

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**  
**CAMPUS POÇOS DE CALDAS**

**CAROLINA CRUZ FERREIRA**

**INCORPORAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* EM SOLUÇÃO  
DE POLICAPROLACTONA PARA RECOBRIMENTO DE TITÂNIO  
COMERCIALMENTE PURO APLICADO COMO BIOMATERIAL**

Poços de Caldas/MG

2020

**CAROLINA CRUZ FERREIRA**

**INCORPORAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* EM SOLUÇÃO  
DE POLICAPROLACTONA PARA RECOBRIMENTO DE TITÂNIO  
COMERCIALMENTE PURO APLICADO COMO BIOMATERIAL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais, pela Universidade Federal de Alfenas - *Campus* Poços de Caldas - MG. Área de Concentração: Caracterização e Aplicação de materiais.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Neide Aparecida Mariano

Poços de Caldas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca campus Poços de Caldas

F383i Ferreira, Carolina Cruz.  
Incorporação de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em  
solução de policaprolactona para recobrimento de titânio  
comercialmente puro aplicado como biomaterial / Carolina Cruz  
Ferreira. – Poços de Caldas/MG, 2020.  
111 f. –

Orientador(a): Neide Aparecida Mariano.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) –  
Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2020.  
Bibliografia.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Titânio 3. Hidroxiapatita. 4.  
Essências e óleos essenciais. I. Mariano, Neide Aparecida. II. Título.

CDD – 620.11

**CAROLINA CRUZ FERREIRA**

**INCORPORAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* EM SOLUÇÃO  
DE POLICAPROLACTONA PARA RECOBRIMENTO DE TITÂNIO  
COMERCIALMENTE PURO APLICADO COMO BIOMATERIAL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais, pela Universidade Federal de Alfenas - *Campus* Poços de Caldas - MG. Área de Concentração: Caracterização e Aplicação de materiais.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neide Aparecida Mariano

Aprovada em: 19/02/2020

Prof<sup>a</sup>.: Dr<sup>a</sup>. Neide Aparecida Mariano

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof<sup>a</sup>.: Dr. Rafael Firmani Perna

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof: Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Assinatura:

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me guiar, iluminar e me dar serenidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar diante dos obstáculos. Agradeço a Ele por colocar pessoas incríveis durante essa jornada, tornando-a mais leve e suportável.

Em especial à minha mãe, minha guerreira, inspiração diária, meu porto seguro.

Aos meus amigos, pela cumplicidade e presença constante, motivando-me a seguir em frente. Obrigada a cada um que tive a oportunidade de conhecer e conviver nos laboratórios do FINEP, por todo aprendizado e por cada conquista compartilhada durante esse período.

Meu profundo agradecimento e admiração à Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Neide Mariano, por toda dedicação e ensinamentos durante todos esses anos. À sempre atenciosa Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucíola Lucena de Sousa por me acolher e me incentivar. À Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Gabriela N. Campos pelo carinho e disposição em auxiliar no desenvolvimento das atividades.

Agradeço aos demais professores e servidores do PPGCEM/UNIFAL que contribuíram para a concretização deste momento.

Agradeço também à todas as instituições parceiras, DEMa-UFSCar, FZEA-USP, IQ-UNESP e UNIFEI, pela colaboração na realização das análises.

À UNIFAL, CAPES, FAPEMIG, FAPESP E CNPq pelo aporte educacional e financeiro.

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

Obrigada a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta conquista!

*“O que será real?  
Dessa janela eu via  
Que o mundo atual  
Não me agradaria  
Por que não escolher?  
Eu mesmo definir qual  
Devo eu acolher  
Só eu sei”*

*(A Luz e a Sombra – Scalene)*

## RESUMO

Os avanços nas áreas da saúde e bioengenharia têm possibilitado o desenvolvimento de dispositivos médicos que permitam a recuperação parcial ou total de órgãos e tecidos danificados em decorrência de acidentes ou doenças degenerativas. As próteses metálicas são as mais utilizadas, sendo o titânio o metal mais aplicado na confecção das mesmas, devido às suas propriedades mecânicas aliadas à excelente biocompatibilidade. Visando potencializar o dispositivo a ser implantado, a aplicação de biomateriais poliméricos e cerâmicos está sendo estudada. O uso da policaprolactona tem demonstrado características promissoras, por sua biodegradabilidade. Em substitutos ortopédicos, a adição de hidroxiapatita tem favorecido a osteointegração. No entanto, complicações ligadas a processos infecciosos são recorrentes aos procedimentos cirúrgicos. Como estratégia para minimizar as contaminações bacterianas pós cirúrgicas, o presente projeto propôs a incorporação de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* como bactericida natural, em recobrimento de policaprolactona e de hidroxiapatita em substrato de titânio (grau 4). As amostras foram caracterizadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia por Energia Dispersiva, Difração de Raios X e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, demonstrando que o recobrimento foi realizado por toda a superfície do material e que a incorporação do óleo essencial não alterou a morfologia do filme polimérico. Visando avaliar o desempenho biológico e a evolução do crescimento da camada apatítica superficial, as amostras foram submetidas a ensaio de bioatividade em fluido corpóreo simulado durante quatro semanas. Constatou-se ainda, uma evolução da camada de hidroxiapatita de modo homogêneo e com característica globular, apreciável para o processo osteointegrativo. As curvas obtidas no ensaio de corrosão demonstraram que o recobrimento combinando hidroxiapatita, policaprolactona e o óleo essencial foi mais resistente ao processo corrosivo, por apresentar maior potencial de corrosão. Para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial, as amostras foram submetidas a ensaios microbiológicos de disco-difusão em ágar para as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os halos de inibição formados foram de pequena dimensão, sendo as culturas de *Escherichia coli* mais sensíveis ao óleo essencial. Portanto, conclui-se que os sistemas propostos apresentam características desejáveis para aplicação em implantes médicos, sugerindo que os mesmos são favoráveis ao processo osteointegrativo.

**Palavras chave:** Titânio. Policaprolactona. Hidroxiapatita, *Melaleuca alternifolia*.

## ABSTRACT

Advances in health and bioengineering have enabled the development of medical devices that allow partial or total recovery of organs and tissues damaged due to accidents or degenerative diseases. Metallic prostheses are the most used, with titanium being the most applied metal in their manufacture, due to its mechanical properties combined with excellent biocompatibility. In order to enhance the device to be implanted, the application of polymeric and ceramic biomaterials is being studied. The use of polycaprolactone has shown promising characteristics, due to its biodegradability. In orthopedic substitutes, the addition of hydroxyapatite has favored the osteointegration process. However, complications related to infectious processes are recurrent to surgical procedures. As a strategy to minimize post-surgical bacterial contamination, the present project proposed the incorporation of essential oil of *Melaleuca alternifolia* as a natural bactericide, covering polycaprolactone and hydroxyapatite on a titanium substrate (grade 4). The samples were characterized by Scanning Electron Microscopy, Dispersive Energy Spectroscopy, X-Ray Diffraction and Fourier Transform Infrared Spectroscopy, demonstrating that the coating was performed over the entire surface of the material and that the incorporation of essential oil did not alter the morphology of the polymeric film. Aiming to evaluate the biological performance and the evolution of the growth of the apatitic superficial layer, the samples were submitted to a bioactivity test in a Simulated Body Fluid medium for four weeks. It was found also an evolution of the hydroxyapatite layer in a homogeneous way and with a globular characteristic, appreciable for the osteointegrative process. The curves obtained in the corrosion test showed that the coating combining hydroxyapatite, polycaprolactone and the essential oil was more resistant to the corrosive process, as it presents a higher corrosion potential. To evaluate the antimicrobial activity of the essential oil, the samples were subjected to microbiological assays of disk-diffusion on agar for the strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The inhibition halos formed were small in size, with *Escherichia coli* cultures being more sensitive to essential oil. Therefore, it is concluded that the proposed systems have desirable characteristics for application in medical implants, suggesting that they are favorable to the osteointegrative process.

**Keywords:** Titanium. Polycaprolactone. Hydroxyapatite. *Melaleuca alternifolia*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alotropia do Titânio .....	23
Figura 2 – Estrutura química da Policaprolactona (PCL).....	27
Figura 3 – Estrutura química da Hidroxiapatita (HA).....	31
Figura 4 – Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	38
Figura 5 – Aparato experimental para ensaio de corrosão por polarização.....	42
Figura 6 – Curva típica de polarização do comportamento ativo-passivo de um metal.....	44
Figura 7 – Princípio do teste suscetibilidade pela metodologia do disco-difusão.....	46
Figura 8 – Fluxograma dos métodos utilizados no trabalho.....	49
Figura 9 – Aparato experimental e célula eletroquímica (em detalhe).....	54
Figura 10 – Micrografia obtida por MEV (em detalhes) para o filme PCL+OE.....	56
Figura 11 – Filme PCL+OE.....	57
Figura 12 – Micrografia obtida por MEV e espectro obtido na microanálise por EDS na região A, para o filme PCL .....	57
Figura 13 – Espectro de infravermelho obtido para o óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	58
Figura 14 – Espectro de infravermelho obtido para o filme de PCL incorporado com óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	58
Figura 15 – Micrografia obtida por MEV (visão geral) para amostra de Ti+PCL+OE .....	59
Figura 16 – Amostra Ti+ PCL+OE .....	60
Figura 17 – Espectro do difração de raios X para a amostra de Ti + PCL + OE.....	60
Figura 18 – Espectro de infravermelho obtido para a amostra de Ti c.p. recoberta com filme de PCL incorporado com óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	61
Figura 19 – Mecanismo de formação de apatita sobre superfície de Ti pré-tratada alcalina e termicamente .....	63
Figura 20 – Micrografia obtida por MEV (visão geral) para amostra de Ti+HA+PCL+OE .	64
Figura 21 – Amostra Ti+ HA+PCL+OE .....	64
Figura 22 – Espectro do difração de raios X para a amostra de Ti + HA+PCL + OE .....	65
Figura 23 – Espectro de infravermelho obtido para a amostra de Ti c.p. recoberta com HA e filme de PCL incorporado com óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	67
Figura 24 – Micrografias obtidas por MEV (visão geral) para amostra Ti+PCL+OE após ensaio de bioatividade .....	69

Figura 25 – Micrografias obtidas por MEV (em detalhes) e espectros obtidos por microanálise por EDS na região A, para ensaio de bioatividade da amostra Ti+ PCL+OE.....	70
Figura 26 – Micrografias obtidas por MEV do ensaio de bioatividade do Ti c.p .....	71
Figura 27 – Espectros obtidos na microanálise por EDS do Ti c.p nos pontos assinalados...	72
Figura 28 – Micrografias obtidas por MEV (em detalhes) e espectros obtido por microanálise por EDS na região A, para ensaio de bioatividade da amostra Ti+ PCL .....	73
Figura 29 – Espectro de infravermelho obtido após ensaio de bioatividade para a amostra Ti+PCL+OE .....	74
Figura 30 – Espectro de infravermelho obtido após a 1ª e 4ª semanas de ensaio de bioatividade para a amostra Ti+PCL+OE.....	75
Figura 31 – Micrografias obtidas por MEV (visão geral) para amostra Ti+HA+PCL+OE após ensaio de bioatividade .....	76
Figura 32 – Micrografias obtidas por MEV (em detalhes) e espectros obtidos por microanálise por EDS na região A, para ensaio de bioatividade da amostra Ti+HA+ PCL+OE .....	77
Figura 33 – Espectro de infravermelho obtido após ensaio de bioatividade para a amostra Ti+HA+PCL+OE .....	78
Figura 34 – Espectro de infravermelho obtido após a 1ª e 4ª semanas de ensaio de bioatividade para a amostra Ti+HA+PCL+OE.....	78
Figura 35 – Curvas de OCP para as condições Ti+PCL+OE e Ti+HA+PCL+OE em meio 1,5 SBF, a 36,5°C e pH 7,4 .....	80
Figura 36 – Curvas de polarização potenciadinâmica e extrapolação das retas de Tafel para amostra de Ti c.p. (grau 4) .....	81
Figura 37 – Curva de polarização linear para as condições Ti+PCL+OE e Ti+HA+PCL+OE, em meio 1,5 SBF, a 36,5°C e pH 7,4 .....	82
Figura 38 – Zona de inibição das condições para cepas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> (Teste de disco-difusão).....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Biomateriais e aplicações .....	17
Tabela 2 – Composição química máxima para Ti c.p. e liga Ti6Al4V, segundo norma ASTM .....	24
Tabela 3 – Polímeros sintéticos bioabsorvíveis aplicados no reparo de tecido ósseo .....	26
Tabela 4 – Classificação dos Fosfatos de Cálcio pela razão atômica Ca/P .....	29
Tabela 5 – Reagentes utilizados para preparo de 1L de solução SBF .....	48
Tabela 6 – Comparação entre a concentração iônica do SBF e do plasma sanguíneo humano .....	49
Tabela 7 – Descrição das condições estudadas .....	50
Tabela 8 – Resultados da Microanálises semiquantitativa por EDS na região A das amostras Ti+PCL+OE e Ti+ HA+PCL+OE.....	65
Tabela 9 – Bandas de absorção obtidas por FTIR.....	68
Tabela 10 – Potenciais obtidos no ensaio de OCP para as amostras Ti+HA+PCL+OE e Ti+PCL+OE. ....	80
Tabela 11 – Parâmetros eletroquímicos para as condições Ti+PCL+OE e Ti+HA+PCL+OE... ..	82
Tabela 12 – Zona de inibição das condições para as cepas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> (Teste de disco-difusão) .....	84
Tabela 13 – Zona de inibição em resposta ao óleo essencial de melaleuca e discos antibióticos convencionais .....	86
Tabela 14 – Composição química do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AISI</b>	<i>American Iron and Steel Institute</i>
<b>ASTM</b>	<i>American Society for Testing and Materials</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATR</b>	Refletância Total Atenuada (do inglês <i>Attenuated Total Reflectance</i> )
<b>CaP</b>	Fosfatos de Cálcio
<b>CCC</b>	Cúbica de Corpo Centrado
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>DRX</b>	Difração de raios X
<b>E<sub>corr</sub></b>	Potencial de Corrosão
<b>ECS</b>	Eletrodo de Calomelano Saturado
<b>EDS</b>	Espectroscopia por Energia Dispersiva (do inglês <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> )
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
<b>HA</b>	Hidroxiapatita
<b>HCP</b>	Hexagonal Compacta
<b>I<sub>corr</sub></b>	Densidade de Corrente de Corrosão
<b>I<sub>pass</sub></b>	Densidade de Corrente de Passivação
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i>
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>M<sub>n</sub></b>	Massa Molar Numérica
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>OCP</b>	Potencial de Circuito Aberto (do inglês <i>Open Circuit Potential</i> )
<b>OE</b>	Óleo Essencial
<b>PCL</b>	Policaprolactona
<b>SBF</b>	Fluido Corpóreo Simulado (do inglês <i>Simulated Body Fluid</i> )
<b>Ti c.p.</b>	Titânio comercialmente puro
<b>TTO</b>	<i>Tea Tree Oil</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
2.1	BIOMATERIAIS .....	16
2.2	TECIDO ÓSSEO.....	18
2.3	BIOMATERIAIS METÁLICOS .....	20
<b>2.3.1</b>	<b>Titânio e suas ligas.....</b>	<b>21</b>
2.4	POLÍMEROS .....	25
<b>2.4.1</b>	<b>Policaprolactona .....</b>	<b>26</b>
2.5	FOSFATOS DE CÁLCIO.....	28
<b>2.5.1</b>	<b>Hidroxiapatita.....</b>	<b>30</b>
2.6	RECOBRIMENTOS .....	32
2.7	BACTERICIDAS .....	33
<b>2.7.1</b>	<b>Óleos Essenciais .....</b>	<b>35</b>
2.7.1.1	Óleo Essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	37
2.8	ENSAIO DE BIOATIVIDADE .....	39
2.9	ENSAIO DE CORROSÃO .....	40
2.10	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA .....	45
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
3.1	MATERIAIS .....	48
3.2	MÉTODOS.....	49
<b>3.2.1</b>	<b>Identificação das condições avaliadas.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Preparo das amostras de Ti c.p.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Recobrimento das amostras .....</b>	<b>51</b>
3.2.3.1	Recobrimento Biomimético .....	51
3.2.3.2	Recobrimento Polimérico.....	51
<b>3.2.4</b>	<b>Caracterização Microestrutural .....</b>	<b>52</b>
3.2.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura / Espectroscopia por Energia Dispersiva.....	52
3.2.4.2	Difração de raios X.....	52
3.2.4.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier .....	53
<b>3.2.5</b>	<b>Ensaio de Bioatividade.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Ensaio de Corrosão .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Ensaio Microbiológico.....</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>

4.1	CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL .....	56
4.1.1	<b>Caracterização Microestrutural do Filme PCL+OE .....</b>	<b>56</b>
4.1.2	<b>Caracterização Microestrutural do Ti+PCL+OE .....</b>	<b>59</b>
4.1.3	<b>Caracterização Microestrutural do Ti+HA+PCL+OE.....</b>	<b>62</b>
4.2	ENSAIO DE BIOATIVIDADE .....	69
4.2.1	<b>Condição Ti + PCL + OE.....</b>	<b>69</b>
4.2.2	<b>Condição Ti + HA + PCL + OE .....</b>	<b>75</b>
4.3	ENSAIO DE CORROSÃO .....	79
4.3.1	<b>Circuito Aberto.....</b>	<b>79</b>
4.3.2	<b>Polarização Linear .....</b>	<b>81</b>
4.4	ENSAIO MICROBIOLÓGICO .....	83
5	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
6	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>88</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>105</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças acometem a população mundial, impactando no funcionamento de células e tecidos. A utilização de materiais sintéticos, como substitutos parciais ou totais de tecidos biológicos e próteses artificiais para reestabelecer as funções sistêmicas, sempre foi uma grande preocupação na área médica, justificando a investigação de novos materiais na engenharia de tecidos. O titânio e suas ligas apresentam uma grande aplicação neste mercado uma vez que aliam resistência mecânica e alta resistência à corrosão em fluidos corpóreos, além de serem biocompatíveis (ALVES, 2013; KULKARNI *et al.*, 2014; MONTANHA, 2012; SILVA, 2012).

Novas pesquisas estão sendo desenvolvidas, com o intuito de otimizar os materiais metálicos tradicionalmente aplicados na confecção desses dispositivos médicos, aumentando sua eficácia e melhorando o processo de regeneração tecidual e consequente recuperação do paciente. Diferentes tipos de biomateriais (naturais e sintéticos) têm se mostrado potencialmente aplicáveis para estes fins, sendo que sua escolha é crucial durante o desenvolvimento das próteses, uma vez que não devem produzir reação adversa local ou sistêmica, não podendo ser tóxico, carcinogênico, antigênico e mutagênico (GHANBARI *et al.*, 2009 *apud*. ALVES, 2013; MONTANHA, 2012; SILVA, 2012).

Dentre os materiais potencialmente aplicáveis para estes fins, destaca-se a hidroxiapatita (HA), material biocerâmico que apresenta baixo risco de inflamação, baixa toxicidade e grande aceitação pelo sistema biológico, além de acelerar o processo osteointegrativo devido à composição química semelhante à fase mineral de ossos e dentes (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; MIRANTE, 2015; SHERESTHA; JOSHI, 2014; SHOJA *et al.*, 2015; VITAL *et al.*, 2006).

A policaprolactona (PCL), material polimérico sintético muito utilizado como agente biológico, principalmente àqueles relacionados com a liberação controlada de fármacos, é caracterizada por sua versatilidade, biocompatibilidade e a biodegradabilidade (MIRANTE, 2015; SHERESTHA; JOSHI, 2014; SHOJA *et al.*, 2015; VITAL *et al.*, 2006).

Os procedimentos cirúrgicos de implantação envolvem riscos de infecção associados à contaminação do implante e/ou às condições do paciente e da cirurgia. A contaminação bacteriana e a formação de biofilmes são as principais causas de complicações pós cirúrgicas

de implantação, seguida das reações de rejeição. Sendo assim, estudos são realizados visando a incorporação de agentes bactericidas nas superfícies dos materiais a serem implantados. (KULKARNI *et al.*, 2014; RAPHEL *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais constituem uma pequena fração das plantas, composta por uma mistura de substâncias voláteis e não voláteis, conhecidos por seus aromas característicos. São amplamente aplicados como flavorizantes nas indústrias alimentícias e cosméticas, tendo grande destaque na formulação de medicamentos, devido à atividade antioxidante e antimicrobiana dos compostos terpênicos presentes, além de serem naturais e biodegradáveis, podendo atuar, simultaneamente, sobre várias moléculas alvo, quando comparado a fármacos sintéticos (CARNEIRO *et al.*, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; FLORES; BECK; SILVA, 2016; MIRANDA, 2014).

Neste contexto, o presente trabalho estudou a incorporação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em solução polimérica de PCL para o recobrimento de amostras de titânio comercialmente utilizadas na fabricação de próteses artificiais, de modo a modificar a superfície do material, deixando-a mais bioativa e resistente à ação bacteriana.

Para isso, avaliou-se o desempenho da incorporação de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em solução polimérica de PCL, utilizada para recobrir amostras de Ti comercialmente puro (Ti c.p. - grau 4) com e sem recobrimento biomimético prévio de HA, visando potencial aplicação em implantes. As amostras foram caracterizadas por meio de técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Ensaio de Corrosão por Polarização Linear, avaliando a possível alteração na morfologia do filme polimérico após a incorporação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, além de avaliar a bioatividade e eficácia do recobrimento biomimético no processo osseointegrativo. Ensaio microbiológicos de disco-difusão em ágar também foram realizados para verificar a capacidade antimicrobiana do recobrimento proposto.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Inúmeras doenças afetam diretamente o funcionamento de tecidos e órgãos, acometendo milhares de pessoas ao redor do mundo. Em grande parte dos casos, o uso de implantes artificiais é o tratamento recomendado para que o paciente possa ter as funções sistêmicas restabelecidas, bem como a regeneração dos tecidos lesionados. Os materiais metálicos são amplamente empregados, sendo o titânio e suas ligas os materiais mais difundidos, visto que combinam boas propriedades mecânicas com elevada biocompatibilidade (ALVES, 2013; CATAURO *et al.*, 2014; LEWALLEN *et al.*, 2015).

Tais materiais são classificados como inertes, uma vez que não sofrem erosões ou desgastes acentuados quando em ambientes *in vivo*, devido à sua alta resistência à corrosão, característica decorrente de sua capacidade em formar uma película de óxido quimicamente estável que atua como uma proteção contínua (CATAURO *et al.*, 2014; KULKARNI *et al.*, 2014).

Esta camada é formada espontaneamente e instantaneamente a partir da reação com o oxigênio presente no ambiente biológico, interrompendo imediatamente o processo corrosivo. A morfologia e espessura dessa camada protetora dependem das condições ambiente, sendo mais comumente encontrada na composição de  $TiO_2$ ,  $Ti_2O_3$  e  $TiO$  (CATAURO *et al.*, 2014; KULKARNI *et al.*, 2014).

O alto volume anual de procedimentos cirúrgicos e intervenções relacionadas com implantes, bem como as imperfeições encontradas e limitações das próteses metálicas, são fatores que têm impulsionado a intensiva pesquisa e busca de alternativas para aprimorá-las, ganhando espaço como estratégia para desenvolvimento de novos implantes médicos o uso de aditivos poliméricos e cerâmicos na confecção de materiais híbridos bioativos. Novos estudos sugerem a utilização de biomateriais na área médica, devido a propriedades que são atraentes para confecção de implantes, como sua gradual absorção pelo organismo e sua biodegradação que deve gerar subprodutos atóxicos eliminados pelas vias metabólicas normais (ALVES, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SILVA, 2012).

## 2.1 BIOMATERIAIS

O aumento de doenças e fraturas ósseas tem suscitado um grande interesse no desenvolvimento de biomateriais aplicados na substituição e regeneração de tecidos. Impulsionado pelo envelhecimento populacional e pelo desejo da manutenção das atividades cotidianas com qualidade, o uso de implantes cresceu notavelmente nos últimos anos, fazendo com que o mercado de biomaterial tivesse sua avaliação aumentada de US \$ 94,1 bilhões em 2012 para US \$ 134,3 bilhões em 2017, com uma projeção de US \$ 250 bilhões em 2025 (PRASAD *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2018).

Toda substância utilizada para tratar ou substituir um tecido, órgão ou função de algum sistema do organismo, é considerada um biomaterial. Esta pode ser de origem natural ou sintética, podendo permanecer em contato com o local de forma temporária ou permanente (HELMUS; TWEDEN, 1995).

Os biomateriais se diferenciam dos materiais convencionais por possuírem uma combinação de propriedades mecânicas, físico-químicas e biológicas que viabilizam sua implantação, sem gerar qualquer reação adversa, devendo ser atóxicos, não carcinogênicos, antigênicos e não mutagênicos (RODRIGUES, 2013; SILVA, 2005).

Sua seleção é feita a partir da similaridade ao local a ser substituído, visando à máxima aceitação. Além disso, eles devem ser biofuncionais e biocompatíveis, ou seja, além de desempenhar a função desejada, este material deve ser compatível ao meio biológico em que será inserido e deverá permanecer neste meio (APARECIDA, 2006).

Os biomateriais podem ser categorizados de três maneiras: bioinertes, bioativos e bioreabsorvíveis – conforme o aspecto fisiológico do sítio a ser substituído.

Os bioinertes, englobam todas as substâncias facilmente aceitas pelo corpo receptor, visto que não provocam nenhuma reação química com o mesmo ou liberação de componentes. Os materiais bioativos interagem diretamente com o tecido, induzindo a formação de uma ligação química na interface tecido-implante, denominada bioadesão, favorecendo a absorção da prótese. Os materiais bioreabsorvíveis ou biodegradáveis, são de elevado interesse médico, visto que serão solubilizados e expelidos pelo organismo de modo gradual pelas vias metabólicas normais (BASU; KATTI; KUMAR, 2009; BHAT, 2002; HENCH, 2016; KAWACHI *et al.*, 2000).

O termo bioinerte, apesar de amplamente utilizado, é considerado inadequado segundo a Conferência da Sociedade Européia para Biomateriais de 1986, uma vez que todo material irá induzir, ainda que minimamente, alguma resposta do organismo hospedeiro. Desta maneira, também são designados como quase inertes (BASU; KATTI; KUMAR, 2009; BHAT, 2002; HENCH, 2016; KAWACHI *et al.*, 2000).

Uma quarta classificação também pode ser encontrada na literatura, a dos materiais biotoleráveis. Assim como os bioinertes, o material implantado sofrerá um encapsulamento por uma camada fibrosa aderente, a qual terá espessura variável de acordo com as condições do implante, tecido receptor e das cargas mecânicas as quais estes serão submetidos (APARECIDA, 2006; CAO; HENCH, 1996).

Existe uma grande variedade de possíveis biomateriais para usar em qualquer aplicação biomédica. As quatro classes ou tipos básicos de materiais são metais e ligas, cerâmicas e vidros, polímeros e compósitos. A Tabela 1 exemplifica biomateriais de acordo com sua classificação, apontando suas vantagens e desvantagens (APARECIDA, 2006; HENCH, 2016; KUHN, 2012).

Tabela 1 - Biomateriais e aplicações

CLASSE	BIOMATERIAL	APLICAÇÕES	VANTAGENS	DESVANTAGENS
<b>Metais e ligas</b>	- Aço inoxidável - Ligas de titânio - Ligas de Co-Cr	- Fixação ortopédica - Implantes dentários - Próteses cardíacas - Eletrodos neurais	- Alta força de tensão - Alta resistência ao desgaste - Alta energia de deformação	- Baixa biocompatibilidade - Corrosão em meio fisiológico - Perda de propriedades mecânicas com tecidos moles - Alta densidade
	- Polietileno - PTFE - Poliéster - Poliuretano - PMMA	- Fios de sutura - Artérias - Cimento - Oftalmologia - Pele artificial	- Elasticidade - Fácil fabricação - Baixa densidade	- Baixa resistência mecânica - Degradação dependente do tempo
<b>Cerâmicas e vidros</b>	- Alumina - Zircônia - Fosfatos de cálcio - Vidros bioativos	- Ossos - Cimentos endodônticos - Vasos e artérias artificiais	- Boa biocompatibilidade - Resistência à corrosão - Inércia química - Alta resistência à compressão	- Baixa força de tensão - Baixa resistência mecânica - Baixa elasticidade - Alta densidade
<b>Compósitos</b>	- Fibra de carbono - HA-Quitina - HA-Colágeno	- Válvula cardíaca - Próteses ortopédicas	- Boa biocompatibilidade - Resistência à corrosão - Inércia química - Alta força de tensão	- Difícil fabricação

Fonte: Adaptado de APARECIDA (2006); KUHN (2012); SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO (2013); SOUZA *et al.* (2018b).

Dentre as estratégias da bioengenharia tecidual e da terapia gênica, é recorrente a busca por técnicas capazes de suprir os procedimentos de enxertia óssea, tais como os autoenxertos e aloenxertos, de modo mais eficaz e sem riscos de complicações posteriores. Os esforços concentram-se principalmente no desenvolvimento e aprimoramento de substitutos sintéticos, que exibam propriedades biomecânicas similares às do osso natural, com o intuito de acelerar o processo regenerativo ou aplicar no tratamento de distúrbios esqueléticos e osteoporose (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2014; ROLIM *et al.*, 2018).

## 2.2 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo, composto por células e uma matriz extracelular, é uma forma complexa e especializada de tecido conjuntivo, essencial para o suporte muscular e produção de células sanguíneas e imunitárias por meio da medula óssea (ESTEVEES, 2016; NISBET *et al.*, 2009).

A matriz óssea pode ser rotulada como um nanocompósito, constituído de uma fase orgânica, que permite a extensão e flexão ao osso, e outra inorgânica, correspondente a 65 % da matriz. Tal componente inorgânica, formada por HA carbonatada, tem a capacidade de mineralizar, conferindo extrema dureza e resistência mecânica ao osso, para que este desempenhe as funções de sustentação e proteção (ESTEVEES, 2016; JUDAS, 2012; NISBET *et al.*, 2009).

A fase orgânica, correspondente a 35 %, é responsável pela flexibilidade e maleabilidade da estrutura óssea devido à presença de fibras de colágeno, além de água, glicosaminoglicanos e glicoproteínas, diretamente envolvidos no processo de transformação do osteóide em osso (ESTEVEES, 2016; JUDAS, 2012; NISBET *et al.*, 2009).

Apesar de sua aparência inerte, os ossos são estruturas altamente dinâmicas, as quais estão em constante remodelação. Isso se deve por sua atividade celular, desempenhada por duas principais linhagens: as células osteoblásticas, responsáveis pela formação da matriz óssea e as células osteoclásticas, ligadas ao processo de reabsorção (ESTEVEES, 2016; JUDAS, 2012).

O reparo deste tecido condiciona-se a determinados fatores, tais como suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica e extensão da lesão. Nos casos em que o sítio danificado possui grandes dimensões e morfologias críticas, uma cicatriz fibrosa pode ser gerada devido à

limitação do processo regenerativo (KIM *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2007).

Desta maneira, os biomateriais a serem empregados como potenciais substitutos ósseos devem apresentar algumas características específicas que sirvam de suporte para a neoformação óssea e proporcionem a condução celular de osteoblastos e precursores a fim de promover o crescimento tecidual no local lesionado (OLIVEIRA *et al.*, 2010; ROLIM *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018b).

Além dos pré-requisitos que os materiais destinados a aplicação médica devem ter, como características físicas e biológicas compatíveis com o tecido hospedeiro de forma que haja interação favorável e estímulo de uma resposta adequada do mesmo, tais biomateriais devem ter habilidade de remodelação e integração com o organismo (APARECIDA, 2010; GUASTALDI; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2010; ROLIM *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018b).

Para que este processo de reorganização estrutural ocorra de maneira natural e segura, também é importante que este apresente condições superficiais que permitam a adesão, proliferação e crescimento celular, com porosidade adequada, interconectividade e diâmetro de poros que favoreçam esse processo além da vascularização e elasticidade para suportar este crescimento sem sofrer deformação. A resistência mecânica, biodegradação, hidrofília, massa molar e pH também são condições indispensáveis organismo (APARECIDA, 2010; GUASTALDI; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2010; ROLIM *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018b).

Nestes termos, os substitutos utilizados para regeneração óssea, independentemente de serem permanentes ou temporários, naturais ou sintéticos, devem ser biocompatíveis, biodegradáveis, osteoindutivos, osteocondutivos, porosos e mecanicamente compatíveis com o osso nativo (OLIVEIRA *et al.*, 2010; ROLIM *et al.*, 2018; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013).

