UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

JONAS DE OLIVEIRA VIEIRA

**“Recobrimento biomimético de HA dopado com Ag sobre
superfície de Ticp”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia-Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientadora: Dr^a Eliana Cristina da Silva Rigo

São Carlos
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

V657r Vieira, Jonas de Oliveira
Recobrimento biomimético de HA dopado com Ag sobre
superfície de Ticp / Jonas de Oliveira Vieira; orientador Dr^a
Eliana Cristina da Silva Rigo. São Carlos, 2013.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2013.

1. Recobrimento biomimético. 2. Hidroxiapatita. 3. Prata.
4. Cultura de bactérias. I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

JONAS DE OLIVEIRA VIEIRA

TÍTULO: "Recobrimento Biomimético de HA dopado com Ag sobre superfície de TiCP".

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

APROVADO EM: 21/06/2013

PROF^a. DR^a. ELIANA CRISTINA DA SILVA
RIGO
(ORIENTADORA)

FACULDADE DE ZOOTECNIA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS - USP

RESULTADO: aprovado

ASSINATURA: Elia Rigo

PROF^a. DR^a. CECÍLIA AMÉLIA DE CARVALHO
ZAVAGLIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
- UNICAMP

RESULTADO: APROVADO

ASSINATURA: Cecília Zavaglia

PROF^a. DR^a. ANA MARIA MINARELLI
GASPAR

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

RESULTADO: APROVADO

ASSINATURA: Ana Maria Minarelli Gaspar

Dedico esse trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, Valdomiro e Elisete, à minha noiva Hanna Feliciano.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida.

À minha noiva, por sempre me incentivar e oferecer motivos para seguir em frente. Tudo que passei teria sido muito mais complicado sem a presença dela. Agradeço a Deus por ter te colocado ao meu lado!

À minha família, em especial a uma guerreira. Com toda certeza, sem o apoio dela não estaria concluindo esse sonho. À você, MÃE.

À Professora Eliana pelo acolhimento, nunca vou me esquecer da oportunidade e confiança que me deu. Te admiro pelo jeito com que lida com as pessoas.

À família da minha noiva, em especial aos seus pais Eduardo e Rô.

Aos meus amigos de muitas idas e vindas, Lorena e Flávio. Vou sentir saudade desses tempos. Desejo o melhor a vocês. Obrigado por me aturarem.

Manifesto aqui minha gratidão a todos os professores, funcionários e amigos do departamento da Bioengenharia EESC/USP. Não deixo de agradecer o imprescindível apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Aos professores e alunos do Laboratório de Nanotecnologia, Biossensores e Dispositivos – NANOBIODIV- foram tempos bons e de muito aprendizado, agradeço em especial os professores Andrés e Luci pela confiança e por cederem o espaço do laboratório, imprescindível para a realização do trabalho.

Agradeço também aos meus queridos amigos, Rafael, Fabiano, Juninho, Paulinho, Jonatas, Carol, Josi e muitos outros que de forma direta ou indireta me incentivaram a continuar.

Ao laboratório de Química biológica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos da USP- FZEA-Pirassununga, em especial à Dra. Luciane Tavares e à Profa. Dra. Mariza Pires de Melo.

Ao laboratório de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara (SP), em especial à Profa. Dra. Carla Fontana e à Dra. Elaine Miranda que ofereceram tempo e disposição para me ajudarem a fazer os ensaios bactericidas.

Mais uma etapa foi vencida! Sei que ainda é só o começo...

"Eu sou a ressurreição e a vida. Quem crê em mim, ainda que morra, viverá; e quem vive e crê em mim nunca morrerá."

(Jesus Cristo)

RESUMO

VIEIRA, J. O. **Recobrimento biomimético de HA dopado com Ag sobre superfície de Tícp.** 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

O titânio apesar de ser um material muito utilizado em implantes devido a suas excelentes propriedades físicas não apresenta características bioativas, dessa forma, faz-se necessário a utilização de métodos de modificação de superfície para melhorar sua resposta biológica favorecendo a formação óssea. A partir dos anos 90, foi desenvolvido um método químico, relativamente simples, para induzir a bioatividade desses materiais metálicos inertes, cujo princípio é imitar as condições biológicas para obtenção do material desejado, denominado de método biomimético. Ainda assim, existe a preocupação desse material não causar rejeição por parte do organismo, causando não só infecções, que leva o paciente ingerir grande quantidade de antibióticos, mas também aumentando o tempo de internação e gasto de recursos em remédios. Uma maneira de prevenção e tratamento de infecções microbianas é mediante a utilização de sais de prata. Dessa maneira, o presente trabalho apresenta resultados de recobrimento bioativo (HA) sobre superfície de titânio comercialmente puro (Tícp) dopado com íons Ag para efeito bactericida. O recobrimento consiste em 2 etapas, na etapa 1 - Com 3 condições superficiais distintas: 1 – superfície lixada com lixa de SiC #150; 2 – superfície lixada e posterior tratamento químico com NaOH 5M à 60°C/24h; 3 – idem a condição 2 com posterior tratamento térmico a 600°C/1h, os substratos foram imersos em uma solução de silicato de sódio (SS) para a fase de nucleação e a etapa 2 - reimersão desses substratos em solução sintética que simula o plasma sanguíneo (SBF) concentrado (1,5SBF) para a precipitação e crescimento da camada de apatita. Após a etapa de recobrimento os substratos foram imersos em soluções de AgNO₃ com concentrações de 20 ppm e 100 ppm à 37°C/48h. A caracterização antes e após o recobrimento foi feita mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho (IV), difração de raios X (DRX) e o efeito bactericida foi avaliado utilizando ensaio de cultura de bactérias - Teste de halo de inibição. Com os resultados obtidos constatou-se formação de uma camada de apatita em todos os tratamentos superficiais adotados, sendo uma camada mais homogênea para o tratamento T3. As amostras recobertas após os tratamentos superficiais T2 e T3 apresentaram efeito bactericida contra os dois tipos de bactérias a partir de 20ppm de Ag enquanto que a amostra com tratamento T1 só foi possível observar esse mesmo comportamento para concentração de 100ppm de Ag.

Palavras-chave: Recobrimento biomimético, Hidroxiapatita, Prata, Cultura de bactérias.

ABSTRACT

VIEIRA, J.O. **Biomimetic coating of hydroxyapatite doped with Ag on surface Ticp.** 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Titanium despite being a material widely used in implants due to its excellent physical properties does not have bioactive characteristics, thus it is necessary to use methods of surface modification to improve its biological response favoring bone formation. From the 90s, we developed a chemical method, relatively simple to induce bioactivity of these inert metallic, whose principle is to mimic the biological conditions for obtaining the desired material, called biomimetic method. Still, there is concern that material does not cause rejection by the body, causing not only infections, which leads the patient to ingest large amounts of antibiotics, but also increasing the length of stay and spending resources on medicine. One way to prevent and treat microbial infections is by using silver salts. Thus, this paper presents results of bioactive coating (HA) on the surface of commercially pure titanium (Ticp) doped with Ag ions for bactericidal effect. The coating consists of two steps, in step 1 - With three different surface conditions: a - surface sanded with sandpaper # 150 SiC 2 - sanded surface and subsequent chemical treatment with 5M NaOH at 60 ° C/24h 3 - the same condition 2 with subsequent thermal treatment at 600 ° C/1h, the substrates were immersed in a solution of sodium silicate (SS) to the nucleation stage and stage 2 - immersion in solution of these synthetic substrates which simulates the blood plasma (SBF) concentrated (1.5 SBF) for the precipitation and growth of apatite layer. After the step of coating the substrates were immersed in solutions of AgNO₃ at concentrations of 20 ppm and 100 ppm at 37 ° C/48h. The characterization before and after the coating was done by scanning electron microscopy (SEM), infrared (IR), X-ray diffraction (XRD) and the bactericidal effect was assessed using bacterial culture test - Test of inhibition zone. With the results obtained it was found formation of an apatite layer on all surface treatments adopted, being a homogeneous layer to T3. The coated samples after surface treatments T2 and T3 showed bactericidal effect against both types of bacteria from 20ppm Ag while the sample T1 was only possible to observe this behavior same concentration of 100ppm Ag.

Keywords: Hydroxyapatite, Biomimetic coating, Silver, Culture of bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura cristalina da HA : a) arranjo tridimensional e b) plano basal	25
Figura 2 – Formas alotrópicas do titânio.....	26
Figura 3 – Representação esquemática da interação do titânio ativado com a solução SBF. ...	34
Figura 4 – Diferentes tipos de parede celular.....	37
Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.	45
Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.....	46
Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.....	47
Figura 8- DRX do Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.....	48
Figura 9- DRX Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.....	49
Figura 10 - DRX Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.....	49
Figura 11 - FTIR de Ticp recoberto com os tratamentos T1, T2 e T3.....	50
Figura 12 - MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.....	51
Figura 13 - MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 20ppm de Ag.....	52
Figura 14 - MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 100ppm de Ag.....	52
Figura 15 - MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.....	53

Figura 16 - MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 20ppm de Ag.....	54
Figura 17 - MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 100ppm de Ag.....	54
Figura 18 - MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.....	55
Figura 19 - MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 20ppm de Ag.	55
Figura 20 - MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 100ppm de Ag.	56
Figura 21 - DRX de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.....	57
Figura 22 - DRX de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 20ppm de Ag.	57
Figura 23 - DRX de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 100ppm de Ag.	58
Figura 24 - DRX de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.....	59
Figura 25 - DRX de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 20ppm de Ag.....	59
Figura 26 - DRX de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 100ppm de Ag.....	60

Figura 27 - DRX de Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.....	61
Figura 28 - DRX de Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 20ppm de Ag.....	61
Figura 29 - DRXde Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 100ppm de Ag.	62
Figura 30 - FTIR de Ticp recoberto com o tratamento T1; T1 com 20ppm e 100ppm de Ag.	63
Figura 31 - FTIR de Ticp recoberto com o tratamento T2; T2 com 20ppm e 100ppm de Ag.	63
Figura 32- FTIR de Ticp recoberto com o tratamento T3; T3 com 20ppm e 100ppm de Ag. .	64
Figura 33 - Resultado do teste de halo de inibição para Ticp recoberto utilizando o T1 e dopado com 20 e 100 ppm de Ag para cultura utilizando cepas diferentes, a) <i>Escherichia coli</i> , b) <i>Staphylococcus Aureus</i>	65
Figura 34 – Resultado do teste de halo de inibição para Ticp recoberto utilizando o T2 e dopado com 20 e 100 ppm de Ag para cultura utilizando cepas diferentes, a) <i>Escherichia coli</i> , b) <i>Staphylococcus Aureus</i>	65
Figura 35– Resultado do teste de halo de inibição para Ticp recoberto utilizando o T3 e dopado com 20 e 100 ppm de Ag para cultura utilizando cepas diferentes, a) <i>Escherichia coli</i> , b) <i>Staphylococcus Aureus</i>	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades químicas e físicas dos biomateriais.....	20
Tabela 2 – Propriedades mecânicas da hidroxiapatita.....	24
Tabela 3 – Comparação do módulo de elasticidade do osso com materiais utilizados como implantes.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ticp: Titânio comercialmente puro

OCP: Fosfato octacálcico

HA: Hidroxiapatita

CDHA: Hidroxiapatita deficiente em cálcio

DCPA: Hidrogenofosfato de cálcio anidro

DCPD: Hidrogenofosfato de cálcio dihidratado

ACP: Fosfato de cálcio amorfo

β- TCP: Beta-fosfato tricálcico

α- TCP: Alfa-fosfato tricálcico

Ca/P : Razão cálcio-fósforo

TRIS: (Tri-hidroximetil) aminometano

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS: Espectroscopia por Energia Dispersiva

SS: Solução de silicato de sódio

DRX: Difração de raios X

NaOH: Hidróxido de sódio

SAB: Solução avaliadora da bioatividade

SBF: Fluido corpóreo simulado

T1: Tipo de tratamento superficial usando as soluções: SS e SBF

T2: Tipo de tratamento superficial usando NaOH, SS e SBF

T3: Tipo de tratamento superficial usando NaOH, tratamento térmico, SS e SBF

FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

DAP: Diamônio fosfato

DBO: Demanda Biológica de Oxigênio

DCB: Diclorobenzeno

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	19
	2.1 Objetivo geral	19
	2.2 Objetivos Específicos	19
	2.3 Organização do Trabalho.....	19
3	Revisão Bibliográfica	20
	3.1 Classificação dos Biomateriais.....	20
	3.1.1 Fosfatos de Cálcio	22
	3.1.2 Titânio e suas Ligas	26
	3.2 Modificação de Superfície do Ti c.p.	28
	3.2.1 Método Biomimético.....	30
	3.2.2 Soluções Simuladoras do Fluido Corpóreo	31
	3.2.3 Processo de Nucleação dos Fosfatos de Cálcio	33
	3.3 Processos inflamatórios	35
	3.3.1 Tipos de bactérias	36
	3.4 A prata para fins bactericidas	38
	3.4.1 Recobrimentos sobre Ticp contendo agentes antibacterianos inorgânicos	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
	4.1 Materiais	41
	4.2 Métodos	41
	4.2.1 Recobrimento biomimético sobre Ticp	41
	4.2.1.1. Recobrimento denominado de Tratamento T1	41
	4.2.1.2. Recobrimento denominado de Tratamento T2	41
	4.2.1.3. Recobrimento denominado de Tratamento T3	41
	4.2.2 Etapa da dopagem da camada de fosfato de cálcio com íons Ag	42
	4.3 Caracterização físico-química das amostras.....	42
	4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
	4.3.2 Difração de Raios X (DRX)	43
	4.3.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	43
	4.4 Caracterização <i>in vitro</i>	44
	4.4.1 Ensaio de cultura de bactérias - Teste de halo de inibição	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
	5.1 Recobrimento biomimético sobre Ticp	45
	5.2 Ensaio de cultura de bactérias – Teste de halo de inibição	65
	5.3 Considerações Finais	69
6	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de obtenção de novos materiais para substituição de partes do corpo humano que foram destruídas ou danificadas conduziu cientistas das mais diferentes áreas à investigação de novos materiais utilizados para implantes. Desta maneira, dentro da área de biomateriais, há a necessidade de encontrar materiais que possam oferecer similaridade em propriedades químicas e físicas das estruturas do corpo humano. Dentre os materiais que possuem propriedades químicas similares ao tecido ósseo, estão os fosfatos de cálcio, dentre eles, a hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ que é uma cerâmica bioativa e biocompatível, com razão Ca/P similar ao tecido ósseo, tornando-a capaz de promover uma rápida formação do osso e forte fixação do tecido ósseo. Entretanto, esta biocerâmica apresenta baixas propriedades mecânicas em comparação ao osso natural (SYKARAS et al., 2000; VALLET-REGÍ, 2010). O grande interesse pela HA se dá pelo fato de que essa fase é quimicamente similar à fase mineral óssea, denotando uma forte interação HA/tecido ósseo, delegando excelentes características bioativas e biocompatíveis quando implantada. No entanto, essa implantação somente é possível em situações de baixas tensões ou apenas de tensões de compressão (DHERT, 1992).

