, devido às suas melhores propriedades mecânicas.

Tabela 2 - Resumo das propriedades físico-químicas do titânio. [5, 17]

Nº atômico	22
Massa	47,867 g/mol
Ponto de fusão	1668ºC
Ponto de ebulição	3287⁰C
Densidade	4,54 g/cm ³
Potencial de Ionização	6,83 eV
Eletronegatividade	1,6
Configuração eletrônica	$[Ar] 4s^2 3d^2$

2.3.2 Tratamentos superficiais

Como explicitado na seção 2.2, Titânio é um material bioinerte. Dessa maneira, mesmo não reagindo bioquimicamente com o corpo humano, o tecido lesado ao redor do implante ainda é substituído por uma capa fibrosa de tecido conjuntivo, o que faz com que a conexão entre implante e tecidos orgânicos seja física, e não química, não possibilitando a osseointegração propriamente dita de acordo com a definição do início da seção 2.1.2. Isso pode levar a uma ancoragem e integração insuficientes com o osso após a implantação caso ocorram contaminações bacterianas e micromovimentações. [18,19]

Para que esses efeitos sejam mitigados, é importante realizar tratamentos superficiais nos implantes de titânio que promovam a osseointegração através da modificação das propriedades físicas, químicas e topográficas da superfície, como também já discutido na seção 2.1.2. [3].

Dentre essas opções de modificação da superfície, destaca-se a criação de uma camada nanoestruturada através dos métodos de *anodização* e *tratamento hidrotérmico*, por serem ambos métodos simples e baratos; a escala das nanoestruturas proporciona também uma melhor aderência de células e proteínas em comparação a tratamentos que criam microrrugosidades, já que a ordem de grandeza das estruturas das células e proteínas é nanométrica, e não micrométrica. [20, 21, 22]

No entanto, dentre estas duas opções principais, observou-se na literatura que o tratamento hidrotérmico, ao contrário da anodização, possibilita uma diminuição drástica do ângulo de contato, concedendo uma alta hidrofilicidade à superfície. Esses fatores conferem ao implante uma melhor interface com os fluidos corporais, facilitando o crescimento de tecidos sobre o implante e, portanto, possibilitando uma melhor osseointegração. [21] Dessa maneira, decidiu-se por utilizar o tratamento hidrotérmico no presente trabalho.

A síntese hidrotérmica, por sua vez, é caracterizada pela reação de TiO₂ se tornando trititanato de sódio (Na_xH_{2-x}Ti₃O₇·*n*H₂O) após ser submetido, sob agitação e em solução concentrada de NaOH em um reator autoclave, a temperaturas da ordem de 150°C durante um número de horas que varia de acordo com as condições do experimento. Após a síntese, o teor de sódio do composto resultante

pode ser reduzido através do procedimento de lavagem, em que se substitui os íons Na⁺ por íons H⁺, tornando-se trititanato de hidrogênio (H₂Ti₃O₇). [20, 23, 24]

2.4 Poli(álcool vinílico) (PVA)



Figura 2 - Molécula do PVA e suas representações químicas (centro e direita) [25]

O PVA é um polímero solúvel em água, biodegradável e biocompatível. É de grande importância comercial e possui uma vasta gama de aplicações devido à sua estrutura simples e de suas propriedades únicas, como adesividade, resistência mecânica, formação de filmes, inchamento, baixo risco à saúde e por ser não-cancerígeno. Algumas das áreas de aplicação possíveis incluem as indústrias têxtil, de papel, de adesivos, alimentar, farmacêutica e biomédica. [26] Mais recentemente, atrai interesse também devido à intensificação da preocupação ambiental sobre o descarte e controle do ciclo de vida dos produtos plásticos. [25]

Seu monômero, álcool vinílico, não possui uma forma estável, existindo em equilíbrio dinâmico com seu tautômero, o acetaldeído. Dessa maneira, sua produção não é realizada através da polimerização direta desse monômero, mas sim através da hidrólise em solução alcoólica de outro polímero, acetato de polivinila, também nomeado PVA em algumas fontes de literatura. Após a hidrólise, a reação prossegue via mecanismo de radical livre ou polimerização em suspensão. [25, 26]

O grau de hidrólise do acetato de polivinila pode ser variado na reação, o que afeta diretamente a cristalinidade do PVA resultante e por conseguinte suas

propriedades. PVA completamente hidrolisado (variante utilizada neste trabalho, considerado assim quando o grau de hidrolisação atinge um valor acima dos 98%) possui cristalinidade tipicamente entre os valores de 40% e 50%, enquanto que PVA altamente hidrolisado (porém não completamente, entre 87% e 98% de grau de hidrolisação) possui valores de cristalinidade entre 30% e 40%; essa diferença entre os dois tipos ocorre devido à presença residual de grupamentos acetato, que diminuem a capacidade de empacotamento das cadeias. Em consequência disso, PVA completamente hidrolisado possui maior resistência mecânica e menor capacidade de inchamento do que sua variante completamente hidrolisada. Devido à presença residual dos grupos acetato, o PVA altamente hidrolisado pode ser considerado como um co-polímero de acetato de vinila e álcool vinílico, enquanto que o PVA totalmente hidrolisado é considerado como um homopolímero. [25]

Apesar de ser um polímero linear atático, o PVA possui um grau de cristalinidade razoável devido ao tamanho reduzido dos grupos hidroxila, que não dificultam o empacotamento das cadeias. Seu grau de cristalinidade também torna esse polímero estável e inerte quimicamente, razão pelo qual é considerado biocompatível. [25, 27]

Por suas propriedades de biocompatibilidade, solubilidade em água e inchamento, o PVA atrai crescente interesse de aplicação nas indústrias farmacêutica e biomédica, por exemplo, à sua utilização sob a forma de hidrogéis para a liberação controlada de fármaco e *drug delivery*. [27]

Um hidrogel pode ser descrito como um polímero hidrofílico que possui cadeias com estrutura tridimensional formada por ligações cruzadas e que incha ao ser exposto à água ou aos fluidos do ambiente corporal, permanecendo, no entanto, insolúvel e estável mecanicamente devido à estrutura de suas cadeias. [28]

A criação das ligações cruzadas e a subsequente formação do hidrogel, pode ocorrer por duas rotas principais: química ou física. [27]

A rota química é realizada através do uso de um composto precursor para a criação das ligações, por exemplo, formaldeído, glutaraldeído ou cetonas. No entanto, esses compostos são tóxicos, o que faz seu uso inadequado para aplicações no corpo humano, principalmente porque, depois de promovida a criação das ligações cruzadas entre as cadeias do polímero, torna-se praticamente inviável realizar a total retirada dos resquícios de precursor do hidrogel. Além disso, devido à sua funcionalidade e reatividade, os resquícios do precursor têm forte potencial de

interagirem com o fármaco a ser liberado, intervindo no tratamento e alterando suas propriedades terapêuticas. Dessa maneira, a rota química é desfavorecida para esse tipo de aplicação.

