



**Universidade de  
Aveiro  
2016**

Departamento de Engenharia de Materiais e  
Cerâmica

**Luís Guilherme  
Alves Mendes  
Teixeira**

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANO HIDROXIAPATITE PARA  
APLICAÇÕES ANTIBACTERIANAS**





**Universidade de Aveiro** Departamento de Engenharia de  
2016 Materiais e Cerâmica

**Luís Guilherme Alves  
Mendes Teixeira**

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANO HIDROXIAPATITE  
PARA APLICAÇÕES ANTIBACTERIANAS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Margarida Tavares Almeida, Professora auxiliar e da Doutora Maria Elizabete Jorge Vieira Costa, Professora Auxiliar, ambas do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, e do Doutor Paulo Quadros, supervisor na empresa FLUIDINOVA, S.A.



## **o júri**

presidente

Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira  
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Doutora Bárbara Joana Martins Leite Ferreira  
Bolseira de Pós Doutoramento da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Margarida Tavares Almeida  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro



## **agradecimentos**

Primeiramente, tenho que agradecer aos meus pais por me trazerem a este mundo, por me concederem a oportunidade de entrar neste ciclo de estudos, por me apoiarem e me darem a liberdade de tomar as minhas próprias decisões relativas à construção do meu futuro. Quero também agradecer a toda a minha família e todos os meus amigos e a todas as pessoas que de alguma maneira me ajudaram a aqui chegar.

Quero agradecer a todos os meus colegas de curso pela sua amizade, ajuda e espírito de camaradagem durante todo o mestrado.

Quero agradecer à professora Margarida Almeida pela sua enorme dedicação e seriedade que apresenta em tudo o que faz, e por sempre ter estado disponível e presente para me dar o seu importante contributo durante todo este trabalho. À professora Elizabete Costa por me ter co-orientado e inúmeras vezes contribuído positivamente com o seu vasto conhecimento científico e experiência. Ao Doutor Paulo Quadros pela oportunidade de realizar este projecto em parceria com a empresa FLUIDINOVA, S.A. e me por me ter sempre dado todas as condições necessárias para a realização da parte experimental na empresa e na universidade. Quero também agradecer à Eng<sup>a</sup> Catarina Coelho e ao Eng<sup>o</sup> Telmo Folhento por toda a ajuda durante o tempo que estive na empresa.

Quero agradecer à Eng<sup>a</sup> Ana Almeida, pela sua amabilidade e ajuda nos procedimentos experimentais práticos que levei a cabo no DeMAC, e à Doutora Cristina Fernandes pela paciência, e incrível capacidade de resolver problemas. E também agradecer à minha colega de laboratório e de curso, Tânia Macedo pela sua amizade, boa disposição, companhia e ajuda durante este ano.

Quero agradecer à professora Maria Ângela Cunha, do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, por todo o apoio e ajuda prestados na execução dos ensaios antibacterianos. Quero também agradecer à Bruna David por amavelmente me ter ajudado e ensinado a realizar todos os procedimentos dos ensaios antibacterianos que levei a cabo no departamento de Biologia.

Quero agradecer ao professor Augusto Lopes do DeMAC, por me ter ajudado em toda análise de difração de raios X, parâmetros de rede, etc.

Por fim, quero agradecer a toda a equipa de técnicos do DeMAC pela sua grande ajuda nos ensaios e a sua enorme importância na caracterização dos materiais.





**palavras-chave**

Nanopartículas, hidroxiapatite, prata, dopagem, propriedades antibacterianas, precipitação, troca iónica.

**resumo**

A hidroxiapatite é o principal componente inorgânico dos tecidos duros, sendo química e estruturalmente semelhante à parte mineral do osso. É utilizada em várias aplicações biomédicas (ortopédicas, dentárias), pela sua biocompatibilidade, bioactividade e capacidade osteointegrativa. Deste modo é amplamente utilizada em enxertos ósseos para preencher defeitos ou lacunas, ou como revestimento de implantes dentários e ortopédicos, promovendo a regeneração óssea e facilitando o seu processo de reparação. A hidroxiapatite nanométrica é a mais adequada para efeito, pois os componentes da matriz óssea são também eles de dimensões nanométricas.

Um dos problemas de alguns procedimentos cirúrgicos onde a hidroxiapatite é utilizada, é a rejeição dos implantes e as infecções relacionadas com a cirurgia. De modo a encontrar soluções para esta situação, têm sido conduzidos inúmeros estudos com o intuito de conferir à hidroxiapatite propriedades antibacterianas. Alguns elementos como a prata e o cobre são conhecidos pelo facto de serem antibacterianos. A substituição de cálcio por prata confere grande capacidade de acção antibacteriana, contra diversas estirpes de bactérias gram positiva e gram negativa.

O presente trabalho tem como objectivos estudar, em parceria com a empresa FLUIDINOVA (Maia), a produção de hidroxiapatite dopada com prata, de modo a conferir-lhe propriedades antibacterianas, com o intuito de diminuir os problemas associados a infeções aquando da aplicação de implantes que a utilizem. Para esse efeito são utilizadas duas metodologias: (i) a síntese de hidroxiapatite dopada recorrendo a um método de precipitação química e (ii) a troca iónica, partindo de uma hidroxiapatite (comercial ou previamente preparada). A hidroxiapatite dopada pelos dois processos foi extensivamente caracterizada quanto às suas propriedades físico-químicas, morfologia e actividade antibacteriana.

Conclui-se que foi possível obter hidroxiapatite dopada com prata por duas vias distintas, precipitação química e troca iónica.

Os resultados mostram que as amostras seleccionadas não apresentam segundas fases nos seus difractogramas, possuem áreas superficiais específicas elevadas, são mesoporosas e têm um tamanho de partícula na ordem dos 50 nm e uma morfologia do tipo bastonete, e que todas as amostras dopadas evidenciam actividade antibacteriana.

Para as amostras dopadas sintetizadas por precipitação química, observou-se uma redução de pelo menos 99,9% no número de bactérias viáveis, para ambas as estirpes bacterianas em estudo, comuns em ambientes hospitalares.



**keywords**

Nanoparticles, hydroxyapatite, silver, doping, antibacterial properties, precipitation, ion exchange.

**abstract**

Hydroxyapatite is the major inorganic component of hard tissues, being chemically and structurally similar to the mineral part of the bone. It is used in various biomedical applications (orthopedic, dental), due to its biocompatibility, bioactivity and osseointegrative capacity.

Thus, it is widely used in bone grafting to fill defects or voids, or as a coating of dental and orthopedic implants, promoting bone regeneration and facilitating its repair process.

Nanometric hydroxyapatite is the most appropriate for this purpose, since the bone matrix components are themselves of nanometric dimensions.

One of the problems of some surgical procedures where hydroxyapatite is used, is the rejection of implants and infections related to surgery. In order to find solutions for this problem, many studies have been conducted in order to grant antibacterial properties to hydroxyapatite. Some elements such as silver and copper are known for their antibacterial behavior. The substitution of calcium by silver has proven to provide hydroxyapatite antibacterial activity against various strains of both gram positive and gram negative bacteria.

This work aims to study, in partnership with the company FLUIDINOVA (Maia, Portugal), the production of silver doped hydroxyapatite that could exhibit antibacterial behaviour, and hence, reduce the problems associated with infections when applying it on implants.

For this purpose, two strategies are used: (i) the synthesis of silver doped hydroxyapatite using a chemical precipitation method, and (ii) ion exchange process, using hydroxyapatite powders (commercial or previously synthesized).

Hydroxyapatite doped by the two processes has been extensively characterized in terms of its physicochemical properties, morphology and antibacterial activity.

It was concluded that it was possible to obtain silver doped hydroxyapatite by two distinct routes, chemical precipitation and ion exchange.

The results showed that the selected samples do not show second phases in their diffractograms, have high specific surface areas, are mesoporous and have a particle size in the order of 50 nm and nanorod morphology, and that all doped samples show antibacterial activity.

For the doped samples synthesized by chemical precipitation, a reduction of at least 99.9% in the number of viable bacteria was observed for both bacterial strains that were studied, common in hospital environments.



# Índice

1. Introdução, motivação e objetivos.....	3
2. Revisão Bibliográfica .....	7
2.1. Hidroxiapatite (HAP) .....	7
2.2. Fases apatíticas.....	8
2.3. Métodos de síntese de nanopartículas de hidroxiapatite.....	9
2.4. Aplicações de nanopartículas de hidroxiapatite .....	11
2.4.1 Aplicações em reparação óssea .....	12
2.4.2 Aplicações dentárias .....	12
2.4.3 Outras aplicações .....	13
2.5. Substituição iónica e funcionalização da hidroxiapatite .....	14
2.6. Comportamento antibacteriano da prata .....	16
2.7. Dopagem da hidroxiapatite com prata .....	18
2.7.1. Método de Precipitação .....	19
2.7.2. Método de troca iónica.....	19
3. Procedimento Experimental.....	31
3.1. Síntese de HAP .....	31
3.2. Síntese de nano hidroxiapatite dopada com prata .....	33
3.2.1. Precipitação Química .....	33
3.2.2. Troca Iónica .....	34
3.3. Caracterização dos materiais.....	36
3.3.1. Difracção de raios X .....	36
3.3.2. Área superficial específica B.E.T. (Brunauer-Emmett-Teller).....	38
3.3.3. Potencial zeta .....	40
3.3.4. TEM e STEM de alta resolução .....	41
3.3.6. ICP-OES .....	43

3.4. Ensaio antibacterianos .....	44
3.4.1. Ensaio Qualitativos .....	44
3.4.2. Ensaio Quantitativos .....	45
4. Resultados e discussão .....	51
4.1. Composição de fases cristalinas .....	51
4.1.1. Amostras precipitadas não dopadas .....	51
4.1.2. Amostras dopadas por precipitação .....	53
4.1.3. Amostras dopadas por troca iônica .....	54
4.2. Morfologia de partícula .....	57
4.3. Porosidade .....	59
4.4. Potencial Zeta .....	63
4.5. Quantificação elementar .....	65
4.6. Ensaio Antibacterianos .....	69
4.6.1. Ensaio Antibacterianos Qualitativos .....	69
4.6.2. Ensaio Antibacterianos Quantitativos .....	70
5. Conclusões e trabalho futuro .....	79

## Índice de Figuras

Figura 2.1 - Sistema cristalino da hidroxiapatite. Adaptado de [11] .....	9
Figura 2.2 - Esquema ilustrativo da ação antibacteriana da hidroxiapatite dopada com prata pelos dois métodos propostos: (A) por Precipitação e (B) por troca iónica. Adaptado de [2].....	18
Figura 3.1 - Fotografia do Reactor NETmix. ....	31
Figura 3.2 - Ilustração da estrutura do reactor NETmix, evidenciando a rede de câmaras e canais que compõem o reactor. ....	32
Figura 3.3 - Isolamento da Hotte e de recipiente com suspensão. ....	35
Figura 3.4 - Representação ilustrativa da lei de Bragg. Adaptado de [5]. ....	37
Figura 3.5 - Difractómetro PAN alytical XPERT PRO <sup>3</sup> , disponível no departamento de engenharia de materiais e cerâmica da universidade de Aveiro.....	37
Figura 3.6 - Representação da classificação de tipos de histerese de isotérmicas de adsorção [adaptado de 8,9]. ....	39
Figura 3.7 - MICROMETRICS –Gemini 2370 V5, disponível na universidade de Aveiro.....	40
Figura 3.8 - Zetasizer Nano ZS (malvern instruments), disponível na Universidade de Aveiro.....	41
Figura 3.9 - Microscópio eletrónico de varrimento e transmissão Hitachi HD 2700, disponível na universidade de Aveiro [15]. ....	42
Figura 3.10 - Espectómetro HORIBA Jobin Yvon Activa-M [16]. ....	44
Figura 4.1 - Comparação de espectros de difracção de raios X de amostras de hidroxiapatite, não dopadas, obtidas por precipitação. ....	51
Figura 4.2 - Comparação de espectros de difracção de raios X de amostras de hidroxiapatite dopadas com prata e obtidas por precipitação. ....	53
Figura 4.3 - Comparação de espectros de difracção de raios X de amostras de hidroxiapatite dopadas com prata, por troca iónica. ....	55
Figura 4.4 – Comparação da morfologia das partículas entre HAP_F (A) e HAP_N (B). ....	57
Figura 4.5 – Comparação da morfologia das partículas de hidroxiapatite não dopada HAP_F(A); e das partículas dopadas HAP_Ti 0,005M (B); HAP HAP_Ti 0,001 (C); HAP_P_0,05 (D). ....	58

Figura 4.6 - Comparação das curvas de adsorção e dessorção (coluna à esquerda), e a variação do volume e tamanho de poro (coluna à direita), das várias amostras em estudo: A amostra não dopada HAP_F (a); a amostra não dopada HAP_N (b); a amostra HAP_P_0,05, dopada por precipitação (c); a amostra dopada por troca iônica HAP_Ti_0,001 (d); e a amostra dopada por troca iônica HAP_Ti_0,005 (e).....	60
Figura 4.7 – Variação do potencial zeta com o pH das amostras em estudo. ....	63
Figura 4.8 – Variação do teor de prata na solução sobrenadante. ....	66
Figura 4.9 – Ensaio antibacterianos qualitativos: S. Aureus (a) e E.Coli (b) .....	69
Figura 4.10 – Reduções logarítmicas de colónias formadoras de bactérias ao longo do tempo (S. Aureus).....	71
Figura 4.11 - Reduções logarítmicas de colónias formadoras de bactérias ao longo do tempo (E. Coli). ....	71



## Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Minerais de fosfatos de cálcio. Adaptado de [11,15,16] .....	8
Tabela 2.2 – Métodos de síntese de fosfatos de cálcio, e respectivas vantagens e desvantagens.....	10
Tabela 2.3 - Vários mecanismos propostos para atividade antibacteriana por iões de prata. Adaptado de [2]. .....	17
Tabela 3.1 – Nomenclatura das amostras de hidroxiapatite em estudo. ....	35
Tabela 4.1 – Parâmetros de rede e tamanho de cristalite de hidroxiapatites precipitadas não dopadas. ....	52
Tabela 4.2 - Parâmetros de rede e tamanho de cristalite de hidroxiapatites dopadas com prata, obtidas por precipitação.....	54
Tabela 4.3 – Parâmetros de rede e tamanho de cristalite de hidroxiapatites dopadas por troca iónica.....	55
Tabela 4.4 - Comparação do comprimento e largura média das partículas, e da sua área superficial específica.....	59
Tabela 4.5 – Comparação entre a relação $\text{Ca/P}$ , $(\text{Ag}+\text{Ca})/\text{P}$ e fração molar de prata (x). .....	65
Tabela 4.6 – Taxa de incorporação de prata na amostra sólida de hidroxiapatite. ....	65



# **Capítulo 1**

## **Introdução, motivação e objetivos**



# 1. Introdução, motivação e objetivos

A produção e desenvolvimento de materiais para aplicações biomédicas é uma das áreas de estudo mais importantes da atualidade no que toca à engenharia de materiais, e das mais promissoras na resposta à necessidade de regenerar ou reconstruir tecido ósseo perdido ou danificado em eventos traumáticos ou não traumáticos [1].

A hidroxiapatite (HAP) é o principal componente inorgânico dos tecidos duros, sendo química e estruturalmente semelhante à parte mineral do osso. É utilizada sob diferentes formas para aplicações ortopédicas e dentárias, devido à sua extraordinária biocompatibilidade, bioatividade e capacidade osteointegrativa. Estas propriedades são requisitos fundamentais a ter em consideração no desenvolvimento de estruturas porosas semelhantes à parte mineral do osso [2-4] o que justifica a ampla utilização da hidroxiapatite em enxertos ósseos para preencher defeitos ou lacunas, ou como revestimento de implantes dentários e ortopédicos, promovendo a regeneração óssea e assim facilitando o seu processo de reparação.

Nos últimos anos, com o desenvolvimento da nanotecnologia, e atendendo a que os constituintes minerais da matriz óssea têm também uma dimensão nanométrica, surgiu um grande interesse na síntese de hidroxiapatite com um tamanho de partícula à escala nanométrica, que por ser semelhante à da hidroxiapatite biológica, iria potenciar uma melhoria do seu desempenho nas aplicações biomédicas já referidas. Os estudos reportados na literatura comprovaram que efetivamente, algumas propriedades fundamentais como a área superficial e a semelhança dimensional das partículas são, na hidroxiapatite com um tamanho de partícula nanométrico, próximas das da hidroxiapatite biológica, confirmando-se uma resposta mais eficaz do hospedeiro e proporcionando condições propícias à adesão e migração celular [5].

No entanto, o hospedeiro está sujeito a infeções relacionadas com o implante, o que por vezes resulta em cirurgias de revisão, rejeição de implantes, problemas para o paciente, para as instituições hospitalares e para o Estado. Apesar das cirurgias serem realizadas em ambiente esterilizado e de serem usados

antibióticos de largo espectro, as infeções relacionadas com implantes são ainda bastante comuns. Com o aumento da esperança média de vida e o aumento da utilização de implantes como solução para vários problemas de saúde, é esperado que os casos de infeções continuem a aumentar, principalmente nos grupos de maior risco como o dos idosos, dos imunodeprimidos ou dos doentes crónicos. Para além de toda a dor e sofrimento que as vítimas destas infeções sofrem, elas acarretam custos substanciais para resolver ou minimizar o problema [2]. Neste contexto, de modo a tentar encontrar soluções para esta situação, têm-se conduzido inúmeros estudos científicos com o intuito de conferir à hidroxiapatite propriedades antibacterianas, através da substituição parcial dos seus elementos químicos constituintes por novos elementos com propriedades antibacterianas. A dopagem pode ser feita com diferentes elementos como o estrôncio, o silício, o zinco, a prata ou com uma combinação destes. Os resultados de vários estudos científicos demonstraram que a hidroxiapatite dopada com prata possui actividade antibacteriana, contra diversas estirpes de bactéria gram-positiva e gram-negativa, e que a hidroxiapatite dopada com estrôncio ou com silício apresenta melhorias ao nível da sua biocompatibilidade [1,6-10].

O presente estudo tem como objetivos estudar, em parceria com a empresa FLUIDINOVA (empresa produtora de hidroxiapatite, sediada na Maia), a produção de nano hidroxiapatite dopada com prata, de modo a conferir-lhe propriedades antibacterianas, com o intuito de diminuir os problemas associados a infeções aquando da aplicação de implantes que a utilizem. Para esse efeito serão utilizadas duas metodologias: (i) a síntese de hidroxiapatite dopada recorrendo a um método de precipitação química e (ii) a troca iónica, partindo da hidroxiapatite produzida na própria empresa. A hidroxiapatite dopada pelos dois processos será posteriormente usada em estudos de caracterização da sua actividade antibacteriana.

# **Capítulo 2**

## **Revisão Bibliográfica**





## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Hidroxiapatite (HAP)

Os fosfatos de cálcio, e, em particular a hidroxiapatite possuem um grande potencial para aplicações de saúde, devido à sua elevada biocompatibilidade, pois a hidroxiapatite é o mineral inorgânico encontrado nos ossos e dentes dos mamíferos [11,12].

O osso proporciona o suporte mecânico básico do corpo, gerando e transferindo forças que estão envolvidas na locomoção [11]. Funciona como uma reserva de minerais, maioritariamente de cálcio e fósforo, que circulam pelo sangue em concentrações sobresaturadas. Também alberga factores de crescimento, metais, ácidos gordos e está envolvido no controlo do pH do sangue, libertando sais alcalinos [11]. Alguns ossos produzem eritrócitos e glóbulos brancos [11].