Assim, vários trabalhos têm como objetivo aliar a HA aos materiais metálicos como o aço inoxidável austenítico, cromo-cobalto e o titânio e suas ligas que possuem propriedades mecânicas adequadas para uso em implantes, pois possuem propriedades físicas similares ao osso e vêm sendo utilizados de forma rotineira na restauração de estruturas anatômicas (MAZZOCCA, et al., 2003). No entanto, eles são suscetíveis à degradação química e eletroquímica, ou seja, possuem baixa biocompatibilidade em comparação à cerâmica hidroxiapatita (HA). Uma liga metálica ideal para implantes deve apresentar baixo módulo de elasticidade, baixa densidade, excelente resistência mecânica, alta resistência à corrosão, conformabilidade de acordo com a função mecânica no organismo e não deve conter elementos tóxicos. Contudo, a biocompatibilidade da maioria dos biomateriais metálicos é baseada no quanto passivo é sua oxidação e nos riscos que podem causar futuramente. Dentre os metais usados para implante, o que mais resiste a todos os tipos de corrosão é o titânio e suas ligas, seguido por nióbio e tântalo e o que menos resiste é o aço inoxidável (EISENBARTH et al., 2004).

Segundo Kokubo et al. (2000), um dos pré-requisitos para um material ligar-se ao osso é a formação de uma camada de apatita biologicamente ativa na interface material/osso, definida como “bone-like apatite”. Tal camada de apatita é similar à fase mineral do tecido ósseo, em composição e estrutura. Acredita-se que ela atua como sinalizadora de proteínas e células para

iniciar a cascata de eventos que resulta na formação da estrutura óssea. Ou seja, os osteoblastos, células ósseas responsáveis pela produção do tecido ósseo, proliferam preferencialmente e se diferenciam produzindo apatita e colágeno sobre a camada de apatita formada anteriormente, o que favorece a união do implante com o osso. Quando isso ocorre, uma ligação química é formada entre o osso e a camada de apatita, reduzindo a energia interfacial entre elas (KOKUBO et al., 2003).

Desde então, vários trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de avaliar *in vitro*, por meio de testes de bioatividade, a capacidade de formação da camada de apatita biológica sobre a superfície de diversos materiais, prevendo, assim o potencial bioativo de cada um deles. Os testes *in vitro* de bioatividade se tornaram muito populares a partir da década de 90 pela sua relativa simplicidade. Entretanto, os resultados nem sempre apresentam uma boa reprodutibilidade, consequentemente, não são claramente compreendidos, o que dificulta bastante o estabelecimento de uma relação de unicidade entre os resultados *in vitro* e o comportamento *in vivo*.

Uma possibilidade consiste em recobrir o material bioinerte ou biotolerável de boa resistência mecânica com uma camada bioativa através da deposição de um material bioativo (DHERT, 1992). Neste caso, a principal dificuldade consiste em obter uma boa união da camada bioativa com o substrato (Ti).

Nos últimos anos tem-se utilizado na obtenção de tais recobrimentos, diferentes métodos, entre os quais: *ion sputtering*, *plasma spray*, sol-gel, eletrólise e biomimético. O *plasma spray* é o único que se utiliza para fins comerciais, mas esse método apresenta algumas desvantagens em decorrência da alta temperatura de trabalho (10.000 °C), onde a HA decompõe-se em oxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$], α e β -TCP [α e β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], e uma fase vítrea amorfa alterando o processo de dissolução e biodegradação, além disso a natureza da ligação HA-metal é puramente mecânica, podendo falhar quando submetidos as cargas de tração devido a grande diferença entre os coeficientes de expansão térmica (FISHER, 1986).

Abe et al. (1990) têm proposto um método para o recobrimento de substratos de natureza variada com uma camada de hidroxiapatita “biológica”. O método consiste em colocar o substrato a ser recoberto em uma solução sintética de composição iônica semelhante a do plasma sanguíneo (*simulated body fluid* - SBF) mais um vidro bioativo (vidro G). Depois de determinado período o substrato é reimerso em uma solução 1,5 vezes mais concentrada (1,5 SBF) (ABE, 1990).

É necessário, porém, atentar-se não apenas na obtenção do material ideal para o implante, mas também o quanto esse material obtido poderá interferir no mecanismo de defesa

como também influenciar nas doses de antibióticos necessárias para protegê-lo contra as possíveis infecções, tornando-se um sério problema na área médica. Uma saída é utilizar quantidade de material, na interface osso-implante, em doses mais elevadas, entretanto, em alguns casos acaba ocorrendo a remoção desse implante (SANT, 1999).

A administração de antibióticos em muitos casos não consegue ser efetiva, pois ocorre a formação de uma camada circundando o implante que age como uma barreira para que esse antibiótico atue no local da infecção. Neste caso a solução seria aumentar a dose desses medicamentos. Por outro lado o aumento da dose de antibiótico pode, na maioria das vezes, causar sérios efeitos colaterais. Vários métodos estão sendo pesquisados para que possa haver liberação dos antibióticos no local do processo de infecção (SANT, 1999). Uma estratégia de combater essa resistência seria vencer as defesas bacterianas, usando, precisamente nos lugares certos, sendo possível aplicar altas doses de antibióticos já existentes, doses que não seriam aceitáveis se fossem liberadas no corpo do paciente, como ocorre pelos métodos tradicionais.

Uma maneira de prevenção e tratamento de infecções microbianas é a utilização de sais de prata.

Kim et al.(1998) discutiram os efeitos dos metais que podem ser liberados no local do implante através da hidroxiapatita dopada. Os metais incorporados à hidroxiapatita foram Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , e os efeitos antimicrobiais dos substratos dopados contra *Escherichia coli* foram testados e fotografados. O índice de crescimento de *E. coli* tratados com vários substratos dopados, foi observado para determinação dos efeitos antimicrobiais. De acordo com os autores o substrato com a Ag^+ apresentou completa inibição do desenvolvimento de *E. coli* após 20h de incubação, no entanto, os substratos dopados com Cu^{2+} e Zn^{2+} não apresentaram nenhum efeito antimicrobial.

Uma avaliação feita por Lingzhou Zhao et al. (2009), mostrou que a Ag^+ além de ser efetiva contra algumas bactérias, não possui efeitos contra as propriedades do implante, diferente do cobre que compromete as propriedades físicas do titânio tais como a resistência e corrosão.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, Yoshiki Ando et al. (2009), em seu trabalho concluiu que o recobrimento contendo Ag^+ sobre discos de titânio obteve alta atividade antibacteriana contra vários tipos de bactérias, incluindo a *metilina S. aureus*, além de apresentar baixa citotoxicidade.

Muitos materiais inorgânicos com efeitos bactericidas contendo íons Ag^+ estão sendo desenvolvidos e alguns deles em uso comercial para esse fim. Seria interessante que os íons Ag^+

pudessem ser liberados de forma lenta e progressiva e que os mesmos fossem efetivos contra os processos infecciosos.

A presente pesquisa se insere no conjunto de estudos voltados para a produção de um material artificial usado na correção ou substituição de partes danificadas do corpo humano. Especificamente, toma como objeto a análise de mecanismos químicos, como a formação de uma camada de fosfato de cálcio na superfície de implantes metálicos, que são considerados facilitadores da ligação entre o implante e o organismo vivo, bem como dopar a apatita depositada com íons Ag^+ na superfície do material e avaliar o seu efeito bacteriano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito das variáveis de processo sobre o mecanismo de precipitação e crescimento de apatita pelo método biomimético, bem como o efeito da dopagem com íons Ag sobre a morfologia e a fase da camada bioativa formada.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar a formação de camada de hidroxiapatita.
- Caracterizar os recobrimentos obtidos em função dos tratamentos de superfície.
- Comparar a influência dos tratamentos químicos superficiais com relação à formação da camada de hidroxiapatita.
- Avaliar o efeito da dopagem com íons Ag.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Classificação dos Biomateriais

Nas ultimas décadas os biomateriais tem sido largamente utilizados para melhorar a qualidade de vida das pessoas, como consequência dos avanços da medicina moderna. Os biomateriais podem ser definidos como sendo uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, de natureza sintética ou natural, que podem ser utilizados por um período de tempo para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente tecido ou órgãos (BORETOS; EDEN,1984), dentre os materiais sintéticos os mais utilizados para fins biomédicos são os metais, os polímeros, as cerâmicas e os compósitos.

A tabela 1 apresenta um resumo das principais propriedades químicas e físicas de biomateriais sintéticos.

Tabela 1: Propriedades químicas e físicas dos biomateriais

Propriedades	Cerâmicas	Metais	Polímeros
Biocompatibilidade	Excelente	Bom	Bom
Resistência química	Excelente	Bom	Bom
Resistência térmica	Excelente	Bom	Ruim
Expansão térmica	Fraco	Moderada	Excelente
Condutividade térmica	Bom	Excelente	Ruim
Dureza	Rígido	Moderada	Flexível
Compressibilidade	Excelente	Moderada	Fraco
Resistência à tração	Moderado	Forte	Frágil
Fragilidade	Grande	Pouco	Pouco
Moldabilidade	Difícil	Normal	Fácil
Custo	Caro	Econômico	Econômico

Fonte: Adaptado Aoki (1988)

De acordo com Sykaras (2000) os materiais podem ser classificados segundo o comportamento fisiológico baseado na resposta do tecido hospedeiro e são classificados como biotoleráveis, bioinertes, bioativos e bioabsorvíveis.

Bioinertes- Materiais que são tolerados pelo organismo e que praticamente não liberam nenhum tipo de componente. No entanto, esses materiais tendem a ser envolvidos por uma cápsula fibrosa que o isolam do meio vivo. A espessura da camada fibrosa depende de muitos fatores como as condições do implante, tecido e carga mecânica existente na interface (HENCH; WILSON, 1993; CASTNER; RATNER, 2002).

Bioativos- Materiais que favorecem a ligação química entre o material implantado e o tecido ósseo (osteointegração), sem a presença de invólucros fibrosos. Em função da similaridade química entre tais materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio de recobrimento por células ósseas. Quando o material bioativo é implantado no corpo, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorrem na interface implante/tecido. Essas reações eventualmente resultam em uma ligação interfacial de natureza química e não física (HENCH; WILSON, 1993). Os materiais bioativos podem ainda serem classificados em:

Materiais osteoindutores- São materiais que promovem uma resposta intracelular e extracelular na interface. Por meio desse processo uma superfície bioativa é colonizada pelas células troncos livres no ambiente deficiente como resultado de intervenções cirúrgicas.

Materiais osteocondutores- Os materiais osteocondutores promovem uma superfície biocompatível que favorece o desenvolvimento das células ósseas. Isso ocorre quando um material promove somente uma resposta extracelular na interface. Como exemplo pode-se citar a hidroxiapatita sintética (CAO; HENCH, 1996).

Reabsorvíveis

Implantes reabsorvíveis são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo após certo período de contato com o tecido. Esses materiais são muito importantes em aplicações clínicas em função de serem desnecessárias novas intervenções cirúrgicas para a retirada do material implantado. São exemplos desses materiais os fosfatos tricálcico, ácidos poliláticos e poliglicólicos. (HENCH; WILSON, 1993).

Segundo Shirliff e Hench (2003) a classificação de biomateriais em bioinertes ocorreu na primeira geração de biomateriais do qual o principal objetivo era obter uma combinação das propriedades que fossem próximas as do tecido que seria substituído, de forma a provocar a mínima reação tóxica possível. Já os materiais reabsorvíveis e bioativos pertencem à segunda geração de biomateriais. Desde então, vários materiais foram enquadrados em uma

dessas categorias, o que promoveu um avanço na produção de dispositivos para aplicações biomédicas, e conseqüentemente uma melhora na qualidade de vida das pessoas.

Apesar desse avanço, observou-se que tais materiais falhavam em torno de 10-25 anos após ser implantado, o que levava o paciente a uma outra intervenção cirúrgica. Além disso, eles não respondem a uma mudança fisiológica ou estímulo bioquímico, ao contrário do tecido vivo. Devido a essas limitações surgiu recentemente a terceira geração de biomateriais que tem como foco principal melhorar a capacidade de regeneração do tecido pela estimulação de genes, os quais iniciam o reparo do tecido danificado ou doente. De uma forma geral todos esses biomateriais necessitam ter, além de suas características, auxílio para ligar-se ao tecido vivo.

3.1.1 Fosfatos de Cálcio

Alguns fosfatos de cálcio têm sido muito utilizados nestes últimos anos como biomateriais, principalmente, porque muitas das suas fases químicas estão presentes em alguns tecidos como, por exemplo, nos ossos e dentes. Entretanto, os fosfatos podem cristalizar-se irregularmente em regiões indesejáveis dando origem às calcificações patológicas (DOROZHKIN; EPPLÉ, 2002). Dentre os fosfatos de cálcio mais importante para aplicações biomédicas estão: hidrogenofosfato de cálcio dihidratado [$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DCPD], hidrogenofosfato de cálcio anidro [CaHPO_4 , DCPA], fosfato de cálcio amorfo [ACP], fosfato octacálcico [$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, OCP] e hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA], além disso, esses fosfatos têm sido identificados como as principais fases que se precipitam durante os testes de bioatividade realizados *in vitro* (LEGEROS, 1991; ELLIOTT, 1994).

De forma genérica, as biocerâmicas à base de fosfato de cálcio degradam com uma velocidade dada pela seguinte ordem decrescente: bruxita – $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ > fosfato dicálcico anidro - CaHPO_4 > fosfato octacálcico – $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A velocidade de reabsorção pode aumentar com o aumento da área superficial, com a diminuição da cristalinidade e tamanho de grão. Portanto, para uma determinada aplicação, pode-se selecionar a fase desejada e o método de processamento no qual se obtém uma microestrutura que permita que as biocerâmicas à base de fosfato de cálcio tenham uma bioabsorção mais adequada com a reposição dos tecidos (KAWACHI et al., 2000).

