

Estudo da liberação de benzocaína de implantes de titânio nanotexturizados

Study of benzocaine release from nanotextured titanium implants

RESUMO

Bruna Lemes da Silva
brunas.1998@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – campus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

Mariana de Souza Sikora
marianasikora@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – campus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

Emanuelly Francescon Belusso
belussoe@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – campus Pato Branco, Pato Branco, Paraná, Brasil

No presente trabalho investigou-se o efeito do tempo de nanotexturização de implantes de Ti-cp e Ti₆Al₄V na morfologia, molhabilidade e no uso desses biomateriais para liberação de benzocaína. Na nanotexturização, aplicou-se um potencial (25 V) em temperatura constante (40 °C) durante 10 e 30 min usando substratos com 2 cm² de área geométrica. Utilizou-se uma solução organo-aquosa (9,5% v/v de água, 0,5% de SBF (Simulated Body Fluid) e 0,75% m/m fluoreto de amônio em etilenoglicol). As amostras foram caracterizadas por MEV e ângulo de contato. A incorporação do fármaco ocorreu pelas técnicas de top filling e imersão. Para a quantificação de massa de fármaco liberada, as amostras foram imersas em água ultrapura a 37 °C. Os resultados indicam que a auto-organização dos nanotubos é inversamente proporcional ao tempo de síntese. As curvas de liberação para as duas técnicas apresentaram comportamentos diferentes devido a interação das moléculas do fármaco com a superfície dos coatings. Quanto maior essa interação, maior será o tempo de retenção do fármaco. Sendo assim, os resultados mostram a viabilidade da nanotexturização para a obtenção de implantes para a liberação retardada de benzocaína.

PALAVRAS-CHAVE: Anodização. Biomateriais. Nanotubos.

ABSTRACT

In the present work the effect of nanotexturing time of Ti-cp and Ti₆Al₄V implants on the morphology, wettability and use of these biomaterials for benzocaine release was investigated. In nanotexturization, a potential (25 V) was applied at constant temperature (40 °C) for 10 and 30 min using substrates with 2 cm² of geometric area. An organo-aqueous solution (9.5% v/v water, 0.5% SBF (Simulated Body Fluid) and 0.75% w/w ammonium fluoride in ethylene glycol) was used. The samples were characterized by SEM and contact angle. The incorporation of the drug occurred by the techniques of top filling and immersion. For the quantification of the mass of drug released, the samples were immersed in ultrapure water at 37 °C. The results indicate that the self-organization of the nanotubes is inversely proportional to the synthesis time. The release curves for the two techniques showed different behaviors due to the interaction of the drug molecules with the coatings surface. The greater this interaction, the longer the drug retention time. Thus, the results show the feasibility of nanotexturing for obtaining implants for delayed release of benzocaine.

KEYWORDS: Anodization. Biomaterials. Nanotubes.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

O titânio e suas ligas são biomateriais frequentemente utilizados no ramo da implantodontia devido à resistência mecânica, à fadiga e a corrosão, baixa densidade, módulo de elasticidade semelhante ao tecido ósseo e elevada bioaceitação. A modificação superficial desses dispositivos através da anodização potencioestática promove o crescimento de nanotubos de TiO_2 auto-organizados capazes de mimetizar a matriz óssea humana promovendo a melhora da osseointegração desses biomateriais no corpo humano (HAMOUDA, 2012).

A geometria das matrizes dos nanotubos permite que o material possa ser utilizado como cápsula de administração de medicamentos, sendo facilmente revestidos com drogas que representam sistemas eficientes e promissores de liberação de drogas (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011). A benzocaína (BZC), fármaco modelo utilizado nesse estudo, é um agente anestésico local do tipo éster que possui ação rápida e de curta duração, popularmente utilizado em formulações clínicas, principalmente em anestesia tópica (MELO et al., 2010).