A criação de ligações cruzadas através de vias físicas é possível principalmente através da irradiação (radiação gama, ultravioleta) e da criogelificação do polímero. A irradiação promove a formação desse tipo de estrutura pois induz a recombinação de radicais poliméricos induzidos pelo bombardeamento com a radiação ionizante, formando ligações covalentes entre as cadeias poliméricas. [29] Já a criogelificação proporciona, através de ciclos de resfriamento e aquecimento, o aumento do grau de cristalinidade do polímero em regiões entre as cadeias, formando cristalitos, que contribuem assim para conectarem tridimensionalmente as cadeias poliméricas. [26]



Figura 3 - Estrutura tridimensional das ligações cruzadas de géis de PVA criogelificados. [26]

Dessa maneira, o presente trabalho se propõe a estudar as implicações do uso das técnicas de irradiação por radiação Gama e criogelificação na produção de filmes de hidrogel de PVA para o modelo de liberação controlada do fármaco a ser estudado.

2.5 Metronidazol



Figura 4 - Estrutura química do grupo funcional Nitro, do grupamento Imidazol (acima), e do composto Metronidazol. [30]

Metronidazol (tratado a partir de agora neste trabalho pela abreviação MTZ), também conhecido pelo nome comercial Flagyl® (Pfizer), é um fármaco sintético com ação antibiótica classificado como um nitroimidazol (composto químico constituído de uma molécula de imidazol com um grupamento funcional nitro, como representado na figura 4 acima. Ele é especialmente eficaz contra anaeróbios obrigatórios, organismos que são prejudicados pela presenca de oxigênio no meio. Sua ação antibiótica ocorre devido ao fato de que a molécula de metronidazol entra nas células dos microrganismos e lá é reduzida a um radical livre polar que não contém o grupamento funcional nitro; esse radical, por ser muito reativo, é citotóxico, de modo que interage com as cadeias de DNA do micro-organismo e as fazem perder sua estrutura de hélice, o que inibe a síntese de ácidos nucleicos pela célula (DNA e RNA), inviabilizando a transmissão de informação genética e a síntese de proteínas, efetivamente matando esses organismos. [31] Metronidazol é utilizado comumente para o tratamento de doenças como a amebíase, infecções bacterianas do abdômen, vaginose bacteriana e em, conjunto ou não com técnicas cirúrgicas, para o tratamento da peri-implantite. [32] A bula do metronidazol em comprimidos produzido pela Pfizer (Flagyl) recomenda, no caso de infeccões

bacterianas anaeróbias em adultos, a administração de uma dose de 7,5 mg/kg a cada seis horas, com uma dosagem máxima de 4 g num período de 24 horas. [33]

A peri-implantite é um processo inflamatório que afeta os tecidos ao redor do implante e é associada a sangramento, formação de pus e perda óssea. Ela é causada por alguns fatores principais, como a resposta imunológica do paciente, a presença de doenças sistêmicas (por exemplo, diabetes e osteoporose), o histórico dentário do paciente (ocorrência prévia de periodontite), fatores sociais (como higiene oral inadequada e uso de drogas), hábitos involuntários nocivos à saúde buco-maxilar (ditos hábitos parafuncionais, como o bruxismo e má-oclusão) e, de modo geral, a qualidade do ambiente em torno do implante. As principais bactérias encontradas nos casos de peri-implantite (Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas intermedia, е Actinobacillus actinomycetemcomitans) são anaeróbias, o que torna o uso de metronidazol adequado. [32]

2.6 Entrega de Fármaco (Drug delivery) e liberação controlada

Entrega de Fármaco (*Drug delivery*) e liberação controlada se referem a técnicas de controlar o transporte, a entrega e a liberação de fármacos através do corpo humano com um grau de precisão maior do que normalmente se atingiria com métodos mais convencionais (como por exemplo, administração sistêmica). Esses métodos oferecem uma série de vantagens, incluindo aumento da eficácia do tratamento, diminuição de possíveis efeitos tóxicos e, de modo geral, uma maior conveniência do tratamento para o paciente.

Essas técnicas, em vias gerais, têm o objetivo de estabelecer controle sobre dois parâmetros da liberação do fármaco: o *quando* e o *onde*. [2]

No primeiro caso, o controle temporal é estabelecido através de sistemas que proporcionam ao fármaco ser liberado durante um período mais extenso de tempo do que seria possível normalmente; dessa maneira, é possível administrar doses mais baixas do medicamento durante um tempo mais longo, assegurando que a concentração nunca será alta demais a ponto de acarretar toxicidade para o paciente enquanto simultaneamente é mantida a dosagem exata necessária para eficácia do tratamento. Outra possibilidade é a do medicamento ser liberado apenas

em momentos específicos planejados de acordo com o tratamento concebido para o paciente, possibilitando o uso de doses maiores em espaços mais curtos de tempo, amenizando um possível efeito tóxico prolongado.

Já no segundo caso, o controle do lugar de liberação é realizado através de métodos que ou tornam a distribuição do fármaco mais localizada ou garantem que a liberação ocorra apenas em locais específicos do corpo humano. Nos primeiros, pode-se simplesmente implantar o sistema de distribuição no local desejado para que a liberação ocorra de maneira mais localizada, provendo maior eficiência ao tratamento; já nos segundos métodos, estabelecem-se sistemas bioquímicos que garantam que a liberação do fármaco aconteça apenas nos locais que são alvo da terapia (como, por exemplo, um polímero que só se degrada na presença de um pH específico do meio ou na presença de bactérias específicas que quebrem suas ligações).

No caso da liberação controlada aplicada a implantes dentários, é desejável que se controle ambos os parâmetros de tempo e lugar. Dessa maneira, o sistema de liberação é posicionado diretamente no implante, limitando o local de distribuição, enquanto simultaneamente se utiliza um método que atrase a liberação de tal sistema, de modo que o fármaco possa ser liberado gradualmente e durante um tempo maior, possibilitando a manutenção da concentração do fármaco a um nível constante, estável e mais baixo do que caso houvesse picos de liberação, como no caso de uma administração mais convencional do medicamento.

