FLÁVIO AUGUSTO CAVADAS ANDRADE

Desenvolvimento de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata com propriedades antibacterianas.

Dissertação de mestrado 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 como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Cristina da Silva Rigo

São Carlos
2013

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.

A554d Andrade, Flávio Augusto Cavadas
Desenvolvimento de hidroxiapatita contendo
nanopartículas de prata com propriedades
antibacterianas / Flávio Augusto Cavadas Andrade;
orientadora 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. Biomaterial. 2. Quitosana. 3. Adsorção. 4.
Efeito bactericida. 5. Cultura de células. 6. Adesão
celular. 7. Resazurina. 8. Método de imersão. I.
Título.

À minha mãe, Rosalia Cavadas

Que me deu a vida e me ensinou a vivê-la com dignidade. A você que se doou por inteiro para que eu pudesse realizar os meus sonhos, a minha eterna gratidão. Obrigado pela educação valiosa, presença constante, apoio, compreensão e amor concedido. Você é a maior responsável das minhas realizações. Exemplo de caráter, honestidade e amor incondicional! O amor infinito que sinto por você jamais será traduzido por palavras.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação representa todo um conjunto de resultados conquistados que não seria possível obter sem a contribuição de diversas pessoas. Desde já, quero demonstrar o meu mais sincero reconhecimento a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para finalizar esta etapa.

Aos meus pais, Rosalia Cavadas e Luiz Alpoim, por todo o amor, apoio, carinho e sacrifícios incondicionais, para que eu pudesse atingir mais esta etapa na minha vida. Um profundo e sincero obrigado, por me instruírem na pessoa que sou hoje. Esta conquista também é de vocês;

À minha irmã, Talita Alpoim, e a todos os meus familiares e amigos separados por quilômetros de distância que mesmo assim souberam por todo esse tempo demonstrar amizade, companheirismo e carinho;

Um agradecimento especial a minha amiga e namorada, Aline Galindo Nunes, por todo o apoio, carinho, amor, incentivo, companheirismo e paciência infindáveis, mesmo nas horas mais desesperadas e que é responsável pela motivação do meu saber científico;

Meu agradecimento também especial aos amigos de infância e da minha terra natal - Daniel Santana Cruz, Pablo Miranda, e aos amigos conquistados ao longo desses anos em São Paulo - Caio Pontes, Renato Paciência e todos os moradores da República 071. Obrigado por companheirismo e verdadeira amizade prestados.

À minha orientadora, Professora Doutora Eliana Cristina da Silva Rigo, por ter acreditado no projeto desenhado, por acreditar no meu potencial e por todo o apoio e estímulo prestado durante esses dois anos. Minha admiração pela sua integridade, generosidade e sinceridade me faz sentir orgulho de ser seu orientado. Espero ter correspondido à sua confiança;

Ao Professor Doutor Fernando Jorge Monteiro da Universidade do Porto, Portugal por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e proporcionado os meios para a complementação desta dissertação. Obrigado também por toda experiência, competência e amizade transmitidas e por oferecer a oportunidade de alcançar objetivos pessoais. Foram os primeiros três meses mais incríveis fora do meu país. Em particular, gostaria de agradecer à Liliana Grenho do Biocomposites Group por toda a ajuda, acolhimento e amizade fornecidos durante minha estadia na cidade do Porto, Portugal. Agradeço, ainda, a técnica Mónica Garcia da

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, e a Pós-Doutoranda Christiane Salgado pelo suporte com ensaios envolvendo as culturas de células;

À Faculdade de Engenharia do Porto (FEUP) e à Universidade do Porto pela excelente organização e apoio prestados durante estágio e aos funcionários do Instituto de Engenharia Biomédica (INEB) que de forma direta e indireta auxiliaram na realização deste trabalho;

Aos amigos do curso de Ciências Físicas e Biomoleculares e aos também companheiros de casa, Ricardo Boffa, Heloísa Muniz e Caliane Almeida por todas as discussões e apoio nos momentos mais difíceis. Em especial ao amigo Wagner Rafael Correr, ao grande auxílio na realização e interpretação de experimentos finais;

Aos técnicos de laboratório Maria Inês Basso do Instituto de Física de São Carlos, Elaine Toscano Miranda e a Professora Dra. Carla Raquel Fontana da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, além da Pós Doutoranda Luciane Tavares e professora Marisa do laboratório de Química Biológica da USP de Pirassununga, por toda a ajuda e assistência durante parte dos experimentos realizados. Muito obrigado também ao Prof. Cauê Ribeiro e Profa. Elaine Paris da EMPAPA Instrumentação; ao Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan e ao técnico Luiz Penazzi pela assistência prestada na etapa da prensagem das amostras. Agradeço ainda aos serviços e apoio oferecidos pela biblioteca da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), em especial a Elena Gonçalves, e à amiga Lúcia Gonçalves pela gentileza envolvida na revisão e correção de texto;

Como não poderia faltar, quero agradecer profundamente a todos os meus colegas e amigos da USP de Pirassununga, Jonas Vieira, Andrés Vercik, Luci de Oliveira Vercik, Germán Ayala, Letticia Gavião, Suzanni, Thiago e Pedro Guarnieri que ao longo deste período me proporcionaram momentos de alegria, descontração e reflexão. Muito obrigado a todos vocês pela forma como me receberam, gentileza, carinho e conhecimento proporcionados. Agradeço aos professores e colegas da Bioengenharia, em especial ao Professor João Manuel Domingos A. Rollo pelo grande apoio e por sempre ter confiado no meu trabalho e potencial;

Em particular, gostaria de agradecer o apoio das agências de fomentos, CAPES, pelo suporte financeiro durante meu mestrado, ao Programa Santander de Bolsas de Mobilidade Internacional e à Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo pelo financiamento durante o estágio em Portugal;

Um profundo e sincero OBRIGADO, a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, na minha formação. As experiências vividas e as conexões pessoais feitas seguramente refletirão positivamente na minha vida pessoal e profissional.