A hidroxiapatite (HAP)  $[Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2]$ , apresenta uma relação cálcio/fosfato (Ca/P) de 1.67, e cristaliza no sistema hexagonal, sendo reconhecida como um mineral inorgânico bioativo e osteocondutivo, por formar ligações químicas fortes com o tecido ósseo do hospedeiro, proporcionando condições adequadas à formação de novo tecido ósseo. A sua semelhança química e estrutural com o osso mineral, e com o esmalte dentário, faz com que seja reconhecida como um excelente material para enxertos ósseos, revestimento de próteses, e regeneração do esmalte dentário, sendo por isso indiscutível a sua aplicabilidade na área da engenharia do tecido ósseo [2,5,13]. A parte mineral do osso representa no corpo humano cerca de 60-70% do peso dos ossos e 90% do peso do esmalte humano [14]. Com o desenvolvimento da nanotecnologia, acentuou-se o interesse no estudo da hidroxiapatite à escala nanométrica. A matriz do osso natural apresenta estruturas hierárquicas nesta dimensão, maioritariamente constituídas por colagénio (20%) e fosfatos de cálcio (69%). Os fosfatos de cálcio estão presentes na forma de nano-cristais com forma de bastonetes, barras ou placas, com aproximadamente 5 - 20 nanómetros de largura e 60 nanómetros de comprimento, que são depositados e alinhados paralelamente em fibrilhas de colagénio [12].

Os estudos reportados na literatura têm mostrado que, de facto, a maioria dos materiais nano-estruturados aplicados em implantes ósseos acabam por suscitar uma resposta mais eficaz quando comparados com os materiais seus congéneres, com tamanho de partícula superior.

## 2.2. Fases apatíticas

Os fosfatos de cálcio podem adoptar diversas estruturas cristalinas dependendo da sua estequiometria e condições de síntese. Para além da HAP existem outros minerais de fosfatos de cálcio, como se indica na tabela 2.1:

Tabela 2.1 – Minerais de fosfatos de cálcio. Adaptado de [11,15,16]

<b>Fosfato de cálcio</b>	<b>Formula Química</b>	<b>Relação Ca/P</b>	<b>Sistema de Cristalização – Grupo espacial</b>
<b>Fosfato Monocálcico</b>	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5	Triclínico P1
<b>Fosfato Bicálcico</b>	$\text{CaHPO}_4$	1,0	Monoclínico C2/c
<b>Fosfato Octacálcico (OCP)</b>	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	Triclínico P1
<b>Fosfato tricálcico (TCP)</b>	$\alpha$ e $\beta$ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	$\beta$ =romboédrico R3c
<b>Hidroxiapatite (HAP)</b>	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	Hexagonal P6 <sub>3</sub> /m
<b>Fluorapatite</b>	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1,67	Hexagonal P6 <sub>3</sub> /m

A hidroxiapatite pretence à família das apatites, e tem como formula geral  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ , onde X é  $\text{OH}^-$  (hidroxiapatite),  $\text{F}^-$  (Fluorapatite), ou  $\text{Cl}^-$  (clorapatite) [17]. Em condições biológicas, a hidroxiapatite pode ser sujeita a várias substituições iónicas. A apatite do osso humano pode ser descrita como  $(\text{Ca},\text{Z})_{10}(\text{PO}_4,\text{Y})_6(\text{OH},\text{X})_2$ , onde Z representa iões como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  ou  $\text{Sr}^{2+}$ , Y corresponde a  $\text{CO}_3^{2-}$  ou  $\text{HPO}_4^{2-}$ , e X a  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{F}^-$  [11,17]. À exceção do cloro, estas impurezas contribuem para um aumento da solubilidade da apatite. O ião  $\text{CO}_3^{2-}$  é a impureza mais comum nas apatites biológicas, sendo reportado que

hidroxiapatites sintéticas carbonatadas demonstram maior bioactividade em comparação com hidroxiapatite pura [11].

A estrutura mais frequente da hidroxiapatite é o sistema hexagonal (grupo espacial  $P6_3/m$ ), e, relativamente aos seus parâmetros de rede, são reportados para  $a=b$  valores entre 9.398Å e 9.438Å e para  $c$  valores entre 6.868Å e 6.887Å, com  $\alpha=\beta=90^\circ$  e  $\gamma=120^\circ$  [18,19,20]. A figura x ilustra graficamente a estrutura cristalina hexagonal da hidroxiapatite:

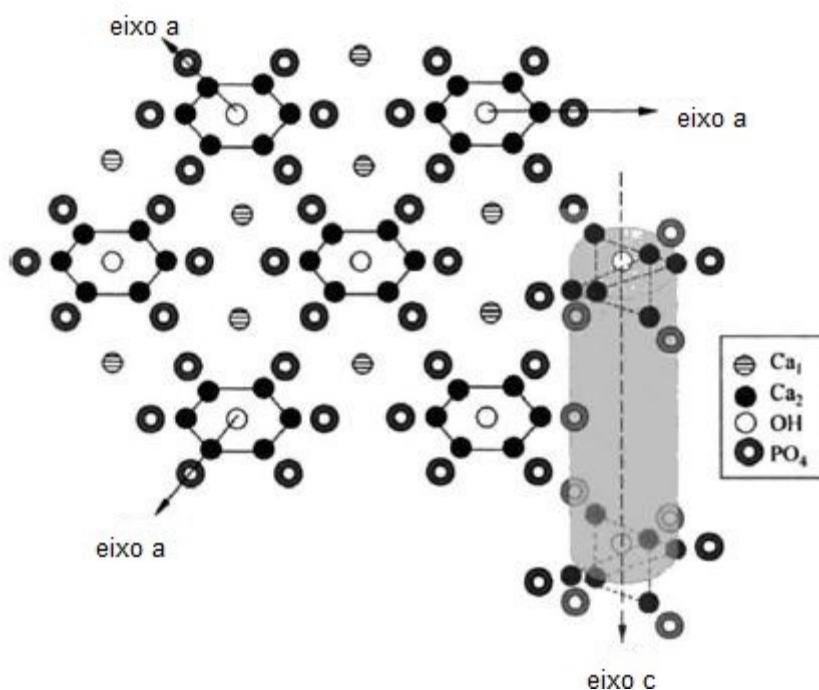


Figura 2.1 - Sistema cristalino da hidroxiapatite. Adaptado de [11]

### 2.3. Métodos de síntese de nanopartículas de hidroxiapatite

Os biocerâmicos nanométricos e nanocristalinos são materiais promissores na área dos implantes dentários e ortopédicos, sistemas de libertação controlada com melhores propriedades biológicas e biomecânicas. Estes materiais possuem melhores performances quando comparados aos seus semelhantes de maiores dimensões, devido ao facto de possuírem valores superiores de razão área (superficial / volume) [21].

Existem diversos métodos para sintetizar nanopartículas de hidroxiapatite, tais como: Processamento por sol-gel [22], co-precipitação [23], técnica de

emulsão [24], processamento hidrotérmico [25], método mecano-químico [26], técnica ultrassónica [27], processamento por microondas [27], e combinações entre métodos [28].

A tabela 2.2 apresenta vários métodos de síntese de fosfatos de cálcio, a estrutura e morfologia dos materiais obtidos, bem como as suas vantagens e desvantagens [27]. Com estes métodos é possível obter partículas com uma grande variedade de estruturas e morfologias. Neste estudo iremos focar-nos no método de precipitação, e na secção experimental, particularizar-se-á o método de precipitação utilizado pela empresa FLUIDINOVA.

Tabela 2.2 – Métodos de síntese de fosfatos de cálcio, e respectivas vantagens e desvantagens.

<b>Método de Síntese</b>	<b>Morfologia das partículas</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Processamento por Sol-Gel [22,29,30]	Nanocristais agregados.	Fabrico de cristais de alta pureza e homogeneidade utilizando recursos simples.	Reagentes organometálicos caros e vulneráveis à humidade. Processo demorado.
Co-Precipitação [23,31]	Nanocristais com morfologia do tipo agulha, esférica, bastonete ou barra.	Cristais com estrutura semelhante à apatite natural do osso. Baixo custo. O uso de biomacromoléculas permite controlar a agregação das partículas.	Produtos pouco cristalinos e agregam facilmente.
Técnica de Emulsão [24,32]	Nanocristais com morfologia do tipo agulha, e esférica. Barras e placas nanométricas.	Bom controlo de morfologia e tamanho de partícula. Pouca tendência para agregar.	O processo precisa de uma temperatura de sinterização alta e de muito tempo. O Sistema de reação é muito complexo.
Processamento	Nanocristais do	Partículas de alta	Processo demora

Hidrotérmico [25,33]	tipo agulha, esféricos e fibrosos. Barras nanométricas.	cristalinidade e pureza, bem dispersas. Fácil controlo de morfologia e tamanho de partícula.	muito tempo. Baixo rendimento.
Método mecano-químico [26]	Nano-estruturas fibrosas e esféricas.	Método simples e de baixo custo. Não precisa de altas temperaturas de sinterização.	Nanocristais com tendência para agregar. Requer equipamentos especiais.
Técnica ultrasónica [27]	Nanocristais com morfologia do tipo agulha ou esféricos.	Os produtos têm pouca tendência para agregar. Cristalização rápida a baixas temperaturas.	Precisa de equipamento especial. Baixo rendimento.
Processamento por microondas [27,34]	Estruturas do tipo barra, agulha, laço ou flor.	Produtos altamente cristalinos, fácil de controlar morfologia e tamanho de partícula. A síntese é rápida.	Requer equipamentos especiais e é difícil fazer sínteses em grande escala.
Emulsão-Hidrotermal (Combinação de métodos) [28,35]	Estruturas esféricas, do tipo barra, fibrosas e do tipo cinto.	Este método pode impedir as partículas de se agregarem e crescerem. Fácil de controlar morfologia e tamanho de partícula a baixas temperaturas.	Requer equipamentos especiais. Processo lento. Sistema de reação complexo. Baixo rendimento.
Microondas-Hidrotermal (Combinação de métodos) [36]	Cristais com morfologia do tipo agulha ou esféricos.	Método rápido que não requer altas temperaturas. Os produtos sintetizados têm alta cristalinidade.	Requer equipamentos especiais. Baixo rendimento.

## 2.4. Aplicações de nanopartículas de hidroxiapatite

O desenvolvimento de nanotecnologia promoveu a aplicação de nano partículas de hidroxiapatite no mercado para vários fins, tais como a regeneração óssea e regeneração do esmalte.

#### **2.4.1 Aplicações em reparação óssea**

A Angstrom Medica, INC produziu a primeiro nanomaterial com aplicações terapêuticas, aprovado pela U.S. FDA (United States Food and Drug Administration) em 2005, o NanOSS™ utilizado para o preenchimento de espaços vazios em ossos. Este material obtém-se pela compactação e aquecimento um pó de nanopartículas de ortofosfato de cálcio, dando origem a um material caracteristicamente denso, transparente e nanocristalino [21]. A principal vantagem do NanOSS™ é a sua semelhança com os ossos humanos a nível da microestrutura, composição, resistência mecânica e osteocondutividade, sendo usado em áreas como ortopedia e medicina desportiva.

Ostim® (Osartis GmbH & Co. KG, Obernburg, Germany), aprovada em 2002 pela CE (Conformite Europeenne) é uma pasta injetável, incorporável em ossos, que promove a regeneração óssea com resultados visíveis em 3 meses [37,38]. Os nanocristais de hidroxiapatite presentes na pasta têm dimensões na ordem dos  $100 \times 20 \times 3 \text{ nm}^3$  e uma elevada área superficial específica,  $106 \text{ m}^2/\text{g}$  [39]. Este material não endurece em contacto com o sangue e é útil para aumentar o volume de material autólogo e homólogo. Pode ser usado em quistos e fraturas metafisiárias, reconstrução do acetábulo e fracturas periprotéticas, osteotomias, preenchimento de espaços em cirurgias à coluna, entre outras [17,39,38].

#### **2.4.2 Aplicações dentárias**

Na fase inicial das cáries, o esmalte, a camada exterior que reveste o dente, sofre danos causados por bactérias, e, é possível preencher a zona danificada com materiais sintéticos de modo a reparar o esmalte. Por outro lado, cáries

secundárias aparecem frequentemente entre a camada sintética e o dente [37], [40].

Por ser quimicamente semelhante, a hidroxiapatite é habitualmente considerada como um modelo para a reconstrução do esmalte dentário [37,40]. Apesar disto, os materiais análogos que pretendem substituir o esmalte em falta não são muito utilizados clinicamente, devido á complexidade da estrutura nativa do esmalte, das diferentes dimensões dos cristais sintéticos, orientação dos cristais e morfologia, resultando assim numa débil restauração dentária, devido à difícil adesão e resistência mecânica do material [37].

Para a optimização da remineralização do esmalte, a utilização das partículas mais pequenas de hidroxiapatite é aparentemente uma opção mais viável, devido à proximidade das características naturais do esmalte, comparativamente às partículas de maiores dimensões da hidroxiapatite micrométrica [37,41]. Demonstrou-se que as partículas mais pequenas aderem a estruturas idênticas ao esmalte em laboratório [42,43], e por isso sugere-se que a restauração do esmalte pode ser optimizada com este material. Esta estratégia possui um grande potencial e pode ser aplicada na medicina dentária [43].

### **2.4.3 Outras aplicações**

Além das propriedades que as nanoestruturas de hidroxiapatite apresentam para a restauração de ossos e do esmalte, estas possuem outras propriedades interessantes que lhes granjeiam outras potenciais aplicações.

Podem ser estavelmente carregadas com radioisótopos para serem usadas em pacientes com artrite reumatóide e sinovite crónica no joelho [44].

As partículas de hidroxiapatite podem servir como portadores não virais de fármacos e proteínas devido á biocompatibilidade e capacidade de adsorção [45,46]. São difíceis de degradar e facultam um trajecto conveniente para a penetração da membrana celular e o controle da libertação de genes e fármacos [47,48]. Por possuírem elevada área superficial específica, podem carregar

maiores quantidades de fármacos comparadas a partículas de maiores dimensões [48,49].

A transferência de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) para células vivas (transfecção) é uma técnica muito importante na área da biologia molecular e bioquímica [50]. Por não conseguirem penetrar na parede celular sozinhos, os ácidos nucleicos precisam de transportadores eficientes. A hidroxiapatite pode funcionar como um vector não viral, e servir eficazmente como um transportador para entrega localizada de genes [51] e células [52].

## **2.5. Substituição iónica e funcionalização da hidroxiapatite**

Uma das principais características da hidroxiapatite é a sua capacidade de substituição iónica. Os locais dos iões de hidróxidos ( $\text{OH}^-$ ), podem ser ocupados por iões de tamanho e carga semelhante, como  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{F}^-$ . De um modo semelhante, locais dos iões fosfato podem ser ocupados por iões  $\text{BO}_3^{3-}$ , e os locais de catiões de cálcio por  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , ou  $\text{Sr}^{2+}$  [53,54,55]. A substituição pode ser total, nos casos de OH por F ou Ca por Sr, ou parcial, devido a limitações nas diferenças de tamanho e cargas dos iões, bem como das suas estruturas espaciais.

Um aspecto importante reside na possibilidade de substituir iões de diferentes cargas. É possível substituir iões fosfato (-3) por iões carbonato (-2), criando um desíquilíbrio electroquímico positivo, que é neste caso, compensado pela perda simultânea de um catião de  $\text{Ca}^{2+}$  e um anião de  $\text{OH}^-$  [56].

Esta propriedade tem vindo a ser explorada na área da engenharia de biomateriais. Pequenas quantidades de certos iões podem causar melhorias nas suas propriedades mecânicas, físico-químicas ou biológicas [57,58]. Por exemplo, a introdução de uma pequena quantidade de iões de  $\text{Mn}^{2+}$  favorece a proliferação de osteoblastos [59]. Iões  $\text{Mg}^{2+}$  causam uma melhoria nas propriedades osteointegrativas [60]. O estrôncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ) provoca efeitos positivos ao nível da biocompatibilidade e bioactividade [61].



Como foi descrito anteriormente, conferir à hidroxiapatite propriedades antibacterianas pode ser bastante importante, de modo a prevenir complicações associadas a procedimentos cirúrgicos decorrentes da aplicação de implantes ósseos. Nestas situações, antibióticos são oralmente administrados ao paciente, um processo pouco eficaz, onde a dose tem de ser alta o suficiente para assegurar a concentração apropriada em torno da região onde o implante foi inserido. Actualmente, estudos científicos têm procurado utilizar diferentes iões para conferir propriedades antibacterianas à hidroxiapatite, tais como a prata ( $\text{Ag}^+$ ), o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e o zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ).

A hidroxiapatite dopada com prata, com um conteúdo de 0,5 % de proporção em relação ao peso total de prata na apatite, é eficaz contra diversas estirpes bacterianas encontradas em ambientes hospitalares (gram-positivas e gram-negativas) [62]. A hidroxiapatite dopada com cobre é eficaz contra várias bactérias, mas estudos demonstraram que algumas bactérias gram-positivas (*S. Aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*) conseguiram desenvolver mecanismos de proteção [63-66]. A hidroxiapatite dopada com zinco é eficaz como agente antibacteriano, no entanto para teores de dopante de 1.2% já revela citotoxicidade [67]. Por estes motivos, escolheu-se a prata como dopante.

É preciso, no entanto, ter em atenção que uma concentração demasiado alta de prata pode trazer problemas de citotoxicidade. Estudo in vitro em osteoblastos humanos mostraram que a hidroxiapatite contendo 0,3% do seu peso em prata não trouxe nenhum efeito negativo no crescimento dos osteoblastos. Um conteúdo de 0,7% inibe ligeiramente o seu crescimento, e um conteúdo de 8.3% exibiu um efeito altamente citotóxico, especificamente na inibição do crescimento de células estaminais humanas [68]. Um bom balanço entre propriedades antibacterianas e citotoxicidade poderá situar-se entre os 2% e 4% [69].

## 2.6. Comportamento antibacteriano da prata

No sentido de combater infecções causadas por micro-organismos e para responder à ineficácia dos antibióticos, devido à capacidade de adaptação dos micro-organismos a condições adversas e a novas substâncias, o estudo do impacto dos agentes antibacterianos tem suscitado o interesse das companhias farmacêuticas e comunidades de investigação.

Um dos principais fatores que potencia as infecções é a adesão de micro-organismos às superfícies dos implantes e a subsequente formação de biofilmes. O processo de formação do biofilme envolve (i) a adesão inicial de células bacterianas, (ii) a acumulação em várias camadas de células, (iii) a maturação do biofilme, e (iv) o descolamento de células do biofilme para um estado planctónico para iniciar um novo ciclo de formação de biofilme noutra localização [2]. As bactérias que vivem no biofilme são muito resistentes a agentes antibacterianos e o biofilme protege-as do sistema imunitário do hospedeiro.

A direção a seguir é, provavelmente, a pesquisa na área dos materiais à nano-escala. As aplicações dos mesmos têm vindo a aumentar consideravelmente, tendo já sido usados na área da nanoquímica para melhorar a atividade de catalisadores, na medicina e na nanoengenharia farmacêutica para libertação controlada de agentes terapêuticos, em diagnósticos de doenças crónicas, sensores e na indústria alimentar para limitar o crescimento de bactérias. Na última década, as companhias farmacêuticas lançaram poucos antibióticos novos e nenhum deles demonstrou melhorias contra estirpes bacterianas com multi-resistência a fármacos [13].