Dada a vasta gama de biomateriais disponíveis, os primeiros utilizados para a substituição total ou parcial dos tecidos ósseos foram os metais, devido às suas propriedades mecânicas superiores. Atualmente, todas as classes de materiais podem ser aplicadas para fabricação de biomateriais destinados à restauração de tecidos ósseos, além dos compósitos. (APARECIDA, 2006; COSTA *et al.*, 2015; HENCH, 2016).

Os biomateriais metálicos são empregados de diversas maneiras para substituir componentes estruturais danificados e restaurar funções perdidas no corpo humano. Sua aplicabilidade em diversos campos é garantida devido à combinação favorável de resistência à tração, tenacidade à fratura e resistência à fadiga (KUHN, 2012; HSU *et al.*, 2012; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013).

Dentre as áreas aplicáveis, pode-se citar a ortopedia, (juntas artificiais, placas e parafusos), ortodontia e odontologia (aparelhos e implantes dentários) e dispositivos cardiovasculares e neurocirúrgicos (coração artificial, grampos, stents, fios e bobinas). Comparados aos biomateriais poliméricos e cerâmicos, os metais são caracterizados por maior condutividade, tendo empregabilidade para confecção de eletrodos em órgãos eletrônicos artificiais (HSU *et al.*, 2012; KUHN, 2012; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013).

### 2.3 BIOMATERIAIS METÁLICOS

A seleção dos materiais para a confecção de dispositivos médicos deve levar em conta diversos fatores, incluindo os requisitos de carga mecânica, propriedades químicas e estruturais do próprio material e os requisitos biológicos (ADDISON *et al.*, 2012; KUHN, 2012; LOVE, 2017).

Nos casos de implantes utilizados em articulações de joelho e quadril, placas ósseas e dispositivos de fusão medular, os metais são mais vantajosos frente aos outros materiais cerâmicos e poliméricos, de modo a serem amplamente aplicados por possuírem comprovada biocompatibilidade e atenderem aos altos requisitos de resistência mecânica dessas aplicações. Dentre os mais utilizados, podemos citar o aço inoxidável, as ligas de Cobalto-Cromo (Co-Cr) e o titânio e suas ligas (KUHN, 2012; PAIVA, 2012; SAINI, 2015; ZAFAR *et al.*, 2019).

Anualmente são empregadas mais de 1000 toneladas de materiais e dispositivos confeccionados à base de titânio ao redor do mundo. Os primeiros esforços para implantar esses biomateriais remontam à década de 1930, quando observaram sua semelhança com o aço inoxidável e a liga Co-Cr-Mo, e obtiveram resultados satisfatórios para a aceitação do Ti pelos

tecidos ósseos femorais nos felinos (ADDISON *et al.*, 2012; IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014; LEWALLEN *et al.*, 2015).

### 2.3.1 Titânio e suas ligas

O Ti c.p e as ligas à base de titânio são reportados na literatura como materiais que apresentam alta resistência à corrosão em soluções fisiológicas e excelente biocompatibilidade (IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014; PRASAD, 2017; SAINI, 2015; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; SOUZA *et al.*, 2018a; ZAFAR *et al.*, 2019).

A biocompatibilidade depende das condições do hospedeiro, das propriedades do material e da localização anatômica em que o material é utilizado. A alta constante dielétrica da camada de TiO<sub>2</sub> formada rapidamente na superfície do Ti promove a integração celular, permitindo um contato mais intenso entre os tecidos e o implante, em comparação com o aço (IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014; PRASAD, 2017; SAINI, 2015; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; SOUZA *et al.*, 2018a; ZAFAR *et al.*, 2019).

Outras propriedades, tais como baixa densidade (4,5 g/cm<sup>3</sup>) combinadas com baixa condutividade térmica, módulo de elasticidade e alta resistência mecânica tornam esses materiais atraentes no campo da implantologia (PRASAD, 2017; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; SOUZA *et al.*, 2018; ZAFAR *et al.*, 2019).

Tratamentos térmicos de recozimento, têmpera e envelhecimento são comumente aplicados para aumentar a resistência mecânica destas ligas, a qual também varia de acordo com a quantidade de impurezas e elementos intersticiais presentes (PRASAD, 2017; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; SOUZA *et al.*, 2018; ZAFAR *et al.*, 2019).

A proximidade entre o módulo de elasticidade do osso (entre 10 – 40 GPa, aproximadamente) e do material implantado faz com que o biomaterial consiga transferir homogêaneamente o estresse entre ele e o osso, reduzindo o processo de remodelação e perda de densidade mineral óssea na região da prótese, fenômeno denominado “*stress shielding*” (GUIMARÃES *et al.*, 2017; IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014; LEWALLEN *et al.*, 2015; MOUSSA, 2017).

O “*stress shielding*” origina-se da interação das características do osso e seus estados de deformação com o material e geometria do implante, ocasionando o afrouxamento do implante a médio prazo, necessitando de novos procedimentos cirúrgicos de reparo (GUIMARÃES *et al.*, 2017; IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014; LEWALLEN *et al.*, 2015; MOUSSA, 2017).

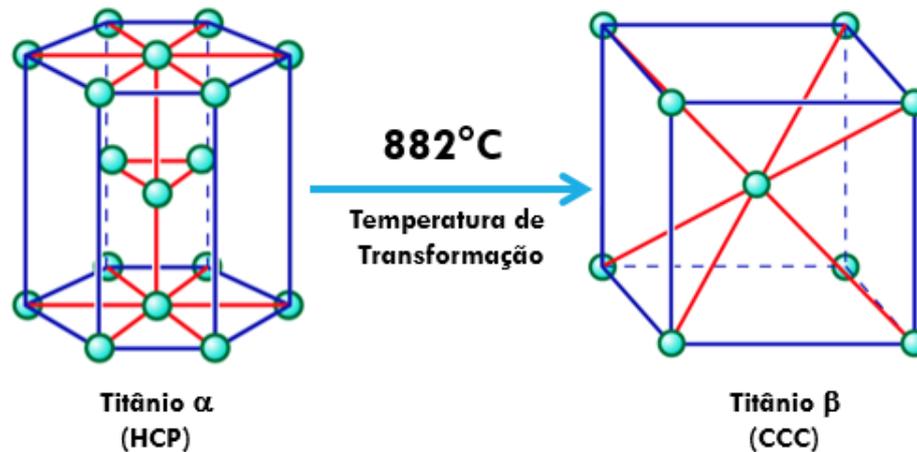
Em comparação a outros biomateriais metálicos, o módulo de elasticidade dos materiais à base de Ti (55 a 110 GPa) é consideravelmente menor em comparação com o aço inoxidável (cerca de 210 GPa) e as ligas de Co-Cr (entre 204 - 240 GPa) (GUIMARÃES *et al.*, 2017; HANSEN, 2008; IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014; LEWALLEN *et al.*, 2015; MOUSSA, 2017; NIINOMI; HATTORI, 2010).

A utilidade biomédica do Ti também decorre da leveza relativa do metal em comparação com o aço convencional e as ligas de Co-Cr. As ligas de Co-Cr, apesar da elevada resistência mecânica e à corrosão, possuem a alta rigidez. Já os aços inoxidáveis, especialmente o AISI 316L, são mais vulneráveis à corrosão localizada, como a corrosão por pites e por fresta (ADDISON *et al.*, 2012; IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014; PRASAD, 2017; SAINI, 2015; ZAFAR *et al.*, 2019).

Além disso, o desempenho das ligas de Ti de grau médico é superior ao do aço inoxidável, visto que estas possuem uma relação resistência/peso 50 % maior, tornando-as mais adequadas para aplicações que requisitam altas taxas de carga. Deve-se ressaltar que o peso da liga é um fator importante, pois determina o grau de estresse ao qual o osso adjacente será submetido (CRAWFORD, 2014; IVANOVA; BAZAKA; SAINI, 2015; PRASAD, 2017).

O Ti é um metal de transição, alotrópico, capaz de formar soluções sólidas substitucionais e intersticiais. À temperatura ambiente, sua estrutura cristalina é do tipo hexagonal compacta (HCP), denominada fase alfa ( $\alpha$ ). Esta se transforma em fase beta ( $\beta$ ), de estrutura cúbica de corpo centrado (CCC), em aproximadamente 882°C, mantendo-se estável até o ponto de fusão do metal em torno de 1660°C (ESTEVES, 2016; LOVE, 2017; SAINI, 2015).

Figura 1 - Alotropia do Titânio



Fonte: Adaptado de LOVE (2017).

Dependendo de sua composição química, o Ti c.p. é classificado em quatro graus, diferindo-se na % em massa de Oxigênio (O), Ferro (Fe), Nitrogênio (N) e Hidrogênio (H) presente no material, aumentando do grau I ao grau IV até atingir um máximo de 0,7 % (APARECIDA, 2006; GEETHA *et al.*, 2009; IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014; LOVE, 2017).

Entre vários tipos de materiais confeccionados à base de titânio, o Ti c.p. grau IV é o mais aplicado para a fabricação de implantes, devido ao grau de pureza de 98, % associado a uma alta resistência (resistência máxima à tração em torno de 560 MPa) (APARECIDA, 2006; LOVE, 2017; SOUZA *et al.*, 2018a).

Já para a produção de pilares dentários, são utilizadas ligas de Ti-6Al-4V com aproximadamente 89 % de Ti e uma resistência à tração de cerca de 940 MPa, visto que essas necessitam suportar alta tensão causada pela carga oclusal (APARECIDA, 2006; LOVE, 2017; SOUZA *et al.*, 2018a).

A Tabela 2, apresenta as classes e composições de cada grau de Ti, juntamente com a composição da liga de Ti6Al4V, de acordo com as normas ASTM F67-06 e ASTM F136-13, respectivamente (LOVE, 2017).

Tabela 2 - Composição química máxima para Ti c.p. e liga Ti6Al4V, segundo norma ASTM

LIGA	ELEMENTOS (% EM MASSA)					
	N	C	H	Fe	O	Ti
<b>G1</b>	0,03	0,10	0,015	0,20	0,18	Balanço
	máx.	máx.	máx.	máx.	máx.	
<b>G2</b>	0,03	0,10	0,015	0,30	0,25	Balanço
	máx.	máx.	máx.	máx.	máx.	
<b>G3</b>	0,05	0,10	0,015	0,30	0,35	Balanço
	máx.	máx.	máx.	máx.	máx.	
<b>G4</b>	0,05	0,10	0,015	0,50	0,40	Balanço
	máx.	máx.	máx.	máx.	máx.	
<b>Ti6Al4V</b>	0,05	0,08	0,015	0,25	0,13	Balanço
	máx.	máx.	máx.	máx.	máx.	

Fonte: Adaptado de LOVE (2017).

Os esforços científicos atuais ainda estão focados no desenvolvimento e modificações superficiais para implantes de Ti, por meio do emprego de alguns tipos de recobrimento cerâmicos ou poliméricos (LEWALLEN *et al.*, 2015; MIRANDA *et al.* 2019; PRASAD, 2017; SOUZA *et al.*, 2018a).

Essas associações entre os materiais tornam as superfícies metálicas mais bioativas, podendo conferir maior resistência mecânica, além de minimizar a liberação de íons metálicos devido a interação do biomaterial com os fluidos fisiológicos (LEWALLEN *et al.*, 2015; MIRANDA *et al.* 2019; PRASAD, 2017; SOUZA *et al.*, 2018a).

Dentre os polímeros aplicados como recobrimento da superfície de Ti, podemos citar o polietileno-glicol (PEG), poli (1-lisina)-g-PEG, Quitosana, poli( $\epsilon$ -caprolactona) e vários outros. Os principais responsáveis pela ligação entre o metal e os polímeros são o pH, grupos hidroxila ativos e cargas elétricas superficiais (LEWALLEN *et al.*, 2015; MIRANDA *et al.* 2019; PRASAD, 2017; SOUZA *et al.*, 2018a).

## 2.4 POLÍMEROS

Os materiais poliméricos têm se mostrado potencialmente viáveis para aplicação como biomaterial, sendo amplamente utilizados na fabricação de *scaffolds* para dispositivos médicos e engenharia de tecidos. Isso se deve às suas semelhanças aos tecidos nativos, bem como a possibilidade de indução de sinais biológicos e fácil manuseio (ALVES, 2013; DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; GRIFFITH, 2000; SHOJA *et al.*, 2015).

Oferecem vantagens distintas de biocompatibilidade, versatilidade química e propriedades biológicas significativas na aplicação para o reparo de tecidos e substituição de órgãos, além de combinarem atributos peculiares, como alta relação superfície-volume, alta porosidade com tamanho de poro pequeno, biodegradabilidade e propriedades mecânicas (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; SAINI, 2015).

Os polímeros sintéticos são altamente úteis no campo biomédico, e muitos dos que estão disponíveis em uso possuem propriedades físico-químicas e mecânicas comparáveis às dos tecidos biológicos, sendo indicados na ortopedia e como dispositivos implantados para liberação de fármacos (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SAINI, 2015).

Os poli( $\alpha$ -hidróxi ácidos), inicialmente usados como fios de sutura (Dexon®, Vicryl®, Maxon®, PDS®, etc), representam uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, caracterizados por sua biodegradabilidade e capacidade de bioabsorção (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), apresentados na Tabela 3, são os principais polímeros utilizados com a finalidade de reparo do tecido ósseo, além de seus copolímeros e outros (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Tabela 3 – Polímeros sintéticos bioabsorvíveis aplicados no reparo de tecido ósseo

<b>POLÍMERO</b>			
	<b>Poli(ácido glicólico)</b>	<b>Poli(ácido láctico)</b>	<b>Poli(<math>\epsilon</math>-caprolactona)</b>
<b>Sigla</b>	<b>PGA</b>	<b>PLA</b>	<b>PCL</b>
<b>Estrutura Química</b>			
<b>Fórmula Química</b>	$(C_2H_2O_2)_n$	$(C_3H_4O_2)_n$	$(C_6H_{10}O_2)_n$
<b>Tg (°C)</b>	35 – 40	60 – 65	(-65) – (-60)
<b>Tm (°C)</b>	225 - 230	173 – 178	58 - 63
<b>Módulo de elasticidade (GPa)</b>	8,4	2,7	0,4
<b>Degradação* (meses)</b>	6 - 12	> 24	24 - 36

Fonte: Adaptado de BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK (2005).

Legenda: \* até a completa bioabsorção

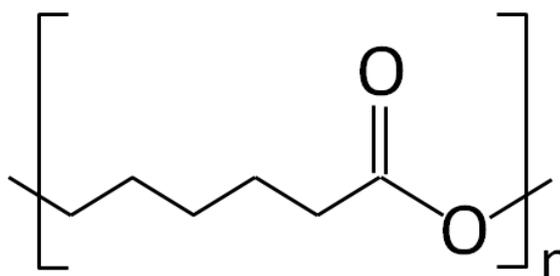
Tg = Temperatura de transição vítrea

Tm = Temperatura de fusão

### 2.4.1 Policaprolactona

A PCL (Figura 2), é um polímero semicristalino, produto de condensação de um grupo hidroxílico e um carboxílico dentro da mesma molécula, sintetizado por meio de polimerização por abertura de anel de  $\epsilon$ -caprolactona, para a obtenção da unidade repetitiva. Conhecida por suas propriedades mecânicas superiores, excelente biocompatibilidade e taxa de degradação mais lenta, a PCL tem se destacado em relação aos demais polímeros, por possuir alta biocompatibilidade e grande capacidade de bioreabsorção (ALVES, 2013; GRIFFITH, 2000; KIRAN *et al.*, 2018; RAMOS, 2011; SHOJA *et al.*, 2015).

Figura 2 - Estrutura química da Policaprolactona (PCL)



Fonte: Adaptado de MIRANTE (2015).

Classificada como um poliéster alifático sintético aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para utilização médica nos EUA, a PCL apresenta baixo peso molecular, o que favorece sua integração com outros materiais e solubilização gradual pelo organismo, sendo amplamente aceita para emprego como recobrimento e para liberação controlada de fármacos, na fabricação de embalagem biodegradáveis e no desenvolvimento de *scaffolds* tridimensionais para aplicações na engenharia de tecidos (CATAURO; BOLLINO; PAPALE, 2018; KIRAN *et al.*, 2018; TAVARES, 2011).

Apresenta excelente solubilidade em diferentes solventes orgânicos a temperatura ambiente, tais como clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno e tolueno, possibilitando a formação de filme por meio da técnica de *casting*, que consiste na solubilização do polímero, seguida da evaporação do solvente (ABEDALWAFI *et al.*, 2013; RAMOS, 2011). Como resultado, Ferreira *et al.* (2018) obtiveram um filme polimérico homogêneo, o qual demonstrou eficácia como recobrimento em superfície de Ti c.p.

A biocompatibilidade deste polímero e seu desempenho adequado quando em contato com fluidos orgânicos ou tecidos vivos (moles ou duros), sem apresentar reações adversas (de caráter alérgico, inflamatório ou tóxico), tem estimulado sua aplicação na área biomédica. Características como alto grau de cristalinidade (comparado à outros polímeros), associado ao caráter hidrofóbico, fazem da PCL um polímero com alta resistência e tempo maior de degradação, sendo indicada para implantes de longa duração (ASEFNEJAD *et al.*, 2011; OCHOA, 2013).

Diferentemente dos polímeros naturais, degradados enzimaticamente, a PCL tem sua degradação ocorrida por hidrólise simples de suas ligações ésteres, geralmente metabolizada no organismo pelo ciclo de Krebs e, posteriormente eliminada pela urina (ASEFNEJAD *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2010; RAMOS, 2011; TABATA, 2009).

Quando implantado, o polímero sofre um processo de bioreabsorção auto catalítico, que pode ser dividido em três etapas básicas: inicialmente há a quebra da cadeia polimérica, seguida da formação de curtas cadeias oligoméricas, encerrando-se na fagocitose da PCL por macrófagos. Estudos relataram que a degradação foi semelhante tanto nos testes *in vitro* (solução salina) quanto *in vivo* (coelhos) (OCHOA, 2013; PITT, 1990; RAMOS, 2011; SALGADO 2011).

Diferentes autores estudaram a biocompatibilidade de matrizes de PCL em modelos animais, descrevendo a neoformação de tecido ósseo dentro destas matrizes, indicando eficiência na colonização por fibroblastos em culturas celulares, além da fixação e proliferação de células endoteliais e osteoblásticas, sugerindo potencial integração com o tecido fibrovascular (MAKAROV *et al.*, 2010; OCHOA, 2013; WANG *et al.*, 2010).

Pesquisas envolvendo a associação deste polímero com biocerâmicas para a regeneração óssea têm sido bem-sucedidas. Estudos visando o desenvolvimento de materiais para a fabricação de implantes reabsorvíveis para fixação ortopédica, como placas e parafusos, sugeriram a aplicação da PCL como matriz para a HA obtendo um compósito com boas características mecânica e de bioatividade (ASEFNEJAD *et al.*, 2011; KIRAN *et al.*, 2018; OCHOA, 2013; WANG *et al.*, 2010).

## 2.5 FOSFATOS DE CÁLCIO

Materiais biocerâmicos destacam-se por sua estabilidade química superficial, excelente biocompatibilidade e bioatividade. Atualmente, os fosfatos de cálcio (CaP) têm tido destaque em aplicações médicas em que se faz necessária a neoformação ou integração óssea (BEST *et al.*, 2008; DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; ZAFAR *et al.*, 2019).

Isto se deve ao fato de apresentarem composição mineralógica semelhante com tecido ósseo e características favoráveis ao processo de osteoindução e osteointegração. São amplamente utilizados devido ao seu desempenho superior em aplicações biológicas e largamente explorados para comparar o perfil biológico de implantes bioativos com os não

revestidos (BEST *et al.*, 2008; DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; ZAFAR *et al.*, 2019).

Pertencentes à classe das apatitas, os CaPs podem ser sintetizados por precipitação a partir de soluções contendo íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , sob condições alcalinas ou ácidas. Sua classificação é feita a partir da razão molar entre Cálcio (Ca) e Fósforo (P) presentes, a qual varia de 0,5 a 2,0, conforme apresentado na Tabela 4. Quanto maior esta razão, menor solubilidade dos fosfatos em condições neutras, resultando em maior estabilidade em meio aquoso, juntamente com baixa taxa de degradação (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013).

Tabela 4 - Classificação dos Fosfatos de Cálcio pela razão atômica Ca/P

<b>Nomenclatura</b>	<b>Sigla</b>	<b>Fórmula química</b>	<b>Razão Ca/P</b>
Fosfato tetracálcico	TeCP	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,00
Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2.n\text{H}_2\text{O}$	1,50
Fosfato tricálcico ( $\alpha$ , $\alpha'$ , $\beta$ , $\gamma$ )	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50
Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6.5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4.2\text{H}_2\text{O}$	1,00
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio	DCP	$\text{CaHPO}_4$	1,00
Pirofosfato de cálcio	CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,00
Pirofosfato de cálcio di-hidratado	CPPD	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7.2\text{H}_2\text{O}$	1,00
Fosfato heptacálcico	HCP	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,70
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico	TDHP	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcicomono-hidratado	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2.\text{H}_2\text{O}$	0,50
Metafosfato de cálcio ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	CMP	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,50

Fonte: Adaptado de SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO (2013).

Dentre os fosfatos acima expostos, a HA e o TCP encontram-se entre as cerâmicas comercialmente disponíveis comumente aplicadas na reparação e substituição do tecido ósseo, sendo foco de diferentes estudos de interesse biológico. Estes podem ser aplicados como recobrimentos, modificando a superfície de implantes, deixando-os mais bioativos (ALGHAMDI *et al.*, 2013; BARKARMO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2010; ZAFAR *et al.*, 2019).

As propriedades dos revestimentos de CaP dependem de diversos fatores, como cristalinidade, pureza de fase, espessura do recobrimento, porosidade e adesão ao substrato. Visto que 65 % da massa óssea consiste em CaP carbonatado, os implantes recobertos com CaP formam boas ligações com o osso vivo, de modo que os pacientes que receberam tais implantes se recuperaram mais rapidamente (VALLET-REGÍ; NAVARRETE, 2008; ZAFAR *et al.*, 2019).

### 2.5.1 Hidroxiapatita

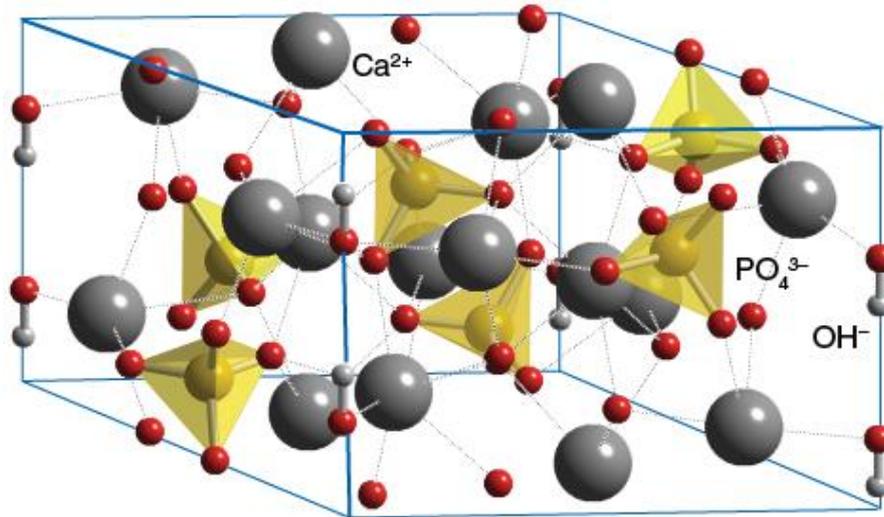
A busca por estruturas que se assemelhem à composição óssea e favoreça o processo osteointegrativo é indispensável na ortopedia e tem crescido nas últimas décadas, sendo a HA o biomaterial cerâmico mais difundido. Diversos estudos clínicos e experimentais reportaram que sua superfície favoreceu a formação de ligações com tecidos do hospedeiro, além de proporcionar maior osteocondução e adesão celular, demonstrando eficácia da HA no processo regenerativo de defeitos ósseos e na aplicação para enxertia óssea (ESTEVES, 2016; HENCH, 2016; KIEN-SENG *et al.*, 2011; OCHOA, 2013).

Sua fórmula química,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , com estrutura ilustrada na Figura 3, possui os principais constituintes minerais dos ossos, representando de 30 a 70 % da massa destes. Tal fator contribui para o equilíbrio iônico entre as fases cerâmica e biológica, auxiliando na aceitação do material pelo organismo (COSTA *et al.*, 2015; ISKANDAR *et al.*, 2013; OCHOA, 2013; VALLET-REGÍ, 2001; VITAL *et al.*, 2006).

Adicionalmente, o mecanismo de degradação da HA ocorre por osteoclastos, de modo semelhante ao observado no tecido ósseo natural, sugerindo a possibilidade de completa

degradação durante o remodelamento normal do osso (COSTA *et al.*, 2015; ISKANDAR *et al.*, 2013; OCHOA, 2013; VALLET-REGÍ, 2001; VITAL *et al.*, 2006).

Figura 3 - Estrutura química da Hidroxiapatita (HA)



Fonte: GREEVES (2018).

Os biomateriais porosos, tais como a HA, propiciam uma fixação interfacial por meio do crescimento de tecido no interior dos poros superficiais ou ao longo do implante. Essa capacidade é designada de "Fixação Biológica", a qual permite que o material suporte estados de estresse mais complexos do que implantes densos e quase inertes (como os metais e alguns polímeros) que realizam "Fixação Morfológica" (CAO; HENCH, 1996; LEWALLEN *et al.*, 2015; MAVROGENIS *et al.*, 2009).

A HA pode ser obtida natural ou artificialmente. Sua produção artificial é vantajosa por permitir a síntese de um material com composição uniforme, elevada biocompatibilidade e microestrutura controlável, incluindo a porosidade e tamanho de poros (COSTA, 2015; LEGEROS; BEN-NISSAN, 2014; OCHOA, 2013; PU'AD *et al.* 2019).

Quando utilizada como recobrimento de materiais metálicos, a HA demonstrou a capacidade de aumentar a porosidade superficial do material, fator relevante na osteointegração, por potencializar a bioatividade e a proliferação de células ósseas ao redor do implante, resultando na formação de um novo osso em posição direta do biomaterial (ISKANDAR *et al.*, 2013; SHERESTHA; JOSHI, 2014; VITAL *et al.*, 2006; ZAFAR *et al.*, 2019).

## 2.6 RECOBRIMENTOS

Para minimizar o contato direto do fluido corpóreo com o implante metálico e impedir a liberação de íons indesejados no organismo, revestimentos biocompatíveis no substrato metálico, como a HA são sugeridos (APARECIDA, 2006; ERAKOVIĆ *et al.*, 2013; ISKANDAR *et al.*, 2013; SURMENEVA; SURMENEV, 2015).

Além disso, a interação dos implantes de Ti com o tecido ósseo pode ser acelerada pela presença superficial de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , visto que o processo de osseointegração é iniciado pela troca destes íons entre o material sintético e o meio biológico (APARECIDA, 2006; ERAKOVIĆ *et al.*, 2013; ISKANDAR *et al.*, 2013; SURMENEVA; SURMENEV, 2015).

Por mais de duas décadas, a estratégia mais difundida para alterar quimicamente a superfície dos implantes metálicos e favorecer o processo da osseointegração tem sido o recobrimento de Titânio com uma camada de HA ou outros CaPs (ERAKOVIĆ *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2018a; SURMENEVA; SURMENEV, 2015; ZAFAR, 2019).

Muitos estudos *in vivo* relataram que quando estes materiais bioativos são aplicados como recobrimento, melhoram a resistência química e a biocompatibilidade do implante, aumentando também a durabilidade e a fixação do mesmo (ERAKOVIĆ *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2018a; SURMENEVA; SURMENEV, 2015; ZAFAR, 2019).

Existem diversas técnicas disponíveis e bem-sucedidas para realizar a deposição de CaPs nos substratos metálicos visando aplicação clínica que podem ser divididas em dois grupos: físicas (ou de via seca) e químicas (ou de via úmida).

A deposição por via seca tem a vantagem de produzir um recobrimento mais aderente à superfície do implante. Por outro lado, as técnicas de precipitação, por via úmida, são mais difundidas por sua simplicidade de execução e realização à baixas temperaturas, mantendo-se inalterada a cristalinidade do CaP, além de permitir aplicação em geometrias tridimensionais de maior complexidade (BUSER; SENNERBY; BRUYN, 2017; GUASTALDI; APARECIDA, 2010; LEWIS, 2017; PU'AD *et al.*, 2019; SURMENEVA; SURMENEV, 2015; ZAFAR, 2019).

Dentre as técnicas físicas podemos citar: (I) aspersão térmica a plasma convencional (“*plasma spray*”), (II) aspersão térmica a plasma de baixa pressão, (III) pulverização de oxi-combustível em alta velocidade, (IV) deposição por pulverização, (V) pulverização por feixe

de íons de deposição e (VI) ablação a laser. As químicas, podem ser por: (I) sol-gel, (II) deposição eletroforética, (III) deposição eletroquímica e (IV) recobrimento biomimético (ALMEIDA FILHO *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2006; LIMAR, 2014; ZAFAR, 2019).

Outros estudos utilizando a combinação de substratos de Ti com HA, modificando a superfície de implantes de Ti e aplicação de revestimento composto exibiram superior atividade antibacteriana e melhor biocompatibilidade (ALMEIDA FILHO *et al.*, 2007; BESINIS *et al.*, 2017; COELHO *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014; ROSENBAUM *et al.*, 2017; SONG; GE, 2019; SOUSA *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018; YENIYOL *et al.*, 2014; ZHONG *et al.*, 2016).

## 2.7 BACTERICIDAS

Além da bioatividade e do aprimoramento da osseointegração do implante, os revestimentos de superfície podem ser utilizados para fins terapêuticos, com a dopagem de antibióticos e outros medicamentos, prevenindo infecções pós-operatórias causadas pela formação de biofilme bacteriano (CHEN *et al.*, 2006; ERAKOVIĆ *et al.*, 2013; MOURIÑO; CATTALINI; BOCCACCINI, 2012; SOUZA *et al.*, 2018a; ZAFAR, 2019).

As contaminações pós-cirúrgicas são o resultado da adesão bacteriana à superfície do implante e, subsequentemente, a formação de biofilme no local do implante. Correspondem à aproximadamente 25 % dos casos de insucesso do procedimento de implantação, gerando consequências de ordem clínica e econômica, como a necessidade de re-hospitalização do paciente, manutenção do uso de antibióticos por tempo prolongado, desconforto, possível afrouxamento e/ou rejeição da prótese, e, nos casos mais graves, pode levar o paciente a óbito (ERAKOVIĆ *et al.*, 2013; JAGGESSAR *et al.*, 2018; KIRAN *et al.*, 2018; MOURIÑO; CATTALINI; BOCCACCINI, 2012).

Para interromper a infecção bacteriana, é crucial inibir a adesão das bactérias causadoras, pois o biofilme formado pode ser muito resistente à resposta e imune aos antibióticos, sendo necessária a substituição do dispositivo médico contaminado por um novo (ACTIS *et al.*, 2013; ERAKOVIĆ *et al.*, 2013; KIRAN *et al.*, 2018; RATH *et al.*, 2012).

Uma vez que o reparo de um implante infectado após a cirurgia é extremamente complicado, principalmente devido às dificuldades inerentes ao tratamento de um biofilme estabelecido formado por microorganismos na superfície, estratégias preventivas têm sido propostas por diferentes estudos, visando aprimorar a capacidade antibacteriana do material antes do procedimento cirúrgico (ACTIS *et al.*, 2013; ERAKOVIĆ *et al.*, 2013; KIRAN *et al.*, 2018; RATH *et al.*, 2012).

Dentre as soluções propostas, são recomendadas modificações superficiais dos implantes por meio de tratamentos ou técnicas de recobrimento incorporando agentes ativos, para a obtenção de superfícies com caráter bactericida sem a perda de sua bioatividade. Como exemplo, a incorporação de própolis em nanotubos de TiO<sub>2</sub>, aplicados como modificadores da superfície de implantes dentários à base de Ti, foi bem-sucedida na redução das inflamações induzidas pelo material, melhorando também a interação celular e a osseointegração (ACTIS *et al.*, 2013; JASINSKI *et al.*, 2016; KIRAN *et al.*, 2018; SOMSANITH *et al.*, 2018).