Capítulo 3

3 Materiais e Métodos



Figura 5 - Fluxograma dos processos experimentais deste estudo.

Nesse estudo foram utilizados corpos de prova de dois tipos, membranas poliméricas de PVA e discos de Ti com duas camadas superficiais: uma inferior, composta de nanoestruturas de TiO₂ com MTZ adsorvido em sua superfície, e uma superior, composta por um filme fino de PVA.

As matérias primas utilizadas foram PVA (Aldrich Chemistry, Lote # MKBS2768V, 99+% hidrolisado, peso molar 85,000-124,000), MTZ (em solução, Fresenius Kabi Brasil Ltda., 5 mg/ml) e barras de Ti grau (ASTM grau 4) de seção circular.

Os métodos de caracterização empregados foram: espectrofotometria na faixa do UV/visível para os ensaios de liberação do metronidazol, análise microestrutural através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Difração de

Raios-X (DRX), medição do ângulo de contato pelo método da gota séssil e avaliação do grau de inchamento das membranas poliméricas.

3.1 Membranas poliméricas

Foram produzidas membranas de PVA puro e com MTZ (concentração original de 5 mg/ml) através do processo de evaporação de solvente (*casting*). As membranas de PVA puro foram utilizadas para o ensaio de inchamento (seção 3.7) enquanto que as membranas com MTZ foram utilizadas em ensaios de liberação.

Para as membranas de PVA puro, uma solução de PVA foi preparada misturando-se 10 g de PVA a 100 ml de água destilada. Essa solução foi mantida à temperatura de (90 ± 2)°C sob agitação magnética durante 4 h com o uso de um condensador de refluxo para evitar perda de água da solução. Ao final desse período, o aquecimento foi desligado e deixou-se a solução resfriar até a temperatura ambiente, ainda sob agitação, durante aproximadamente 30 minutos. Essa solução foi vertida em placas de Petri de vidro e colocada em uma estufa ventilada a 50°C durante aproximadamente 20 h para que ocorresse a evaporação da água. Após a secagem, os filmes foram submetidos a diferentes doses de radiação gama (5, 15 ou 25 kGy) para proporcionar a formação de ligações cruzadas em sua estrutura.

Por último, os filmes de PVA resultantes foram retirados das placas e cortados em membranas nas dimensões de 8 mm x 100 mm (L x C), tamanho adequado para que, na etapa subsequente de liberação, as amostras coubessem completamente dentro de tubos Falcon de 50 ml.

Para as membranas de PVA com MTZ, o procedimento foi semelhante com exceção de que, no preparo da solução, foram usados 80 ml de água destilada e que, após as 4h de solubilização do PVA na solução e os 30 minutos subsequentes de resfriamento, foi adicionado o antibiótico diretamente ao polímero; foram adicionados à solução 20 ml do fármaco MTZ concentrado, deixando-se solubilizar por mais 30 minutos antes de se verter nas placas de Petri.

3.2 Tratamento superficial e recobrimento de discos de Ti

Barras de Ti de seção circular com diâmetro de 12,7 mm foram cortadas em discos de espessura de aproximadamente 2 mm com uma máquina de corte (modelo ISOMET 4000, Buehler). Esses discos foram lixados com o auxílio de lixas nas seguintes granulometrias: 220, 400, 600 e 1500.

3.2.1 Tratamento superficial

Os discos foram lavados com o auxílio de ultrassom utilizando acetona, álcool e água destilada. Foi então realizada a síntese do trititanato de sódio, com fórmula química Na_xH_{2-x}Ti₃O₇·*n*H₂O sobre a placa de Ti, via rota hidrotérmica alcalina pela imersão em 200 ml de uma solução aquosa de NaOH 3M em reator hidrotérmico (modelo BR 500, Berghof) a 150°C por 6 horas. Após o término do tempo de reação, as amostras foram lavadas 3 vezes com água destilada, descartando o sobrenadante. Em seguida, foram secos à temperatura ambiente.

3.2.2 Recobrimento

Realizou-se um teste de detecção de concentração para o espectrofotômetro utilizado; com base nos resultados desse teste, gotejou-se cada amostra com 200 µl da solução concentrada de MTZ (5 mg/ml). O gotejamento do MTZ foi realizado utilizando-se uma pipeta micrométrica monocanal de volume fixo de 25 µl (Digipet). Gotejou-se o centro da área do disco, de modo que a gota cobrisse completamente sua área superficial. Após isso, deixou-se as gotas secarem de um dia para outro, à temperatura ambiente.

Durante a secagem, foi identificado que houve perdas experimentais, de modo que observou-se MTZ que molhava a superfície abaixo dos discos. Isso indica que a tensão superficial das gotas não foi suficiente para manter todo o antibiótico sobre os discos enquanto ocorria a secagem; dessa maneira, faz-se necessário

pontuar que há inexatidão no cálculo da quantidade total liberada pelas amostras, que ainda será apresentado neste trabalho. No entanto, o perfil de cinética de liberação se mantém o mesmo, já que apenas a quantidade total liberada é proporcionalmente menor do que a realidade.

Como descrito na seção 2.6, é desejável que a cinética de liberação fosse controlada de modo que a liberação do antibiótico fosse mais uniforme ao longo do tempo, evitando picos de liberação; o método escolhido para garantir que isso acontecesse foi o recobrimento dos discos com um filme polimérico, por ser simples e de fácil execução. [19] Para isso, os discos secos foram recobertos por um filme de PVA com o uso da técnica de spin coating, gotejando-se 4 gotas (0,2 ml) da mesma solução polimérica utilizada para a fabricação das membranas de PVA (10% PVA em água) sobre a superfície dos discos e os rotacionando a uma velocidade de rotação de 400 RPM durante 10 s e depois a 4000 RPM durante 60 s. Em seguida, foi feita a secagem do filme em uma estufa ventilada a 50 °C durante 20 h para que houvesse a evaporação completa de água no filme.

3.3 Reticulação

As membranas e os discos foram submetidos a tratamentos que aumentariam a densidade de ligações cruzadas do PVA.