Um dos elementos mais estudados e usados devido às suas propriedades antibacterianas é a prata. Apesar de ainda não se conhecer exatamente o mecanismo de ação da prata, esta é utilizada atualmente para controlar o crescimento bacteriano em vários contextos como a medicina dentária, os cimentos ósseos, os fixadores ortopédicos, as próteses cardíacas, as queimaduras e os cateteres [2]. Os iões de prata evidenciaram efeitos oligodinâmicos com um alargado espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus, algas e fungos [1,2,70]. As propriedades antibacterianas da prata

estão associadas ao catião  $\text{Ag}^+$  [2,70], sendo que vários autores defendem mecanismos de ação antibacteriana diferentes. As observações mais consensuais referem que os iões de prata ou geram espécies reativas de oxigénio (ROS) e danificam a membrana celular [71-76], ou ligam-se a grupos tiol (grupo S-H) de várias enzimas metabólicas importantes para o transporte de eletrões e a respiração da bactéria. De facto, verificou-se que a prata ligada a grupos tiol presente nos resíduos de cisteína envolvidos no transporte de proteínas induziu um vazamento massivo de protões através da membrana da bactéria, resultando na sua desenergização e levando à morte celular [77-80]. Estes e outros mecanismos de ação propostos para atividade antibacteriana por iões de prata podem ser consultados na tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Vários mecanismos propostos para atividade antibacteriana por iões de prata. Adaptado de [2].

---

**Mecanismo proposto**

---

A prata inibiu a captação de fosfato e causou o efluxo de fosfato intracelular.

---

Iões de prata ligam-se a grupos tiol de várias enzimas metabólicas importantes para o transporte de eletrões da bactéria e a respiração.

Por exemplo, a prata ligada a grupos tiol (grupo S-H) presente nos resíduos de cisteína do transporte de proteínas, induziu um vazamento massivo de protões através da membrana da bactéria, resultando na sua desenergização e levando à morte celular.

---

Iões de prata entraram nas paredes das bactérias, penetrando através da parede celular, e condensaram o DNA. O DNA perdeu a capacidade de ser replicado e este facto conduziu à morte celular.

---

Iões de prata ligam-se a DNA microbiano por interações com ácidos nucleicos, e mudam a estrutura do DNA, o que em consequência previne a replicação bacteriana.

---

Foi observado que os iões de prata aumentam as frequências de mutação do DNA durante reações em cadeia da enzima polimerase

---

Foi observado que os iões de prata geraram espécies reativas de oxigénio (ROS) e danificaram a membrana celular.

---

---

As células bacterianas sofreram mudanças morfológicas como encolhimento do citoplasma e descolamento de íons de potássio.

---

Com o intuito de conferir à hidroxiapatite propriedades antibacterianas, a dopagem com prata é uma aposta promissora para reduzir o risco de infecções.

## 2.7. Dopagem da hidroxiapatite com prata

Existem várias técnicas de síntese aplicáveis à produção de hidroxiapatite dopada, tais como a precipitação química em solução [2,81-83], a técnica de sol-gel [1], a síntese por micro-ondas [84], a síntese hidrotermal [7,81] e a troca iônica [2]. Para introdução de novos elementos na hidroxiapatite, como a prata, o estrôncio ou o magnésio, alguns autores utilizaram o método da irradiação ultrassônica [10] e o método hidrotérmico [7, 85].

No contexto do presente trabalho recorrer-se-á às técnicas de precipitação química e de troca iônica para obter hidroxiapatite dopada com prata. Na literatura é referido que na nano hidroxiapatite dopada com prata através da síntese por precipitação química, os íons de prata difundem menos rapidamente do que na dopagem por processo de troca iônica [2], sendo necessário averiguar as taxas de libertação dos íons de prata, para perceber para que tipo de aplicações deve ser usado um ou outro processo. As diferenças de ação entre os dois métodos estão ilustradas na figura 2.1.

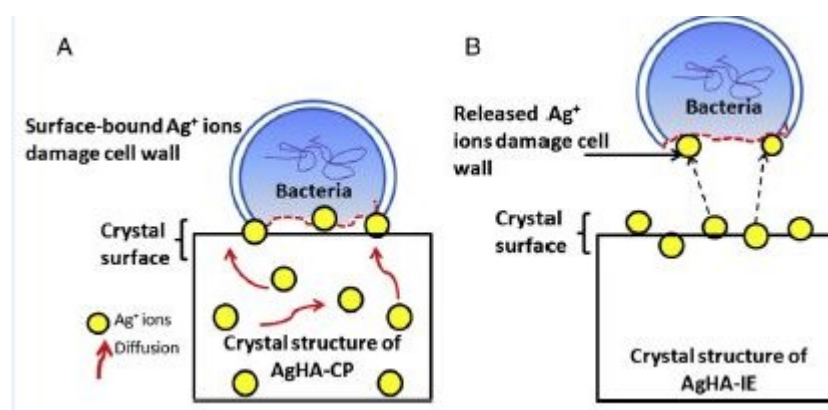
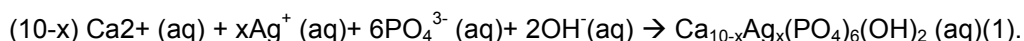


Figura 2.2 - Esquema ilustrativo da ação antibacteriana da hidroxiapatite dopada com prata pelos dois métodos propostos: (A) por Precipitação e (B) por troca iônica. Adaptado de [2].

Nas secções que se seguem abordam-se detalhadamente essas técnicas.

### 2.7.1. Método de Precipitação

O método de precipitação é um dos métodos mais utilizados para produzir hidroxiapatite  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  e hidroxiapatite dopada com prata  $[Ca_{10-x}Ag_x(PO_4)_6(OH)_2]$ . A incorporação dos iões de prata na apatite pode ser globalmente descrita pela Eq. (1):



Onde x é a quantidade molar de prata a ser incorporada.

Esta modificação mantém a relação atómica  $[(Ca+Ag)/P]$  em 1,67.

Os reagentes precursores que são mais frequentemente utilizados são o nitrato de prata ( $AgNO_3$ ), o nitrato de cálcio tetra-hidratado ( $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ), e o di-hidrogenofosfato de amónia ( $(NH_4)_2HPO_4$ ). O precursor da prata é inicialmente adicionado sob agitação constante ao precursor de cálcio, pois a prata deve supostamente substituir o cálcio. Durante o método da precipitação, o precursor de fosfato é adicionado gota a gota à mistura, e agitado durante várias horas para a reação ocorrer antes da solução envelhecer. Para prevenir a agregação e controlar o pH pode ser utilizado ácido cítrico ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ). As misturas são geralmente preparadas à temperatura ambiente [2,81,82]. A literatura reportou que para teores de prata até  $x=0,3$  não ocorreram segundas fases, e que os parâmetros de rede tendem a aumentar com o aumento dos teores de prata [84].

### 2.7.2. Método de troca iónica

Para este método, a hidroxiapatite dopada com prata pelo método da troca iónica é sintetizada por imersão da hidroxiapatite fornecida pela empresa FLUIDINOVA numa solução de nitrato de prata. Dá-se o processo de troca iónica dos iões de prata por iões de cálcio. [2]. Estas reações são muito rápidas e o equilíbrio é atingido ao fim de poucos minutos [86]. As reações serão conduzidas a temperatura ambiente.



## Bibliografía

- [1] Miranda, M.; Fernández, A.; Díaz, M.; Esteban-Tedeja, L.; López-Esteban, S.; Malpartida, F.; Torrecillas, R.; Moya, J. - Silver-hydroxyapatite nanocomposites as bactericide and fungicide materials. *International Journal of Materials Research*. 101:1 (2010).
- [2] Lim, P. N.; Chang, L.; Thian, E. S. - Development of Nanosized Silver-Substituted Apatite for Biomedical Applications: A Review. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. . ISSN 1549-9642. 11:6 (2015) 1331–1344. doi: 10.1016/j.nano.2015.03.016.
- [3] Dubnika, A. *et al.* - Impact of sintering temperature on the phase composition and antibacterial properties of silver-doped hydroxyapatite \*. *Pure and Applied Chemistry*. ISSN 0033-4545. 85:2 (2013) 453–462. doi: 10.1351/PAC-CON-12-08-12.
- [4] Dubnika, A.; Zalite, V. - Preparation and characterization of porous Ag doped hydroxyapatite bioceramic scaffolds. *Ceramics International*. . ISSN 02728842. 40:7 (2014) 9923–9930. doi: 10.1016/j.ceramint.2014.02.088.
- [5] Laranjeira, M. S.; Fernandes, M. H.; Monteiro, F. J. - Innovative macroporous granules of nanostructured-hydroxyapatite agglomerates: Bioactivity and osteoblast-like cell behaviour. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. ISSN 15493296. 95:3 A (2010) 891–900. doi: 10.1002/jbm.a.32916.
- [6] Dubnika, A. *et al.* - Evaluation of the physical and antimicrobial properties of silver doped hydroxyapatite depending on the preparation method. *Journal of materials science. Materials in medicine*. ISSN 1573-4838. 25:2 (2014) 435–44. doi: 10.1007/s10856-013-5079-y.
- [7] Geng, Z. *et al.* - Strontium incorporation to optimize the antibacterial and biological characteristics of silver-substituted hydroxyapatite coating. *Materials Science and Engineering: C*. ISSN 09284931. 58:2016) 467–477. doi: 10.1016/j.msec.2015.08.061.
- [8] Lim, P. N. *et al.* - Synthesis and characterization of silver/silicon-cosubstituted nanohydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. . ISSN 15524973. 100B:1 (2012) 285–291. doi: 10.1002/jbm.b.31951.
- [9] Miao, S. *et al.* - Sol–gel preparation of Zn-doped fluoridated hydroxyapatite films. *Surface and Coatings Technology*. ISSN 02578972. 198:1-3 (2005) 223–226. doi: 10.1016/j.surfcoat.2004.10.026.
- [10] Gopi, D.; Shinyjoy, E.; Kavitha, L. - Synthesis and spectral characterization of silver/magnesium co-substituted hydroxyapatite for biomedical applications. *Spectrochimica*

- [11] Uskokovic, V.; Uskokovic, D. "Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents". *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* 96B, 151-191, (2011).
- [12] Dorozhkin, S. "Nanodimensional and Nanocrystalline Apatites and Other Calcium Orthophosphates in Biomedical Engineering, Biology and Medicine". *Materials* 2, 1975-2045, (2009).
- [13] Ciobanu, C. *et al.* - Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanoscale Research Letters*. . ISSN 1556-276X. 7:1 (2012) 324. doi: 10.1186/1556-276X-7-324.
- [14] Junqueira, L. C.; Carneiro, J. (2003). Foltin, Janet; Lebowitz, Harriet; Boyle, Peter J., eds. *Basic Histology, Text & Atlas* (10th ed.). McGraw-Hill Companies. p. 144. ISBN 0-07-137829-4
- [15] Palmer, L.; Newcomb, C.; Kaltz, S.; Spoerke, E.; Stupp, S. "Biomimetic Systems for Hydroxyapatite Mineralization Inspired By Bone and Enamel". *Chem Rev.* 108, 4754-4783, (2008).
- [16] Lijun; Wang; George. "Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution". *Chem Rev.* 108, 4628-4669, (2008).
- [17] Elliott, J. C.; Wilson, R. M. and Dowker, S. E. P. "Apatite structures". *JCPDSInternational Centre for Diffraction Data* 45, 172-181, (2002).
- [18] Kay, M.; Young, R.; Posner, A. "Crystal structure of Hydroxyapatite". *Nature* 204, 1050-1052, (1964).
- [19] Corno, M.; and Rimola, A.; Bolis, V.; Ugliengo, P. "Hydroxyapatite as a key biomaterial: quantum-mechanical simulation of its surfaces in interaction with biomolecules". *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 6309-6329, (2010).
- [20] Leeuw, N.H. "Computer simulations of structures and properties of the biomaterial hydroxyapatite". *J. Mater. Chem* 20, 5376-5389, (2010).
- [21] Dorozhkin, S. "Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates". *Acta Biomaterialia* 6, 715-734, (2010).
- [22] Kuriakose, T.; Kalkura, S.; Narayana; Palanichamy, M.; Arivuoli, D.; Dierks, Karsten; Bocelli, G.; Betzel, C. "Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature". *Journal of Crystal Growth* 263, 517-523, (2004).



- [23] Pang, Y. X.; Bao, X. "Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles". *Journal of the European Ceramic Society* 23, 1697-1704, (2003).
- [24] Guangsheng, G.; Sun, Y.; Wang, Z.; Hongyou, G. "Preparation of hydroxyapatite nanoparticles by reverse microemulsion". *Ceramics International* 31, 869-872, (2005).
- [25] Liu, H. S.; Chin, T. S.; Lai, L. S.; Chiu, S. Y.; Chung, K. H.; Chang, C. S. and Lui, M. T. "Hydroxyapatite synthesized by a simplified hydrothermal method". *Ceramics International* 23, 19-25, (1997).
- [26] Yeong, K.; Wang, J.; Ng, S. "Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO<sub>4</sub>". *Biomaterials* 22, 2705-2712, (2001).
- [27] Youliang, H.; Hongsong, F.; Li, B.; Bo, G.; Ming, L.; Xingdong, Z. "Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphate nanoceramics". *Materials Science and Engineering R* 70, 225-242, (2010).
- [28] Wang, Y.; Lai, C.; Wei, K.; Tang, S. "Influence of temperature, ripening time, and cosurfactant on solvothermal synthesis of calcium phosphate nanobelts". *Materials Letters* 59, 1098-1104, (2005).
- [29] Liu, D.; Yang, Q.; Troczynski, T.; Tseng, W. "Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite". *Biomaterials* 23, 1679-1687, (2002).
- [30] Bigi, A.; Boanini, E. and Rubini, K. "Hydroxyapatite gels and nanocrystals prepared through a sol-gel process". *Journal of Solid State Chemistry* 177, 3092-3098, (2004).
- [31] Zhai, Y.; Cui, F. Z. and Wang, Y. "Formation of nano-hydroxyapatite on recombinant human-like collagen fibrils". *Current Applied Physics* 5, 429-432, (2005).
- [32] Sun, Y.; Guo, G.; Wang, Z.; Hongyou, G. "Synthesis of single-crystal HAP nanorods". *Ceramics International* 32, 951-954, (2006).
- [33] Riman, R.; Suchanek, W. L.; Byrappa, K.; Chen, C.; Shuk, P.; Charles S. "Solution synthesis of hydroxyapatite designer particulates". *Solid State Ionics* 151, 393-402, (2002).
- [34] Liu, J.; Li, K.; Wang, H.; Zhu, M.; Yan, H. "Rapid formation of hydroxyapatite nanostructures by microwave irradiation". *Chemical Physics Letters* 396, 429-432, (2004).

- [35] Lin, K.; Chang, J.; Cheng, R. and Ruan, M. "Hydrothermal microemulsion synthesis of stoichiometric single crystal hydroxyapatite nanorods with mono-dispersion and narrow-size distribution". *Materials Letters* 61, 1683-1687, (2007).
- [36] Han, J.; Song, H.; Saito, F.; Lee, B. "Synthesis of high purity nano-sized hydroxyapatite powder by microwave-hydrothermal method". *Materials Chemistry and Physics* 99, 235-239, (2006).
- [37] Rivera, P.; Gil; Dominik, H.; Loretta, L.; Sasse, D.; Parak, W. "Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds". *Pharmacological Research* 62, 115-125, (2010).
- [38] Olaf, K.; Fuhrmann, R.; Alt, V.; Noll, T.; Coskun, V.; Dingeldein, E.; Schnettler, R.; Franke, R. "Plasma transglutaminase factor XIII induces microvessel ingrowth into biodegradable hydroxyapatite implants in rats". *Biomaterials* 26, 1819-1827, (2005).
- [39] Matthias, W. Laschke; K, Witt; T., Pohlemann; Michael, D. "Injectable Nanocrystalline Hydroxyapatite Paste for Bone Substitution: In Vivo Analysis of Biocompatibility and Vascularization". *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 494-505, (2007).
- [40] Legeros, R.Z. "Calcium Phosphate Materials in Restorative dentistry: a review". *Advances in Dental Research* 2, 164-180, (1988).
- [41] Galler, Kerstin M.; D'Souza, Rena N. and Hartgerink, Jeffrey D. "Biomaterials and their potential applications for dental tissue engineering". *Journal of Materials Chemistry* 20, 8730-8746, (2010).
- [42] Yamagishi, K.; Onuma, K.; Suzuki, T.; Okada, F.; Tagami, J.; Otsuki, M.; Senawangse, P. "Materials chemistry: A synthetic enamel for rapid tooth repair". *Nature* 433, 819-819, (2005).
- [43] Arcís, R. W.; López-Macipe, A.; Toledano, M.; Osorio, E.; Rodríguez-Clemente, R.; Fanovich, M.; Pascual, C. "Mechanical properties of visible light-cured resins reinforced with hydroxyapatite for dental restoration". *Dental Materials* 18, 49-57, (2002).
- [44] Santos, M.; Furtado, R.; Konai, M.; Castiglioni, M.; Marchetti, R.; Silva, C. and Natour, J. "Effectiveness of radiation synovectomy with Yttrium-90 and Samarium-153 particulate hydroxyapatite in rheumatoid arthritis patients with knee synovitis: a controlled, randomized, doubleblinded trial". *Clinical Rheumatology* 30, 77-85, (2011).

- [45] Epple, M.; Ganesan, K.; Heumann, R.; Klesing, K.; Kovtun, A.; S. Neumann; V. Sokolova. "Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine". *J. Mater. Chem.* 20, 18-23, (2010).
- [46] Tomada, K.; Hidehiko, A.; Takatomo, N., Kimiko M. "Hydroxyapatite particles as drug carriers for proteins". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 76, 226-235, (2010).
- [47] Klesing, J.; Chernousova, S.; Kovtun, A.; Neumann, S.; Ruiz, L.; Gonzalez-Calbet, J. M.; Vallet-Regi, M.; Heumann, R. and Epple, M. "An injectable paste of calcium phosphate nanorods, functionalized with nucleic acids, for cell transfection and gene silencing". *Journal of Materials Chemistry* 20, 6144-6148, (2010).
- [48] Santos, C.; Rovath, C.F.; Franke, R.; Almeida, M.M.; Costa, M.E. "Spray-dried hydroxyapatite-5-Fluorouracil granules as a chemotherapeutic delivery system". *Ceramics International* 35, 509-513, (2009).
- [49] Scharnweber, T.; Santos, C.; Franke, R.; Almeida, M. and Costa, M. "Influence of Spray-dried Hydroxyapatite-5-Fluorouracil Granules on Cell Lines Derived from Tissues of Mesenchymal Origin". *Molecules* 13, 2729-2739, (2008).
- [50] Welzel, T. andl. Radtke, W. Meyer-Zaika, R. Heumann, M. Epple. "Transfection of cells with custom-made calcium phosphate nanoparticles coated with DNA". *J. Mater. Chem* 14, 2213-2217, (2004).
- [51] Akahane, M.; Ohgushi, H.; Kuriyama, S.; Akahane, T. and Takakura, Y. "Hydroxyapatite ceramics as a carrier of gene-transduced bone marrow cells". *Journal of Orthopaedic Science* 7, 677-682, (2002).
- [52] Xu, Z.; Zeng, Q.; Lu, G.; Yu, Y. "Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery". *Chemical Engineering Science* 61, 1027 – 1040, (2006).
- [53] Dorozhkin, S. V. "Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine," *Materials*, vol. 2, no. 2, pp. 399–498, 2009.
- [54] Kannan, S.; Goetz-Neunhoeffler, F.; Neubauer, J.; Ferreira, J.M.F. "Ionic substitutions in biphasic hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate mixtures: structural analysis by Rietveld refinement," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 91, no. 1, pp. 1–12, 2008.
- [55] Aina, V.; Lusvardi, G.; Annaz, B. et al., "Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effect of doped ions on the structure and chemico-physical properties," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 23, no. 12, pp. 2867–2879, 2012.