Tratamentos baseados em antibióticos não convencionais são atraentes devido à sua ação múltipla frente aos microorganismos, combinado aos menores efeitos colaterais em comparação aos de drogas sintéticas, reduzindo o desenvolvimento de bactérias resistentes aos medicamentos. Íons de metais pesados, extratos naturais e óleos essenciais, estão entre os compostos estudados para potencial uso como agentes antimicrobianos eficazes (CHEN *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2019; FLORES; BECK; SILVA, 2016; JASINSKI *et al.*, 2016; KIRAN *et al.*, 2018; LOW *et al.*, 2017; SOMSANITH *et al.*, 2018; SOUSA, 2018;).

Recentemente, nanopartículas (NPs) antimicrobianas de diferentes elementos químicos têm sido desenvolvidas e incorporadas aos biomateriais, podendo citar as nanopartículas de Prata (AgNPs), Cobre (CuNPs), Quitosana, óxido de Zinco (ZnO-NPs), dióxido de Titânio (TiO<sub>2</sub>-NPs) e selênio (SeNPs), destacando-se as AgNPs, por sua atividade antimicrobiana de amplo espectro, significativa contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo a primeira delas mais susceptível ao composto (ABDULKAREEM *et al.*, 2015; BESINIS *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018; DIVAKAR *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2016; LOW *et al.*, 2017; MEMARZADEH *et al.*, 2015; SONG; GE, 2019; SOUSA *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2016).

Mais eficiente que o uso de Ag na forma de nitrato (AgNO<sub>3</sub>), por sua dimensão nanométrica, pesquisas mostraram que apenas 0,05 ppm do bactericida sobre a superfície de Ti foi suficiente para inibir as espécies Gram-positivas e Gram-negativas. No entanto, as NPs

aplicadas neste estudo exibiram citotoxicidade em osteoblastos, limitando sua aplicação clínica (BESINIS *et al.*, 2017; POKROWIECKI *et al.*, 2017; SONG; GE, 2019).

### 2.7.1 Óleos Essenciais

Naturalmente, as plantas sintetizam metabólitos secundários aromáticos com o intuito de se proteger contra a predação e impedir a colonização de patógenos vegetais. Esses compostos são divididos em classes, incluindo óleos essenciais (principalmente os fenólicos e/ou terpenóides), alcalóides, lectinas, polipeptídeos e poliacetilenos, todos com diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; COWAN, 1999; LOW *et al.*, 2017).

Definidos pela ISO (*International Standard Organization*) como produto de destilação por arraste a vapor de plantas, os óleos essenciais são aplicados como agentes bactericidas desde a Idade Média, ganhando destaque na indústria farmacêutica e cosmética nos últimos anos, devido à baixa toxicidade, se comparados aos fármacos tradicionais (ALMEIDA, 2006; BAKKALI *et al.*, 2008; MAN *et al.*, 2019; PIRES; MOURA, 2017).

Por serem misturas naturais complexas, os óleos essenciais podem ser constituídos de cerca de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações. Os óleos essenciais são caracterizados por possuírem dois ou três componentes ativos principais presentes em concentrações razoavelmente altas (20 a 70 %) em comparação com outros componentes presentes em quantidades mínimas (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; LOW *et al.*, 2017).

Os óleos essenciais são, em geral, voláteis e não estáveis na presença de ar, luz, calor e umidade. Sua atividade antimicrobiana decorre da presença de grupos aromáticos e fenólicos, os quais variam de acordo com a espécie da planta em estudo e condições de extração (ALMEIDA, 2006; CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; MAN *et al.*, 2019; PIRES; MOURA, 2017; SANTOS; NOVALES, 2011; TAVARES, 2007).

Alguns exemplos de óleos essenciais comumente usados por suas propriedades antimicrobianas são: óleo essencial de Melaleuca, Ylang-Ylang, Eucalipto, Arnica, Verbena limão e Alecrim (COWAN, 1999; FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2005; LOW *et al.*, 2017).

Além do poder antimicrobiano, estudos investigaram o efeito osteoindutivo de alguns constituintes dos óleos essenciais e sua possível aplicação no tratamento de doenças ligadas aos ossos, tais como osteoporose e osteopenia (LASZLO, 2013; MÜHLBAUER *et al.*, 2003; PUTNAM *et al.*, 2007).

Mühlbauer *et al.* (2003) testaram os efeitos de óleos essenciais (sálvia, alecrim e tomilho) e alguns monoterpenos isolados no processo de reabsorção óssea em ratos ovariectomizados. Os resultados obtidos demonstraram que a presença dos monoterpenos é capaz de inibir a atividade dos osteoclastos e a consequente descalcificação decorrente da reabsorção óssea (LASZLO, 2013; MÜHLBAUER *et al.*, 2003; PUTNAM *et al.*, 2007).

Dados obtidos por testes conduzidos em ratos mantidos em dieta com baixo teor de Ca, sugerem que a suplementação com tomilho e alecrim é marcada pela melhora da absorção intestinal de Ca. Entre os componentes do óleo essencial de alecrim encontram-se: 1,8-cineol, cânfora,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -terpineol. Já no óleo essencial de tomilho podemos citar timol, carvacrol, c-terpineno e  $\beta$ -cariofileno. O exame histopatológico dos grupos animais tratados mostrou uma melhora na histologia óssea e proteção contra a perda óssea, além da restauração dos níveis diminuídos de Ca plasmático aos valores normais. (BANU; VARELA; FERNANDES, 2012; ELBAHNASAWY *et al.*, 2019; PINTORE *et al.*, 2001; SIENKIEWICZ *et al.*, 2017; TANNENBAUM *et al.*, 2002).

Um terceiro estudo, utilizando óleo essencial de gálbano, evidenciou seu potencial na proliferação de osteoblastos. A composição do óleo é rica por hidrocarbonetos monoterpênicos (78,8-80,3 %), sendo mirceno (33,4-39,7 %),  $\alpha$ -pineno (22,7-23,0%) e  $\gamma$ -terpineno (8,1-10,9 %) seus componentes majoritários (LASZLO, 2013; MÜHLBAUER *et al.*, 2003; PUTNAM *et al.*, 2007; SABBieti *et al.*, 2011).

Para o tratamento de doenças associadas à degradação e inflamação de cartilagens, como o reumatismo, o  $\alpha$ -pineno mostrou-se eficaz em pequenas dosagens (0,02 %) (LASZLO, 2013; NEVES *et al.*, 2010; RUFINO *et al.*, 2014).

### 2.7.1.1 Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia*

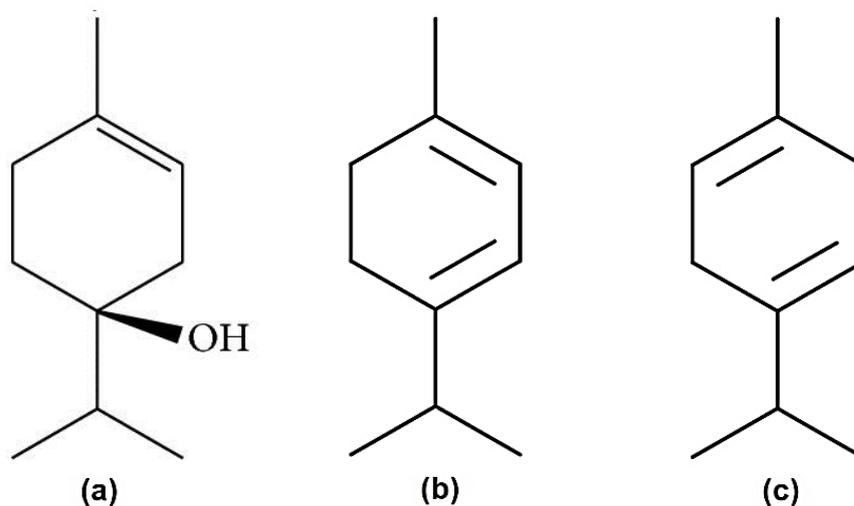
Popularmente conhecida como Melaleuca ou “árvore do chá”, a *Melaleuca alternifolia*, pertencente à família Myrtaceae, é uma planta de origem australiana, a qual possui atividades bactericida, antifúngica e antiviral comprovadas. Seu óleo essencial pode ser extraído a partir dos ramos e caule da árvore, ou por meio da hidrodestilação das folhas (PIRES; MOURA, 2017; SALVATORI *et al.*, 2017; SAGAVE *et al.*, 2015).

O óleo essencial de *tea tree* (TTO) é constituído por mais de 100 componentes, dos quais se destacam os monoterpenos, hidrocarbonetos sesquiterpenos e seus álcoois associados. Sua composição padrão é regulamentada pela ISO 4730:2017(E), a qual estipula as concentrações percentuais máximas e mínimas para cada um dos 15 principais componentes, como apresentada no Apêndice A (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; MIRANTE, 2015; PIRES, 2016; SALVATORI *et al.*, 2017; SIENKIEWICZ *et al.*, 2011).

Preparações contendo TTO são comumente usadas como agentes anti-sépticos com propriedades antimicrobianas, de limpeza, curativas e de alívio da coceira. A *Melaleuca alternifolia* caracteriza-se por sua intensa eficácia na inibição e propagação do crescimento de bactérias, tais como *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus* e *Escherichia coli*, incluindo também bactérias resistentes a antibióticos, tal como a *Pseudomonas aeruginosa*, comumente encontrada em infecções hospitalares. Outros estudos também relataram a eficácia do óleo na ação antimicrobiana em biofilmes orais (BARBOSA, 2010; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; LEITE *et al.*, 2017; LOW *et al.*, 2017; PIRES, 2016; PROBST, 2012; REICHLING *et al.*, 2006; SAGAVE *et al.*, 2015; SALVATORI *et al.*, 2017; SIENKIEWICZ *et al.*, 2011).

Pesquisas realizadas nas últimas décadas mostraram que o TTO atingiu uma série de respostas imunes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Essa característica é decorrente da presença majoritária do terpinen-4-ol, seguido do  $\gamma$ -terpineno e  $\alpha$ -terpineno em sua composição (Figura 4), uma vez que diversos estudos caracterizam os terpenos como compostos antimicrobianos (BARBOSA, 2010; LOW *et al.*, 2017; PIRES, 2016; PROBST, 2012; SALVATORI *et al.*, 2017).

Figura 4 - Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*



Fonte: Adaptado de MIRANTE (2015).

Legenda: (a) Terpine-4-ol;  
 (b)  $\alpha$ -terpineno;  
 (c)  $\gamma$ -terpineno.

Na composição do TTO, o  $\alpha$ -terpineol e o terpineno-4-ol demonstram ter atividade antibacteriana contra o crescimento de *S. aureus* e *E. coli* em uma concentração de cerca de 0,78 %. Carson *et al.* (2002) avaliaram a liberação de ácidos nucleicos de *S. aureus* após tratamento com TTO completo, terpinen-4-ol, 1,8-cineol e  $\alpha$ -terpineol. Como resultados, vazamento significativo de ácidos nucleicos, sugerindo danos extensos à membrana citoplasmática das bactérias (BARBOSA, 2010; BUDZYŃSKA *et al.*, 2011; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; LOW *et al.*, 2017; PIRES, 2016; PROBST, 2012; SAGAVE *et al.*, 2015; SALVATORI *et al.*, 2017;).

O principal constituinte, o 4-Terpinenol, age inibindo a respiração oxidativa e induzindo da deformação da membrana, alterando sua permeabilidade. Além disso, o 1,8-cineol é considerado um antimicrobiano marginal, por estimular o aumento da permeabilidade da membrana, facilitando a entrada de outros agentes antimicrobianos (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; BARBOSA, 2010; BUDZYŃSKA *et al.*, 2011; PROBST, 2012; SAGAVE *et al.*, 2015; PIRES, 2016; SALVATORI *et al.*, 2017; LOW *et al.*, 2017).

## 2.8 ENSAIO DE BIOATIVIDADE

A implantação de um material bioativo desencadeia uma série de reações bioquímicas e biofísicas entre o implante e o tecido de contato, resultantes de uma forte interação interfacial, associada à formação superficial de uma camada fina com alta concentração de Ca e P (ERAKOVIC, 2013; KOKUBO; TAKADAMA, 2006; ORÉFICE; SILVA JR., 2001).

A condição essencial para que os implantes se liguem a um osso nas condições *in vivo* é a formação de uma camada superficial de apatita biologicamente ativa e semelhante ao componente ósseo (KOKUBO; TAKADAMA, 2006; SABER-SAMANDARI *et al.*, 2016).

Esta formação pode ser avaliada *in vitro*, reproduzida na superfície de materiais bioativos por meio da imersão destes em meio SBF acelular com concentrações de íons próximas às do plasma sanguíneo humano. Desta forma, a bioatividade óssea de um material artificial pode ser examinada por sua capacidade de formar apatita no SBF (KOKUBO; TAKADAMA, 2006; SABER-SAMANDARI *et al.*, 2016).

Além de prever quantitativa e qualitativamente o crescimento de apatitas superficiais, o ensaio de bioatividade é útil na triagem de materiais bioativos ósseos antes de testes em animais, reduzindo o número de animais utilizados e a duração das experiências com os mesmos a partir da aplicação deste método, auxiliando no desenvolvimento eficaz de novos tipos de materiais bioativos (KOKUBO; TAKADAMA, 2006; SABER-SAMANDARI *et al.*, 2016).

Deste modo, o ensaio de bioatividade é realizado com a finalidade de constatar se irá ocorrer uma ligação entre o tecido vivo e o material, a partir do crescimento de apatitas superficiais, criando uma resposta biológica específica na interface do material. Aplica-se para superfícies de implantes que entrarão em contato com o osso (ERAKOVIC, 2013; KOKUBO; TAKADAMA, 2006; ROHANOVÁ *et. al.*, 2016).

A norma ISO 23317/2014 estabelece algumas condições uniformes para detecção de apatita formada sobre a superfície de um material imerso em um fluido corpóreo simulado. Estes padrões estão relacionados com as características do SBF e volume, com tempo de ensaio e com a forma das amostras, conforme segue (ERAKOVIC, 2013; ROHANOVÁ *et. al.*, 2016):

- a) A solução simulada deve ser acelular, ausente de proteínas em sua composição e deve estar tamponada com tris-hidroximetil-aminometano.

- b) As amostras devem ser compactas com uma relação A/V (área da superfície da amostra / volume de SBF) bem definida.
- c) O volume de solução (SBF) é limitado e não se altera durante o teste, caracterizando um arranjo estático.
- d) As amostras devem ser em forma de discos ou prismas.
- e) A duração do teste deve ser de 28 dias.

## 2.9 ENSAIO DE CORROSÃO

A corrosão é definida como um processo espontâneo e gradual de desgaste do material, em sua maioria metálicos, a partir de uma transformação devido à interação química ou eletroquímica em um determinado meio, podendo ou não estar aliado a transformações físicas e esforços mecânicos (ELIAZ, 2019a; ELIAZ, 2019b; ONG; LOVALD, 2014; POUND, 2014).

Em geral, o processo corrosivo se dá por processo eletroquímico para materiais metálicos. Os elétrons se difundem através da superfície do material até um ponto em que são recebidos pelo elemento do meio, oxidante. Esse processo faz com que haja a geração de corrente elétrica na interface sólido/meio corrosivo. Esse processo se baseia em duas reações: uma catódica, com a redução da espécie química e outra anódica, a qual envolve a oxidação do metal (ELIAZ, 2019a; ELIAZ, 2019b; ONG; LOVALD, 2014; POUND, 2014).

A classificação dos tipos de corrosão pode ser feita a partir da morfologia ou forma de ataque, causas e mecanismos. Dentre os diversos tipos de corrosão, podemos citar a corrosão uniforme, por placas, alveolar, por pites, intergranular e filiforme (ELIAZ, 2019a; POUND, 2014).

A corrosão uniforme se processa em toda a extensão da superfície, ocorrendo perda uniforme de espessura, enquanto a corrosão por placas se localiza em regiões da superfície metálica formando placas com escavações. Já a corrosão intergranular ocorre entre os grãos da rede cristalina do material metálico, o qual perde suas propriedades mecânicas e pode fraturar quando solicitado por esforços mecânicos (ELIAZ, 2019a; POUND, 2014; SRIDHAR; RAJESWARI, 2009).

O tipo alveolar produz sulcos ou escavações superficiais semelhantes a alvéolos apresentando fundo arredondado e profundidade geralmente menor que seu diâmetro. A corrosão por pites ou puntiforme, considerada a mais agressiva e de difícil detecção e controle, é um tipo de ataque localizado, resultando em minúsculos furos que penetram o metal, enquanto outras partes do mesmo se mantêm intactas, produzindo cavidades com fundo anguloso e profundidade muito maior que seu diâmetro (ELIAZ, 2019a; POUND, 2014; SRIDHAR; RAJESWARI, 2009).

Normalmente, a corrosão tem seu início na superfície do material, causando alterações prejudiciais e indesejáveis a sua aplicação. É um importante parâmetro a ser analisado em diversas aplicações, desde materiais estruturais, até os que serão utilizados em implantes médico (ELIAZ, 2019a; ONG; LOVALD, 2014; POUND, 2014).

A resistência a corrosão de um biomaterial deve ser um fator determinante na escolha do substrato para a confecção de dispositivos médicos, visto que o fluido corpóreo contém água, oxigênio dissolvido, proteínas e diversos íons tais como cloretos e hidróxidos (BRONZINO; PETERSON, 2015; ELIAZ, 2019a; ELIAZ, 2019 b; GILBERT; MALI, 2012).

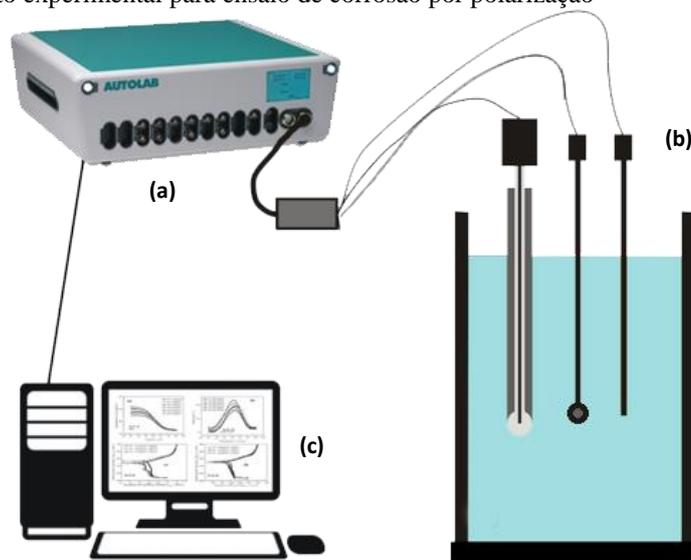
Desta forma, o corpo humano apresenta um ambiente muito agressivo para metais utilizados como implante. A resistência à corrosão de um implante metálico é um aspecto importante da sua biocompatibilidade (BRONZINO; PETERSON, 2015; ELIAZ, 2019a; GILBERT; MALI, 2012; RICCI, 2017; SRIDHAR; RAJESWARI, 2009).

No método de ensaio de corrosão, por polarização, as amostras são submetidas a condições artificiais e controladas, para acelerar o processo de corrosão. Os resultados serão mais fielmente próximos a realidade se os parâmetros ambientais do ensaio puderem ser controlados próximos àqueles encontrados em serviços, tais como composição do eletrólito, temperatura e agitação (BERRADJA, 2019; ELIAZ, 2019a).

O aparato experimental típico de ensaios eletroquímicos é ilustrado na Figura 5.

O equipamento utilizado para obter as curvas de polarização de um material numa solução é o potenciostato. Funciona como um circuito elétrico que controla a diferença de potencial elétrico entre os eletrodos presentes na célula eletroquímica, sendo que a diferença de potencial e a corrente registrada permitem caracterizações de reações eletroquímicas (BERRADJA, 2019; UNAL *et al.*, 2019).

Figura 5 – Aparato experimental para ensaio de corrosão por polarização



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) Potenciostato;  
 (b) Célula eletroquímica;  
 (c) Computador para processamento dos dados.

A célula eletroquímica é composta por três eletrodos (referência, trabalho e contra eletrodo), os quais devem estar imersos em um eletrólito e dispostos de modo que a corrente elétrica passe de modo uniforme por todos eles. O eletrodo de referência, mantém um potencial constante em relação ao qual o potencial de uma outra meia-pilha pode ser medido, sendo os tipos mais aplicados o de Calomelano Saturado ( $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) e de Prata / Cloreto de Prata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ). Seu contato com a solução analítica ocorre por meio de um disco de vidro sinterizado adaptado a um tubo de vidro que envolve o eletrodo de referência (MARCO; BIEST, 2016; SERRA; ESPÍRITO-SANTO; MAGRINHO, 2020).

O contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar é, em geral, confeccionado de platina, material inerte, e tem como função principal minimizar os erros causados pela resistência da célula no controle do potencial do eletrodo de trabalho, devendo ficar o mais próximo possível deste eletrodo. A corrente resultante entre o contra-eletrodo e o eletrodo de trabalho é a corrente que será registrada (BERRADJA, 2019; ELIAZ, 2019b; SERRA; ESPÍRITO-SANTO; MAGRINHO, 2020).

O eletrodo de trabalho é o material a ser analisado, e a área da amostra submetida ao meio corrosivo (eletrólito) deve ter formato circular, evitando a formação de sítios ativos e, conseqüentemente, ataque corrosivo preferencial (MARCO; BIEST, 2016; SERRA; ESPÍRITO-SANTO; MAGRINHO, 2020; UNAL *et al.*, 2019).

O eletrólito corresponde à solução em que os eletrodos serão imersos, e deve permitir a troca de elétrons, além de reproduzir as condições ambientais reais, tais como composição, concentração de sais, temperatura e agitação (BERRADJA, 2019; MARCO; BIEST, 2016; UNAL *et al.*, 2019).

O Ensaio de Circuito Aberto (OCP – do inglês *Open Circuit Potential*) é uma técnica simples que permite detectar a característica do possível filme de passivação a ser formado, bem como a estabilidade da montagem experimental. O ensaio OCP, avalia a diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, em função do tempo, a partir do momento de imersão (BERRADJA, 2019; POPOV, 2015).

No início da indução, a interface do material possui uma distribuição não homogênea de cargas, a qual se estabilizará após processos de transferência de cargas, definidos pela adsorção de moléculas do solvente, íons do eletrólito e de outras moléculas presentes no meio (POPOV, 2015).

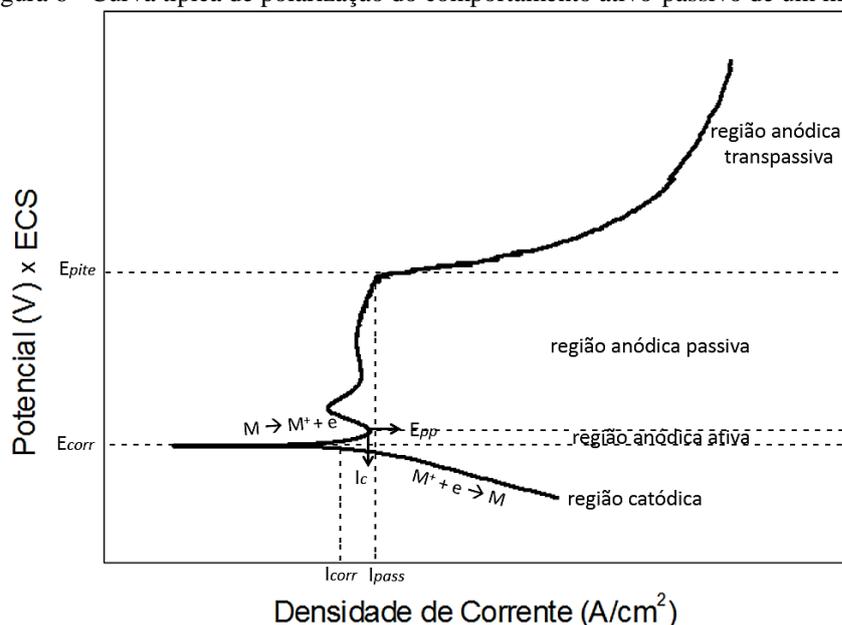
As curvas de polarização consistem numa varredura contínua de potenciais aplicados a uma velocidade constante, monitorando a densidade de corrente que flui na interface da solução/metal. São representadas graficamente em diagramas de potenciais (E) *versus* densidade de corrente (A/cm<sup>2</sup>) e podem ser determinadas a partir de dois métodos: galvanostático e o potenciostático. (ELIAZ, 2019b; LI *et al.*, 2016; POPOV, 2015).

O método galvanostático é caracterizado pela variação da intensidade de corrente que circula no sistema, enquanto o potenciostático, cuja variável é o potencial do eletrodo, tem uma corrente gerada pelo sistema para cada valor de potencial imposto, a qual é suprida pelo próprio potenciostato (ELIAZ, 2019b; LI *et al.*, 2016; OLIVEIRA; BERTAZZOLI, 2011).

Ambos os métodos produzem curvas de polarização catódica semelhantes, porém a curva de polarização anódica apresenta aspecto diferente para transição ativo/passivo, sendo o método potenciostático mais indicado para estudar materiais metálicos. A Figura 6 ilustra uma curva típica de polarização do comportamento ativo-passivo de um metal, delimitando cada uma das regiões importantes para análise (BERRADJA, 2019; ELIAZ, 2019b; LI *et al.*, 2016).

A curva é formada por duas regiões distintas, catódica e anódica. Na região catódica, a taxa de dissolução do metal é muito baixa devido as reações catódicas, como a de evolução do hidrogênio ( $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ ). O aumento do potencial aplicado irá causar uma redução na densidade de corrente (ELIAZ, 2019a; ELIAZ, 2019b; ONG; LOVALD, 2014).

Figura 6 - Curva típica de polarização do comportamento ativo-passivo de um metal



Fonte: Adaptado de ELIAZ (2019a).

A região anódica, inicia-se a partir do momento de reversão da corrente, havendo um aumento da densidade de corrente com pequena variação no potencial de corrosão. Isso se deve a dissolução anódica ou reações de interface do material ( $M \rightarrow M^+ + e^-$ ), em que há liberação de elétrons no meio (início do processo corrosivo). A região anódica é dividida em: anódica ativa, passiva e transpassiva (ELIAZ, 2019a; ELIAZ, 2019b; ONG; LOVALD, 2014).

Na região anódica ativa há um aumento da taxa de dissolução do metal e conseqüentemente um aumento do potencial e da densidade de corrente. Isso ocorrerá até determinado potencial, em que a densidade de corrente aumenta até atingir um valor crítico ( $I_c$ ) e permanece constante, denominada região de passivação (ELIAZ, 2019a; ELIAZ, 2019b).

Esse fenômeno ocorre em alguns metais e ligas, em que há a formação de uma película de óxido muito fina e aderente sobre a superfície do metal, protegendo o metal contra uma corrosão adicional, caracterizando a região anódica passiva pela baixa e constante densidade de corrente ( $I_{pass}$ ) e baixa ou nenhuma taxa de corrosão. O potencial em que a corrente de dissolução anódica tem seu valor máximo é chamado de potencial de passivação primário,  $E_{pp}$  (ELIAZ, 2019a; ELIAZ, 2019b; SRIDHAR; RAJESWARI, 2009).

Se o potencial for continuamente aumentado acima da faixa do potencial passivo, a densidade de corrente volta a crescer acentuadamente, caracterizando a região transpassiva (ELIAZ, 2019a; ELIAZ, 2019b).

Nessa região o filme passivo torna-se instável com relação às espécies solúveis na solução e a densidade da corrente aumenta rapidamente, podendo iniciar a corrosão por pites. Neste ponto, obtém-se o potencial de pite ( $E_{\text{pite}}$ ), o qual representa o início da formação dos pites, indicando a resistência do material a este tipo de corrosão (ELIAZ, 2019a; ELIAZ, 2019b).

Alguns metais, como os aços inoxidáveis, alumínio, cromo e suas ligas, são susceptíveis a corrosão por pite em ambientes contendo ânions halogêneos como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$ . Na região anódica passiva, esses íons serão responsáveis pela ruptura localizada da película passiva e o desenvolvimento de pites (ELIAZ, 2019a; ELIAZ, 2019b; SRIDHAR; RAJESWARI, 2009).

## 2.10 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Diversos testes laboratoriais podem ser aplicados para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* de um extrato ou um composto puro, sendo utilizados na descoberta de medicamentos, epidemiologia e previsão de resultados terapêuticos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; BONA *et al.*, 2014).

Os procedimentos mais comumente aplicados são os métodos de difusão em disco e diluição em caldo ou ágar. Para estudos mais aprofundados, são recomendados outros métodos como *time kill* e citofluorometria de fluxo, os quais fornecerão informações sobre a natureza do efeito inibitório (bactericida ou bacteriostático) e acerca dos danos celulares infligidos ao microrganismo de teste (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; BONA *et al.*, 2014).

O teste disco-difusão em ágar, desenvolvido em 1940 e descrito em 1966 por Bauer e Kirby, consiste em um método qualitativo usado em muitos laboratórios de microbiologia para testes rotineiros de susceptibilidade a antimicrobianos, devido a sua simplicidade e confiabilidade (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; BONA *et al.*, 2014; PÉRILLAUD-DUBOIS *et al.*, 2019).

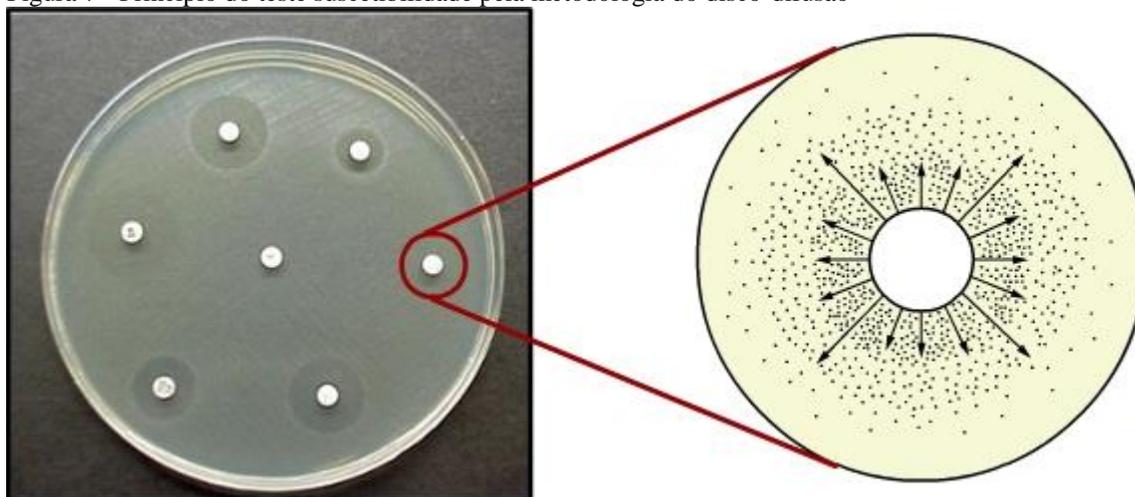
Frente a outros métodos, o teste disco-difusão é vantajoso por sua capacidade de testar um grande número de microrganismos e agentes antimicrobianos, apresentar baixo custo e ser

de fácil interpretação dos resultados fornecidos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; BONA *et al.*, 2014; PÉRILLAUD-DUBOIS *et al.*, 2019).

As vantagens desse método, principalmente simplicidade e o baixo custo, contribuíram para seu uso comum na triagem antimicrobiana de extratos de plantas, óleos essenciais e outros medicamentos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010; HASHEMI, *et. al.*, 2017; KUMAR, 2017).

O seu princípio básico consiste na difusão do agente antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo, formando um halo ao redor da amostra (Figura 7). O halo de inibição do crescimento bacteriano indica a magnitude da atividade antimicrobiana do agente impregnado (BONA *et al.*, 2014; MACHADO; GALES, 2008).

Figura 7 - Princípio do teste suscetibilidade pela metodologia do disco-difusão



Fonte: MACHADO; GALES (2008).

Atualmente, muitos padrões aceitos e aprovados são publicados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para testes de bactérias e leveduras. Embora nem todas as bactérias possam ser testadas com precisão por esse método, há uma padronização para certos patógenos bacterianos, usando meios de cultura específicos, condições de incubação e critérios interpretativos para zonas de inibição (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; CLSI, 2012).

Neste procedimento, as placas de Petri, contendo ágar, são inoculadas com microrganismo padronizado, como culturas do tipo ATCC (*American Type Culture Collection*). Em seguida, discos contendo o composto a ser testado na concentração desejada, são colocados na superfície do ágar, e as placas são incubadas sob condições adequadas. Durante o período de incubação, ocorre a difusão do agente antimicrobiano, o qual inibirá a germinação e o

crescimento do microrganismo utilizado no teste. Posteriormente, os diâmetros das zonas de crescimento de inibição são medidos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; PÉRILLAUD-DUBOIS *et al.*, 2019; HASHEMI, *et. al.*, 2017).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

Neste trabalho foram usadas amostras de Ti c.p de grau 4 na forma de discos, com 3 mm de diâmetro e 5 mm de espessura, com composição química, segundo a norma ASTM F67-06.