Metade dos discos foram irradiados e a outra metade foi submetida a criogelificação, de modo a se comparar a influência de cada procedimento. O objetivo de se aumentar a quantidade de reticulações nessas amostras foi o de propiciar maior dificuldade física para a liberação do MTZ contido abaixo da camada de polímero.

3.3.1 Irradiação

As membranas poliméricas foram irradiadas com radiação gama em três condições diferentes com o objetivo de avaliar a influência da dose de radiação e,

consequentemente, a quantidade de ligações cruzadas no comportamento do inchamento e da liberação do metronidazol das membranas; as conclusões desse experimento serviriam para definir a dose de radiação empregada nos discos. As amostras foram irradiadas em condições ambientes com fonte de radiação gama Co-60 a uma taxa de 5, 15 ou 25 kGy por 10 h.

Já os discos de Ti foram irradiados em condições ambientes com fonte de radiação gama Co-60 somente a uma taxa de 25 kGy por 10 h.

3.3.2 Criogelificação

No procedimento de criogelificação, os discos de Ti foram deixados em um congelador comum por 15 h à temperatura de aproximadamente 0°C. Após isso foram repetidos ciclos de tempo fora (à temperatura ambiente) e dentro do congelador durante 30 min e 1 h, respectivamente, até que 4 ciclos fossem completados (ou seja, depois de os discos serem colocados novamente no congelador por 4 vezes).

3.4 Caracterização

Foram empregados cinco métodos diferentes de caracterização: ensaios de liberação das membranas de PVA e discos e subsequente espectrofotometria das alíquotas retiradas, ensaio de inchamento das membranas de PVA, análise morfológica utilizando microscopia eletrônica com imagem por feixe de hélio (HIM), análise do ângulo de contato da superfície e análise microestrutural utilizando difração de raios-X.

3.4.1 Construção da curva padrão do metronidazol

Para que os resultados do ensaio de liberação pudessem ser devidamente interpretados, fez-se necessário encontrar a correlação entre a concentração de metronidazol no meio a ser medido e quantidade de luz absorvida pelo meio de acordo com essa concentração (Lei de Lambert-Beer).

Dessa maneira, diluiu-se a solução de MTZ em várias concentrações diferentes para que a absorvância das soluções padrões fosse lida no espectrofotômetro (modelo Lambda 25, Perkin Elmer). Realizou-se uma varredura dos comprimentos de onda de 200 a 500 nm para se determinar o comprimento em que ocorre o pico de absorvância. Através do uso do software Excel, utilizou-se os valores de absorvância medidos nesse comprimento de onda para estabelecer a correlação com os valores das próprias concentrações. Através do cálculo da regressão linear, foi possível encontrar uma equação para a reta que melhor se adequasse ao conjunto de dados.

3.4.2 Ensaios de liberação

Através dos procedimentos descritos em 3.1 e 3.2.2, o fármaco foi, no caso das membranas de PVA, misturado à solução polimérica e, no caso dos discos, carregado através de adsorção física simplificada no interior de nanoestruturas acrescidas à sua superfície. Para se compreender como e com que rapidez o fármaco seria liberado no meio do corpo humano, foram conduzidos os ensaios de liberação.

Neles, os corpos de provas foram imersos em 45 ml de solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4, com o objetivo de simular as condições fisiológicas humanas, de acordo com [34]. Esses tubos foram deixados em uma incubadora shaker (M.S. Mistura) a 37°C sob agitação de 100 RPM.

Alíquotas de 4 ml da solução tampão foram retiradas de tempos em tempos para que a absorvância da solução pudesse ser medida no espectrofotômetro e,

com auxílio da curva padrão, a concentração liberada em cada tempo pudesse ser calculada.

Após a retirada de uma alíquota para análise da espectrofotometria, a solução de PBS nos tubos era reposta com 4 ml de PBS novo. Com isso, o conteúdo original retirado para análise não era devolvido ao tubo, evitando a possibilidade de contaminação. Dessa maneira, a cada alíquota retirada, realizou-se efetivamente uma diluição da solução; para que os efeitos dessa diluição fossem desconsiderados, foi realizada a seguinte correção matemática:

Fator de Correção =
$$\left(\frac{45}{45-4}\right)^{n-1}$$

Onde *n* é o número sequencial da amostra, 45 é o volume em mililitros da solução de PBS e 4 é o volume em mililitros da alíquota retirada. Para realizar a correção, o volume de liberação de antibiótico medido na espectrofotometria foi multiplicado por este fator. [34]

Foram realizados ensaios de liberação com membranas de PVA com metronidazol e com discos de titânio

O ensaio de liberação do MTZ contido em membranas de PVA foi realizado para estudar a possibilidade de se produzir um implante dentário de titânio cuja superfície fosse recoberta por um filme polimérico que liberasse antibiótico gradualmente.

O ensaio de liberação dos discos foi realizado para se estudar a possibilidade de produzir um implante em que, dessa vez, o antibiótico estivesse adsorvido em sua superfície, cuja área superficial teria sido aumentada através da criação de nanoestruturas, e que houvesse um filme de PVA por cima atuando como barreira física para mitigar uma possível liberação rápida de antibiótico. Para esse, foram utilizados os corpos de prova de discos de Ti, descritos no item 3.2

Após a conclusão do ensaio dos discos, foi realizada uma extensão desse, recolocando-se os mesmos discos de titânio novamente em meio PBS para se estudar a possibilidade de mudança no mecanismo de liberação após longos períodos de tempo.

3.4.3 Ensaio de inchamento

Foi realizado um ensaio de inchamento utilizando-se membranas de PVA puro para observar a influência que esse poderia ter sobre a integridade física do filme que recobriria a superfície do implante dentário idealizado.

Membranas de PVA puro submetidas a doses de radiação de 5, 10 e 15 kGy foram pesadas previamente, imersas em PBS em tubos Falcon e deixadas em uma incubadora à temperatura de 37°C sob agitação à frequência de 100 RPM para simular condições próximas às da aplicação no corpo humano. De tempos em tempos, as membranas foram secas com lenços absorventes para que se retirasse o excesso de solução e pesadas novamente para que fosse aferida a variação da massa, de modo que fosse medida ao longo do tempo a variação de seu inchamento através da absorção da solução do meio.

3.4.4 Microscopia

Utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV, modelo Vega, Tescan) e microscopia com imagem por feixe de hélio (modelo Orion NanoFab, Zeiss) para se realizar a análise morfológica dos filmes. As amostras foram recobertas por uma fina camada de ouro obtida através do método de sputtering para que se tornassem condutoras de modo a transmitirem melhor o sinal do microscópio.

