



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

**HIDROXIAPATITAS MODIFICADAS COM PRATA APLICADAS
COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS**

Cleibson Oliveira de Lima

João Pessoa – PB - Brasil

Fevereiro/2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

HIDROXIAPATITAS MODIFICADAS COM PRATA APLICADAS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

Cleibson Oliveira de Lima*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Inorgânica.

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Maria Gardênnia da Fonseca

Co-Orientador: Prof.^a Dr.^a. Iêda Maria Garcia dos Santos

* Bolsista CAPES

João Pessoa – PB - Brasil

Fevereiro/2015

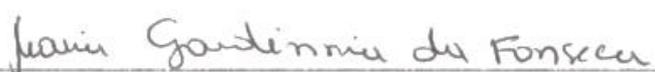
L732h Lima, Cleibson Oliveira de.
Hidroxiapatitas modificadas com prata aplicadas como agentes antimicrobianos / Cleibson Oliveira de Lima.- João Pessoa, 2015.
87f.
Orientadora: Maria Gardênnia da Fonseca
Coorientadora: Iêda Maria Garcia dos Santos
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN
1. Química inorgânica. 2. Hidroxiapatitas. 3. Prata.
4. Agentes antimicrobianos.

UFPB/BC

CDU: 546(043)

Hidroxiapatitas modificadas com prata aplicadas como agentes antimicrobianos.

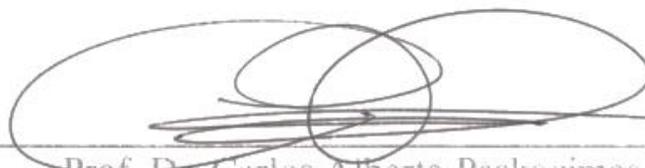
Dissertação de Mestrado do aluno Cleibson Oliveira de Lima aprovada pela banca examinadora, em 03 de março de 2015.



Profa. Dra. Maria Gardênnia da Fonseca
Orientadora/Presidente



Profa. Dra. Iêda Maria Garcia dos Santos
2ª. Orientadora



Prof. Dr. Carlos Alberto Paskocimas
Examinador



Prof. Dr. José Rodrigues de Carvalho Filho
Examinador

"O Senhor é o meu pastor e nada me faltará. Deita-me em verdes pastos e guia-me mansamente em águas tranquilas. Refrigera a minha alma, guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome. Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque Tu estás comigo, a Tua vara e o Teu cajado me consolam. Prepara-me uma mesa perante os meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida e habitarei na casa do SENHOR por longos dias."

Salmo 23.

Bíblia Sagrada.

A minha esposa Maria Cristina da Silva Oliveira, minha filha querida
Cecilia Cristinni, todos familiares e amigos sempre presentes em minha
vida.
Dedico.

Agradecimentos

- À Deus por tudo.
- A minha mãe, Ladjane Oliveira de Lima, meu pai Amaro Emídio e todos os familiares por todo companheirismo, incentivo e carinho.
- A minha esposa, Maria Cristina da Silva Oliveira, pelo carinho, força e compreensão.
- Minha filha Cecilia Cristinni.
- A professora Maria Gardênnia da Fonseca pela acolhida em seu grupo de pesquisa e pela valiosa orientação.
- Prof^a Dra. Iêda Maria Garcia dos Santos pela co-orientação;
- Ao professor ao Prof. Dr. Antônio Gouveia por ceder gentilmente às instalações do LACOM.
- Aos companheiros de grupo: Mariana, Denise, Saloana, Líbia, Graycyelle, Francisco, Kaline, Leandro, Rafael e Leanderson, que são pessoas excepcionais.
- Aos companheiros do LACOM: Jacqueline Moraes, Luzia Maria, Thiago Marinho, Juliana Kelly, Alex, Laís, Suellen, João Jarllys, KiKo, Arnayra, Ana Flávia, Anderson, Raquel, Abraão e Ana Rita;
- Aos Companheiros do LAQA Ivson Nino, Eduardo Lima e Dayvson Ribeiro por toda amizade e ajuda.
- Aos professores Edson Cavalcanti da Silva Filho (UFPI) e Fábio Sampaio (UFPB) e ao aluno Allan Reis do laboratório de Biologia Bucal (UFPB).
- A todos os demais membros do LACOM.
- A CAPES pela bolsa concedida para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Sumário

Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	viii
Lista de Siglas e Abreviaturas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
Capítulo 1 - Introdução	12
1.1 - Objetivos.....	14
1.1.1 - Geral.....	15
1.1.2 - Específicos.....	15
Capítulo 2 – Revisão da literatura	16
2.1 – Biomateriais e biocerâmicas.....	17
2.1.1. – Fosfato de cálcio.....	19
2.1.1.1- Hidroxiapatitas.....	21
2.1.1.1.2 – Estrutura da hidroxiapatita.....	22
2.1.2 – Métodos de síntese da hidroxiapatita.....	26
2.1.3 – Fosfatos de cálcio como trocadores iônicos.....	29
2.1.4 - Prata como agente antimicrobiano.....	31
Capítulo 3 - Metodologia experimental	36
3.1 - Reagentes químicos.....	37
3.2 - Sínteses da hidroxiapatita pura pelo método de co-precipitação.....	37
3.3 - Fosfatos de cálcio/ prata obtidos por impregnação.....	40
3.4 – Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana.....	43
3.4.1 – Adesão bacteriana.....	43
3.4.2 -. Contato direto.....	46
3.5 – Técnicas de caracterização.....	47
3.5.1 -. Difratomia de raios X (DRX).....	47
3.5.2-Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	48
3.5.3 - Espectroscopia de Raman.....	48
3.5.4 - Espectroscopia de fluorescência.....	49
3.5.5 - Microscopia eletrônica de varredura.....	49
Capítulo 4 – Resultados e discussão	50
4.1 - Caracterizações dos sólidos sintetizados.....	51
4.1.1 - Difratomia de raios X (DRX).....	51
4.1.2 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho..	56
4.1.3 - Espectroscopia de Raman.....	59
4.1.4 - Microscopia eletrônica de varredura.....	59
4.1.5 - Avaliações in vitro da atividade antibacteriana.....	65
4.1.5.1 – Adesão Bacteriana.....	65
4.1.5.2 -. Contato direto.....	66
Capítulo 5 - Conclusões	74
Capítulo 6 - Referências bibliográficas	76

Lista de Figuras

Figura 1. Visão da estrutura de HA ao longo do eixo c. Linhas pretas conectam Ca (I) em redes hexagonais. Triângulos escalonados de átomos de Ca (II) encontram-se no mesmo plano, mas a uma altura diferente em relação ao eixo c.....	24
Figura 2. Estrutura da hidroxiapatita ao longo do eixo c.....	25
Figura 3. Fluxograma ilustrativo da obtenção das hidroxiapatitas pura e modificadas com prata pelo método de co-precipitação.....	39
Figura 4. Imagens dos sólidos sintetizados pelo método de co-precipitação.....	40
Figura 5. Fluxograma da obtenção das hidroxiapatitas modificadas com prata por impregnação.....	41
Figura 6. Imagens dos sólidos obtidos por impregnação	42
Figura 7. Fluxograma das avaliações in vitro da atividade antibacteriana	45
Figura 8. Difratoograma de raios X da hidroxiapatita pura	52
Figura 9. Difratoogramas de raios X das amostras sintetizadas pelo método de co-precipitação para HA puro (a), HA 0,25% Ag (b), HA 0,5% Ag (c) e HA 1% Ag (d).....	53
Figura 10. Difratoogramas de raios X das amostras sintetizadas por impregnação em que HA puro (a), HA I 0,25% Ag (b), HA I 0,5% Ag (c) e HA I 1% Ag (d).....	54
Figura 11. Valores de FWHM (a) e tamanho médio de cristalitos (b) das amostras sintetizadas	56
Figura 12. – Espectros na região do infravermelho dos sólidos sintetizados pelos métodos de co-precipitação e por impregnação em que HA pura (a), 0,25% de Ag (b), 0,5% de Ag (c) e 1% de Ag (d) a 298 K.....	57
Figura 13. Espectroscopia Raman dos sólidos sintetizados	58
Figura 14. Micrografias dos sólidos HA pura (a), HA 0,25% Ag (b), HA 0,5% Ag e HA 1% Ag (d). Com diferentes ampliações	60
Figura 15. Micrografias dos sólidos HA I 0,25% Ag (a), HA I 0,5% Ag (b) e HA I 1% Ag (c). Com diferentes ampliações	63
Figura 16. Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de <i>S. aureus</i> formadas após contato direto bacteriana com o controle (a) e as amostras HA pura (b), HA 0,25% Ag (c), HA 0,5% Ag (d), HA 1% Ag (e), HA I 0,25% Ag (f), HA I 0,5% Ag (g) e HA I 1% Ag (h).....	66

Figura 17 Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de *S. aureus* formadas após contato direto bacteriana com o controle (a) e as amostras HA pura (b), HA 0,25% Ag (c), HA 0,5% Ag (d), HA 1% Ag (e), HA I 0,25% Ag (f), HA I 0,5% Ag (g) e HA I 1% Ag (h)..... 69

Lista de Tabelas

Tabela 1. Materiais constituintes dos biomateriais.....	18
Tabela 2. Classificação dos fosfatos de cálcio segundo a razão Ca/P..	20
Tabela 3. Ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos...	21
Tabela 4. Estudos relacionados sobre a atividade antimicrobiana da prata incorporada na estrutura cristalina da hidroxiapatita.....	35
Tabela 5. Reagentes utilizados nas sínteses das hidroxiapatitas.....	37
Tabela 6. Valores dos parâmetros de redes e de volumes das amostras de hidroxiapatitas pura e dopadas com prata.....	55
Tabela 7. Relação entre área largura a meia altura e o tamanho de cristalito das amostras sintetizadas.....	56
Tabela 8. Principais absorções na região do infravermelho para as amostras sintetizados.....	58
Tabela 9. Percentuais de células viáveis nos testes de adesão bacteriana.....	65
Tabela 10. Percentuais de células viáveis nos testes de contato direto.....	72

Lista de Siglas e Abreviaturas

FWHM	<i>The half width (Largura a meia altura)</i>
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
pH	<i>Potencial Hidrogeniônico</i>
K	Kelvin
Å	<i>Ångström (unidade de comprimento)</i>
pm	<i>Picômetro (unidade de comprimento)</i>
BSE	<i>Backscattered Electrons</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>

Resumo

Título: Hidroxiapatitas modificadas com prata aplicadas como agentes antimicrobianos.

Autor: Cleibson Oliveira de Lima

Orientadoras: Prof^a Dr^a Maria Gardênnia da Fonseca

Prof^a Dr^a Iêda Maria Garcia dos Santos

A hidroxiapatita tem sido objeto de pesquisa em virtude de fase cristalina ser similar a fase cristalina do tecido ósseo e a parte mineral dos dentes, além disso possui boa biocompatibilidade, por esse motivo tornou-se um biomaterial bastante utilizado atualmente. Neste estudo, hidroxiapatitas modificadas com prata foram obtidas pelo método da co-precipitação e por impregnação, visando a aplicação dos diversos sólidos como agentes antimicrobianos. A síntese por co-precipitação partiu do cloreto de cálcio e fosfato de amônio dibásico, utilizando como tampão hidróxido de sódio e do nitrato de prata em diferentes concentrações em quantidades de 0,25, 0,5 e 1% em mol com relação ao cálcio para obtenção dos sólidos dopados em diferentes percentuais. No método por impregnação a hidroxiapatita pura reagiu com soluções aquosas de nitrato de prata com as concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mmol dm⁻³, a temperatura ambiente. Os sólidos obtidos foram caracterizados por difratometria de raios X, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados de difratometria de raios X mostraram a presença da prata metálica nos compostos em $2\theta \approx 38^\circ$, além dos picos correspondente a hidroxiapatita estequiométrica. As hidroxiapatitas modificadas com prata obtidas por co-precipitação e impregnação mostraram-se ser eficazes na inibição do crescimento bacteriano quando testado in vitro através do método adesão bacteriana e contato direto para bactérias Gram positivas e Gram negativas mostrando seu potencial para o uso como agente antimicrobiano.

Palavras-chave: hidroxiapatita, prata, agentes antimicrobianos.

Abstract

Title: Hydroxyapatites modified with silver applied as antimicrobial agents

Author: Cleibson Oliveira de Lima

Supervisors: Prof^a Dr^a Maria Gardênnia da Fonseca

Prof^a Dr^a Iêda Maria Garcia dos Santos

Hydroxyapatite has been the subject of research because of being similar to the crystal phase of the crystalline phase and the bone mineral part of the teeth, moreover possesses good biocompatibility, therefore it has become quite a biomaterial used today. In this study, hydroxyapatites have been modified with silver obtained by the method of coprecipitation and impregnation with a view to implementing the various solids such as antimicrobial agents. The synthesis started by coprecipitation of calcium chloride and dibasic ammonium phosphate using buffer such as sodium hydroxide and silver nitrate at different concentrations in amounts of 0.25, 0.5 and 1 mol% with respect to the calcium to obtain the solid doped in different percentages. In the method for impregnating the pure hydroxyapatite reacted with aqueous solutions of silver nitrate in concentrations of 0.125, 0.25 and 0.5 mmol dm⁻³ at room temperature. The obtained solids were characterized by X-ray diffraction, infrared spectroscopy, Raman spectroscopy and scanning electron microscopy. The results of X-ray diffraction showed the presence of metallic silver in $2\theta \approx 38^\circ$ compounds besides the peaks corresponding to the stoichiometric hydroxyapatite. The modified hydroxyapatites with silver obtained by impregnation and co-precipitation of proved to be effective in inhibiting bacterial growth when tested in vitro bacterial adhesion through direct contact and method for Gram positive and Gram negative bacteria showing its potential for use as an antimicrobial agent.

Keywords: synthesis, characterization, hidroxyapatites, silver.

Capítulo

1

Introdução

1. Introdução

Os biomateriais desempenham um papel de grande importância na área médica e biológica em que uma ampla variedade de materiais é utilizada, dentre esses destaca-se a hidroxiapatita que têm sido bastantes utilizada na substituição de tecidos, órgãos ou função do corpo (HELMUS; TWEDEN, 1995). A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é o constituinte mineral do osso natural representando 30 a 70% da massa dos ossos e dentes (Ando J., 1958). A hidroxiapatita sintética possui propriedades de biocompatibilidade e bioatividade que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses (Eanes; E.D., 1980), daí o grande interesse em sua produção. Outra característica interessante e bastante pesquisada é a estrutura cristalina da hidroxiapatita (HA), que permite substituições por outros íons o que faz com que tenha uma grande capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas (MAVROPOULOS E. et al., 1999).

Neste aspecto particular a presença em certos materiais metálicos, como por exemplo prata, permite que o uso como agentes antimicrobianos. A atividade antibacteriana de prata tem sido desde há muito conhecido e encontrou uma variedade de aplicações porque a sua toxicidade para as células de humanos é consideravelmente mais baixa do que para a bactéria (R. DASTJERDI *et al.*, 2010).

Este campo tem sido continuamente investigado porque os microrganismos estão mais resistentes à antibióticos e assim novos compostos bioativos com elevada biocompatibilidade e propriedades antibacterianas vem sendo obtidos (JAISWAL *et al.*, 2010; MARTINEZ-GUTIERREZ *et al.*, 2010).

Durante décadas, a hidroxiapatita (HA) é utilizada como biocerâmica, no entanto os fosfatos de cálcio podem adsorver metais e diversos estudos mostram que a interação entre os cátions metálicos e hidroxiapatita ou fosfato de rocha é um mecanismo complexo que combina troca iônica, a dissolução da superfície, adsorção superficial e precipitação.

Estes fosfatos ao interagirem com metais podem ser utilizados como agentes antimicrobianos para uso na medicina e na odontologia. Neste sentido, no trabalho hidroxiapatitas (HA) foram sintetizadas nas formas pura e dopada com prata (Ag) visando a obtenção de hidroxiapatitas modificadas (HA-Ag) com diferentes teores de íon dopante. Os materiais obtidos foram aplicados como agentes antibacterianos (JAISWAL *et al.*, 2010).

1.1. Objetivos

1.1.1 Geral

- Sintetizar hidroxiapatitas modificadas com prata pelo método de co-precipitação e por impregnação com solução de nitrato de prata.

1.1.2 – Específicos

- Sintetizar as hidroxiapatitas pura e modificadas com prata partindo dos precursores cloreto de cálcio e hidrogenofosfato de diamônio em diferentes percentagens do dopante 0,25, 0,5 e 1%.
- Utilizar hidroxiapatita para processos de impregnação com prata a partir de soluções do dopante em concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mmol dm⁻³.
- Caracterizar os materiais obtidos pelas técnicas de difratometria de raios X, espectroscopia na região do infravermelho com transformada em Fourier (FTIR), espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos vários pós obtidos pelos métodos adesão bacteriana e contato direto.

Capítulo

2

Revisão da literatura

2. 1 - Biomateriais e biocerâmicas

O termo biomaterial foi definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento em Saúde em novembro de 1982 nos Estados Unidos. Pode ser definido como quaisquer substâncias ou combinação delas, sintética ou natural, que possam ser usadas por um período de tempo, de forma completa ou parcial, como parte de um sistema que trate, aumentem ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Um biomaterial deve ainda ser seguro, econômico e fisiologicamente aceitável (HELMUS *et al.*, 1995). Outro conceito, é que um biomaterial pode ser utilizado em contato com tecido vivo no sentido de reconstruir ou substituir os tecidos danificados. Deste ponto de vista, um biomaterial deve possuir compatibilidade bioquímica e biomecânica, bem como possuir propriedades físicas e mecânicas que se assemelham com aquelas encontradas nos tecidos a serem substituídos. Por exemplo, um implante que é constituída de biomaterial com alto módulo elástico tenderá em absorver quase toda carga aplicada e funcionará como proteção óssea da região restaurada. O revestimento ósseo formado sofre mudanças biológicas que facilita a reabsorção do osso e assim possibilita a formação de uma interface entre o revestimento e o osso. Contudo, o biomaterial implantado poderá se decompor quando a estrutura óssea for comprometida por alguma patologia que lhe cause enfraquecimento (WANPENG *et al.*, 1996).

Os biomateriais se diferem das outras classes de materiais em virtude de sua eficiência em se manter em ambiente biológico, não prejudicando o meio e sem serem avariados no processo (HUANG *et al.*, 2014; WILLIAMS, 2009). Assim devemos associar os biomateriais com as devidas preocupações e cuidados com seu uso para áreas de saúde, onde o material deve ter uma interface que não traga qualquer prejuízo na saúde, ou seja, que não produza quaisquer interferências, seja ela biológica, portanto são aquelas que não produza efeito tóxicos ou sistêmica quando seu uso é feito em uma série aplicações fisiológicas (KHAN *et al.*, 2014).

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com o tipo material que o constitui, conforme é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Materiais constituintes dos biomateriais.

Materiais	Biomateriais
Polímeros	Polietileno, PMMA, poliéster, silicone, celulose, quitosana e quitina.
Metais e ligas	Aço inoxidável, Liga de titânio, Liga de Cobalto e Cromo.
Cerâmicas e vidros	Alumina, Zircônia, Hidroxiapatita, fosfato tricálcio (TCP) e Vidros bioativos.
Compósitos	Fibra de carbono e Fosfato de Cálcio-Colágeno.

Fonte: (HELMUS, M. N. *et al.*, 1995)

Dentre os inúmeros materiais sintetizados grande parte são utilizados para reparações dos tecidos ósseos, Dentre esses materiais estão incluídas as cerâmicas, que podem ser chamadas de biocerâmicas, que são as mais utilizadas na atualidade. As biocerâmicas apresentam-se na forma de pós, revestimentos ou próteses são utilizadas nas bioreparações, aumento ou como enxertos dos tecidos doentes ou danificados, como ossos, juntas e dentes (GROSS, K.A, *et al.*, 2002; HENCH, L.L. *et al.*, 1993). Contudo várias composições de cerâmicas tenham sido analisadas e testadas para uso médico, ainda são poucas utilizadas clinicamente. Dentre essas, pode-se citar a alumina e a zircônia, utilizadas inicialmente na substituição por completo das juntas dos quadris e fêmur; os fosfatos de cálcio utilizados para o recobrimento de ligas metálicas e que possuem forma de grãos ou peças pequenas que são usadas para reparos ósseos; os vidros e vitro-cerâmicas bioativos são utilizados para substituições e reparos de ossículos do ouvido interno, dentes e vértebras (Hench, L.L. *et al.*, 1993).

Os biomateriais cerâmicos podem ser classificadas de acordo com sua interação com tecidos vivos, podendo ser:

- Inertes: É aquela em que não existe interação química entre a cerâmica e o tecido biológico (zircônia);

- Porosas: Propicia o crescimento de tecido biológico dentro da cerâmica (HA e aluminatos);
- Bioativas: Existe a interação entre o tecido biológico e a cerâmica (hidroxiapatita - HA);
- Reabsorvíveis: São aquelas cerâmicas que são degradadas e absorvidas pelo organismo (fosfato tricálcio - TCP).

São essas características aliadas com as propriedades mecânicas, que tornam as biocerâmicas um biomaterial de excelente desempenho no campo biomédico (SAMAVEDIA *et al.*, 2013).

2.1.1 Fosfatos de cálcio

Dentre os fosfatos, o grupo dos fosfatos de cálcio são bastantes conhecidos e utilizados, devido à importância biológica desses materiais. O que torna os fosfatos de cálcio uma biocerâmica especial e que apresentam a ausência de toxicidade local e sistêmica, além da ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações, e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro (HORNEZ *et al.*, 2007).