O recobrimento polimérico foi realizado utilizando PCL ( $M_n$  70000–90000, densidade 1,145 g/mL a 25°C), fornecida por Sigma Aldrich. Como bactericida a ser incorporado no recobrimento, foi escolhido o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* adquirido da Phytoterápica (Lote POM17.05).

A solução acelular de SBF aplicada nas etapas do recobrimento biomimético e no ensaio de bioatividade foi preparada segundo a norma ISO 23317:2012, a partir da dissolução, em água deionizada, das quantidades pré-estabelecidas dos reagentes descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Reagentes utilizados para preparo de 1L de solução SBF

Reagente	Fórmula Química	Quantidade
Cloreto de Sódio	NaCl	8,035 g
Bicarbonato de Sódio	NaHCO <sub>3</sub>	0,355 g
Cloreto de Potássio	KCl	0,225 g
Hidrogenofosfato dipotássico trihidratado	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,231 g
Cloreto de Magnésio hexahidratado	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,311 g
Cloreto de Cálcio	CaCl <sub>2</sub>	0,292 g
Sulfato de Sódio	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,072 g
Tris-hidroximetil aminometano	Tris:(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	6,118 g
Ácido Clorídrico (1 mol/L)	HCl	39 mL

Fonte: Adaptado de KOKUBO (2008).

A utilização destes reagentes visa alcançar as concentrações iônicas semelhantes ao encontrado no plasma sanguíneo humano, como apresentado na Tabela 6. A solução final foi padronizada até obter pH de 7,4 à temperatura de 36,5°C.

Tabela 6 - Comparação entre a concentração iônica do SBF e do plasma sanguíneo humano

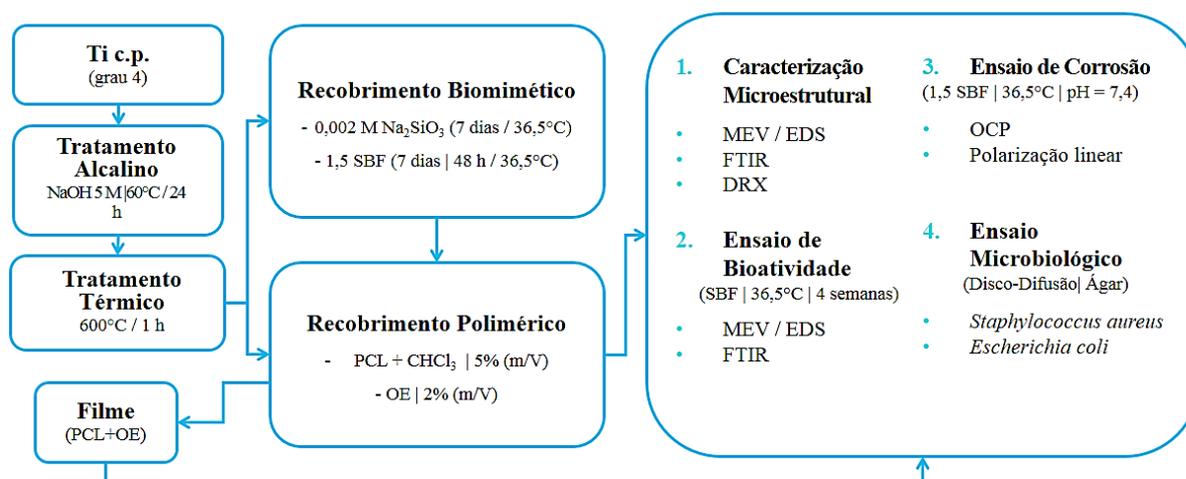
	Concentração Iônica/mM							
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>Plasma Sanguíneo Humano</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
<b>SBF</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5

Fonte: Adaptado de KOKUBO (2008).

### 3.2 MÉTODOS

As etapas envolvidas no preparo e análise das condições estudadas estão ilustradas na Figura 8.

Figura 8 – Fluxograma dos métodos utilizados no trabalho



Fonte: Da autora.

### 3.2.1 Identificação das condições avaliadas

A Tabela 7 apresenta as condições e as nomenclaturas empregadas neste trabalho.

Tabela 7 - Descrição das condições estudadas

NOMENCLATURA	DESCRIÇÃO
Ti c.p.	Titânio comercialmente puro (grau 4)
OE	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>
PCL+OE	Filme de Policaprolactona contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>
Ti +PCL+OE	Titânio recoberto com Policaprolactona contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>
Ti + HA+PCL+OE	Titânio recoberto com Hidroxiapatita e filme de Policaprolactona contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>

Fonte: Da autora.

### 3.2.2 Preparo das amostras de Ti c.p.

As amostras de Ti c.p. tiveram sua superfície limpas, passando por tratamentos alcalino e térmico, para receber o recobrimento.

Inicialmente, o substrato foi lixado com lixas de 180 mesh e, em seguida, limpo em banho ultrassônico (marca Sandres, modelo SoniClean 2) com detergente, água destilada e álcool isopropílico, por 15 minutos em cada solução, para remoção de todas as impurezas. Posteriormente, as amostras de Ti c.p. foram imersas em solução de NaOH 5M (tratamento alcalino) e colocadas em estufa a 60°C durante 24 horas.

Após o tratamento alcalino, os discos foram lavados com água destilada, secos e submetidos a tratamento térmico em forno (marca EDG, modelo Inox Line 3000) a 600°C por 1 hora, resfriados a temperatura ambiente em dessecador.

Esses pré-tratamentos visam a deixar a superfície do material mais bioativa, por meio de alteração da rugosidade, formação de sítios de nucleação e deposição de uma fina camada de Na<sub>2</sub>O-TiO<sub>2</sub> que favorecem a formação de apatitas de maneira mais densa (VERCIK *et al.*, 2003; KOKUBO, 2008; KOKUBO; YAMAGUCHI, 2016).

### **3.2.3 Recobrimento das amostras**

#### 3.2.3.1 Recobrimento Biomimético

O recobrimento biomimético foi realizado somente na condição contendo HA, e consistiu em duas etapas: nucleação e crescimento. Na primeira delas, as amostras limpas e termicamente tratadas foram imersas em solução  $2 \times 10^{-3}$  mol/L de silicato de sódio, durante sete dias em estufa a 36,5 °C e posteriormente secas em dessecador a temperatura ambiente.

Para a etapa de crescimento, as amostras foram imersas em solução SBF (concentração de 1,5) em estufa a 36,5 °C durante sete dias, com troca de solução a cada 48 horas para garantir a supersaturação do meio e favorecer a formação da camada de HA. Após esse período, os discos de Ti foram lavados com água destilada e secos a temperatura ambiente em dessecador.

#### 3.2.3.2 Recobrimento Polimérico

Os filmes de PCL, contendo óleo essencial, foram preparados pelo método de evaporação de solvente (*casting*), por meio da dissolução do polímero em clorofórmio, para uma concentração final da solução polimérica de 5 % (m/v), sob agitação magnética (800 rpm em agitador magnético, marca Fisatom, modelo 752A).

Em seguida, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi incorporado, gotejando-o lentamente na solução polimérica ainda sob agitação magnética, até a concentração final de 2% em relação à massa de polímero.

Para o recobrimento, foi realizada a imersão das amostras de Ti c.p., com e sem HA, na solução polimérica durante 3 segundos, repetindo o processo por 3 vezes, e depois dispondooas para secagem a temperatura ambiente no dessecador durante 24 horas.

Para melhor análise da morfologia do recobrimento, foram confeccionados filmes poliméricos isolados do substrato metálico, vertendo a solução final em uma placa de Petri e submetendo-a a secagem nas mesmas condições e período que para as amostras metálicas.

### **3.2.4 Caracterização Microestrutural**

#### 3.2.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura / Espectroscopia por Energia Dispersiva

Com o intuito de avaliar, qualitativamente, a superfície das amostras e caracterizar a presença dos elementos químicos em determinado ponto do recobrimento, foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) da marca FEI, modelo Inspect S 50, acoplado ao Espectrômetro de Energia Dispersiva (EDS), da marca EDAX, modelo Apollo X, do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) no DEMa/ UFSCar – São Carlos.

#### 3.2.4.2 Difração de raios X

Para determinar as fases presentes no material e comprovar a existência dos recobrimentos realizados, fez-se a análise por difração de raios X. O equipamento utilizado foi o difratômetro da marca Rigaku, modelo Miniflex 600, da USP - *campus* Pirassununga, utilizando radiação Cu K $\alpha$ , em uma faixa de 2 $\theta$  de 10° a 90°, com passo de 0,02° por 2s/passos.

### 3.2.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Os grupos funcionais presentes nas amostras foram avaliados de acordo com a banda de absorção apresentada na região do infravermelho, sendo possível determinar a presença do recobrimento e da evolução no crescimento de apatitas superficiais.

A Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada na UNESP - *campus* Araraquara, no equipamento da marca Perkin Elmer, modelo Spectrum 100 FTIR Spectrometer, com acessório de refletância total atenuada (ATR) empregando um cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Todos os espectros foram na faixa de 450 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com 32 varreduras. O “background” das medidas foi obtido empregando o cristal sem amostra. A cela foi higienizada com acetona P.A.

### 3.2.5 Ensaio de Bioatividade

O ensaio de bioatividade foi realizado de acordo com a norma ISO 23317:2014, para avaliar a capacidade de osseointegração mediante a formação apatitas em até quatro semanas. As amostras de Ti c.p. com e sem recobrimento foram submersas em meio SBF durante períodos de uma, duas, três e quatro semanas, mantidas em estufa à 36,5 °C durante toda a vigência do ensaio.

Após esse período, os discos de Ti foram retirados do recipiente, lavados com água destilada e secos em dessecador. A superfície das amostras foi caracterizada por meio de MEV, EDS e FTIR, de modo a determinar o crescimento de apatitas.

### 3.2.6 Ensaio de Corrosão

Os ensaios de polarização por circuito aberto e polarização potenciodinâmica linear foram realizados no LABMAT, UNIFAL-MG *campus* Poços de Caldas, utilizando o aparato

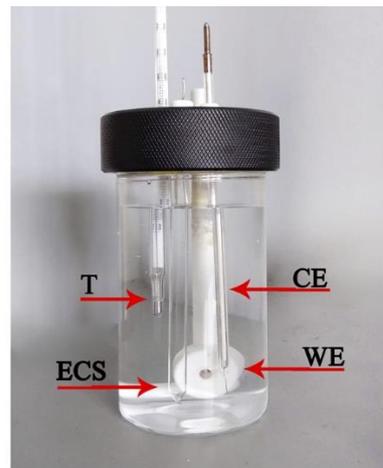
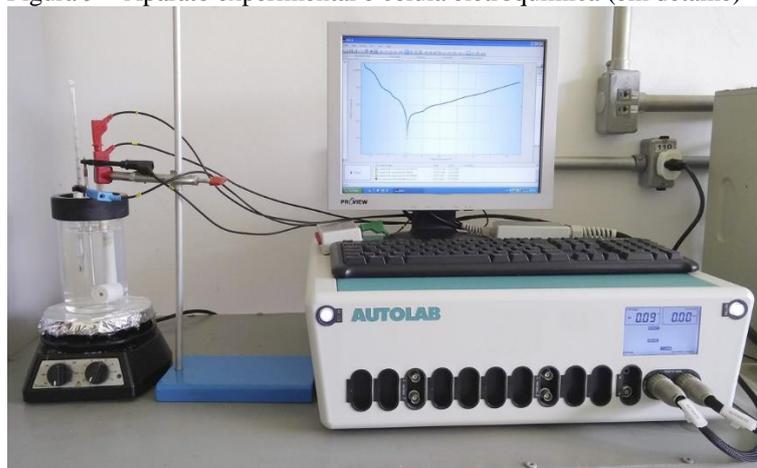
experimental ilustrado na Figura 9. Os dados foram obtidos por meio de um potenciostato da marca Metrohm, modelo Autolab/PGSTART302, com interface gráfica acoplada a um computador controlado pelo software NOVA 1.8.

A célula eletroquímica utilizada constituiu-se por um eletrodo de trabalho, contra-eletrodo de platina e o eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS), imersos em solução eletrolítica 1,5 SBF (pH = 7,4), mantida sob agitação magnética e temperatura constantes (36,5°C). A área da amostra exposta à solução foi de 0,1589 cm<sup>2</sup>.

O ensaio, realizado em triplicata, teve início com o potencial de circuito aberto em função do tempo, com os eletrodos permanecendo em solução eletrolítica por 1200 s, para estabilização do potencial, dando início ao ensaio de polarização.

As curvas de polarização potenciodinâmica linear foram obtidas variando o potencial (E) de -1,5 V (ECS) a + 3,0 V com passo de 0,001 V e velocidade de varredura de 0,001 V/segundo.

Figura 9 – Aparato experimental e célula eletroquímica (em detalhe)



Fonte: Da autora.

Legenda: T = Termômetro.  
ECS = Eletrodo de calomelano saturado.  
CE = Contra-eletrodo de platina.  
WE = Eletrodo de trabalho.

### 3.2.7 Ensaio Microbiológico

Para avaliar o potencial antimicrobiano das amostras, utilizou-se o método de difusão em disco, testando as condições propostas para cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 8739).

Para tanto, as cepas bacterianas selecionadas, foram retiradas de placas de culturas preservadas e suspendidas em solução salina estéril de NaCl a 0,9 % (m/v). A suspensão padrão das bactérias foi padronizadas em  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  utilizando a escala 0,5 de *MacFarland* e semeadas na superfície das placas de ágar Muller-Hinton de 10 cm, com auxílio de *swabs* estéreis. Amostras foram colocadas sob a cultura de bactérias e incubadas por 24 h a  $37^\circ\text{C}$ .

O diâmetro do halo formado em volta dos discos foi mensurado de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para testes de sensibilidade por disco-difusão. Os testes foram realizados em triplicata e os dados coletados foram submetidos a teste estatístico de análise de variância (ANOVA) para verificar a existência de diferenças significativas entre a atividade antimicrobiana das amostras.

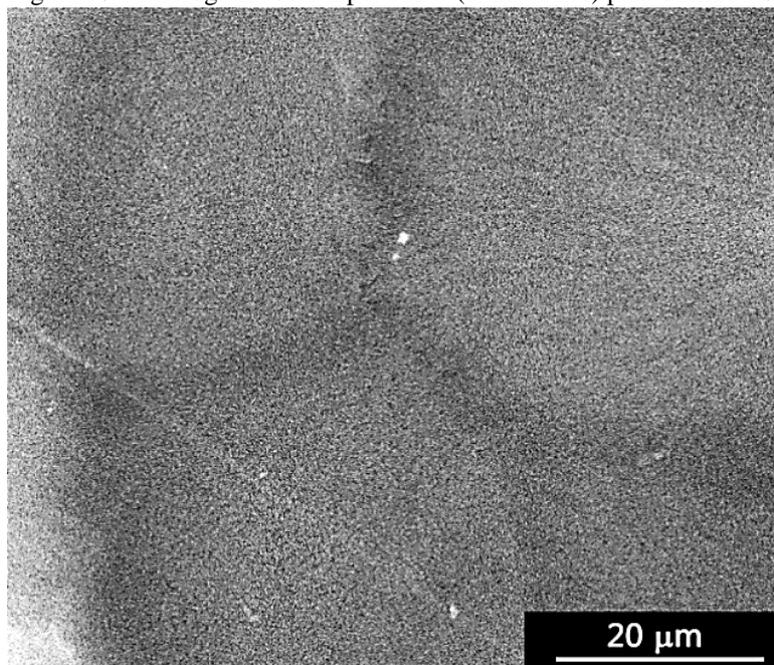
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL

#### 4.1.1 Caracterização Microestrutural do Filme PCL+OE

As Figuras 10 e 11 mostram, respectivamente, as micrografias obtidas por MEV para os filmes de PCL incorporados com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, juntamente com o espectro obtido na microanálise semiquantitativa por EDS na região A.

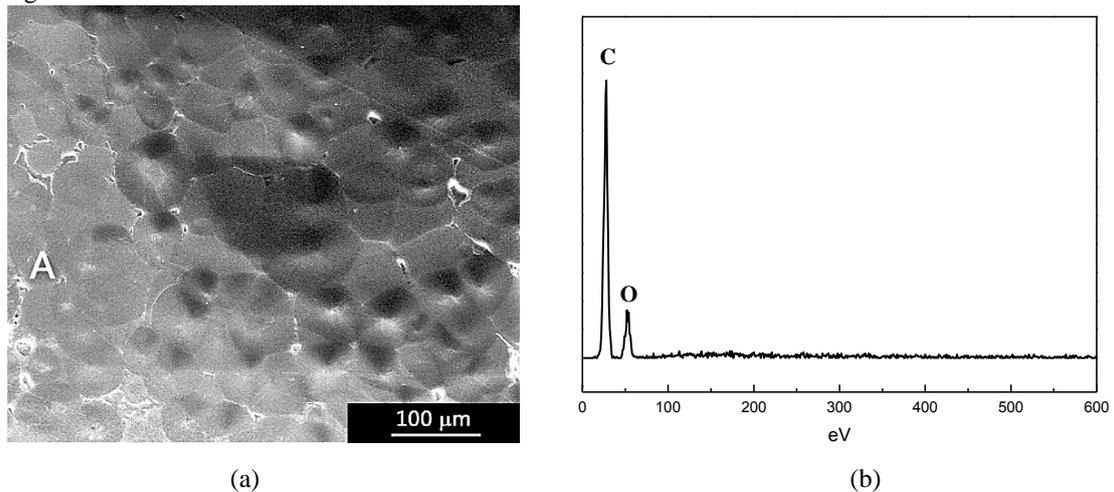
Figura 10 – Micrografia obtida por MEV (em detalhes) para o filme PCL+OE



Fonte: Da autora.

A caracterização do filme de PCL foi realizada por Ferreira *et al.* (2018). A partir da micrografia realizada por MEV (Figura 12), os autores reportaram regiões cristalinas acentuadas, denominadas cristallitos. A microanálise por EDS feita na região A confirmou a presença somente dos elementos C e O, componentes típicos da PCL, sem a presença de contaminantes do solvente utilizado.

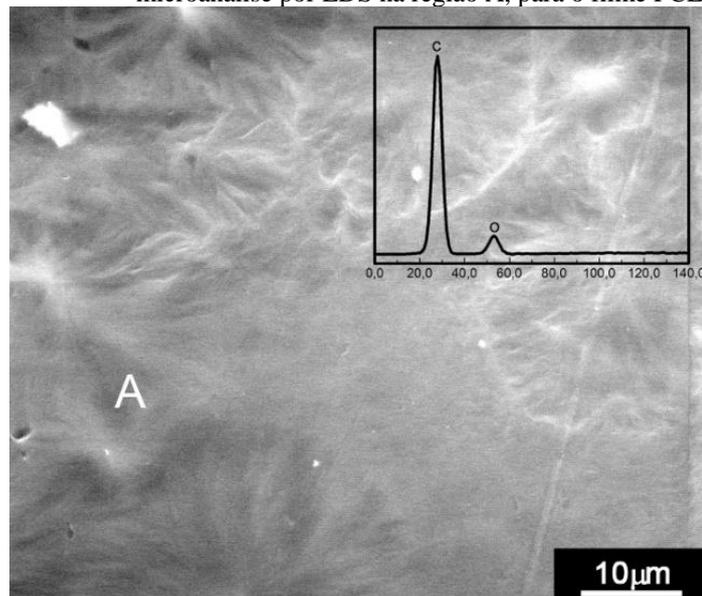
Figura 11 – Filme PCL+OE



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) Micrografia obtida por MEV (visão geral);  
 (b) Espectro obtido por microanálise por EDS na região A.

Figura 12 – Micrografia obtida por MEV e espectro obtido na microanálise por EDS na região A, para o filme PCL



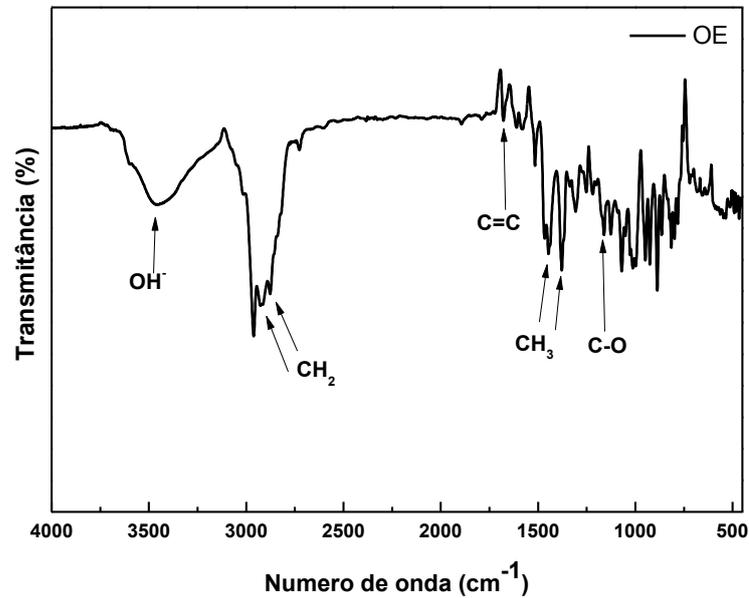
Fonte: FERREIRA *et al.* (2018).

Comparando as características do filme puro com a condição PCL+OE, observou-se que a incorporação do óleo essencial não alterou expressivamente a morfologia natural do filme polimérico, pois assim como observado por Ferreira *et al.* (2018), nota-se que o filme produzido também é homogêneo e possui regiões cristalinas acentuadas.

Do mesmo modo, a microanálise por EDS realizada na região A para a condição PCL+OE indicou somente a presença dos elementos C e O, típicos do filme de PCL e do óleo essencial.

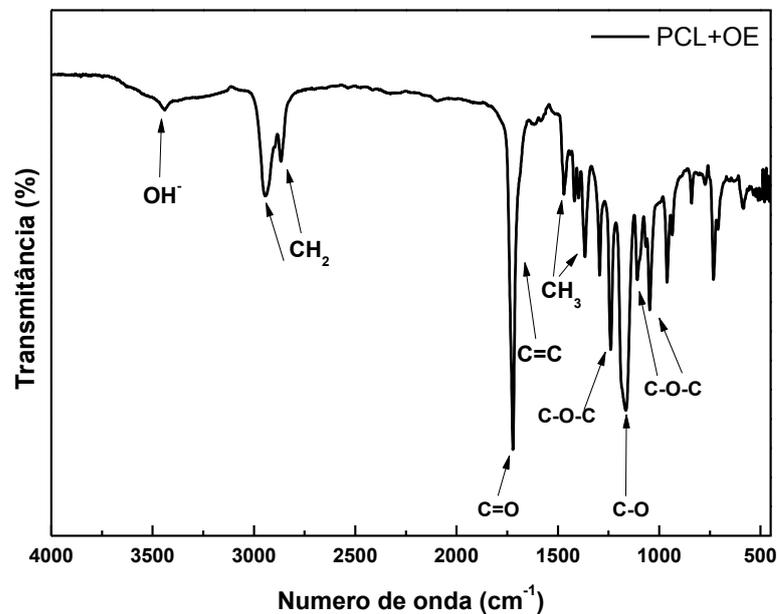
Os espectros de infravermelho obtidos para o OE puro e incorporado ao filme polimérico estão ilustrados nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

Figura 13 – Espectro de infravermelho obtido para o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*



Fonte: Da autora.

Figura 14 – Espectro de infravermelho obtido para o filme de PCL incorporado com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*



Fonte: Da autora.

Cada ligação química irá se comportar de maneira distinta perante a presença da radiação, movimentando-se por vibração, estiramento, entre outros. Uma vez que ambos são

compostos orgânicos, foi possível observar a presença de bandas semelhantes nos dois espectros. Como exemplo, a presença de bandas fortes em torno de  $2900\text{ cm}^{-1}$  é comum em espectros de orgânicos, decorrentes da presença do estiramento C–H presente na ligação  $\text{CH}_2$  (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2007).

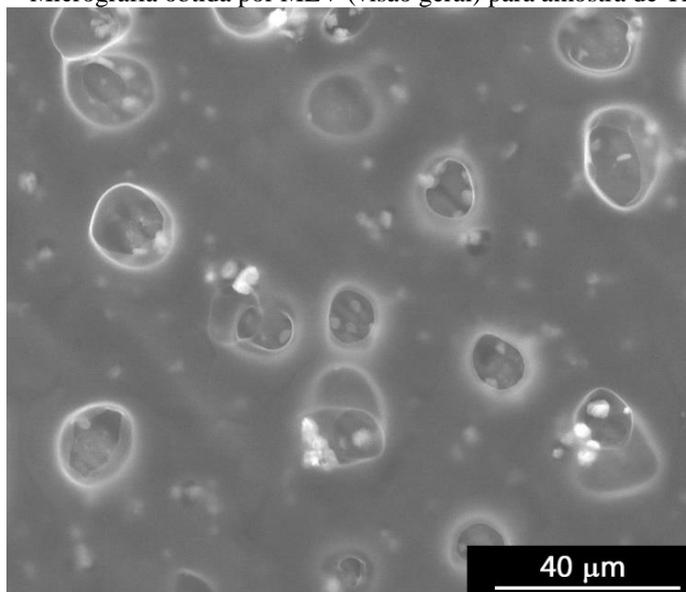
Entre as vibrações características da PCL, foi possível visualizar bandas de absorção em  $1233$ ,  $1107$  e  $1042\text{ cm}^{-1}$  referente à vibração assimétrica do C–O–C. Em  $1736\text{ cm}^{-1}$  encontra-se a banda de vibração de estiramento dos grupos carbonila (C=O), com frequência originária da função éster. Segundo Catauro *et al.* (2015), o alongamento simétrico e assimétrico das ligações C–O–C e as vibrações O–C podem ser utilizados como bandas características do PCL.

A presença do OE no filme é atribuída ao pico referente à ligação C=C presente no anel aromático ( $1670\text{ cm}^{-1}$ ) e ao estiramento da ligação alcoólica entre C–O ( $1160\text{ cm}^{-1}$ ).

#### 4.1.2 Caracterização Microestrutural do Ti+PCL+OE

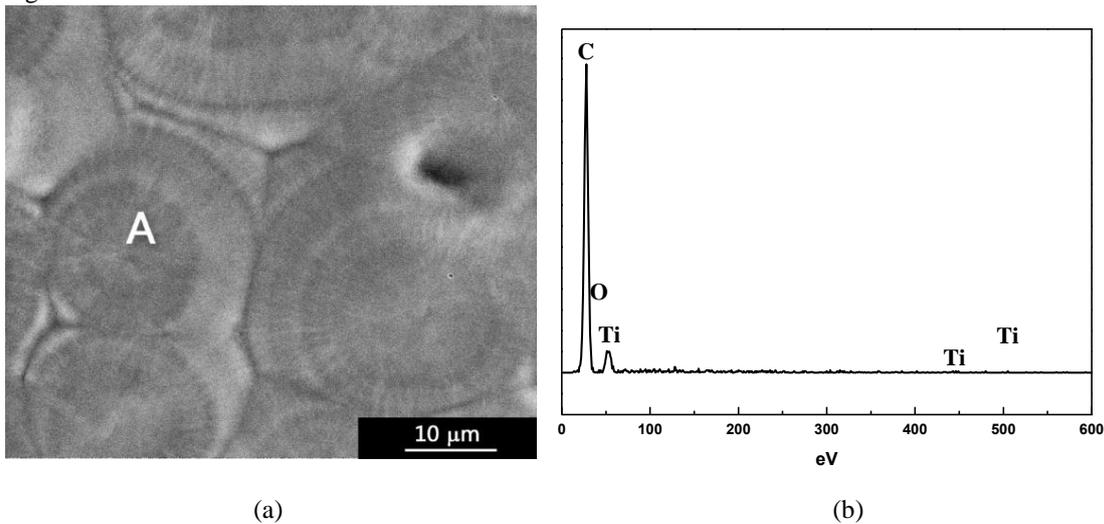
As micrografias obtidas por MEV para as amostras de Ti c.p. recobertas com PCL contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* estão ilustradas nas Figuras 15 e 16, juntamente com o espectro obtido na microanálise por EDS na região A.

Figura 15 – Micrografia obtida por MEV (visão geral) para amostra de Ti+PCL+OE



Fonte: Da autora.

Figura 16 – Amostra Ti+ PCL+OE



Fonte: Da autora.

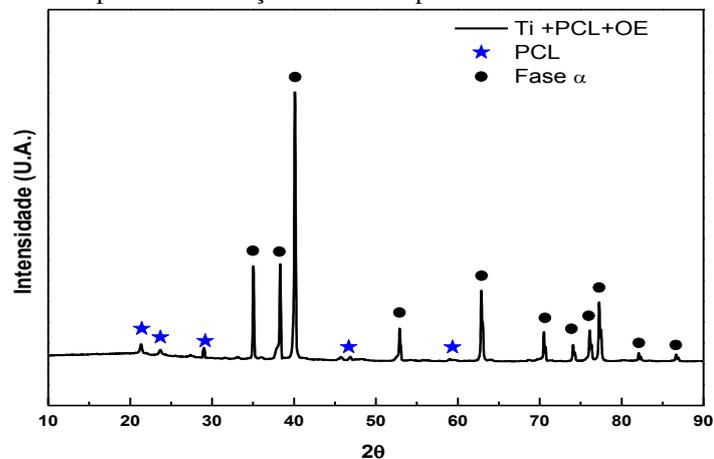
Legenda: a) Micrografia obtida por MEV (em detalhes);  
b) Espectro obtido por microanálise por EDS na região A.

É possível observar regiões aglomeradas na Figura 15, decorrentes da concentração de PCL utilizada no filme. Apesar das possíveis bolhas formadas durante a secagem, observa-se que o recobrimento se apresenta uniformemente distribuído por toda a superfície do Ti c.p.

Na Figura 16, foi possível observar a mesma morfologia obtida para o filme isolado, com a presença de cristalitas definidas. O espectro por EDS realizado a região A confirma a presença de espécies características da PCL e do óleo essencial (C e O), além de Ti correspondente ao substrato metálico utilizado.

A Figura 17 ilustra o difratograma obtido por difração de raios X para a amostra de Ti+PCL+OE.

Figura 17 – Espectro do difração de raios X para a amostra de Ti + PCL + OE.



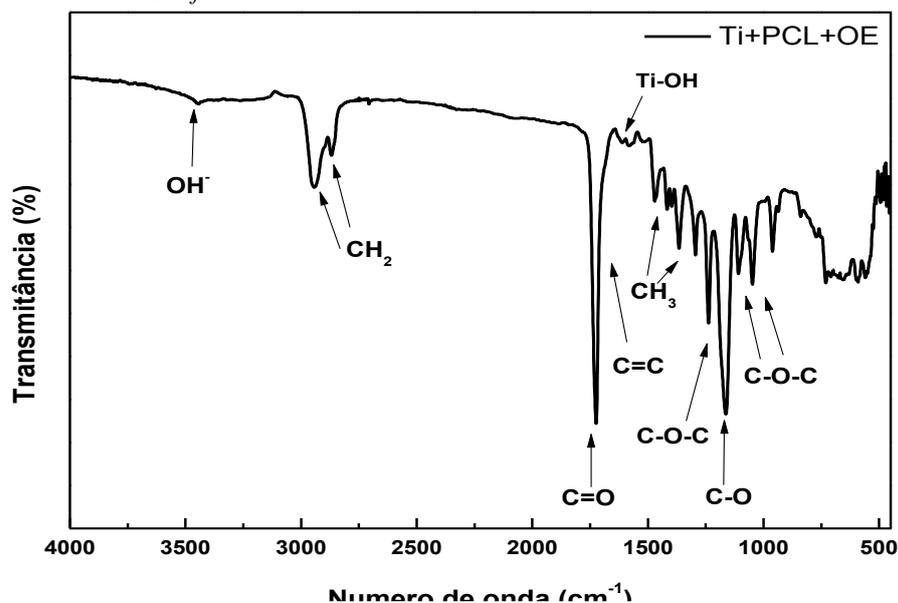
Fonte: Da autora.

A análise do difratograma permite confirmar a presença da fase  $\alpha$  do Ti, nos principais picos característicos em  $2\theta = 35^\circ$ ,  $38^\circ$  e  $41^\circ$ , correspondentes à estrutura do tipo HCP. Esta fase era esperada, visto que a transformação alotrópica do Ti ocorre somente em  $882^\circ\text{C}$ , temperatura superior à utilizada no tratamento térmico do substrato metálico e/ou aplicação proposta.