3.4.5 Ângulo de Contato

A análise do ângulo de contato foi realizada para se testar a hidrofilicidade das superfícies dos corpos de prova. Ela foi realizada sobre as superfícies das amostras de discos de titânio não recobertos, após tratamento superficial e após serem recobertos por MTZ e pela camada polimérica.

3.4.6 Difração de Raios-X

Foi utilizada a análise de difração de raios-X (DRX; gerador de raios-x modelo ID 3000, Seifert; difratômetro de alta resolução modelo HZG\$, Zeiss; sistema gerador/difratômetro modelo PANalytical X'Pert PRO, Philips) para analisar a microestrutura da camada nanoestruturada de titanato de sódio e para confirmar a sua presença; ela foi realizada, portanto, em amostras que possuíam apenas a sua adição, sem a presença do antibiótico e do recobrimento polimérico.

Capítulo 4

4 Resultados e Discussão

4.1 Análise microestrutural



Figura 6 - Espectro de difração de uma amostra de disco logo após o tratamento hidrotérmico.

Através do espectro de difração da figura 6, é possível reconhecer picos típicos do titanato de sódio, em especial o pico de 2θ igual a 9,7°, o que revela a presença de titanato em camadas [20]; os outros picos em 2θ igual a 24,3°, 28,5° e 48,5° também confirmam a presença de titanato.

Além desses, os picos 35,2°, 38,6°, 40,3°, 53,2°, 63,1°, 70,8° e 76,4°, marcados com círculos vermelhos, evidenciam a presença do titânio do substrato.



Figura 7 - Microscopia de Íons de Hélio (HIM) de uma amostra de disco logo após o tratamento hidrotérmico, campo de visão do microscópio: 2µm.

Já na figura 7, em uma imagem de HIM realizada em uma amostra logo após o tratamento hidrotérmico alcalino, é possível confirmar visualmente a presença de uma microestrutura de nanofibras organizadas.

4.2 Ângulo de contato



Figura 8 - Perfil da gota molhando a superfície de uma amostra de disco de Ti puro. (ângulo = 46º)



Figura 9 - Perfil da gota molhando a superfície de uma amostra de disco logo após o tratamento hidrotérmico (superfície nanoestruturada sem MTZ). (ângulo próximo a 0º)



Figura 10 - Perfil da gota molhando a superfície de uma amostra de disco com superfície nanoestruturada, MTZ e recoberta pelo filme de PVA. (ângulo = 22º)

Através das figuras 8 - 10, pode-se observar que a amostra de titânio puro é a menos hidrofílica, como esperado, e que a amostra apenas com as nanoestruturas (sem o MTZ nem o PVA) é a mais hidrofílica dentre todas.

O ângulo de contato da gota na superfície da amostra de titânio puro é alto (46º) devido ao contato da água diretamente com a superfície da amostra de metal. Em comparação, o ângulo de contato da amostra apenas com as nanoestruturas é extremamente baixo, de modo que não foi sequer possível fazer a leitura do ângulo da gota no aparelho. Isso ocorre devido ao aumento da área de superfície que as nanoestruturas proporcionam, de modo que a água acessa os vazios que essas criam através de capilaridade.

Adicionalmente, a amostra que possui em sua superfície as nanoestruturas nas quais há o fármaco dissolvido são menos hidrofílicas do que as que não o tem, e a amostra que possui a camada de PVA irradiado por cima das nanoestruturas é ainda menos hidrofílica. No primeiro caso, isso se explica porque a água encontra maior dificuldade de preencher os vazios da nanoestrutura quando esses já estão parcialmente preenchidos pelo fármaco, de modo que a gota se espalha menos pela superfície; já no segundo, apesar do PVA ser um polímero solúvel em água, e portanto hidrofílico, ocorre uma diminuição da área superfícial da amostra devido ao

fato de que essa é recoberta pela camada de polímero, tornando essa amostra menos hidrofílica do que as duas que não possuem tal recobrimento sobre as nanoestruturas, porém, naturalmente, ainda muito mais hidrofílica do que a amostra de titânio puro.

Dessa maneira, puramente com base na hidrofilicidade, esse ensaio apontaria para o uso de uma superfície recoberta apenas com as nanoestruturas adsorvidas com o fármaco; no entanto, a partir dos resultados do ensaio de liberação (no item 4.2), é sabido que a liberação dessa amostra é muito mais rápida do que a liberação da que possui a superfície recoberta com a camada polimérica.

4.3 Ensaio de liberação das membranas de PVA

4.3.1 Curva Padrão



Figura 11 - Espectro de absorção UV-VIS da solução de MTZ.

Primeiramente, foi obtido o espectro de absorção da solução de MTZ em PBS pH 7,4 entre 200 e 500 nm e o máximo de absorção foi detectado em 320 nm (Fig. 11). Considerando este comprimento de onda, realizou-se testes preliminares em que foi possível perceber os limites máximos e mínimos de detectabilidade da

concentração de MTZ do espectrofotômetro UV-VIS utilizado. Com base nesses testes, para garantir a validade dos experimentos, escolheu-se concentrações para traçar a curva padrão que estariam tanto na janela de detectabilidade quanto representariam diluições possíveis dos experimentos.

A curva padrão resultante apresentada na Fig. 12 produziu os seguintes parâmetros: coeficiente angular = 92,8106 ml/mg; coeficiente linear = 0,0310.



Figura 12 - Curva padrão para análise de espectrofotometria.

4.3.2 Resultados da liberação das membranas de PVA



Figura 13 - Liberação acumulada das membranas de PVA.



Figura 14 - Liberação acumulada das membranas de PVA - detalhe das primeiras 6 h.

Devido a fatores não previstos durante a realização do procedimento experimental, os dados apresentados na figura 14 mostram uma queda na porcentagem liberada de fármaco (entre 1 e 4 horas); esse resultado não corresponde à realidade porque sabe-se que o conteúdo de antibiótico liberado no meio se mantém nesse meio até que seja retirado de alguma forma, o que aponta provavelmente para algum tipo de problema de diluição após a retirada das alíquotas e subsequente preenchimento da solução com PBS puro novamente.