Dentre as principais aplicações dos fosfatos de cálcio estão relacionados aos setores médicos e odontológicos como no reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas, aumento de rebordo alveolar, coadjuvante na colocação de implantes metálicos, regeneração guiada de tecidos ósseos, reconstrução buco-maxilo-facial, equipamentos percutâneos, reparo e substituição de paredes orbitais, substituição do globo-ocular e revestimento de implantes metálicos (ELLIOTT, 1994). Outra utilização dos fosfatos de cálcio está relacionada ao fornecimento de suprimento de fosfatos que são amplamente usados na produção de fertilizantes (ATKINS, 2001), colunas cromatográficas, indústria de alimentos e na indústria farmacêutica, em cremes dentais, etc (LEE, 1996).

Entre os fosfatos de cálcio de maior relevância biológica estão principalmente os amorfos, hidroxiapatita e demais apatitas, como a monetita, brushita, fosfato octacálcio, fosfato tricálcio e pirofosfato de cálcio. Dentre as fases minerais contidas em calcificações normais, ou seja, não doentias, as apatitas são frequentemente citadas (FERNANDES *et al.*, 2011; WILLIAMS, 2009).

Dentre algumas das propriedades de aplicação destes materiais, está incluída a sua influência sobre os tecidos biológicos e particularmente a sua ação na biodegradação e interação são determinadas por sua constituição química, pela morfologia e topologia da superfície (MOUTHUY *et al.*, 2013; BOUTINGUIZA *et al.*, 2012).

Na Tabela 2 podemos observar alguns dos tipos de fosfatos de cálcio onde temos a classificação baseada na razão molar Ca/P. Todos os fosfatos possuem diferentes metodologias de sínteses, as metodologias realizadas para os fosfatos hidratados baseiam-se na síntese à temperatura ambiente enquanto os anidros baseiam-se à temperaturas não muito elevadas (JINAWATH e SUJARIDWORAKUN, 2002).

Tabela 2 - Classificação dos fosfatos de cálcio segundo a razão Ca/P.

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ca/P
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de tricálcio (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato de tricálcio (α , α' , β , γ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogeno fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogeno fosfato de cálcio (DCP)	CaHPO_4	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogeno fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio (α , β , γ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Fonte: GUASTALDI A.C *et al.* 2010.

Na Tabela 3 podemos relacionar diversos fosfatos de cálcio e suas ocorrências em sistemas biológicos.

Tabela 3 - Ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos

Fosfato de Cálcio	Ocorrência
Hidroxiapatita (HA)	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário e urinário.
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	Cálculo dentário e urinário.
Fosfato octacálcico (OCP)	Cálculo dentário e urinário.
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD)	Cálculo dentário, ossos decompostos.
Fosfato tricálcico (TCP)	Cálculo dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias. Calcificação de tecido mole.
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	Depósitos de pseudo-gotas em fluidos.

Fonte: GUASTALDI A.C *et al.* 2010.

Dentre os inúmeros fosfatos, iremos apontar a hidroxiapatita que foi alvo de estudo nesta pesquisa.

2.1.1.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) ou monohidroxiortofosfato de pentacálcio apresenta fórmula estequiométrica $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ é um composto bastante escasso e está presente na constituição das rochas ígneas e metamórficas e em solos calcáreos. A fluorapatita FAp e a cloroapatita ClAp, isomorfos da hidroxiapatita são bastantes numerosas (ELLIOTT, 1994).

A hidroxiapatita possui similaridade com fase mineral encontradas nos ossos e dentes isso se deve a forma estrutural e composição química deste material, desde então a hidroxiapatita tem sido alvo de estudos, além possuir inúmeras utilidades, e uma dessas é aplicação deste material como enxertos de tecidos ósseos (CAMPBELL, 2003). A aplicação da hidroxiapatitas como biomateriais deve-se a ausência de toxicidade local e

sistêmica do material aliada à falta de respostas inflamatórias e possuir excelente compatibilidade para ligar-se ao tecido ósseo hospedeiro (KAWACHI *et al.*, 2000).

É um material conhecido e com uma excelente biocompatibilidade, devido sua estrutura cristalina possuir semelhanças com fase da estrutura cristalina dos ossos (IVANOVA *et al.*, 2014; CHAI *et al.*, 2012).

Por possuir um alto valor de reatividade, a nano estrutural, a bioadesão e cinética de dissolução favorável são reportadas fazendo com que esse material torne-se vantajoso para o uso em organismos humanos (ZHOU e LEE, 2011). Estas propriedades permitem garantias nas características osteocondutoras, cuja a definição é dita como sendo a formação óssea sobre estrutura superficial do biomaterial influenciada por meio de um processo bioativo, além dessas outras características intrínsecas aos biomateriais já citadas (ABDAL-HAY *et al.*, 2014; BOSE e TARAFDER, 2012).

A biocompatibilidade das hidroxiapatitas está acrescida com sua eficácia de adsorção que possibilita a incorporações de moléculas bioativas em sua estrutura cristalina. Portanto, destacando-se com um excelente veículo para a distribuição de agentes terapêuticos (KLEINER *et al.*, 2014; GINEBRA *et al.*, 2012).

2.1.1.2 Estruturas da hidroxiapatita

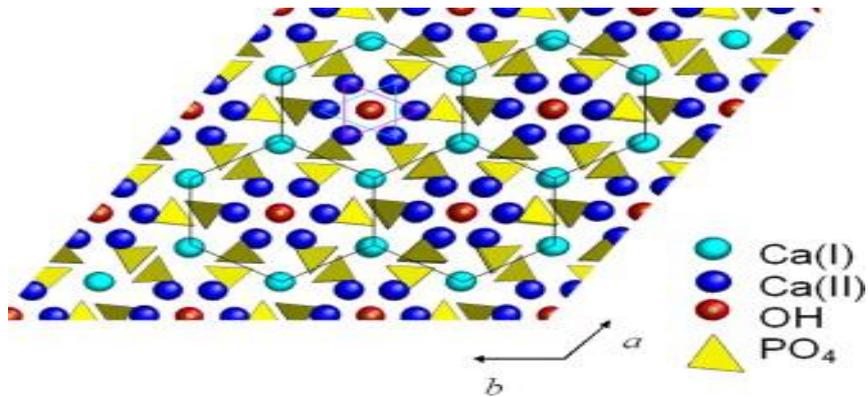
A designação apatita é aplicado ao grande grupo de materiais que apresentam fórmula geral $M_{10}(ZO_4)_6X_2$ (ELLIOT, 1973; HEIMANN, 2013), onde o metal M pode ser Ca, Pb, Cd, Ir, La, Ce, K, Na, e Z inclui os elementos P, V, As, Cr, S, C, Al, S e X é um ânion como OH^- , Cl^- , F^- e CO_3^{2-} e até H_2O . A nomenclatura específica de cada uma das apatitas depende quais elementos ou radicais estão presentes M, Z e X. De acordo com essa definição, a hidroxiapatita possui a estrutura molecular das apatitas, onde temos o M representado pelo cátion Ca^{2+} , Z representa o P^{5+} e X é o OH^- ,

dando origem a hidroxiapatita estequiométrica com relação atômica Ca/P de 1,67 (ELLIOT, 1999; BOANINIA *et al.*, 2010).

A estrutura da hidroxiapatita normalmente possui conformação hexagonal, com os seguintes parâmetros de rede $a = b = 0,9432$ nm, $c = 0,6881$ nm e $Z = 1$, estes que pertencem ao grupo espacial $P6_3/m$, onde P indica o sistema hexagonal primitivo. A estrutura da hidroxiapatita pode ser interpretada como um conjunto de fosfatos atravessado por canais paralelos preenchidos por íons OH^- , paralelo ao eixo c (HEIMANN, 2013; MAVROPOULUS, 2002). Na estrutura existem dois locais de cátions não equivalentes na célula unitária, classificados como sítios Ca (I) e Ca (II), onde estão presentes e distribuídos os dez átomos de cálcio, sendo quatro cálcios localizados no sítios no sitio I, onde os mesmo estão alinhados em colunas e os outros seis cálcios estão presentes no sítio II, eles estão distribuídos e organizados em triângulos equiláteros em planos perpendiculares ao eixo c , um no plano $\frac{1}{4}$ e outro em $\frac{3}{4}$ de forma que a sua projeção no plano ab , forme um hexágono (HEIMANN, 2013; MAVROPOULUS, 2002). Nestes dois sítios existentes na estrutura cristalina ocasiona implicações importantes nas hidroxiapatita que contêm cátions impuros, devido a essa impureza podem ocorrer o comprometimento das propriedades estruturais dependendo do sítio ocupado pelo cátion da impureza (HEIMANN, 2013).

Os íons de cálcio presente no sítio (I) são coordenados por seis átomos de oxigênio dos tetraedros do grupo fosfato e com outros três oxigênios a uma distância média de 0,225 nm, e estão dispostos em colunas paralelas aos canais de hidroxilas. Enquanto que os íons de Ca (II) são rodeados por sete átomos de oxigênios relativamente distanciados, conforme mostrado na figura 1.

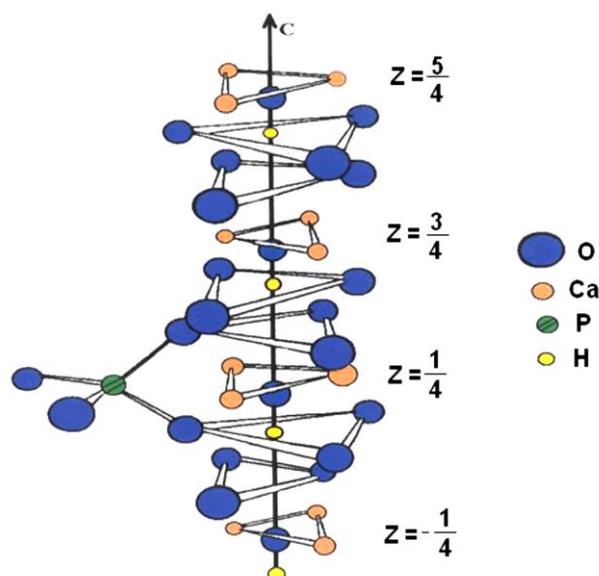
Figura 1 - Visão da estrutura de HA ao longo do eixo *c*. Linhas pretas conectam Ca (I) em redes hexagonais. Triângulos escalonados de átomos de Ca (II) encontram-se no mesmo plano, mas a uma altura diferente em relação ao eixo *c* (BOANINIA *et al.*, 2010).



É importante notar que os íons PO_4^{3-} encontram-se entre os sítios de Ca (I) e Ca (II). Os quatro átomos de oxigênio que fazem parte dos grupos fosfatos, dois estão localizados nos planos perpendiculares à direção *c* e os outros dois são paralelos a esta direção (BOANINIA *et al.*, 2010).

Devemos destacar que a distribuição dos átomos de Ca (II) parece formar um hexágono, mas na realidade existem dois triângulos equiláteros sobrepostos e no centro deles se encontra os íons OH^- , onde na estrutura hexagonal ocupa 50% das posições possíveis estaticamente (BOANINIA *et al.*, 2010; ELLIOTT, 1994). Na Figura 2 podemos visualizar a distribuição dos átomos com mais clareza.

Figura 2 - Estrutura da hidroxiapatita ao longo do eixo c. Adaptado de (ELLIOTT, 1994).



Os átomos de Cálcios do sítio I são alinhados em colunas e qualquer interação na rede do metal-oxigênio irá afetar toda a estrutura (BOANINIA *et al.*, 2010). Na estrutura da célula unitária existem dois canais de cálcio, um ocupado por Ca (I) em $z = 0$ e em $z = \frac{1}{2}$ do parâmetro cristalino e em $z = \frac{1}{4}$ e $z = \frac{3}{4}$ encontram-se os íons de cálcio do sítio (II) (ELLIOTT, 1994).

A rede cristalina da hidroxiapatita permite as substituições dos íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- por outros grupos. As substituições isomórficas pode acarretar a mudanças nos parâmetros de rede, a morfologia do cristal, a cristalinidade, a solubilidade, propriedades espectrais de absorção no infravermelho e estabilidade térmica da hidroxiapatita. As trocas catiônicas podem ocorrer com íons bivalentes como Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} ou Fe^{2+} e também pode ocorrer com outros íons como Y^{3+} e K^+ . As trocas aniônicas podem ocorrer nas posições de fosfato ou hidroxila e as substituições mais importantes ocorrem nas trocas com os íons Cl^- , F^- e CO_3^{2-} substituem o OH^- e quando CO_3^{2-} , AsO_4^{3-} e VO_4^{3-} substituem o PO_4^{3-} (BOANINIA *et al.*, 2010).

Fluoroapatita e clorapatita são os exemplos mais comuns da hidroxiapatita que sofre substituição anionicamente. As estruturas

cristalinas possuem semelhanças a estrutura cristalina da hidroxiapatita. A fluorapatita, possui uma estrutura mais estável e é um composto menos solúvel que a hidroxiapatita, além disso possui a presença do flúor em estrutura que auxilia na prevenção de cáries e tratamento da osteoporose, por essas qualidades a fluorapatita tem sido objeto de estudo na área biológica (LALA *et al.*, 2013).

A literatura aborda que existem dois tipos de substituições de carbonatos a primeira substituição e do CO_3^{2-} por OH^- (tipo A) e CO_3^{2-} por PO_4^{3-} (tipo B), nos dois casos as substituições podem influenciar nos parâmetros de rede do material. As carboapatitas são estudadas como promissoras para aplicações em enxertos e suportes ósseos (LALA *et al.*, 2013).

A hidroxiapatita ainda poderá apresentar-se na forma monoclinica quando houve um deslocamento dos grupos hidroxilas acarretando na deformação da rede cristalina, passando a ter um grupo espacial $\text{P2}_1/\text{b}$, e parâmetros de rede $a = 0,9421 \text{ nm}$, $b = 2a$ e $c = 0,6881 \text{ nm}$ (ELLIOT, 1994). Portanto só a fase hexagonal possuirá importância, isso devido que a forma monoclinica não possui estabilidade (BOANINIA *et al.*, 2010).

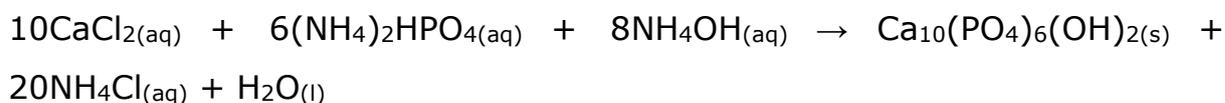
2.1.2 Métodos de síntese da hidroxiapatita

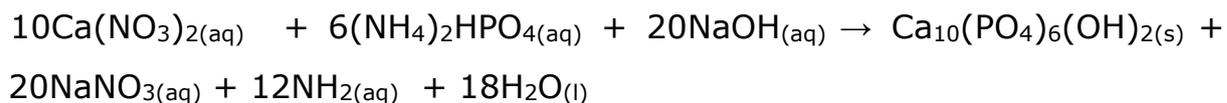
A hidroxiapatita possui as características críticas além disso possui outras propriedades tais como: morfologia, área superficial, volume e diâmetro de poros, propriedades mecânicas, estabilidade térmica e permeabilidade da superfície estão relacionadas fundamentalmente com o tipo de método de síntese (AMER *et al.*, 2013; SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013). Na literatura existe uma vasta variedade de metodologia para a síntese de obtenção da hidroxiapatita densa e porosa, contudo em diferentes em termos das condições específica, são feitos incremento afim do aprimoramento das propriedades dos biomateriais (AHMED *et al.*, 2014).

Dentre as principais metodologias de preparação da hidroxiapatita podemos citar cinco grupos: métodos por via úmida, métodos secos, processos a altas temperaturas, método a partir de fontes biogênicas e métodos combinados. Dentre essas daremos prioridade na metodologia por via úmida.

Na metodologia por via úmida estão incluídas as sínteses hidrotermais, hidrólise, sol-gel, emulsão, sonoquímico e co-precipitação.

A metodologia de co-precipitação é que possui os resultados mais satisfatório para síntese de nanopartículas de hidroxiapatita, devido ao pó obtido possuir características equivalente ao tecido ósseo e dentário (AMINZARE *et al.*, 2013), o que difere da síntese da hidroxiapatita realizadas às altas temperaturas. Na síntese de co-precipitação é necessário obedecer os principais parâmetros para a realização do experimento tais como: pH alcalino, agitação contínua, adição lenta dos precursores mantendo a razão molar Ca/P e tempo de maturação. As vantagens dessa metodologia é que podemos variar a temperatura da síntese podendo ser uma síntese a temperatura ambiente ou próxima a temperatura de ebulição da água (DONGDONG *et al.*, 2013; AMER *et al.*, 2013). Na síntese a temperatura ambiente teremos um material menos cristalino quando comparada com uma síntese realiza com uma temperatura próxima da ebulição da água. Dependendo da aplicação do material isso pode ser uma vantagem ou desvantagem. Algumas das desvantagens da utilização desse método é o tempo longo de síntese, que inclui a maturação e a adição dos precursores, dificultando o rendimento da síntese da hidroxiapatita (DONGDONG *et al.*, 2013). As seguintes equações simplificadas mostram algumas das reações químicas conhecidas adotadas para a síntese de HA via método de co-precipitação.





A metodologia hidrotermal tem despertado interesses dos pesquisadores devido a obtenção da hidroxiapatita estequiométrica e com cristalinidade, esse tipo de método é realizada em altas temperatura, contudo o controle da morfologia e o custo alto da síntese tornando desfavoráveis seu processo. (LIN *et al.*, 2011).

No procedimento de hidrólise fundamentar-se na transformação/hidrólise de algumas fases como DCPD e DCPA em HA. Esse tipo de transformação não tem sido chamariz para a síntese da hidroxiapatita, possivelmente devido à hidrólise lenta dos fosfatos de cálcio (GUO *et al.*, 2013).

O método baseado em sol-gel tem oferecido uma boa homogeneidade ao produto, que habitualmente é realizada em baixa temperatura e o material obtido apresenta uma estrutura com alta área superficial e tamanho que varia de 50 nm a 1 µm, porém podem apresentar o aparecimento de fases secundárias, frequentemente apresenta a fase de óxido de cálcio, o que prejudica a biocompatibilidade da hidroxiapatita (KAYGILI *et al.*, 2014).

No método de emulsão é baseado na dispersão de dois líquidos imiscíveis tais como água e óleo na juntamente com a presença de agentes tensoativos, apresentando dependência do surfactante para a obtenção de partículas pequenas e com morfologia controlada (FUJII *et al.*, 2006).

A metodologia mais atual é o sonoquímico, baseado nas reações químicas que são ativadas por irradiação de ultrassom, sendo um procedimento mais rápido, permitindo a obtenção de nanopartículas (GOPI *et al.*, 2012; MEHRALIA *et al.*, 2014).

2.1.3 Fosfatos de cálcio como trocadores iônicos

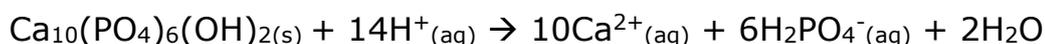
Segundo Legeros et al. 1984, cátions com raios iônicos maiores que o do cálcio podem ser incluídos na estrutura da apatita com mais facilidade do que aqueles com raios iônicos menores. Como resultado teremos uma expansão dos parâmetros de rede a e c , e com aumento do volume da célula unitária. Já a substituição do cátion cálcio por um cátion menor, como exemplo podemos citar o cobre (raio iônico igual a $0,68 \text{ \AA}$), teremos como resultado dessa troca uma contração dos parâmetros a e c , e como consequência a diminuição do volume da célula unitária (V_c).

Dois mecanismos gerais foram propostos (MA *et al.*, 1993). Para fundamentar a capacidade de alguns fosfatos de cálcio, principalmente aqueles que possuem altas áreas superficiais, atuarem como trocadores de íons metálicos:

- (1) adsorção de íons na superfície do material, seguida por sua difusão no sólido, e a liberação de cátions originais;
- (2) dissolução do material numa solução aquosa contendo os íons doadores, seguindo-se de precipitação ou co-precipitação.

Lower et al. 1998 Propuseram os mecanismos de dissolução e precipitação para a imobilização de Pb^{2+} aquoso em hidroxiapatita através das seguintes reações:

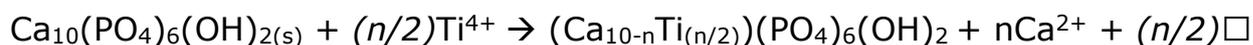
- (1) Processo de dissolução:



- (2) Processo de precipitação:

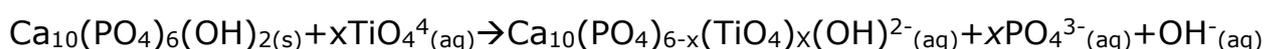


Ribeiro et al. 2005, Sugeriram o processo de difusão do sólido, e a liberação de íons Ca^{2+} para solução incubadora, na adsorção de íons Ti^{4+} na hidroxiapatita. Neste caso, a substituição de Ca^{2+} por Ti^{4+} na rede cristalina da hidroxiapatita aconteceria através da seguinte reação:



Onde: \square representa uma vacância.

Além do cátion Ca^{2+} , o ânion fosfato da mesma forma pode ser substituído na rede cristalina da hidroxiapatita. Ribeiro et al. 2005, confeccionaram uma hidroxiapatita substituída com silicone por intermédio do método simples de precipitação aquosa. Estes estudos baseavam-se no fato de que a troca de um grupo fosfato (PO_4^{3-}) por um grupo silicato (SiO_4^{4-}) em uma estrutura cristalina seria possível, certamente porque existiria um equilíbrio de carga elétrica por considerar o grupo de silicato ser mais negativo do que o grupo fosfato. Equitativamente, um mecanismo que representaria essa substituição do fosfato por titanato, com um conveniente mecanismo para o equilíbrio de carga, é representado pela equação:



A rede cristalina da hidroxiapatita permite as substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com grande simplicidade (AFSHAR *et al.*, 2003). O cátion Ca^{2+} pode ser trocado por metais tais como o chumbo (Pb^{2+}), cádmio (Cd^{2+}), cobre (Cu^{2+}), zinco (Zn^{2+}), estrôncio (Sr^{2+}), cobalto (Co^{2+}), ferro (Fe^{2+}), manganês (Mn^{2+}), prata (Ag^+). Os grupos fosfatos e hidroxilas, negativos, podem ser trocados por carbonatos (CO_3^{2-}), silicatos (SiO_4^{2-}), flúor (F^-), cloro (Cl^-), etc. (MAVROPOULOS, 1999). Dentre as propriedades dos fosfatos de cálcio que são abalados através de substituintes são: parâmetros de rede (dimensões dos eixos a e c), tamanhos e forma do cristal, tensão cristalina, cristalinidade, propriedades espectrais de absorção

no infravermelho e estabilidade térmica (AOKI, 1999). Quando as trocas estão presentes ao mesmo tempo, elas podem ter aditivos, sinergia ou efeitos opostos às propriedades cristalinas das apatitas (MAVROPOULOS *et al.*, 2005).