Os picos mais intensos da PCL são observados em  $2\theta = 21^\circ$  e  $29^\circ$ , assim como reportado por Wei *et al.* (2012) e Ferreira *et al.* (2018). Sua intensidade é inferior à observada para a fase  $\alpha$  do titânio, devido à característica semicristalina do recobrimento.

A presença do recobrimento polimérico também foi confirmada por meio da análise do espectro de infravermelho obtido para a amostra Ti+PCL+OE, como ilustrado na Figura 18.

Figura 18 – Espectro de infravermelho obtido para a amostra de Ti c.p. recoberta com filme de PCL incorporado com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*



Fonte: Da autora.

Nota-se que as bandas características da PCL e do OE se mantiveram localizadas nas zonas de absorção observadas para o filme isoladamente. A intensidade das bandas de  $\text{CH}_2$  na faixa de absorção em  $2862$  e  $2942\text{ cm}^{-1}$  são alteradas, devido à interação e deformação destas ligações conectadas a rede inorgânica, assim como observado por Ferreira *et al.* (2018).

Estudos avaliando a superfície e seção transversal de amostras de Ti após o tratamento químico com NaOH, revelaram a formação de uma fase de Titanato de Sódio, com fórmula química geral  $\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{-Ti}_y\text{O}_{2y+1}$  ( $0 < x < 2$ ), a qual se transforma em Hexatitanato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$ ) acompanhada de uma pequena quantidade de  $\text{TiO}_2$  (rutilo). Com o tratamento

térmico subsequente, os autores notaram um aumento na resistência ao risco, sem alteração morfológica apreciável nas fases anteriormente formadas (KOKUBO; YAMAGUCHI, 2016; YAMAGUCHI *et al.*, 2009).

A banda observada em  $1576\text{ cm}^{-1}$  é atribuída às vibrações do grupo hidroxila ligado ao Ti superficial presente no óxido. O átomo de oxigênio presente no grupo OH pode ser coordenado com vários átomos de metal vizinhos. Assim, o hidroxil superficial pode ocorrer na forma livre (Ti-OH) ligada por hidrogênio entre si ou ligada a moléculas de água adsorvidas quimicamente na superfície do  $\text{TiO}_2$ . Portanto, forças interfaciais entre a matriz PCL e a rede de óxido de titânio são estabelecidas principalmente por ligações de hidrogênio (FERREIRA *et al.*, 2018).

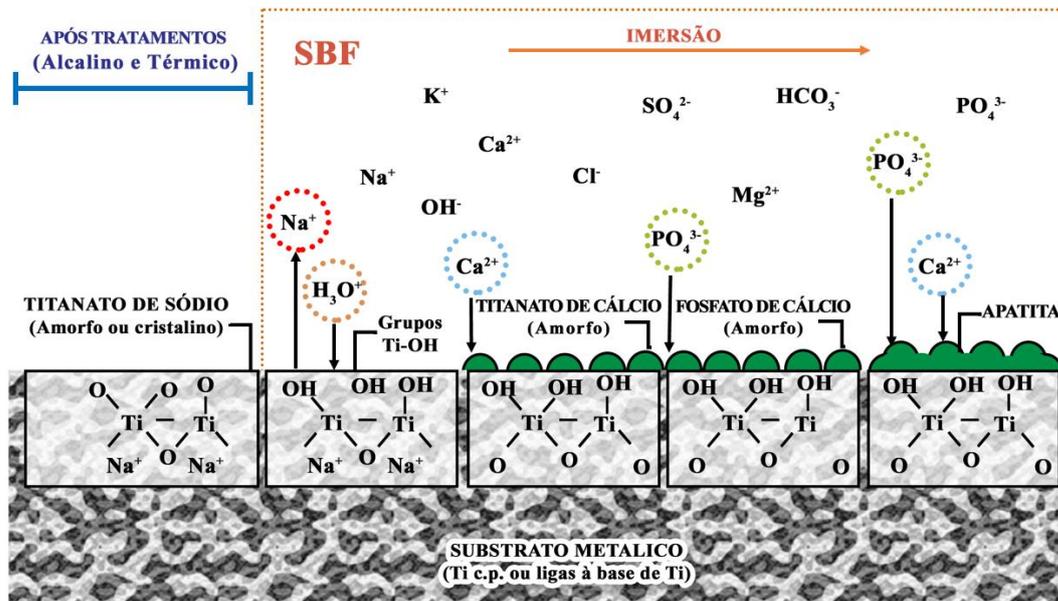
Catauro *et al.* (2015) também investigaram interações PCL- $\text{TiO}_2$  por análise de FTIR. Os autores foram capazes de confirmar essas interações pelas mudanças na intensidade relativa das bandas relacionadas aos grupos éster encontrados na cadeia polimérica (FERREIRA *et al.*, 2018).

#### **4.1.3 Caracterização Microestrutural do Ti+HA+PCL+OE**

O método biomimético pode ser aplicado para recobrir diferentes materiais com HA. Uma vez que a solução de SBF contém íons supersaturados de Ca e P, os precursores de CaP nucleados e cristais apatíticos irão crescer nas superfícies sólidas, sendo estes identificados como HA carbonatada, semelhante à encontrada na composição óssea (KOKUBO, 2008).

A formação da apatita sobre a superfície metálica ocorre como ilustrado na Figura 19. Em geral, o Titânio é coberto com uma camada passiva de óxido, o qual se dissolve com o pré-tratamento em NaOH, formando uma camada amorfa contendo íons alcalinos. Quando expostos ao SBF, os íons  $\text{Na}^+$  são liberados por meio de troca com os íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  do meio, formando grupos TiOH na superfície do metal (JONÁŠOVÁ *et al.*, 2004; KOKUBO; TAKADAMA, 2007; KOKUBO; YAMAGUCHI, 2016).

Figura 19 – Mecanismo de formação de apatita sobre superfície de Ti pré-tratada alcalina e termicamente



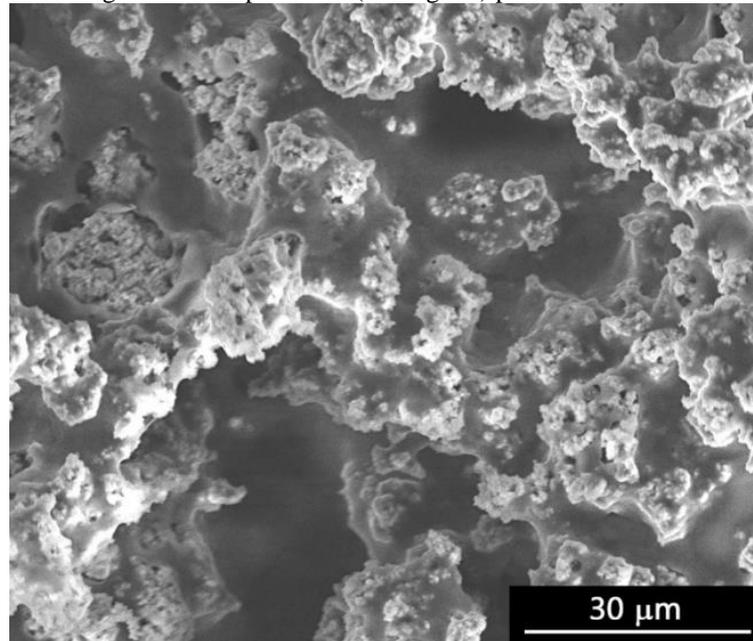
Fonte: Adaptado de SILVA (2016).

Como resultado da liberação de íons  $\text{Na}^+$ , há um aumento no grau de supersaturação da solução de imersão em relação à apatita, ocasionando a elevação local do pH. Em ambiente alcalino, óxido de titânio é carregado negativamente, de modo que os grupos  $\text{TiOH}$  absorvem seletivamente os íons  $\text{Ca}^{2+}$  carregados positivamente no SBF, induzindo a nucleação de apatita na superfície do Ti. À medida que os íons de cálcio se acumulam, a superfície metálica ficava carregada positivamente (JONÁŠOVÁ *et al.*, 2004; KOKUBO; TAKADAMA, 2007; KOKUBO; YAMAGUCHI, 2016; SILVA, 2016).

Combinada com os íons de fosfato negativamente carregados, forma-se CaP amorfo, fase metaestável e, eventualmente, transformada na apatita óssea cristalina estável, que possui o elemento Mg e Na em sua composição. O mecanismo será fundamentalmente o mesmo em fluidos contendo proteínas (JONÁŠOVÁ *et al.*, 2004; KOKUBO; TAKADAMA, 2007; KOKUBO; YAMAGUCHI, 2016; SILVA, 2016).

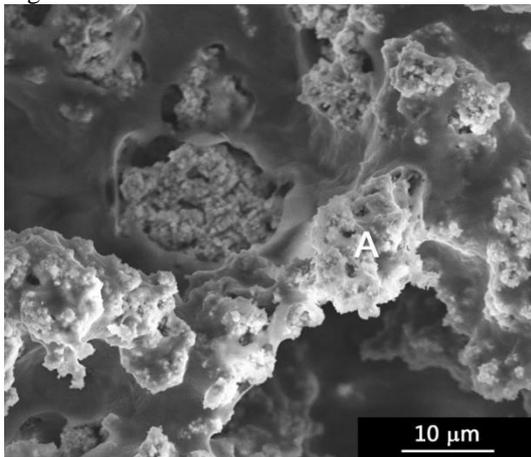
As micrografias ilustradas nas Figuras 20 e 21 correspondem às amostras de Ti c.p. recobertas com HA e filme polimérico incorporado com óleo essencial, obtidas por MEV juntamente com o espectro obtido na microanálise pela EDS na região A. A Tabela 8 apresenta as porcentagens (em massa) dos elementos químicos, presente nos pontos, segundo a microanálise semiquantitativa por EDS.

Figura 20 – Micrografia obtida por MEV (visão geral) para amostra de Ti+HA+PCL+OE

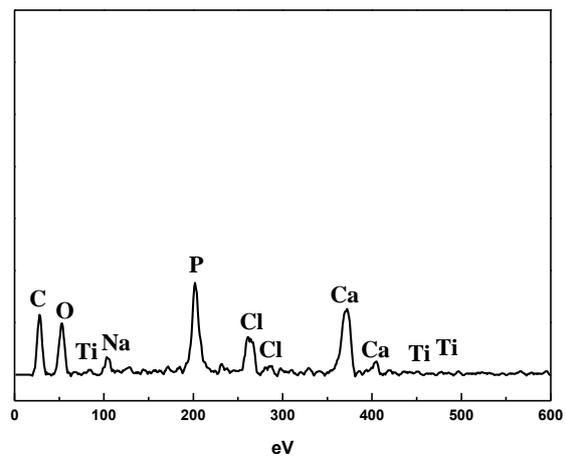


Fonte: Da autora.

Figura 21 – Amostra Ti+ HA+PCL+OE



(a)



(b)

Fonte: Da autora.

Legenda: (a) Micrografia obtida por MEV (em detalhes);  
(b) Espectro obtido por microanálise por EDS na região A.

Analisando as Figuras 20 e 21, observa-se a presença de regiões globulares mais claras, de morfologia porosa, característica do recobrimento de HA. O espectro por EDS realizado na região A também confirma a presença dos elementos característicos da PCL (C e O), bem como Ca e P, principais componentes da HA, além de Ti correspondente ao substrato metálico utilizado.

Tabela 8 – Resultados da Microanálises semiquantitativa por EDS na região A das amostras Ti+PCL+OE e Ti+HA+PCL+OE

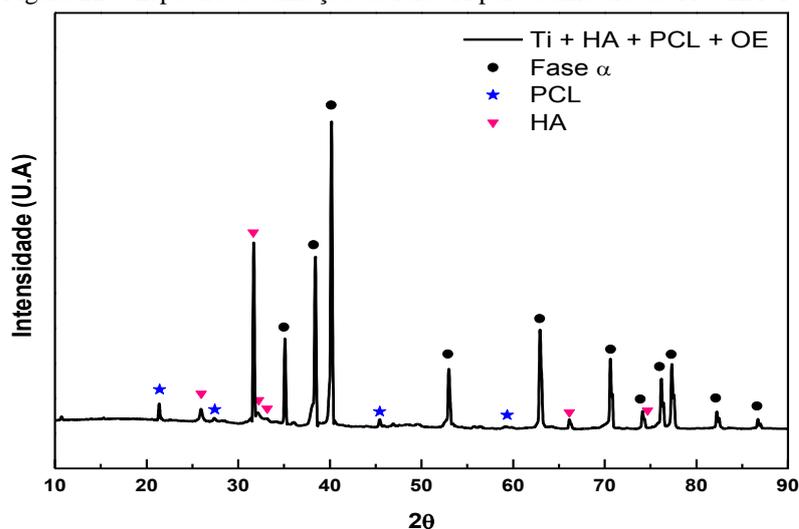
ELEMENTO (% EM MASSA)	AMOSTRA	
	Ti+PCL+OE	Ti+HA+PCL+OE
C	85,11	18,51
O	14,89	13,27
Na	0	1,36
P	0	17,31
Cl	0	11,82
Ca	0	37,72
Ti	1,13	0,17

Fonte: Da autora.

A presença de picos de Na e Cl se deve aos reagentes utilizados na preparação e recobrimento biomimético da amostra (NaOH, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub> e HCl). Os mesmos elementos foram reportados por Coelho *et al.* (2020).

A Figura 22 apresenta o difratograma de raios X obtido para a amostra de Ti c.p. recoberta com HA e PCL contendo óleo essencial.

Figura 22 – Espectro do difração de raios X para a amostra de Ti + HA+PCL + OE



Fonte: Da autora.

Assim como observado na amostra anterior, a análise do difratograma permite confirmar a presença da fase  $\alpha$  do Ti, com picos característicos em  $2\theta = 35^\circ$ ,  $38^\circ$  e  $41^\circ$ , correspondentes à estrutura do tipo HCP.

Da mesma forma, o pico mais intenso da PCL é observado em  $2\theta = 21^\circ$ . Os demais picos referentes ao material polimérico possuem intensidade inferior, visto que seu caráter é semicristalino (resultando em picos menos definidos e de menor dimensão que de materiais cristalinos como Ti e HA).

Em adição, picos da HA localizam-se em  $2\theta = 25,9^\circ$ ,  $31,5^\circ$ ,  $32,2^\circ$  e  $32,7^\circ$ , referentes aos planos cristalográficos (002), (211), (112) e (300), respectivamente (SANTOS *et al.*, 2019). Padrões de difração obtidos por Rakngarm, Miyashita e Mutoh (2007) também mostraram picos de HA na faixa de  $2\theta = 30-33^\circ$ , assim como observado por Chen *et al.* (2006). Ambos apresentaram uma intensidade significativamente menor em relação aos picos da fase  $\alpha$  do Ti c.p.

A rede de HA presente nos ossos e dentes permite substituições aniônicas e catiônicas, as quais podem alterar a cristalinidade, o parâmetro da rede, as dimensões do cristal, a textura da superfície, a estabilidade e a solubilidade da estrutura da HA.

Os grupos fosfato podem ser substituídos por carbonatos, citratos e vanadatos, enquanto as hidroxilas podem sofrer trocas por carbonatos, fluoretos e cloretos. O íon  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser substituído por cátions metálicos como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (Kim *et al.*, 2018; ALMEIDA, 2018; RAKNGARM; MIYASHITA; MUTOH, 2007).

O magnésio substitui facilmente  $\text{Ca}^{2+}$  na rede cristalina, uma vez que seu raio iônico ( $0,66 \text{ \AA}$ ) é menor que o do elemento original ( $0,99 \text{ \AA}$ ), ele pode causar redução nos parâmetros de célula dando origem a uma apatita com baixa cristalinidade e maior solubilidade devido à redução do tamanho dos cristalitos e/ou aumento na distorção do cristal aumentando consequentemente a taxa de dissolução (ALMEIDA, 2018; KHANRA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2013; REVILLA-LÓPEZ *et al.*, 2016).

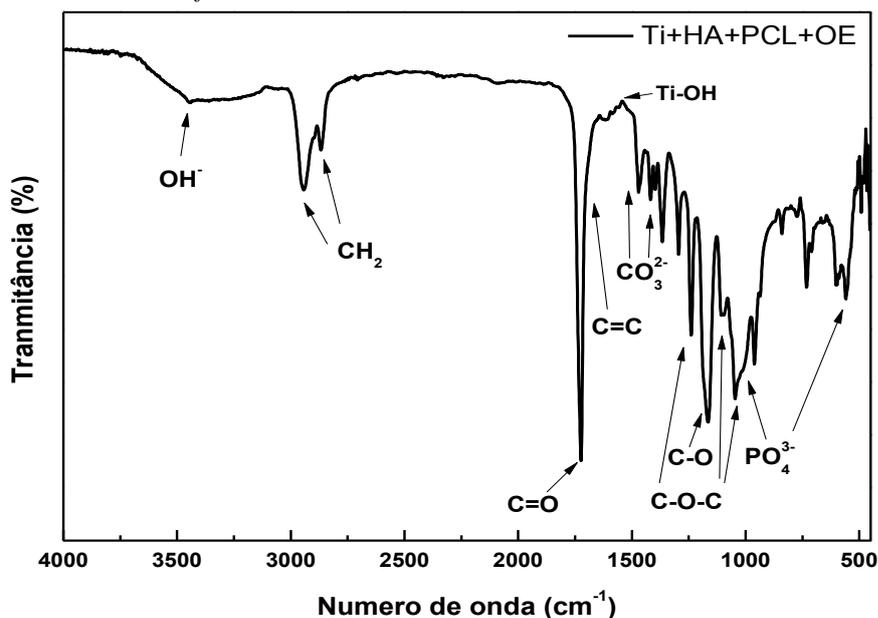
Em níveis fisiológicos, esse processo pode promover a mineralização do osso ou controlar a taxa de nucleação dos cristais de HA, inibindo sua cristalização quando usadas em concentrações maiores que a razão  $\text{Mg}/\text{Ca} = 0,05$  por meio de reações enzimáticas específicas (ALMEIDA, 2018; KHANRA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2013; REVILLA-LÓPEZ *et al.*, 2016). Visto que não houve variação do ângulo de difração observado para a HA obtida, sugere que não houve substituição desse tipo na amostra analisada.

Outra possível fase é a  $\beta$ -TCP, fase deficiente em Ca, resultante da transformação na estrutura da HA pela substituição dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  por cátions monovalentes. Sua presença é responsável pela desorganização estrutural na HA, gerando as mesmas alterações anteriormente citadas (LIU *et al.*, 2013; KHANRA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2013; REVILLA-LÓPEZ *et al.*, 2016).

Tal fase foi observada por Vieira (2013) em amostras de Ti c.p. recobertas com HA e dopadas com  $\text{AgNO}_3$  em concentrações variando de 20 a 100 ppm. Por meio do difratograma de DRX, sua presença pode ser detectada nos picos localizados em  $2\theta = 26^\circ$ ,  $33^\circ$  e  $34^\circ$ , os quais não foram observados nas amostras de Ti+HA+PCL+OE.

O espectro obtido na análise de FTIR para as amostras de Ti+HA+PCL+OE está ilustrado na Figura 23.

Figura 23 – Espectro de infravermelho obtido para a amostra de Ti c.p. recoberta com HA e filme de PCL incorporado com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*



Fonte: Da autora.

A existência de HA no material está diretamente ligada à presença de bandas de absorção referentes à vibração dos grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e hidroxila ( $\text{OH}^-$ ). A banda larga observada na região entre  $3670\text{-}3570\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento do grupo  $\text{OH}^-$ , enquanto as bandas em  $1196$  e  $1022\text{ cm}^{-1}$  indicam o estiramento do grupo fosfato. A vibração deste é observada em  $563\text{ cm}^{-1}$ . A banda de vibração relacionada à ligação  $\text{Ti-OH}$  ( $1576\text{ cm}^{-1}$ ) também foi observada.

O tipo de HA obtida é caracterizada mediante a análise das vibrações do grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ . As bandas observadas em  $1514\text{ cm}^{-1}$  e  $1412\text{ cm}^{-1}$  referem-se ao estiramento do grupo dos tipos A e B, respectivamente, caracterizando a HA presente como do tipo AB.

Assim como na amostra anterior, as bandas características do recobrimento polimérico contendo OE também são observadas, confirmando a presença do mesmo na superfície do Ti c.p.

A Tabela 9 apresenta os valores obtidos para as bandas de absorção determinadas por FTIR para cada componente presente nas amostras.

Tabela 9 – Bandas de absorção obtidas por FTIR

NÚMERO DE ONDA ( $\text{cm}^{-1}$ )	DESCRIÇÃO	COMPONENTE
3670-3570	Estiramento de $\text{OH}^-$	PCL; OE; HA
2900	Estiramento C-H no $\text{CH}_2$	PCL; OE
2862; 2942	Deformação de $\text{CH}_2$ (rede inorgânica)	PCL
1736	Estiramento C=O (éster)	PCL
1670	Vibração C=C (anel aromático)	OE
1576	Vibração Ti-OH	Ti c.p.; PCL
1514	Estiramento $\text{CO}_3^{2-}$ (grupo A)	HA
1412	Estiramento $\text{CO}_3^{2-}$ (grupo B)	HA
1448; 1381	Dobramento C-H no $\text{CH}_3$	OE
1233; 1107; 1042	Vibração assimétrica do C-O-C	PCL
1160	Vibração C-O (alcoólica)	OE
1196; 1022	Estiramento $\text{PO}_4^{3-}$	HA
563	Vibração $\text{PO}_4^{3-}$	HA

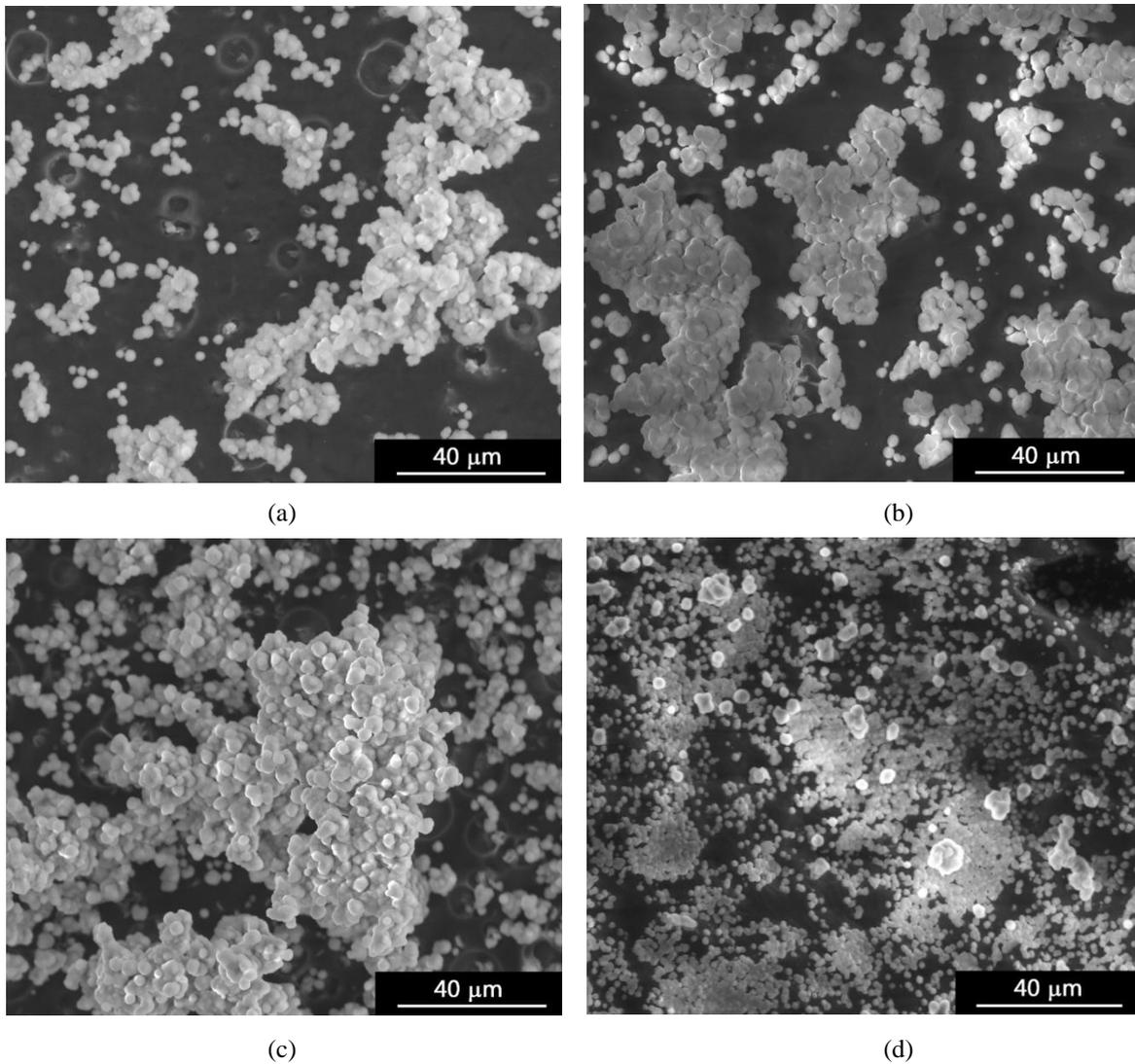
Fonte: Da autora.

## 4.2 ENSAIO DE BIOATIVIDADE

### 4.2.1 Condição Ti + PCL + OE

As Figuras 24 e 25 exibem as micrografias obtidas por MEV para as quatro semanas de ensaio de bioatividade, para as amostras de Ti c.p. recoberta com PCL e OE.

Figura 24 – Micrografias obtidas por MEV (visão geral) para amostra Ti+PCL+OE após ensaio de bioatividade



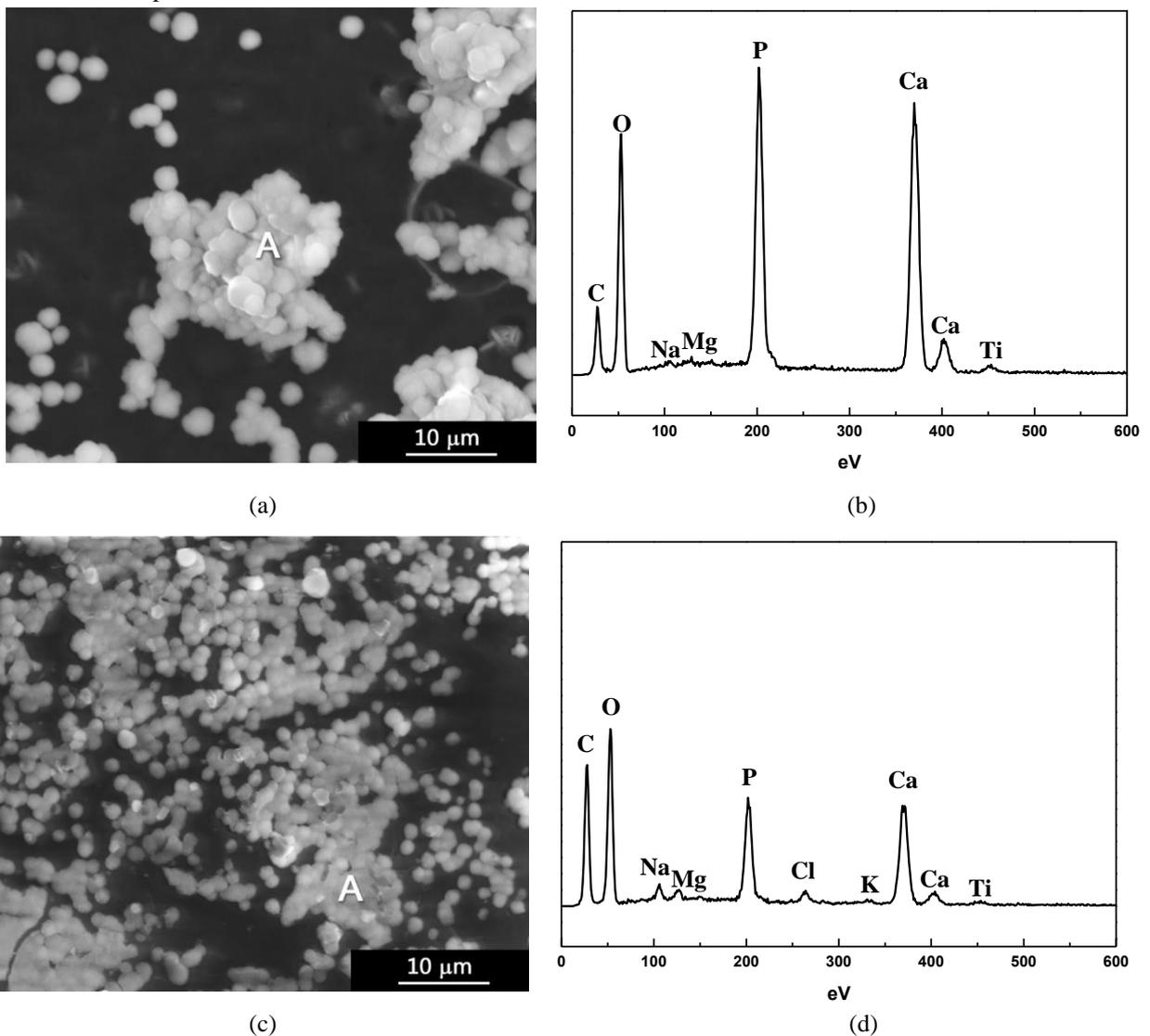
Fonte: Da autora.

Legenda: (a) Semana 1;  
(b) Semana 2;  
(c) Semana 3;  
(d) Semana 4.

É possível observar a matriz do substrato metálico (região mais escura), juntamente com a formação de nódulos de mineralização, que podem ser melhor visualizados nas Figuras 25a e 25c com maior aumento.

Para confirmar a composição química, foram realizadas microanálise por EDS nas regiões indicadas nas Figuras 25b e 25d, em que observam-se picos característicos dos elementos P e Ca, provenientes do desenvolvimento de apatitas.

Figura 25 – Micrografias obtidas por MEV (em detalhes) e espectros obtidos por microanálise por EDS na região A, para ensaio de bioatividade da amostra Ti+ PCL+OE



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) Semana 1;  
 (b) Semana 1;  
 (c) Semana 4;  
 (d) Semana 4.

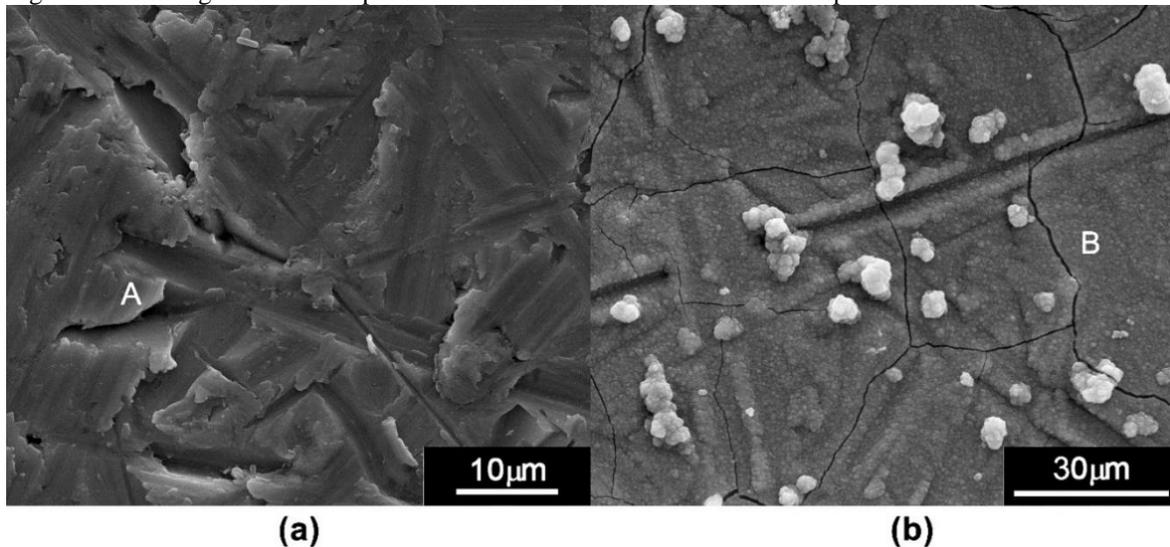
Os elementos C e O são característicos do recobrimento de PCL e OE utilizado, e os elementos Na, Mg e K estão associados aos reagentes utilizados no tratamento alcalino e na constituição do fluido corpóreo simulado.