Mesmo assim, os resultados são relevantes e revelam que houve uma liberação muito rápida nas primeiras 4 horas. Também revelam que houve uma diminuição da quantidade de fármaco liberada de acordo com o aumento da dose de radiação, provavelmente devido ao aumento da densidade de ligações cruzadas no polímero após a exposição à radiação. A membrana que foi irradiada com a maior intensidade (25 kGy) liberou menos fármaco do que as das outras duas condições.

No gráfico apresentado na figura 14 é possível perceber também que as duas maiores intensidades de radiação proporcionaram uma liberação mais lenta do que a de menor intensidade, o que era esperado devido à presença de maior quantidade de ligações cruzadas.



4.4 Ensaio de inchamento das membranas de PVA

Figura 15 - Inchamento das membranas de PVA.

Os resultados do ensaio de inchamento (Fig. 15) mostram que a membrana irradiada com 25 kGy foi a que apresentou a menor absorção do meio aquoso. Esse comportamento era esperado devido à densidade maior de ligações cruzadas proporcionadas pela maior intensidade da radiação, de modo que essas tornam

mais difícil a penetração do meio entre as cadeias do polímero. Mesmo assim, todas as membranas apresentaram grau de inchamento maior que 120%.

Para todas as amostras foi observado o perfil normal de uma curva de inchamento de um hidrogel em que, num primeiro momento, é observado um grande aumento de massa que cai ao longo do tempo do ensaio e atinge um equilíbrio. [35] Inicialmente, ocorre um grande inchamento do hidrogel devido à absorção do fluido por causa da hidrofilicidade do polímero, atingindo um pico de inchamento. A partir deste ponto, as cadeias tendem a um estado relaxado ou grau de inchamento de equilíbrio (GIE), onde as forças de hidratação e as forças elásticas das reticulações atingem o equilíbrio. Como esperado, o GIE foi menor para a membrana irradiada com 25 kGy.

4.5 Ensaio de liberação dos discos de titânio

Devido ao fato de os resultados do ensaio de liberação das membranas de PVA terem revelado que ocorreu uma liberação muito rápida, decidiu-se deixar de lado a estratégia de liberação em que o fármaco estaria contido no filme polimérico sobre a superfície nanoestruturada do implante de titânio em favor de adsorver o fármaco diretamente sobre as nanoestruturas crescidas em sua superfície e então cobri-la com um filme de polímero puro.

Devido ao comportamento das membranas de PVA irradiadas com 25 kGy e aos resultados do ensaio de inchamento, definiu-se que o filme de polímero seria irradiado com essa intensidade.

Essa nova estratégia teria como objetivo oferecer obstáculo físico maior à liberação do fármaco, obrigando-o a se difundir através do filme polimérico.







Figura 17 - Liberação acumulada dos discos de Ti - detalhe das primeiras 2 h.

Os dados novamente revelam uma liberação rápida nas medições feitas no primeiro dia; observa-se que as amostras cujo polímero foi irradiado liberaram menos do que as amostras em que houve o tratamento de criogelificação, que por sua vez liberaram menos conteúdo total de antibiótico do que as amostras sem o recobrimento polimérico, como esperado.

No entanto, as amostras recobertas com polímero, tanto criogelificado quanto irradiado, atingiram a estabilidade na liberação em torno dos 60 minutos, enquanto que as amostras sem recobrimento polimérico aparentemente continuaram liberando antibiótico até por volta dos 110 minutos.



Figura 18 - Liberação acumulada dos discos de Ti - tempo estendido.

Após o término do ensaio anterior, as amostras foram reintroduzidas no meio de PBS e deixadas lá durante 12 dias (26 dias de tempo total de liberação) para determinar se o perfil de liberação sofreria alguma alteração devido a uma possível degradação tardia da capa polimérica, que potencialmente liberaria quantidades de fármaco ainda aprisionadas na amostra que não tivessem sido liberadas antes.

Como é possível observar no gráfico da figura 18, a reintrodução das amostras no meio não proporcionou alteração pronunciada no perfil; as curvas apresentam um leve aumento inicial muito provavelmente devido ao erro da medição. Dessa maneira, é possível concluir que a liberação já estava completamente estabilizada e que não há mudança tardia no mecanismo da liberação.

4.6 Análise morfológica



Figura 19 - Micrografia MEV de uma amostra apenas com MTZ diretamente sobre o titânio.



Figura 20 - Micrografia MEV de uma amostra apenas com MTZ sobre a superfície nanoestruturada, antes do ensaio de liberação.

A imagem da figura 19 foi realizada sobre uma amostra apenas com metronidazol por cima da superfície de titânio e a imagem da figura 20 foi realizada sobre uma amostra com a presença de metronidazol adsorvido na superfície nanoestruturada, ambas sem recobrimento de PVA; elas demonstram a presença da formação de cristais. Em ambos os casos, os cristais visíveis aparentam ser provenientes da solução salina usada como solvente do antibiótico. A forma de nucleação dos cristais na amostra da figura 20 pode ser relacionada com o fato de que a área superficial é amplamente maior, por causa da superfície nanoestruturada, de modo que isso favorece a nucleação de cristais menores; da mesma maneira, na amostra com área superficial menor, ocorreu a nucleação de cristais maiores.



Figura 21 - Micrografia MEV de uma amostra apenas com MTZ sobre a superfície nanoestruturada, após o ensaio de liberação.

A imagem da figura 21, realizada também sobre uma amostra com o metronidazol adsorvido sobre a superfície nanoestruturada (sem o recobrimento de PVA), mas dessa vez após o ensaio de liberação do antibiótico, revela que, após a liberação, ocorre o desaparecimento dos cristais presentes na figura 20, provavelmente devido à imersão em solução aquosa.



Figura 22 - Micrografia MEV de uma amostra com a superfície nanoestruturada, MTZ e recoberta por PVA, antes do ensaio de liberação.



Figura 23 - Micrografia MEV de uma amostra com a superfície nanoestruturada, MTZ e recoberta por PVA, após o ensaio de liberação.



Figura 24 - Micrografia MEV de uma amostra com a superfície nanoestruturada, MTZ e recoberta por PVA; ampliação na borda do filme.

Nas figuras 22 e 23 acima, tem-se microscopias de amostras com a adição do recobrimento polimérico irradiado, realizadas antes e depois do ensaio de liberação Na figura 22, ainda antes da liberação, não é mais possível observar a presença de cristais, provavelmente devido ao fato do disco estar recoberto pelo polímero. Já na figura 23, é possível observar a situação da degradação da camada polimérica após o ensaio de liberação, que se encontra visivelmente danificada e sem a uniformidade observável na figura anterior. Na figura 24, pode ser vista a ampliação de uma região da borda do filme de PVA mostrando a interface entre uma região recoberta com o filme, à direita, e outra sem recobrimento, à esquerda.