É bem conhecido que o tipo de fase de fosfato formada no processo de obtenção vai depender das condições do meio, tais como: temperatura, pH, concentração de íons, razão molar Ca/P, dentre outros. Neste contexto, os diagramas de fases são úteis para ilustrar o

mecanismo pelo qual a HA se forma por meio das reações de precipitação/dissolução e expressam a variação da solubilidade molar do componente mais relevante em função do pH. No caso dos fosfatos, a variação da solubilidade é expressa em termos do íon comum a todos os componentes, neste caso, o íon cálcio (BROWN, 1999).

Hidroxiapatita (HA)

A HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é um dos materiais utilizados pelos vertebrados para compor o esqueleto, devido à sua capacidade de atuar como reserva de cálcio e fósforo. Além disso, a hidroxiapatita biológica contém ainda íons diversos, tais como: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-} e outros. Além de ser considerada a fase mais estável em ambiente fisiológico, sendo, portanto, o componente principal do mineral ósseo, a HA possui propriedades de biocompatibilidade e bioatividade. Dessa forma, ela é capaz de favorecer o crescimento ósseo nos locais em que se encontra (osteocondutividade), estabelecer ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioatividade), permitindo assim a proliferação das células ósseas (osteócitos), as quais não a distinguem da superfície óssea, o que indica a grande similaridade química superficial. Contudo, a baixa resistência mecânica dessas cerâmicas tem limitado suas aplicações como implantes (JARCHO, 1992).

A hidroxiapatita presente no tecido ósseo vivo se diferencia da obtida por métodos sintéticos por sua maior cristalinidade e a presença de substituições iônicas em sua estrutura. Essas peculiaridades desempenham um papel importante em seu comportamento biológico (LEGEROS, 1991). Dessa forma, as apatitas biológicas não são puras, visto que acomodam facilmente uma grande variedade de substituições catiônicas e aniônicas na sua estrutura, o que interfere nas suas propriedades cristalinas, morfológicas e os parâmetros de rede. Por exemplo, a incorporação de íons carbonato, CO_3^{2-} , na estrutura da HA, dá origem à hidroxiapatita carbonatada e esse íon pode ser incorporado por meio de dois sítios, PO_4^{2-} substituição do tipo B e OH^- do tipo A. Este último tipo de substituição ocorre em reações de síntese de HA realizadas a temperaturas elevadas e em atmosfera de dióxido de carbono, originando um material bastante cristalino, enquanto que o primeiro tipo ocorre nas reações de precipitação em meio aquoso e é referida por diminuir a cristalinidade e o tamanho do precipitado. As apatitas carbonatadas do tipo A são encontradas tipicamente em osso velho, enquanto que a do tipo B é mais abundante no osso jovem (AOKI, 1994).

Tabela 2: Propriedades mecânicas da Hidroxiapatita

Hidroxiapatita	Resistência à compressão (MPa)	Resistência à tração (MPa)	Módulo de elasticidade (GPa)
Porosa	7,69	2,5	-----
Densa	207-897	69-193	34,5-103

Fonte: Akao et al. (1981)

As propriedades da HA faz dela um material viável para utilização em substituições ósseas (EANES, 1980). Além de apresentar propriedades de biocompatibilidade e bioatividade, também tem uma alta capacidade de aderir e/ou absorver moléculas fazendo com que possa ser utilizada como um suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos, com eficácia em tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (MAVROPOULOS, 1999).

A célula unitária da HA é hexagonal formada por 10 íons de $[\text{Ca}^{+2}]$, 6 íons de fosfatos $[(\text{PO}_4)^{-3}]$ e 2 íons de hidroxila $[\text{OH}^-]$. Dessa forma a representação da fórmula molecular na célula unitária, é dada por:

O cálcio pode ser substituído por metais e os grupos $[\text{OH}^-]$ e $[(\text{PO}_4)^{-3}]$ por outros grupos aniônicos como $[\text{Cl}^-]$, $[\text{F}^-]$ e $[(\text{CO}_3)^{-2}]$. De acordo com a substituição aniônica catiônica, as propriedades da HA são alteradas, desencadeando assim, mudanças nas propriedades físico-químicas e biológicas.

Figura 1. Estrutura cristalina da HA: a) arranjo tridimensional e b) plano basal. Adaptada de ALMQVIST et al. (1999).

A posição do íon OH^- na estrutura cristalina da HA possibilita a sua troca deste por outros íons, tais como F^- , Cl^- e CO_3^{2-} .

A utilização de HA em recobrimentos tornou-se popular em implantes dentários e ortopédicos devido às seguintes vantagens: rápida adaptação óssea, não formação de tecido fibroso, íntima adesão implante/tecido, tempo de cicatrização reduzido e maior tolerância à imprecisões cirúrgicas. Estas vantagens, relativamente de curto prazo, podem propiciar outros fatores que aumentam a estabilidade a longo prazo dos implantes. O recobrimento de HA

pode fornecer maior tolerância às mudanças ósseas naturais inevitáveis e um sistema de manutenção do osso ao redor da área recoberta (KAY, 1992).

3.1.2 Titânio e suas Ligas

O titânio foi descoberto em 1790 na Inglaterra pelo químico William Gregor ao analisar uma amostra de areia da região do vale de Manaccan na Cornualha. Ele pode ser encontrado sob mais de uma forma, pois possui propriedades alotrópicas. À temperatura ambiente, a sua estrutura cristalina mais estável é a hexagonal compacta (hc), a qual se constitui na fase α . Alguns elementos químicos estabilizam a fase β , a qual possui estrutura cúbica de corpo centrado (CCC) e que, no titânio puro, só é estável a temperaturas maiores que 883 °C (BROOKS, 1982).

O titânio é um metal de transição, com o último nível eletrônico (d) incompleto, pertencente ao subgrupo IVB. Forma soluções sólidas substitucionais e intersticiais de acordo com os critérios estabelecidos nos estudos pioneiros de Hume-Rothery. É um elemento alotrópico, isto é, existe em mais de uma forma cristalográfica. À temperatura ambiente, o titânio metálico possui estrutura hexagonal compacta (hcp), chamada fase alfa (α), a qual passa por uma transformação cristalina por volta de 882°C, tornando-se uma estrutura cúbica de corpo centrado (ccc), chamada fase beta (β), como visto na figura 2, que se torna estável até o ponto de fusão do metal em torno de 1660°C (POLMEAR, 1989).

Figura 2 – Formas alotrópicas do titânio

Fonte: Jachinoski et al. (2007)

Titânio e suas ligas têm sido muito utilizados para produzir componentes biomédicos, principalmente na área odontológica e ortopédica, pois exibem algumas propriedades interessantes como resistência à tenacidade, biocompatibilidade, resistência à corrosão, estabilidade química em ambiente fisiológico e módulo de elasticidade mais próximo ao do osso, se comparado com o aço inoxidável ou com a liga de Co-Cr-Mo, Tabela 3 (FENG et al., 1999; YAN et al., 1997; AOKI, 1994). O que confere a biocompatibilidade e a resistência à corrosão do titânio e suas ligas é a existência de uma camada de óxido formada na sua superfície. Na Tabela 3 é apresentado o módulo de elasticidade de alguns materiais biomédicos.

Tabela 3: Comparação do módulo de elasticidade do osso com materiais utilizados como implantes

Materiais	Módulo de elasticidade (GPa)
Osso cortical	15,2-40,8
Ticp	110
Ti6Al4V	116
Aço inoxidável F138	190
Co-Cr-Mo	210

Fonte: Ratner (2004)

Várias metodologias têm sido desenvolvidas com o intuito de melhorar a bioatividade da superfície do titânio e de suas ligas. Isto pode ser possível quando estes materiais são submetidos a alguns tipos de pré-tratamento, incluindo tratamento térmico, tratamento com soluções alcalinas e ácidas.

Os fosfatos são frágeis e apresentam baixa resistência à fratura, o que limita a sua utilização como implante. Por outro lado, embora os metais como titânio e suas ligas tenham propriedades mecânicas superiores, não se ligam ao osso, exceto sob condições específicas, no entanto, várias técnicas foram propostas com a finalidade de recobrir substratos não

bioativos com fosfatos de cálcio, já que estes possuem propriedades osteocondutoras e habilidade de ligar-se quimicamente com o osso vivo (YAN et al., 1997).

Segundo Tas (2000), a razão para recobrir um implante metálico com fosfato de cálcio é produzir uma superfície que promova o crescimento ósseo e induza uma maior velocidade na união direta entre o implante e o tecido ósseo.

Dentre algumas técnicas utilizadas, encontram-se sol-gel, *ion sputtering*, eletroforese, e o *plasma spray*, sendo que esta última tem sido utilizada para fins comerciais. No entanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens, tais como: inexistência de ligação química entre o metal e o fosfato de cálcio, o que comprometerá a adesão do recobrimento; impossibilidade de recobrir implantes porosos, além da degradação dos fosfatos devido à elevada temperatura do processo, o que afeta a sua bioatividade e dificulta o controle da composição do recobrimento (BARRERE et al., 2001).

É conhecido que a resposta biológica e o sucesso do implante dependem das propriedades químicas e físicas da superfície. Dessa forma, torna-se necessária a utilização de métodos de modificação de superfície para melhorar a atividade biológica destes materiais e favorecer a formação óssea (ELLINGSEN, 2003).

3.2 Modificação da Superfície do Tícp.

A interação dos implantes de titânio com o tecido ósseo pode ser melhorada e acelerada pela presença de íons cálcio e fosfato na superfície destes materiais, pois o processo de osseointegração é iniciado pela troca destes íons entre o material sintético e o meio biológico. Porém, alguns estudos mostram que é possível melhorar a capacidade do titânio, principalmente relacionado à estabilidade química e energia superficial (LAYROLLE et al., 2004).

Várias técnicas têm sido utilizadas para modificar a superfície de titânio para aumentar a sua integração óssea ou até mesmo produzir uma superfície bioativa (para promover a ligação óssea) (LAYROLLE et al., 2004). Exemplos de tais métodos incluem ácidos que atacam a superfície do Ti para aumentar a rugosidade da superfície do substrato e do recobrimento (hidroxiapatita) para formar uma superfície que é semelhante ao tecido ósseo (WENNERBERG et al., 1996). Uma técnica de recobrimento utilizada para testes de bioatividade e método de recobrimento de HA é o processo biomimético (UCHIDA et al., 2003).

A bioatividade de um material é definida e relacionada com a capacidade que ele possui em criar ligações químicas ao tecido ósseo (KOKUBO et al., 2006). No método de Kokubo, o material de implante é imerso num fluido corpóreo simulado (SBF) à 37 ° C durante quatro semanas. O fluido corporal simulado é supersaturado para a formação de hidroxiapatita. Se houver formação de hidroxiapatita sobre a superfície dentro do período de quatro semanas, o material de implante é considerado bioativo. Tem sido provado que, em essência, um material bioativo tem uma carga superficial negativa na solução de SBF que por sua vez promove a formação de hidroxiapatita sobre a superfície.

O óxido de titânio natural que se forma espontaneamente na superfície do substrato está carregado negativamente a um pH de 7,4. Os grupos Ti-OH na superfície se tornam desprotonados por imersão em soluções de SBF para formar grupos carregados negativamente (ZHU et al., 2004). Existem diferentes métodos para aumentar a carga negativa da superfície do titânio, por exemplo, o tratamento de óxido de titânio com formação química cristalina (WANG et al., 2001). Por meio de tratamentos químicos, um método comum é a produção de uma camada de titanato de sódio sobre a sua superfície através da imersão do material de implante (Ti), em solução de alta concentração de NaOH. O tratamento da superfície do titânio com NaOH produz uma estrutura de rede fina de escala nanométrica na superfície do titânio (PATTANAYAK et al., 2011). A oxidação da superfície usando um tratamento térmico (HT) e de imersão em plasma sanguíneo é habitualmente utilizado para aumentar a cristalinidade dos óxidos de titânio. A imersão em solução de hidróxido de sódio combinada com o tratamento térmico tem sido previamente aplicada a uma camada de titânio poroso sobre um implante de quadril e tem sido utilizado clinicamente no Japão desde 2007 (KAWANABE et al., 2009). Este tratamento produz uma rugosidade de superfície na escala nanométrica, com área de superfície específica elevada (KAWANABE et al., 2009). O papel da camada de óxido sobre as propriedades químico-biológicas do titânio tem sido divulgado em vários estudos (NYGREN et al., 1997). A camada de óxido, também tem papel importante na adsorção de proteínas e íons cálcio e de fosfato sobre a superfície do titânio (ROHANIZADEH et al., 2004).

Para combinar a resistência mecânica dos materiais bioinertes ou biotoleráveis com a bioatividade dos materiais bioativos existem duas possibilidades: a primeira consiste na preparação de materiais compósitos, nos quais o material bioativo é homogeneamente disperso em uma matriz resistente do material bioinerte ou biotolerável; a segunda possibilidade consiste em recobrir o material bioinerte ou biotolerável de boa resistência mecânica com uma camada bioativa através da deposição de um material bioativo (RIGO,

1999). As duas possibilidades apresentam como principal dificuldade a necessidade de obter uma boa união interfacial entre o componente bioativo e a matriz bioinerte (ou biotolerável) para evitar a concentração de defeitos na interface que conduziria à falha do material.

A preparação e modificação de superfícies com recobrimentos bioativos têm despertado o interesse em explorar o potencial de métodos simples, que utilizam soluções aquosas e baixa temperatura (<100°C) (FENG, 2000).

3.2.1 Método Biomimético

No início da década de 70, iniciou-se a busca por implantes que agregassem tanto propriedades bioativas, apresentadas pelos fosfatos de cálcio, como também boas propriedades mecânicas, provenientes geralmente dos metais, sendo que o primeiro implante com essas características foi obtido em 1972. Desde então, algumas técnicas de recobrimentos foram propostas com a finalidade de conjugar as propriedades do titânio e suas ligas, como a sua resistência à fratura, que é cerca de 40 vezes maior do que a HA, com a bioatividade de algumas cerâmicas, para, dessa forma, obter um material compósito, o qual pode ser utilizado como biomaterial (AOKI, 1994).