O presente trabalho investigou o efeito do tempo de anodização na morfologia e na molhabilidade dos filmes de Ti-cp e da liga de $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ nanotexturizados, bem como no comportamento de liberação de benzocaína a partir dessas plataformas de TiO_2NTs .

MATERIAL E MÉTODOS

Os nanotubos de TiO_2 foram obtidos através da técnica de anodização potencioestática. Utilizou-se como eletrodo de trabalho substratos de Ti-cp (ASTM F67) e de $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ (ASTM F136) com área de 2 cm^2 , polidos com lixas de carbetto de silício 1200 mesh. Aplicou-se um potencial de 25 V (MINIPA MPC-303D) em um reator eletroquímico composto pelo eletrodo de trabalho e dois contra-eletrodos de platina em 50 mL de solução organo-aquosa contendo 90% v/v de etilenoglicol, 9,5% v/v de água, 0,5% v/v de SBF (*Simulated Body Fluid*) e 0,75% m/m fluoreto de amônio. O sistema foi mantido em temperatura constante de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e variou-se o tempo de anodização em 10 e 30 min. A morfologia dos filmes foi avaliada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV – Quanta 650 FEG) e o diâmetro dos nanotubos foi determinado pelo *software ImageJ*. A molhabilidade dos materiais também foi investigada através da medida de ângulo de contato resultante de uma gotícula de água deionizada ($0,5 \text{ }\mu\text{L}$) posicionada sobre a superfície nanoporosa dos filmes, a fim de fotografar e verificar a capacidade dos *coatings* em absorver parcialmente o líquido. As amostras foram caracterizadas em relação ao substrato (T para *titanio* e A para *alloy*) e segundo o tempo de síntese (10 e 30 min).

Os *coatings* foram submetidos a incorporação do fármaco benzocaína ($0,4 \text{ g/L}$), através das técnicas *top filling* e imersão. *Top filling* consiste no preenchimento dos NTs, pipetando $50 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de BZC (previamente dissolvida em etanol) em cada face de modo a incorporar $0,04 \text{ mg}$ por filme, seguido pela secagem das amostras em estufa à $30 \text{ }^\circ\text{C}$. A segunda corresponde a imersão dos filmes em 10 mL de solução de BZC durante 24h a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), que em seguidas também foram secas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Duplicatas de substrato anodizadas em cada tempo foram utilizadas em cada técnica. A liberação *in vitro* do fármaco para ambas as técnicas foi realizada imergindo as amostras em

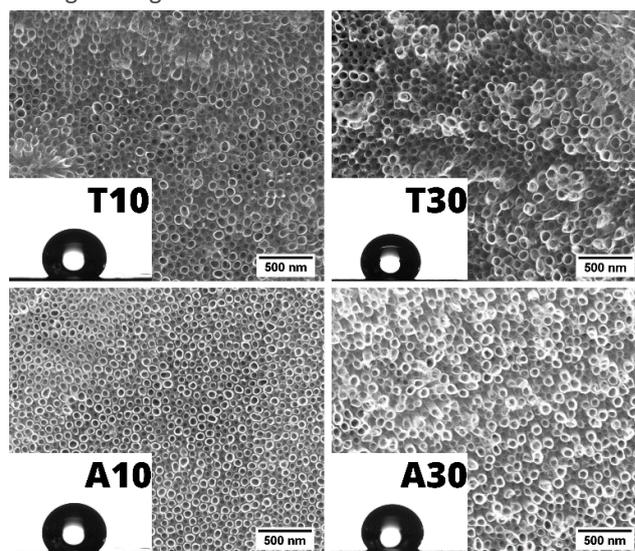
5 mL de água ultrapura (Milli-Q) a 37 °C. Foram coletadas alíquotas de 0,5 mL em intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 90, 120, 150, 180, 230, 280, 340 e 400 minutos. O volume retirado foi substituído por 0,5 mL de água ultrapura. A quantificação foi realizada por espectroscopia UV-Vis em 284 nm. Todos os *coatings* foram mantidos em água ultrapura durante 14 dias para posterior análise da quantidade total de massa adsorvida. A porcentagem em massa foi calculada pela massa cumulativa de benzocaína liberada dividida pela massa total incorporada por cada filme. Amostras com finais A e B referem-se as técnicas *top filling* e imersão, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises morfológicas dos *coatings* obtidos em diferentes tempos a partir de Ti-cp e Ti_6Al_4V apresentadas na Figura 1, mostram a formação de estruturas nanotubulares bem definidas em todas as condições de síntese. Com apenas 10 min de anodização obtêm-se NTs altamente organizados. Contudo, com o decorrer do tempo (30 min) observa-se uma desorganização estrutural dos TiO_2 NTs, indicando que auto-organização é inversamente proporcional ao aumento no tempo de nanotexturização.