Também foram realizadas microscopias das amostras com o PVA criogelificado e foi possível concluir que a degradação nelas ocorreu de maneira semelhante, sem diferenças visíveis, contrariando a hipótese de que a degradação no PVA criogelificado seria maior devido à tendência de formação de menos ligações cruzadas em comparação com a irradiação e com os próprios resultados dos ensaios de liberação.

Capítulo 5

5 Conclusão

Não foi possível obter um comportamento de liberação prolongada nas amostras devido ao atingimento do equilíbrio entre uma e duas horas de liberação, caracterizando uma liberação rápida do fármaco. Para que esse comportamento fosse obtido, seria necessário que a liberação se estendesse por dias ou semanas antes de atingir um equilíbrio de concentração; com essa finalidade em mente, propõe-se o uso de outros polímeros para testes posteriores.

Os resultados de liberação das amostras criogelificadas sugerem indícios de que a cinética de liberação nessas amostras tenha ocorrido mais lentamente, atingindo o equilíbrio em 2 h, enquanto que as amostras irradiadas teriam atingido o equilíbrio antes disso, por volta de 1 h de liberação. Uma hipótese possível para esses resultados é a de que isso tenha ocorrido devido à presença de porosidade nos recobrimentos irradiados, advinda do bombardeamento de radiação ionizante; a liberação nas amostras criogelificadas ocorreria somente por difusão através do polímero, enquanto que, nas amostras irradiadas, a fuga do fármaco seria facilitada pela presença de poros. Dessa maneira, sendo a densidade de ligações cruzadas maior nas amostras irradiadas do que nas amostras criogelificadas, as primeiras reteriam mais fármaco (preso entre as ligações) e o liberariam mais rapidamente através dos poros, enquanto que as segundas propiciariam uma liberação de quantidade maiores de fármaco no total enquanto o liberassem de maneira mais demorada. Isso seria explicável por causa do comportamento de difusão do fármaco e também por causa do maior grau de cristalinidade (e, portanto, maior empacotamento das cadeias) do polímero criogelificado, em comparação com a estrutura do polímero irradiado que tende a ser mais amorfa e com menor grau de empacotamento, consequência do bombardeamento da radiação. De modo a se testar essa hipótese, sugere-se, para trabalhos que dêem prosseguimento a essa

pesquisa, subsequente análise morfológica através de microscopia MEV para verificar a presença de poros nas amostras irradiadas.

Mesmo assim, os resultados indicam que foi desenvolvido um dispositivo de entrega local de fármaco à base de titânio e metronidazol. Além disso, foi verificado através da análise do ângulo de contato que a superfície nanoestruturada do dispositivo, exposta após a degradação que ocorre durante a liberação, possui alta molhabilidade, o que promove a osseointegração do dispositivo. Simultaneamente, há evidência na literatura de que a superfície nanoestruturada de trititanato de sódio produzida através da síntese hidrotérmica confere alta bioatividade à superfície recoberta. [36] Todas essas características reforçam a viabilidade do dispositivo.

6 Sugestões para trabalhos futuros

 Produzir recobrimentos de outros polímeros que não o Poli(álcool vinílico) (PVA) e testar o perfil de liberação sob essas novas condições.

É possível que outros polímeros retenham o fármaco de maneira mais eficiente e possibilitem um perfil de liberação mais demorado.

- Testar se há a porosidade nas membranas irradiadas devido ao bombardeamento da radiação e se esse pode ser um fator que influencie na velocidade de liberação.
- Realizar análise de FTIR de modo a se obter mais informações sobre a interação de ligações químicas entre o fármaco metronidazol e o polímero PVA.
- Realizar testes de sensibilidade a antimicrobianos de modo a se determinar o comportamento do dispositivo de liberação na inibição da proliferação de bactérias relacionadas à peri-implantite.

7 Referências

1 ESPOSITO, M., HIRSCH, J., LEKHOLM, U. *et al.*, "Differential Diagnosis and Treatment Strategies for Biologic Complications and Failing Oral Implants: A Review of the Literature", **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 14, n. 4, pp. 473-490, Nov. 1998.

2 UHRICH, K. E., CANNIZZARO, S. M., LANGER, R. S. *et al.*, "Polymeric Systems for Controlled Drug Release", **Chemical Reviews**, v. 99, n. 11, pp. 3181-3198, Nov. 1999.

3 LIN, L., WANG, H., NI, M. *et al.*, "Enhanced osteointegration of medical titanium implant with surface modifications in micro/nanoscale structures", **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 2, n. 1, pp. 35-42, Jan. 2014.

4 ABRAHAM, C. M., "A Brief Historical Perspective on Dental Implants, Their Surface Coatings and Treatments", **The Open Dentistry Journal**, v. 8, n. 1, pp. 50-55, Mai. 2014.

5 CHAKRAVORTY, N., JAIPRAKASH, A., IVANOVSKI, S. *et al.*, "Implant Surface Modifications and Osseointegration". In: **Biomaterials for Implants and Scaffolds**, v. 8, **Springer Series in Biomaterials Science and Engineering**, Springer, pp. 107-131, 2017.

6 FRANCISCHONE, C.E., NETO, A.M., "Uma Breve História da Implantologia". In: FRANCISCHONE, C.E., NETO, A.M., **Bases clínicas e biológicas em implantologia**, 1 ed., capítulo 1, São Paulo, Brasil, Editora Santos, 2009.

7 PESSOA, R. S., MURARU, L., VAZ, L. G. *et al.*, "Influência do desenho do implante na micromovimentação de implantes imediatos com carga imediata -

análise multivariada em elementos finitos", **Innovations Implant Journal: Biomaterials and Esthetics**, v. 5, n. 1, pp. 44-49, Jan.-Abr. 2010.

8 DAVIES, J. E., "Mechanisms of endosseous integration", **The International Journal of Prosthodontics**, v.11, n. 5, pp. 391-401, Set.-Out. 1998.

9 DOS SANTOS, V., BRANDALISE, R. N., SAVARIS, M., "Biomaterials: Characteristics and Properties". In: DOS SANTOS, V., BRANDALISE, R. N., SAVARIS, M., **Engineering of Biomaterials**, 1 ed., capítulo 2, Nova Iorque, EUA, Springer, 2017.