Um desses métodos, desenvolvido por ABE et al. (1990), denominado de biomimético, consiste em colocar o substrato a ser recoberto em uma solução sintética, denominada *Synthetic Body Fluid – SBF*, de composição iônica semelhante ao do plasma sanguíneo. Conjuntamente com o substrato coloca-se uma placa de vidro G bioativo distante cerca de 0,5 mm deste substrato. Depois de mantido o sistema durante 7 dias à 37°C, forma-se sobre o substrato uma camada contínua e homogênea de espessura composta por cristaltos de hidroxiapatita semelhante à biológica muito finos e de aparência fibrosa. Por reimersão durante mais 7 dias em uma solução 1,5 vezes mais concentrada que a primeira, obtém-se um aumento na espessura da camada de $1,5 \mu\text{m}$. A caracterização do recobrimento demonstrou que se tratava da hidroxiapatita carbonatada de baixa cristalinidade, muito semelhante à da hidroxiapatita biológica presente no tecido ósseo natural. Abe e colaboradores propuseram o seguinte mecanismo de recobrimento:

1. Os íons silicatos presentes no vidro G dissolvem-se e adsorvem-se sobre o substrato.
2. Ocorre a nucleação de hidroxiapatita sobre os íons silicatos adsorvidos.
3. Os núcleos de hidroxiapatita crescem às custas da SBF supersaturada com relação a hidroxiapatita, produzindo-se o recobrimento do substrato ($1 \mu\text{m}$ de espessura).

4. A espessura da camada aumenta (até 15 μm) às custas da SBF 1,5 vezes mais concentrada.

Esta técnica tem sido proposta por apresentar algumas vantagens em relação às demais (RIGO et al., 1999; BARRERE et al., 2002; LU; LENG, 2005; YAN et al., 1997; LIU et al., 2003). Uma dessas vantagens é o fato desse método ser realizado em condições fisiológicas, a temperatura em torno de 37 °C, o que possibilita recobrir materiais sensíveis à temperatura como os polímeros; além disso, apresenta baixo custo; pode ser utilizado para recobrir materiais que apresentem geometria complexa; e os recobrimentos apresentam boa uniformidade e adesão, devido à existência de ligação química que é responsável pela união ao substrato, além disso, existe a possibilidade de incorporar moléculas orgânicas, como proteínas, na estrutura dos cristais.

A camada de apatita formada na superfície do titânio, quando em contato com o fluido corpóreo simulado, é mais próxima à composição do osso, se comparado com o recobrimento obtido por *plasma spray* (LIANG et al., 2003). Além disso, acredita-se que ela possua melhores propriedades osteocondutoras pelo fato do método não alterar as propriedades da HA (BARRERE et al., 1999).

Um dos pontos críticos quando o método biomimético é utilizado para recobrir implantes metálicos, é a questão do tempo, que é considerado relativamente longo. Em função dessa problemática, vários trabalhos têm sugerido alguns tratamentos com o objetivo de diminuir o tempo de formação da apatita, como por exemplo, imergir os substratos em soluções cujas concentrações são maiores que as dos fluidos corpóreos (BARRERE et al., 2002; STOCH et al., 2000; KASUGA et al., 2002).

3.2.2 Soluções simuladoras do fluido corpóreo

Algumas soluções, que simulam o fluido corpóreo simulado, têm sido preparadas com proteínas, visto que a adsorção de proteína na superfície dos biomateriais influencia o processo de mineralização, e constitui-se num dos primeiros passos de uma série de processos biofísicos e bioquímicos que determinam a resposta biológica do organismo ao biomaterial (MARQUES, 2003).

A proteína mais empregada com tal finalidade tem sido a albumina, pois ela é a mais abundante no sangue e também a proteína que possui vários sítios de ligação com o cálcio, o que pode interferir no processo de mineralização (MARQUES, 2003). Além do uso das

proteínas, algumas soluções utilizadas no meio de cultivo (KIZUKI et al., 2003) também têm sido empregadas para produzir uma camada de apatita sobre a superfície da HA. As soluções simuladoras do fluido corpóreo acelular, com concentração igual ou próxima à do plasma sanguíneo, têm reproduzido bem os resultados obtidos *in vivo* (KASUGA et al., 2002). Dentre as soluções desenvolvidas com a mesma finalidade, encontram-se a de Ringer (JUN et al., 2003), Neuman (MARQUES, 2003) e a de Kokubo (FENG et al., 1999). Esta última é a que tem sido mais utilizada, pois é a que mais se aproxima da composição iônica do plasma, aprovada pela norma ISO 23.317. Sendo que as soluções simulam apenas a parte inorgânica acelular do fluido corpóreo, componentes como proteínas, glicose, vitaminas e outros são excluídos (KASUGA et al., 2002)..

Barrere et al. (1999) estudaram várias composições de soluções simuladas com o propósito de avaliar a influência dos íons Mg^{2+} e HCO_3^- no processo de mineralização dos fosfatos de cálcio. Assim, eles observaram que a camada de apatita formada sobre a superfície do Ti6Al4V variou de acordo com a solução utilizada. Quando a solução era isenta dos íons Mg^{2+} e HCO_3^- , a camada de fosfato era densa e apresentava cristaltos alongados. Já quando apenas uma dessas espécies era excluída da solução, a camada de fosfato formada apresentava cristaltos menores, e não estava totalmente recoberta, sendo que esse comportamento foi mais pronunciado quando o Mg^{2+} estava em solução. Lu e Leng (2005) também se referem ao Mg^{2+} como um inibidor durante o processo de nucleação e crescimento dos fosfatos de cálcio em solução aquosa.

Bastos et al. (2005) realizaram um estudo teórico, por meio de modelagem computacional, com duas soluções que simulam o fluido corpóreo. As soluções estudadas foram a de Kokubo e uma solução avaliadora de bioatividade (SAB), proposta pelos autores. As comparações realizadas mostraram que os perfis das propriedades termodinâmicas, coeficiente de atividade, variação da energia livre de Gibbs e produto iônico, de ambas as soluções, apresentaram comportamento similares. Desta forma, os autores sugerem que a solução proposta por Kokubo pode ser uma forte candidata a ser usada em precipitação heterogênea, pois é mais simples e mais efetiva durante o processo de formação do recobrimento.

A solução avaliadora de bioatividade, (SAB), foi desenvolvida diante das dificuldades experimentais e problemas éticos inerentes aos procedimentos *in vivo* para se avaliar a bioatividade de um determinado material, na qual são envolvidos procedimentos cirúrgicos e, na maioria dos casos, posterior sacrifício dos animais envolvidos, tem sido proposto vários procedimentos *in vitro* visando reproduzir, da maneira mais fiel possível, o que se tem

observado *in vivo*. A primeira questão a ser colocada é: como saber se um material é ou não bioativo. Os materiais bioativos desenvolvidos até o momento apresentam a habilidade de formação em sua superfície de uma camada de HA carbonatada quando em contato com os tecidos vivos, ligando-se quimicamente ao tecido ósseo (KOKUBO et al., 2008; KIM et al., 2003; YAMAMURO et al., 2006). Por sua vez, essa habilidade que os materiais bioativos apresentam pode ser reproduzida *in vitro*, desde que o material seja exposto a um meio apropriado. Assim, com base nos resultados obtidos, é possível traçar um direcionamento, devendo a formação *in vitro* de HA na superfície do material ser considerada como um indício de que o material possa mesmo vir a ser bioativo, o que reduz, de forma significativa, o número de experimentos que seriam realizados *in vivo* (KOKUBO et al., 2008).

Li et al. (2002) formularam uma solução simplificada composta pelos seguintes reagentes, NaHCO_3 , CaCl_2 e NaH_2PO_4 , que foi utilizada para recobrir a superfície do titânio modificado quimicamente com NaOH . Os autores observaram que o NaHCO_3 aumentou o pH da solução gradualmente, elevando assim a supersaturação em relação aos íons cálcio, o que acelerou o processo de formação do recobrimento. Por meio do método biomimético, foi possível obter recobrimentos de fosfatos de cálcio com espessura na faixa de 30-40 μm . Os autores concluíram que foi possível alterar a composição do recobrimento de acordo com a proporção de CaCl_2 , NaH_2PO_4 e NaHCO_3 utilizada para preparar a solução.

3.2.3 Processo de Nucleação dos Fosfatos de Cálcio

Os meios de formação de apatita sobre diversas superfícies são considerados essenciais para desenvolver materiais bioativos com novas funções físicas, químicas, e biológicas (KOKUBO et al., 2000).

São várias as dificuldades para entender o mecanismo que está relacionado com as diferentes fases de fosfatos que podem ser precipitadas, dependendo de algumas condições da solução como concentração e pH. Para desenvolver estudos nesse campo, é importante utilizar soluções com composição variada (FENG et al., 1999), nem que seja para entender pelo menos o papel da composição química no processo de deposição.

A superfície de alguns implantes metálicos, especificadamente do titânio, não induz naturalmente a nucleação de fosfato de cálcio em ambiente fisiológico simulado ou em soluções supersaturadas em cálcio e fósforo. Para contornar esta situação, vários métodos têm sido propostos para tratar a superfície do titânio de forma a ancorar alguns grupos específicos na sua superfície, que são responsáveis por induzir a nucleação dos fosfatos de cálcio. Dentre

estes grupos, destacam-se as hidroxilas (Ti-OH, Si-OH, Zr-OH, Nb-OH, Ta-OH), carboxilas (-COOH) e os ortofosfatos H_2PO_4^- . Estes grupos funcionais possuem pares de elétrons livres que atraem os íons cálcio da solução formando assim uma camada de cálcio amorfo. Sendo que o método mais reportado na literatura é o tratamento alcalino com NaOH (ANDRADE, 1999; FENG et al., 1999; LEE et al., 2003) que promove a formação do TiOH, favorecendo assim a formação do recobrimento de fosfato de cálcio quando imerso em solução que simula o fluido corpóreo ou solução supersaturada em cálcio e fósforo.

Um dos mecanismos proposto para explicar a formação dos núcleos de fosfatos de cálcio sobre o titânio tratado com NaOH é descrito a seguir, e está representado na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática da interação do titânio ativado com solução de NaOH e imerso em solução de SBF

Fonte: Adaptada de Kokubo et al. (2007)

Quando o titânio é submetido a um tratamento alcalino, o óxido presente na sua superfície reage com NaOH presente na solução segundo a Equação 1.

Gerando assim uma camada de titanato de sódio amorfo, quando submetido a um tratamento térmico. Após imersão desse material em SBF, haverá troca iônica dos íons Na^+ da camada amorfa com os íons H_3O^+ presentes na solução, o que resultará na formação de uma camada de Ti-OH sobre a superfície do titânio. Em virtude da troca iônica, o pH da solução aumentará, pois os íons H_3O^+ são removidos da solução, o que favorecerá o processo de nucleação de alguns fosfatos. Em seguida os grupos Ti-OH reagem com os íons cálcio da solução (formando um composto de cálcio amorfo), que por sua vez reagirão com os íons fósforo e carbonato da solução dando origem à camada de apatita (JONASOVA et al., 2004).

Feng et al. (1999) mostraram que alguns fatores favorecem o crescimento dos cristais de fosfatos sobre a superfície do titânio tratado com NaOH, dentre os quais, encontram-se: a

elevação da concentração da solução NaOH, o tempo de imersão do Ti nessa solução, bem como a temperatura da mesma. O aumento da concentração dos íons Ca^{2+} na solução simulada também favoreceu a formação do recobrimento.

3.3 Processos inflamatórios

A hidroxiapatita tem sido amplamente usada como um biomaterial devido às suas propriedades e estrutura química. No entanto, os recobrimentos de HA não apresentam propriedades antibacterianas (ZHENG, 2009).

Quando implantamos um biomaterial no corpo humano, logo nos deparamos com graves processos inflamatórios, decorrente de uma reação do organismo a uma infecção ou lesão dos tecidos. Eles geralmente são causados pela adesão e colonização de bactérias no material implantado (YOSHIKI ANDO et al., 2009).

Capanna et al, relataram que a taxa de infecção no pós-operatório foi de 5% para casos primários, 6% para os casos de revisão, e 43% para a revisão de casos previamente infectados (ZHENG, 2009).

Shimazaki et al, observaram que a substituição de articulações artificiais, proporciona alívio da dor, melhora a amplitude de movimento, melhora a qualidade de vida dos pacientes. No entanto, o grande desafio é controlar as complicações associadas às infecções bacterianas. Essas complicações não incomodam apenas os pacientes, mas também aumentam os custos médicos.

Yoshiki Ando et al. (2009), também relataram a importância dos implantes e observaram que de acordo com o sistema de vigilância nacional dos Estados Unidos, um total de 134.731 transplantes de prótese de quadril ocorreram de janeiro de 1992 a junho de 2004 nos Estados Unidos. Sendo que a taxa primária de infecção foi entre 0,86% e 2,52%.

Titânio e ligas de titânio são amplamente utilizados em ortopedia e em implantes dentários, mas as infecções associadas a esses implantes ainda representam sérias ameaças, levando a possíveis complicações, como internação prolongada, complexo processo de revisão, falha do implante, a remoção completa, o sofrimento do paciente, encargos financeiros e até mesmo morte. Os implantes com titânio estão ficando cada vez mais populares na indústria biomédica, com isso cresce também a prevalência de infecções. Melhorar a capacidade antibacteriana dos materiais é imprescindível para diminuir o tempo de internação do paciente e diminuir gastos desnecessários (LINGZHOU ZHAO, 2009).

Medidas preventivas devem ser tomadas, como por exemplo, obtenção de salas cirúrgicas mais limpas, procedimentos severos de assepsia e uso de agentes antibacterianos adequados (SHIMAZAKI et al., 2009).

A prevenção eficaz das infecções associadas ao implante é de extrema importância para evitar revisões cirúrgicas cujo custo é alto e a longa permanência em hospital, que contribuem para aumentar a morbidade do paciente. Uma estratégia comum e aceita para tratar e prevenir infecções associadas a implantes ortopédicos é fornecer antibióticos de forma controlada no local do implante para administrar altas doses no local, sem, contudo exceder a toxicidade sistêmica desses fármacos (GERHART, 1993).

A maioria dos biomateriais antimicrobianos é constituída de prata elementar, sais de prata ou complexos de prata incorporada nos materiais orgânicos (polímeros) ou inorgânicos (biovidros e HA). Embora a atividade antimicrobiana *in vitro* de polímeros (poliamida, poliuretano e PMMA) e biovidros contendo prata sejam extensivamente estudada (ALT, 2004), a ação bactericida do recobrimento via método biomimético de hidroxiapatita com prata tem sido relatada em menor extensão (CHEN, 2008; ZHENG, 2009; CHEN 2009; SHIMAZAKI 2009).

3.3.1 Tipos de bactérias

As bactérias foram observadas pela primeira vez por Antoine van Leeuwenhoek em fins do século XVI, mas esses seres só começaram a despertar o interesse dos cientistas no final do século XIX. Bactérias são microrganismos unicelulares (constituídos por uma célula), procariontes (que são células mais simples, pois não tem núcleo nem compartimentos membranosos no citoplasma) que podem ser encontrados na forma isolada ou em colônias e pertencem ao Reino Monera (MURRAY et al., 2004) .