O crescimento da hidroxiapatita no meio ambiente acontece na presença de diversos íons diferentes dos íons cálcio e fosfato (APARECIDA *et al.*, 2005). Assim como nos minerais, a hidroxiapatita dos ossos é multiplamente substituída por diversos íons metálicos assim como vistos nas apatitas minerais. Os níveis de substituição pode variar com idade e com a região do osso, e os níveis de substituições podem aparecer em diferentes concentrações. As substituições mais grosseiras ficam por conta do CO_3^{2-} (5,0%), Na^+ (0,9%) e Mg^{2+} (0,5%-0,7%). Também podemos encontrar outros substituintes, tais como SiO_4^{2-} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} , são observados em menores proporções (AOKI, 1994).

Os efeitos produzidos pela substituição do Ca^{2+} por diversos outros metais tem estimulado grande interesse em virtude das mudanças que eles podem provocar nas propriedades físico-químicas e biológicas da hidroxiapatita. Diversos estudos acerca da biofuncionalidade de cada um desses metais quando individualmente incorporados a fosfatos de cálcio são realizados atualmente (AOKI, 1999).

2.1.7 Prata como agente antimicrobiano

Desde os tempos antigos entre os vários agentes antimicrobianos, a prata tem sido estudada e usada para combater infecções e evitar a deterioração (RAI *et al.*, 2009). Atualmente, muitas pesquisas têm focalizado nas propriedades antibacterianas e multifuncionais de nanopartículas de prata (NERSISYAN *et al.*, 2003; JEONG *et al.*, 2005; RAI *et al.*, 2009). Vários métodos têm sido utilizados para produção de nano-prata entre eles a redução foto catalítica (CHANG *et al.*, 2006), processo de redução química (Yu, 2007), sono-química, matriz química (AYYAD *et al.*,

2010), foto-redução (COURROL et al., 2007), métodos baseados em micela reversa (XIE et al., 2006) e até mesmo síntese biológica (SATHISHKUMAR et al., 2009; KALISHWARALAL et al., 2010; ZEIRI et al., 2002; SHAHVERDI et al., 2007; DURAN et al., 2007). A prata é um dos mais seguros agentes antimicrobianos, em comparação com alguns agentes orgânicos antimicrobianos (DASTJERDI et al., 2010) que foram evitados devido aos seus efeitos nocivos sobre o corpo humano (MUCHA et al., 2002). A prata foi descrita como sendo "oligo-dinâmico" devido à sua capacidade de exercer um efeito bactericida sobre os produtos que a contém, principalmente devido à suas atividades antimicrobianas e baixa toxicidade para as células humanas (DASTJERDI et al., 2009).

A sua propriedade terapêutica foi provada contra uma ampla gama de microrganismos (LOK, 2006; JEONG et al., 2006), com mais de 650 organismos causadores de doenças no corpo, mesmo em baixas concentrações (JEONG et al., 2005). A capacidade de prata para evitar a formação de biofilme também foi comprovada (STOBIE et al., 2008). Semelhante mecanismo foi verificado para íons de prata e com suas nano partículas (LOK, 2006). Nano partículas prata são um desinfetante não-tóxico e não-tolerante (WEN et al., 2007; PAKNIKAR et al., JIA et al., 2008). O uso de nano partículas de prata leva a um aumento no número de partículas por unidade de área e, assim, os efeitos antibacterianos podem ser maximizados (YEO et al., 2003).

O modo de atuação da prata ainda é muito discutido na literatura mas uma das hipóteses é que os íons metálicos podem destruir ou passar através da membrana celular, e ligar-se ao grupo de SH das enzimas celulares (WRIGHT, 2002). A diminuição consequente da atividade crítica enzimática provoca mudança no metabolismo do microrganismo e inibe o seu crescimento, até à morte da célula. Os íons metálicos podem também catalisar a produção de radicais de oxigênio que oxidam a estrutura molecular. A formação de oxigênio ativo ocorre de acordo a reação química (1):



Tal mecanismo não precisa de qualquer contato direto entre agente antimicrobiano e bactérias, porque o oxigênio produzido ativo se difunde a partir de fibra para o ambiente circundante. Portanto, os íons metálicos inibem a multiplicação de microrganismos.

Íons de prata podem conduzir à desnaturação da proteína e morte celular por causa da sua reação com resíduos nucleófilos de aminoácidos em proteínas, e ataque a grupos sulfidríla, amino, imidazol, fosfato e carboxílicos de proteínas da membrana ou enzima (KAUR et al., 1985).

O bloqueio da respiração e morte celular também pode ser causada por formação de ligações R-S-S-R (KUMAR et al., 2004). Kumar et al. propuseram que estas ligações podem ser formadas através da reação entre a prata na forma oxidada e grupos (-S-H).

A ligação de íons Ag^+ nas bactérias por interação eletrostática com a carga negativa da parede celular das bactérias é conhecido como um dos mecanismos de morte celular via Ag^+ pela ruptura da membrana celular (LOK, 2006). Em geral, baixas concentrações de Ag^+ induz a perda de prótons através da membrana bacteriana e morte celular (PERCIVAL et al., 2005). Além disso, a concentração de nano-partículas de prata na faixa nanomolar pode ser eficiente, enquanto íons Ag^+ são necessários no nível micromolecular (LOK, 2006).

Kim et al. 2007, sugeriram que o mecanismo antimicrobiano de nano-partículas de Ag^+ está relacionado com a formação de radicais livres e subsequente dano à membrana induzida por radicais livres. Eles confirmaram que a atividade antimicrobiana de nanopartículas de Ag^+ e de nitrato de prata foi influenciada por NAC (N-acetilcisteína). Eles têm também sugerido que os radicais livres que podem ter sido derivados a partir da superfície de nano-partículas de Ag eram responsáveis pela atividade antimicrobiana através de EPR (ressonância paramagnética eletrônica) (KIM et al., 2007).

A investigação da bio inocuidade de prata revelou que partículas de tamanhos menores de prata são menos tóxicos para a pele do que as maiores ao mesmo nível de concentração. Apesar de uma pequena irritação

ter sido relatada pela aplicação da prata coloidal com partículas 30 nm tamanho, a prata coloidal com tamanho de 2-3 nm partícula tem sido conhecida como sendo inofensiva (LEE e JEONG, 2005).

Pape et al. 2002, desenvolveram uma fibra de carbono ativado após tratada com nano-prata (PAPE et al., 2002). Yeo et al. aplicaram nanopartículas de prata para produzir fios antibacterianos (YEO et al., 2003).

Silva et al. 2006, relataram a influência da introdução de nano-prata em copolímeros na atividade antibacteriana. Eles acreditam que os grupos carboxílicos do ácido acrílico levam ao aumento da mobilidade iônica no copolímero responsável pela melhoria da atividade antibacteriana da superfície do copolímero (PAULA et al., 2009).

As nanopartículas de prata podem ser utilizadas para reduzir infecções, prevenir a colonização bacteriana em superfícies de prótese, em cateteres e materiais odontológicos, bem como na indústria de alimentos, no tratamento de água e na fabricação de tintas antibactérias (GUZMÁN et al., 2009). A prata possui ação bactericida sobre inúmeros tipos de bactérias Gram-positivas e negativas tais como *E. coli*, *S. aureus*, *E. flecium*, *Tuberculosis*, *S. pneumoniae*, *V. cholera* e sobre alguns vírus (MORONES et al., 2005). Porém, alguns tipos de microrganismos apresentam resistentes à ação da prata, como *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* (SADOWSKY et al., 2008). A resistência pode ser ocasionada pela produção de proteínas que atuam como quelatos, complexando a prata ou outros metais pesados no interior das células fazendo com que haja a diminuição de sua toxicidade (GUGGENBICHLER, et al., 1999). Existem outros microrganismos que são capazes de sintetizar nanopartículas de prata por ação enzimática (*P. fungi*) ou por redução extracelular (*Fusarium oxysporum*), ou ainda podem realizar a degradação das mesmas, como caso da bactéria *Chromobacterium violaceum* (DURÁN et al., 2007).

Na literatura são encontrados estudos relacionados sobre a atividade antimicrobiana da prata incorporada na estrutura cristalina da hidroxiapatita como podemos ver na Tabela 4.

Tabela 4 - Estudos relacionados sobre a atividade antimicrobiana da prata incorporada na estrutura cristalina da hidroxiapatita.

Sistema	Metodologia	Aplicação	Referência
Hidroxiapatita/prata	Hidroxiapatita dopada com prata pelo método de pulverização	Atividade antimicrobiana sobre as bactérias <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	CHEN <i>et al.</i> , (2006)
Hidroxiapatita/prata	Hidroxiapatita dopada com prata pelo método de neutralização e posteriormente co-precipitação	Atividade antimicrobiana sobre as bactérias <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .	STANIC <i>et al.</i> , (2011)
Hidroxiapatita/prata	Hidroxiapatita dopada com prata pelo método de co-precipitação.	Teste da eficácia de resposta imune contra bactérias.	CIOBANU <i>et al.</i> , (2013)
Hidroxiapatita/prata	Hidroxiapatita dopada com prata pelo método de redução.	Atividade antimicrobiana sobre a bactéria <i>Escherichia coli</i> pelo Método de espalhamento em placa	LIU <i>et al.</i> , (2013)
Filmes finos de hidroxiapatita/prata	Filmes finos revestido com hidroxiapatita dopada com prata pelo método Sol-Gel.	Atividade antimicrobiana sobre as bactérias <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	ICONARU <i>et al.</i> , (2014)
Hidroxiapatita/prata/zinco	Hidroxiapatita dopada com prata e zinco pelo método de micro ondas.	Atividade antimicrobiana sobre as bactérias <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	IQBAL <i>et al.</i> , (2014)

Capítulo

3

Metodología

3. Metodologia experimental

3.1 Reagentes químicos

De acordo com Tabela 5 foram utilizados os seguintes reagentes e solventes, todos sem purificação prévia.

Tabela 5 - Reagentes utilizados nas sínteses das hidroxiapatitas.

Reagentes	Fórmula química	Massa (g mol^{-1})	Pureza	Fabricante
Hidrogenofosfato de diamônio	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	132,06	99%	Merck
Cloreto de cálcio	CaCl_2	110,98	93%	Sigma Aldrich
Hidróxido de sódio	NaOH	40,0	97%	Vetec
Nitrato de prata	AgNO_3	169,87	99,8%	Alphatec

3.2 Sínteses da hidroxiapatita pura pelo método de co-precipitação

O processo de síntese da hidroxiapatita pura foi realizada partindo de soluções precursoras de volumes iguais contendo 0,033 mol de hidrogeno fosfato de diamônio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e 0,056 mol de cloreto de cálcio (CaCl_2) numa razão molar $\text{Ca/P} = 1,67$, a pH 13.

Inicialmente foi preparada solução de 250 cm^3 de NaOH a 0,2 molar pH 13, essa solução foi adicionada a um balão três bocas com capacidade de 1000 cm^3 , a mesma foi aquecida a $373 \pm 10\text{K}$ em refluxo sob agitação magnética. Em seguida foram adicionados simultaneamente 250 cm^3 das soluções precursoras de hidrogeno fosfato de diamônio (0,033 mol) e cloreto de cálcio (0,056 mol) à vazão de $1,7 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.

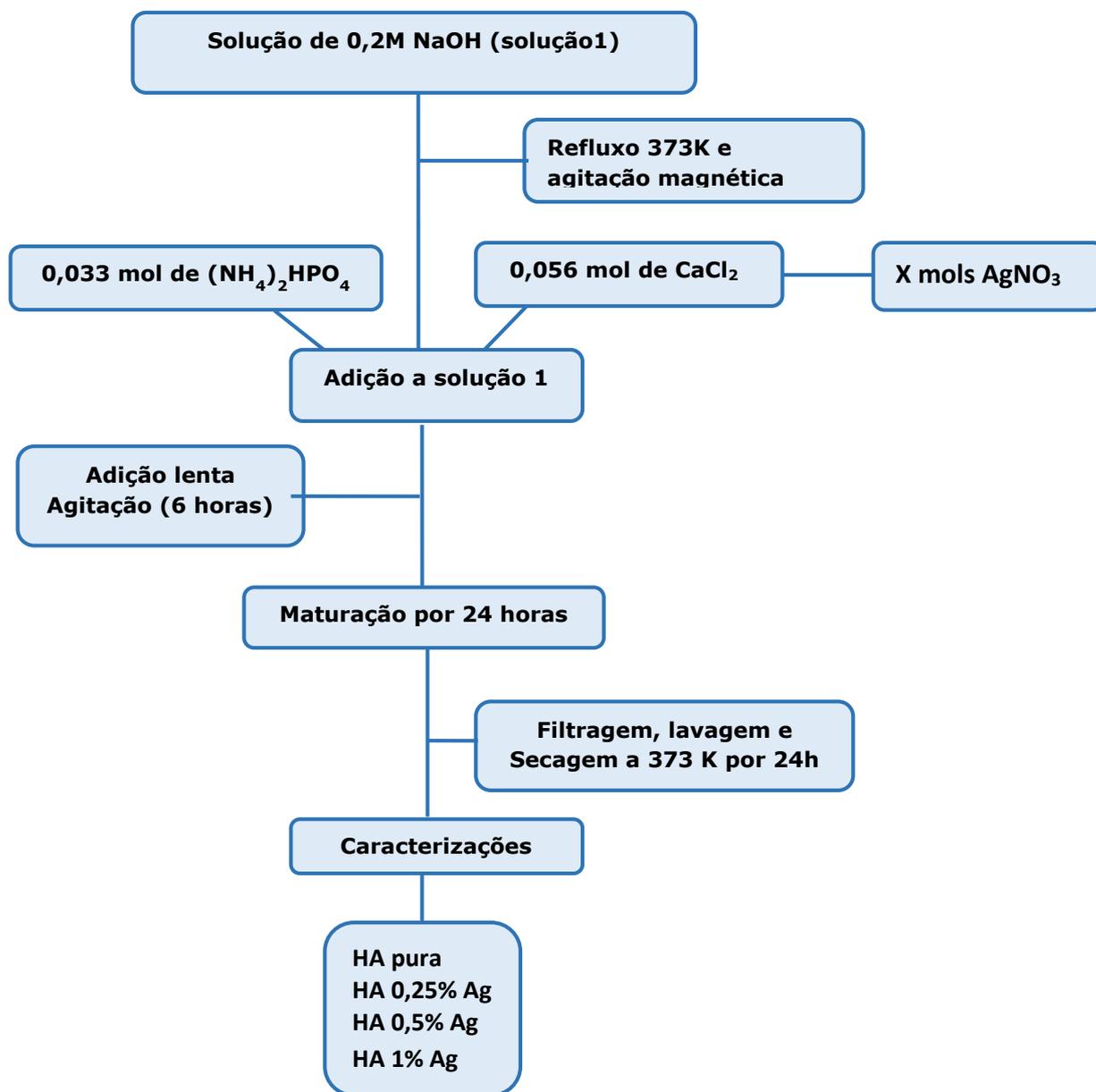
Após a completa adição dessas soluções, o precipitado formado foi envelhecido sob agitação a temperatura $373 \pm 10 \text{ K}$ por 24 h. Em seguida, o sólido obtido foi filtrado e lavado com água deionizada até o teste de cloreto negativo, verificado com uma solução de nitrato de prata (AgNO_3).

Finalmente, o produto HA pura foi seco a 373 ± 10 K em estufa por 24 h. A quantidade final de sólido obtida em cada síntese de cor branca foi de aproximadamente 3,5 gramas.

A síntese da hidroxiapatitas modificadas com prata foi realizada utilizando o mesmo procedimento adotado para a síntese da hidroxiapatita pura, porém com a adição do dopante nitrato de prata (AgNO_3) em quantidades de 0,25, 0,5 e 1% em mol com relação ao cálcio partindo de soluções do nitrato de prata em concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mmol dm^{-3} . O sistema reacional foi protegido da luz pela colocação de papel alumínio em volta do balão de reação. Os sólidos obtidos foram denominados HAXAg (em que $x = 0,25, 0,5$ e 1%). A coloração dos pós teve leve alteração na brancura após adição de prata.

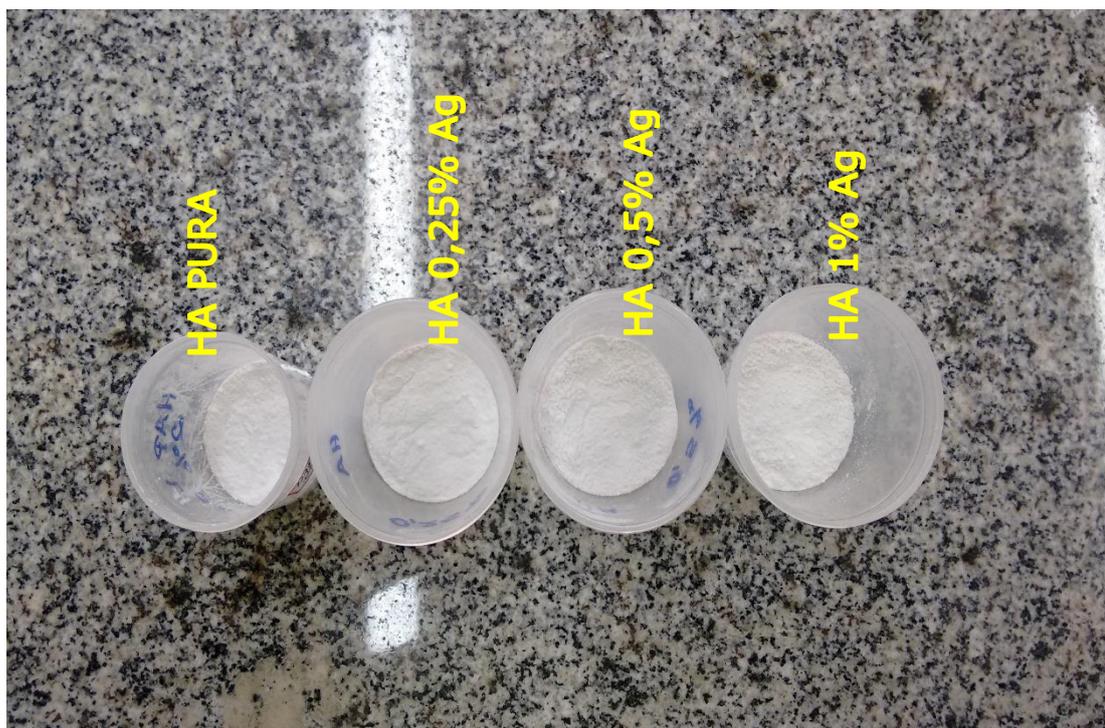
Um fluxograma resumido referente ao método de obtenção das hidroxiapatitas pura e modificadas com prata pelo método de co-precipitação está apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma ilustrativo da obtenção da hidroxiapatita pura e modificadas com prata pelo método de co-precipitação.



Na figura 4 podemos observar as imagens dos sólidos sintetizados pelo método de co-precipitação.

Figura 4- Imagens dos sólidos sintetizados pelo método de co-precipitação.



3.3 Fosfatos de cálcio/prata obtidos por impregnação

O procedimento realizado para se obter as HA modificadas com prata por impregnação foi realizado pelo método em batelada. Nestes ensaios uma amostra de 1 grama do sólido HA pura foi suspensa em 100,0 cm³ de solução aquosa de nitrato de prata (AgNO₃) nas concentrações de 0,25, 0,5 e 0,1 mmol dm⁻³. Em seguida a solução com os sólidos suspensos foram mecanicamente agitadas em incubadora da Tecnnal modelo TE-420, a temperatura ambiente a 130 rpm por 24 h. Os sólidos foram separados por centrifugação, lavados com água deionizada e finalmente secos a 373 ± 10 K em estufa por 24 h. Os sólidos obtidos foram denominados HAIxAg (x = 0,25, 0,5 e 1%), respectivamente.

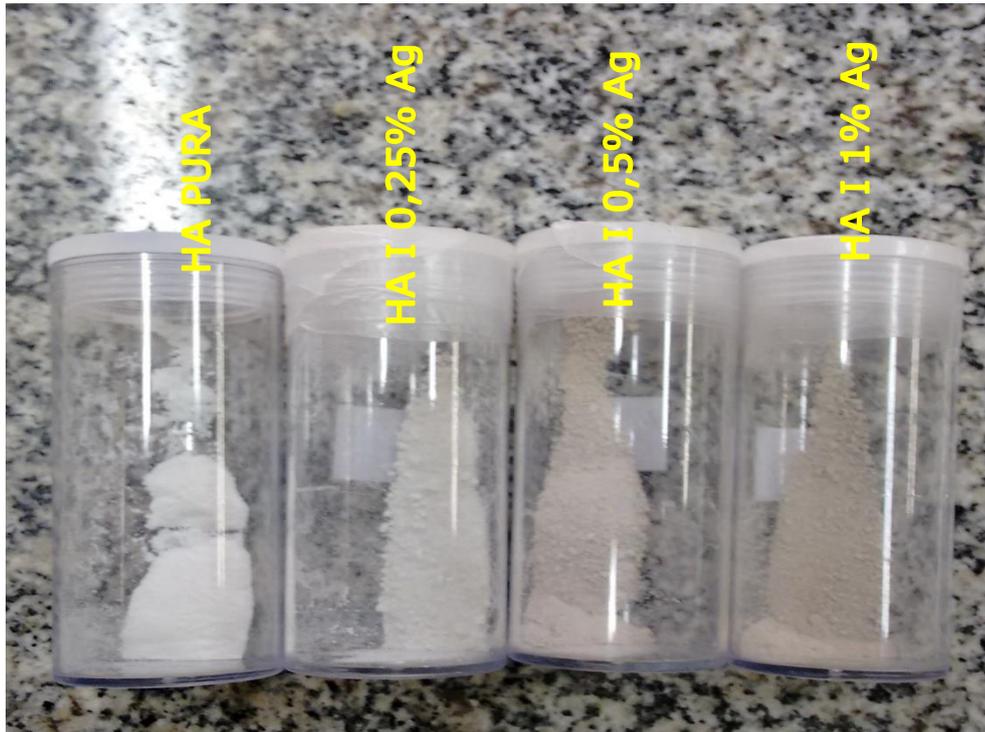
O fluxograma da obtenção das hidroxiapatitas modificadas com prata por impregnação está apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma da obtenção das hidroxiapatitas modificadas com prata por impregnação.