- [56] Barallet, J.; Best, S.; Bonefield, W. "Carbonate substitution in precipitated hydroxyapatite: an investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 41, no. 1, pp. 79–86, 1998.
- [57] Oh, K.; Kim, K.; Jeong, Y.; Choa, Y.H. "Effect of fabrication processes on the antimicrobial properties of silver doped nano-sized HAp," *Key Engineering Materials*, vol. 240–242, pp. 583–586, 2003.
- [58] Su, B.; Xiong, Z. "Preparation of antibacterial ceramics with silver-carrying nano-hydroxyapatite," *Key Engineering Materials*, vol. 336–338, pp. 1563–1566, 2007.
- [59] Palcevskis, E.; Dindune, A.; Dekhtyar, Y.; Polyaka, N.; Veljovic, D.; Sammons, R. "The influence of surface treatment by hydrogenation on the biocompatibility of different hydroxyapatite materials," *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 23, no. 1, Article ID012032, 2011.
- [60] Webster, T.; Ergun, T.; Doremus, R.; Bizios, R. "Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. II. Mechanisms of osteoblast adhesion," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 59, no. 2, pp. 312–317, 2002.
- [61] A. Bigi, E. Boanini, C. Capuccini, and M. Gazzano, "Strontium substituted hydroxyapatite nanocrystals," *Inorganica Chimica Acta*, vol. 360, no. 3, pp. 1009–1016, 2007.
- [62] Choi, J.; Cho, H.; Kwak, E. et al., "Effect of Ag-doped hydroxyapatite as a bone filler for inflamed bone defects," *Key Engineering Materials*, vol. 254–256, pp. 47–50, 2004.
- [63] Osman, D.; Waldron, K.; Denton, H. et al., "Copper homeostasis in *Salmonella* is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 33, pp. 25259–25268, 2010.
- [64] Soutourina, O.; Dubrac, S.; Poupel, O.; Msadek, T.; Martin-Verstraete, I. "The pleiotropic CymR regulator of *Staphylococcus aureus* plays an important role in virulence and stress response," *PLoS Pathogens*, vol. 6, no. 5, article e1000894, 2010.
- [65] Wolschendorf, F.; Ackart, D.; Shrestha, T.; et al., "Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 4, pp. 1621–1626, 2011.
- [66] Babu, U.; Failla, M. L. "Respiratory burst and candidacidal activity of peritoneal macrophages are impaired in copper deficient rats," *Journal of Nutrition*, vol. 120, no. 12, pp. 1692–1699, 1990.

- [67] Thian, E. S.; Konishi, T.; Kawanobe, Y.; et al., "Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced, bioactivity and antibacterial properties," *Journal of Materials Science, Materials in Medicine*, vol. 24, no. 2, pp. 437–445, 2013.
- [68] Thian, E. S.; Lim, P. N.; Shi, Z.; Tay, B. Y.; Neoh, K. G. "Silver-doped apatite as a bioactive and an antimicrobial bone material," *Key Engineering Materials*, vol. 493-494, pp. 27–30, 2012.
- [69] Fielding, G. A.; Roy, M.; Bandyopadhyay, A.; Bose, S. "Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings," *Acta Biomaterialia*, vol. 8, no. 8, pp. 3144–3152, 2012.
- [70] Dubnika, A. *et al.* - Evaluation of the physical and antimicrobial properties of silver doped hydroxyapatite depending on the preparation method. *Journal of materials science. Materials in medicine*. . ISSN 1573-4838. 25:2 (2014) 435–44. doi: 10.1007/s10856-013-5079-y.
- [71] Darouiche, R.O. - Anti-infective efficacy of silver-coated medical prostheses. *Clin Infect Dis* (1999); 29:1371-7.
- [72] Chen, W.; Liu, Y.; Courtney, H.S.; Bettenga, M.; Agrawal, C.M.; Bumgardner, J.D. et al. - In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron cosputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials* (2006); 27:5512-7.
- [73] Holt, K.B.; Bard, A.J. - Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: An electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag<sup>+</sup>. *Biochemistry* (2005); 44:13214-23.
- [74] Liau, S.Y.; Read, D.C.; Pugh, W.J.; Furr, J.R.; Russell, A.D. - Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: Relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett Appl Microbiol* (1997); 25:279-83.
- [75] Russel, A.D.; Hugo W.B. - Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem* (1994); 31:351-70.
- [76] Petering, H.G. - Pharmacology and toxicology of heavy metals: Silver. *Pharmacol Ther A* (1976); 1:127-30.
- [77] Raffi, M.; Hussain, F.; Bhatti, T.; Akhter J.; Hameed, A.; Hasan, M. - Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224. *J Mater Sci Technol* (2008); 24:192-6.
- [78] Hwang, E.; Lee, J.; Chae, Y.; Kim, Y.; Kim, B.; Sang, B.; et al. - Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. *Small* (2008); 4:746-50.

- [79] Choi, O. H. - Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ Sci Technol* (2008); 42:4583-8.
- [80] Kim, J.;Kuk, E.; Yu K; Park, S.; Lee, H.; et al. – Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med* (2007); 3:95-101.
- [81] Santos, C. *et al.* - Relevance of the sterilization-induced effects on the properties of different hydroxyapatite nanoparticles and assessment of the osteoblastic cell response. *Journal of The Royal Society Interface*. . ISSN 1742-5689. 9:77 (2012) 3397–3410. doi: 10.1098/rsif.2012.0487.
- [82] Martins, M. A. *et al.* - Hydroxyapatite micro- and nanoparticles: Nucleation and growth mechanisms in the presence of citrate species. *Journal of Colloid and Interface Science*. . ISSN 00219797. 318:2 (2008) 210–216. doi: 10.1016/j.jcis.2007.10.008.
- [83] Dubnika, A.; Rudovica, V. - Evaluation of Silver Ion Bioavailability from Silver Doped Hydroxyapatite. *Key Engineering Materials*. ISSN 1662-9795. 604:2014) 200–203. doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.604.200.
- [84] N. Rameshbabu; T.S. Sampath Kumar. (2006). Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization. *J. Biomed. Mater. Res. A*.<http://doi.org/10.1002/jbm.a.30958>
- [85] Shi, C. *et al.* - Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity. *Materials Science and Engineering: C*. ISSN 09284931. 55:2015) 497–505. doi: 10.1016/j.msec.2015.05.078.
- [86] Gómez-Morales, J. *et al.* - Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. ISSN 09608974. 59:1 (2013) 1–46. doi: 10.1016/j.pcrysgrow.2012.11.001.

# **Capítulo 3**

## **Procedimiento Experimental**





### 3. Procedimento Experimental

Neste capítulo serão descritos os métodos de produção e dopagem de nanopartículas de Hidroxiapatite que foram utilizados no trabalho experimental realizado. Referir-se-ão também as técnicas usadas para caracterizar os materiais estudados.

#### 3.1. Síntese de HAP

A Hidroxiapatite comercial produzida na empresa FLUIDINOVA é sintetizada pelo método de precipitação química utilizando o reactor NETmix que, muito sucintamente, pode ser descrito como uma rede interligada de câmaras e canais, criando-se assim zonas de mistura e segregação, como se ilustra nas figuras 3.1 e 3.2 [1].

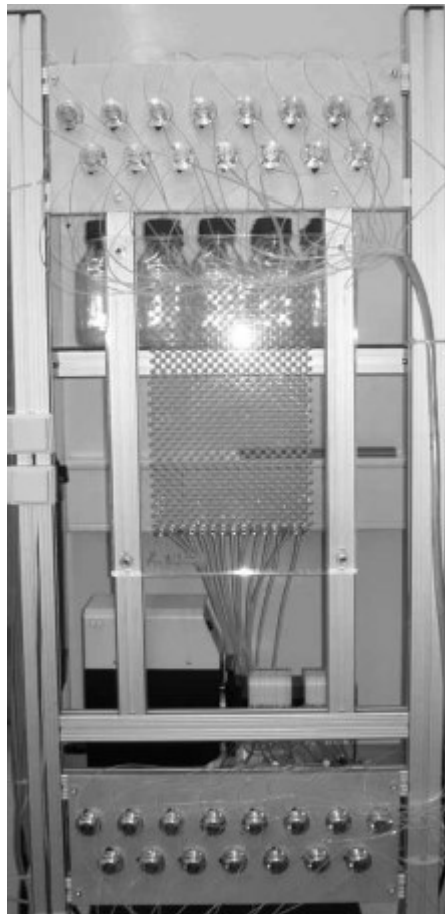


Figura 3.1- Fotografia do Reactor NETmix.

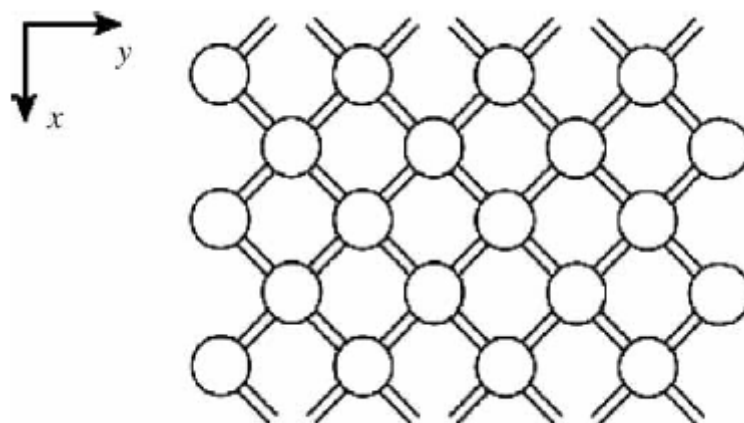


Figura 3.2- Ilustração da estrutura do reactor NETmix, evidenciando a rede de câmaras e canais que compõem o reactor.

O reactor permite que a reacção ocorra com elevada intensidade, em espaços pequenos e controlados, quando comparada com uma precipitação levada a cabo num recipiente laboratorial munido de agitação magnética normal. O fenómeno de micro-mistura que é salvaguardado no reactor NETmix, regula a mistura ao nível moléculas, à escala onde as reacções ocorrem, e é um factor chave na determinação das propriedades da hidroxiapatite, como pureza, cristalinidade e morfologia [1].

Foram preparadas duas soluções para alimentar o reactor NETmix para produzir HAP comercial (HAP\_F): A solução A (Ca, H<sub>2</sub>O) e a solução B (P, KOH e H<sub>2</sub>O). Na solução A utilizou-se cloreto de cálcio [CaCl<sub>2</sub>] (0,5M), e na solução B fosfato monopotássico [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] (0,3M) e hidróxido de potássio [KOH] (numa concentração protegida por segredo industrial da empresa). As soluções foram preparadas em água desionizada. As molaridades dos reagentes conferem uma razão Ca/P estequiométrica de 1,67. O reactor NETmix leva as soluções por uma rede de canais e câmaras esféricas onde as soluções se encontram e reagem, conduzindo a suspensão final até um terceiro terminal, onde esta é recolhida. O tempo médio da reacção foi de 5 minutos. Todas as reacções decorreram a temperatura ambiente. Seguindo as directrizes utilizadas na empresa, as suspensões ficaram a envelhecer durante 24 h. No dia seguinte, as misturas foram centrifugadas a 10000 rpm durante 45 minutos e lavadas várias vezes até a

condutividade elétrica do líquido sobrenadante ser inferior a 700mS/cm, de forma a eliminar iões solúveis indesejáveis.

Devido ao facto de a prata reagir com o cloro, formando um precipitado muito pouco solúvel, AgCl, cujo produto de solubilidade ( $K_{sp}$ ) é de  $1.8 \times 10^{-10}$ , e de modo a evitar este problema, foi produzida hidroxiapatite pelo mesmo processo, apenas substituindo o precursor de cálcio, utilizando nitrato de cálcio tetrahidratado  $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2] \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (HAP\_N), na mesma concentração molar. O objectivo é verificar que alterações podem ocorrer no produto final ao alterar o reagente de cálcio, tendo em conta que é preferível utilizar nitrato de cálcio tetrahidratado para produção de amostras dopadas precipitadas, cujo procedimento esta relatado na secção seguinte.

## **3.2. Síntese de nano hidroxiapatite dopada com prata**

### **3.2.1. Precipitação Química**

Os reagentes utilizados na síntese de hidroxiapatite dopada com prata,  $[\text{Ca}(10-x)\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  foram: Nitrato de cálcio tetra hidratado  $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2] \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ; nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ); fosfato monopotássico  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  e hidróxido de potássio  $[\text{KOH}]$ . Foram preparadas duas amostras por este processo, com fracções molares de prata de  $x=0,05$  e  $x=0,5$  designadas respectivamente por HAP\_P\_0,05 e HAP\_P\_0,5. Para a amostra com o teor de prata  $x=0,05$  as concentrações foram de 0,4975M para o cálcio, 0,0025M para prata, 0,300M para o fósforo, e uma concentração protegida por segredo industrial da empresa para o hidróxido de potássio. Para a amostra  $x=0,5$  as concentrações foram de 0,475M para o cálcio, 0,025M para a prata, 0,300M para o fósforo, e uma concentração protegida por segredo industrial da empresa para o hidróxido de potássio. Para ambas as amostras, a soma das concentrações do reagente de cálcio com o reagente de prata é de 0,5M, mantendo a relação estequiométrica  $(\text{Ca}+\text{Ag})/\text{P}$  em 1,67.

De forma semelhante ao processo de produção de hidroxiapatite comercial, foram preparadas duas soluções para alimentar o reactor NETmix: A solução A

(Ca, Ag e H<sub>2</sub>O) e a solução B (P, KOH e H<sub>2</sub>O). As soluções foram dissolvidas em água desionizada. O tempo médio da reação foi de 5 minutos. Todas as reacções decorreram a temperatura ambiente. As suspensões ficaram a envelhecer durante 24 h. Posteriormente foram centrifugadas a 10000 rpm durante 45 minutos e lavadas várias vezes até a sua condutividade elétrica do líquido sobrenadante ser inferior a 700mS/cm.

Todos estes procedimentos foram realizados na empresa FLUIDINOVA, S.A. (Maia).

### **3.2.2. Troca Iónica**

Preparou-se inicialmente, uma solução aquosa de 360 mL de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), pesando a quantidade de reagente necessária para obter uma dada concentração molar (0,001 M e 0,005M) na mistura final que resultará da adição da presente solução de AgNO<sub>3</sub> a um determinado volume de suspensão de hidroxiapatite comercial produzida pela empresa FLUIDINOVA.

Para o caso da concentração final 0,001M a concentração da solução inicial de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) foi de 0,0015M; e no caso da concentração final 0,005M, a concentração da solução inicial de nitrato de prata foi de 0,0075M.

A mistura final foi preparada do seguinte modo: depois de preparada a solução inicial de nitrato de prata e de mantida sob agitação magnética durante 5 min, adicionou-se-lhe 240 mL de suspensão de hidroxiapatite FLUIDINOVA a 5% (12g total), deixando a mistura obtida sob agitação magnética durante 1 hora e 30 minutos. O pH foi ajustado para 9.2 durante a reação, com hidróxido de amónia (NH<sub>4</sub>OH) de modo a promover a estabilidade da suspensão, procurando evitar a aglomeração das partículas. A suspensão final foi centrifugada a 10000 rpm durante 15min, descartando-se o sobrenadante, e recolhendo-se as partículas. As amostras dopadas por troca iónica serão denominadas de acordo com a concentração molar de prata inicial na suspensão, HAP\_Ti\_0,001 e HAP\_Ti\_0,005.

No método da troca iónica, todo o procedimento experimental decorre na ausência de luz, devido ao facto de a prata ser fotoreactiva [2]. Para tal a janela

da Hotte é protegida com material opaco de modo a evitar a presença de luz durante a reação, como se documentana figura 3.3.



Figura 3.3 - Isolamento da Hotte e de recipiente com suspensão.

A nomenclatura das amostras produzidas por todos os métodos e suas condições de preparação encontram-se identificadas na tabela 3.1:

Tabela 3.1 – Nomenclatura das amostras de hidroxiapatite em estudo.

Método de preparação	Código da amostra	Reagente Precursor calcio	Teor de Prata no precipitado (x)	Teor de prata na solução de troca iónica
Precipitação Química	HAP_F	CaCl <sub>2</sub>	-----	-----
	HAP_N	[Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].4 H <sub>2</sub> O	-----	-----
	HAP_P_0,05	[Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].4 H <sub>2</sub> O	0,05	-----
	HAP_P_0,5	[Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].4 H <sub>2</sub> O	0,5	-----
Troca Iónica	HAP_Ti_0,001	-----	-----	0,001 M
	HAP_Ti_0,005	-----	-----	0,005 M
	HAP_Ti_0,01	-----	-----	0,01M

### 3.3. Caracterização dos materiais

No presente estudo, os materiais produzidos foram analisados por diversas técnicas de caracterização. As suspensões e os precipitados obtidos pelos dois métodos foram secos a 110°C durante 72 horas, e posteriormente moídos, de modo a obter os pós para caracterização.

#### 3.3.1. Difracção de raios X

A difracção de raios X é uma técnica não destrutiva que permite identificar as fases cristalinas, de uma amostra. Através desta análise é possível determinar também o tamanho de cristalite e parâmetros de rede. [3]

A incidência de um feixe de raios X no material a analisar, com átomos regularmente espaçados, faz com que cada átomo se torne uma fonte de radiação. As ondas emitidas pelos átomos originam interferências construtivas e destrutivas. Um feixe difractado resulta de uma interferência construtiva, pois apenas as interferências construtivas produzem máximos de difracção (picos) [4]. A condição da interferência construtiva é obtida através da lei de Bragg (equação 3.3) que estabelece a relação entre os ângulos de difracção e os espaços interplanares.

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad 3.1$$

Nesta equação,  $n$  corresponde ao número de ordem de difracção;  $\lambda$  ao comprimento de onda da radiação,  $d$  a distância interplanar do conjunto de planos hkl (índices de miller) da estrutura cristalina, e  $\theta$  o ângulo incidente do feixe no material [4]. Na figura 3.4 é possível observar uma imagem exemplificativa da lei de bragg.

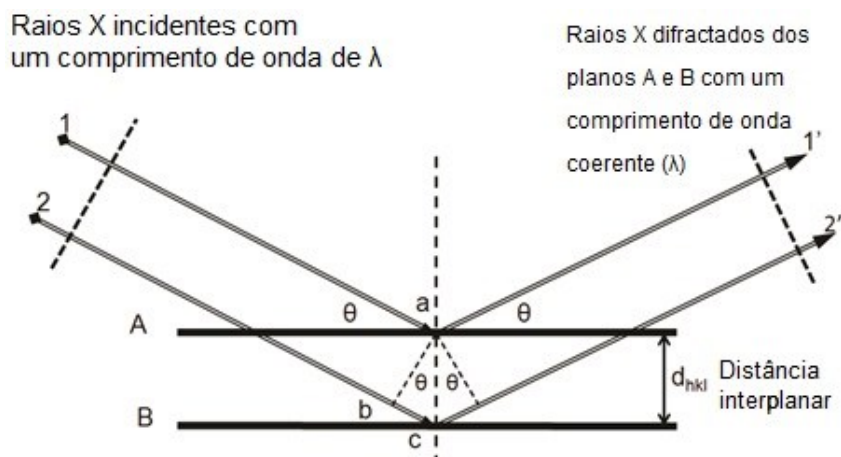


Figura 3.4 - Representação ilustrativa da lei de Bragg. Adaptado de [5].