O método mais simples de classificação das bactérias é através da sua forma. Existem 3 grandes grupos: 1) **Cocos**: bactérias em formato esférico que apresentam tendência a se agrupar. 2) **Bacilos ou bastonetes**: bactérias em formato de bastão. Podem ou não possuir flagelos que as ajudam a se locomover. 3) **Espiraladas**: São as bactérias em forma de espiral, geralmente dividida em dois grupos: espirilos e espiroquetas.

Porém, esta divisão em formatos não é muito útil, pois existem várias bactérias com formatos diferentes, como de vírgula (vibriões), bactérias em forma de bastão que não são consideradas bacilos, presença ou ausência de flagelos, e ainda bactérias com formas híbridas, tipo cocobacilos (MURRAY et al., 2004) .

Basear-se somente na forma pode causar muita confusão. Por isso, existem vários outros modos de se classificar e caracterizar as bactérias; um exemplo é o método de Gram.

A técnica de Gram, também conhecida como coloração de Gram, é um método de coloração de bactérias desenvolvido pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram (1853-1938), em 1884, o qual permite diferenciar bactérias com diferentes estruturas de parede celular a partir das colorações que estas adquirem após tratamento com agentes químicos específicos (MURRAY et al., 2004).

A forma das bactérias pode ser observada através de coloração de Gram que divide as bactérias em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas, aproximadamente iguais em número e importância. A reação das bactérias à técnica de Gram expressa diferentes características, de modo especial no que diz respeito à composição química, estrutura, permeabilidade da parede celular, fisiologia, metabolismo e patogenicidade. A parede da célula Gram-negativa é constituída por estruturas de múltiplas camadas bastante complexas, que não retêm o corante quando submetidas a solventes nos quais o corante é solúvel, sendo descoloradas e, quando acrescentado outro corante, adquirem a nova coloração. Já a parede da célula Gram-positiva consiste de única camada que retém o corante aplicado, não adquirindo a coloração do segundo corante. (BURNETT et al., 1982; NISENGARD et al., 1994).

A parede celular da bactéria Gram-positiva é única e consiste de uma camada espessa, composta quase que completamente por peptidoglicano, responsável pela manutenção da célula e sua rigidez. As múltiplas camadas de peptidoglicano das bactérias Gram-positivas constituem uma estrutura extremamente forte em tensão, enquanto que nas Gram-negativas o peptidoglicano é apenas uma camada espessa e, conseqüentemente, frágil, conforme figura 4 (SLOTS et al., 1992; NISENGARD et al., 1994).

Figura 4: Diferentes tipos de parede celular

Duas bactérias de diferentes características foram selecionadas no presente trabalho. Uma é a *Staphylococcus aureus*, bactéria gram-positiva, com uma estimativa que uma em cada três pessoas são colonizadas, mas não infectado por ele, (HURTADO et al., 2002).

E a *Escherichia coli*, bactéria gram-negativa, que, juntamente com o *Staphylococcus aureus* é a mais comum e uma das mais antigas bactérias simbiontes do homem (MURRAY et al., 2004).

3.4 A prata para fins bactericida

A grande capacidade antibacteriana da prata é conhecida há muitos anos na literatura e muitos trabalhos têm se dedicado a explicar como ocorre esse fenômeno. O mecanismo mais aceitável indica que os íons Ag^+ se aderem na superfície carregada negativamente das membranas celulares conduzindo a desnaturação de proteínas e levando a uma consequente morte celular (MORONES et al., 2005).

A atividade antimicrobiana da prata é significativamente elevada. A prata é comprovadamente mais letal no combate às infecções do que muitos outros metais na seguinte sequência: $\text{Ag} > \text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Cr} > \text{Pb} > \text{Co} > \text{Au} > \text{Zn} > \text{Fe} > \text{Mn} > \text{Mo} > \text{Sn}$ (ZHAO; STEVENS, 1998).

A Ag^+ apresenta baixa toxicidade para células de mamíferos (ZHAO; STEVENS, 1998), além de apresentar baixa propensão para induzir resistência microbiana comparada a outros materiais antimicrobianos (KIM et al., 2007). Como resultado, a Ag^+ tem sido usada em uma vasta gama de aplicações, tais como: queimaduras e feridas traumáticas, úlceras, recobrimento de cateteres, materiais odontológicos, *scaffold* e dispositivos médicos (RAI et al., 2009; LEI et al. 2008; SILVER et al. 2006; KIM et al. 2007; THOMAS et al., 2007). Também é utilizada em produtos de higiene, incluindo a purificação de sistemas hídricos, forros de máquina de lavar, máquinas de lavar louça, geladeiras e assentos sanitários (SILVER et al., 2006; RAI et al., 2009.).

A fim de reduzir a incidência de infecção pós-operatória, uma investigação tem sido realizada em um material metálico contendo diversas substâncias antibacterianas como *lactoferin*, *viologen*, silício, prata, cobre, zinco, etc. A prata desses recobrimentos exibiu efeito antibacteriano observada contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. e *Staphylococcus aureus*. A prata e sua liberação oportuna no ambiente fisiológico desempenharam um papel importante na inibição da proliferação de bactérias. Não houve

citotoxicidade significativa, oferecendo, assim, boas atividades antibacterianas e excelentes propriedades biológicas (YIKAI CHEN et al., 2008).

Estudos realizados em materiais metálicos mostram que recobrimentos de hidroxiapatita que possuem íons prata são efetivos contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (YIKAI CHEN et al., 2009).

3.4.1 Recobrimentos sobre Ticp contendo agentes antibacterianos inorgânicos

A Ag^+ tem demonstrado sua eficiência e capacidade de inibir o crescimento bacteriano, a partir daí surgiram recobrimentos de HA dopados com Ag^+ com excelentes resultados. Diferentes métodos de recobrimento são encontrados na literatura com o objetivo de incorporar a Ag^+ na HA (FENG et al., 1998).

Um estudo feito por Chen et al. (2006), mostra o recobrimento de HA sobre Ticp ,através da técnica de ion-sputtering, dopado com Ag^+ . A composição da película *co-sputtered* foi controlada por um fornecimento simultâneo de 10W para deposição de Ag e 300W para a deposição de HA. A duração total de pulverização para o *co-sputtering* foi de 3 h. Neste estudo, as análises de DRX do recobrimento de Ag-HA na superfície do Ti apontam os picos de DRX correspondentes às fases da Ag e da HA. De modo geral, a Ag foi incorporada ao recobrimento fornecendo propriedade antibacteriana ao material recoberto.

Trabalhos na literatura onde os autores usaram a técnica de recobrimento por *Plasma spraying* e ainda incorporaram a Ag^+ na HA, como o de Zheng et al., 2009, reportam a excelente habilidade inibitória da Ag^+ contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e a incorporação dos íons na HA, observado através dos ensaios de halos de difusão e DRX. Os íons Ag^+ apresentaram não só a inibição, mas também a manutenção e característica da HA e do material, deixando-o ainda bioativo e biocompatível.

Stobie et al. (2008), utilizando o método sol-gel, obteve recobrimento de HA dopada com Ag, relata que a liberação de íons de prata do recobrimento reduziu a adesão e a formação de um biofilme de *S. epidermidis*. Estes recobrimentos dopados com prata também exibiram atividade antibacteriana significativa contra *S. epidermidis*.

Song et al. (2008), apontaram a obtenção do recobrimento de fosfato de cálcio através de uma solução eletrolítica (Recobrimento Eletrolítico) de baixa concentração de Ag, exibindo atividade antibacteriana in vitro, não citotóxico. Os recobrimentos contendo Ag estavam fortemente dependentes da tensão aplicada e da concentração de Ag. Fases de HA e

α -TCP foram detectadas nos recobrimentos oxidados acima de 400 V, e a presença de Ag foi confirmada por EDS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Foram utilizados substratos de Ticp no formato de pastilhas com aproximadamente 7 mm de diâmetro. Todas as soluções utilizadas ao longo do trabalho foram obtidas com reagentes de grau analítico.

4.2 Métodos

4.2.1 Recobrimento biomimético sobre Ticp

As pastilhas de Ticp foram lixadas com lixa 150 mesh, lavadas com água destilada e secas ao ar em temperatura ambiente.

4.2.1.1. Recobrimento denominado de Tratamento T1

Esse tratamento consistiu em 2 etapas, na etapa 1 - imersão do substrato em uma solução de silicato de sódio (SS) para a fase de nucleação e a etapa 2 - reimersão desses substratos em solução sintética que simula o plasma sanguíneo concentrado (1,5 SBF) para a precipitação e crescimento da camada de apatita.

4.2.1.2. Recobrimento denominado de Tratamento T2

Nesse caso o recobrimento consistiu em 3 etapas, na etapa 1 - tratamento químico da superfície das amostras com NaOH 5M por 24 horas a temperatura de 60°C. Etapa 2 - imersão do substrato em questão em uma solução de silicato de sódio (SS) para a fase de nucleação e a etapa 3 - reimersão desses substratos em solução sintética que simula o plasma sanguíneo concentrado (1,5 SBF) para a precipitação e crescimento da camada de apatita.

4.2.1.3. Recobrimento denominado de Tratamento T3

Esse recobrimento consistiu em 4 etapas, na etapa 1 - tratamento químico da superfície das amostras com NaOH 5M por 24 horas a temperatura de 60°C. Etapa 2- os substratos foram colocados em uma temperatura de 600°C por uma hora e a Etapa 3 - imersão do substrato em questão em uma solução de silicato de sódio (SS) para a fase de nucleação. Etapa 4 - reimersão desses substratos em solução sintética que simula o plasma sanguíneo concentrado (1,5 SBF) para a precipitação e crescimento da camada de apatita.

4.2.2 Etapa da dopagem da camada de fosfato de cálcio com íons Ag

Após a etapa de recobrimento os substratos foram imersos em soluções de AgNO_3 com concentrações de 20 ppm e 100 ppm por 48h a 37°C.

4.3 Caracterização físico-química das amostras

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O equipamento de microscopia eletrônica de varredura (MEV) consiste de uma fonte que gera elétrons que são colimados ao passar por lentes eletromagnéticas, sendo focalizados em uma região muito pequena da amostra. Bobinas adequadamente colocadas promovem a varredura desse feixe sobre a área da amostra a ser examinada. A interação feixe-amostra gera uma série de sinais, como elétrons secundários, por exemplo, que são captados por um detector. Após a amplificação, esse sinal modula o brilho de um tubo de raios catódicos (TRC), que é varrido de forma sincronizada com a varredura da superfície da amostra, gerando uma imagem ponto a ponto da superfície examinada. A técnica é geralmente utilizada para observação de amostras espessas, ou seja, não transparentes a elétrons. A sua grande vantagem é sua excelente profundidade de foco, que permite a obtenção de imagens de superfícies de fraturas ou superfícies irregulares com alta definição (SENA, 2001).

O MEV pode formar imagens a partir de diversos mecanismos de contraste. Os mais utilizados são: contraste de número atômico (ou composicional) e o contraste topográfico. O contraste topográfico é o mais utilizado no equipamento de MEV. Ele é próprio para superfícies que contem relevo, utilizando-se sinais produzidos pelos elétrons secundários, que são elétrons com baixa energia oriundos da superfície da amostra permitindo visualização de detalhes topográficos com elevada definição. No contraste por elétrons retroespalhados, os elétrons coletados são os de maior energia, oriundos de uma profundidade maior da amostra e cuja energia é altamente dependente do número atômico das espécies envolvidas, podendo ser usado para identificar fases com composições químicas diferentes (SENA, 2001).

Os elementos químicos presentes na amostra podem ser detectados e quantificados com o acoplamento de um espectrômetro por energia dispersiva (EDS – *Energy Dispersive Spectroscopy*).

Neste trabalho as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com análise por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) em um microscópio Hitachi modelo TM 3000 no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP).

4.3.2 Difração de Raios X (DRX)

A difratometria de raios X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, encontrando aplicações em diversos campos de conhecimento, mais particularmente na engenharia e ciências de materiais, engenharia metalúrgicas, química além de geociências, dentre outros.

Os raios X ao atingirem o material podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo (dispersão ou espalhamento coerente). O fóton de raios X após a colisão com o elétron muda sua trajetória, mantendo, porém, a mesma fase e energia do fóton incidente. Sob o ponto de vista da física ondulatória, pode-se dizer que a onda eletromagnética é instantaneamente absorvida pelo elétron e reemitida; cada elétron atua, portanto, como centro de emissão de raios X.

Este método faz uso dos raios X de comprimentos de onda conhecidos para determinar os espaçamentos dos planos cristalinos desconhecidos. Os raios X são ondas eletromagnéticas de alta energia e pequeno comprimento de onda. Quando o feixe de raios X atinge os átomos do material a ser analisado, seus elétrons são acelerados e passam a reemitir radiação com a mesma energia (mesmo comprimento de onda), porém em todas as direções. Se os átomos estiverem num arranjo periódico, as ondas sofrerão interferência, ou seja, ocorre uma reflexão apenas em certos ângulos de incidência e reflexão (JACHINOSKI; SILVA 2005).

A técnica de difratometria de raios X foi utilizada para verificar quais as fases presentes no material.

As amostras foram analisadas por difratometria de raios X por incidência rasante (DRX) no Laboratório do Instituto de Física de São Carlos -USP em um Difratômetro Rigaku Rotaflex modelo ru-200b câmera *multi purpose* no Instituto de Física de São Carlos -USP.

4.3.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica do infravermelho pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra, é a técnica espectroscópica molecular mais flexível e versátil na atualidade. Pode ser aplicada a uma larga faixa de materiais de origem orgânica e inorgânica.

A espectrometria no infravermelho empregando métodos de reflexão gera procedimentos de análise não destrutiva, que são extremamente úteis. Tais procedimentos podem ser aplicados ao estudo de amostras poliméricas utilizadas nas formas de revestimento,

laminados, filmes coextrudados multicamadas, e outras amostras opacas à radiação eletromagnéticas na região do infravermelho.

Baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais).