Isso pode estar relacionado a formação de rachaduras e exposição prolongada dos NTs ao eletrólito contendo fluoreto, este que ataca as partes mais expostas, promovendo a dissolução das estruturas que tornam-se irregulares, originando os chamados *nanograss* (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011). Além disso, observa-se que os NTs formados a partir do Ti_6Al_4V são mais auto-organizados em relação as estruturas formadas a partir do Ti-cp, isso pode ser justificado pela composição heterogênea da liga, formada por estabilizadores $\alpha+\beta$ que promovem uma melhor conformação das nanoestruturas crescidas sobre o material (MOHAMMED; KHAN; SIDDIQUEE, 2014).

Figura 1 – Morfologia e ângulo de contato dos TiO_2 NTs obtidos em diferentes tempos



Fonte: Autoria própria (2020).

As medidas de ângulo de contato dos filmes obtidas em diferentes tempos estão anexadas ao MEV (Figura 1) e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

A análise estatística indica que os filmes obtidos em 10 e 30 min a partir da liga de Ti_6Al_4V não possuem diferença estatística. Por outro lado, para o Ti-cp observa-se um declínio do ângulo de contato em função do tempo. O que pode indicar que o aumento do tempo de anodização promove um aumento na molhabilidade do material, característica que favorece a melhora da osseointegração, decorrente da melhor adesão e proliferação celular sobre a superfície do implante (KUBIES et al., 2011). Em relação ao diâmetro dos nanotubos, observa-se que tanto para o titânio quanto para a liga, não há diferença estatística entre as amostras de 10 e 30 min.

Tabela 1 – Ângulo de contato e diâmetro dos nanotubos de Ti-cp e Ti_6Al_4V obtidos em 10 e 30 min de anodização

Amostras	Ângulo de contato (°)	Diâmetro dos nanotubos (nm)
T10	134,19 ± 8,53 ^a	40,80 ± 4,10 ^a
T30	120,1 ± 2,12 ^b	45,00 ± 3,60 ^a
A10	136,61 ± 1,11 ^a	37,64 ± 3,31 ^a
A30	140,73 ± 0,45 ^a	43,09 ± 4,04 ^a

* Valores que compartilham da mesma letra são estatisticamente equivalentes (ANOVA).
Fonte: Autoria própria (2020).

As curvas de massa cumulativa resultantes da incorporação pelas técnicas de *top filling* e imersão estão apresentadas nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Nas duas técnicas observa-se que os *coatings* apresentaram um perfil de liberação característico com grandes variações em torno da média, associado a uma cinética de liberação em patamares (ou níveis) em função do tempo. Além disso, os filmes obtidos em ambas as técnicas não obtiveram a liberação de 100% da massa total adsorvida do fármaco durante o tempo estabelecido (400 min). Em função disso, as massas foram novamente quantificadas após 14 dias imersas em água ultrapura.