É possível visualizar que a HA cresce a partir da primeira semana, apresentando o morfologia globular arredondada, favorável ao processo osteointegrativo. No entanto, a microanálise por EDS exibiu uma redução na concentração de Ca e P para a amostra após 4 semanas de ensaio.

A bioatividade do Ti c.p (grau 4) foi analisada por Ricci (2017), em que foi observado que na primeira semana, não ocorreu a formação de HA, enquanto que na quarta semana, pôde-se visualizar uma fina camada de recobrimento, além da aparição de pequenos glóbulos, como ilustrado na Figura 26.

A partir da microanálise por EDS realizada nas regiões A e B, apresentada na Figura 27, confirmou-se que os grânulos eram compostos por elementos químicos formadores da HA, tais como Ca, O e P.

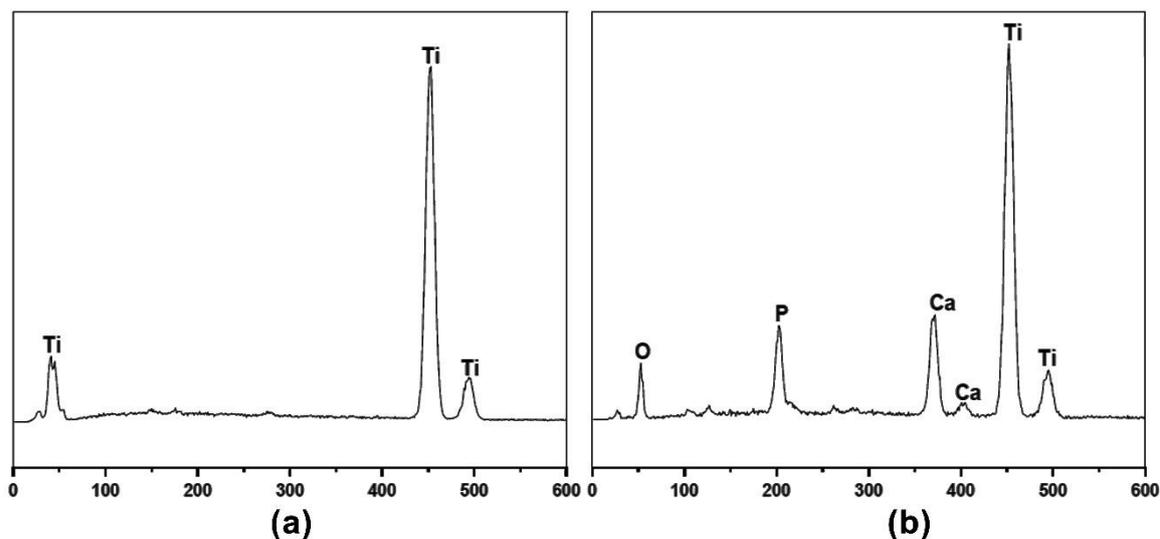
Figura 26 - Micrografias obtidas por MEV do ensaio de bioatividade do Ti c.p



Fonte: Adaptado de RICCI (2017).

Legenda: (a) Semana 1;  
(b) Semana 4.

Figura 27 - Espectros obtidos na microanálise por EDS do Ti c.p nos pontos assinalados



Fonte: Adaptado de RICCI (2017).

Legenda: (a) Ponto A – Semana 1;  
(b) Ponto B – Semana 4.

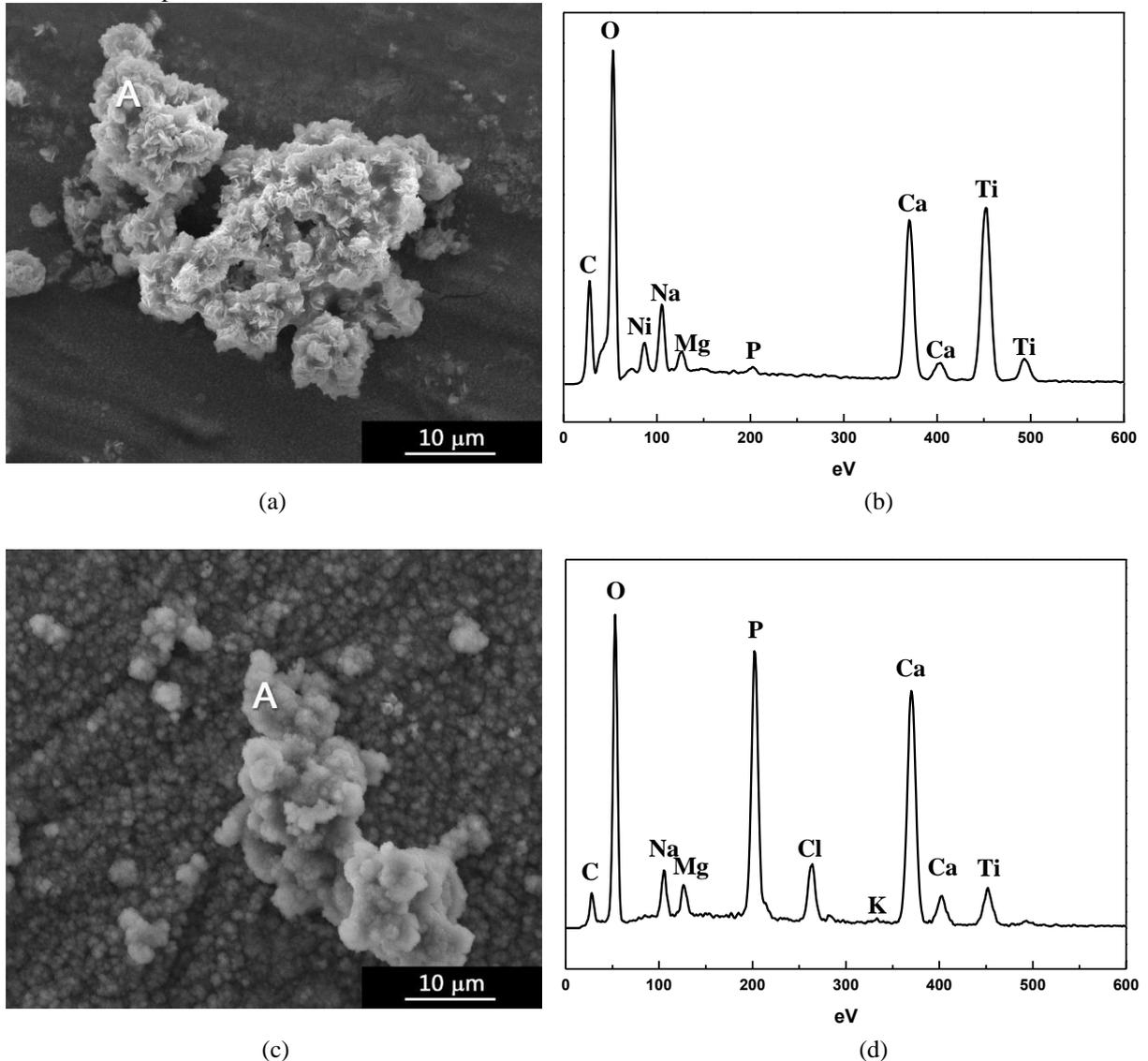
Comparando os resultados obtidos para as condições propostas no presente trabalho com os obtidos por Ricci (2017) para o Ti c.p. sem recobrimento, observa-se que a HA forma-se de maneira mais abundante e homogênea pela superfície do material recoberto.

Para comparação do possível efeito osteoindutivo do OE, realizou-se o ensaio de bioatividade na amostra de Ti c.p. recoberta somente com PCL. As micrografias obtidas por MEV e os espectros por EDS estão apresentados na Figura 28.

Observa-se que, sem a presença do OE, ocorre o crescimento de apatitas na primeira semana, porém com aspecto de ripas, desfavorável à posterior integração osso-implante. Após a quarta semana de ensaio, nota-se a presença de uma camada primária de HA, sobreposta por camadas mais espessas. No entanto, os grânulos das camadas superiores sofreram alteração na morfologia, com perda das limitações de poros e vilosidades, assim como observado por Costa *et al.* (2015) em amostras implantadas para reparo de defeito ósseo proximal da tibia de ovinos.

Sugere-se, então, que o OE atue também no crescimento de HA, favorecendo sua morfologia para o processo osteointegrativo. Esse efeito possivelmente decorre da presença de componentes como 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol e  $\gamma$ -terpineno, também encontrados nos óleos essenciais utilizados em estudos conduzidos por Sabbieti *et al.* (2011) e Elbahnasawy *et al.* (2019), os quais tiveram efeitos positivos na absorção de Ca e na proliferação de osteoblastos.

Figura 28 – Micrografias obtidas por MEV (em detalhes) e espectros obtido por microanálise por EDS na região A, para ensaio de bioatividade da amostra Ti+ PCL



Fonte: Da autora.

Legenda: (a) Semana 1;  
 (b) Semana 1;  
 (c) Semana 4;  
 (d) Semana 4.

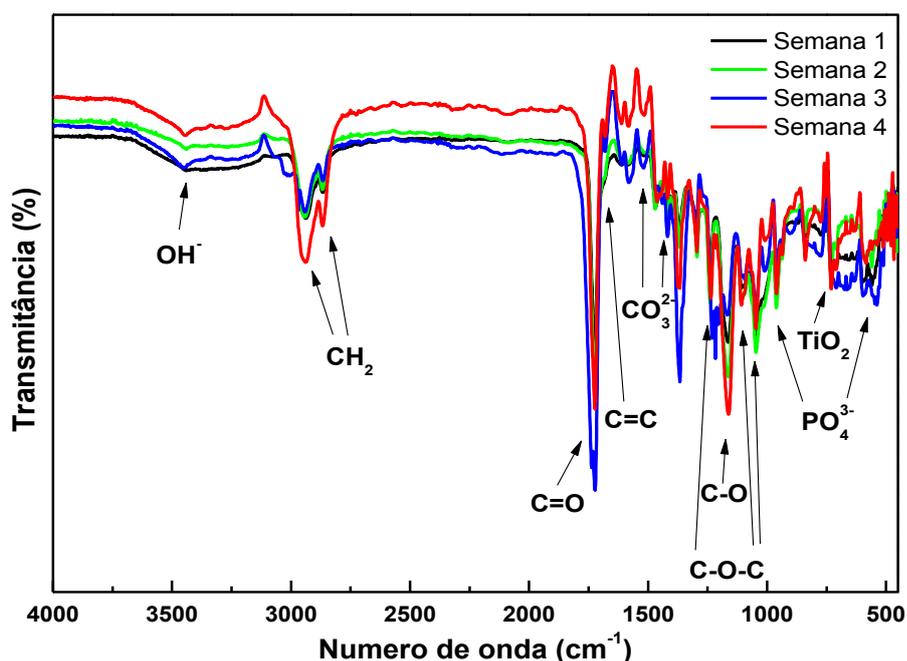
Lazlo (2013) reportou dois casos em que o uso do OE de Melaleuca demonstrou-se eficiente no processo de recuperação óssea. No primeiro deles, pacientes que utilizavam o OE como antisséptico para o tratamento de gengivite, notaram um raro processo de recalcificação da arcada dentária após poucos meses de uso.

O segundo caso reportado, foi uma paciente com desgaste severo na cabeça do fêmur devido à osteoporose, aplicou durante 2 meses o OE de Melaleuca na região afetada como

antiinflamatório, e foi observado um alívio da dor após esse período. Os exames de densitometria óssea demonstraram que o local estava recuperando a massa óssea (LAZLO, 2013).

A evolução da presença de HA pode ser feita por meio da análise de bandas de absorção no infravermelho, referentes à vibração dos grupos fosfato, carbonato e hidroxila, conforme ilustrado na Figura 29.

Figura 29 – Espectro de infravermelho obtido após ensaio de bioatividade para a amostra Ti+PCL+OE



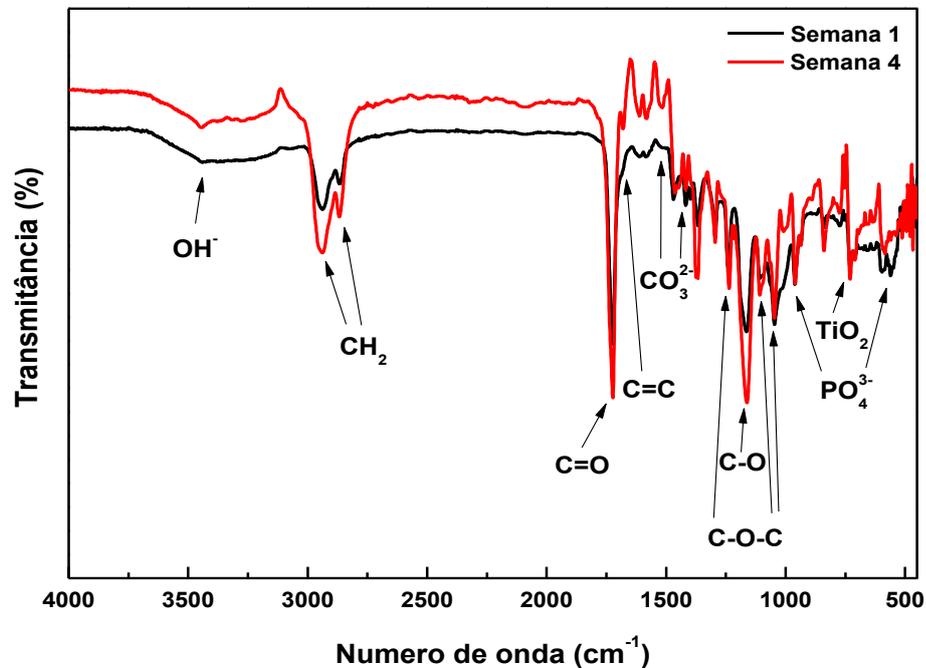
Fonte: Da autora.

Bandas associadas ao estiramento do grupo  $\text{OH}^-$  foram observadas na região entre  $3670\text{-}3570\text{ cm}^{-1}$ , enquanto em  $1514\text{ cm}^{-1}$  e  $1412\text{ cm}^{-1}$  referem-se ao estiramento do grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ . Bandas relacionadas ao grupo fosfato foram identificadas em  $1196$  e  $1022\text{ cm}^{-1}$  (estiramento) e em  $563\text{ cm}^{-1}$  (vibração).

Comparando a intensidade das bandas observadas na primeira e na quarta semana, nota-se um aumento para todos os componentes. As bandas características da PCL e do OE mantiveram-se presentes após as quatro semanas de ensaio, sugerindo que o recobrimento manteve-se aderente à superfície do material. Também foi observado que as bandas referentes à deformação de  $\text{CH}_2$  do polímero interligado à rede inorgânica ( $2862$  e  $2942\text{ cm}^{-1}$ ) aumentaram.

A Figura 30 faz um comparativo entre o espectro obtido após a 1ª e 4ª semana, de modo a obter melhor visualização da evolução das bandas após as semanas de ensaio.

Figura 30 – Espectro de infravermelho obtido após a 1ª e 4ª semanas de ensaio de bioatividade para a amostra Ti+PCL+OE



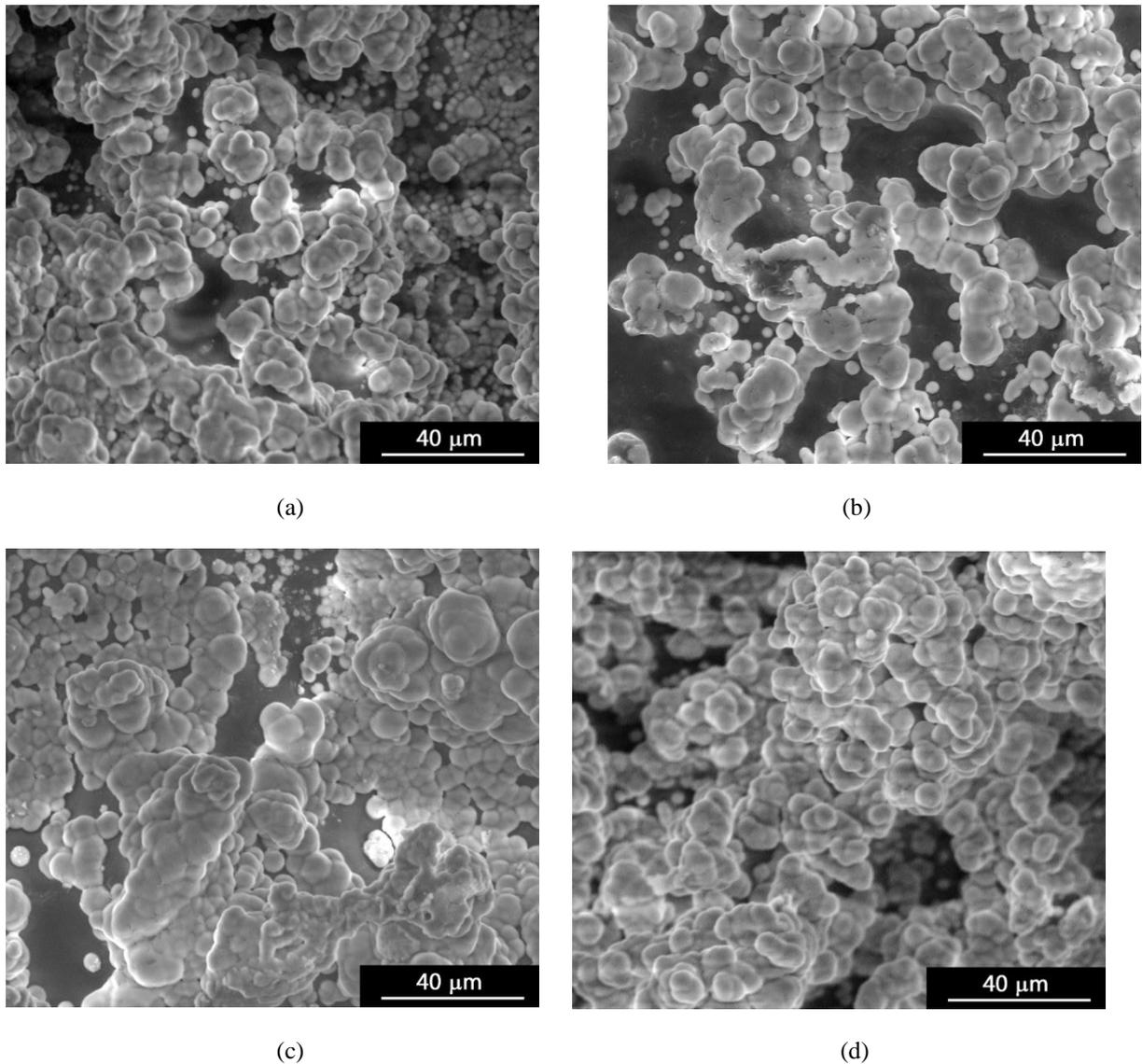
Fonte: Da autora.

#### 4.2.2 Condição Ti + HA + PCL + OE

As micrografias obtidas por MEV para as amostras de Ti+HA+PCL+OE após as quatro semanas de ensaio estão apresentadas na Figura 31.

Para esta condição, foi possível observar que o crescimento de HA ocorre de maneira mais acelerada que nas condições anteriores, formando grânulos de maior dimensão, devido à presença prévia do recobrimento de HA. Nota-se também a sobreposição de camadas, de modo que as camadas mais internas possuem glóbulos de diâmetro inferior aos presentes nas mais externas, visto que terão seu crescimento limitado pela próxima camada em formação.

Figura 31 – Micrografias obtidas por MEV (visão geral) para amostra Ti+HA+PCL+OE após ensaio de bioatividade



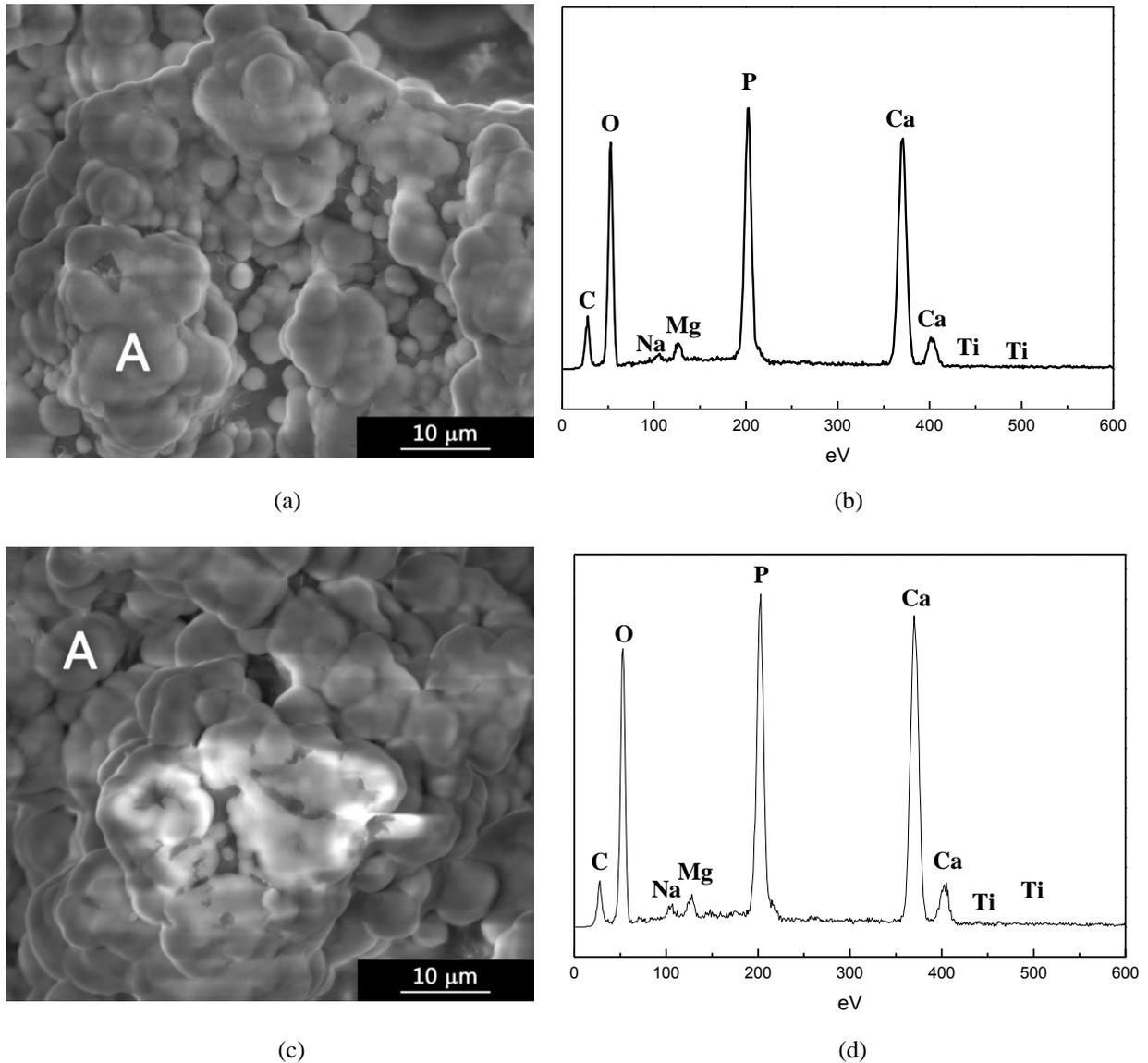
Fonte: Da autora.

Legenda: (a) Semana 1;  
 (b) Semana 2;  
 (c) Semana 3;  
 (d) Semana 4.

O empilhamento das camadas de HA fica mais evidente nas micrografias com maior aumento, como ilustrado pelas Figuras 32a e 32c, em que também foi possível observar uma estrutura globular do recobrimento, característica desejável para o processo osseointegrativo.

A microanálise por EDS (Figuras 32b e 32d), realizada na região A, indica a presença dos mesmos elementos observados na condição Ti+PCL+OE (C, O, Na, Mg, P, Ca e Ti) os quais são esperados pela composição química do substrato e recobrimentos aplicados.

Figura 32 – Micrografias obtidas por MEV (em detalhes) e espectros obtidos por microanálise por EDS na região A, para ensaio de bioatividade da amostra Ti+HA+ PCL+OE



Fonte: Da autora.

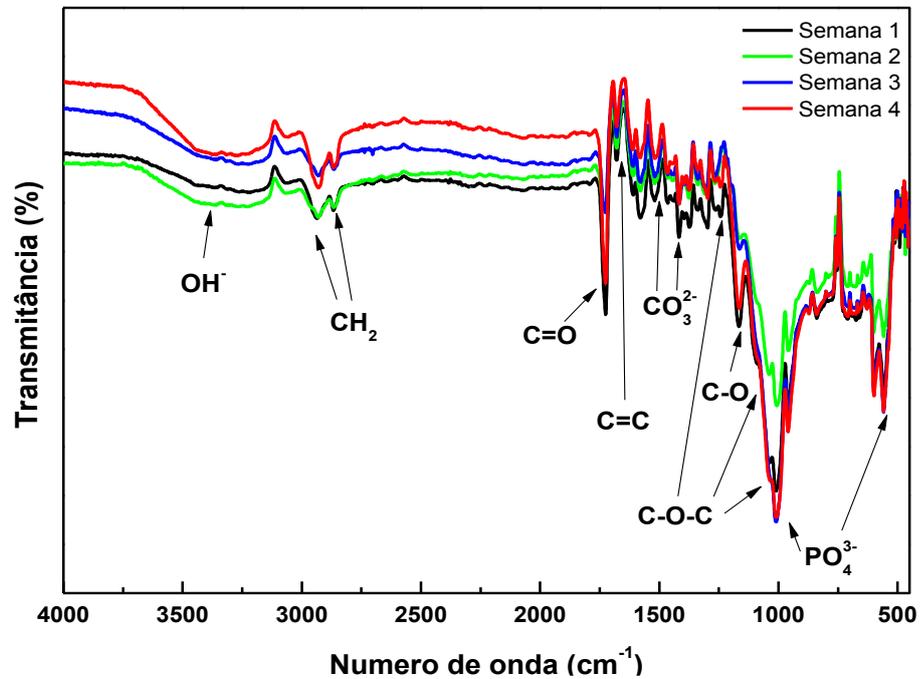
Legenda: (a) Semana 1;  
 (b) Semana 1;  
 (c) Semana 4;  
 (d) Semana 4.

A mesma morfologia, predominantemente globular arredondada, pôde ser observada na quarta semana. Além disso, a microanálise por EDS indica concentrações superiores dos elementos P e Ca, sugerindo maior quantidade de HA em relação à primeira semana de ensaio.

A partir da análise do espectro obtido por infravermelho (Figura 33), observa-se a manutenção do recobrimento polimérico utilizado, devido à presença de bandas de  $\text{CH}_2$ , C-O-C, C=O, C=C e C-O, relacionadas às ligações características da PCL e do OE. Para melhor

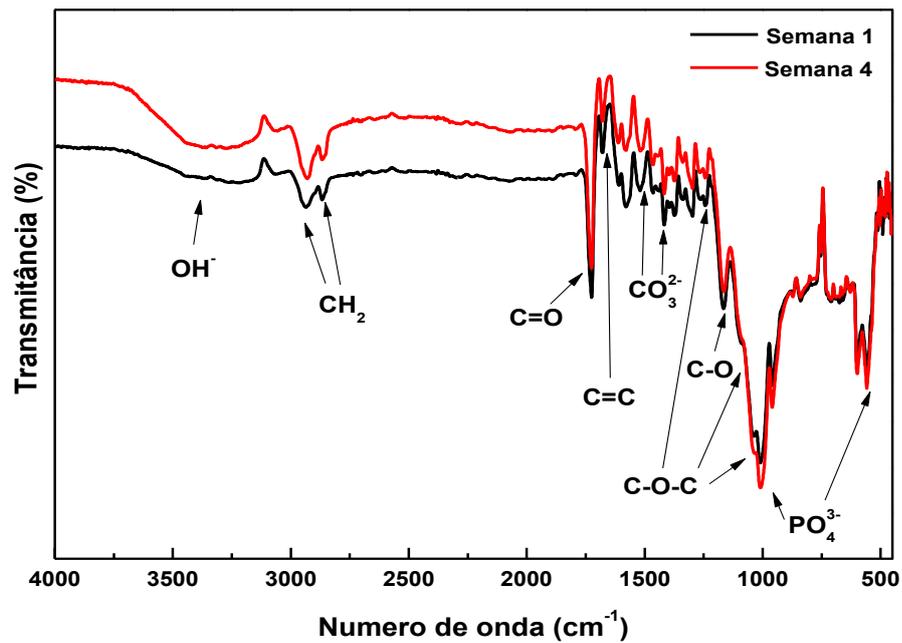
visualizar a evolução das bandas após as semanas de ensaio, a Figura 34 mostra um comparativo entre o espectro obtido após a 1ª e 4ª semana.

Figura 33 – Espectro de infravermelho obtido após ensaio de bioatividade para a amostra Ti+HA+PCL+OE



Fonte: Da autora.

Figura 34 – Espectro de infravermelho obtido após a 1ª e 4ª semanas de ensaio de bioatividade para a amostra Ti+HA+PCL+OE



Fonte: Da autora.

Assim como avaliado para a condição anterior, as bandas de absorção referentes à presença dos grupos  $\text{OH}^-$  ( $3670\text{-}3570\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{CO}_3^{2-}$  ( $1514\text{ cm}^{-1}$  e  $1412\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $1196$ ,  $1022$  e  $563\text{ cm}^{-1}$ ), apresentaram maior intensidade após as 4 semanas de ensaio, corroborando com o crescimento de HA observado pelas micrografias.

Comparando os resultados obtidos, nota-se que as amostras com recobrimento prévio de HA apresentam crescimento mais acelerado durante o ensaio de bioatividade, decorrente da presença da mesma na superfície do material.

Esse fato também foi observado por Ochoa (2013), que comparou a eficácia da PCL pura e compósitos de HA+PCL contendo ou não Alendronato, no reparo de defeitos ósseos no olecrano de coelhos. Apesar de todas as condições estudadas apresentarem biocompatibilidade e capacidade de biodegradação simultaneamente à formação de tecido ósseo, a resposta dos compósitos contendo material biocerâmico foi mais evidente.

### 4.3 ENSAIO DE CORROSÃO

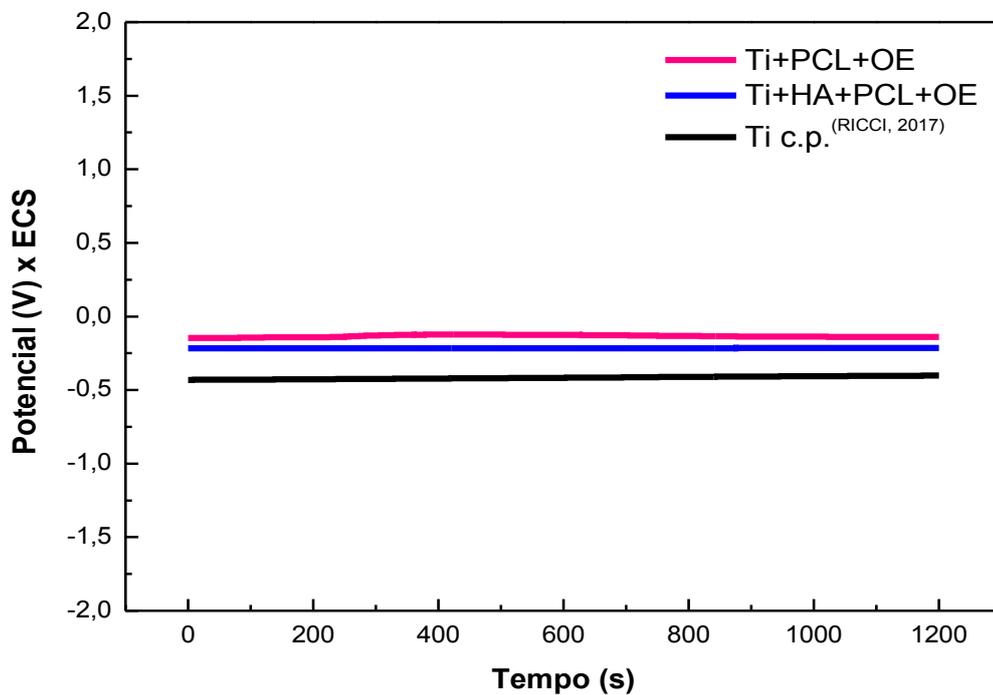
#### 4.3.1 Circuito Aberto

As curvas obtidas no ensaio de OCP para as condições estudadas estão ilustradas na Figura 35, e os respectivos potenciais são apresentados na Tabela 10.