A análise das amostras foi executada em um espectrofotômetro no infravermelho por reflectância difusa (DRIFT) (Perkin Elmer – modelo Spectrum 1000) com varredura de 400 a 4.000 cm^{-1} no Laboratório de Materiais Vítreos – LaMaV do Departamento de Engenharia de Materiais – DEMa da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

4.4 Caracterização *in vitro*

4.4.1 Ensaio de cultura de bactérias - Teste de halo de inibição

O meio de cultivo foi preparado e esterilizado conforme as instruções do fabricante (BioBrás Diagnósticos) e distribuído em placas de Petri. Para a obtenção das bactérias, 100 μL da solução estoque de *S. aureus* e *Escherichia coli* (armazenada em glicerol 10% e mantida sob congelamento) foram incubadas em 10 mL de caldo BHI e ficaram sob agitação constante por 18 horas a 37°C até atingir exponencial do crescimento. A cultura foi diluída para 3×10^8 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia/mL) e 100 μL desta suspensão foram inoculados em superfície de agar *Mueller-Hinton* e espalhadas com o auxílio de uma alça de *Drigalsky* até a secagem do mesmo. Sobre a superfície da placa semeada foram depositados discos com 7 mm de diâmetro, de titânio recobertos com HA e dopados com diferentes concentrações de nitrato de prata (20 e 100ppm). As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas e após este período, foram registradas imagens fotográficas dos halos de inibição. Os resultados foram feitos em triplicata e os halos de inibição foram comparados entre si. Foi realizado o registro fotográfico dos mesmos.

Os ensaios foram realizados na Faculdade de Ciências farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, campus Araraquara, laboratório de Microbiologia e também na Universidade de São Paulo, campus Pirassununga no laboratório de microbiologia.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Recobrimento biomimético sobre Ticp

Nas Figuras 5, 6 e 7 são apresentadas as micrografias obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, MEV, das superfícies dos Ticp após realização dos recobrimentos, T1(Fig.5) , T2 (Fig. 6) e T3 (Fig. 7).

Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.

Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.

Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.

Pode-se observar que para todos os tratamentos adotados após a imersão em fluido corpóreo simulado modificado, por sete dias para a finalização do recobrimento, as superfícies apresentaram a formação de HA com uma camada primária e com formações globulares de diversos tamanhos (Figuras 5,6 e 7).

Peng et al, verificaram por meio do MEV e difração de raios X a deposição de uma fina camada de fosfato de cálcio(camada primária), sobre substrato de titânio utilizando uma reação eletroquímica em um fluido corpóreo simulado à 37°C.

As superfícies dos substratos se encontram recobertas com aglomerados esféricos de fosfato de cálcio. Porém a morfologia do recobrimento pertinente ao T3 mostra a presença de

algumas trincas (Figura 7) que é similar aos trabalhos encontrados na literatura que utilizam o método biomimético associado com o tratamento da superfície em meio alcalino (BARRERE et al., 2002; UCHIDA et al., 2002). Segundo Liu et al ((LIU *et al.*, 2007). à medida que a camada cresce, aumenta a tendência à trinca durante o resfriamento, isso pode estar relacionado com a morfologia do recobrimento, que, por ser mais densa, pode favorecer o surgimento das trincas

Muitos trabalhos na literatura indicam que o tempo de 7 dias é determinante para a formação da camada de fosfato de cálcio (BARRERE et al., 2002; UCHIDA et al., 2002) e que a morfologia composta por grãos esféricos é uma das características desse tipo de método de recobrimento (KANAZAWA, 1989).

É visível a modificação na superfície do recobrimento após o tratamento alcalino e térmico, pois o recobrimento tornou-se mais homogêneo, apresentando similaridade às obtidas nos trabalhos de outros autores (FENG et al., 1999; JONASOVA et al., 2004).

Kim et al.(1996) e Kokubo et al.(1999), promoveram a nucleação da HA através do tratamento do Ti com NaOH. Mostraram que o tratamento promove o aumento da atividade da superfície para nucleação da HA.

O tratamento alcalino em conjunto com o tratamento térmico leva a pré-calcificação de Ca(OH)_2 e ,consequentemente, aumenta a deposição uniforme de precursores de cálcio sobre a superfície do material e ajuda a acelerar o crescimento de apatita carbonatada (ADAWY et al., 2009).

Os recobrimentos obtidos com seus respectivos tratamentos de superfície foram analisados por DRX, e os resultados estão apresentados nas Figuras 8,9 e 10.

Figura 8- DRX do Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.

A Figura 8 apresenta os difratogramas de raios X do titânio recoberto utilizando o tratamento T1, onde o substrato foi imerso em solução de silicato de sódio. Os resultados indicam a formação da fase hidroxiapatita (ficha JCPDS09-0432), com picos em 32° , 29° e 26° e os picos referentes ao titânio em 38° , 40° e 53° (ficha JCPDS 21-1276).

Figura 9- DRX Tícp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a $60^\circ\text{C}/24\text{h}$; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C .

O ensaio de difração de raios X (DRX), Figura 9, mostrou que o recobrimento obtido mediante o tratamento T2 é composto HA e Tícp.

Figura 10 - DRX Tícp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a $60^\circ\text{C}/24\text{h}$ com posterior tratamento térmico a $600^\circ\text{C}/1\text{h}$; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C .

O resultado para o substrato de Ticp com tratamento T3 (Figura 10) também apresenta a fase HA e Ticp.

Os resultados apresentados por DRX indicam a formação de uma camada de HA, porém, os espectros são sutilmente diferentes em se tratando de intensidade e ruído, como utilizou-se a técnica de incidência rasante e segundo Abe et al. (1990), a camada obtida por esse método de recobrimento é relativamente fina, pode-se inferir de que os tratamentos podem diferir em espessura.

Os resultados obtidos por espectroscopia no infravermelho (FTIR) para Ticp submetido aos tratamentos T1, T2 e T3 são apresentados na Figura 11.

Figura 11- FTIR de Ticp recoberto com os tratamentos T1, T2 e T3.

Para todos os substratos recobertos se observa que os espectros são similares evidenciando a formação de uma camada de apatita, característica dessa técnica de recobrimento, as bandas são largas caracterizando a fase amorfa (KIM, 2005; ABBONA, 1996).

Os espectros de FTIR (Figura 11) indicam a presença de bandas características dos grupos P-OH entre 1000-1100 cm^{-1} , PO_4 entre 500-600 cm^{-1} , que pode ser atribuída também à fase amorfa de fosfato de cálcio, e apatita carbonatada do tipo A em 1595 cm^{-1} . A banda em 1620 cm^{-1} é devido à incorporação de moléculas de água o que é explicado pelo fato do

recobrimento ter sido obtido em meio aquoso e uma banda bem larga na região de 3500 cm^{-1} caracterizando o modo de vibração de OH^- (PASTERIS et al., 2004).

Quando os substratos foram tratados em T2 e T3 o comportamento foi similar. Com os resultados apresentados na Figura 11, conclui-se que os três tratamentos foram efetivos para que ocorresse a nucleação e posterior crescimento da camada de hidroxiapatita sobre a superfície de Ticp.

Da Figura 12 até a Figura 20, são apresentados as micrografias dos recobrimentos com dopagem em solução de nitrato de Ag de 20 e 100 ppm para o tratamentos T1, T2 e T3.

Figura 12. MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C .

Figura 13. MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 20ppm de Ag.

Figura 14. MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 100ppm de Ag.

As micrografias referentes ao tratamento T1 apresentam uma morfologia diferente após a imersão na solução de Ag, com o aumento da concentração da Ag, de 20 para 100ppm, os glóbulos esféricos, característicos do recobrimento, aumentaram em quantidade e a camada ficou mais homogênea sobre o substrato, isso pode estar relacionado à formação de uma nova fase em decorrência da possível substituição de íons Ag na rede da HA. Mais adiante mediante a análise por DRX será possível analisar o que aconteceu durante o processo de dopagem com a Ag.

A estrutura da hidroxiapatita permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com facilidade. O Ca^{2+} pode ser substituído por cátions metálicos tais como o Pb^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , etc.; os grupos fosfatos por carbonatos e vanadatos e as hidroxilas por carbonatos, fluoretos e cloretos. Essas substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da estrutura da hidroxiapatita (MAVROPOULUS., et al, 2002)

Figura 15. MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.

Figura 16. MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 20ppm de Ag.

Figura 17. MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 100ppm de Ag.

Figura 18. MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.

Figura 19. MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 20ppm de Ag.

Figura 20. MEV da superfície de Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 100ppm de Ag.

A partir das análises microestruturais obtidas pelo MEV, constatou-se que as amostras tratadas com NaOH tiveram como característica o crescimento de filme de Ca/P em camadas, bem como estágios iniciais de nucleação heterogênea representados por núcleos sobre a superfície que quando aglomerados deram origem ao recobrimento. Esse tipo de microestrutura foi também observado por Resende (2007).

Mediante os resultados das micrografias referentes aos tratamentos T2 e T3, após imersão em solução contendo Ag, observa-se o mesmo comportamento anteriormente descrito para o tratamento T1 com Ag, ou seja, ocorre um aumento na quantidade de glóbulos e com isso toda a superfície fica preenchida com esses glóbulos.

O crescimento da HA e de outras apatitas, tanto no meio biológico quanto em SBF, ocorre em meio contendo, além de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , íons-traços essenciais tais como: Mg^{2+} , HCO_3^- , K^+ e Na^+ (APARECIDA et al., 2007).

Figura 21- DRX de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.

Figura 22- DRX de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 20ppm de Ag.

Figura 23- DRX de Ticp recoberto com o tratamento T1 – imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 100ppm de Ag.

A caracterização por DRX das amostras recobertas utilizando-se o tratamento T1, T1 com posterior imersão em solução contendo Ag com 20 e 100ppm, apresentada nas Figuras 21, 22 e 23 pode-se observar os picos em 26°, 29°, 32° referentes à HA; em 26°, 33° e 34° referentes ao beta fosfato tricálcico β -TCP (ficha JCPDS 09-0169); em 46° e 48° referentes ao fosfato de prata, ($\text{Ag}_4\text{P}_2\text{O}_7$) (ficha JCPDS 37-0187), além dos picos referentes a fase do Ti.

As amostras submetidas ao T1 mostraram-se diferentes em relação a intensidade dos picos que apontam a presença de HA e também a presença do β -TCP a partir do momento que a Ag foi incorporada ao recobrimento. Outra mudança notada é que após a inserção da Ag na estrutura do recobrimento houve a formação do fosfato de prata, apontado na Figura 24 como HA-Ag, possivelmente, através da troca dos íons Ca^{2+} por íons Ag^+ , assim como foi reportado no trabalho de Rameshabu (2006), que afirma através da análise feita por DRX que houve claramente a substituição dos íons Ca^{2+} pelos íons Ag^+ . Outra mudança notada nos difratogramas foi a presença dos picos de β -TCP que é ocasionado a partir da transformação de HA deficiente em cálcio (KANAZAWA, 1989). Assim, a distribuição mais homogênea observada nas micrografias das amostras dopadas com Ag pode estar relacionada à ao surgimento da fase β -TCP e do fosfato de Ag.

A intensidade dos picos referentes ao recobrimento e à dopagem com Ag da amostra dopada com 100ppm é muito superior comparada a amostra dopada com 20ppm, nota-se que o pico correspondente ao β -TCP da amostra dopada com 100ppm (Figura 24) tornou-se mais

intenso que o pico referente ao Ticp, podendo estar relacionado ao aumento de espessura do recobrimento.

Figura 24- DRX de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.

Figura 25- DRX de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 20ppm de Ag.

Figura 26- DRX de Ticp recoberto com o tratamento T2 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 100ppm de Ag.

As amostras submetidas ao tratamento T2 quando são imersas em solução de Ag comportam-se de forma semelhante com as amostras recobertas utilizando-se o tratamento T1 onde é possível observar além da fase HA, do Ti e do fosfato de Ag também a presença da fase β -TCP, evidenciando possivelmente que a presença da Ag provoca uma transformação de fase de HA para β -TCP por causa da substituição dos íons Ag^+ por íons Ca^{2+} . Porém, nota-se que o T2 mostrou picos mais intensos do β -TCP e do fosfato de Ag nas amostras de 20ppm de Ag, ao contrário das amostras submetidas ao T1, que mostrou picos mais intensos nas amostras a partir de 100ppm de Ag.

Figura 27- DRX de Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C.

Figura 28- DRX de Ticp recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 20ppm de Ag.

Figura 29 - DRX de T3 recoberto com o tratamento T3 – tratamento prévio da superfície com NaOH 5,0M a 60°C/24h com posterior tratamento térmico a 600°C/1h; imersão em SS por 7 dias a 37°C e reimersão em 1,5SBF por 7 dias a 37°C com 100ppm de Ag.

As Figuras 27, 28 e 29 apresentam os espectros de DRX das amostras submetidas ao tratamento T3 com a dopagem de Ag de 20 e 100 ppm respectivamente.

Assim como foi observado no T2 (Figuras 24 a 26), quando as amostras submetidas ao T3 passam a ser dopadas com Ag há uma alteração na intensidade dos picos referentes a HA, além de detectar picos intensos referentes ao β -TCP na amostra dopada com 20ppm. Outra mudança que ocorre após a inserção da Ag no recobrimento, observado já nas amostras T1 e T2, é a formação de fosfato de Ag com intensidades muito parecidas entre as amostras de 20 e 100ppm. A intenção de aumentar a concentração de Ag é conferir ao material maior atividade bacteriana, porém foi observado que a intensidade da Ag no recobrimento se estabilizou em todos os tratamentos, o que pode estar relacionado a um limite de incorporação da Ag na estrutura da HA.

Em todos os difratogramas para as amostras referentes aos tratamentos T1, T2 e T3 observou-se o aparecimento da fase β -TCP após a dopagem com Ag, isso pode estar relacionado à substituições de íons na estrutura da HA, de íons Ca^{2+} por íons Ag^+ favorecendo a transformação da HA por β -TCP que por sua vez é deficiente em Ca^{2+} , podendo ocasionar uma desorganização estrutural da HA, gerando mudança nas suas propriedades físico-químicas. Essas variações podem ser os parâmetros de rede, solubilidade, textura superficial, cristalinidade, solubilidade, dimensões do cristal, e a estabilidade no material (KIM et al., 1998).

Os espectros de infravermelho referentes as amostras de Ticp recobertas e imersas em solução de Ag são apresentados nas Figuras 30,31 e 32.

Figura 30- FTIR de Ticp recoberto com o tratamento T1; T1 com 20ppm e 100ppm de Ag.

Figura 31 - FTIR de Ticp recoberto com o tratamento T2; T2 com 20ppm e 100ppm de Ag.

Figura 32- FTIR de Ticp recoberto com o tratamento T3; T3 com 20ppm e 100ppm de Ag.

De acordo com as Figuras 30, 31 e 32, pode-se observar que os espectros de IV dos tratamentos T1, T2 e T3, são similares, com presença de bandas características de grupos PO_4 em $570\text{-}580$, $1000\text{-}1080\text{cm}^{-1}$. Além destas bandas, bandas características de apatita carbonatada do tipo B apareceram em $860\text{-}880$, $1417\text{-}1460\text{cm}^{-1}$. A banda em $1595\text{-}1600\text{cm}^{-1}$ é devido à incorporação de moléculas de água. A existência de bandas na região $3300\text{-}3340\text{cm}^{-1}$ é característica do grupo OH^- presente na HA ou OCP (PASTERIS *et al.*, 2004).