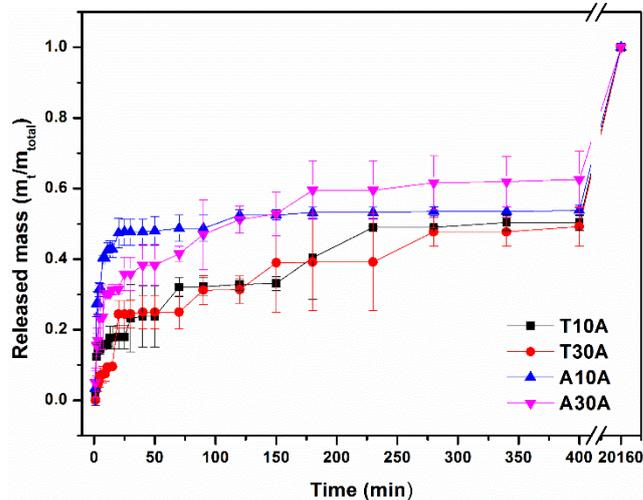
A análise de variância (ANOVA com teste de *Tukey*) indica que não há diferença estatística na quantidade de massa total incorporada e liberada em relação ao substrato ou tempo de anodização em *top filling* e imersão, ou seja, a técnica, o substrato e o tempo não influenciaram na quantidade de massa total adsorvida nas estruturas nanotubulares. No entanto, as amostras apresentam um comportamento de liberação diferente entre elas durante os 400 min definidos.

Para as curvas de *top filling* observa-se que durante o tempo estabelecido (400 min) há um padrão no comportamento das amostras em função da natureza do substrato. As amostras A10A e A30A liberaram uma grande quantidade de fármaco nos primeiros minutos. Embora os resultados de diâmetro dos nanotubos não tenham apresentado diferença estatística nesse estudo, em trabalhos anteriores de Ferreira et al. (2019), o diâmetro interno das estruturas crescidas na liga de Ti_6Al_4V são menores do que as crescidas no titânio, evidenciando que o comportamento da liga pode estar relacionado ao diâmetro dos NTs e, conseqüentemente, ao efeito da capilaridade. Pois, com o decréscimo do diâmetro, maior é a força de adesão das moléculas às paredes dos NTs, conseqüentemente, menores são as forças de coesão entre as moléculas de BZC, fazendo com que subam para a superfície dos NTs, assim, quanto menor o diâmetro, maior é o efeito da capilaridade. Portanto, essa característica da superfície da liga pode ter influenciado no elevado *burst* inicial, a “liberação de

rajada”, ou seja, difusão das moléculas de BZC a partir dos NTs obtidos da liga (HUANG; BRAZEL, 2001).

Por outro lado, as amostras T10A e T30A apresentaram uma liberação inicial menor e com pouca diferença significativa. Ao que tudo indica, na incorporação por *top filling* não há influência do tempo de síntese na liberação da droga e sim, da superfície dos diferentes substratos, demonstrando que a camada de TiO₂ formada a partir da liga apresentou menor interação com o fármaco e, portanto, liberou uma alta taxa de medicamento nos primeiros minutos, ao passo que o óxido formado a partir do Ti-cp obteve maior interação com as moléculas de BZC, retardando a liberação, visto que os filmes a partir do Ti-cp liberaram menor massa de fármaco durante os 400 min.

Figura 2 – Massa cumulativa de benzocaína liberada dos filmes obtidos em diferentes tempos a partir de Ti-cp e Ti₆Al₄V referente ao método de *top filling*



Fonte: Autoria própria (2020).

Para as curvas de liberação obtidas a partir da incorporação por imersão das amostras na solução de fármaco observa-se que a T30B apresentou uma maior velocidade de liberação, com níveis mais elevados em relação as demais, seguida pela amostra A10B, que antecede a T10B, e por fim, antecede a A30B. Os resultados de liberação obtidos apresentam uma estreita relação entre a cinética de liberação das amostras com a molhabilidade dos materiais.