10 NOROWSKI, P. A., BUMGARDNER, J. D., "Biomaterial and Antibiotic Strategies for Peri-implantitis", **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 88, n. 2, pp. 530-543, Fev. 2009.

11 BERGMANN, C. P., STUMPF, A., "Biomaterials". In: BERGMANN, C. P., STUMPF, A., **Dental Ceramics: Microstructure, Properties and Degradation**, ed. 1, capítulo 2, Nova Iorque, EUA, Springer, 2013.

12 DIMARAKIS, I., REHMAN, S.M., ASIMAKOPOULOS, G., "Tissue responses to implanted materials". In: **Biomaterials and Devices for the Circulatory System**, v. 25, **Woodhead Publishing Series in Biomaterials**, Woodhead Publishing, pp. 3-23, 2010.

13 LEE, J.K., CHOI D.S., JANG, I. *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, n. 1, pp. 1145-1154, Fev. 2015.

14 BOYER, R., WELSCH, G., COLLINGS, E. W., "Commercially Pure and Modified Titanium". In: BOYER, R., WELSCH, G., COLLINGS, E. W., Materials

Properties Handbook - Titanium Alloys, ed. 4, capítulo 15, EUA, ASM International, 2007.

15 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, **ASTM F 67-95**: **Standard specification for unalloyed titanium for surgical implant application.** Filadélfia, EUA, 1995.

16 MOURITZ, A. P., "Titanium alloys for aerospace structures and engines". In: MOURITZ, A. P.,, **Introduction to Aerospace Materials**, ed. 1, capítulo 9, Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing, 2012.

17 RENZ, R. P., Avaliação da Osseointegração de Implantes de Titânio Submetidos a Diferentes Tratamentos de Superfícies, dissertação de M.Sc., PUCRS, Porto Alegre, Brasil, 2007.

18 HUANG, Y., HE, S., GUO, Z. *et al.*, "Nanostructured titanium surfaces fabricated by hydrothermal method: Influence of alkali conditions on the osteogenic performance of implants", **Materials Science and Engineering: C**, v. 94, n. 1, pp. 1-10, Jan. 2019.

19 FENG, W., GENG, Z., LI, Z. *et al.*, "Controlled release behaviour and antibacterial effects of antibiotic-loaded titania nanotubes", **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, n. 1, pp., 105-112, Mai. 2017.

20 MORGADO, E., DE ABREU, M. A. S., PRAVIA, O. R. C. *et al.*, "A study on the structure and thermal stability of titanate nanotubes as a function of sodium content", **Solid State Sciences**, v. 8, n. 8, pp. 888-900, Ago. 2006.

21 Zuldesmi, M., Waki, A., Kuroda, K. *et al.*, "High Osteoconductive Surface of Pure Titanium by Hydrothermal Treatment", **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 4, n. 3, pp. 284-290, Jul. 2013.

22 SALOU, L., HOORNAERT, A., LOUARN, G. *et al.*, "Enhanced osseointegration of titanium implants with nanostructured surfaces: An experimental study in rabbits", **Acta Biomaterialia**, v. 11, n. 1, pp. 494-502, Jan. 2015.

23 KASUGA, T., HIRAMATSU, M., HOSON, A. *et al.*, "Formation of Titanium Oxide Nanotube", **Langmuir**, v. 14, n. 12, pp. 3160–3163, Dez. 1998.

24 KASUGA, B. T., HIRAMATSU, M., HOSON, A. *et al.*, "Titania Nanotubes Prepared by Chemical Processing", **Advanced Materials**, v. 11, n. 15, pp. 1307– 1311, Out. 1999.

25 GOODSHIP, V., JACOBS, D., "Manufacture". In: OGUR, E. (ed.), **Polyvinyl Alcohol: Materials, Processing and Applications**, ed. 1, capítulo 3, Shawbury, Reino Unido, Smithers Rapra, 2005.

26 HASSAN, C. M., PEPPAS, N. A., "Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods". In: Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites, v. 153, Advances in Polymer Science, Springer, pp. 37-65, 2000.

27 MUPPALANENI, S., "Polyvinyl Alcohol in Medicine and Pharmacy: A Perspective:", **Journal of Developing Drugs**, v. 2, n. 3, pp. 1-5, Jan. 2013.

HUGLIN, M. R., "Hydrogels in medicine and pharmacy", **British Polymer Journal**, v. 21, n. 2, p. 184, 1989.

29 SEEFRIED, A., DRUMMER, D., "The effects of radiation cross- linking and process parameters on the behavior of polyamide 12 in vacuum thermoforming", **Polymer Engineering and Science**, v. 52, n. 4, pp. 884-892, Nov. 2012.

30 SALEM, H., "Simultaneous Determination of Metronidazole and Diiodohydroxyquine in Bulk Powder and Paramibe Compound Tablets by TLC-Densitometry and HPLC", **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 03, n. 10, 2012.

31 HAVELES, E. B., "Antiinfective Agents". In: HAVELES, E. B., **Applied Pharmacology for the Dental Hygienist**, ed. 7, capítulo 7, Amsterdam, Holanda, Elsevier, 2015.

32 CHACON, G. E., UGALDE, C. M., "Principles of Implantology and Osseointegration". In: BAGHERI, S. C., BELL, R. B., KHAN, H. A. (eds), **Current Therapy In Oral and Maxillofacial Surgery**, ed. 1, capítulo 12, Amsterdam, Holanda, Elsevier, 2011.

33 PFIZER, **FLAGYL - metronidazole tablet, film coated,** G.D. Searle LLC Division of Pfizer Inc., revisado em julho de 2018.

34 DA SILVA, M. A. C., Membranas bioreabsorvíveis de Poli(3-Hidroxibutirato) carregadas com metronidazol para regeneração tecidual guiada, tese de D.Sc., UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2014.

35 OLIVEIRA, R. N., ROUZE, R., QUILTY, B. *et al.*, "Mechanical properties and in vitro characterization of polyvinyl alcohol-nano-silver hydrogel wound dressings", **Interface Focus**, v. 4, n. 1, p. 20130049, Fev. 2014.

36 GUO, Z., JIANG, N., CHEN, C. *et al.*, "Surface bioactivation through the nanostructured layer on titanium modified by facile HPT treatment", **Scientific Reports**, v. 7, n. 1., Jun. 2017.