Há relatos de que a presença de íons carbonato nas apatitas sintéticas influencia o comportamento de decomposição, solubilidade, sinterabilidade e na reatividade biológica. Eles provocam uma diminuição na cristalinidade e um aumento na solubilidade, tanto nos testes *in vitro* quanto nos testes *in vivo* (SLOSARCZYK *et al.*, 2005; LANDI *et al.*, 2004).

Os resultados de IV confirmam os resultados de DRX, pois após a inserção da Ag no recobrimento observa-se a definição das bandas de PO_4 com o surgimento de dupletos em 557 , 604 cm^{-1} , como também dupletos característicos de CO_3^{2-} em 1414 , 1466 e definição de bandas em $860\text{-}880\text{ cm}^{-1}$ que correspondem também a CO_3^{2-} .

5.2 Ensaio de cultura de bactérias – Teste de halo de inibição

As imagens referentes ao ensaio de cultura de bactérias das amostras recobertas e imersas em solução de Ag são apresentadas nas Figuras 33,34 e 35.

Figura 33- Resultado do teste de halo de inibição para Ticp recoberto utilizando o T1 e dopado com 20 e 100 ppm de Ag para cultura utilizando cepas diferentes, a) *Escherichia coli*, b) *Staphylococcus Aureus*.

Figura 34 – Resultado do teste de halo de inibição para Ticp recoberto utilizando o T2 e dopado com 20 e 100 ppm de Ag para cultura utilizando cepas diferentes, a) *Escherichia coli*, b) *Staphylococcus Aureus*.

Figura 35– Resultado do teste de halo de inibição para Ticp recoberto utilizando o T3 e dopado com 20 e 100 ppm de Ag para cultura utilizando cepas diferentes, a) *Escherichia coli*, b) *Staphylococcus Aureus*.

As amostras referentes ao tratamento T1 (Figura 33) apresentaram menor capacidade de ação antimicrobiana para a menor concentração de Ag, ou seja, 20ppm. Ainda assim, observa-se halo de difusão na amostra para *E. coli* da Figura 33a, quando comparada para a *S. aureus* Figura 33b que se mostra totalmente sem halo. Apenas com o aumento da concentração de Ag, de 20 para 100ppm, pode-se observar um aumento no halo de difusão tanto para a *E. coli* quanto para a *S. aureus* (a e b respectivamente).

A avaliação dos efeitos antimicrobianos das amostras recobertas para o método de disco-difusão com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* evidenciou halos de inibição circulares e crescentes ao redor dos discos, após 24 horas de incubação com as cepas bacterianas. No restante da placa de Petri que não teve contato com as amostras cresceu colônias de forma confluyente, sem qualquer outra contaminação.

Observa-se que a amostra submetida ao tratamento T1 obteve halo de inibição nas concentrações de 20 e 100ppm contra a *Escherichia coli*, porém o maior halo de inibição foi com a amostra dopada com 100ppm de Ag. Já em contato com a *Staphylococcus aureus*, as amostras submetidas ao T1 obtiveram halo de inibição apenas com as amostras dopadas com 100ppm de Ag, as amostras dopadas com 20ppm de Ag não obtiveram nenhum halo de inibição. Ou seja, a *Staphylococcus aureus* por ser gram-positiva mostrou resistência à ação bacteriana dos íons Ag até certa concentração. Outro fator que pode ser determinante para se ter ou não a inibição bacteriana, além do tipo da bactéria, é a morfologia da camada do

recobrimento, ou seja, vimos através dos resultados do MEV, DRX e FTIR que é possível os íons Ca^{2+} serem substituídos por íons Ag^+ na estrutura do recobrimento, formando uma nova fase de fosfato, e que a partir da dopagem há uma mudança morfológica e estrutural que são decorrentes das definições de bandas de CO_3^{2-} e PO_4^{3-} e do surgimento dos picos referentes a elementos do recobrimento observados no DRX que gera um recobrimento mais homogêneo e intenso, e no caso do T1 apenas as amostras com 100ppm de Ag obtiveram picos intensos desses elementos que constituem o recobrimento. Então, pode-se dizer que os íons Ag são dependentes da qualidade do recobrimento no que se refere à homogeneidade e intensidade, ou seja, quanto maior for a abrangência do recobrimento maior será a incorporação dos íons Ag na estrutura do recobrimento e assim maior ação bacteriana do material dopado.

Por outro lado, nas Figuras 34 e 35 observam-se halos de inibição similares em todas as concentrações de Ag^+ e nos dois tipos de micro-organismos testados *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Ou seja, a mesma bactéria, (*Staphylococcus aureus*), que mostrou ser resistente às amostras do tratamento T1 com 20ppm de Ag não mostrou resistência às amostras submetidas aos tratamentos T2 e T3 com 20ppm de Ag, confirmando os resultados das análises, que apontaram mudanças morfológicas e estruturais das amostras submetidas aos tratamentos de superfície com NaOH e também a partir da dopagem com 20ppm de Ag que a amostra T1 dopada com 20ppm não apontou. Dessa forma, pode-se inferir de que não é necessária uma dopagem maior com a Ag para os tratamentos T2 e T3. Outro fator que pode ser determinante para o efeito bacteriano das amostras submetidas aos tratamentos T2 e T3 é o aumento do contato superficial da Ag, ou seja, quanto melhor estiverem distribuídos os íons de Ag na superfície do material maior será o efeito bacteriano, entretanto, o contato superficial está ligado diretamente com a homogeneidade do recobrimento, pois como vimos, os íons Ag são incorporados na estrutura do recobrimento e, portanto quanto maior a área de superfície do recobrimento maior será a área superficial da Ag e o efeito bacteriano. Os resultados das análises confirmam que a partir de 20ppm de Ag a estrutura do recobrimento aumenta de intensidade, há a possibilidade de que esse aumento de intensidade dos picos de DRX e às definições de elementos como CO_3^{2-} e PO_4^{3-} e as mudanças morfológicas estejam apontando o aumento do recobrimento e a partir daí a concentração de 20ppm passa a ser melhor distribuída. Por outro lado, nota-se que as amostras de 100ppm não obtiveram maior halo de inibição, como esperado.

Han et al. (2007) avaliou o efeito bacteriano do recobrimento de fosfato de cálcio sobre Ti através da deposição de HA por feixe de elétrons contra as bactérias *Treptococcus mutans* e *Escherichia coli* com concentrações de 0.1, 0.05, 0.4 e 0.5M de AgNO_3 em solução

aquosa. Os autores relataram que os íons de prata foram facilmente introduzidos na estrutura do fosfato de cálcio através da imersão dos substratos em uma solução aquosa de AgNO_3 pois a Ag é conhecida por substituir o Ca^{2+} dentro da estrutura. Um efeito antimicrobiano maior é esperado a partir do momento que se aumenta a quantidade de prata. No entanto, a capacidade osteocondutora do filme de fosfato de cálcio poderia ser reduzida devido ao esgotamento de íons de cálcio em decorrência da troca entre Ca e Ag. Assim, controlar as quantidades de íons de prata e determinação da razão Ag / Ca são muito importantes para o efeito desejado, pois os autores constataram que as amostras que continham menor concentração de prata tiveram, praticamente, o mesmo efeito antimicrobiano comparadas às com maior concentração de prata.

Então, dessa forma é possível que tratamentos superficiais que geram um recobrimento com densidade e homogeneidade maior possam ter um melhor efeito bacteriano quando capacitados para isso.

5.3 Considerações Finais

Vários trabalhos estão sendo feitos em torno do objetivo de obter um biomaterial que reúna em si propriedades que o tornam semelhante ao órgão que está sendo substituído. Existem muitos métodos que auxiliam o recobrimento de tais materiais, porém, este trabalho tentou oferecer algumas sugestões ou direções para pesquisas que possibilitariam um melhor direcionamento para o uso do recobrimento de hidroxiapatita dopada com prata sobre a superfície do titânio.

No entanto, ainda são necessários estudos aprofundados acerca da inserção da prata na hidroxiapatita, as possíveis aplicações e seus métodos, assegurando que o mesmo satisfaça as demandas listadas como essenciais para sua aplicação.

Devido à baixa atividade da superfície do titânio, é interessante propiciar uma camada intermediária na sua superfície, por meio do tratamento com solução alcalina, que favorece a nucleação dos fosfatos de cálcio e apresenta excelente aderência com o substrato e a apatita precipitada.

A identificação dos recobrimentos obtidos por meio biomimético é uma etapa criteriosa, uma vez que os fosfatos de cálcio apresentam propriedades semelhantes, o que dificulta a sua caracterização. Como exemplo, foi citado a similaridade na localização dos planos cristalinos da HA e OCP identificados por meio da técnica de DRX.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos durante a realização deste trabalho pode-se concluir que:

Houve formação de uma camada de apatita, com aspectos de glóbulos, sobre a superfície do Ticp.

O método de recobrimento biomimético se mostrou efetivo para a obtenção da camada de hidroxiapatita.

Os tratamentos de superfície com NaOH favoreceram a obtenção da camada de apatita sobre a superfície.

A superfície tratada com NaOH e posterior tratamento térmico a 600°C (tratamento T3) possibilita a formação de uma camada de hidroxiapatita mais homogênea.

Foi possível dopar a camada de hidroxiapatita utilizando a solução de AgNO_3 para os diferentes tratamentos superficiais utilizados, confirmado pelas técnicas de DRX, FTIR e MEV.

Após a dopagem com a Ag foi possível observar que além de se observar a formação de uma fase de $\text{Ag}_4\text{P}_2\text{O}_7$ também a presença da fase β – TCP, em decorrência da substituição de íons Ag por íons Ca^{2+} .

As amostras submetidas aos tratamentos T2 e T3 com imersão em solução de Ag com 20ppm apresentaram, praticamente, o mesmo efeito antimicrobiano comparadas às com 100ppm de Ag.

A partir da concentração de 20ppm de Ag as amostras recobertas apresentam características antibacterianas e as amostras referentes aos tratamentos superficiais T2 e T3 nessa concentração são efetivas contra os dois tipos de bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*). Para a amostra referente ao tratamento T1 só foi possível observar esse comportamento quando a concentração passou de 20ppm para 100ppm.

REFERÊNCIAS¹

- ABBONA, F.; BARONNET, A. A XRD and TEM study on the transformation of amorphous calcium phosphate in the presence of magnesium. **Journal of Crystal Growth**, v.165, n.1/2, p.98-105, July 1996.
- ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coatings on ceramics, metals and polymers utilising a biological process. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, v.1, p. 536-540, 1990.
- ADAWY, A. et al. Biomimetic coating of precalcified Ti-6Al-4V alloy. **The Open Medical Devices Journal**, v.1, n.1, p.19-28, 2009.
- AKAO, M.; AOKI, H.; KATO, K. Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic application. **Journal of Materials Science**, v.16, n.3, p. 809-812, 1981.
- ALMQVIST, N.; THOMSON, N. H.; SMITH, B. L. Methods for fabricating and characterizing a new generation of biomimetic materials. **Materials Science & Engineering**, v.7, n.1, p.34-43, 1999.
- ALT, V. et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. **Biomaterials**, v.25, n.18, pp.4383–4391, Aug. 2004.
- AMARANTE, E. S.; LIMA, L. A.. Otimização das superfícies dos implantes: plasma de titânio e jateamento com areia condicionado por ácido – estado atual. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.15, n.2, p.166-173, 2001.
- AMATO, D. et al.. Staphylococcal peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis: colonization with identical strains at exit site, nose and hands. **American Journal Kidney Disease**, v.37, n.1, p.43-48, 2001.
- ANDO, Y. et al. Calcium phosphate coating containing silver shows high antibacterial activity and low cytotoxicity and inhibits bacterial adhesion. **Materials Science and Engineering C**, v.30, n.1, p.175–180, Jan. 2009.
- ANDRADE, M.C. **Nucleação e crescimento de hidroxiapatita em titânio**. 1999. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.
- AOKI, H. **Medical Applications of Hydroxyapatite**: bone mineral, drug delivery system, cancer & HIV, IVH & CAPD, dental implant. Tokyo; St. Louis: Ishiyaku Euro America, 1994.
- APARECIDA, A.H. **Recobrimento de apatitas empregando-se o método biomimético**: estudo da influência dos íons K⁺, Mg²⁺, SO₄²⁻ e HCO₃⁻ na formação de hidroxiapatita. 2006. 115p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6063.

BARRERE, F. et al. Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: a crystal growth study of octacalcium phosphate and inhibition by Mg^{2+} and HCO_3^- . **Bone**, v.25, n.2, p. 107S-111S, 1999.

_____. Biomimetic coatings on titanium: a crystal growth study of octacalcium phosphate. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, v.12, n.6, p.529-534, 2001.

BASTOS, I. N.; PLATT, G. M.; SOARES, G. A. Thermodynamics study of simplified SBF solutions. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MECHANICAL ENGINEERING, 18., Ouro preto, 2005. **Proceedings...** [S.l.:s.n.], 2005.

BORETOS, J. W.; EDEN, M. **Contemporary biomaterials**: material and host response, clinical applications, new technology and legal aspects. Park Ridge: Noyes, 1984. p.232-233.

BRETT D. W. A Discussion of silver as an antimicrobial agent: alleviating the confusion. **Ostomy Wound Manage**, v.52, n.1, p.34-41, Jan. 2006.

BROOKS, C. R. Heat treatment, structure and properties of nonferrous Alloys. [S.l.]: ASM International, 1982.

BROWN, P. W. Hydration behavior of calcium phosphates is analogous to hydration behavior of calcium silicates. **Cement and Concrete Research**, v.29, n.8, p. 1167-1171, Aug. 1999.

BURNETT, G.W.; SCHUSTER, G.S. **Microbiologia oral e enfermidade infecciosas**. Buenos Aires: Panamericana, 1982.

CAO, W.; HENCH, L. L. Bioactive materials. **Ceramics International**, v.22, n.6, p.493-507, 1996.

CASTNER, D.G.; RATNER, B.D. Biomedical surface science: foundations to frontiers. **Surface Science**, v.500, n.1/3, p.28-60, Mar. 2002.

CHEN, Y. et al. Anti-bacterial and cytotoxic properties of plasma sprayed silver-containing HA coatings. **Journal of Materials Science: materials medicine**, v.19, n.12, p. 3603-3609, Dec. 2008.