As fases cristalinas de todos os pós foram primeiramente investigadas por difração de raios X (DRX). As medições foram feitas utilizando um difractómetro de raios X, modelo PAN alytical XPERT PRO<sup>3</sup> (figura 3.5), com uma radiação incidente Cu-K $\alpha$  de (1,5405Å).



Figura 3.5 - Difractómetro PAN alytical XPERT PRO<sup>3</sup>, disponível no departamento de engenharia de materiais e cerâmica da universidade de Aveiro.

Os difractogramas foram registados a temperatura ambiente num espectro de ângulos de varrimento  $2\theta$  de (10-80) ° em modo contínuo. A velocidade de varrimento foi de 0,02°/s. O tempo por passo foi de 200 segundos. O tempo de varrimento foi de 1h13min09s.

Os difractogramas obtidos foram comparados com o difractograma da hidroxiapatite original, de modo a verificar a existência dos picos característicos da hidroxiapatite, a existência ou não de segundas fases, e extraídos os seus parâmetros de rede para comparação com o standard da ficha PDF de a: 9.4210 Å e c: 6.8800 Å. Para efetuar o cálculo dos parâmetros de rede utilizou-se o pico [010] para obter o parâmetro a=b e o pico [002] para o parâmetro c. Para efetuar o cálculo do tamanho de cristalite utilizou-se a equação de Scherrer (equação 3.4) no pico [002].

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad 3.2$$

Onde D é o tamanho médio de cristalite; k é uma constante de forma com valores próximos da unidade.  $\lambda$  é o comprimento de onda do raio X;  $\beta$  é a largura a meia altura do pico; e  $\theta$  é o ângulo de Bragg.

### 3.3.2. Área superficial específica B.E.T. (Brunauer-Emmett-Teller)

Área superficial específica (ASE) é definida como a razão ( $m^2/g$ ) entre a área superficial absoluta entre um sólido (que inclui todas as superfícies internas acessíveis tais como poros) e a sua massa. Neste estudo, a área superficial específica foi investigada através do método Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T.). Este método consiste na determinação da quantidade de gás de adsorção ( $N^2$ ), necessário para revestir toda a superfície com uma camada monomolecular a uma temperatura igual ou próxima de 77°K, ponto de fusão do líquido de adsorção [6]. A isotérmica de adsorção através da equação B.E.T., de onde se determina a capacidade da monocamada, é dada pela seguinte equação (equação 3.5) [7].

$$\frac{P}{V_a(P_0 - P)} = \frac{c - 1}{V_M c} \times \left(\frac{P}{P_0}\right) + \frac{1}{V_M c} \quad (3.3)$$

Onde P e  $P_0$  são pressões de equilíbrio e de saturação de gás à temperatura de adsorção;  $V_a$  é o volume de gás adsorvido,  $V_M$  representa a quantidade de gás



adsorvido na monocamada, e  $c$  é a constante de BET que está associada à entalpia de adsorção do gás na amostra. O gás de adsorção apenas é fisicamente adsorvido por forças de van der Waals, e pode ser dessorvido quando a descida da pressão ocorre a mesma temperatura.

Os materiais porosos são classificados de acordo com o seu tamanho de poro e geometria: poros com menos de 2nm são denominados microporos, poros entre 2 e 50 nm são mesoporos, e poros com mais de 50 nm são macroporos.

A classificação IUPAC de isotermicas de adsorção estabelece que existem quatro tipos de histerese, H1, H2, H3 e H4, que estão ilustrados na figura 3.6.

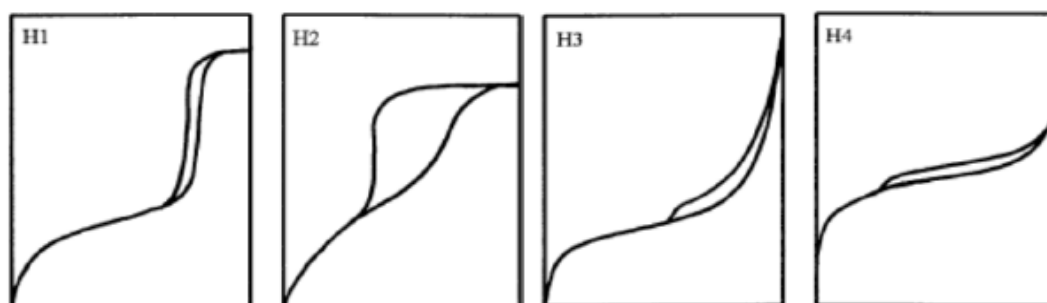


Figura 3.6 - Representação da classificação de tipos de histerese de isotérmicas de adsorção [adaptado de 8,9].

A histerese do tipo H1 está associada a materiais porosos (aglomerados ou compactos de esferas uniformes em conjunto e possuem distribuições de tamanho de poro pequenas). A histerese do tipo H2 é característica de sistemas cuja geometria e distribuição de poros não é bem definida. Existe uma diferença no processo de adsorção e dessorção, algo que ocorre em poros do tipo “garrafa”, poros com menor tamanho na superfície e maior interior no seu interior, o que explica o atraso na desorção a pressões relativas altas. O tipo de histerese H3 é característico em agregados de partículas com forma de placas, indicando poros em forma de fenda. Por fim, a histerese do H4 é associada a poros estreitos em forma de fenda, e é um indicador de microporosidade [10].

A área superficial específica foi determinada usando a isotermica multiponto Brunauer-Emmett-Teller (BET) no equipamento MICROMETRICS – Gemini 2370 V5, disponível na universidade de Aveiro (Figura 3.7). O gás de adsorção utilizado

foi nitrogénio (N<sub>2</sub>). As amostras ficaram a desgaseificar durante 24 horas, à temperatura de 120°C.



Figura 3.7 - MICROMETRICS – Gemini 2370 V5, disponível na universidade de Aveiro.

### 3.3.3. Potencial zeta

O potencial zeta é uma propriedade física que é exibida por qualquer partícula em suspensão. O seu valor depende das propriedades da superfície das partículas e do meio de suspensão, e é medido mediante aplicação de um campo eléctrico à dispersão, onde as partículas eléctricamente carregadas vão migrar para o eléctrodo da carga oposta a uma velocidade proporcional à magnitude do seu potencial zeta. A avaliação do potencial zeta é muito importante para validar a estabilidade das partículas através do estudo do seu comportamento electroforético. A relação entre a estabilidade da suspensão e o seu potencial zeta advém da repulsão mútua que ocorre entre partículas com cargas iguais, o que faz com que partículas com cargas superficiais elevadas tendam a não aglomerar.

O potencial zeta foi medido de modo a caracterizar o equilíbrio electroquímico das partículas em suspensão. A magnitude deste parâmetro fornece uma indicação da estabilidade do sistema coloidal [11].

As medições da mobilidade electroforética das partículas sintetizadas foram efectuadas a 25°C, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (malvern instruments) (figura 3.8). Este equipamento realiza a análise de potencial zeta através da combinação da velocimetria a laser baseada no efeito doppler e

análise de fase por dispersão de luz (PALS), uma técnica patenteada pela Malvern (M3-PALS) [12].

Para medir o potencial zeta de todas as amostras foi utilizada uma solução de KCl (10 mL,  $10^{-3}$  M) que foi usado como meio dispersante, para uma pequena quantidade de amostra, de modo a assegurar uma espessura de dupla camada eléctrica constante. Para ajustar os valores de pH das suspensões foi utilizada a adição de HCl (0.001 M - 0.1 M) e NaOH (0.001 M - 0.1 M), de modo a baixar e subir, respectivamente, o pH da suspensão.

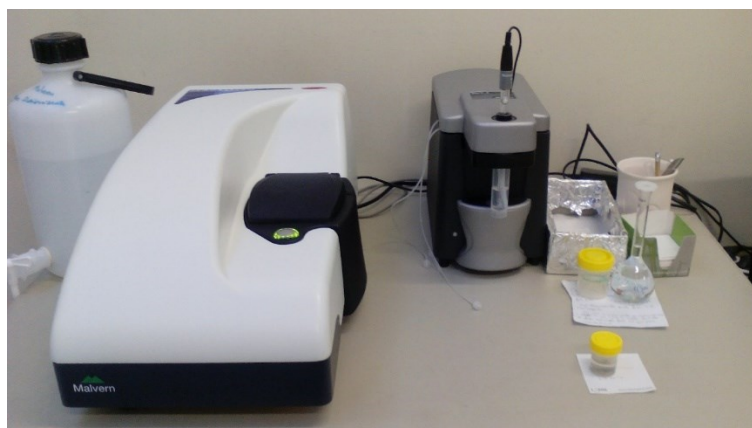


Figura 3.8 - Zetasizer Nano ZS (malvern instruments), disponível na Universidade de Aveiro.

### 3.3.4. TEM e STEM de alta resolução

O facto de ser possível, nos dias de hoje, visualizar partículas de dimensões nanométricas deve-se ao microscópio eletrónico de transmissão (TEM).

O microscópio eletrónico utiliza eletrões com energias entre os 50 - 1000 KeV para produzir imagens com notáveis ampliações. Esta técnica é utilizada para investigar a morfologia, microestrutura e propriedades químicas e cristalográficas dos materiais [13;14]. De modo a observar a morfologia das partículas nanométricas obtidas, recorreu-se a microscopia eletrónica de transmissão, utilizando o microscópio eletrónico de transmissão Hitachi H9000, e o microscópio eletrónico de alta resolução de varrimento e transmissão HD 2700 (figura 3.9).



Figura 3.9 - Microscópio eletrónico de varrimento e transmissão Hitachi HD 2700, disponível na universidade de Aveiro [15].

Para observação em STEM as grelhas foram preparadas do seguinte modo: primeiramente, as amostras foram diluídas, sendo colocada 1 a 2 gotas de suspensão em 1.5 mL de etanol para amostras não dopadas, e água desionizada para amostras dopadas, sendo efetuadas mais diluições com etanol ou água desionizada se necessário, até a suspensão estar bem diluída (sem turbidez). Estas amostras foram posteriormente submetidas a imersão num banho de ultrassons durante 30 minutos e dispersas sobre grelhas de cobre recobertas com um fino filme de carbono e ficam a secar durante 25 a 30 minutos, são recolhidas e colocadas num excicador. Toda a preparação é feita pelo menos um dia antes de as grelhas serem observadas no microscópio eletrónico.

As micrografias obtidas permitiram também, através de uma análise com recurso ao programa Image J, inferir o tamanho das partículas, e confrontar esses valores com os valores obtidos de área superficial específica.

### 3.3.6. ICP-OES

A espectroscopia de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado é uma técnica de análise química instrumental, que resulta em determinações elementares na última camada eletrónica dos elementos, baseada nos princípios da espectroscopia atómica.

Esta técnica faz uso de uma fonte de excitação de plasma de argon a alta temperatura (7000-10000 °K) para que, numa amostra introduzida sob a forma de névoa no centro do plasma, os átomos excitados emitam radiação em comprimentos de onda na faixa dos 125 a 950 nm, característicos dos elementos nela presente. As radiações emitidas, tem as suas intensidades medidas por detectores de radiação específicos e correlacionadas com as concentrações respectivas através de curvas de calibração obtidas pela medição prévia de padrões certificados de referência. Esta técnica aplica-se a todos os elementos, excepto o hidrogénio, carbono, azoto, oxigénio, enxofre, flúor, cloro, bromo e gases raros. As amostras podem estar na forma líquida, gasosa ou sólida, com limites de deteção ao nível de partes por bilião. Foram analisadas 3 amostras sólidas de hidroxiapatite dopada com prata, para determinação de teores de prata, cálcio e fosforo e 6 amostras líquidas de hidroxiapatite dopada com prata por troca iónica para determinação de variação de teores de prata no líquido sobrenadante, com objetivo de compreender a cinética de substituição de cálcio por prata ao longo do tempo.

O equipamento utilizado para a análise de ICP-OES foi o espectómetro HORIBA Jobin Yvon Activa-M (figura 3.10)



Figura 3.10 - Espectómetro HORIBA Jobin Yvon Activa-M [16].

### 3.4. Ensaio antibacterianos

Com o propósito de testar a actividade antibacteriana das amostras produzidas, foram levados a cabo ensaios antibacterianos qualitativos e quantitativos com duas estirpes de bactérias encontradas frequentemente em ambientes hospitalares, *S. aureus* (gram positiva) e *E. coli* (gram negativa). Estes ensaios foram idealizados em parceria com o Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e realizados no mesmo.

#### 3.4.1. Ensaio Qualitativos

A avaliação da actividade antibacteriana qualitativa foi baseada no método de difusão em discos [17]. Inicialmente foi feita uma repicagem da bactéria do meio de cultura sólido TSA (agar de triptona de soja), que se encontrava no frigorífico a temperatura de 4°C, para o meio líquido TSB (caldo de triptona de soja) e foi incubado a temperatura de 37°C a 130rpm durante 24h.

No dia seguinte, a suspensão de bactérias (com uma densidade óptica entre 1 e 1.2) foi espalhada em três direcções diferentes com uma zaragatoa numa placa de petri, alimentada com meio de cultura TSA. Posteriormente, com um vazador, foram criados poços no agar para colocar as amostras a testar.

Os poços foram preenchidos pelas respectivas amostras de HAP dopadas com prata (em pó) e noutra placa foi aplicado o mesmo procedimento, desta vez para o controlo (HAP\_F).

As placas foram incubadas a 37 ° C durante 24h, e a sua zona de inibição formada à volta de cada poço foi registada por fotografia.

### **3.4.2. Ensaio Quantitativo**

De modo a quantificar a cinética e capacidade antibacteriana do material, foram feitos ensaios quantitativos. Tal como no procedimento anterior, inicialmente foi feita uma repicagem da bactéria do meio sólido TSA, que se encontrava no frigorífico a temperatura de 4°C, para o meio líquido TSB e foi incubado a temperatura de 37°C a 130rpm durante 24 horas. No dia seguinte, foi feita uma diluição da suspensão de bactérias (com uma concentração inicial entre  $5 \times 10^7$  e  $10^9$  CFU (colónias formadoras de bactérias)/mL) de 1:10 em PBS (solução tampão de fosfato). Utilizou-se uma placa com 12 poços, onde foi colocada em cada poço 1mL da suspensão diluída de bactérias, e 0,1mL das amostras de HAP a testar a uma concentração de 220 mg/mL. A placa foi colocada numa plataforma de agitação a 180 rpm a 37 °C durante 6 horas. Aos tempos 0;2;4 e 6 horas foram retirados aos respectivos poços 1 mL de suspensão de bactérias com amostra de HAP, e diluídos diversas vezes em PBS de modo a obter placas com várias diluições (até  $10^{-6}$ , para permitir a contagem das colónias formadoras de bactérias). Foram semeadas duas réplicas de cada uma das diluições convenientes em placas de petri, e feitas as sementeiras por incorporação com TSA. Estas placas foram colocadas numa estufa a 37°C durante 24 horas. Este ensaio foi efetuado para as duas estirpes de bactérias (*S. aureus* e *E. coli*) e para 2 amostras dopadas por precipitação e uma amostra controlo (HAP comercial). A inativação das células foi avaliada pela quantificação das unidades formadoras de colónias por mL (CFU/mL), que representam o teor de microorganismos viáveis da estirpe bacteriana em questão. Três reduções logarítmicas comprovam que o material possui atividade antibacteriana.

## Bibliografia

- [1] -Silva, V., Quadros, P., Laranjeira, P. et al. (2008). A Novel Continuous Industrial Process for Producing Hydroxyapatite Nanoparticles A Novel Continuous Industrial Process for Producing Hydroxyapatite Nanoparticles. *Journal of Dispersion Science and Technology*, (August 2013), 37–41. <http://doi.org/10.1080/01932690701728924>
- [2] - Range, S., Hagemeyer, D., Rotan, O., Sokolova, V., Verheyen, J., Siebers, B., & Epple, M. (2015). A continuous method to prepare poorly crystalline silver-doped calcium phosphate ceramics with antibacterial properties. *RSC Adv.*, 5(54), 43172–43177. <http://doi.org/10.1039/C5RA00401B>
- [3] – Cullity, B. D.; Stock, S. R. “Elements of X-Ray Diffraction”. Third edition, ISBN: 0201610914 Published 1956 by Addison-Wesley.
- [4] – William D. Callister, *FUNDAMENTALS OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING: An Integrated Approach, International 3rd Edition*. John Wiley & Sons Inc; 3ª edição.
- [5] - Fotografia. Retrieved from <http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=40299>
- [6] – S. Brunauer, P. H. Emmett, and E. Teller, “Adsorption of Gases in Multimolecular Layers,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 60, no. 2, pp. 309–319, Feb. 1938.
- [7] - Webb, P. A., *Analytical methods in fine particle technology*. First edition, ISBN: 978-0965678308 Published 1997 by Micromeritics Instrument Corporation.
- [8] – K., Katsumi. Determination of pore size and pore size distribution. Adsorbents and catalysts. *Journal of Membrane Science* 96, 59-89, (1994).
- [9] - Rojas, F.; Kornhauser, I.; Felipe, C.; Esparza, J.M.; Cordero, S.; Dominguez, A.; Riccardo, L. "Capillary condensation in heterogeneous mesoporous networks consisting of variable connectivity and pore-size correlation". *Phys.Chem. Chem.Phys* 4, 2346-2355, (2002).
- [10] - Sing, K. S.; Everett, D. H.; Haul, R. A.; Moscou, L.; et al. "IUPAC Commission on Colloid and Surface Chemistry Including Catalysis. Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity". *Pure Appl. Chem.* 57, 603-619, (1985).
- [11] – Zeta potential – An introduction in 30 minutes. Zetasizer Nano series technical note MRK654-01.
- [12] - Malvern – Materials relationships. Brochure.
- [13] – Rolf, E. *Aberration-Corrected Imaging in Transmission Electron Microscopy: An introduction*. (Imperial College Press, 2010).



- [14] – Andreas, R. Transmission electron microscopy of semiconductor nanostructures: an analysis of composition and strain state. (2003).
- [15] - Fotografia. Retrieved from [http://www.hitachi-hightech.com/eu/product\\_detail/?pn=em-hd2700](http://www.hitachi-hightech.com/eu/product_detail/?pn=em-hd2700)
- [16] – HORIBA JOBIN YVON ACTIVA-M. (n.d.). Retrieved September 9, 2016, from [http://www.koti.szie.hu/KEMT/en\\_research\\_files/image1740.jpg](http://www.koti.szie.hu/KEMT/en_research_files/image1740.jpg)
- [17] – Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.; et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *Am. J. Clin. Pathol.* 45 (1966) 493–496.



# **Capítulo 4**

## **Resultados e discussão**



## 4. Resultados e discussão

Ao longo deste estudo, executaram-se vários ensaios de preparação de partículas e testes de caracterização de modo a caracterizar extensivamente o material em estudo, cujos resultados serão analisados e discutidos neste capítulo. Para análise, interpretação e discussão dos resultados, estes serão agrupados em amostras não dopadas (HAP\_F, e HAP\_N), dopadas por precipitação (HAP\_P\_0,05; HAP\_P\_0,5) e dopadas por troca iónica (HAP\_Ti\_0,001M; HAP\_Ti\_0,001M).

### 4.1. Composição de fases cristalinas

Todas as amostras foram primeiramente caracterizadas por difracção de raios X. Nas secções que se apresentam de seguida é possível analisar os resultados de difracção de raios X, e com base neles, determinar os parâmetros de rede e tamanhos de cristalite.