Na figura 6 podemos observar as imagens dos sólidos obtidos por impregnação.

Figura 6 - Imagens dos sólidos obtidos por impregnação.



As amostras foram encaminhadas para análise estrutural pelas de técnicas de difratometria de raios-X, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia Raman, análise térmica por termogravimetria e análise térmica diferencial, análise de morfologia por microscopia eletrônica de varredura. Todas estas caracterizações foram realizadas no Laboratório de Combustíveis e de Materiais da UFPB.

Para avaliação da atividade antimicrobiana as amostras foram analisadas pela técnica do biofilme no Laboratório de Biologia Bucal (LABIAL), no Departamento de Odontologia do CCS, UFPB.

3.4 Avaliações *in vitro* da atividade antibacteriana

3.4.1 Adesão bacteriana

Os testes de adesão bacteriana foram realizados no laboratório de Biologia Bucal (LABIAL), no Departamento de Odontologia/CCS/UFPB, com a coordenação do Professor Dr. Fábio Sampaio.

Para a avaliação da adesão bacteriana nas amostras sintetizadas foram feitas análises quantitativas dos percentuais de bactérias viáveis. Essas contagens visa analisar os percentuais de células vivas contidas em um biofilme bacteriano formado sobre superfície dos corpos de provas. As cepas bacterianas padronizadas utilizadas no ensaio *in vitro* foi a de linhagem *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Foram cultivadas massa bacteriana (em estoque e conservado em glicerol) em BHI-caldo por 24 horas a 35 °C em anaerobiose, posteriormente foram preparadas as soluções de meio cultura BHI-caldo onde às bactérias foram inoculadas e em seguida foram utilizadas para os testes microbiológicos.

Para a realização dos testes microbiológicos foram confeccionadas pastilhas dos sólidos sintetizados onde foram utilizada cerca de 200 mg de amostra previamente seca em estufa e comprimidas com um pistão a 30 kN/mm².

Os testes microbiológicos por adesão bacteriana foram realizados com utilização de placas de 24 poços de funda chato, onde foram adicionados 1,6 mL da solução de BHI caldo e seguida foi adicionado 0,4mL do inóculo bacteriano; nesses poços foram depositados os corpos de prova das hidroxiapatitas pura e modificadas com prata e seguida permaneceu em estufa a uma temperatura 37°C por 24 horas para viabilizar o crescimento bacteriano e a formação do biofilme.

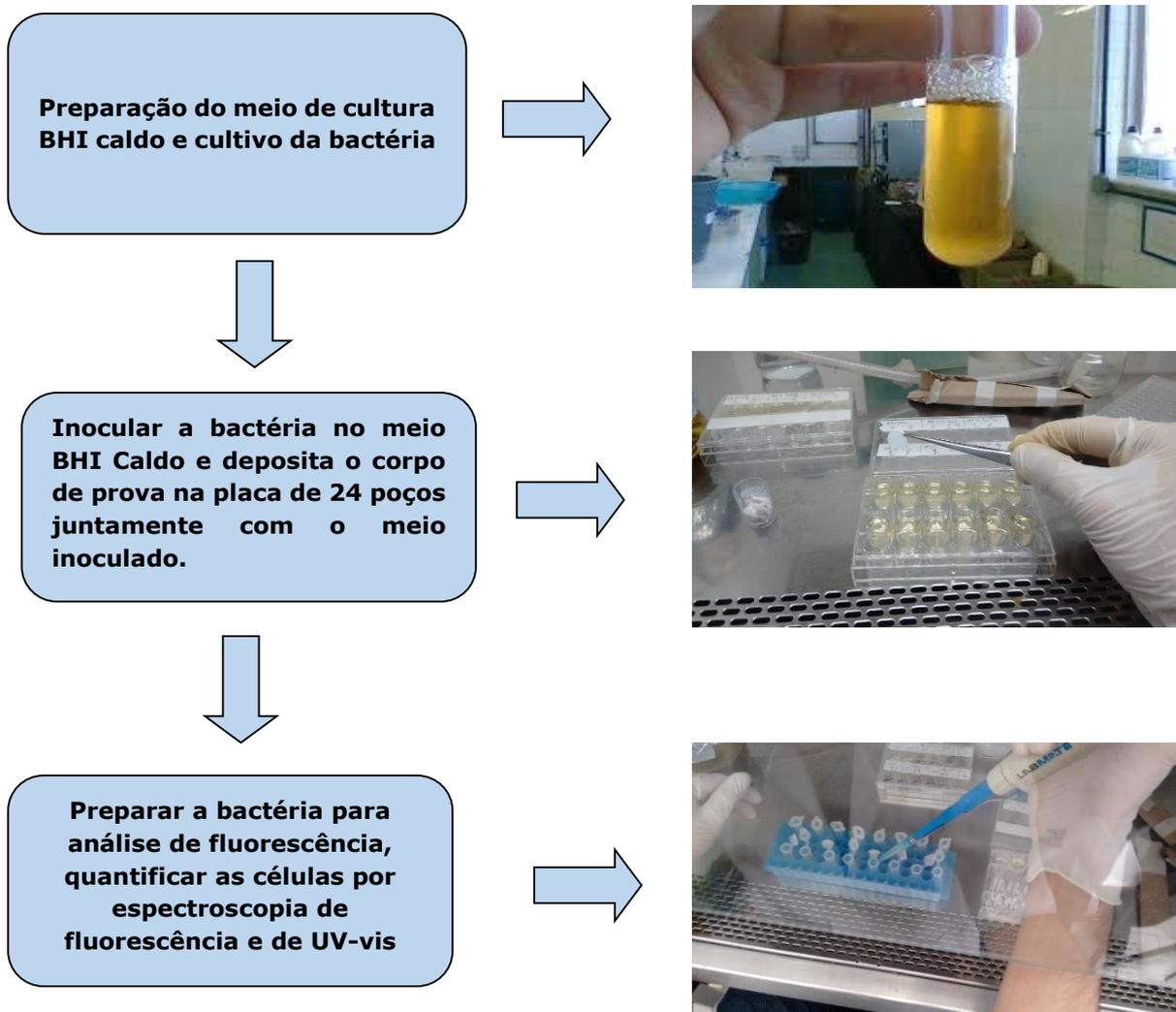
Após 24 horas de incubação, os corpos de provas foram colocados dentro de poços da placas de fundo chato contendo um volume de 2 mL de solução salina a 0,85%, onde a placa foi levada para o sonicador onde passou dois minutos, para que os biofilmes formados se dispensem em

seguida o conteúdo líquido colocados em tubos falcons e homogeneizado em vórtex por dois minutos logo após os tubos foram centrifugados por dez minutos, e os sobrenadantes descartados e 1 mL de solução salina e foram adicionados aos tubos. Os conteúdos foram transferidos para tubos eppendorfs onde os mesmos foram centrifugados (em micro centrífuga) por dez minutos. As soluções bacterianas foram homogeneizadas para serem feitas as leituras em espectrofotômetro de fluorescência usando placas de fundo chato, para determinar a viabilidade bacteriana e espectroscopia de UV-vis para determinar a quantidade exopolissacarídeos.

A determinação e padronização das concentrações das massas bacterianas, foi realizada uma curva de calibração que foi utilizada como referência para as leituras dos poços analisados, fazendo-se uma combinação entre bactérias vivas e mortas, em volumes diferentes. Tomando-se a bactéria viva como referência, a curva Confeccionada com as seguintes concentrações: 0%, 20%, 50%, 80% e 100% de bactérias vivas.

Para cada poço de leitura, seja da curva de calibração ou dos poços contendo o material a ser analisado, Foram acrescentados 30 μ L do reagente com a mistura de SYTO® 9 (componente A) e Iodeto de Propídeo (componente B). Para preparação do reagente, foi utilizado o Kit para Viabilidade Bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ da Invitrogen. Cada componente foi diluído em um tubo tipo falcon contendo 2,5 mL de água deionizada estéril (ultra pura). Em seguida, os dois componentes foram misturados na proporção de 1:1 antes de serem usados. Após cada poço contendo as amostras a serem analisadas tiverem sido expostas a mistura de reagentes na proporção de 1:1, foi necessário cobrir a placa com alumínio para evitar ao máximo qualquer exposição à luz por 10 minutos antes de se fazer a leitura de fluorescência. Todo o experimento de fluorescência foi realizado com o mínimo de luz e em triplicatas. O fluxograma dos testes microbiológicos está demonstrado na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma das avaliações in vitro da atividade antibacteriana.



3.4.2 Contato direto

Outro teste antimicrobiano utilizado foi o contato direto, tendo como resultado a contagem de unidade formadora de colônias (UFC). O meio de crescimento utilizado foi o Ágar Mueller Hinton. A preparação do meio de crescimento deu-se pela proporção de hidratação de 36g do meio por 1000 mL de água destilada. Após hidratar o meio, a solução de Ágar Mueller Hinton foi aquecida até ocorrer toda a dissolução do ágar, em seguida foi levada à autoclave, onde permaneceu na temperatura de 121°C por 15 minutos. Em seguida ocorreu o plaqueamento, partindo-se para o teste de esterilidade, na estufa microbiológica por um intervalo de tempo de 24h.

O teste do contato direto partiu da mistura de 2000µL do inóculo de concentração de 10^{-4} UFC/mL de *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923) e *Escherichia coli* (ATTC 25922) e aproximadamente 2000µg dos materiais analisados (Hidroxiapatita pura e modificadas com prata). Da mistura foi recolhido 200µL que foram espalhados verticalmente, horizontalmente e diagonalmente sobre o meio de crescimento com auxílio da alça de Drigalski. Levou-se a placa para a estufa microbiológica, deixando-a em repouso por 24h, onde em seguida se fez a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). O teste foi feito em triplicata para cada um dos diferentes materiais. O Controle positivo de crescimento bacteriano (solução salina) foi preparado para fazer as comparações com os testes e verificar a viabilidade das cepas. Os testes foram realizados segundo metodologia de Zheng e Zhu (2003).

Os testes microbiológicos por contato direto foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV)-UFPI com a coordenação do professor Edson Cavalcanti da Silva Filho.

3.5 Técnicas de caracterização

3.5.1 Difractometria de raios X (DRX)

A técnica de difratometria de Raios-X foi utilizada com o objetivo de avaliar a cristalinidade e organização a longo alcance das amostras. As medidas foram realizadas em um difratômetro de raios X modelo XRD-6000, da SHIMADZU operando a potência de 2 kVA, voltagem de 30 kV e corrente de 30 mA. Foram feitas varreduras no intervalo de 2θ entre 5 e 60° , com um passo de $0,02^\circ$ e velocidade de 2° min^{-1} , utilizando como fonte de radiação CuK_α $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$.

Para os cálculos dos parâmetros de rede da célula unitária das amostras sintetizadas foi utilizado o programa *redef* onde os planos de difração foram indexados de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS 09-0432 e calculados para os planos: (002), (102), (210), (211), (300), (202). Os valores de largura a meia altura (FWHM) foram obtidos utilizando gaussianas das reflexões dos difratogramas de raios X em que a reflexão utilizada foi a referente ao plano (002). Os tamanhos dos cristalitos foram calculados empregando a equação 1, de Scherrer e o volume da célula unitária hexagonal foi determinado a partir equação 2.

$$D = \frac{0,9 \lambda}{\beta \cos \theta} \quad \beta^2 = B^2 - b^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

D = tamanho de cristalitos

λ = comprimento de onda da radiação eletromagnética aplicada

θ = ângulo de difração de Bragg

β = valor da FWHM do pico mais intenso

B = FWHM da amostra

b = FWHM do quartzo (padrão- SiO₂)

Fórmula do volume da célula unitária hexagonal:

$$V = \frac{\sqrt{3}.a^2.c}{2} = 0,866.a^2.c \quad (\text{eq. 2})$$

Em que:

V = volume da célula (Å³)

a e c são os parâmetros de rede em (Å)

3.5.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi utilizada com o objetivo de observar a organização a curto alcance dos materiais sintetizados, de acordo com ligações químicas presentes e estruturas ou fases cristalinas formadas. Os sólidos foram analisados em um equipamento IR PRESTIGE – 21, da marca SHIMADZU. A técnica utilizada foi o de pastilha de KBr, mantendo a proporção de 1:100 mg de KBr. Os espectros foram obtidos no modo transmitância entre 4000-400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 30 acumulações.

3.5.3 Espectroscopia Raman

A espectroscopia de Raman foi utilizada de forma complementar à espectroscopia de infravermelho visando avaliar a ordem à curto alcance. As medidas foram realizadas com um microscópio Renishaw Raman equipado com inVia um diodo de laser de estado sólido operando a 5 minutos tempos de exposição detector. Os sinais de Backscattered Raman foram coletados com um detector CCD refrigerado Peltier- usando um laser de potência a 10% para evitar a transformação de fase.

3.5.4 Espectroscopia de fluorescência

A técnica da fluorescência foi utilizada visando determinar a presença de bactérias vivas e mortas, de modo a fornecer mais um parâmetro para a confirmação da atividade antimicrobiana dos materiais testados. O equipamento utilizado foi o FLUO STAR DA OPTIMA da marca BMG LABTECH.

A técnica funciona por meio da exposição das amostras testadas em meio líquido, a uma combinação de dois corantes (SYTO 9 e iodeto de propídio) que permitem identificar células com membrana celular danificada. Os corantes diferem tanto em suas características espectrais quanto em sua capacidade para penetrar as células saudáveis bacterianas.

Quando usados isoladamente, o SYTO 9 (verde) cora geralmente todas as bactérias numa população, tanto aquelas com membranas intactas quanto aquelas com membranas danificadas. No entanto, o iodeto de propídio (vermelho) penetra apenas nas bactérias com membranas danificadas, causando uma redução na fluorescência do corante SYTO 9 quando os dois corantes estão presentes na amostra. A excitação/emissão máximas para estes corantes ocorrem em cerca de 480/500 nm para SYTO 9 e 490/635 nm para o iodeto de propídio.

3.5.5 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada visando acompanhar a morfologia das partículas formadas antes e após a introdução de íons de prata. As imagens foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura por detecção de elétrons secundários em um microscópio LEO-300, onde os sólidos foram recobertos com uma fina camada de ouro e carbono por metalização em um instrumento da Plasma Science, a espessura da metalização foi 24 nanômetros. As análises foram realizadas no modo de elétrons retroespalhados (Backscattering Electrons – BSE).

Capítulo

4

Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

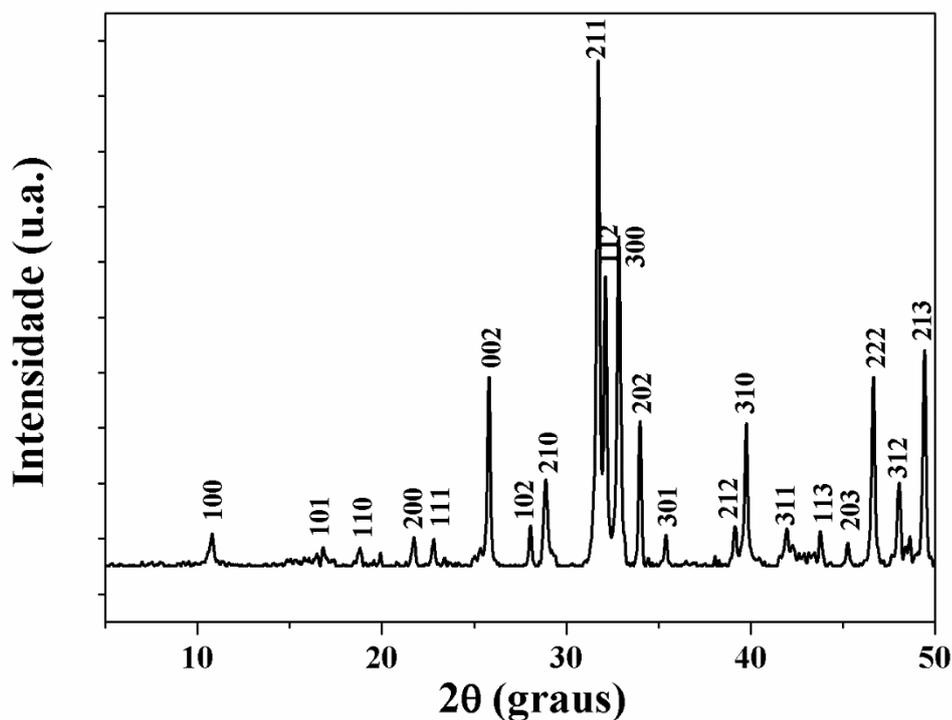
No presente trabalho foram sintetizadas pelos métodos de co-precipitação e por impregnação, as hidroxiapatitas modificadas com prata, empregando-se como dopante o nitrato de prata (AgNO_3) em quantidades de 0,25, 0,5 e 1% em mol com relação ao cálcio, partindo de soluções do nitrato de prata em concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 mmol dm^{-3} . Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussões desta pesquisa, a qual foi dividida em duas partes: caracterizações dos sólidos sintetizados e as avaliações in vitro da atividade antibacteriana das amostras.

4.1 Caracterizações dos sólidos sintetizados

4.1.1 Difractometria de raios X (DRX)

O difratograma de raios X da hidroxiapatita pura sintetizada pelo método de co-precipitação está apresentado na Figura 8, onde os planos foram indexados de acordo com carta cristalográfica JCPDS 09-0432. De acordo com dados obtidos podemos observar a formação de hidroxiapatita de estrutura bem definida e com boa cristalinidade. Foram realizadas buscas no programa Crystallographica Search-Match, no intuito de identificar outras fases interferentes, mas nenhuma outra fase foi encontrada. Isto sugere que a metodologia de síntese se mostrou adequada.

Figura 8 - Difratoograma de raios X da hidroxiapatita pura.



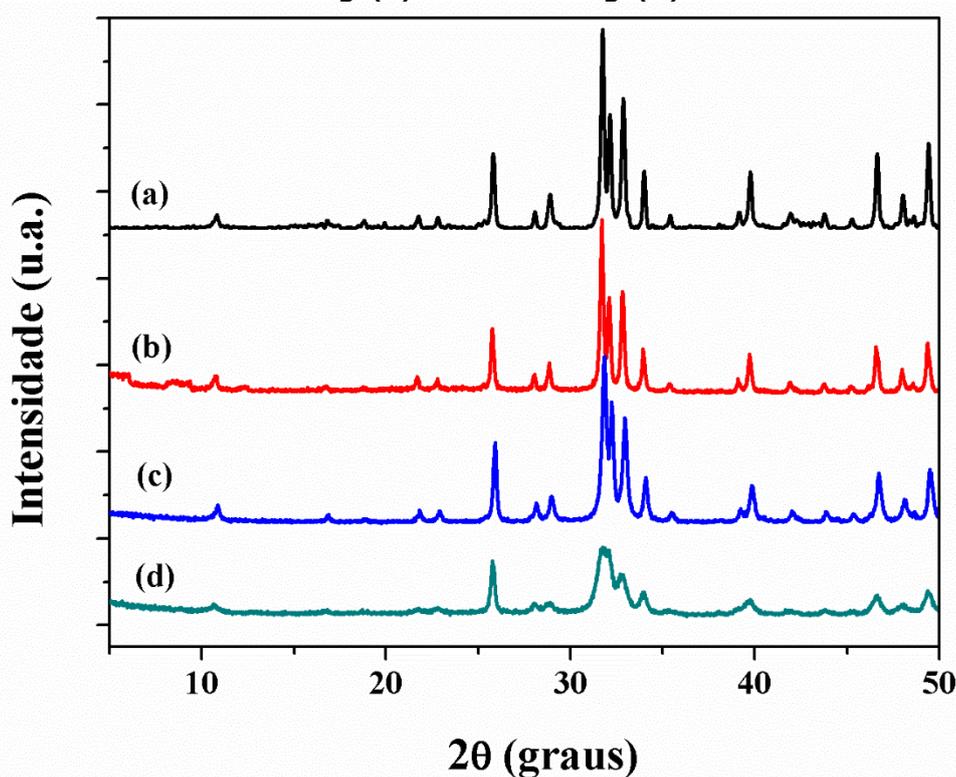
Na Figura 9 está representando os difratogramas das hidroxiapatitas modificadas com o dopante nitrato de prata pelo método de co-precipitação.

Pelo difratogramas de Raios X na Figura 9 foram observados que todos os sólidos sintetizados e analisados pela técnica de DRX apresentaram a fase referente hidroxiapatita, com base na literatura (ELLIOTT, 1994) e com comparação da carta cristalográfica JCPDS 09-0432. Além do auxílio das cartas cristalográficas foram realizadas buscas com o auxílio do programa Crystallographica Search-Match que comprovaram a presença de apenas uma fase nas amostras modificadas com o dopante prata.