_____. In Vitro cytocompatibility of silver-containing hydroxiapatite coatings. **Materials Science Forum**, v.620/622, p.567-570, Apr. 2009.

CULLITY, B. D. Elements of X-ray diffraction. 2nded. Reading: Addison- Wesley, 1979.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6thed. Wayne, 2003. (NCCLS document M7-A6).

DE GROOT, K. et al. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx5 solution. **Biomaterials**, v.23, n.9, p.1921-1930, 2002.

DHERT, W.J.A., Plasma-sprayed coatings and hard-tissue compatibility: a comparative study. In: FLUORAPATITE, magnesiumwhitlockite and hydroxyapatite. Ablasserdam: Offsetdrukkerij Haveka B.U., 1992.

DOROZHUKIN, S. V.; EPPLE, M. Biological and medical significance of calcium phosphates. **Angewandte chemie-international edition**, v.41, n.17, p. 3130-3146, Sept. 2002.

EVANS, E.D. Crystall growth of mineral phases in skeletal tissues. **Progress in Crystal Growth Characterization**, v.3, n.1, p.3-15, 1980.

ELLIOTT, J.C. Carbonate apatites from aqueous systems. In: _____. **Structure and chemistry of the apatites and other calcium phosphates**. Amsterdam: Elsevier Science, 1994.

EISENBARTH, E. et al. Biocompatibility of beta-stabilizing elements of titanium alloys. **Biomaterials**, v.25, n.26, p.5705-5713, Nov. 2004.

FENG, Q.L. et al. Ag-HAp thin film on alumina substrate. **Thin solid film**. v.335, n.1-2, p.214-219, Nov. 1998.

_____. Controlled crystal growth of calcium phosphate on titanium surface by NaOH-treatment. **Journal of Crystal Growth**, v.200, n. 3-4, p.550-557, Apr. 1999.

_____. A Mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, n.4, p.662-668, Dec. 2000a.

_____. Influence of solution conditions on deposition of calcium phosphate on titanium by NaOH-treatment. **Journal of Crystal Growth**, v.210, n.4, p.735-740, Mar. 2000b.

FISHER G. Ceramic coating enhance performance engineering. **Ceramic Bulletin**, v.65, n. 2, p.283-287, 1986.

GERHART, T.N. et al. Antibiotic-loaded biodegradable bone cement for prophylaxis and treatment of experimental osteomyelitis in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v.11, n.2, p.250-255, Mar. 1993.

HENCH, L. L. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.41, n.4, p.511-518, Dec. 1998.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **An Introduction to bioceramics**. Singapore: World Scientific, 1993.

HURTADO, M.P.; BRITO, M.A. Staphylococcus aureus: revision de los mecanismos de patogenecidad y la fisiopatologia de la infeccion estafilocócica. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia, v.22, n.2, p.112-118, 2002.

ITO, A. et al. Formation of an ascorbate–apatite composite layer on titanium. **Biomedical Materials**, v.2, n.3, p.181-5, Sept. 2007.

JACHINOSKI, A.C.; SILVA, J.C. **Formação de ligas de titânio**. Curitiba: UFPR, 2005. Seminário da Disciplina de Formação de Ligas.

JARCHO, M. Retrospective analysis of hydroxyapatite development for oral implant applications. **Dental Clinic of North America**, v.36, n.1, p.19-26, Jan. 1992.

JONASOVA, L. et al. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. **Biomaterials**, v.25, n.7-8, p.1187- 1194, Mar./Apr. 2004.

JUN, Y. et al. The Fabrication and biochemical evaluation of alumina reinforced calcium phosphate porous implants. **Biomaterials**, v.24, n.21, p.3731-3739, Sept. 2003.

KANAZAWA, T. **Inorganic phosphate materials**. Tokio: Elsevier, 1989.

KASEMO, B. Biological surface science. **Surface Science**, v.500, p.656–677, 2002.

KASUGA, T.; KONDO, H.; NOGAMI, M. Apatite formation on TiO₂ in simulated body fluid. **Journal of Crystal Growth**, v.235, n.1-4, p.235-240, Feb. 2002.

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

KAWANABE, M. et al. **Robust common spatial filters with a maxmin approach**. In: ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY SOCIETY, 2009. Proceedings... New York: IEEE, 2009. p. 2470-2473.

KIM, T.N. et al. Antimicrobial effects of metal ions (Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, v.9, n.3, p. 129-134, Mar. 1998.

KIZUKI, T. et al. Effect of bone-like layer growth from culture medium on adherence of osteoblast-like cells. **Biomaterials**, v.24, n.6, p.941-947, Mar. 2003.

KOKUBO, T. Bioactive glass-ceramics. In: KOKUBO, T. (Ed.). **Bioceramics and their clinical applications**. Cambridge: Woodhead, 2008. p.284-301.

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

KOKUBO, T.; KIM, H.M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v.24, n.13, p.2161-2175, June 2003.

_____. Bioactive metals: preparation and properties. **Journal of Materials Science -Materials in Medicine**, v.15, n.2, p.99-107, Feb. 2004.

KOKUBO, T.; MATSUSHITA, T.; TAKADAMA, H., Titania-based bioactive materials. **Journal of the European Ceramic Society**, v.27, n.2-3, p.1553-1558, 2007.

KOKUBO T. et al. Ceramic-metal and ceramic-polymer composites prepared by a biomimetic process. **Composite**: part A: applied science and manufacturing, v.30, n.2, p.405-409, Apr. 1999.

KOKUBO, T. et al. What kinds of materials exhibit bone-bonding?. In: DAVIES, J.E. (Ed.). **Bone Engineering**, Toronto: [s.n.], 2000.

LEE, I.S. et al. The Nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature, v.425,n.6956, p.415-419, Sept. 2003.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphates in oral biology an medicine. **Monographs in Oral Science**, v.15, p.1-200, Apr. 1991.

LE GUÉHENNEC, L.; LAYROLLE, P.; DACULSI, G. A Review of bioceramics and fibrin sealant. **European Cells and Materials**, v.8, p.1-10, Sept. 2004. Discussion 10-1.

LEMONS, J.E. Hydroxyapatite coatings. **Clinical Orthopaedics Related Research**, v.235, p. 220-223, Oct.1988.

LENG, Y.; CHEN, J.; QU, S. TEM study of calcium phosphate precipitation on HA/TCP ceramics. **Biomaterials**, v.24, n.13, p.2125-2131, June 2003.

LI, F. et al. A Simple biomimetic method for calcium phosphate coating. **Surface and Coatings Technology**, v.154, n.1, p.88-93, 2002.

LIANG, F.;ZHOU, L.; WANG, K. Apatite formation on porous titanium by alkali and heat-treatment. **Surface and Coatings Technology**, v.165, n.2, p.133-139, Feb. 2003.

LINGZHOU, Z. et al. Review antibacterial coatings on titanium implants. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied biomaterials**, v.91, n.1, jul. 2009.

LIU, C.M. et al. Seed-mediated growth and properties of copper nanoparticles, nanoparticle 1D arrays and nanorods. **Microelectronic Engineering**, v.66, n.1/4, p.107-114, Apr. 2003.

LIU, X. Y.; CHU, P. K.; DING, C. X. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: r: reports**, v.47, n.3-4, p.49-121, Dec. 2004.

LIU, Y. et al. Influence of calcium phosphate crystal assemblies on the proliferation and osteogenic gene expression of rat bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, v.28, n.7, p.1393-1403, Mar. 2007.

LU, X.; LENG, Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. **Biomaterials**, v.26, n.10, p.1097-1108, Apr. 2005.

MARQUES, P.A.D.A.P. **Reacções de superfície de cerâmicos de fosfato de cálcio em plasma simulado**. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2003.

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

MAZZOCCA, A.D. et al. Principles of internal fixation. In: BROWER, B.D. et al. **Skeletal trauma**. 3th ed. Philadelphia: Saunders, 2003. p.145-249.

MELO, C.B.M. **Recobrimento eletroquímico de liga de aço 316L a base de fosfato de cálcio**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale da Paraíba, São José dos Campos, 2011.

MORONES, J.R. et al. The Bactericidal effect of silver nanoparticles, **Nanotechnology**, v.16, n.10, p.2346-2353, Oct. 2005.

MULLER, L.; MULLER, F.A. Preparation of SBF with different HCO₃⁻ content and its influence on the composition of biomimetic apatites. **Acta Biomaterialia**, v.2, n.2, p.181-189, Mar. 2006.

MURRAY, P.R. et al. Agentes antibacterianos. In: MURRAY, P.R. **Microbiologia médica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Oral microbiology and immunology**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994.

NYGREN, H.; TENGVALL, P.; LUNDSTRON, I. The Initial reactions of TiO₂ with blood. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.34, n.4, p.487–492, 1997.

ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. [S.l]: Cultura Médica, 2006.

PASTERIS, J.D. et al. Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. **Biomaterials**, v.25, n.2, p.229-238, jan. 2004.

PATTANAYAK, D.P.; DINDA, S.C. Bilayer tablet formulation of metformin HCl and glimepiride: a novel approach to improve therapeutic efficacy. **International Journal of Drug Discovery and Herbal Research**, v.1, n.1, p.1-4, Jan./Mar. 2011.

PENG, P. et al. Thin calcium phosphate coatings on titanium by electrochemical deposition in modified simulated body fluid. **Journal Biomedical Materials Research Part A**, v.76, n.2, p.347-355, Feb. 2006.

PESSKOVA, V., et al. The influence of implant surface properties on cell adhesion and proliferation. **Journal of Materials Science Materials Medicine**, v.18, n.3, p.465-473, Mar. 2007.

POLMEAR, I.J. **Light alloys**: metallurgy of the light metals. 2nded. London: Edward Arnold, 1989.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v.27, n.1 p.76-83, Jan./Feb. 2009.

RAMESHBABU, N. et al. Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: synthesis and characterization. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.80, n.3, p.581-591, mar. 2007.

RATNER, B. D. A. History of Biomaterials. In: RATNER (Ed.) et al. **Biomaterials Science**: an introduction to materials in medicine. 2 ed. San Diego: Academic Press, 2004.

RESENDE, C.X. et al. Characterization of coating produced on titanium surface by a designed solution containing calcium and phosphate ions. **Materials Chemistry and Physics**, v.109, n.2/3, p.429-435, June 2007.

RIGO, E. C. et al. Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita. **Revista de Engenharia Biomédica**, v.15, n.1-2, p.21-29, jan./ago.1999.

ROHANIZADEH, R.; AL-SADEQ, M.; LEGEROS, R.Z. Preparation of different forms of titanium oxide on titanium surface: effects on apatite deposition. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied biomaterials**, v.71, n.2, p.343–352, Sept. 2004.

SANT, S. B.; GILL, K. S.; BURREL, R. E., Morphology of novel antimicrobial silver films deposited by magnetron sputtering. **Scripta Materialia**, v.41, n.12, p.1333-1339, Nov. 1999.

SENA, L. A. et al. **Deposição por eletroforese de hidroxiapatita sobre chapas de titânio com diferentes acabamentos superficiais**. 2001. Tese (Doutorado) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Rio de Janeiro, 2001.

SHIMAZAKI, T. et al. In Vivo Antibacterial and silver-releasing properties of novel thermal sprayed silver-containing hydroxyapatite coating. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied biomaterials**, v.92, n.2, p. 386-389, 2009.

SHIRTLIFF, V.J., HENCH, L.L. Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair. **Journal of Materials Science**, v.38, n.23, p.4697-4707, 2003.

SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. **Contemporary oral microbiology and immunology**. St. Louis: Mosby-Year Book, 1992.

SONG, H.J. et al. Surface characteristics and bioactivity of oxide films formed by anodic spark oxidation on titanium in different electrolytes. **Journal of Materials Processing Technology**, v.209, n.2, p.864–870, Jan. 2008.

STOBIE, N. et al. Prevention of staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol–gel coating. **Biomaterials**, v.29, n. 8, p.963-969, Mar. 2008.

STOCH, A. et al. FTIR absorption reflection study of biomimetic growth of phosphates on titanium implants. **Journal of Molecular Structure**, v.555, n.1/3, p.375-382, Nov. 2000.

SYKARAS, N. et al. Implants materials, designs and surface topographies: their effect on osseointegration: a literature review. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v.15, n.5, p.675-690, Sept./Oct.

TAS, A.C. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 degrees C in synthetic body fluids. **Biomaterials**, v.21, n.14, p.1429-1438, July 2000.

THOMAS, M.; GHOSH, S.K.; GEORGE, K.C. Characterization of nanostructured silver orthophosphate. **Material Letters**, v.56, n.4, p.386–392, Oct. 2002.

UCHIDA, M. et al. Apatite formation on zirconium metal treated with aqueous NaOH". **Biomaterials**, v.23, n.1, p.313-317, Jan. 2002.

UCHIDA, M. et al. Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.64, n.1 p.164 -170, Jan. 2003.

VALLET-REGÍ, M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. **Comptes Rendus Chimie**, v.13, n.1/2, p.174-185, Jan./Feb. 2010.

WANG, X.X. et al. A Comparative study of in vitro apatite deposition on heat-, H₂O₂-, and NaOH-treated titanium surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.54, n.2, p.172–178, 2001.

WENNERBERG, A. et al. A Histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. **Clinical Oral Implants Research**, v.99, n.1, p.11-19, 1996.

XIN, R. et al. A Comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo". **Biomaterials**, v.26, n.33, p.6477-6486, Nov. 2005.

XUEBIN, Z. et al. Antibacterial property and biocompatibility of plasma sprayed hydroxyapatite/silver composite coatings. **Journal of Thermal Spray Technology**, v.8, n.2, p.463 , Apr. 2009.

YAN, W.Q. et al. Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants. **Biomaterials**, v.18, n.17, p.1185- 1190, Sept. 1997.

YANG, Y., KIM, K.H., ONG, J.L., A review on calcium phosphate coating produced using a sputtering process--an alternative to plasma spraying. **Biomaterials**, v.26, n.3, p.327-337, Jan. 2005.

ZHAO, K.; FENG, Q.; CHEN, G. Antimicrobial effects of silver loaded hydroxyapatite. **Tsinghua Science & Technology**, v.4, p.1570–1573, 1999.

ZHENG,X.; WILKIE, C.A. Flame retardancy of polystyrene nanocomposites based on an oligomeric organically-modified clay containing phosphate. **Polymer Degradation and Stability**, v.81, n.3, p.539-550, 2003.

ZHU, X. et al. Cellular reactions of osteoblasts to micron-and submicron-scale porous structures of titanium surfaces. **Cells Tissues Organs**, v.178, n.1, p.13-22, 2004.