#### 4.1.1. Amostras precipitadas não dopadas

Na figura 4.1 é possível comparar os espectros de difracção de raios X (DRX) das amostras precipitadas não dopadas:

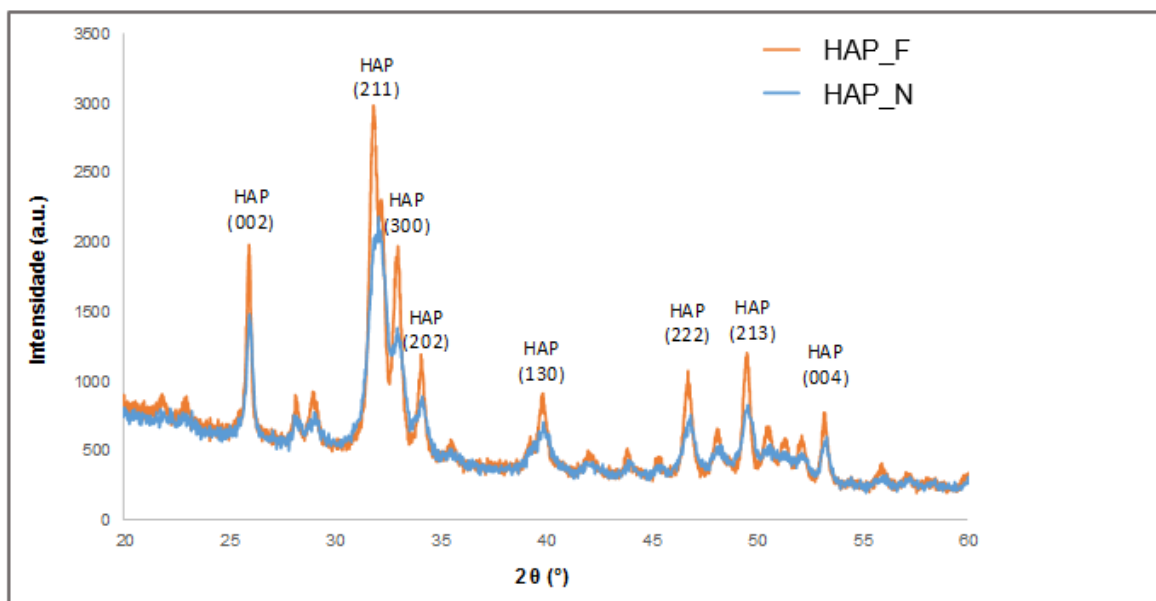


Figura 4.1 - Comparação de espectros de difracção de raios X de amostras de hidroxiapatite, não dopadas, obtidas por precipitação.

Neste gráfico é possível comparar os espectros de difração de raios X de uma amostra de HAP comercial (linha laranja) e de uma preparada com um reagente de cálcio diferente (nitrato de cálcio tetra hidratado em vez de cloreto de cálcio, linha azul). Da observação deste gráfico é possível verificar que ambas possuem todos os picos característicos da HAP, sem qualquer segunda fase. No caso da hidroxiapatite comercial (HAP\_F), este resultado está em linha com estudos anteriores realizados com o mesmo material, no qual foi demonstrado com base em resultados de DRX e de espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) que o material se trata efectivamente de hidroxiapatite [1]. Os picos da HAP preparados com nitrato de cálcio tetra hidratado não são tão intensos como os da HAP comercial [2]. Os parâmetros de rede obtidos foram os seguintes para cada amostra foram os seguintes (tabela 4.1):

Tabela 4.1 – Parâmetros de rede e tamanho de cristalite de hidroxiapatites precipitadas não dopadas.

Parâmetro	HAP_F	HAP_N	Ficha PDF (ICDD 00-064-0738)
a=b (Å)	9.3996	9,3973	9.4210
c (Å)	6.8644	6.8723	6.8800
Tamanho de cristalite (nm)	42	47	-

Os valores da tabela permitem concluir que existe uma variação muito pequena dos parâmetros de rede, utilizando precursores de cálcio diferentes. O tamanho de cristalite aumentou apenas ligeiramente na amostra que utilizou nitrato de cálcio como precursor, o que não traduz uma variação muito significativa. É possível concluir que a nível da composição de fases cristalinas, parâmetros de rede e tamanho de cristalite, a alteração do reagente de cálcio não trouxe diferenças significativas, o que está de acordo com os resultados do estudo de Karakas, et. Al. de 2012 [2], em que o autor sintetizou hidroxiapatite

utilizando ambos os reagentes, através do método precipitação utilizando como meio SBF (fluido corporal simulado), em vez de água desionizada.

#### 4.1.2. Amostras dopadas por precipitação

A figura 4.2 permite a comparação dos espectros de DRX de amostras dopadas com prata preparadas por precipitação.

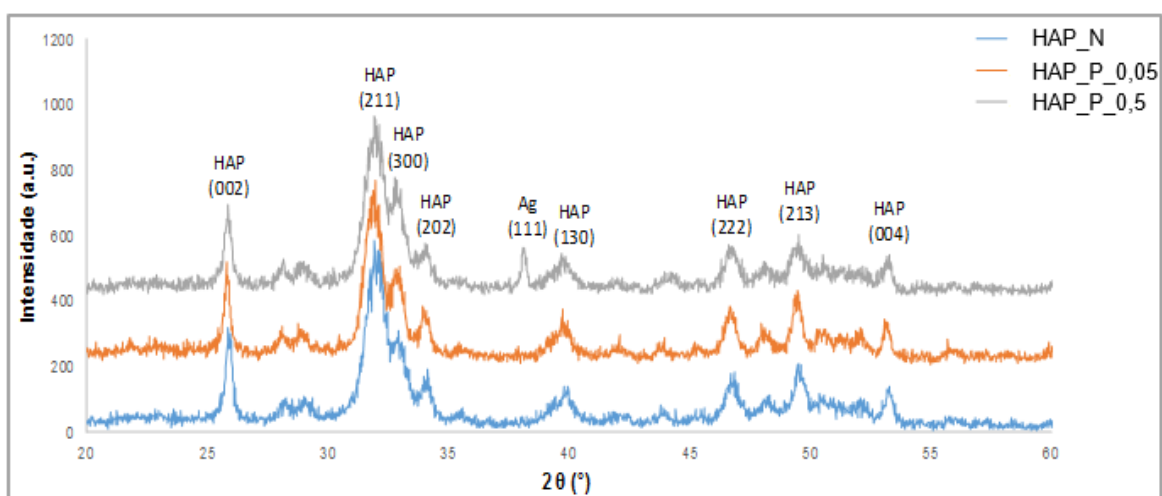


Figura 4.2 - Comparação de espectros de difração de raios X de amostras de hidroxiapatite dopadas com prata e obtidas por precipitação.

Neste gráfico fazemos a comparação dos difractogramas entre duas amostras precipitadas com prata (HAP\_P\_0,05; e HAP\_P\_0,5), e um controlo (HAP\_N). Observa-se que as três amostras, preparadas com diferentes teores de prata ( $x=0$ ;  $x=0,05$ ; e  $x=0,5$ ) possuem todos os picos característicos da HAP. No entanto, é possível verificar na amostra com maior teor de prata ( $x=0,5$ ) a presença de um pico característico de prata metálica (Ag (111)), uma segunda fase. A presença desta segunda fase significa que uma parte da prata não substituiu o cálcio na rede, o que pode ser indesejável, por conferir ao material níveis de citotoxicidade perigosos [3,4], e por isso, o interesse desta amostra é limitado. Em 2006, Rameshbabu, et al, prepararam hidroxiapatite dopada com prata pelo método de precipitação com recurso a processamento por micro-

ondas, e verificaram que, até valores de  $x=0,3$  não se observava a presença de segundas fases nos difractogramas da HAP [5], o que está em linha com os resultados obtidos no presente estudo. Os parâmetros de rede obtidos para cada amostra apresentam-se na tabela 4.2:

Tabela 4.2 - Parâmetros de rede e tamanho de cristalite de hidroxiapatites dopadas com prata, obtidas por precipitação.

Parâmetro	HAP_P_0,05	HAP_N
a=b (Å)	9.4184	9,3973
c (Å)	6.8988	6.8723
Tamanho de Cristalite (nm)	47	47

É possível observar que os parâmetros de rede aumentaram em relação à amostra controlo.

O estudo de Rameshbabu, et al, referido anteriormente, reportou que os parâmetros de rede da hidroxiapatite aumentam com a dopagem com prata, o que pode explicar-se pela substituição do ião cálcio de raio iónico 0,99Å por um ião prata de raio iónico superior (1.28Å), o que indica que a prata substituiu o cálcio na rede cristalográfica da HAP [5]. Em 2010, Staníc, et al, prepararam hidroxiapatite dopada com prata pelo método de precipitação, reportando também um aumento nos parâmetros de rede nas amostras dopadas [6]. O tamanho de cristalite determinado para a amostra dopada foi igual ao da amostra não dopada (47 nm).

#### 4.1.3. Amostras dopadas por troca iónica

A figura 4.3 permite a comparação dos espectros de DRX de 3 amostras dopadas preparadas por troca iónica com diferentes concentrações de prata (0,001M; 0,005M; e 0,01M) e uma amostra controlo (HAP\_F).



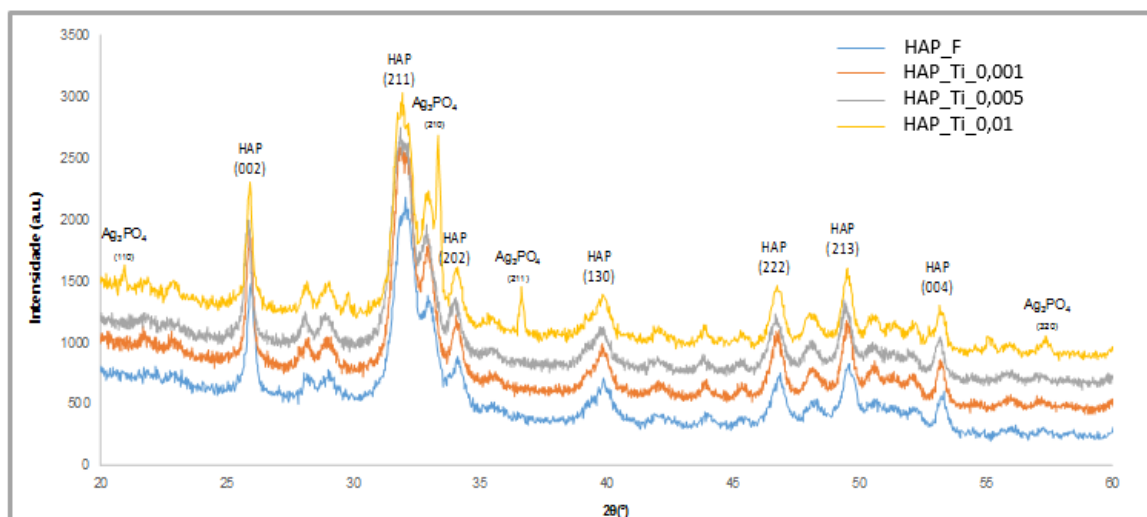


Figura 4.3 - Comparação de espectros de difração de raios X de amostras de hidroxiapatite dopadas com prata, por troca iónica.

É possível observar que todas as amostras possuem os picos característicos da HAP. No entanto, no difractograma da amostra preparada sob concentração de prata mais elevada (0,01M), existem picos característicos de uma segunda fase ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ), sendo esta excluída do estudo, por ser potencialmente citotóxica [3,4], à semelhança da amostra da secção anterior que possuía uma segunda fase, de prata metálica. Os parâmetros de rede das amostras dopadas isentas de segundas fases apresentam-se na tabela 4.3:

Tabela 4.3 – Parâmetros de rede e tamanho de cristalite de hidroxiapatites dopadas por troca iónica.

Parâmetro	HAP_Ti_0,001M	HAP_Ti_0,005M	HAP_F
a=b (Å)	9.4194	9.4419	9.3996
c (Å)	6.8767	6.8877	6.8644
Tamanho de Cristalite (nm)	42	37	42

Tal como na amostra dopada precipitada, foi possível verificar um aumento dos parâmetros de rede em relação à hidroxiapatite não dopada, sugerindo que ocorreu substituição de cálcio por prata na rede [7]. O tamanho cristalite da amostra HAP\_Ti\_0,001M foi igual ao da amostra controlo, no entanto, o tamanho de cristalite da amostra HAP\_Ti\_0,005M diminuiu ligeiramente, não sendo

considerada relevante esta variação. Não se encontrou na literatura informações sobre parâmetros de rede de hidroxiapatites dopadas por troca iônica.

## 4.2. Morfologia de partícula

A figura 4.4 compara as duas amostras precipitadas não dopadas, com o intuito de evidenciar as suas morfologias.

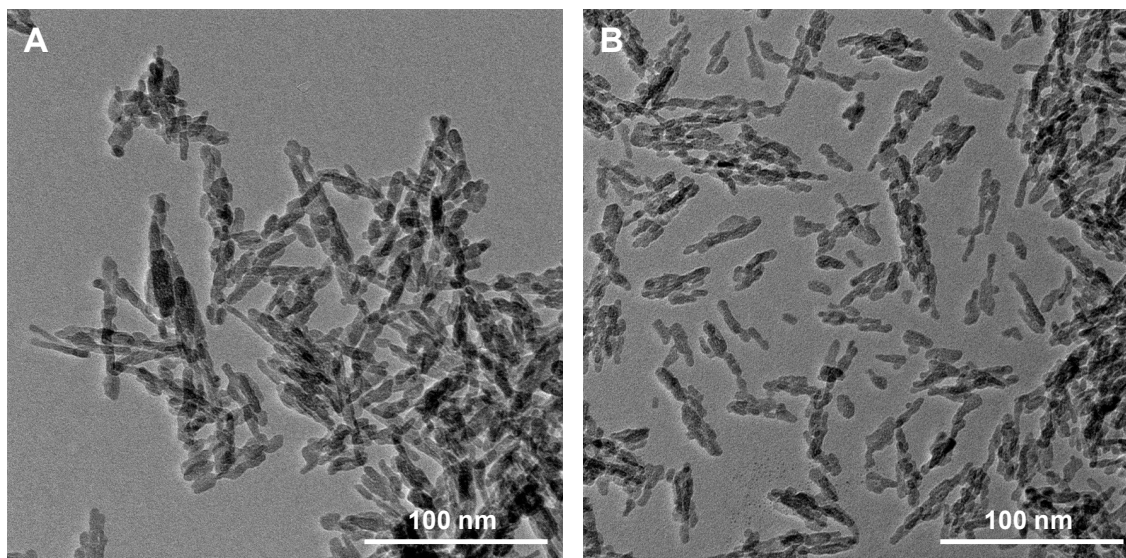


Figura 4.4 – Comparação da morfologia das partículas entre HAP\_F (A) e HAP\_N (B).

É possível constatar que as partículas das duas amostras apresentam uma morfologia (forma dotipobastonete) bastante semelhante: as partículas da imagem A têm um comprimento médio de 45 nm e uma largura média de 8 nm, enquanto que as partículas da imagem B possuem um comprimento médio de 44 nm e uma largura média de 9 nm (medidas efectuadas com recurso ao programa ImageJ). Conclui-se que a substituição do reagente de cálcio não provocou diferenças de relevo na morfologia das partículas de hidroxiapatites não dopadas. As partículas da imagem A possuem uma área superficial específica de 118 m<sup>2</sup>/g, enquanto que as partículas da imagem B possuem um valor de 64 m<sup>2</sup>/g. Como as partículas são morfologicamente idênticas, procedeu-se a um estudo mais aprofundado da sua porosidade na secção seguinte, de modo a tentar compreender esta diferença. Karakas, et al., produziram hidroxiapatite com ambos os reagentes e obtiveram áreas superficiais específicas de 121 m<sup>2</sup>/g e 87 m<sup>2</sup>/g usando cloreto de cálcio e nitrato de cálcio tetrahidrado [2].

A figura 4.5 compara 3 amostras dopadas sem segundas fases e uma amostra controlo de hidroxiapatite comercial.

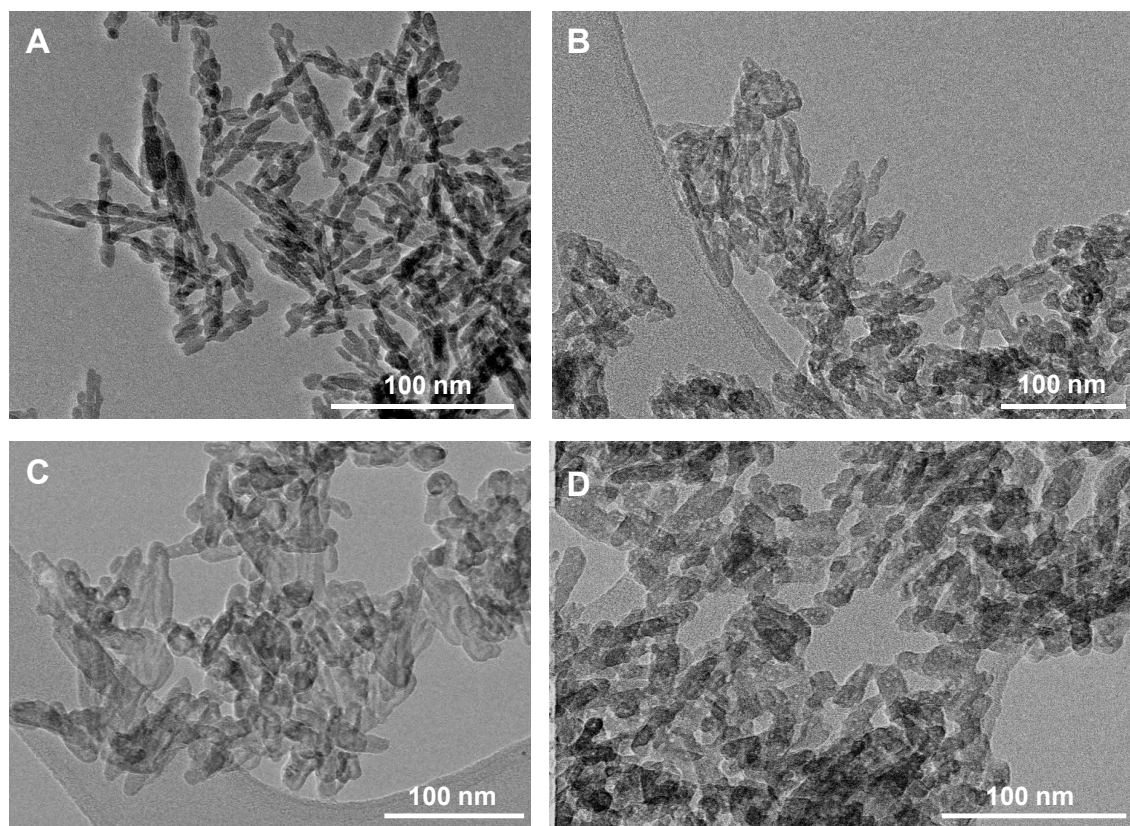


Figura 4.5 – Comparação da morfologia das partículas de hidroxiapatite não dopada HAP\_F (A); e das partículas dopadas HAP\_Ti 0,005M (B); HAP HAP\_Ti 0,001 (C); HAP\_P\_0,05 (D).

É possível observar um ligeiro aumento na largura das partículas dopadas, quer por precipitação, quer por troca iónica. Embora a morfologia das partículas dopadas não tenha sofrido alterações relevantes, ficou ligeiramente mais arredondada em relação às partículas não dopadas, pelo aumento da largura das mesmas. Em 2005, Rameshbabu, et, al, sintetizaram hidroxiapatite dopada com prata pelo método de processamento por micro-ondas, obtendo partículas com morfologias semelhantes [5]. Todas as partículas de todas as amostras possuem uma dimensão nanométrica, tal como a apatite e do osso [8]. A área superficial específica tende a diminuir ligeiramente nas partículas dopadas, como se pode observar na tabela 4.4 que se apresenta de seguida. Dubnika, et al., reportaram

resultados semelhantes num estudo sobre dopagem de hidroxiapatite com prata por precipitação [10].