Através das medidas, observa-se que a amostra T30B apresentou uma maior taxa de liberação e possui o menor ângulo de contato. Como a molhabilidade caracteriza-se pela capacidade que um fluido tem em aderir ou se espalhar em uma superfície sólida, um baixo ângulo de contato indica uma maior molhabilidade, e conseqüentemente um caráter mais hidrofílico em relação as demais (MENZIES; JONES, 2010). Além disso, o fármaco BZC apresenta uma estrutura química do tipo éster que não apresenta na sua extremidade terminal um grupo amino como a maioria dos representantes da classe de AL (Anestésico Local), caracterizando como uma molécula anestésica com caráter hidrofóbico (COURTNEY; STRICHARTZ, 1987).

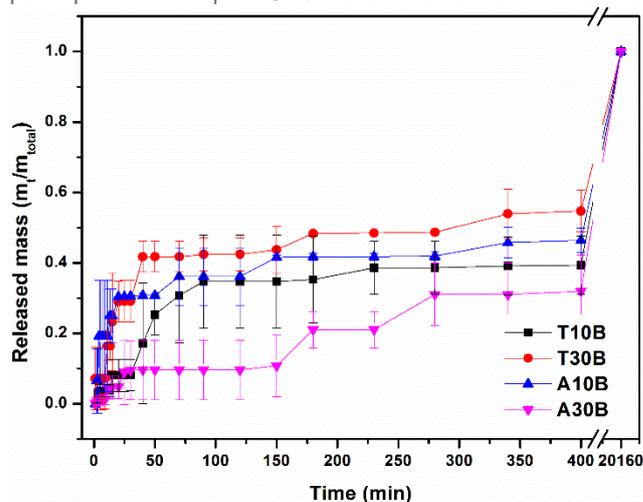
Como a amostra T30B apresenta uma maior molhabilidade e o fármaco um caráter hidrofóbico, uma possível explicação é que a camada nanotubular do filme apresente baixa interação com as moléculas de BZC, refletindo em uma maior

cinética de liberação. Por outro lado, a amostra A30 apresentou uma taxa de liberação inferior em relação às demais, assim como um maior ângulo de contato que indica uma baixa molhabilidade, conseqüentemente, pode apresentar uma maior interação com as moléculas de BZC que possuem baixa solubilidade em meio aquoso, fazendo com que a amostra apresente uma cinética de liberação retardada.

A liberação lenta em virtude da hidrofobicidade da molécula anestésica é favorável para aplicações biomédicas devido ao aumento da potência anestésica do fármaco, pois segundo Courtney e Strichartz (1987) quanto maior a hidrofobicidade da molécula, menos medicamento é necessário para o completo bloqueio da atividade fisiológica e elétrica, além de prolongar o efeito anestésico do fármaco.

As amostras A10B e T10B não seguiram o mesmo padrão de comportamento ao analisar os ângulos de contato obtidos, visto que o aumento da velocidade de liberação se apresentou inversamente proporcional ao ângulo nas demais amostras. Entretanto, observa-se que as medidas dessas duas amostras não apresentam uma diferença significativa entre elas, as curvas demonstram grandes variações e apresentam uma maior proximidade considerando os desvios.

Figura 3 – Massa cumulativa de benzocaína liberada dos filmes obtidos em diferentes tempos a partir de Ti-cp e Ti₆Al₄V referente ao método de imersão



Fonte: Autoria própria (2020).

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a baixa solubilidade da benzocaína em meio aquoso pode ter influenciado no comportamento de liberação em patamares e no retardo de liberação do fármaco. Comparado a estudos de Ferreira et al. (2019) que utilizaram o cloridrato de ciprofloxacino como fármaco modelo para a mesma finalidade, a benzocaína liberada a partir dessas plataformas de TiO₂NTs exibiram um elevado tempo de liberação.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que a incorporação e liberação de benzocaína a partir dos NTs sintetizados em diferentes tempos indica que não há influência do método de incorporação, tipo de substrato e tempo de anodização