Além disso podemos observar nos difratogramas com aumento da dopagem com íons de prata acontece os alargamentos das reflexões indicando que existe modificações na estrutura da rede cristalina da hidroxiapatita a tornando mais amorfa (BAI *et al.*, 2010). Isso acontece devido que os íons cálcios possuem raios iônicos hexacoordenados de 100 pm enquanto os íons de prata (Ag^+) com mesma coordenação possuem raios de 115 pm, essa substituição é mais facilitada em virtude que as

apatitas aceitam melhor a inclusão de íons com raios maiores no sitio do cálcio (LEGEROS *et al.*, 1984).

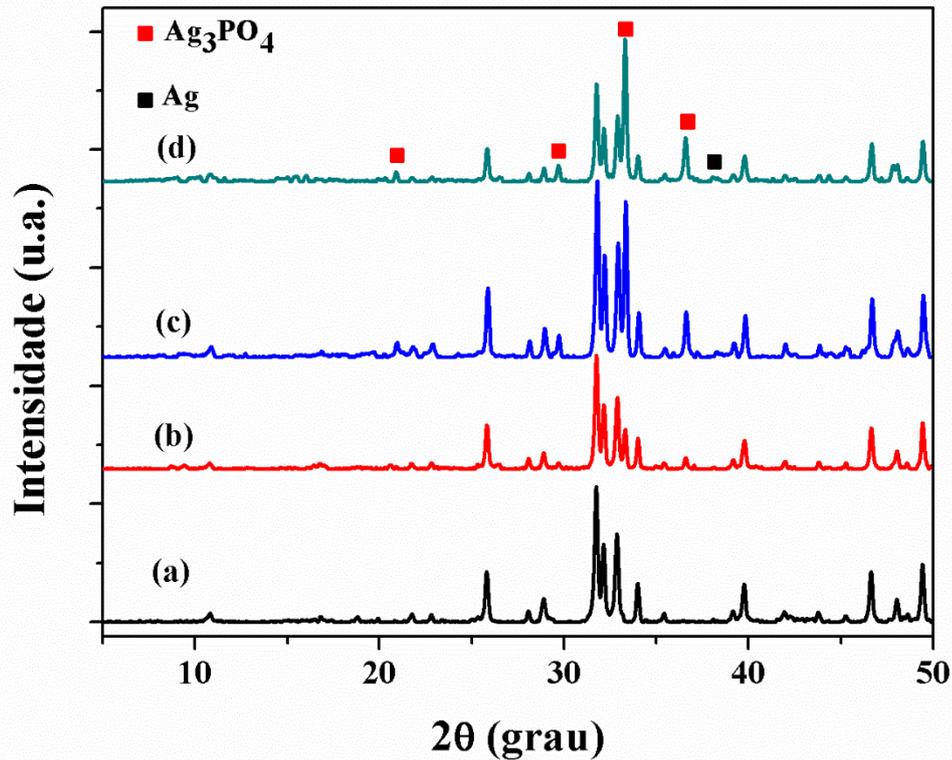
Figura 9 - Difractogramas de raios X das amostras sintetizadas pelo método de co-precipitação para HA puro (a), HA 0,25% Ag (b), HA 0,5% Ag (c) e HA 1% Ag (d).



Para as hidroxiapatitas modificadas com o dopante nitrato de prata por impregnação, os difratogramas são apresentados na Figura 10. Os dados mostram que além das reflexões referentes a hidroxiapatita de acordo com a carta cristalográfica, também foram identificadas reflexões de duas outras fases; uma referente a prata metálica com reflexão em 2θ aproximadamente $38,1^\circ$ que corresponde a reflexão do plano indexado (111) quando comparada a carta cristalográfica JCPDS 04-0783 e a outra referente ao fosfato de prata (Ag_3PO_4), tendo como reflexões os valores de 2θ aproximadamente de $20,9^\circ$, $29,7^\circ$, $33,3^\circ$ e $36,6^\circ$ as quais correspondem à reflexões nos planos (110), (200), (210) e (211) respectivamente e conformidade com a carta cristalográfica JCPDS 01-070-0702. Para o caso da hidroxiapatita modificada com prata por impregnação percebemos que

os alargamentos das reflexões não foram tão acentuados como a síntese realizada pelo método de co-precipitação.

Figura 10 - Difrátogramas de raios X das amostras sintetizadas por impregnação em que HA puro (a), HA I 0,25% Ag (b), HA I 0,5% Ag (c) e HA I 1% Ag (d).



Os valores obtidos dos parâmetros de rede e dos volumes da célula unitárias (Tabela 6) indicaram pequenas variações nos valores, em que tais variações não alteraram as reflexões referente a fase da hidroxiapatita sintetizadas em comparação com hidroxiapatita padrão (JCPDS 09-0432).

Tabela 6 – Valores dos parâmetros de redes e de volumes das amostras de hidroxiapatitas pura e dopadas com prata.

Sistemas	Parâmetros de rede (Hexagonal)		Vol. de célula unitária
	a (Å)	c(Å)	V (Å ³)
Hidroxiapatita-padrão	9,41	6,88	528
HA pura	9,45	6,87	533
HA 0, 25% Ag	9,47	7,07	549
HA 0,5% Ag	9,50	6,83	533
HA 1% Ag	9,40	6,87	526
HA I 0,25% Ag	9,40	6,87	526
HA I 0,5% Ag	9,40	6,87	526
HA I 1% Ag	9,40	6,87	526

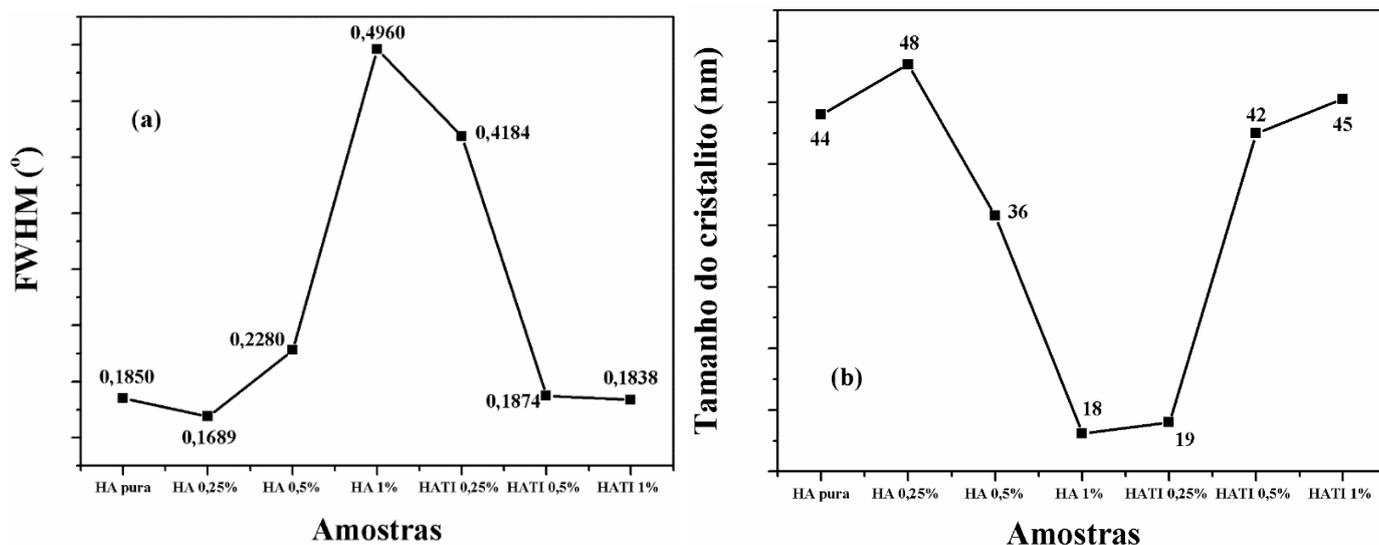
Na Tabela 7 estão os dados referentes ao tamanho de cristalito em relação ao a largura a meia altura (FWHM) dos sólidos sintetizados.

De acordo os resultados, as cristalinidades dos materiais sintetizados mostraram que as dopagens das hidroxiapatitas com prata, sejam elas pelo método de co-precipitação ou por impregnação influenciam nas propriedades dos fosfatos de cálcio. No caso da síntese pelo método de co-precipitação podemos observar que o tamanho do cristalito tem uma relação inversamente proporcional com a dopagem da hidroxiapatita de prata, enquanto que por impregnação a relação foi diretamente proporcional. Algumas dessas propriedades que podemos citar seriam os parâmetros de rede, tamanhos e forma do cristalito, tensão cristalina e cristalinidade do material. (AOKI, 1999).

Tabela 7 – Relação entre área larga a meia altura e o tamanho de cristalito das amostras sintetizadas.

Sólido	FWHM	Tamanho de cristalito (nm)
HA pura	0,1850	44
HA 0,25% Ag	0,1689	48
HA 0,5% Ag	0,2280	36
HA 1% Ag	0,4960	18
HA I 0,25% Ag	0,4184	19
HA I 0,5% Ag	0,1874	42
HA I 1% Ag	0,1838	45

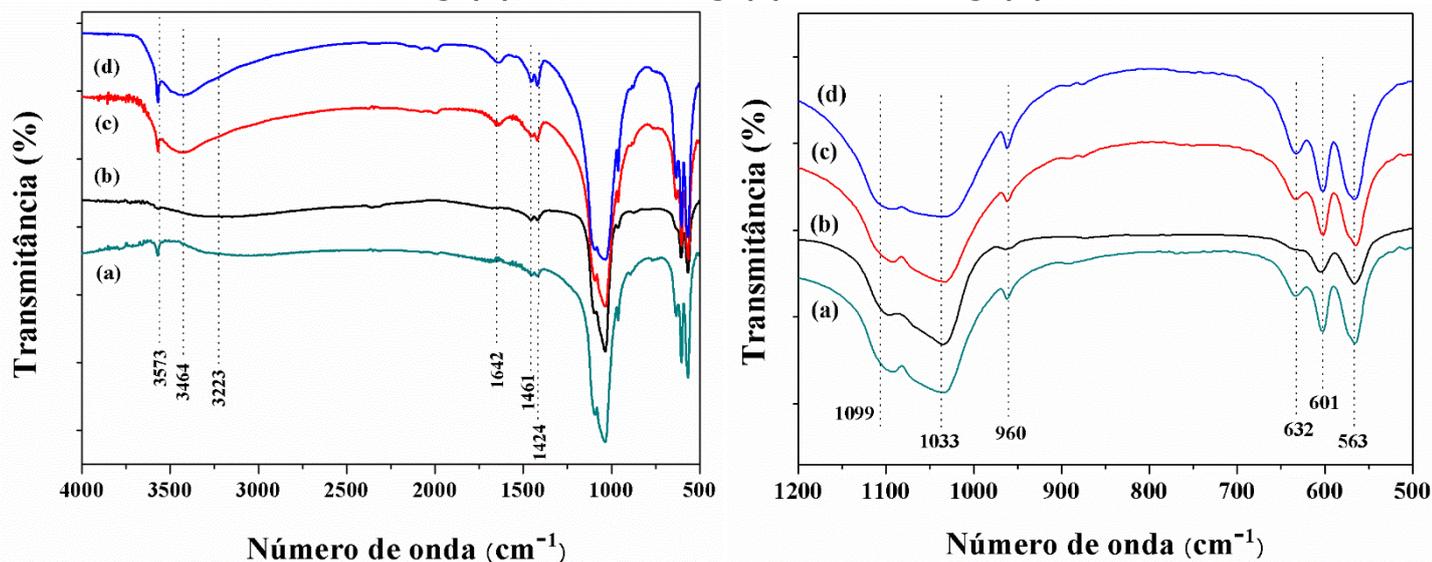
Figura 11 - Valores de FWHM (a) e tamanho médio de cristalitos (b) das amostras sintetizadas.



4.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho dos sólidos sintetizados pelo método de co-precipitação e sintetizadas por impregnação são mostrados na Figura 12.

Figura 12 – Espectros na região do infravermelho dos sólidos sintetizados pelos métodos de co-precipitação e por impregnação em que HA pura (a), 0,25% de Ag (b), 0,5% de Ag (c) e 1% de Ag (d) a 298 K.



Nos espectros se observam a presença das bandas absorção de deformação assimétrica do grupo PO_4^{3-} entre 1099 e 960 cm^{-1} , e que ainda contém uma associação ao estiramento P-OH em HPO_4^{2-} . As bandas em 601 cm^{-1} e 563 cm^{-1} foram atribuídas à deformação assimétrica do P-O do grupo PO_4^{3-} e à deformação assimétrica da ligação P-O(H) do grupo HPO_4^{2-} , respectivamente. A absorção em torno de 3573 cm^{-1} é referente às vibrações de grupos OH contida na estrutura da hidroxiapatitas, a banda de deformação está presente na faixa de 632 cm^{-1} , banda deformação da ligação O-H de H_2O adsorvida com 1642 cm^{-1} (ELLIOTT, 1994).

As bandas 1461 e 1424 cm^{-1} corresponderam à incorporação do grupo CO_3^{2-} na estrutura da hidroxiapatita devido à síntese por co-precipitação ocorre sem controle de atmosfera (BOANINIA et al., 2010).

Os valores das bandas vibracionais dos sólidos obtidos por impregnação não sofreram mudanças significativas em relação a síntese realizada pelo método de co-precipitação.

Na Tabela 8 está um resumo das principais absorções observadas nos espectros de infravermelho para as hidroxiapatitas sintetizadas e as suas atribuições.

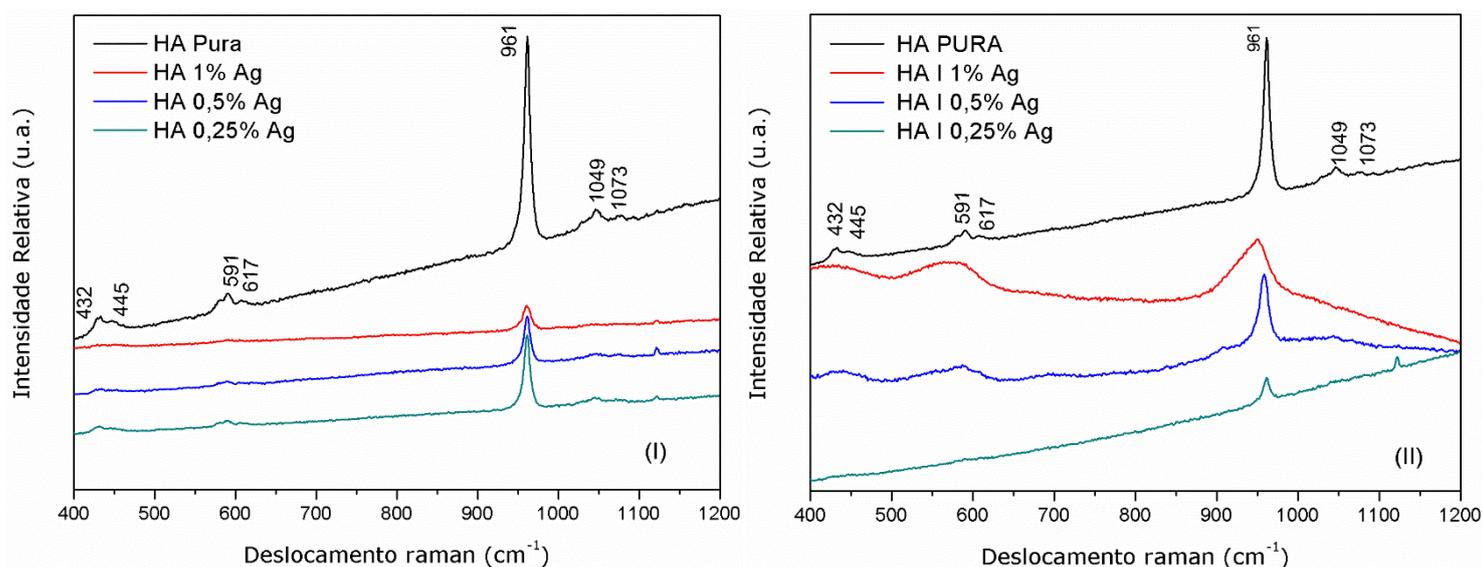
Tabela 8 – Principais absorções na região do infravermelho para as amostras sintetizadas.

Região de Absorção (cm ⁻¹)	Atribuições
3464-3223	ν O-H de H ₂ O adsorvida e O-H de grupo OH
3573	Banda vibracional O-H referente a apatita
1642	δ O-H de H ₂ O adsorvida
1655-1424	Bandas vibracionais do grupo CO ₃ ²⁻
1099-960	ν P-O do grupo PO ₄ ³⁻
632	δ O-H de grupo OH
601	δ P-O do grupo PO ₄ ³⁻
563	δ P-O(H) do grupo HPO ₄ ²⁻

4.1.3 Espectroscopia Raman

Os espectros de Raman dos sólidos sintetizados pelo método de co-precipitação (I) e sintetizadas por impregnação (II), são mostrados na Figura 13.

Figura 13 – Espectroscopia Raman dos sólidos sintetizados.



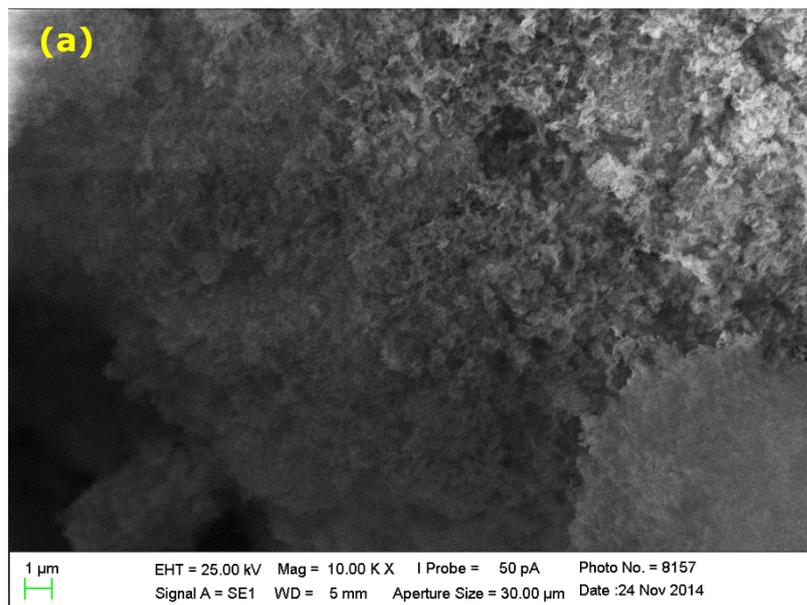
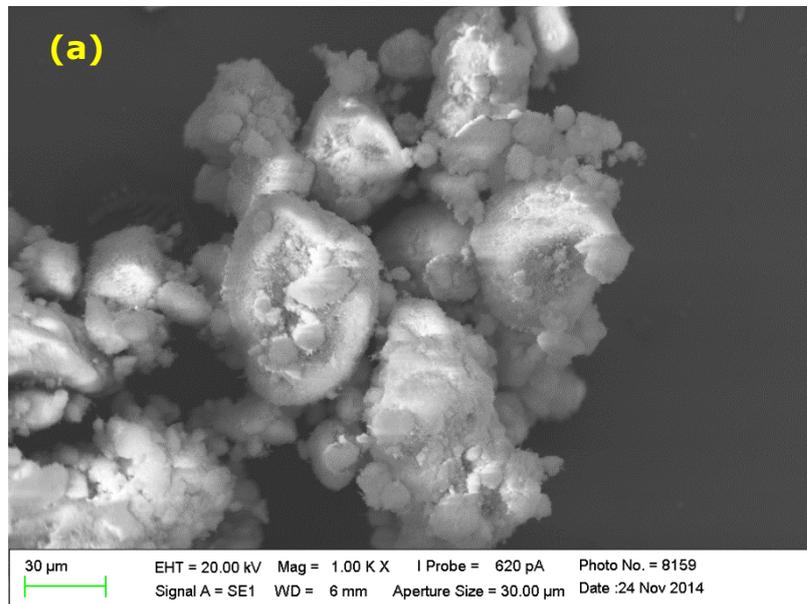
As informações complementares obtidas a partir da técnica de Raman mostram modos de estiramentos simétrico da ligação P-O na ligação no grupo tetraédrico do PO_4^{3-} com frequência ν_1 de 961 cm^{-1} . As bandas vibracionais referentes a 432 cm^{-1} (ν_2) e 445 cm^{-1} (ν_2) são atribuídas aos modos de flexão da ligação O-P-O. As bandas atribuídas a frequência (ν_3) de valores 1049 e 1073 cm^{-1} são referentes ao estiramento assimétrico da ligação P-O. Já a frequência (ν_4) que são referentes a 591 e 617 cm^{-1} refere-se a característica da flexão da ligação O-P-O (CIOBANU *et al.*, 2013).