A análise de curva é feita a partir do seu comportamento, que pode ser linear ou não linear, crescente ou decrescente. Um aumento de potencial na direção positiva indica a formação de uma película passiva, enquanto um potencial constante indica que a película se mantém intacta e protetora (POPOV, 2015; ELIAZ, 2019b).

Uma diminuição de potencial no indica quebra ou dissolução do filme, ou a não formação da película. Além disso, quanto mais linear se apresentar a curva, maior a estabilidade da montagem do sistema (POPOV, 2015).

Figura 35 – Curvas de OCP para as condições Ti+PCL+OE e Ti+HA+PCL+OE em meio 1,5 SBF, a 36,5°C e pH 7,4



Fonte: Da autora.

Tabela 10 – Potenciais obtidos no ensaio de OCP para as amostras Ti+HA+PCL+OE e Ti+PCL+OE.

Condições estudadas	Potencial (V)
Ti + HA + PCL + OE	-0,1904±0,0334
Ti + PCL + OE	-0,1699±0,0260

Fonte: Da autora.

Nas condições observou-se que as curvas obtidas no ensaio de OCP apresentaram comportamento linear semelhante, indicando a tendência de estabilização do filme passivo formado. Nota-se que a condição Ti+PCL+OE sofreu um pequeno decaimento no potencial em 250 s, seguido da recuperação e manutenção deste após 900 s.

Ensaio conduzidos por Ricci (2017) demonstraram uma pequena variação no sentido positivo do potencial para a amostra de Ti c.p. sem recobrimento, indicando a formação de uma camada passiva superficial de óxido de titânio, mais estável que o metal puro.

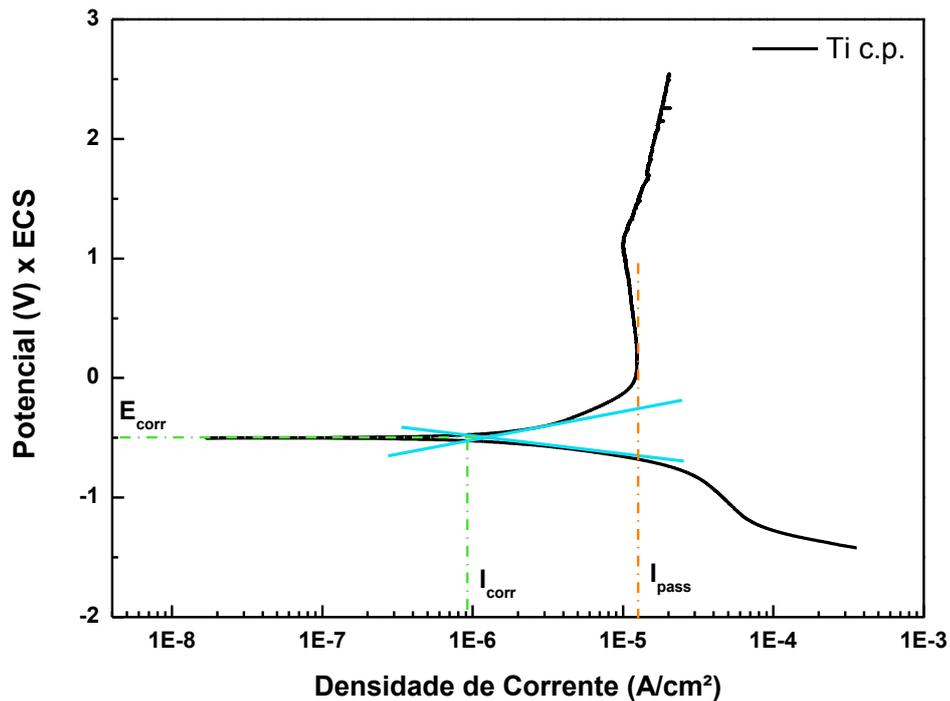
Comparando os valores obtidos para as condições propostas com o potencial determinado por Ricci (2017) para o Ti c.p. (-0,4V), nota-se que o recobrimento aumenta o valor do potencial, indicando que o material é mais resistente ao processo corrosivo.

### 4.3.2 Polarização Linear

Para análise quantitativa do processo corrosivo, utiliza-se o método de extrapolação de Tafel ou método de inserção, a qual deve ser realizada em uma curva de polarização de potencial *versus* log da densidade de corrente, como ilustra a Figura 36.

São traçadas curvas tangentes às regiões catódica e anódica, resultando na interseção dos ramos extrapolados, gerando um par de valores coordenados, correspondentes ao potencial de corrosão ( $E_{corr}$ ) e a densidade de corrente de corrosão ( $I_{corr}$ ) do sistema. Traçando tangentes às regiões passiva e transpassiva, obtém-se os potenciais de pite ( $E_{pite}$ ) e corrente de passivação ( $I_{pass}$ ) (ELIAZ, 2019b).

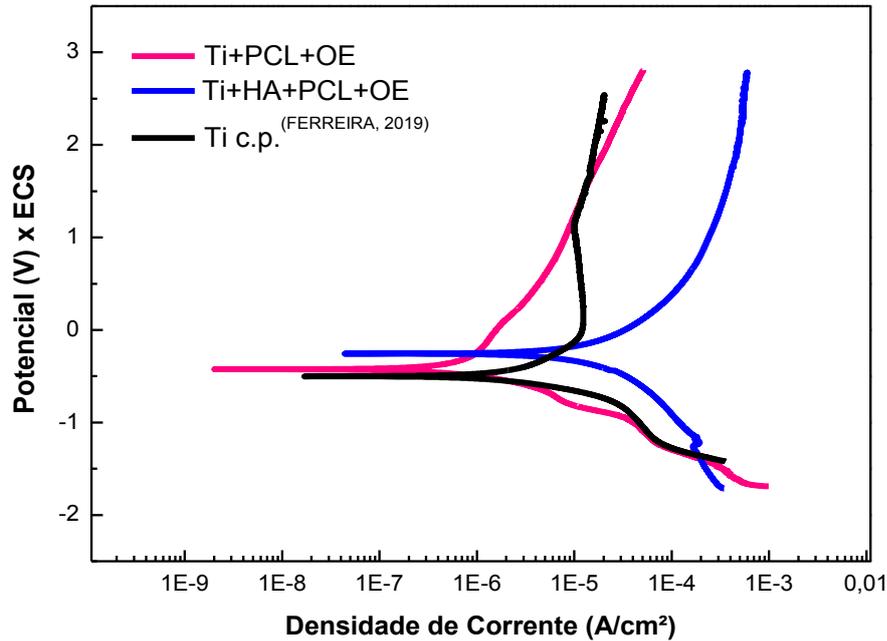
Figura 36 – Curvas de polarização potenciadinâmica e extrapolação das retas de Tafel para amostra de Ti c.p. (grau 4)



Fonte: Adaptado de FERREIRA *et al.* (2019).

As curvas de polarização linear das amostras estão ilustradas na Figura 37. Os parâmetros eletroquímicos foram determinados com o auxílio do software Ec-Lab®, por meio da função Tafel Fit, conforme apresentados na Tabela 11.

Figura 37 – Curva de polarização linear para as condições Ti+PCL+OE e Ti+HA+PCL+OE, em meio 1,5 SBF, a 36,5°C e pH 7,4



Fonte: Da autora.

Tabela 11 – Parâmetros eletroquímicos para as condições Ti+PCL+OE e Ti+HA+PCL+OE

CONDIÇÃO	$E_{corr}$ (V)	$I_{corr}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$I_{pass}$ (A/cm <sup>2</sup> )
Ti + HA + PCL + OE	-0,2369±0,0321	(9,68±5,58) x10 <sup>-6</sup>	(5,59±1,26) x10 <sup>-4</sup>
Ti + PCL + OE	-0,4207±0,0117	(7,48±4,07) x10 <sup>-7</sup>	-----

Fonte: Da autora.

Legenda:  $E_{corr}$  = potencial de corrosão;  
 $I_{corr}$  = densidade de corrente de corrosão;  
 $I_{pass}$  = densidade de corrente de passivação.

Os valores de  $E_{corr}$  para as condições Ti+PCL+OE e Ti+HA+PCL+OE indicam que a presença de HA aumenta a resistência à corrosão do material. Além disso, observa-se a presença definida de uma região passiva, a qual não ocorre na amostra Ti+PCL+OE. Esse comportamento corrobora o observado pela curva de OCP, a qual sugeriu a formação de uma camada passiva mais estável na condição Ti+HA+PCL+OE.

Ferreira *et al.* (2018) propôs o recobrimento polimérico de PCL em amostras de Ti c.p. grau 4, utilizadas na confecção de implantes cardiovasculares, como alternativa para melhoria da resistência a corrosão do material, e conseqüente melhoria na biocompatibilidade do mesmo.

Neste estudo, o Ti c.p. apresentou uma nítida região de passivação, com a formação da camada passiva ( $I_{\text{pass}} = 1,97 \times 10^{-5} \text{ A/cm}^2$ ), que se rompe com um potencial de cerca de 1,5 V. Esse comportamento foi reportado por Coelho *et al.* (2020), que sugere a formação de uma película passiva compacta rapidamente (possivelmente óxido de titânio) na superfície de Ti c.p.

Na presença dos recobrimentos propostos neste trabalho (com e sem HA), esse comportamento não foi observado, não havendo ruptura do filme durante o teste, do mesmo modo que ocorreu para as amostras recobertas nos ensaios realizados por Ferreira *et al.* (2018).

Comparando os resultados obtidos, observa-se que as condições propostas apresentam potenciais de corrosão superiores ao do Ti c.p. sem recobrimento ( $E_{\text{corr}} = -0,4863 \text{ V}$ ), o que indica que os recobrimentos utilizados foram mais estáveis e diminuíram o processo corrosivo.

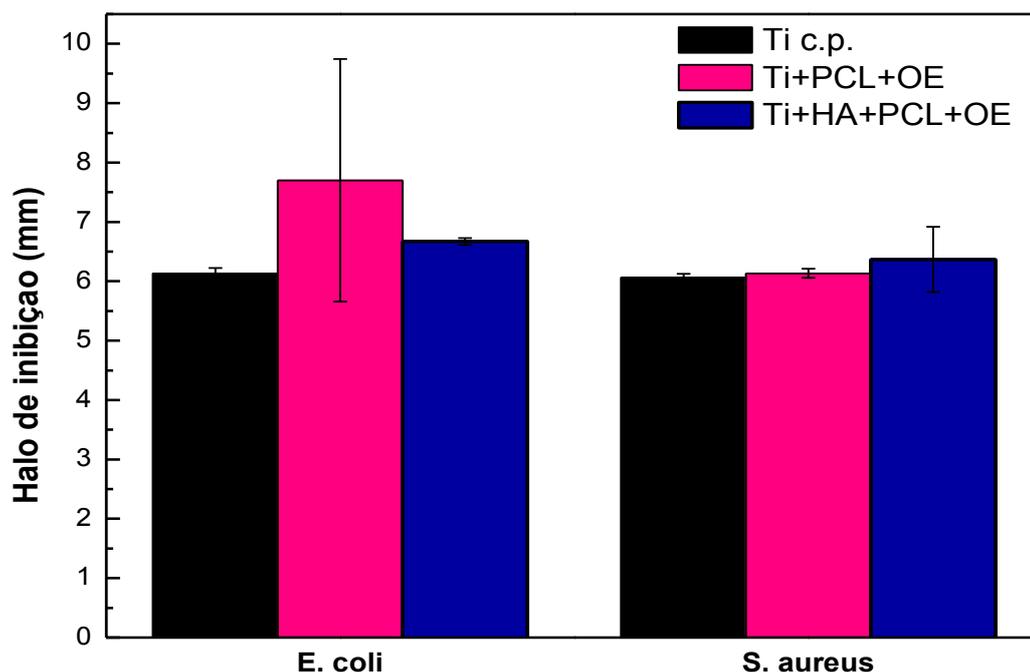
O comportamento da condição Ti+PCL+OE assemelha-se ao da condição Ti+PCL obtida por Ferreira *et al.* (2018). O potencial de corrosão para a condição Ti+PCL+OE foi de -0,4207 V, enquanto para a condição Ti+PCL, no mesmo meio corrosivo, foi de -0,3061 V. Isso indica que a corrosão inicia primeiramente na condição contendo OE, visto que o  $E_{\text{corr}}$  obtido para a amostra somente recoberta com PCL é superior.

Souza *et al.* (2018) avaliaram a corrosão em amostras de Ti c.p. recobertas com HA em meio 1,5 SBF à temperatura de 36,5°C e pH 7,4, as quais apresentaram  $E_{\text{corr}} = -0,321 \text{ V}$ .

No presente trabalho, o potencial de corrosão obtido para a condição Ti+HA+PCL+OE foi maior ( $E_{\text{corr}} = -0,2369 \text{ V}$ ). Isso deve-se ao fato de o PCL ser mais inerte e estável em meio SBF quando comparado ao recobrimento biomimético (HA). Portanto, o uso da PCL pode proteger o implante contra o ataque de fluidos corporais e melhorar sua biocompatibilidade (CATAURO, 2018; FERREIRA *et al.*, 2019; VITERI, 2013).

#### 4.4 ENSAIO MICROBIOLÓGICO

Os resultados obtidos por meio do teste de disco-difusão para as condições propostas estão apresentados na Figura 38 e Tabela 12.

Figura 38 – Zona de inibição das condições para cepas de *E. coli* e *S. aureus* (Teste de disco-difusão)

Fonte: Da autora.

Tabela 12 – Zona de inibição das condições para as cepas de *E. coli* e *S. aureus* (Teste de disco-difusão)

CONDIÇÃO	ZONA DE INIBIÇÃO (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<b>Ti c.p.</b>	6,13±0,088	6,067±0,058
<b>Ti+PCL+OE</b>	7,70±2,042	6,135±0,078
<b>Ti+HA+PCL+OE</b>	6,67±0,058	6,367±0,551

Fonte: Da autora.

A partir da análise das curvas, observa-se que os halos de inibição obtidos para a condição Ti+HA+PCL+OE em ambas as bactérias avaliadas são semelhantes. Frente às cepas de *S. aureus*, tal condição apresenta-se discretamente mais eficiente no controle do crescimento bacteriano. As cepas de *E. coli* mostraram-se mais sensíveis à condição sem a presença de HA.

Ensaio realizado por Melo *et al.* (2015) comparando a atividade dos óleos essenciais de melaleuca, tomilho branco e orégano, verificaram que todas as cepas bacterianas utilizadas foram sensíveis aos óleos essenciais testados (com base em zonas claras de inibição de crescimento bacteriano), sugerindo um amplo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Na maioria dos casos, no entanto, as Concentrações Bactericidas Mínimas (MBC) para bactérias gram-negativas foram menores em comparação aos MBC para bactérias gram-positivas.

Testes conduzidos por Singh et. al. (2016) demonstraram que o OE de melaleuca comporta-se como bacteriostático quando em baixa concentração, mas bactericida em concentrações altas.

Estudos sugerem que o mecanismo de ação do óleo essencial ocorra a partir do aumento da permeabilidade dos sistemas lipossômicos, causando lise e perda da integridade da membrana, ocasionando o vazamento de íons e inibição da respiração, induzindo a morte da bactéria (CARSON; MEE; RILEY, 2002; COX *et al.*, 2001; SINGH *et al.*, 2016)

Também foram observadas diferenças na suscetibilidade dos organismos testados frente ao OE de melaleuca e estas são interpretadas em termos de variações na taxa de penetração de monoterpenos através da parede celular e estruturas da membrana celular.

A capacidade do OE em romper a barreira da permeabilidade das estruturas das membranas celulares e, conseqüentemente, a perda do controle quimiosmótico é a fonte mais provável de sua ação letal em níveis inibitórios mínimos (COX *et al.*, 2001; MUMU; HOSSAIN, 2018).

Ensaio conduzido por Mumu e Hossain (2018) comparando a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de melaleuca, eucalipto e capim-limão, demonstraram que o TTO apresenta maior capacidade de inibição dos patógenos, inibindo 99,92% destes após 6 h de incubação, enquanto os demais óleos inibiram entre 90,43 e 92,59%.

Neste mesmo estudo, fez-se uma comparação entre a ação antimicrobiana do TTO e alguns antibióticos comuns pelo método de disco-difusão. Para o teste, foram utilizados 50 µL de óleo essencial puro e discos antibióticos padrão para uso como controle.

Os valores (em mm) obtidos para os halos de inibição são apresentados na Tabela 13. O óleo essencial demonstra potencial no tratamento alternativo aos antibióticos convencionais contra infecções bacterianas e outras doenças infecciosas.

Tabela 13 – Zona de inibição em resposta ao óleo essencial de melaleuca e discos antibióticos convencionais

AGENTE ANTIMICROBIANO	ZONA DE INIBIÇÃO (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<b>Óleo essencial de Melaleuca</b>	15,6	18,6
<b>Cephalexin</b>	37,6	33,3
<b>Amoxicillin</b>	38,6	35,3
<b>Cefuroxime Sodium</b>	35,3	34,3
<b>Rifampicin</b>	37,6	32,6

Fonte: Adaptado de MUMU; HOSSAIN (2018).

Nota-se uma diferença entre os valores apresentados na Tabela 13 e os obtidos para o halo de inibição para as condições propostas (Tabela 12). Isso pode ser atribuído a diversos fatores, como: volatilidade do componente utilizado, composição química dos óleos e a presença do polímero atuando como um possível controlador da liberação do ativo.

Nestes estudos conduzidos por Mumu e Hossain (2018), os discos dopados com óleo essencial foram expostos imediatamente às culturas bacterianas, enquanto no presente trabalho, as amostras não tiveram exposição imediata devido à necessidade de armazenamento e transporte para realização dos ensaios.

Por ser de origem natural, a composição química do mesmo óleo essencial pode diferir, por sofrer interferências as quais podem ser atribuídas a vários aspectos, incluindo a parte da planta usada para extrair o óleo, o estresse de secagem, o estágio de desenvolvimento da planta quando colhida e as condições de crescimento, e ainda, o tipo de solo, temperatura e fertilizantes utilizados, bem como o próprio procedimento de extração (MELO *et al.*, 2015).

## 5 CONCLUSÃO

A caracterização do material e dos recobrimentos propostos comprovou a realização do recobrimento por toda a superfície do substrato metálico.

As micrografias, juntamente com a microanálise por EDS, indicaram que a incorporação do óleo essencial no filme polimérico foi realizada de maneira adequada e sem alterar as características morfológicas do filme puro. A análise de FTIR confirmou a presença de bandas referentes às ligações existentes no OE e na PCL, as quais se mantiveram após o recobrimento no Ti c.p. com ou sem recobrimento prévio de HA.

Os picos característicos dos recobrimentos foram detectados nos difratogramas de DRX, não observando a formação da fase  $\beta$ -TCP, pobre em Ca.

As micrografias obtidas para as amostras após o ensaio de bioatividade demonstram a evolução da camada apatítica, com crescimento homogêneo de HA durante as quatro semanas, para ambas as condições com estrutura globular apreciável para o processo osseointegrativo. Além disso, observou-se que a presença do OE no recobrimento altera positivamente a morfologia dos grânulos de HA formados durante as semanas de ensaio, sugerindo que o OE aplicado apresenta propriedades osteoindutivas. Os espectros obtidos por FTIR confirmam o crescimento da camada biocerâmica, visto que houve um aumento na intensidade das bandas de  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  características dessa fase.

As curvas de polarização indicaram que dos recobrimentos propostos, a condição Ti+HA+PCL+OE deixou o substrato metálico mais resistente ao processo corrosivo em fluido corpóreo simulado, apresentando maior potencial de corrosão ( $E_{\text{corr}}=-0,2369$  V). A combinação da PCL sobre o recobrimento biomimético de HA demonstrou maior eficiência na proteção do material, melhorando sua biocompatibilidade.

O ensaio microbiológico apresentou baixa atividade inibitória perante as culturas de bactérias ensaiadas, sendo as cepas de *E. coli* mais sensíveis à condição Ti+PCL+OE.

Desta forma, conclui-se que o sistema proposto apresenta características desejáveis para aplicação em implantes médicos, sugerindo que os mesmos são favoráveis ao processo osteointegrativo destes dispositivos.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Confeção de nanopartículas contendo o OE para uso no recobrimento;
- b) Teste de liberação do OE em SBF;
- c) Teste de adesão do recobrimento;
- d) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do recobrimento;
- e) Ensaio de Biofilme e Viabilidade bacteriana;
- f) Ensaio *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ABDULKAREEM, E.H. *et al.* Anti-biofilm activity of zinc oxide and hydroxyapatite nanoparticles as dental implant coating materials. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 12, p. 1462–1469, 2015.
- ABEDALWAGA, M. *et al.* Biodegradable Poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review. **Reviews on Advanced Materials Science**, v. 2, n. 34, p. 123–140, 2013.
- ACTIS, L. *et al.* Antimicrobial surfaces for craniofacial implants: state of the art. **Journal Of The Korean Association Of Oral And Maxillofacial Surgeons**, v. 39, n. 2, p.43-54, 2013.
- ADDISON, O. *et al.* Do ‘passive’ medical titanium surfaces deteriorate in service in the absence of wear? **Journal of The Royal Society Interface**, v. 9, n. 76, p. 3161–3164, 2012.
- ALGHAMDI, H. S. *et al.* Calcium-phosphate-coated oral implants promote Osseointegration in osteoporosis. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 11, p. 982–988, 2013.
- ALMEIDA FILHO, E. *et al.* Biomateriais: deposição de hidroxiapatita sobre superfície de Ti-cp modificada por aspersão térmica. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1129–1232, 2007.
- ALMEIDA, P. P. **Extração de óleo essencial de hortelã (*Methaspicata L.*) com misturas de solventes a alta pressão.** 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- ALMEIDA, T. D. F. **Síntese e caracterização de biocimento de fosfato de cálcio usando resíduo de mármore.** 2018. 111 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes, 2018.
- ALVES, A. R. C. **Engenharia de Tecidos: Válvulas Cardíacas.** 2013. 45 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **F67-06:** Standard Specification for Unalloyed Titanium, for Surgical Implant Applications. West Conshohocken, 2006.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **F136-13:** Standard Specification for Wrought Titanium-6Aluminum-4Vanadium ELI (Extra Low Interstitial) Alloy for Surgical Implant Applications. West Conshohocken, 2013.

APARECIDA, A. H. **Recobrimento de apatitas empregando-se o método biomimético: Estudo da Influência dos Íons  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $HCO_3^-$  na Formação de Hidroxiapatita.** 2006. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

ASEFNEJAD A. *et al.* Polyurethane/fluor-hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. Part I: morphological, physical, and mechanical characterization. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 93–100, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 23317: Implantes para cirurgia - Avaliação *in vitro* da capacidade de formação de apatita de materiais de implante.** Rio de Janeiro, 2013.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils—A review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BANU, J.; VARELA, E.; FERNANDES, G. Alternative therapies for the prevention and treatment of osteoporosis. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 1, p. 22–40, 2012.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, v. 15, n. 1, p. 13–21, 2005.

BARBOSA, L. N. Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer e bovino e teste de aceitação. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

BARKARMO, S. *et al.* Enhanced bone healing around nanohydroxyapatite-coated polyetheretherketone implants: an experimental study in rabbit bone. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, n. 5, p. 737–747, 2014.

BASU, B; KATTI, D; KUMAR, A. **Advanced materials fundamentals: processing and applications.** New Jersey: Wiley-American Ceramic Society, 2009

BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BERRADJA, A. **Electrochemical Techniques for Corrosion and Tribocorrosion Monitoring: Fundamentals of Electrolytic Corrosion.** *In*: SINGH, A. Corrosion Inhibitors. London: IntechOpen, 2019. cap 7, p.1-24.

BESINIS, A. *et al.* Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 3, p. 327–338, 2017.

BEST S. M. *et al.* Bioceramics: past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 28, n. 7, p. 1319-27, 2008.

BHAT, S. V. **Biomaterials**. 2. ed. Nova Dheli: Narosa Publishing House, 2002.

BONA, E. A. M. D. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.

BRONZINO, J. D.; PETERSON, D. R. **The Biomedical Engineering Handbook**. 4 ed.; Florida: CRC Press, 2015.

BUDZYŃSKA, A. *et al.* Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 35-41, 2011.

BUSER, D.; SENNERBY, L.; BRUYN, H. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. **Periodontology 2000**, v. 73, n. 1, p.7-21, 2017.

CAO, W.; HENCH L. L. Bioactive Materials. **Ceramics International**, v. 22, p. 493-507, 1996.

CARNEIRO, F. M. *et al.* Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Rev. Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v.3, n.2, p. 44-75, 2014.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p.1914-1920, 2002.

CARSON, C. F.; MEE, B.J.; RILEY; T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914–1920, 2002.

CATAURO M, PAPALE F, BOLLINO F. Characterization and biological properties of TiO<sub>2</sub>/PCL hybrid layers prepared via sol-gel dip coating for surface modification of titanium implants. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 415, p. 9-15, 2015

CATAURO, M. *et al.* Corrosion behavior and mechanical properties of bioactive sol-gel coatings on titanium implants. **Materials Science and Engineering: C**, v. 43, n. 1, p.375-382, out. 2014.

CATAURO, M., BOLLINO, F., PAPALE, F. Surface modifications of titanium implants by coating with bioactive and biocompatible poly (ε-caprolactone)/SiO<sub>2</sub> hybrids synthesized via sol-gel. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 11, n. 7, p. 1126-1133, 2018.

CHEN, P. *et al.* Fabrication of a silver nanoparticle-coated collagen membrane with anti-bacterial and anti-inflammatory activities for guided bone regeneration. **Biomedical Materials**, v. 13, n. 6, p. 1-14, 2018.

CHEN, W. *et al.* In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. **Biomaterials**, v. 27, n. 32, p.5512-5517, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M02-A11**: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Pennsylvania: 2012.

COELHO, M. F. C. *et al.* Biomimetic coating on titanium: evaluation of bioactivity and corrosion. **Materials Research Express**, v. 6, n. 12, 2020.

COELHO, M. F. C. *et al.* Biomimetic coating on titanium: evaluation of bioactivity and corrosion. **Materials Research Express**, v. 6, n. 12, p. 1-23, 2020.

COSTA, B. D. *et al.* Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 177–187, 2015.

COX, S. D. *et al.* The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal Of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p.170-175, 2001.

DAS, K.; TIWARI, R. K. S.; SHRIVASTAVA, D. K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of medicinal plant research**, v. 4, n. 2, p.104-111, 2010.

DHANDAYUTHAPANI, B. *et al.* Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, p. 1–19, 2011.

DIVAKAR, D. D. *et al.* Enhanced antimicrobial activity of naturally derived bioactive molecule chitosan conjugated silver nanoparticle against dental implant pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 790–797, 2018.

ELBAHNASAWY, A. S. *et al.* The Impact of Thyme and Rosemary on Prevention of Osteoporosis in Rats. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2019, p. 1–10, 2019.

ELIAZ, N. Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review. **Materials**, v. 12, n. 3, p. 407, 2019a.

ELIAZ, N.; GILEADI, E. **Physical Electrochemistry: Fundamentals, Techniques, and Applications**. 2 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2019b.

ERAKOVIĆ, S. *et al.* Corrosion Stability and Bioactivity in Simulated Body Fluid of Silver/Hydroxyapatite and Silver/Hydroxyapatite/Lignin Coatings on Titanium Obtained by Electrophoretic Deposition. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 6, p. 1633–1643, 2013.

FERNANDES, M. B. C. *et al.* The effect of bone allografts combined with bone marrow stromal cells on the healing of segmental bone defects in a sheep model. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 36, 2014.

FERREIRA, C. C. *et al.* Improvement of Titanium Corrosion Resistance by Coating with Poly-Caprolactone and Poly-Caprolactone/Titanium Dioxide: Potential Application in Heart Valves. **Materials Research**, v. 20, suppl 1, p. 126–133, 2018.

FERREIRA, C. C. *et al.* Titanium Biomimetically Coated With Hydroxyapatite, Silver Nitrate and Polycaprolactone, for Use In Biomaterials (Biomedicine). **Materials Research**, v. 22, n. suppl 1, p. 1-9, 2019.

FIGUEIREDO, A. C. *et al.* Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p.213-226, 2008.

FLORES, F. C.; BECK, R. C. R.; SILVA, C. B. Essential Oils for Treatment for Onychomycosis: A Mini-Review. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1-2, p.9-15, 2016.

GAO, A. *et al.* The effects of titania nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bacteria and osteoblasts. **Biomaterials**, v. 35, n. 3, p. 4223–4235, 2014.

GEETHA, M. *et al.* Ti- based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants: A review. **Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3 p. 397 – 425, 2009.

GILBERT, J. L.; MALI, S. **Medical implant corrosion: Electrochemistry at metallic biomaterial surfaces**. *In*: ELIAZ, N. Degradation of Implant Materials. New York: Springer, 2012. cap. 1, p. 1–28.

GREEVES, N. (England). Director of Teaching & Learning. *ChemTube 3D: Hydroxyapatite Ca<sub>5</sub>(OH)(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>*. 2018. Liverpool: University of Liverpool. Disponível em: <<https://www.chemtube3d.com/sshydroxyapatite/>>. Acesso em: 29 abr. 2019.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*, v.48, n. 1, p.263-277, 2000.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de Cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química Nova*, v. 33, n.6, p. 1352-1358, 2010.

GUIMARÃES, Z. A. S. *et al.* A Novel Porous Diamond - Titanium Biomaterial: Structure, Microstructure, Physico-Mechanical Properties and Biocompatibility. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 4, p. 3111–3121, 2017.

HANSEN, D. C. Metal Corrosion in the Human Body: The Ultimate Bio-Corrosion Scenario. *The Electrochemical Society Interface*, v. 17, n. 2, p. 31-34, 2008.

HASHEMI, M. *et al.* Phytochemical, Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Properties of *Agastache foeniculum* Essential Oil. *Journal of Chemical Health Risks*, v. 7, n. 2, p. 95–104, 2017.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. **Materials selection**. In: WISE, D. L.; TRANTOLO, D. J.; ALTOBELLI, D. E.; YASZEMSKI, M. J. **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering**: Part A. New York: CRC Press, 1995, p. 27-59.

HENCH L. L.. Bioactive Glass Bone Grafts: History and Clinical Applications. In: ANTONIAC, I. V. *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*. New York: Springer Reference. 2016, p. 23-33.

HSU, C.; PARKER, G.; PURANIK, R. Implantable Devices and Magnetic Resonance Imaging. *Heart, Lung and Circulation*, v. 21, n. 6–7, p. 358–363, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 4730:2017(E)**: Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (tea tree oil). Geneva: 2017.

ISKANDAR, M. E.; ASLANI, A.; LIU, H. The effects of nanostructured hydroxyapatite coating on the biodegradation and cytocompatibility of magnesium implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 101A, n. 8, p. 2340–2354, 2013.

IVANOVA, E. P.; BAZAKA, K.; CRAWFORD, R. J. **New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014.

JAGGESSAR, A. *et al.* Mechanical, bactericidal and osteogenic behaviours of hydrothermally synthesised TiO<sub>2</sub> nanowire arrays. *Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials*, v. 80, p.311-319, 2018.

JASINSKI, J.J. et al. Effect of hybrid oxidation on the titanium oxide layer's properties investigated by spectroscopic methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 1126, p. 165–171, 2016.

JONÁŠOVÁ, L. et al. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. **Biomaterials**, v. 25, n. 7–8, p. 1187–1194, 2004.

KATTI, K. S. Biomaterials in total joint replacement. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 39, n. 3, p. 133-142, 2004.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

KHANRA, A. K. et al. Microstructure and mechanical properties of Mg-HAP composites. **Bulletin of Materials Science**, v. 33, n. 1, p. 43–47, 2010.

KIEN-SENG L. et al. Macroporous bioceramics: A remarkable material for bone regeneration. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 27, n. 3, p. 345–358, 2011.

KIM, D.H. et al. Preparation and *In Vitro* and *In Vivo* Performance of Magnesium Ion Substituted Biphasic Calcium Phosphate Spherical Microscaffolds as Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Microcarriers. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

KIRAN, A. et al. Antibacterial and Bioactive Surface Modifications of Titanium Implants by PCL/TiO<sub>2</sub> Nanocomposite Coatings. **Nanomaterials**, v. 8, n. 10, p. 860, 2018.

KOKUBO, T. **Bioceramics and their clinical applications**. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2008.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. Simulated Body Fluid (SBF) as a Standard Tool to Test the Bioactivity of Implants. *In: BÄUERLEIN, E. (Org.). Handbook of Biomineralization*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007, cap. 7, p. 97–109.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, 2006.