A tabela 4.4 compara os tamanhos médios das partículas, e a sua área superficial específica. Os valores de área superficial estão em linha com as dimensões médias das partículas, verificando-se que a área diminui com o arredondamento da partícula.

Tabela 4.4 - Comparação do comprimento e largura média das partículas, e da sua área superficial específica.

Amostra	Comprimento (nm)	Largura (nm)	Área superficial específica (m <sup>2</sup> /g)
HAP_F (A)	45	8	118
HAP_Ti_0,005M (B)	42	11	106
HAP_Ti_0,001 (C)	42	15	99
HAP_P_0,05 (D)	39	13	99

O estudo da área superficial específica e porosidade será conduzido na secção seguinte.

### 4.3. Porosidade

A figura 4.6 compara as curvas de adsorção e dessorção (coluna à esquerda), e a variação do volume de poro e do tamanho de poro (coluna à direita), das várias amostras em estudo: A amostra não dopada HAP\_F (a); a amostra não dopada HAP\_N (b); a amostra HAP\_P\_0,05, dopada por precipitação (c); a amostra dopada por troca iónica HAP\_Ti\_0,001M (d); e a amostra dopada por troca iónica HAP\_Ti\_0,005M (e).

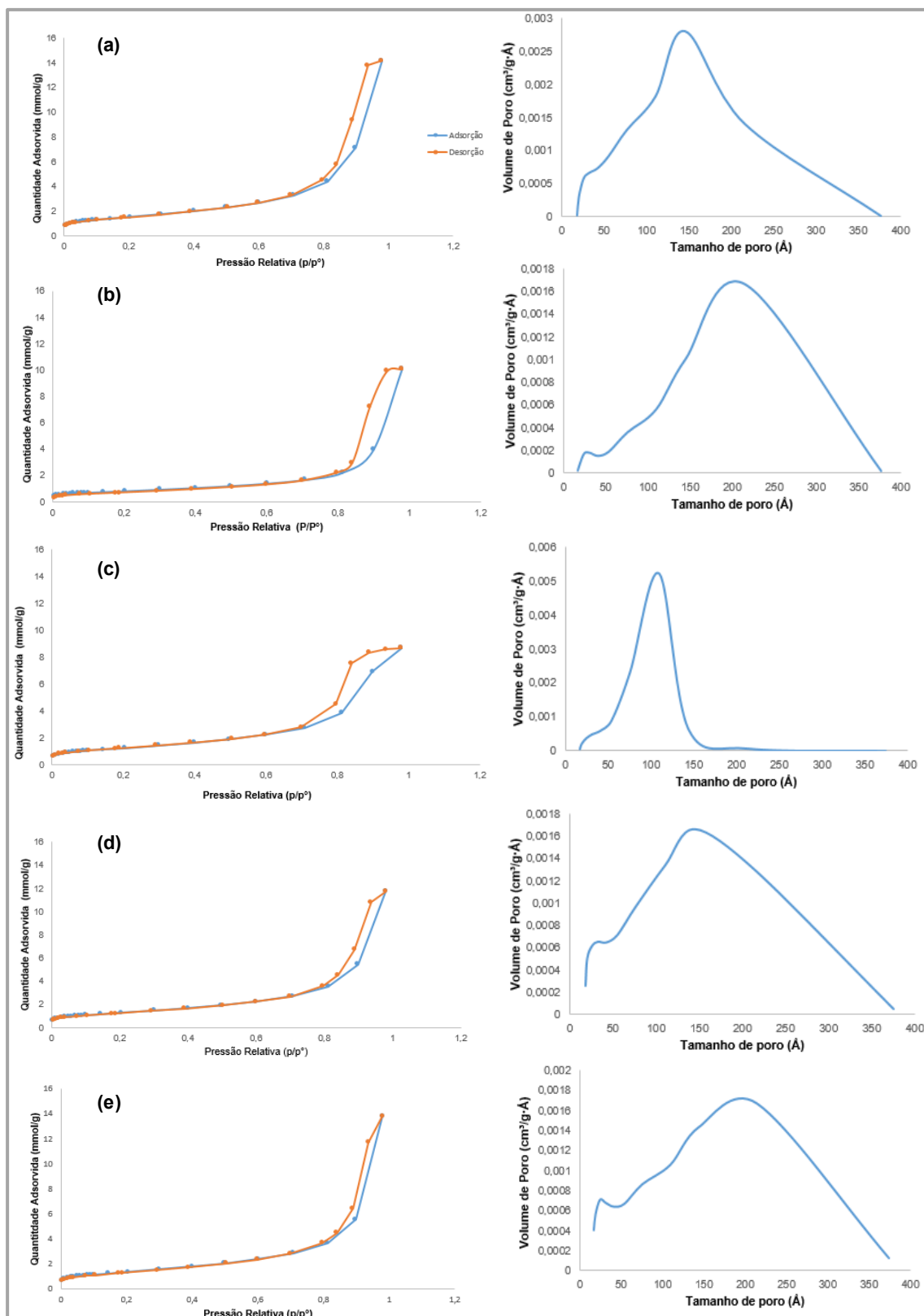


Figura 4.6 - Comparação das curvas de adsorção e dessorção (coluna à esquerda), e a variação do volume e tamanho de poro (coluna à direita), das várias amostras em estudo: A amostra não

dopada HAP\_F (a); a amostra não dopada HAP\_N (b); a amostra HAP\_P\_0,05, dopada por precipitação (c); a amostra dopada por troca iónica HAP\_Ti\_0,001 (d); e a amostra dopada por troca iónica HAP\_Ti\_0,005 (e).

De acordo com a classificação IUPAC, as partículas da amostra de HAP comercial (HAP\_F) e da amostra de hidroxiapatite não dopada produzida com nitrato de cálcio (HAP\_N) apresentam uma isotérmica do tipo H1 (figura 4.6 -(a e b)), que exhibe uma histerese característica de materiais mesoporosos. Um material mesoporoso contém poros entre 2 e 50 nm. As isotérmicas do tipo H1 indicam poros com geometria tubular [9]. Foi também analisada a sua distribuição de tamanho de poro, revelando que a amostra A possui maioritariamente poros de 15 nm, e que na amostra B a maioria dos poros são de 20 nm. O volume de poro das partículas da amostra A é superior aos da amostra B. Ao comparar as isotérmicas da amostra A e da amostra B é perceptível que a amostra A consegue adsorver mais gás do que a amostra B, e como já foi referido, a amostra A possui um tamanho de poro mais pequeno e um volume de poro maior em relação à amostra B, o que explica a diferença nas suas áreas superficiais específicas.

Na mesma figura é possível analisar a isotérmica de adsorção e desorção da amostra dopada com prata (HAP\_P\_0,05), obtida por precipitação (figura 4.6-(c)).

Esta isotérmica de adsorção-desorção possui uma histerese característica do tipo H2 em que, embora o tamanho e forma dos poros não estejam bem definidos, os poros têm o característico “gargalo de garrafa”, ou seja, uma abertura para superfície que é muito estreita comparada com o seu interior, o que explica o atraso na desorção relativamente à adsorção, a pressões relativas altas [9]. Na coluna à direita é possível verificar que o tamanho de poro é mais pequeno em relação às hidroxiapatites não dopadas, possuindo maioritariamente poros de 10 nm, bem como um volume de poro superior. Esta amostra não possui poros com um tamanho superior a 18nm, ao contrário de todas as outras, e revela uma distribuição de tamanho de poro mais estreita.

No que se refere às isotérmicas das amostras dopadas (HAP\_Ti\_0,001; e HAP\_Ti\_0,005) obtidas por troca iónica (figura 4.6, (d) e (e)), observa-se que são

do tipo H1, e que são muito semelhantes à curva de histerese (a). As partículas são mesoporosas e possuem uma geometria de poro tubular [9]. Este facto indica que o processo de troca iónica não alterou substancialmente a estrutura de poro da amostra. A distribuição de volume de poro também é idêntica à da hidroxiapatite não dopada comercial (HAP\_F), possuindo, no entanto, uma distribuição de tamanhos de poro mais alargada.



## 4.4. Potencial Zeta

Na figura 4.7 apresentam-se as curvas que traduzem a variação do potencial zeta das várias amostras com o pH.

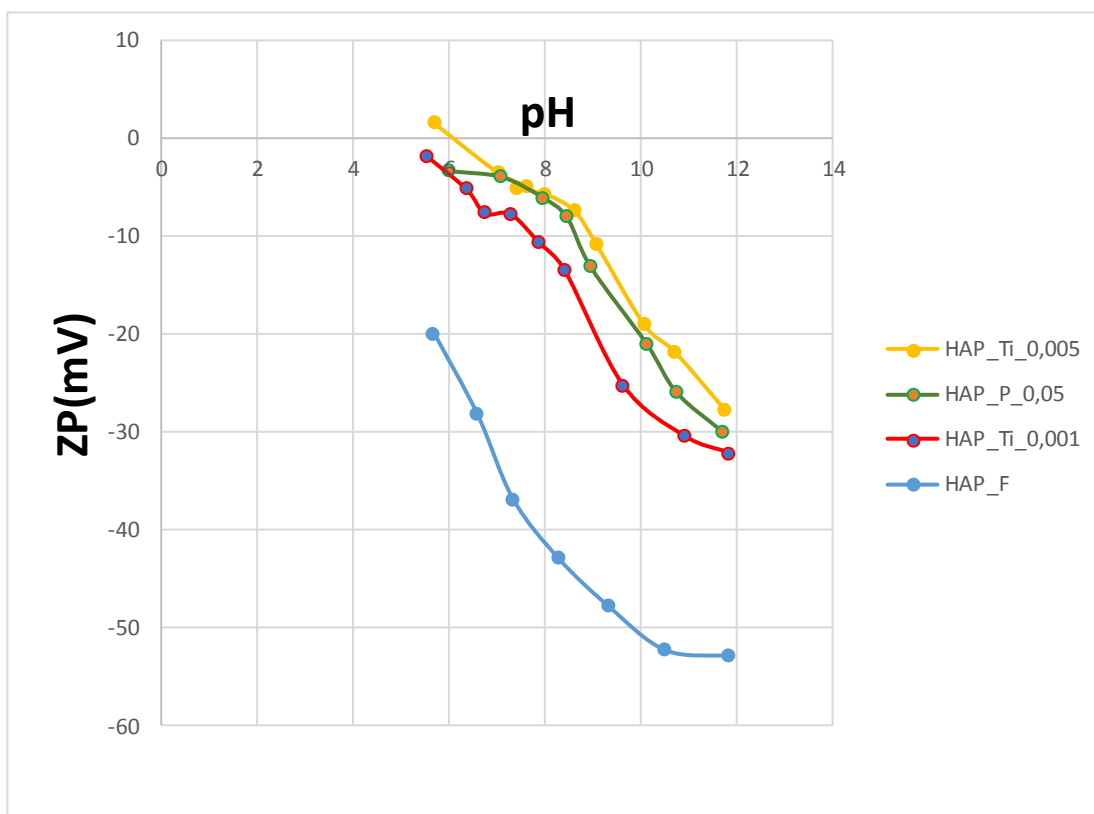


Figura 4.7 – Variação do potencial zeta com o pH das amostras em estudo.

Todas as amostras apresentam curvas descendentes em que a electronegatividade aumenta com o aumento do pH, que resultam da agregação de cargas negativas dentro da dupla camada elétrica (camada de stern).

É possível observar que, para todas as amostras dopadas com prata, quer por precipitação (HAP\_P\_0,05), quer por troca iónica (HAP\_Ti\_0,001 e HAP\_Ti\_0,005), os valores de potencial zeta diminuíram, conforme o teor de prata, para os mesmos valores de pH. Parece existir uma relação entre o aumento da concentração de prata nas partículas e a diminuição da

electronegatividade do seu potencial zeta, o que está de acordo com os resultados obtidos por Chao, et al. [11]. Em 2015, Chao, et al, prepararam hidroxiapatite dopada com prata pelo método de síntese hidrotérmica, com várias concentrações de prata até 197 ppm (partes por milhão), e obtiveram resultados que também evidenciaram que as amostras dopadas possuíam valores de potencial zeta menos negativos quando comparados com os da hidroxiapatite não dopada. O autor reportou no seu estudo que a electronegatividade diminui com o aumento da concentração de prata na hidroxiapatite [11]. No contexto do presente trabalho, e devido à dopagem com prata, podem ter ocorrido diferentes fenómenos com diferentes contributos para a alteração do potencial zeta. A substituição de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Ag}^+$  ocasiona um défice de carga positiva, o que pode ter consequências ao nível da adsorção electrostática e das interações intermoleculares na interface sólido-líquido. Os resultados obtidos podem ser interpretados na base de que a substituição de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Ag}^+$  origina uma superfície mais electronegativa que promove a adsorção de espécies positivamente carregadas [12], resultando num potencial zeta menos electronegativo do que o observado no caso das partículas não dopadas.

## 4.5. Quantificação elementar

As tabelas 4.5 e 4.6 foram construídas a partir dos resultados das análises efectuadas por espectroscopia de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).

Tabela 4.5 – Comparação entre a relação Ca/P, (Ag+Ca) /P e fração molar de prata (x).

	Ca/P	(Ag+Ca)/P
<b>X=0,05</b>	1,58	1,59
<b>0,001M</b>	1,70	1,70
<b>0,005M</b>	1,65	1,66

É possível, logo à partida verificar que todas as amostras apresentam uma relação (Ag + Ca) /P próxima do valor estequiométrico de 1,67.

Tabela 4.6 – Taxa de incorporação de prata na amostra sólida de hidroxiapatite.

	X= (real)	X= (esperado)
<b>HAP_P_0,05</b>	0,04474546	0,05

Observa-se uma taxa de incorporação de 89,5% do total de prata utilizada na síntese na amostra de hidroxiapatite dopada por precipitação, revelando que o processo é eficaz, tendo em conta que no DRX não se observaram outras fases que não hidroxiapatite, indicando que a prata está presente na rede cristalográfica da hidroxiapatite. No caso da troca iónica, observou-se que para a amostra que para a amostra HAP\_Ti\_0,001 a taxa de incorporação de prata no pó de hidroxiapatite final foi de 32,9%, e para a amostra HAP\_Ti\_0,005 foi de 33,3%.

De modo a perceber a dinâmica da reação de troca iónica e sabendo a concentração inicial da suspensão foram medidas as concentrações de prata presentes na solução sobrenadante após centrifugação nos tempos 30, 60, e 90 minutos. Será de esperar que no final dos 90 minutos, cerca de 66% da prata esteja presente no sobrenadante.

Na figura 4.8 observa-se o gráfico que demonstra o empobrecimento de prata na solução sobrenadante ao longo do tempo.

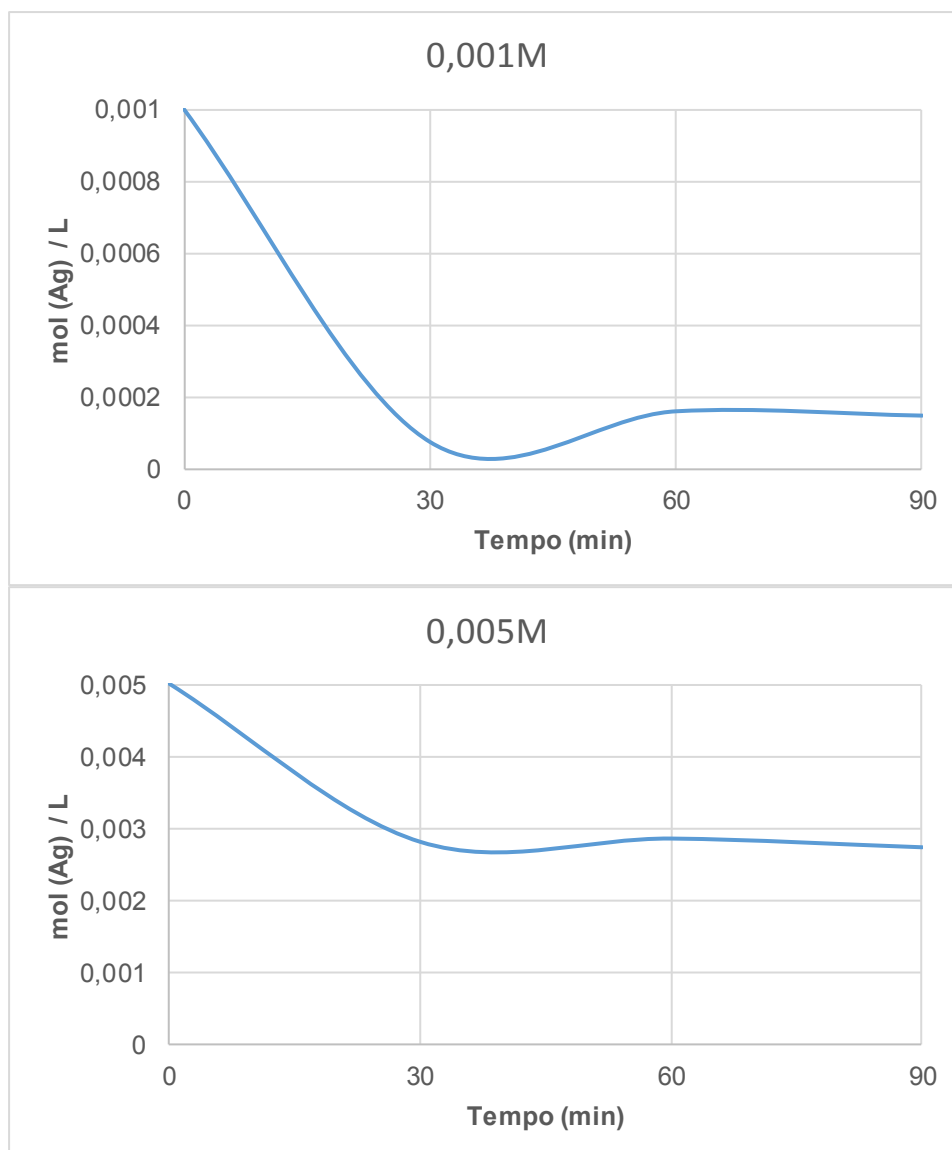


Figura 4.8– Variação do teor de prata na solução sobrenadante.

A figura 4.8 indica que, no caso da amostra 0,001M a concentração desce rapidamente para quase 0 aos 30 minutos, parecendo a reação tender para o equilíbrio a partir dos 60 minutos a sensivelmente 15 % do valor inicial, concluindo-se que 85% da prata ficou na suspensão de HAP substituindo os iões de cálcio. Já no caso da amostra 0.005 M é possível perceber que a reação parece tender para o equilíbrio a partir dos 30 minutos de reação, onde os valores estabilizaram sensivelmente 55% do valor inicial, concluído-se que cerca de 45% dos iões de prata substituíram iões de cálcio. Estes resultados não estão de acordo com os resultados das amostras sólidas respectivas, pois a soma de ambas as partes não perfaz um total de 100%. Podem ter ocorrido pequenas perdas na superfície do recipiente onde a reacção decorreu por adsorção. No entanto, a justificação mais provável para esta disparidade nos resultados, é que, pela cinética lenta e comportamento dinâmico pouco comum deste elemento, o processo de digestão da amostra líquida (redução do pH da amostra até 2, por adição de ácido nítrico), deve permitir à amostra bastante tempo para que toda a digestão ocorra completamente, não se formando precipitados (dificilmente visíveis a olho nú, dado as pequenas quantidades de prata utilizadas), algo que não sucedeu. No trabalho futuro sugere-se a repetição destas análises.