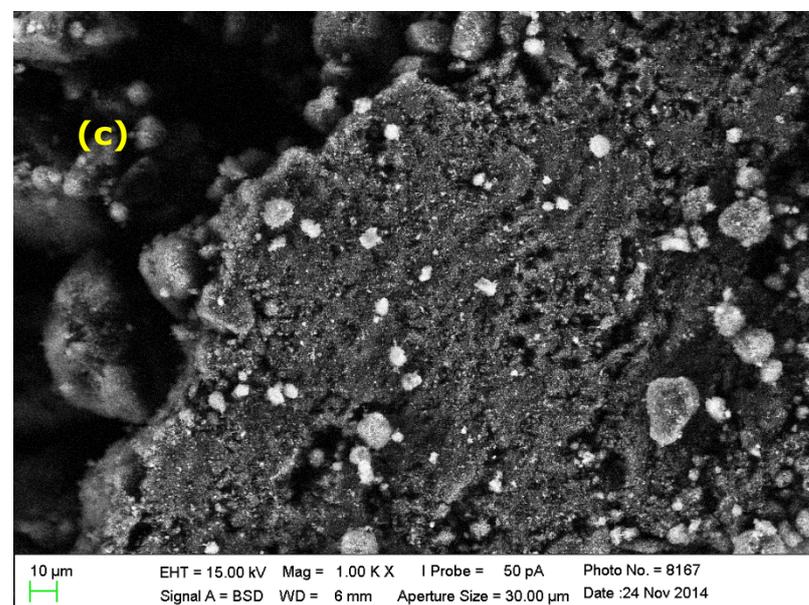
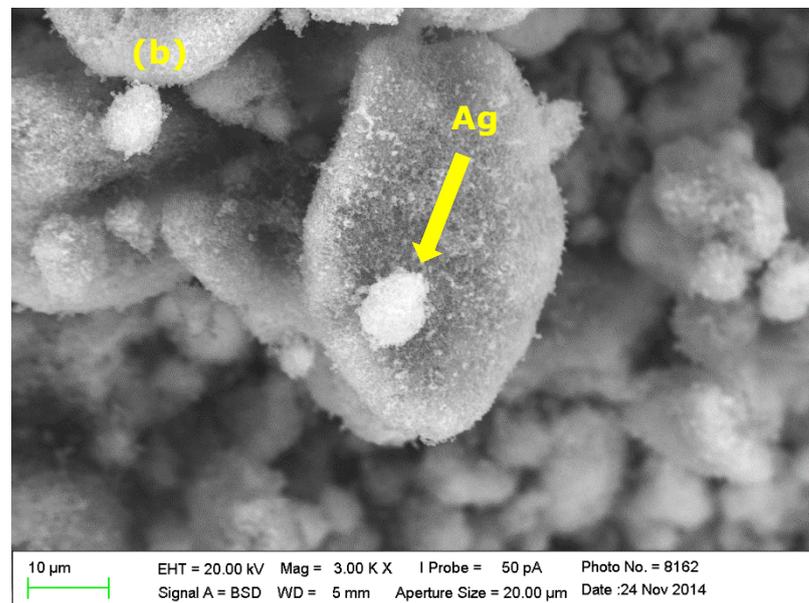
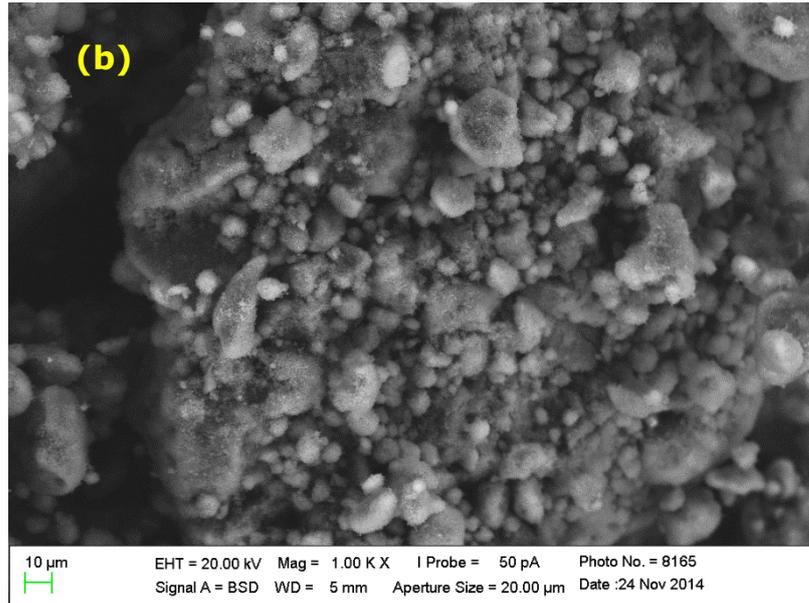
4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias dos sólidos sintetizados (Figuras 14 e 15) mostraram que os pós analisados possuem diferentes formas e com variados tamanhos de cristais. Nas imagens observa-se a presença da prata metálica para as hidroxiapatitas modificadas com prata pelo método de co-precipitação, que aparecem em tom esbranquiçado. Já nas amostras impregnadas com solução de nitrato de prata encontramos partículas esbranquiçadas referentes ao fosfato de prata e o número de partículas aumentam naquelas que possuem maiores percentuais de dopagem.

Para as amostras sintetizadas pelo método de co-precipitação as partículas encontradas nas imagens foram em menor quantidades, possuindo tamanhos de partículas variadas, quando comparadas as sintetizadas por impregnação, em alguns casos as imagens apresentam aglomerações das partículas de prata para as amostras sintetizadas pelo método de co-precipitação e também foram observadas essas aglomerações de fosfato de prata nas amostras impregnadas por nitrato de prata.

Figura 14 - Micrografias dos sólidos HA pura (a), HA 0,25% Ag (b), HA 0,5% Ag e HA 1% Ag (d). Com diferentes ampliações.





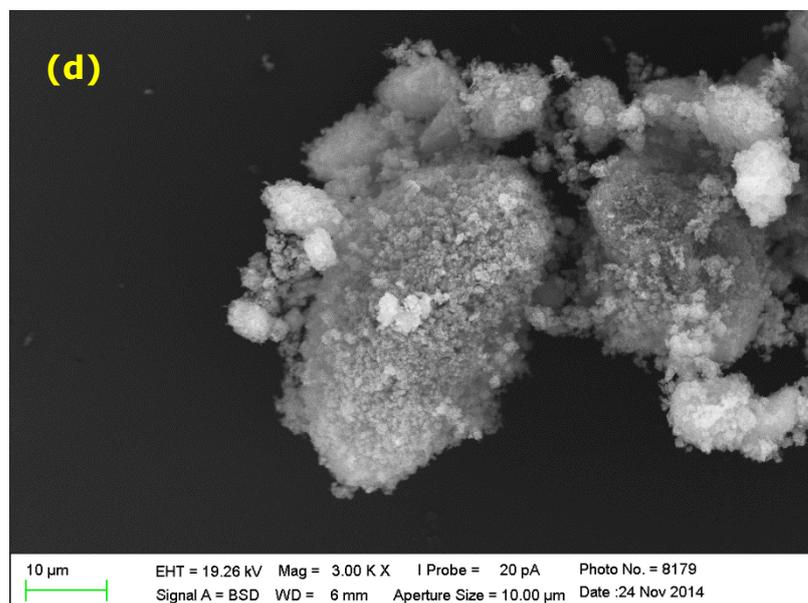
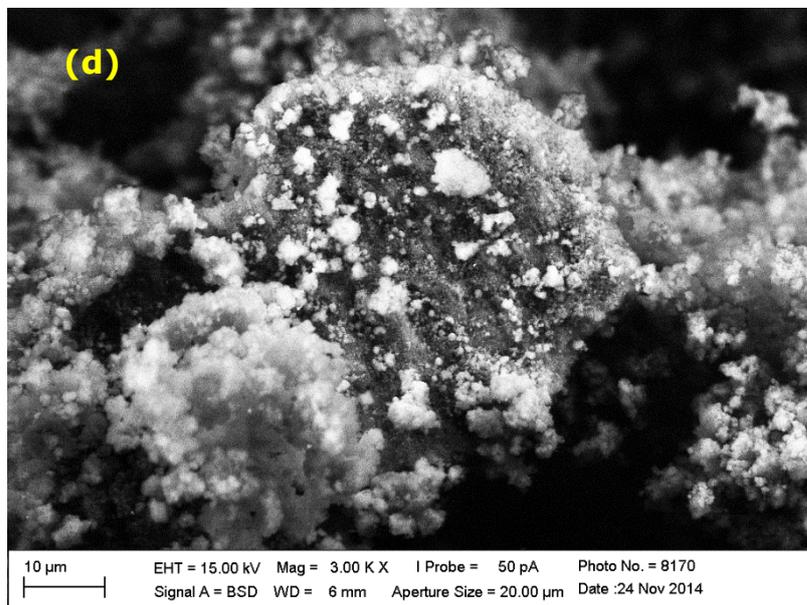
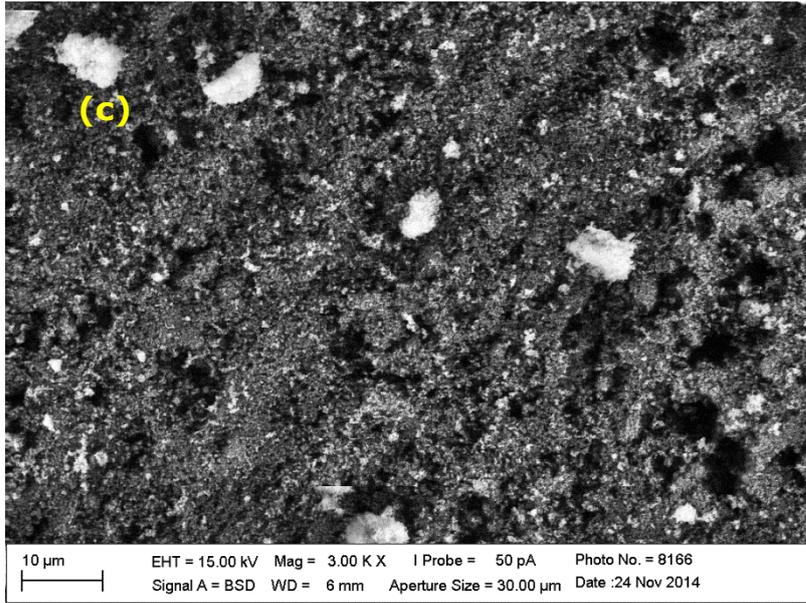
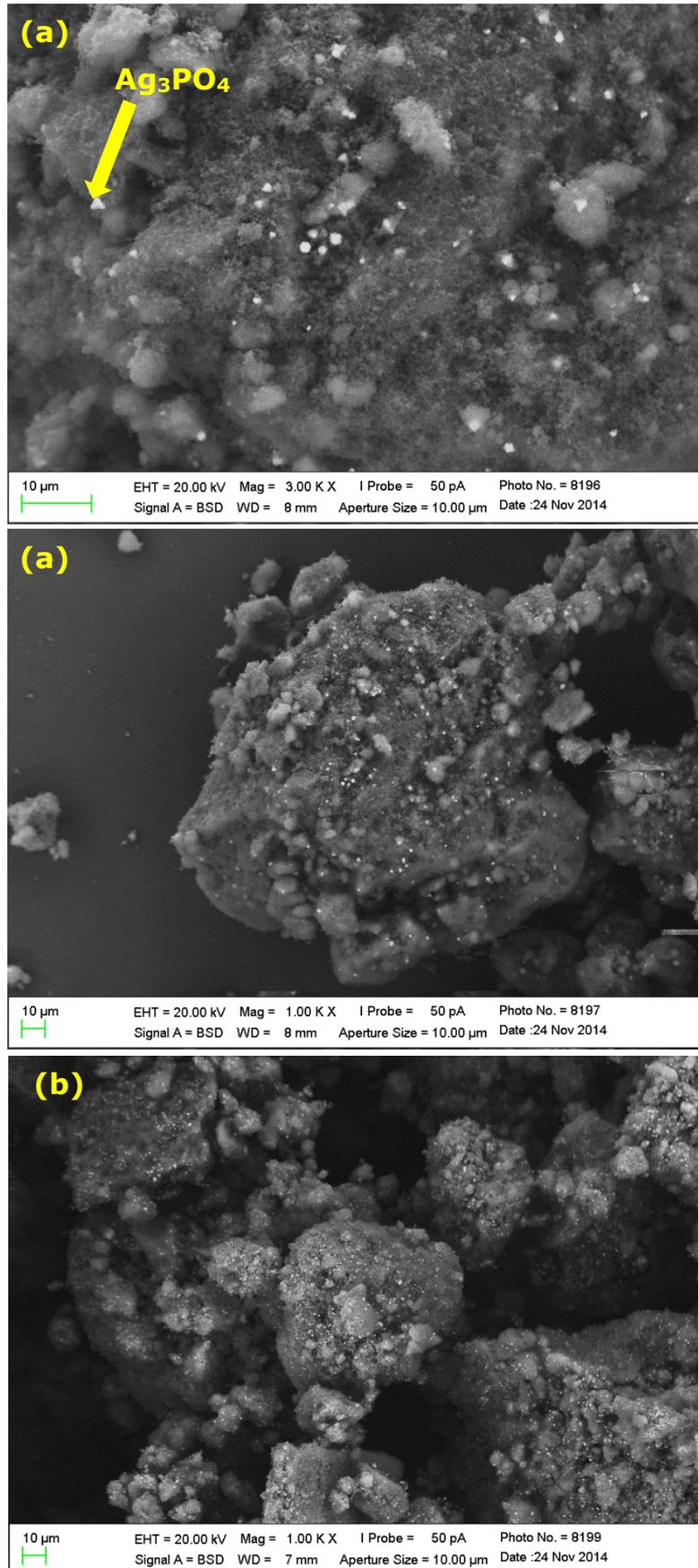
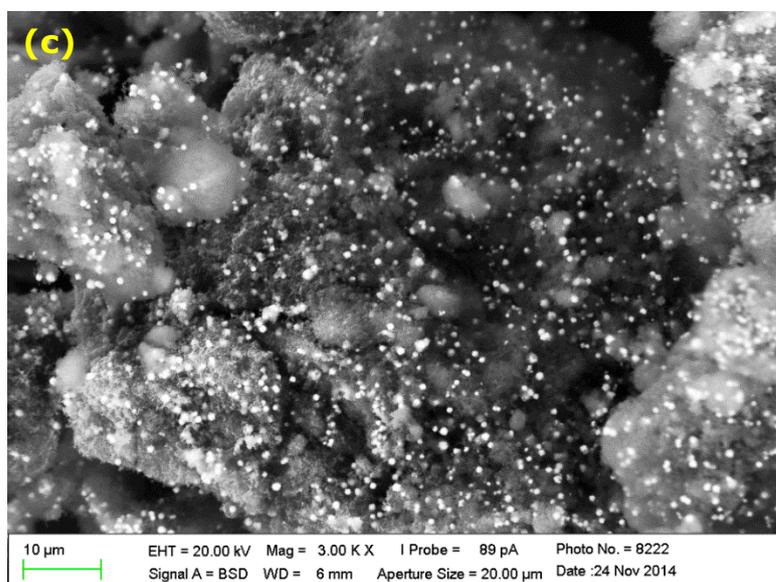
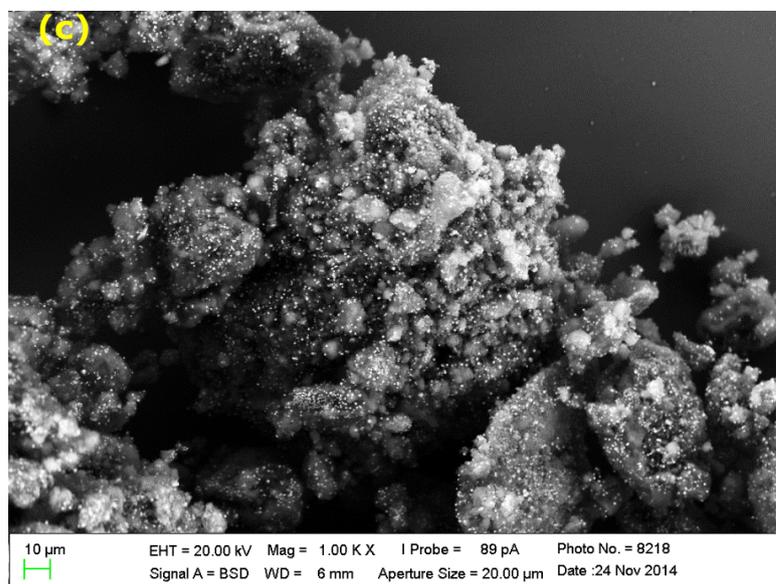
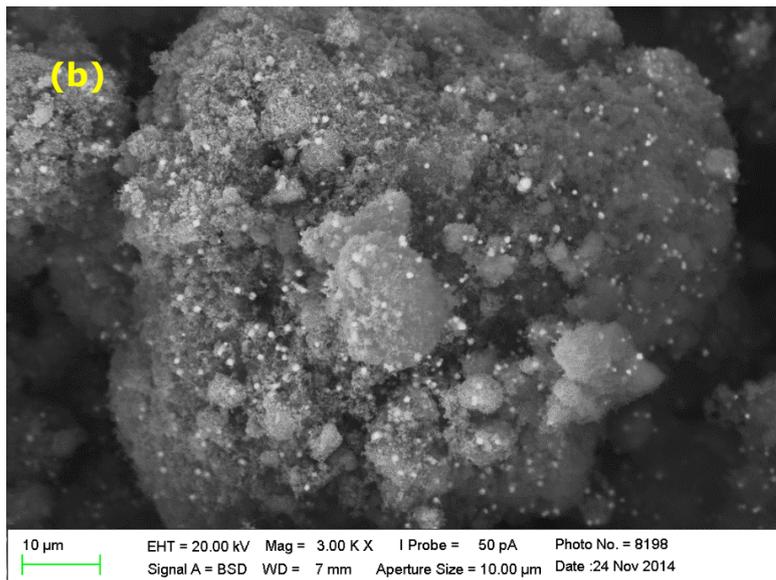


Figura 15 - Micrografias dos sólidos HA I 0,25% Ag (a), HA I 0,5% Ag (b) e HA I 1% Ag (c). Com diferentes ampliações.





4.1.5 Avaliações *in vitro* da atividade antibacteriana

4.1.5.1 Adesão bacteriana

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados dos testes da adesão bacteriana. Estes testes mostraram que o biofilme formado sobre o corpo de prova da hidroxiapatita pura (HA pura) obteve o percentual médio de 83% de células viáveis (vivas), o que era esperado por se tratar de uma amostra em que não foi incorporado nenhum agente antimicrobiano.

Tabela 9 - Percentuais de células viáveis nos testes de adesão bacteriana.

Experimentos	Percentual de massa bacteriana (%)
HA pura	83
HA 0,5% Ag	0
HA 1% Ag	45
HA I 0,25% Ag	3
HA I 0,5% Ag	0
HA I 1% Ag	0

Para as amostras de hidroxiapatitas modificadas por impregnação a inibição da atividade antimicrobiana foram muito altas chegando a 100% (ou seja 0% de células viáveis). Observa-se que os resultados foram praticamente independentes do teor de prata impregnado. Outro aspecto a ser considerado nas amostras obtidas por impregnação refere-se ao tamanho de partículas, tendo em vista que a literatura aponta que um dos fatores fundamentais que alteram na atividade bactericida é o tamanho das partículas e sua forma (DIZAJ, *et al.*, 2014). Conforme as imagens de microscopia eletrônica de varredura discutidas anteriormente, as amostras obtidas por impregnação possuem partículas menores e em maior quantidade.

As amostras obtidas pelo método de co-precipitação (síntese *in situ*) mostraram bons resultados de atividade antimicrobiana, porém quando

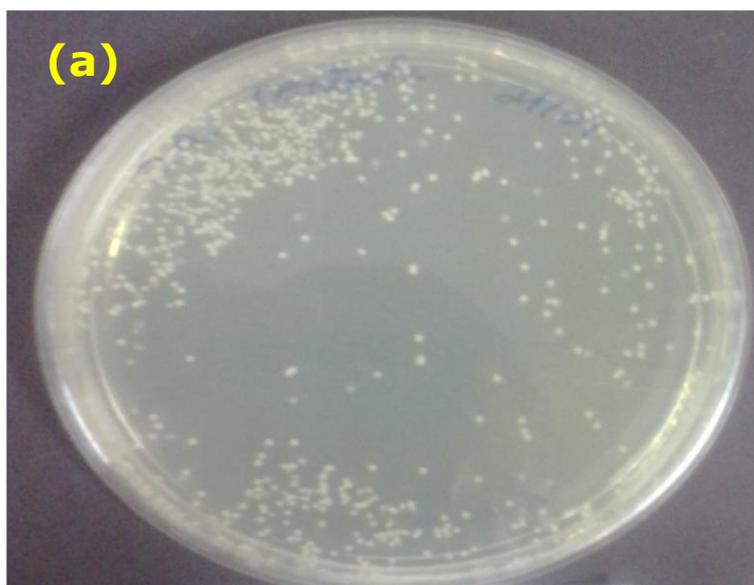
comparada a hidroxiapatita impregnadas seus valores de inibição foram bastantes inferiores. Este fato foi associado à ocorrência de aglomerações das partículas de prata verificadas nas micrografias dos sólidos, que interferem na atividade antimicrobiana da prata nas cepas bacterianas.

Os corpos de prova das amostras HA 0,25% Ag, foram submetidas a mesma metodologia, mas não puderam ser realizadas as leituras no espectrômetro de fluorescência, devido que a formação do biofilme nos corpos de prova foi comprometida, sendo assim foi inviável a técnica de adesão bacteriana. Logo faz-se necessário submeter-se essas amostras para novos testes antimicrobianos in vitro com a metodologia de contato direto para determinar sua ação antimicrobiana.

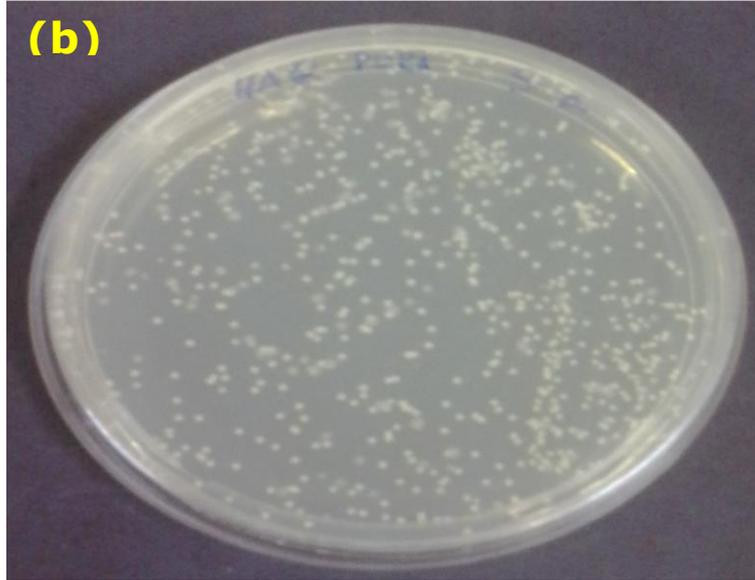
4.1.5.2 Contato direto

As figuras 16 e 17 mostram os ensaios de cultura de bactérias pelo método de contato direto utilizando as bactérias Gram positivas *S. aureus* e Gram negativas *E. coli* respectivamente.