KOKUBO, T.; YAMAGUCHI, S. Novel bioactive materials developed by simulated body fluid evaluation: Surface-modified Ti metal and its alloys. **Acta Biomaterialia**, v. 44, p. 16–30, 2016.

KUHN, L. T. Biomaterials. *In: ENDERLE, J. D.; BRONZINO, J. D. Introduction to Biomedical Engineering*. Oxford: Academic Press, 2012, cap. 5, p. 219–271.

KULKARNI, M. *et al.* Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. *In: SEIFALIAN, A.; MEL, A.; KALASKAR, D. M. Nanomedicine.* Manchester: One Central Press, 2014, cap. 5, p. 111–136.

KUMAR, S. Evaluating Antimicrobial activity of Aloe vera Plant Extract in Human Life. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 1, n. 7, p. 5, 2017.

LASZLO, F. O emprego de óleos essenciais no tratamento de osteoartrite e artrose, osteoporose e no fortalecimento ósseo e das cartilagens. **Jornal de Aromatologia da Laszlo**, n. 3, p. 1-7, 2013.

LEGEROS, R. Z. BEN-NISSAN, B. Introduction to Synthetic and Biologic Apatites. *In: BEN-NISSAN, B. (ed.) Advances in Calcium Phosphate Biomaterials.* [S.I]: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. cap. 1, p. 1-17.

LEITE, K. L. F. *et al.* Antibacterial Activity of Melaleuca alternifolia (tea tree essential oil) on Bacteria of the Dental Biofilm. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2017.

LEWALLEN, E. A. *et al.* Biological Strategies for Improved Osseointegration and Osteoinduction of Porous Metal Orthopedic Implants. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 21, n. 2, p. 218–230, 2015.

LEWIS, G. Nanostructured Hydroxyapatite Coating on Bioalloy Substrates: Current Status and Future Directions. **Journal of Advances in Nanomaterials**, v. 2, n. 1, p. 65-82, 2017

LI, Y. J. *et al.* A Practical Anodic and Cathodic Curve Intersection Model to Understand Multiple Corrosion Potentials of Fe-Based Glassy Alloys in OH<sup>-</sup> Contained Solutions. **Plos One**, v. 11, n. 1, p.1-20, 2016.

LIMAR, C. R C. Revestimentos para barreira térmica: evolução e perspectivas. **Soldagem & Inspeção**, v. 19, n. 4, p.353-363, 2014.

LIU, W. *et al.* Selenium nanoparticles incorporated into titania nanotubes inhibit bacterial growth and macrophage proliferation. **Nanoscale**, v. 8, n. 34, p. 15783–15794, 2016.

LIU, W. *et al.* Synthesis of TiO<sub>2</sub> nanotubes with ZnO nanoparticles to achieve antibacterial properties and stem cell compatibility. **Nanoscale**, v. 6, n. 15, p. 9050–9062, 2014.

LIU, X. *et al.* Synthesis of silver-incorporated hydroxyapatite nanocomposites for antimicrobial implant coatings. **Applied Surface Science**, v. 273, p. 748-757, 2013.

LOVE, B. **Biomaterials: a systems approach to engineering concepts.** Cambridge: Academic Press, 2017.

LOW, W. L. *et al.* Essential oils and metal ions as alternative antimicrobial agents: a focus on tea tree oil and silver: The use of pre-antibiotic antimicrobials in the treatment of chronic wound infections. **International Wound Journal**, v. 14, n. 2, p. 369–384, 2017.

MACHADO, A. M. O.; GALES, A. C. **Interpretação de dados microbiológicos**. 2008. Disponível em: <  
[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo2/objetivos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/objetivos.htm)>. Acesso em: 29 jul. 2019.

MAKAROV, C. *et al.* In situ synthesis of calcium phosphate polycaprolactone nanocomposites with high ceramic volume fractions. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, v. 21, n. 6, p. 1771–1779, 2010.

MARCO, I.; BIEST, O. V. D. Polarization measurements from a rotating disc electrode for characterization of magnesium corrosion. **Corrosion Science**, v. 102, p.384-393, 2016.

MAVROGENIS, A. F. *et al.* Biology of implant osseointegration. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v. 9, n. 2, p. 61–71, 2009.

MELO, A. D. B. *et al.* Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 79, p. 285–289, 2015.

MEMARZADEH, K. *et al.* Nanoparticulate zinc oxide as a coating material for orthopedic and dental implants. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 103, n. 3, p. 981–989, 2015.

MIRANDA G. *et al.* Surface design using laser technology for Ti6Al4V-hydroxyapatite implants. **Optics & Laser Technology**, v. 109, p. 488-495, 2019.

MIRANDA, S. H. S. **Desenvolvimento do método de extração em solução hexânica e identificação dos compostos do óleo de *Melaleuca alternifolia***. 2014. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

MIRANTE, D. C. **Desenvolvimento Tecnológico e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Micropartículas de Polilisina e de Nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* Cheel (Myrtaceae)**. 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

MONTANHA, V.C. **Preparação e caracterização de micropartículas de colágeno ou fibroína como suporte para células-tronco**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

MOURIÑO, V.; CATTALINI, J. P.; BOCCACCINI, A. R. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments. **Journal Of The Royal Society Interface**, v. 9, n. 68, p.401-419, 2012.

MOUSSA, A. A. *et al.* Minimizing Stress Shielding and Cement Damage in Cemented Femoral Component of a Hip Prosthesis through Computational Design Optimization. **Advances in Orthopedics**, v. 2017, p. 1–12, 2017.

MÜHLBAUER, R. C. *et al.* Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism. **Bone**, v. 32, n. 4, p. 372–380, 2003.

MUMU, S. K.; HOSSAIN, M. M. Antimicrobial Activity of Tea Tree oil against Pathogenic Bacteria and Comparison of Its Effectiveness with Eucalyptus Oil, Lemongrass Oil and Conventional Antibiotics. **American Journal of Microbiological Research**, v. 6, n. 3, p. 73–78, 2018.

NEVES, Â. *et al.* Screening of Five Essential Oils for Identification of Potential Inhibitors of IL-1-induced Nf-  $\kappa$  B Activation and NO Production in Human Chondrocytes: Characterization of the Inhibitory Activity of  $\alpha$  -Pinene. **Planta Medica**, v. 76, n. 03, p. 303–308, 2010.

NIINOMI, M.; HATTORI, T. Effect of Young's modulus in metallic implants on atrophy and bone remodeling. *In*: SHUNJI, S.; SASANO, T.; SUZUKI, O. *Interface Oral Health Science 2009*. Osaka: Springer Japan, 2010, p. 90-99.

NISBET, D. R. *et al.* Review Paper: A Review of the Cellular Response on Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering. **Journal Of Biomaterials Applications**, v. 24, n. 1, p.7-29, 2009.

OCHOA, C. C. R. **Hidroxiapatita, Policaprolactona e Alendronato em defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhos**. 2013. 43 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) —Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

OLIVEIRA, L. S. A. F. *et al.* Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 37-44.

OLIVEIRA, P. C. A.; BERTAZZOLI, R. Determinação da densidade de corrente de corrosão em meios de baixa condutividade: uso de microeletrodos para minimizar a queda ôhmica. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p.325-329, 2011.

ONG, K. L.; LOVALD, S.; BLACK, J. **Corrosion and degradation**. *In*: ONG, K. L.; LOVALD, S.; BLACK, J. *Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice*. Florida: CRC Press, 2014. cap. 12, p. 281–316.

ORÉFICE, R. L.; SILVA JUNIOR, P.E. Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de Poli(Metacrilato de Metila). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 3, p. 109-115, 2001.

PAIVA, J. **Estudo da Corrosão Eletroquímica da Liga Ti-13Nb-13Zr Submetida a Diferentes Condições de Deformação a Quente**. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) —Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2012.

PÉRILLAUD-DUBOIS, C. *et al.* Performance of rapid antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion on MHR-SIR agar directly on urine specimens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 38, n. 1, p. 185–189, 2019.

PINTORE, G. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 1, p.15-19, 2001.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

PIRES, V. G. A.; MOURA, M. R. Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p.1-5, 20, 2017.

PITT, C.G. Poly (caprolactone) and its co-polymers. *In*: CHANSIN, M.; LANGER, R. **Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems**. New York: Marcel Decker, 1990, cap. 3, p. 71- 120.

POKROWIECKI, R. *et al.* In vitro studies of nanosilver-doped titanium implants for oral and maxillofacial surgery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 4285–4297, 2017.

POPOV, B. N. Basics of Corrosion Measurements. *In*: POPOV, B. N. **Corrosion Engineering: Principles and Solved Problems**. Cambridge: Elsevier Inc, 2015. cap 5, p.181-237.

POUND, B. G. Corrosion behavior of metallic materials in biomedical applications. II. Stainless steels and Co-Cr alloys. **Corrosion Reviews**, v. 32, n. 1-2, p.21-41, 2014.

PRASAD, K. *et al.* Metallic Biomaterials: Current Challenges and Opportunities. **Materials**, v. 10, n. 8, p. 884, 2017.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação do potencial sinérgico**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

PU'AD N. A. S. M. *et al.* Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. **Heliyon**, v. 5, n. 5, 2019.

PUTNAM, S. E. *et al.* Natural products as alternative treatments for metabolic bone disorders and for maintenance of bone health. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 2, p. 99–112, 2007.

RAKNGARM A, MIYASHITA Y, MUTOH Y. Formation of hydroxyapatite layer on bioactive Ti and Ti–6Al–4V by simple chemical technique. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 5, p. 1953–1961, 2007.

RAMOS, S. L. F. **Membranas de policaprolactona obtidas por eletrofição para utilização em engenharia tecidual**. 2011. 64f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

RAN, A. *et al.* Antibacterial and Bioactive Surface Modifications of Titanium Implants by PCL/TiO<sub>2</sub> Nanocomposite Coatings. **Nanomaterials**, v. 8, n. 10, p.860-875, 2018.

RAPHEL, J. *et al.* Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopedic implants. **Biomaterials**. v. 84, p. 301-314, 2016.

RATH, P. C. *et al.* Titania/hydroxyapatite bi-layer coating on Ti metal by electrophoretic deposition: Characterization and corrosion studies. **Ceramics International**, v. 38, n. 4, p. 3209–3216, 2012.

REICHLING, J. *et al.* In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 64, n. 2, p. 222-228, 2006.

REVILLA-LÓPEZ, G. *et al.* Effects of hydroxyapatite (0001) Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> substitution on adsorbed D -ribose ring puckering. **RSC Advances**, v. 6, n. 73, p. 69634–69640, 2016.

RICCI, V. P. **Caracterização do recobrimento biomimético de hidroxiapatita dopado com nitrato de prata recoberto com quitosana sobre substrato de titânio**. 2017. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2017.

RODRIGUES, L. B. Aplicações de biomateriais em ortopedia. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 2, p.63-76, 2013.

ROHANOVÁ, D. *et al.* Assessment of in vitro testing approaches for bioactive inorganic materials. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 432, p.53-59, 2016.

ROLANDO T. C. J. *et al.* Development of hydroxyapatite coatings by solution precursor plasma spray process and their microstructural characterization. **Surface and Coatings Technology**, v. 318, p. 39-49, 2017.

ROLIM, A. E. H. *et al.* Arcabouços de Quitosana - Propriedades Físico-Químicas e Biológicas para o Reparo Ósseo. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, p. 211–228, 2018.

ROSENBAUM, J. *et al.* Antibacterial properties of nanostructured Cu-TiO<sub>2</sub> surfaces for dental implants. **Biomaterials Science**, v. 5, n. 3, p. 455–462, 2017.

RUFINO, A. T. *et al.* Anti-inflammatory and Chondroprotective Activity of (+)- $\alpha$ -Pinene: Structural and Enantiomeric Selectivity. **Journal Of Natural Products**, v. 77, n. 2, p.264-269, 2014.

SABBIETI, M. G. *et al.* Molecular mediators involved in *Ferulago campestris* essential oil effects on osteoblast metabolism. **Journal Of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 12, p.3742-3754, 2011.

SABER-SAMANDARI, S. *et al.* In vitro evaluation for apatite-forming ability of cellulose-based nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 434–442, 2016.

SAGAVE, L. *et al.* Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p.221-226, 2015.

SAINI, M. Implant biomaterials: A comprehensive review. **World Journal of Clinical Cases**, v. 3, n. 1, p. 52-57, 2015.

SALGADO, C.L., Characterization of chitosan and polycaprolactone membranes designed for wound repair application. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 2, p. 659-667, 2011.

SALVATORI, C. *et al.* A comparative study of antibacterial and anti-inflammatory effects of mouthrinse containing tea tree oil. **Oral & Implantology**, v. 10, n. 1, p. 59-70, 2017.

SANTOS, F. S.; NOVALES, M. G. M. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2011.

SANTOS, M. V. B. *et al.* Desenvolvimento de biomaterial composto por hidroxiapatita e clorexidina para aplicação na cavidade oral. **Cerâmica**, v. 65, n. 373, p.130-138, 2019.

SERRA, P. M. D.; ESPÍRITO-SANTO, A.; MAGRINHO, M. A steady-state electrical model of a microbial fuel cell through multiple-cycle polarization curves. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 117, p.1-17, 2020.

SHERESTHA, S.; JOSHI, S. Current concepts in biomaterials in dental implant. **Science Research**. v. 2, n. 1, p. 7-12, 2014.

SHOJA, M. *et al.* Preparation and characterization of Poly ( $\epsilon$ - Caprolactone)/TiO<sub>2</sub> micro-composites. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 10, n. 2, p. 471-477, 2015.

SIENKIEWICZ, M. *et al.* Antibacterial and immunostimulatory effect of essential oils. **International Review of Allergology and Clinical Immunology**, v. 17, n. 1 p. 40-44, 2011.

SIENKIEWICZ, M. *et al.* The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. **Burns**, v. 43, n. 2, p.310-317, 2017.

SILVA, M. H. P. Osteoinductive Biomaterials. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering, p. 1–5, 2016.

SILVA, W. G. **Biomaterial como implante ortopédico no avanço da tuberosidade tibial em cães**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SILVA, W. J. *et al.* In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research: Part A**, v.76, n.2, p.431-438, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, R. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SINGH, B. R. *et al.* Comparative Antimicrobial Activity of Tea Tree Oil (Melaleuca Oil) and Common Topical Antimicrobials against Bacteria Associated With Wound and Topical Infections. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 7, n. 11, 2016.

SINHORETI, M. A. C.; VITTI, R. P.; CORRER-SOBRINHO, L. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 63, n. 3, p. 178–183, 2013.

SOMSANITH, N. *et al.* Enhancing of Osseointegration with Propolis-Loaded TiO<sub>2</sub> Nanotubes in Rat Mandible for Dental Implants. **Materials**, v. 11, n. 1, p. 61, 2018.

SONG, W.; GE, S. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1033, 2019.

SOUSA, L. L. *et al.* Titanium Coating with Hydroxyapatite and Chitosan Doped with Silver Nitrate. **Materials Research**, v. 20, n. suppl 2, p. 863–868, 2018.

SOUZA, J. C. M. *et al.* Nanostructured surfaces of cranio-maxillofacial and dental implants. *In: SOUZA M J. C. M. et al. Nanostructured Biomaterials for Cranio-Maxillofacial and Oral Applications.* Cambridge: Elsevier Inc, cap. 2, p.13–40, 2018a.

SOUZA, K. G. *et al.* The Influence of Zinco on Bone Repair: A Literature Review. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 3, p. 474–486, 2018b.

SRIDHAR, T. M.; RAJESWARI, S. Biomaterials corrosion. **Corrosion Reviews**, v. 27, p.1-46, 2009.

SURMENEVA, M.A.; SURMENEV, R.A. Microstructure characterization and corrosion behaviour of a nanohydroxyapatite coating deposited on AZ31 magnesium alloy using radio frequency magnetron sputtering. **Vacuum**, v. 117, p. 60-62, 2015.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 6, n. 3, p. 311-324, 2009.

TANNENBAUM, C. *et al.* Yield of Laboratory Testing to Identify Secondary Contributors to Osteoporosis in Otherwise Healthy Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 10, p. 4431–4437, 2002.

TAVARES, J. A. **Projeto, construção, testes e operação de um extrator de óleos vegetais.** 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

TAVARES, V. **Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos.** 2011. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia Biomédica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

UNAL, F. A. *et al.* **Fuel Cell Electrochemistry.** *In: INAMUDDIN, et al.* Enzymatic Fuel Cells: Materials and Applications. Millersville: Materials Research Forum LLC, 2019. cap. 4, p.73-108.

VALLET-REGÍ, M. Ceramics for medical applications. **Journal of the Chemical Society. Dalton Transactions**, n.2, p.97-108, 2001.

VALLET-REGÍ, M.; NAVARRETE, D. A. A. **Biomimetic Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications.** Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008.

VERCIK, L. C. O. *et al.* Recobrimento de apatitas “in vitro” sobre titânio: influência do tratamento térmico. **Eclética Química**, v. 28, n. 1, p. 25–31, 2003.

VIEIRA, J. O. **Recobrimento biomimético de HA dopado com Ag sobre superfície de Ti.** 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Engenharia de São Carlos,

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

VITAL, C. C. *et al.* Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p.175-183, 2006.

VITERI, V. S.; FUENTES, E. **Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials**. In: GENGER, J. *Tribology: Fundamentals and Advancements*. London: IntechOpen, 2013. cap 5, p.1-28.

WANG, Y. *et al.* Biomechanical characterization of a micro/macroporous polycaprolactone tissue integrating vascular graft. **Cardiovascular Engineering and Technology**, v. 1, n. 3, p. 202–215, 2010.

WEI, Z. *et al.* Crystallization behavior of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/TiO<sub>2</sub> nanocomposites obtained by in situ polymerization. **Polymer Engineering & Science**, v. 52, n. 5, p. 1047-1057, 2012.

XU, H. H. K. *et al.* Nanoapatitic composite scaffolds for stem cell delivery and bone tissue engineering. In: SUBRAMANI, K.; AHMED, W. **Emerging Nanotechnologies in Dentistry**. Cambridge: Elsevier Inc, 2018. cap. 11, p.189–207.

YAMAGUCHI, S. *et al.* Cross-sectional analysis of the surface ceramic layer developed on Ti metal by NaOH-heat treatment and soaking in SBF. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 117, n. 1370, p. 1126–1130, 2009.

YANG, T. *et al.* Cytocompatibility and antibacterial activity of titania nanotubes incorporated with gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 597–606, 2016.

YANG, Y. *et al.* Safety and efficacy of PLGA(Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)-coated dental implants in inhibiting bacteria adherence and osteogenic inducement under a magnetic field. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 3751–3762, 2018.

YENIYOL, S. *et al.* Antibacterial Activity of As-Annealed TiO<sub>2</sub> Nanotubes Doped with Ag Nanoparticles against Periodontal Pathogens. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

ZAFAR, M. S. *et al.* Bioactive Surface Coatings for Enhancing Osseointegration of Dental Implants. In: KAUR, G. **Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2019. cap. 11, p. 313–329.

ZHONG, X. *et al.* Titanium Surface Priming with Phase-Transited Lysozyme to Establish a Silver Nanoparticle-Loaded Chitosan/Hyaluronic Acid Antibacterial Multilayer via Layer-by-Layer Self-Assembly. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2016.

**APÊNDICE A – Composição química do OE de *Melaleuca alternifolia***

Tabela 14 - Composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

(continua)

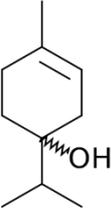
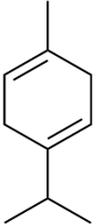
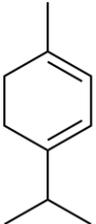
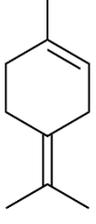
Componente		Composição (%)		
		ISO 4730	Típica	
<b>Terpinen-4-ol</b>		$C_{10}H_{18}O$	35,0 – 48,0	40,1
<b><math>\gamma</math>-Terpinene</b>		$C_{10}H_{16}$	14,0 – 28,0	23,0
<b><math>\alpha</math>-Terpinene</b>		$C_{10}H_{16}$	6,0 – 12,0	10,4
<b>1,8-Cineole</b>		$C_{10}H_{18}O$	Traços – 10,0	5,1
<b>Terpinolene</b>		$C_{10}H_{16}$	1,5 – 5,0	3,1

Tabela 14 - Composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

(continuação)

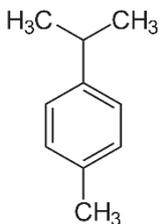
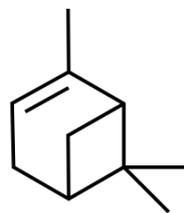
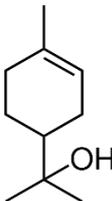
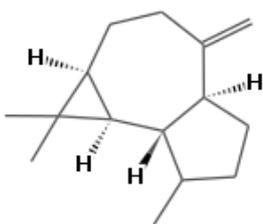
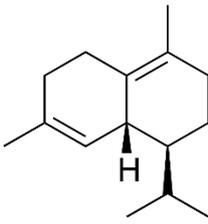
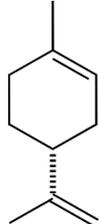
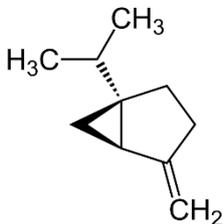
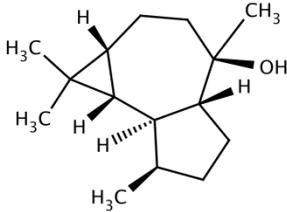
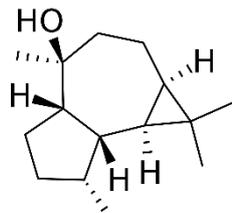
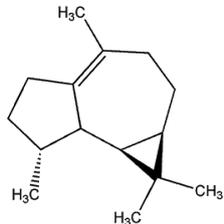
Componente	Composição (%)		
	ISO 4730	Típica	
<p><math>\rho</math>-Cymene</p> 	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	0,5 – 8,0	2,9
<p><math>\alpha</math>-Pinene</p> 	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1,0 – 4,0	2,6
<p><math>\alpha</math>-Terpineol</p> 	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	2,0 – 5,0	2,4
<p>Aromadendrene</p> 	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,2 – 3,0	1,5
<p><math>\delta</math>-Cadinene</p> 	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,2 – 3,0	1,3

Tabela 14 - Composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

Componente	(conclusão)			
	Composição (%)			
	ISO 4730	Típica		
<b>Limonene</b>		$C_{10}H_{16}$	0,5 – 1,5	1,0
<b>Sabinene</b>		$C_{10}H_{16}$	Traços – 3,5	0,2
<b>Globulol</b>		$C_{15}H_{26}O$	Traços – 1,0	0,2
<b>Viridiflorol</b>		$C_{15}H_{26}O$	Traços – 1,0	0,1
<b>Ledene</b>		$C_{15}H_{24}$	Traços – 1,5	--*

Traços: &lt;0,01%

Fonte: Adaptado de SALVATORI *et al.* (2017)

\*Não foi avaliado na análise cromatográfica

**APÊNDICE B – Produção bibliográfica****A – Trabalhos apresentados em Eventos Científicos**

- 1) **FERREIRA, C. C.; SOUZA, B. F. G.; SILVA, Y. M. V. S.; PRADO, D. G.; SOUSA, L. L.; SACHS, D.; RIBEIRO, T. A. N.; CAMPOS, M. G. N.; MARIANO, N. A.** Análise microbiológica da dopagem com bactericida natural de Titânio recoberto com hidroxiapatita para aplicação em biomaterial. *In: 6ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais (OBI)*, São Paulo, SP, 2019.
- 2) GRILLO NETO, J.; **FERREIRA, C. C.; SILVA, J. M. T. F.; SOUZA, B. F. G.; SOUSA, L. L.; MARIANO, N. A.** Avaliação do comportamento eletroquímico das ligas Sn10Zn em solução corpórea. *In: 6ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais (OBI)*, São Paulo, SP, 2019.
- 3) **FERREIRA, C. C.; SOUZA, B. F. G.; SILVA, Y. M. V. S.; SOUSA, L. L.; RIGO, E. C. S.; CAMPOS, M. G. N.; MARIANO, N. A.** Bioatividade do Titânio recoberto com Apatita e Policaprolactona dopada com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. *In: 6ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais (OBI)*, São Paulo, SP, 2019.
- 4) **FERREIRA, C. C.; SOUSA, L. L.; SOUZA, B. F. G.; SILVA, Y. M. V. S.; CAMPOS, M. G. N.; MARIANO, N. A.** Avaliação do crescimento de hidroxiapatita em biometal recoberto com biopolímero. *In: 6ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais (OBI)*, São Paulo, SP, 2019.
- 5) **FERREIRA, C. C.; SOUZA, B. F. G.; SILVA, Y. M. V. S.; SOUZA, L. L.; MARIANO, N. A.; CAMPOS, M. G. N.** Avaliação do crescimento de Hidroxiapatita em biometal recoberto com biopolímero. *In: V Simpósio Integrado (UNIFAL-MG) – Múltiplos Saberes*, Poços de Caldas, MG, 2019.
- 6) GRILLO NETO, J.; **FERREIRA, C. C.; DAINÉZI, I.; SOUSA, L. L.; MARIANO, N. A.** Estudo do mecanismo de corrosão em aços inoxidáveis em meios contendo íons de Cloro. *In: V Simpósio Integrado (UNIFAL-MG) – Múltiplos Saberes*, Poços de Caldas, MG, 2019.
- 7) **FERREIRA, C. C.; SOUZA, B. F. G.; SILVA, Y. M. V. S.; SOUSA, L. L.; SACHS, D.; CAPELLATO, P.; CAMPOS, M. G. N.; MARIANO, N. A.** Incorporation of

- essential oil in polymer film for Ti coating for application as biomaterial. *In: XVIII Brazil MRS Meeting*, Balneário Camboriú, SC, 2019.
- 8) SOUZA, B. F. G.; **FERREIRA, C. C.**; SILVA, Y. M. V. S.; SOUSA, L. L.; SACHS, D.; CAPELLATO, P.; MARIANO, N. A. Corrosion analysis of Ti c.p. coated with hydroxyapatite and natural bactericide in mouthwashes. *In: XVIII Brazil MRS Meeting*, Balneário Camboriú, SC, 2019.
  - 9) **FERREIRA, C. C.**; SOUZA, L. L.; PRADO, D. G.; RICCI, V. P.; VERCIK, L. C. O.; FARIA, A.N.; BRUCHA, G.; MELO, M. S. F.; CAMPOS, M. G. N.; MARIANO, N. A. Avaliação microbiológica do Titânio recoberto com Hidroxiapatita e Quitosana para implantes. *In: 23° Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (23° CBECIMAT)*, Foz do Iguaçu, PR, 2018.
  - 10) SOUZA, L. L.; **FERREIRA, C. C.**; RICCI, V. P.; MARQUES, R. F. C.; PIAZZA, R. D.; FARIA, A.N.; SILVA, Y. M. V. S.; SOUZA, B. F. G.; MARIANO, N. A. Melhoria na biocompatibilidade de ligas metálicas para implantes. *In: 23° Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (23° CBECIMAT)*, Foz do Iguaçu, PR, 2018.
  - 11) **FERREIRA, C. C.**; SOUSA, L. L.; RICCI, V. P.; PRADO, D. G.; FARIA, A. N.; RIGO, E. C. S.; BRUCHA, G.; MELO, M. S. F.; CAMPOS, M. G. N.; MARIANO, N. A. Titânio recoberto biomimeticamente com Hidroxiapatita, Nitrato de prata e Policaprolactona para aplicação em biomaterial. *In: 23° Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (23° CBECIMAT)*, Foz do Iguaçu, PR, 2018.
  - 12) SOUSA, L. L.; PRADO, D. G.; **FERREIRA, C. C.**; RICCI, V. P.; FARIA, A. N.; MARQUES, R. F. C.; PIAZZA, R. D.; SILVA, Y. M. V. S.; SOUZA, B. F. G.; MARIANO, N. A. Estudo da bioatividade da superfície do Titânio para aplicação biomédica. *In: 23° Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (23° CBECIMAT)*, Foz do Iguaçu, PR, 2018.
  - 13) PRADO, D. G.; SOUSA, L. L.; OLIVEIRA, T. P.; **FERREIRA, C. C.**; SILVA, Y. M. V. S.; VERCIK, L. C. O.; RIGO, E. C. S.; MARIANO, N. A. Efeito da corrosão do Ti c.p. recoberto com Hidroxiapatita e Nanopartículas de prata em enxaguante bucal. *In: 23° Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (23° CBECIMAT)*, Foz do Iguaçu, PR, 2018.
  - 14) **FERREIRA, C. C.**; SOUZA, L. L.; MARIANO, N. A.; CAMPOS, M. G. N. Recobrimento de Titânio com Policaprolactona para potencial aplicação em válvulas cardíacas. *In: III Simpósio Integrado (UNIFAL-MG) – Múltiplos Saberes*, Alfenas, MG, 2017.
  - 15) **FERREIRA, C. C.**; SOUZA, L. L.; MARIANO, N. A.; CAMPOS, M. G. N.; MELO, M. S. F. Effect of the addition of TiO<sub>2</sub> in PCL films for Titanium recovery for potential application in heart valves. *In: 14° Congresso da Sociedade Latino*

**Americana de Biomateriais (SLABO) / 5° Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais (OBI), Maresias, SP, 2017.**

- 16) FERREIRA, C. C.; SOUZA, L. L.; RICCI, V. P.; CAMPOS, M. G. N.; MARIANO, N. A.; MELO, M. S. F.; SOARES, C. P.; MORAES, A. V.; SILVA, N. S. Avaliação da atividade antimicrobiana e bioatividade do recobrimento biomimético do Titânio com Hidroxapatita e Nanopartículas de prata revestido com filme Policaprolactona para potencial aplicação em implantes ortopédicos e ortodônticos. *In: 14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais (SLABO) / 5° Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais (OBI), Maresias, SP, 2017.*
- 17) FERREIRA, C. C.; SOUZA, L. L.; RICCI, V. P.; MARIANO, N. A.; CAMPOS, M. G. N. Recovery of Titanium with Polycaprolactone for potential application in heart valves. *In: The 7th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials (NANOMAT), Brotas, SP, 2017.*
- 18) FERREIRA, C. C.; SOUZA, L. L.; RICCI, V. P.; MARIANO, N. A.; CAMPOS, M. G. N. Study of the biomimetic coating of Ti c.p. with Chitosan and Polycaprolactone for application in implants. *In: The 7th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials (NANOMAT), Brotas, SP, 2017.*

#### **B – Artigos publicados em periódicos**

- 1) FERREIRA, C. C. *et al.* Improvement of Titanium Corrosion Resistance by Coating with Poly-Caprolactone and Poly-Caprolactone/Titanium Dioxide: Potential Application in Heart Valves. **Materials Research**, v. 20, suppl. 1, p. 126–133, 2018.
- 2) FERREIRA, C. C.; SOUZA, L. L.; RICCI, V. P.; RIGO, E. C. S.; CAMPOS, M. G. N.; MARIANO, N. A. Titanium, biomimetically coated with Hydroxyapatite, Silver Nitrate and Polycaprolactone, for use in biomaterials (biomedicine). **Materials Research**, v. 22, suppl. 1, 2019.
- 3) COELHO, M. F. C.; SOUZA, L. L.; FERREIRA, C. C.; RIGO, E. C. S.; MARIANO, N. A. Biomimetic coating on titanium: evaluation of bioactivity and corrosion. **Materials Research Express**, v. 6, n. 12, 2020.

#### **C – Artigos submetidos para publicação em periódicos**

- 1) SOUZA, L. L.; **FERREIRA, C. C.**; APOLINÁRIO, R. C.; SOUZA, B. F. G.; DAINÉZI, I.; CHEMIN, A. E. A. Increase of colored anodic oxide films on the Ti-13Nb -13Zr alloy. **Materials Research Express**.

#### **D – Capítulos de livro**

- 1) GONCALVES, L. P.; **FERREIRA, C. C.**; MESSIAS, A. S. R.; SOUZA, L. L.; COGO, F. D. **Cinética Química**. In: SOUZA, L. L.; COGO, F. D. (Org.). **Princípios básicos de identificação, classificação e informatização de práticas educativas**. Ituiutaba: E-Books Barlavento, 2018, p. 188-195.
- 2) SILVA, Y. M. V. S. E.; FERREIRA, C. C.; SOUZA, L. L.; PRADO, D. G.; COGO, F. D. Biomateriais: Aplicação e Importância. In: SOUZA, L. L.; COGO, F. D. (Org.). **Princípios básicos de identificação, classificação e informatização de práticas educativas**. Ituiutaba: E-Books Barlavento, 2018, p. 168-181.