na quantidade de massa adsorvida. Contudo, os efeitos são visíveis no comportamento de liberação. A técnica *top filling* promoveu uma divisão no padrão de comportamento de liberação dos nanotubos formados a partir dos diferentes substratos, onde os TiO₂NTs crescidos em Ti-cp obtiveram maior interação com as moléculas de BZC, retardando a liberação em relação ao Ti₆Al₄V nos dois tempos de síntese, sendo que a liga apresentou um *burst* inicial mais elevado. Os resultados de liberação para a técnica de imersão apresentaram uma relação direta entre a cinética de liberação das amostras com a molhabilidade dos materiais, um alto ângulo de contato indica maior interação com as moléculas do fármaco (que possuem baixa solubilidade em meio aquoso) apresentando uma baixa velocidade de liberação, evidenciando assim, a notável interação entre os *coatings* e as propriedades do fármaco utilizado.

As propriedades identificadas são favoráveis para o desenvolvimento de novas tecnologias aplicáveis a indústria de biomateriais, visto que o método permite a formação de nanotubos auto organizados, permitindo o uso como plataformas de liberação de benzocaína incorporada por diferentes técnicas. Além de promover a liberação da droga em um longo tempo de estudo, o que indica um efeito prolongado da atividade do fármaco no corpo humano sustentando a ação terapêutica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária, UTFPR Campus Pato Branco e ao CNPEM (LNNano) pelas estruturas e equipamentos fornecidos possibilitando a execução do trabalho.

REFERÊNCIAS

COURTNEY, K. R.; STRICHARTZ, G. R. Structural Elements which Determine Local Anesthetic Activity. *In: Local Anesthetics*. vol. 81, Springer-Verlag, Berlin. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-71110-7_3. Acesso em: 20 ago. 2020.

FERREIRA, C. H.; SIMON, A. P.; SANTOS, V. A. Q.; RODRIGUES, A.; SANTOS, J. S.; TRIVINHO-STRIXINO, F.; MARQUES, P. T.; SIKORA, M. D. S. Nanotexturization of Ti-based implants in simulated body fluid: Influence of synthesis parameters on coating properties and kinetics of drug release. **Journal of Materials Research**, v. 34, n. 16, p. 2828–2836, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1557/jmr.2019.216>. Acesso em: 19 ago. 2020.

HAMOUDA, I. M. Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. **Journal of Biomedical Research**, v. 26, n. 3, p. 143–151, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.7555/JBR.26.20120027>. Acesso em: 19 ago. 2020.

HUANG, X.; BRAZEL, C. S. **On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems.** [S. l.: s. n.] Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00248-6). Acesso em: 19 ago. 2020.

KUBIES, D.; HIMMLOVÁ, L.; RIEDEL, T.; CHÁNOVÁ, E.; BALÍK, K.; DOUDĚROVÁ, M.; BÁRTOVÁ, J.; PEŠÁKOVÁ, V.; KUBIES, D. The Interaction of Osteoblasts With Bone-Implant Materials: 1. The Effect of Physicochemical Surface Properties of Implant Materials. **Physiol. Res**, v. 60, p. 95–111, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.33549/physiolres.931882>. Acesso em: 29 ago. 2020.

MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; FILHO, N. L. D.; DE PAULA, E.; DE ARAÚJO, D. R. Development and characterization of poli (L-lactide) nanocapsules containing benzocaine. **Química Nova**, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100013>. Acesso em: 19 ago. 2020.

MENZIES, K. L.; JONES, L. **The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181da863e>. Acesso em: 22 ago. 2020.

MOHAMMED, M. T.; KHAN, Z. A.; SIDDIQUEE, A. N. Surface Modifications of Titanium Materials for developing Corrosion Behavior in Human Body Environment: A Review. **Procedia Materials Science**, v. 6, n. December, p. 1610–1618, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2014.07.144>. Acesso em: 22 ago. 2020.

ROY, P.; BERGER, S.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes: Synthesis and applications. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 13, p. 2904–2939, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.201001374>. Acesso em: 22 ago. 2020.