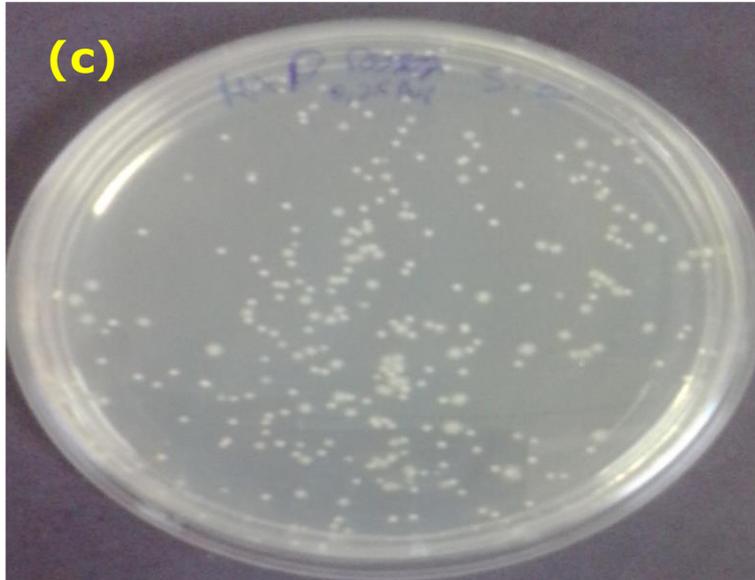
Figura 16 - Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de *S. aureus* formadas após contato direto bacteriana com o controle (a) e as amostras HA pura (b), HA 0,25% Ag (c), HA 0,5% Ag (d), HA 1% Ag (e), HA I 0,25% Ag (f), HA I 0,5% Ag (g) e HA I 1% Ag (h).



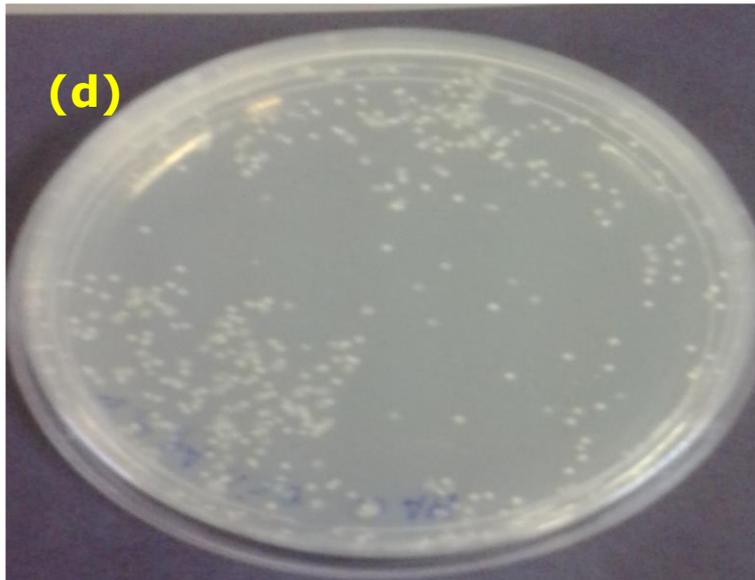
(b)

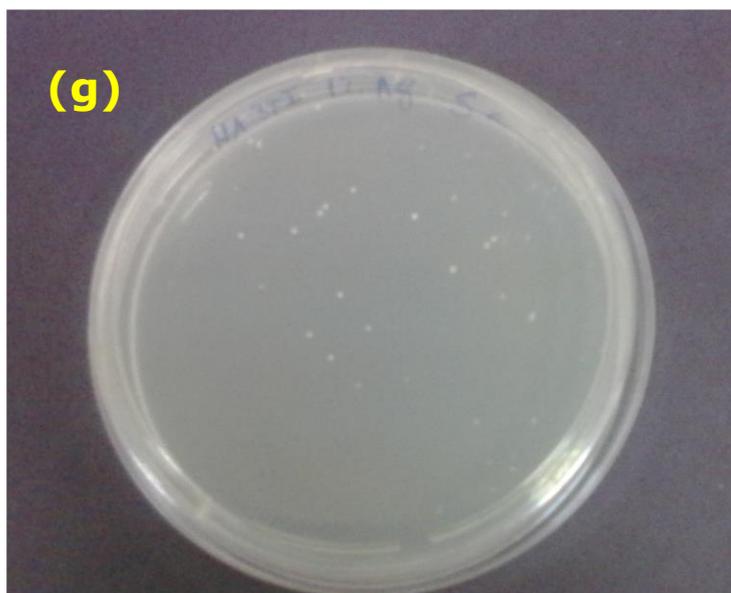
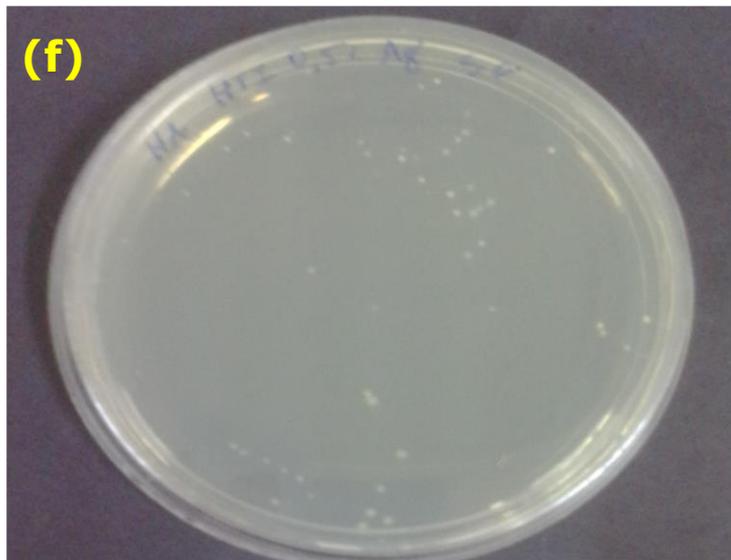
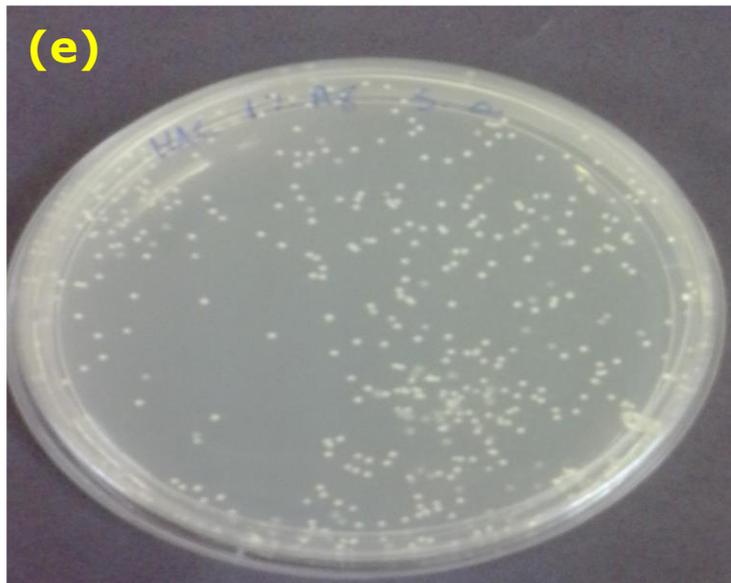


(c)



(d)





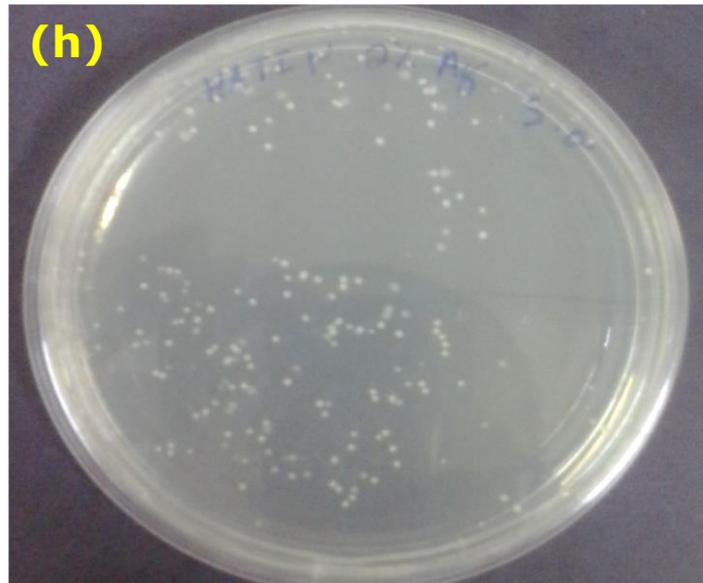
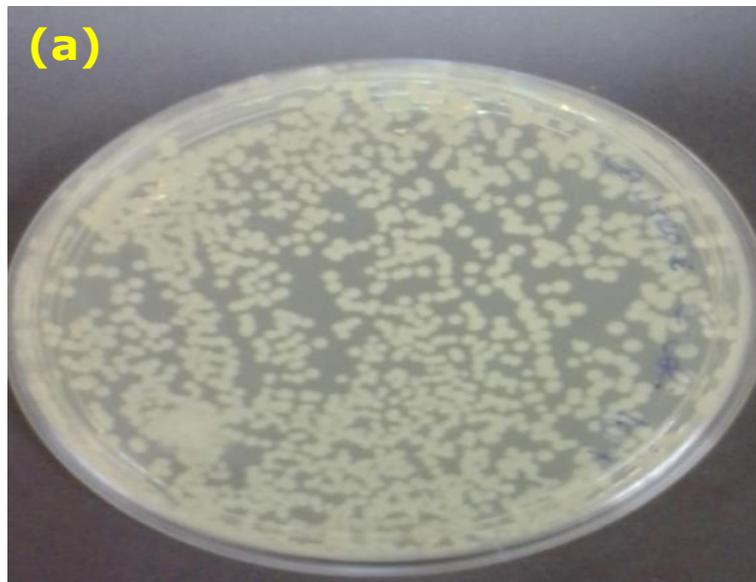
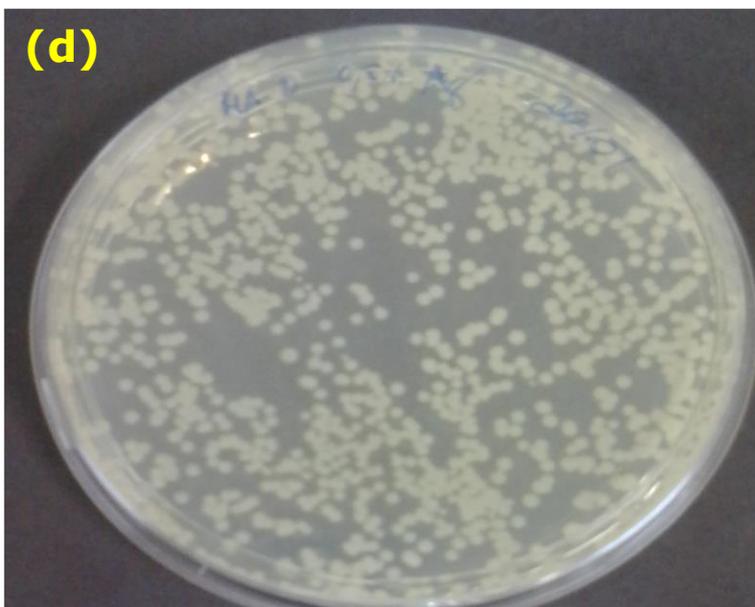
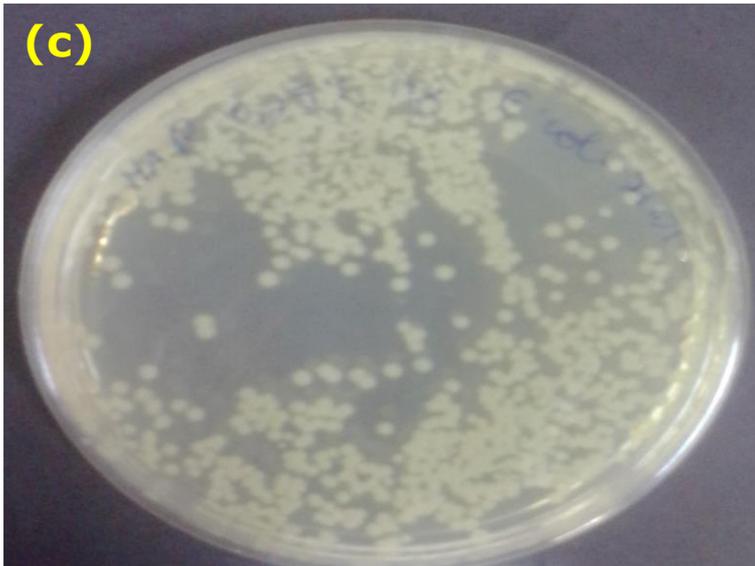
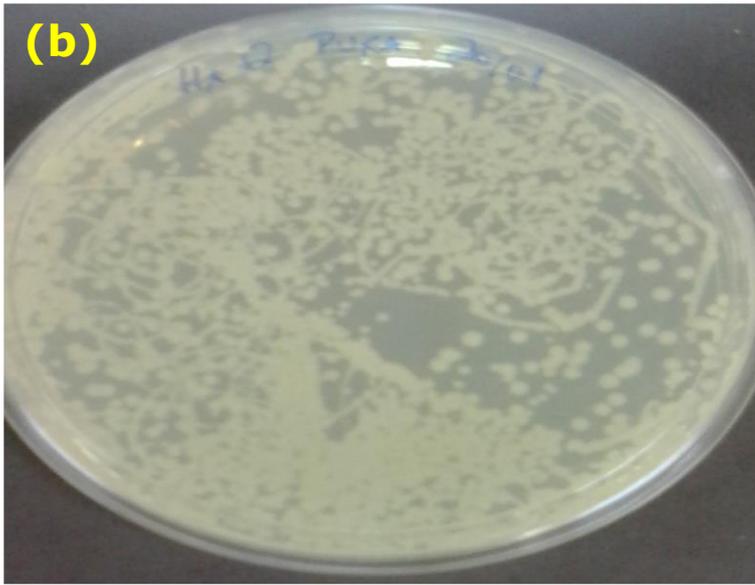
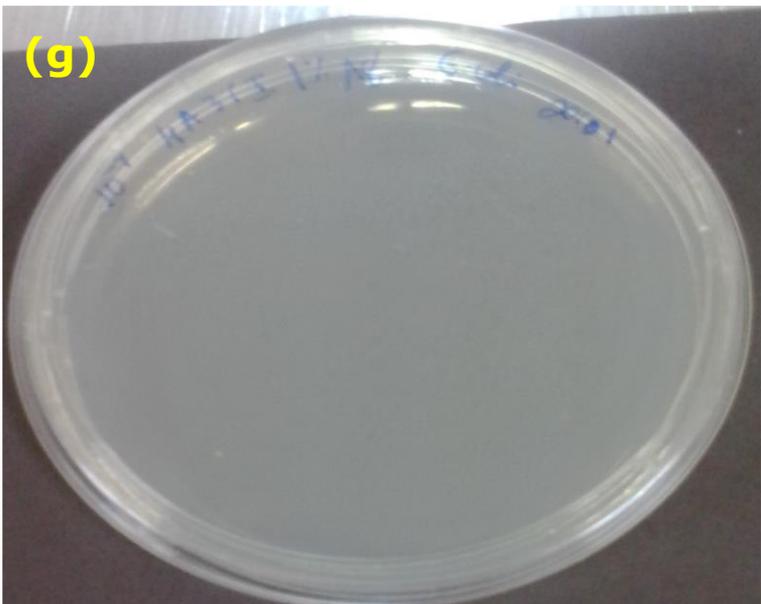
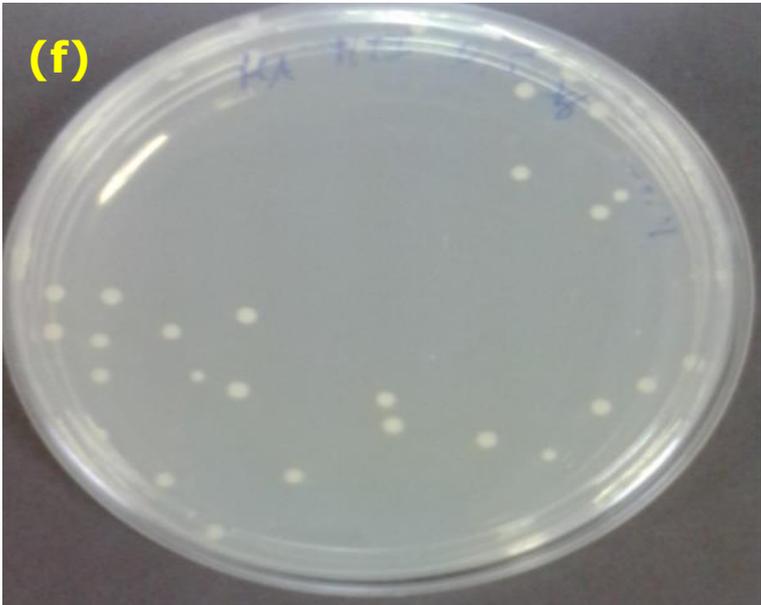
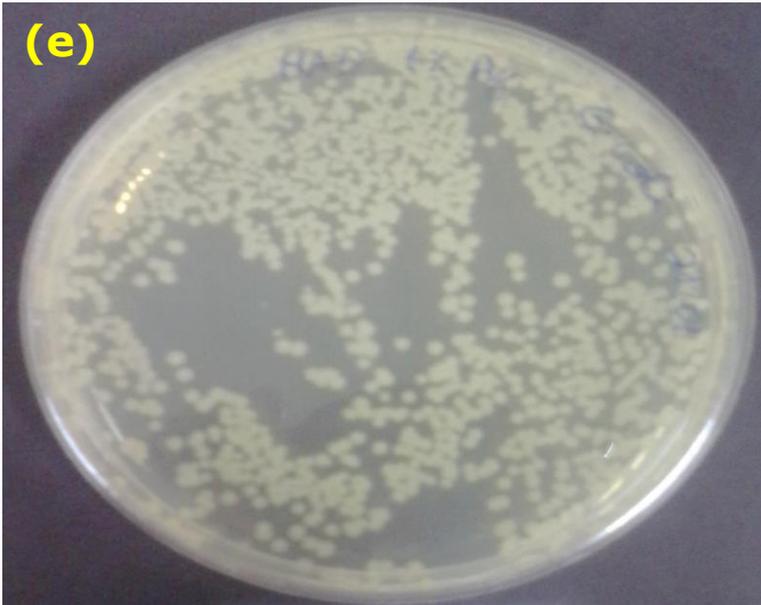
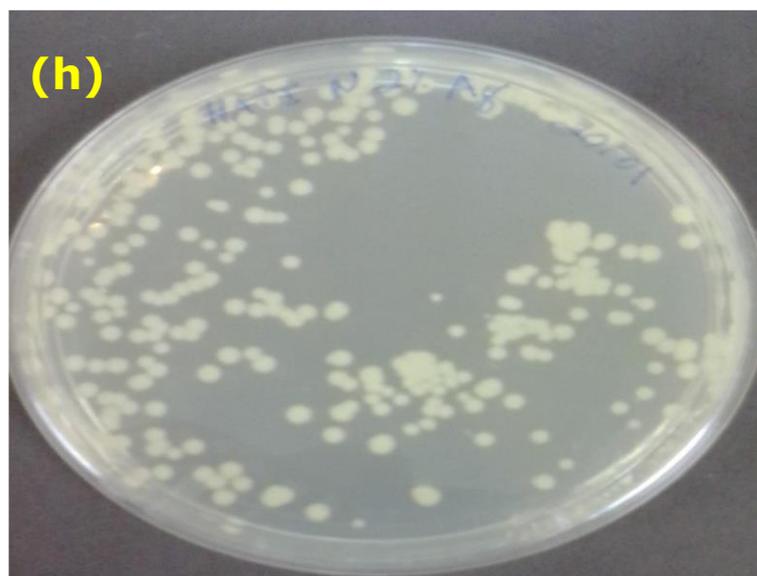


Figura 17 - Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de *E. coli* formadas após contato direto bacteriana com o controle (a) e as amostras HA pura (b), HA 0,25% Ag (c), HA 0,5% Ag (d), HA 1% Ag (e), HA I 0,25% Ag (f), HA I 0,5% Ag (g) e HA I 1% Ag (h).









Pelas imagens das placas Petri, observa-se a formação de colônias bacterianas onde foram constatadas maiores formação dessas colônias no controle de solução fisiológica, cuja a função é confirmar a viabilidade das cepas bacterianas e na hidroxiapatita pura que tem a função de servir como parâmetro para as demais amostras modificadas com prata. A partir destes testes, foram realizadas as contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) para essas duas amostras em que constatou que não há inibição bacteriana tanto para *S. aureus* como a *E. coli*, confirmando as expectativas para as amostras controles. Na Tabela 10 podemos observar os valores das unidades formadas de colônias obtidas através dos testes de contato direto para as bactérias *S. aureus* e *E. coli* frente aos sólidos sintetizados e os respectivos controles.

Tabela 10 - Percentuais de células viáveis nos testes de contato direto.

Material	<i>S. aureus</i> (% de inibição)	<i>E. coli</i> (% de inibição)
Controle (solução fisiológica 10 ⁻⁴)	0	0
HA pura	0	0
HA 0,25% Ag	10	13
HA 0,5% Ag	10	0
HA 1% Ag	40	10
HA I 0,25% Ag	96	95
HA I 0,5% Ag	93	100
HA I 1% Ag	70	67

Para as amostras contendo prata, as maiores taxas de inibições ocorreram com as hidroxiapatitas impregnadas. Novamente este comportamento pode estar associado à aglomeração das partículas, que foi evidente para a amostra HA I 1% Ag, uma vez que pelas micrografias foram observados alguns poucos pontos de aglomerações de partículas; mesmo assim as inibições bacterianas tiveram resultados excelentes para essas amostras.