## 4.6. Ensaio Antibacterianos

Com o propósito de testar a actividade antibacteriana das amostras produzidas, foram levados a cabo ensaios antibacterianos qualitativos e quantitativos com duas estirpes de bactérias encontradas frequentemente em ambientes hospitalares, *S. aureus* (gram positiva) e *E. coli* (gram negativa). Estes ensaios foram idealizados em parceria com o Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, local onde foram realizados.

### 4.6.1. Ensaio Antibacterianos Qualitativos

A avaliação da actividade antibacteriana qualitativa foi baseada no método de difusão em discos [13].

A figura 4.9 mostra os resultados obtidos para as estirpes *S. aureus* (gram positiva) e *E. coli* (gram negativa):

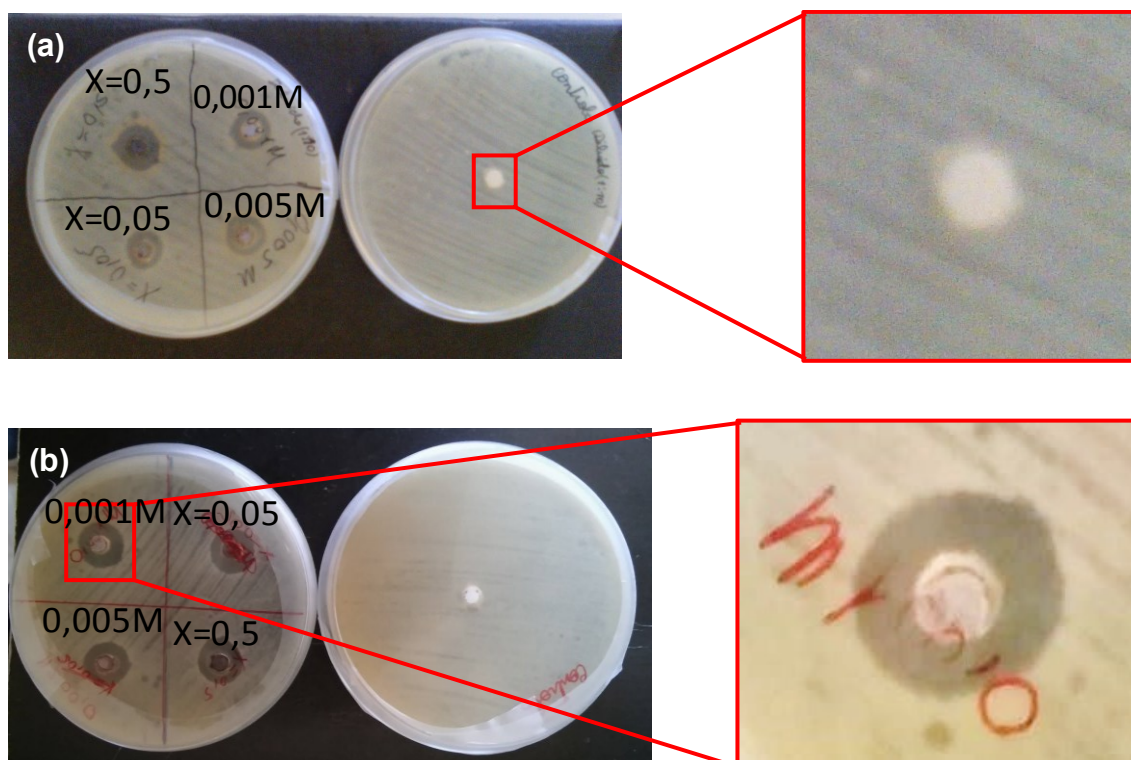


Figura 4.9 – Ensaio antibacterianos qualitativos: *S. Aureus* (a) e *E. Coli* (b)

Decidiu-se testar também uma amostra dopada por precipitação com uma concentração superior de prata (HAP\_P\_0,5), que possui segundas fases (Ag), para poder comparar a capacidade antibacteriana. Nesta fotografia é possível observar os alos de inibição (zona de inibição, ampliada e destacada na imagem b) em torno de cada amostra com prata, o que não se verifica para as amostras controlo revelando que esta não impede o crescimento das bactérias. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Rameshbabu, et al, que executou o mesmo ensaio com hidroxiapatite dopada com diferentes teores de prata, visualizando a zona de inibição a partir da concentração  $x=0,2$  [5]. Neste ensaio as amostras HAP\_P\_0,05 e HAP\_Ti\_0,001 e HAP\_Ti\_0,005 que possuem uma concentração de prata inferior, também conseguiram impedir o crescimento bacteriano, como se verificou na figura 4.12. Staníc, et al, também utilizaram este ensaio para testar hidroxiapatite dopada com prata numa concentração de  $x=0,04$  obtendo também resultados positivos no que toca à inibição do crescimento das bactérias [6].

#### **4.6.2. Ensaio Antibacterianos Quantitativos**

Para as amostras dopadas sintetizadas por precipitação química, de modo a quantificar a cinética e capacidade antibacteriana do material, foram feitos ensaios quantitativos. Os resultados podem ser observados nas figuras 4.10 e 4.11:



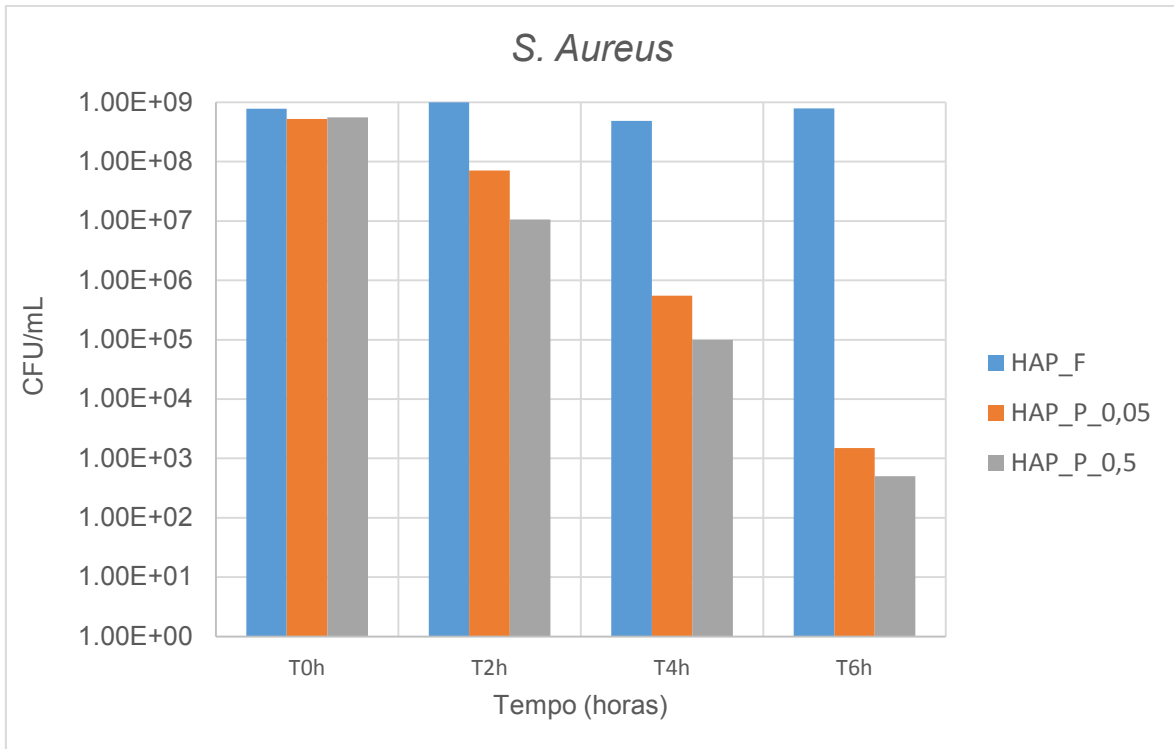


Figura 4.10 – Reduções logarítmicas de colônias formadoras de bactérias ao longo do tempo (*S. Aureus*).

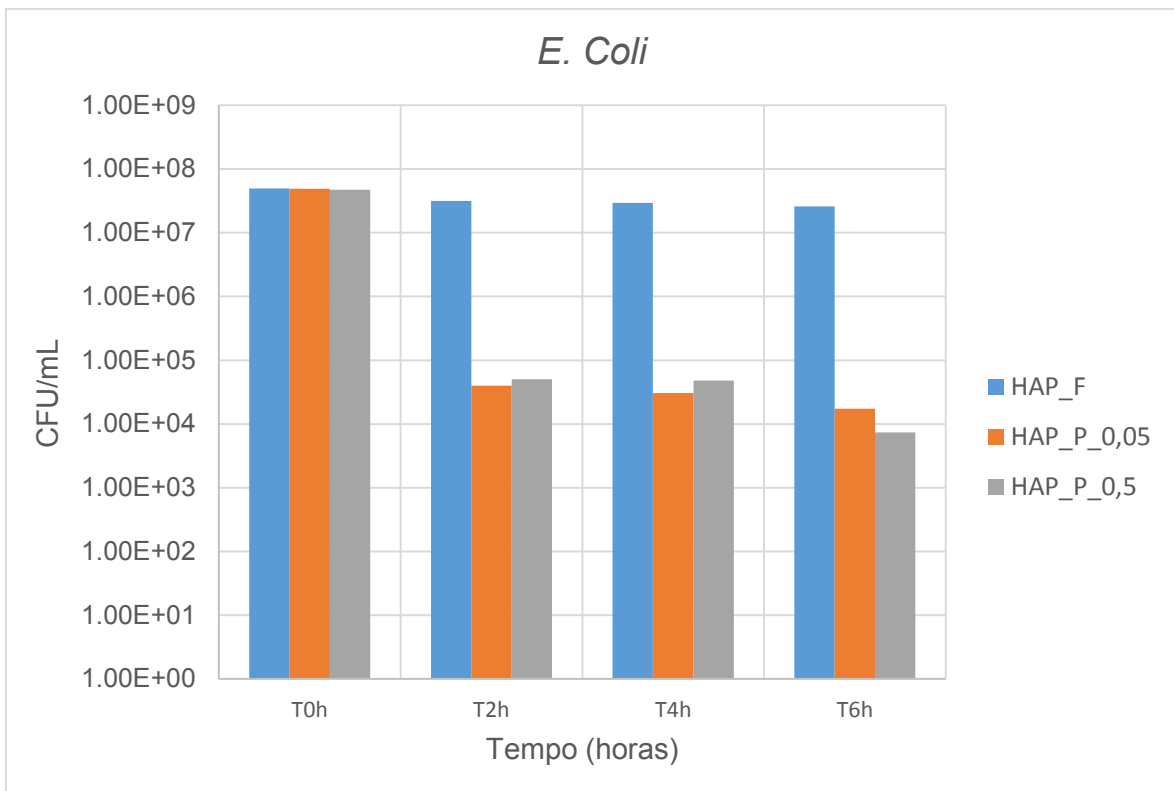


Figura 4.11 - Reduções logarítmicas de colônias formadoras de bactérias ao longo do tempo (*E. Coli*).

As estirpes bacterianas que foram escolhidas e utilizadas no ensaio são frequentemente associadas a infecções relacionadas com cirurgias onde se colocam implantes [14].

As concentrações iniciais foram na ordem dos  $10^{17}$  CFU/mL para *E.coli* e  $10^{19}$  CFU/mL para *S. Aureus*, concentrações bastante superiores às encontradas em situações reais de cirurgia hospitalar que envolvem biomateriais e infecções cirúrgicas, mais próximos da ordem dos  $10^{15}$  CFU/mL [5,15].

Para ambos os casos foram verificadas pelo menos três reduções logarítmicas ao final de 6h para ambas as amostras dopadas com prata, resultando numa redução de bactérias viáveis superior a 99,9% o que atesta a capacidade antibacteriana das amostras.

No caso da estirpe *S. Aureus* (gram-positiva) ocorreu uma redução da concentração de bactérias gradual com o decorrer do tempo. No caso da amostra HAP\_P\_0,5 foi possível observar quase 6 reduções logarítmicas em 6h. Para a estirpe *E. Coli* (gram negativa) foi possível observar três reduções logarítmicas logo após 2h para as duas amostras dopadas, não ocorrendo praticamente nenhuma alteração digna de registo nas 4h seguintes.

Staníc, et al, utilizou um método idêntico para testar a eficácia antibacteriana da hidroxiapatite dopada com prata em concentrações entre  $x=0,004$  e  $x=0,04$  e verificou, para ambas as estirpes, uma redução de pelo menos 2 reduções logarítmicas para uma amostra com uma fração molar de prata de  $x=0,04$  [6]. Chao, et al, também reportou conclusões semelhantes em hidroxiapatite dopada com prata numa concentração de 197 ppm [11].

Ambos os autores reportam a estirpe *S. aureus* é menos susceptível ao efeito antibacteriano da hidroxiapatite dopada com prata do que a estirpe *E. Coli*, pelo facto da estirpe *S. Aureus* ser gram-positiva e possuir uma camada de peptidoglicanos na sua parede celular. O mesmo não pôde ser verificado nestes ensaios, talvez pela capacidade de a amostra  $x=0,05$  já possuir um teor de prata suficiente para obter pelo menos três reduções logarítmicas de bactérias viáveis.

Reportam também que a capacidade antibacteriana da hidroxiapatite dopada com prata aumenta com o teor de prata da mesma. Estes ensaios não foram levados a cabo para o caso da dopagem por troca iónica, pelo facto das concentrações de prata serem muito baixas, e da análise elementar efectuada por ICP ter revelado uma incorporação de apenas 33% de prata na hidroxiapatite. Sugere-se que no futuro sejam realizados ensaios antibacterianos quantitativos com outra metodologia para estas amostras, de modo a conseguir quantificar o seu efeito antibacteriano, que foi comprovado pelo ensaio qualitativo.

## Bibliografia

- [1] - Zhuk, M. (2014). Grânulos nanoestruturados para libertação controlada de dexametasona. Tese de mestrado, Universidade de Aveiro.
- [2] - Karakas, A., Yoruc, A. B. H., Gökce, H., Karabulut, A., & Erdogan, D. C. (2013). Effect of different phosphorus precursors on biomimetic hydroxyapatite powder properties. *Acta Physica Polonica A*, 123(2), 418–420. <http://doi.org/10.12693/APhysPolA.123.418>
- [3] - Maitre, S.; Jaber, K.; Perrot, J.L.; Guy, C.; Cambazard, F.; (2002). Increased serum and urinary levels of silver during treatment with topical silver sulfadiazine, *Ann. Dermatol. Venereol.* 129 217–219.
- [4] - Harges, J.; Ahrens, H.; Gebert, C.; Streitbuerger, A.; Buerger, et al., Lack of toxicological side effects in silver-coated megaprotheses in humans, *Biomaterials* 28 (2007) 2869–2875.
- [5] – N. Rameshbabu; T.S. Sampath Kumar. (2006). Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization. *J. Biomed. Mater. Res. A*. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.30958>
- [6] - Stanic, V., Janackovic, D., Krsti, A., Jovanovi, D., & Raić, S. (2011). Synthesis of antimicrobial monophase silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering. *Applied Surface Science*, 257, 4510–4518. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.12.113>
- [7] - Marcos, I., Souza, L., Simas, N., & Xavier, C. (2015). Crystallographic Aspects Regarding the Insertion of Ag + Ions into a Hydroxyapatite Structure, *18*(4), 881–890.
- [8] - Weiner, S.; Wagner, H.D. The material bone: Structure–mechanical function relations. *Annu Rev Mater Sci* 1998; 28:271–298.
- [9] – Rojas, F.; Kornhauser, I.; Felipe, C.; Esparza, J.M.; Cordero, S.; Dominguez, A.; Riccardo, L. "Capillary condensation in heterogeneous mesoporous networks consisting of variable connectivity and pore-size correlation". *Phys.Chem. Chem.Phys* 4, 2346–2355, (2002).
- [10] - Dubnika, A., Loca, D., Salma, I., Reinis, A., Poca, L., & Berzina-Cimdina, L. (2014). Evaluation of the physical and antimicrobial properties of silver doped hydroxyapatite depending on the preparation method. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 25(2), 435–44. <http://doi.org/10.1007/s10856-013-5079-y>
- [11] - Chao, S., Wang, D. (2015). Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity. *Materials Science and Engineering C*, (October). <http://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.078>

- [12] - Brown, G.; Henrich, V.; Casey, W.; Clark, D.; Felmy, A.; Goodman, D.; et al. (1999). *Metal Oxide Surfaces and Their Interactions with Aqueous Solutions and Microbial Organisms*, 1998.
- [13] – Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.; et al. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *Am. J. Clin. Pathol.* 45 493–496.
- [14] - D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance, *Biomaterials* 27 (2006) 2331–2339.
- [15] - Augusto, F., Andrade, C., Cristina, L., Vercik, D. O., Jorge, F. (2016). Preparation , characterization and antibacterial properties of silver nanoparticles – hydroxyapatite composites by a simple and eco-friendly method. *Ceramics International*, 42(2), 2271–2280. <http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.10.021>



# **Capítulo 5**

## **Conclusões e trabalho futuro**





## 5. Conclusões e trabalho futuro

O âmbito deste trabalho foi a produção de hidroxiapatite dopada com prata para aplicações antibacterianas.

As propriedades físico-químicas de uma nanopartícula possuem um papel crucial nas aplicações biomédicas, quando estas são colocadas em contacto com células vivas, pela sua morfologia e propriedades de superfície.

As principais conclusões retiradas deste trabalho foram:

- Foram utilizados dois métodos de dopagem de Hidroxiapatite: A síntese de hidroxiapatite dopada com prata por precipitação química, e a imersão de uma hidroxiapatite comercial numa solução aquosa de prata, promovendo a troca iónica de iões de cálcio por iões de prata.
- As amostras de hidroxiapatite dopadas com prata não apresentaram fases secundárias, e revelaram um aumento dos parâmetros de rede face aos da hidroxiapatite comercial, indicando que a prata substituiu o cálcio na rede.
- As partículas possuem valores elevados de área superficial específica, algo que promove as suas propriedades de superfície, melhorando a sua capacidade de adesão e consequentemente as propriedades antibacterianas.
- Os valores de potencial zeta das amostras de hidroxiapatite dopadas com prata diminuíram face aos da hidroxiapatite não dopada.
- Ensaio antibacteriano qualitativo revelou que todas as amostras de hidroxiapatite dopadas com prata possuem actividade antibacteriana.

- Os ensaios antibacterianos quantitativos revelaram que a amostra dopada com prata por precipitação conseguiu pelo menos três reduções logarítmicas para ambas as estirpes bacterianas (gram-positiva e gram-negativa).

Os resultados obtidos oferecem possibilidades interessantes para este material, contudo, é necessário responder a algumas questões. A continuação deste estudo poderá revelar novos aspetos, ajudaria a clarificar alguns resultados e o comportamento das amostras. Sugere-se o seguinte trabalho futuro:

- Repetir ensaios de ICP para amostras dopadas por troca iónica.
- Realizar ensaios antibacterianos quantitativos para as amostras dopadas por troca iónica, adoptando uma metodologia adequada para os mesmos.
- Produzir amostras dopadas com prata em concentrações de prata entre  $x=0,1$  e  $x=0,4$ .
- Testar a biocompatibilidade em termos de citotoxicidade, proliferação de células, e adesão celular.
- Efetuar estudos in vitro em células indiferenciadas mesenquimais de forma a avaliar a biocompatibilidade, a taxa de reabsorção e de formação de novo osso;
- Efetuar estudos in vivo de modo a avaliar a toxicidade, avaliar a osteocondutividade e verificar a eficácia do material como substituto ósseo;