Já nas amostras sintetizadas pelo método de co-precipitação a atividade antibacteriana foi menos acentuada em frente das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, do que as amostras impregnadas. Este comportamento pode ser justificado ainda considerando que a ocorrência de aglomerados. Outra característica importante de se mencionar é o fato de que os sólidos sintetizados co-precipitação quando aplicado nos testes de contato direto frente a bactéria *E. coli*, obteve resultado de inibição abaixo das atividades encontradas para as amostras em frente da bactéria *S. aureus* com exceção da amostra HA 0,25% Ag que mostrou uma atividade um pouco maior para a bactéria *E. coli*. Enquanto que a amostra HA 0,5% Ag não ocorreu nenhuma inibição do material frente a bactéria Gram negativa. Estes resultados possivelmente estejam relacionados com a espessura da parede celular das bactérias Gram negativas pois essas possuem natureza mais complexa da parede celular. Sendo assim as bactérias Gram negativa são mais resistentes à ação de antibióticos, que não são capazes de cruzar efetivamente esta barreira lipídica. (GUIMARAES et al, 2010).

Capítulo

5

Conclusões

5. Conclusões

As hidroxiapatitas modificadas com prata pelo método de co-precipitação e por impregnação mostraram possuir estrutura cristalina definida e identificada através do difratograma de raios X.

A dopagem da hidroxiapatita com nitrato de prata em diferentes concentrações pelo método de co-precipitação não apresentou mudanças relevantes nas reflexões referentes hidroxiapatita após análise do difratograma de raios X. Enquanto que as amostras impregnadas sofreram mudanças com aparecimento de novas fases referentes ao fosfato de prata e a prata metálica.

Os difratogramas de raios X mostraram a presença da reflexão referente a prata metálica em 2θ em aproximadamente $38,1^\circ$ para as amostras impregnadas.

As análises no espectrômetro de infravermelho e Raman mostram as presenças das principais bandas vibracionais para as amostras sintetizadas.

As micrografias dos sólidos sintetizados por co-precipitação e por impregnação mostraram a presença de agregados de prata em todos os sólidos modificados com o dopante nitrato de prata.

As avaliações *in vitro* da atividade antibacteriana mostraram que as hidroxiapatitas modificadas com prata tanto pela síntese *in situ* como por impregnação possuem uma ação antimicrobiana para bactérias Gram positivas e Gram negativas podendo ser aplicada possivelmente nas áreas médicas e odontológicas. No entanto as amostras obtidas por impregnação foram mais eficientes independentemente do teor de prata.

Capítulo

6

Referências

6. Referências bibliográficas

AFSHAR A.; GHORBANI M.; SAERI M.R.; SORELL C.C. Some important factors in the precipitation process of hydroxyapatite. **Materials and Design**, v.24, p. 197-202, 2003.

AHMED, M.A.; MANSOUR, S.F.; EL-DEK, S.I.; ABD-ELWAHAB, S.M.; AHMED, M.K. Characterization and annealing performance of calcium phosphate nanoparticles synthesized by co-precipitation method. **Ceramics International**, v. 40, p. 12807-12820, 2014.

AMER, W.; ABDELOUAHDI, K.; RAMANANARIVO, H.R.; ZAHOUILY, M.; COPPEL, A.F.Y.; VARMA, R.S.; SOLHY, A. Synthesis of mesoporous nano-hydroxyapatite using surfactant zwitterions. **Materials Letters**, v. 107, p. 189-193, 2013.

AMINZARE, M.; ESKANDARI, A.; BAROONIAN, MH.; BERENOV, A.; HESABI, Z. R.; TAHERIUM, M.; SADRNEZHAAD, SK. Hydroxyapatite nanocomposites: Synthesis, sintering and mechanical properties. **Ceramics International**, v. 39, p. 2197-2206, 2013.

ANDO, J. Tricalcium Phosphate and its Variation, **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.31, p. 196 – 201, 1958.

AOKI, H. Medical Application of Hydroxyapatite. 1st ed. Tokyo, Ishiyaku EuroAmerica, 1994.

AOKI, H. Science and medical applications of Hydroxyapatite. Tokio: Takayama Press. System center, v. 5, 1991.

ATKINS, P.; JONES, L. Princípios de química. Porto Alegre:Bookman, 2001. BAI, X.; MORE K.; ROULEAU M.C.; RABIEI, A. Functionally graded hydroxyapatite coatings doped with antibacterial components. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2264-2273, 2010.

BERA, R.K.; MANDAL, S.M.; RETNA RAJ, C. Antimicrobial Activity of Fluorescent Ag Nanoparticles. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, p. 520–526, 2014.

BOANINIA, E.; GAZZANOB, M.; BIGI, A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 1882–1894, 2010.

BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 1401-1421, 2012.

BOUTINGUIZA, M.; POU, J.; COMESAÑA, R.; LUSQUIÑOS, F.; DE CARLOS, A.; LEÓN, B. Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. **Materials Science and Engineering: C**, v.32, p. 478-486, 2012.

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

CHEN, W.; LIU, Y.; COURTNEY, H.S.; BETTEMGA, M.; AGRAWAL, C.M.; BUMGARDNER, J.D.; ONG, J.L. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. **Biomaterials**, v. 27, p. 5512-5517, 2006.

CHO, J.S.; RHEE, S.H. Formation mechanism of nano-sized hydroxyapatite powders through spray pyrolysis of a calcium phosphate solution. **Journal of the European Ceramic Society**, v.33, p. 233-241.

CIOBANU, C.S.; MASSUYEAU, F.; CONSTANTIN, L.V.; PREDOI, D. Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100°C. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, p. 613-621, 2011.

COURROL, L.C.; SILVA, F.R.O.; GOMES, L. A simple method to synthesize silver nanoparticles by photo-reduction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 305, p. 54-57, 2007.

CULLITY, B.D. Elements of X-ray diffraction. Addison-Wesley Publishing Company: Massachusetts, 1956.

DAHAL, J.A.; MADDUX, B.L.S.; HUTCHISON, J.E. Toward Greener Nanosynthesis, **Chemical Reviews**, vol. 107, p. 2228-2269, 2007.

DAHL J. A.; MADDUX B. L. S.; HUTCHISON J. E. Toward greener nanosynthesis. *Chemical Reviews*, vol. 107, n. 6, p. 2228-2269, 2007.

DASTJERDI, R.; MOJTAHEDI, M.R.M.; SHOSHTARI, A.M. Comparing the effect of three processing methods for modification of filament yarns with inorganic nanocomposite filler and their bioactivity against *Staphylococcus aureus*. **Macromolecular Research**, v. 17, p. 378-387, 2009.

DASTJERDI, R.; MOJTAHEDI, M.R.M.; SHOSHTARI, A.M.; KHOSROSHAHI, A. Investigating the production and properties of Ag/TiO₂/PP antibacterial nanocomposite filament yarns. **Journal of the Textile Institute**, v.101, p. 204-213, 2010.

DASTJERDI, R.; MONTAZER, M.; SHAHSAVAN, S. A new method to stabilize nanoparticles on textile surfaces. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 345, p. 202–210, 2009.

DIZAJ, S. M.; LOTFIPOUR, F.; JALALI, M. B.; ZARRINTAN, M. H.; ADIBKIA, K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v.44, p. 278-284, 2014.

DONG, Z.; LI, Y.; ZOU, Q. Degradation and biocompatibility of porous nanohydroxyapatite/ polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 6087-6091, 2009.

DONGDONG, L.; ZHU, Y.; LIANG, Z.; Alendronate hydroxyapatite functionalized mesoporous nanoparticles for drug delivery. **Bulletin of Materials Research**, v. 48, p. 2201-2204.

DURÁN, N.; MARCATO, P.D.; SOUZA, G.I.H.; ALVES, O.L.; ESPOSITO, E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, p. 2003-2008, 2007.

EANES, E.D. Crystal growth of mineral phases in skeletal tissues. **Progress in Crystal Growth and Characterization**, v. 3, p 3-15, 1980.

ELLIOTT, J.C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam: Elsevier, 1994.

FAHAMI, A.; EBRAHIMI-KAHRIZSANGI, R.; NASIRI-TABRIZI B. Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite/titanium nanocomposite. **Solid State Sciences**, v. 13, p. 135–141, 2011.

FERNANDES, A.J.D. **Fosfato de cálcio mesoporosos e como nanocompósitos com sílica: Síntese caracterização e ensaios de liberação controlada de fármaco**. 2011, 198p, Tese (Doutorado) - Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

FERNANDES, A.J.D.; BARBOSA, J.H.P.; SILVA, O.G.; FONSECA, M.G.; ARAKAKI, L.H.N.; ESPÍNOLA, J.G.P. Correlations between data of ²⁹Si NMR and thermogravimetry for silica/monetite nanocomposites. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 463-467, 2011.

FUJII, E.; OHKUBO, M.; TSURU, K.; HAYAKAWA, S.; OSAKA, A.; KAWABATA, K.; BONHOMME, C.; BABONNEAU, F. Selective protein adsorption property and characterization of nano-crystalline zinc-containing hydroxyapatite. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 69-74, 2006.

GOPI, D.; ANSARI, M.T.; SHINYJOY, E.; KAVITHA, L. Synthesis and spectroscopic characterization of magnetic hydroxyapatite nanocomposite using ultrasonic irradiation. **Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 87, p. 245–250, 2012.

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, p. 1352-1358, 2010.

GUGGENBICHLER, J.P.; BÖSWALD, M.; LUGAUER, S.; KRALL, T. A New technology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity in central venous catheters. **Infection**, v. 27, p. 16-23, 1999.

GUIMARAES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, 2010.

GUO, Y.J.; LONG, T.; W. CHEN.; NING C.Q.; ZHU, Z.A.; GUO, Y.P. Bactericidal property and biocompatibility of gentamicin-loaded mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, p. 3583–3591, 2013.

GUZMÁN, M.G.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering**, v.2, p. 104-111, 2009.

HEIMANN, R.B. Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings. **Surface and Coatings Technology**, v. 233, p. 27–38, 2013.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K.; WISE D. L.; TRANTOLO D. J.; ALTOBELLI D. E.; YASZEMSKI M. J.; GRESSER J. D. Materials selection, In Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering, Part A: Materials (eds) ER Schwartz (NewYork: Marcel Dekker), p. 27–45, 1995.

HORNEZ, J.C.; CHAI, F.; MONCHAU, F.; BLANCHEMAIN, N.; DESCAMPS, M.; HILDEBRAND, H.F. Biological and physico-chemical assessment of hydroxyapatite (HA) with different porosity. **Biomolecular Engineering**, v. 24, p. 505-509, 2007.

HUANG, C.L.; LEE, W.L.; LOO, J.S.C. Drug-eluting scaffolds for bone and cartilage regeneration. **Drug Discovery Today**, v. 19, p. 714–724, 2014.
HUTCHISON J. E. Greener nanoscience: a proactive approach to advancing applications and reducing implications of nanotechnology. **ACS Nano**, vol. 2, n. 3, p. 395–402, 2008.

ICONARU, S.L.; M.; CHAPON, P.; COUSTOMER, P.L.; PREDOI, D. Antimicrobial activity of thin solid films of silver doped hydroxyapatite prepared by Sol-Gel method. **The Scientific World Journal**, v. 2014, - Article ID 165351, 8 pages, 2014.

IQBAL, N.; KADIR, M.R.A.; MARMOOD, N.H.; SALIN, N.; FROEMMING, G.R.A.; BALAGI, H.R.; KAMARUL, T. Characterization, antibacterial and in vitro compatibility of zinc-silver doped hydroxyapatite nanoparticles prepared through microwave synthesis. **Ceramics International**, v. 40, p. 4507-4513, 2014.

IVANOVA, E.P.; BAZAKA, K.; CRAWFORD, R.J. Natural polymer biomaterials: advanced applications. *New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare*, p. 32-70, 2014.

JAISWAL, S.; DUFFY, B.; JAISWAL, A.K.; STOBIE, N.; MCHALE, P. Enhancement of the antibacterial properties of silver nanoparticles using β -cyclodextrin as a capping agent. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 36, p. 280-283, 2010.

JEONG, S.H.; YEO, S.Y.; YI, S.C. The effect of filler particle size on the antibacterial properties of compounded polymer/silver fibers. **Journal of Materials Science**, v. 40, p. 5407-5411, 2005.

JIA, X.; MA, X.; WEI, D.; DONG, J.; QIAN, W. Direct formation of silver nanoparticles in cuttlebone-derived organic matrix for catalytic applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 330, p. 234-240, 2008.

JINAWATH, S.; SUJARIDWORAKUN, P. Fabrication of porous calcium phosphates. **Materials Science and Engineering C**, v. 22, p. 41-46, 2002.

KALISHWARALAL, K.; DEEPAK, V.; PANDIAN, S.R.K.; KOTTAISAMY, M.; BARATHMANIKANTH, S.; KARTIKEYAN, B.; GURUNATHAN, S. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 77, p. 257-262, 2010.

KAUR, P.; SAXENA, M.; VADEHRA, D.V. Plasmid mediated resistance to silver ions in *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 82, p. 122-126, 1985.

KAWACHI, E.Y.; BERTRAN, C.A.; REIS, R.R.; ALVES, O.L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, p. 518-522, 2000.

KAYGILI, O.; KESER, S.; ORAINYC, R.H.A.; ATES, T.; YAKUPHANOGLU, F. In vitro characterization of polyvinyl alcohol assisted hydroxyapatite derived by sol-gel method. **Materials Science and Engineering: C**, v. 35, p. 239–244, 2014.

KHAN, A.F.; SALEEM, M.; AFZAL, A.; ALI, A.; KHAN, A.; KHAN, A.R. Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 35, p. 245-252, 2014.

KIM, J.S.; KUK, E.; YU, K.N.; KIM, J.H.; PARK, S.J.; LEE, H.J.; KIM, S.H.; PARK, Y.K.; PARK, Y.H.; HWANG, C.Y.; KIM, Y.K.; LEE, Y.S.; JEONG, D.H.; CHO, M.H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, p. 95–101, 2007.

KLEINER, L.W.; WRIGHT, J.C.; WANG, Y. Evolution of implantable and insertable drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 181, p.1-10, 2014.

KUMAR, V.S.; NAGARAJA, B.M.; SHASHIKALA, V.; PADMASRI, A.H.; MADHAVENDRA, S.S.; RAJU, B.D.; RAO, K.S.R. Highly efficient Ag/C catalyst prepared by electro-chemical deposition method in controlling microorganisms in water. **Journal of Molecular Catalysis A—Chemical**, v. 223, p. 313–319, 2004.

LALA, S.; SATPATI, B.; KAR, T.; PRADHAN, S.K. Structural and microstructural characterizations of nanocrystalline hydroxyapatite synthesized by mechanical alloying. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 2891–2898, 2013.

LEE, H.J.; JEONG, S.H. Bacteriostasis and Skin Innoxiousness of Nanosize Silver Colloids on Textile Fabrics. **Textile Research Journal**, v. 75, p. 551–556, 2005.

LEE, J.D. Química inorgânica concisa. 4 ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1996.

LEGEROS, R.Z.; LEGEROS, J.P. Phosphate minerals in human tissues In:J.O. Niagru and P.B. Moore. Eds. Phosphate Minerals, p. 351-385, 1984.

LIN, K.; LIU, X.; CHANG, J.; ZHU, Y. Facile synthesis of hydroxyapatite nanoparticles, nanowires and hollow nano-structured microspheres using similar structured hard-precursors. **Nanoscale**, p. 3052–3055, 2011.

LIU, X.; MOU, Y.; WU, S.; MAN, H.C. Synthesis of silver-incorporated hydroxyapatite nanocomposites for antimicrobial implant coatings. **Applied Surface Science**, v. 273, p. 748-757, 2013.

LOK, C.N.; HO, C.M.; CHEN, R.; HE, Q.Y.; YU, W.Y.; SUN, H.; TAM, P.K.H., CHIU, J.F.; CHE, C.M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal of Proteome Research**, v.5, p. 916–924, 2006.

MARTINEZ-GUTIERREZ, F.; OLIVE, P.L.; BANUELOS, A.; ORRANTIA, E.; NINO, N.; SANCHEZ, E.M.; RUIZ, F.; BACH, H.; AV-GAY, Y. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, vol. 6, p. 681–688, 2010.

MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como removedora de chumbo**. 1999, Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia, Rio de Janeiro, 1999.

MAVROPOULOS, E.; ROCHA, N.C.C.; MOREIRA, J.C.; BERTOLINO, L.C.; ROSSI, A.M. Pb^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+} ions uptake by Brazilian phosphate rocks. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 62-68, 2005.

MAVROPOULOS, E.; ROSSI, A.M.; COSTA, A.M.; PEREZ, C.A.C.; MOREIRA, J.C.; SALDANHA, M. Studies on the Mechanisms of Lead Immobilization by Hydroxyapatite. **Environmental Science and Technology**, v.36, p. 1625–1629, 2002.

MOUTHUY, P.A.; CROSSLEY, A.; YE, H. Fabrication of calcium phosphate fibres through electrospinning and sintering of hydroxyapatite nanoparticles. **Materials Letters**, v. 106, p. 145–150, 2013.

NASCIMENTO, W. J. **Preparação e Caracterização Microestrutural e Térmica de Compósitos à base de Nióbio e Hidroxiapatita**. Dissertação de Mestrado Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR. Março, 2009.

NERSISYAN, H.H.; LEE, J.H.; SON, H.T.; WON, C.W.; MAENG, D.Y. A new and effective chemical reduction method for preparation of nanosized silver powder and colloid dispersion. **Materials Research Bulletin**, v.38. p. 949–956, 2003.

PAKNIKAR, K.M. Anti-microbial activity of biologically stabilized silver nanoparticles. U.S. Patent, 0218555A1, 2007.

PAPE, H.L.; SERENA, F.S.; CONTINI, P.; DEVILLERS, C.; MAFTAH, A.; LEPRAT, P. Evaluation of the anti-microbial properties of an activated carbon fibre supporting silver using a dynamic method. **Carbon**, v. 40, p. 2947–2954, 2002.

PAULA, M.M.S.; FRANCO, C.V.; BALDIN, M.C.; RODRIGUES, L.; BARICHELLO, T.; SAVI, G.D.; BELLATO, L.F.; FIORI, M.A.; SILVA, L.; Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poly-{styrene-acrylic acid} with silver nanoparticles. **Materials Science & Engineering C**, v. 29, p. 647–650, 2009.

PERCIVAL, S.L.; BOWLER, P.G.; RUSSELL, D. Bacterial resistance to silver in wound care. **Journal of Hospital Infection**, v. 60, p. 1–7, 2005.

REGÍ, M.V. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. **Comptes Rendus Chimie**, v. 13, p. 174-185, 2010.

SADOWSKI, Z.; MALISZEWSKA, I.H.; GROCHOWALSKA, B.; POLOWCZYK, I.; KOŹLECKI, T. Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms. **Materials Science-Poland**, v.26, p. 419-424, 2008.

SATHISHKUMAR, M.; SNEHA, K.; WON, S.W.; CHO, C.W.; KIM, S.; YUN, Y.S. Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated greensynthesis of nanocrystalline silver particles and its bactericidal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, p. 332–338, 2009.

SHOJAI, M.S.; KHORASANI, M.T.; KHOSHDARGI, E.D.; JAMSHIDI, A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 7591-7621, 2013.

SILVA, O.G. **Síntese e caracterização de híbridos inorgânico-orgânico formados a partir de reações de silanização da hidroxiapatita e monetita**. 2006, 98p, Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

STOBIE, N.; DUFFY, B.; MCCORMACK, D.E.; COLREAVY, J.; HIDALGO, M.; MCHALE, P.; HINDER, S.J. Prevention of Staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. **Biomaterials**, v. 29, p. 963–969, 2008.

TANASKOVIC, V.; JANACKOVIC, D.; DIMITRIJEVIC, S.; TANASKOVIC, S.B.; MITRIC, M.; PAVLOVIC, M.S.; KRSTIC, A.; JOVANOVIC, D.; RAICEVIV, S. Synthesis of antimicrobial monophase silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 4510-4518, 2011.

WEN, H.C.; LIN, Y.N.; JIAN, S.R.; TSENG, S.C.; WENG, M.X.; LIU, Y.P.; LEE, P.T.; CHEN, P.Y.; HSU, R.Q.; WU, W.F.; CHOU, C.P. Observation of growth of human fibroblasts on silver nanoparticles. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 61 p. 445–449, 2007.

WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, p. 5897-5909, 2009.

WRIGHT, T. Alphasan: A thermally stable silver-based inorganic antimicrobial technology. **Chemical Fibers International**, v. 52, p. 125, 2005.

XIE, Y.; YE, R.; LIU, H. Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 279 p. 175–178, 2006.

YEO, S.Y.; JEONG, S.H. Preparation and characterization of polypropylene/silver nanocomposite fibers. **Polymer-International**, v. 52, p. 1053–1057, 2003.

YEO, S.Y.; LEE, H.J.; JEONG, S.H. Preparation of nanocomposite fibers for permanent antibacterial effect. **Journal of Materials Science**, v. 38, p. 2143–2147, 2003.

ZEIRI, L.; BRONK, B.V.; SHABTAI, Y.; CZEGE, J.; EFRIMA, S. Silver metal induced surface enhanced Raman of bacteria. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 208, p. 357–362, 2002.

ZHAO, J.; ZHAO, J.; CHEN, J.; WANG, X.; HAN, Z.; LI, Y. Rietveld refinement of hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by solution combustion method. **Ceramics International**, v. 40, p. 3379-3388, 2014.

ZHENG, Y. L.; ZHU, F. J. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate polymers**, v. 54, p. 527- 530, 2003.

ZHOU, H.; LEE, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v.7, p. 2769–2781, 2011.