“Além da mente humana e como um impulso livre, cria-se a ciência. Esta se renova, assim como as gerações, frente a uma atividade que constitui o melhor jogo do *homo ludens*: a ciência é, no mais estrito e melhor dos sentidos, uma gloriosa diversão”

Jacques Barzun

RESUMO

ANDRADE, F. A. C. **Desenvolvimento de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata com propriedades antibacterianas**. 2013. 119 p. Dissertação (Mestrado) – 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.

A hidroxiapatita (HA) tem sido amplamente utilizada como material de implante por possuir alta similaridade com a composição dos ossos e ter capacidade de formar ligações químicas fortes com o tecido ósseo. Entretanto, a adsorção fácil de moléculas orgânicas (proteínas, aminoácidos e polissacarídeos) pela HA também favorece a adsorção e replicação de bactérias, aumentando os casos de infecções relacionados a esse biomaterial. Visando contribuir para o avanço de novos biomateriais com propriedades antibacterianas, foram produzidas neste trabalho hidroxiapatitas contendo nanopartículas de prata (AgNPs) com diferentes proporções (0,01; 0,05; 0,10 e 0,25 % m/m). A primeira etapa do trabalho consistiu na obtenção do pó de HA por precipitação química e na produção de AgNPs em suspensões coloidais por meio de síntese que utiliza a quitosana como agente redutor e estabilizante. Na segunda etapa, as AgNPs foram adsorvidas na HA pelo método de imersão do pó usando um dos coloides sintetizados, obtendo-se quatro hidroxiapatitas contendo AgNPs (HA-AgNPs) nas formas de pó e disco. Na terceira e última etapa, os materiais produzidos foram caracterizados utilizando diversas técnicas e os pós (HA e HA-AgNPs) foram submetidos a avaliações *in vitro*. O efeito antibacteriano foi avaliado frente a cepas de *S. aureus* e *E. coli* utilizando métodos qualitativos e quantitativos. A adesão bacteriana sobre a superfície dos discos foi observada por microscopias eletrônica de varredura (MEV) e confocal de varredura a laser. A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada utilizando cultura de células contendo linhagem de osteoblastos (MG-63). Nesse ensaio, a viabilidade dos osteoblastos foi estudada usando o teste da resazurina; a atividade enzimática foi investigada através da fosfatase alcalina (ALP); e a adesão dos osteoblastos foi observada por MEV. Os resultados mostraram que a HA produzida é nanométrica e que as AgNPs sintetizadas são estáveis e esféricas, com diâmetros variando entre 5-10 nm. Técnicas de MEV, EDS e ICP-AES confirmaram a presença de prata nas HA-AgNPs. As demais caracterizações não mostraram alterações relevantes na estrutura, morfologia e características de superfície (hidrofobicidade e carga líquida). No entanto, a atividade antibacteriana dos materiais mostrou-se eficiente para ambas as cepas e com uma redução de 99,9% das colônias bacterianas em quase todos os materiais já nas primeiras 4 h. Também foi encontrado que a eliminação foi maior tanto para *E. coli* quanto utilizando materiais em pó. O estudo da adesão bacteriana confirmou os resultados anteriores mostrando efeito superior para quase todas HA-AgNPs produzidas comparado a HA, exceto para o material com menor proporção de AgNPs (0,01 % m/m). Por outro lado, os testes de viabilidade, ALP e adesão demonstraram que a HA-AgNPs com maior quantidade de AgNPs (0,25 % m/m) tem um efeito negativo sobre os osteoblastos. Considerando ambos os efeitos de citotoxicidade e antibacteriano, aliado a metodologia simples e de baixo custo envolvido na produção desses materiais, sugere-se que a HA contendo entre 0,05 – 0,10 % m/m das AgNPs sintetizada pode ser a mais favorável para o desenvolvimento proposto visando futuras aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Biomaterial. Quitosana. Adsorção. Efeito bactericida. Cultura de células. Adesão celular. Resazurina. Método de imersão

ABSTRACT

ANDRADE, F. A. C. (2013). **Development of hydroxyapatite containing silver nanoparticles with antibacterial properties**. 119 p. Master Dissertation – 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.

Hydroxyapatite (HA) has been widely used as implant material due to its high similarity with the bone composition and its capacity to form strong chemical bonds with the bone tissue. However, the easy adsorption of organic molecules (proteins, amino acids and polysaccharides) by the HA also favors bacteria adsorption and replication, increasing the cases of infection related to this biomaterial. Aiming to contribute to the advancement of new biomaterials with antibacterial properties, were produced in this work hydroxyapatites containing silver nanoparticles (AgNPs) with different ratios (0.01, 0.05, 0.10 and 0.25% m/m). The first step of this work consisted in obtaining the HA powder by chemical precipitation and production of AgNPs colloidal suspensions by synthesis using chitosan as a reducing agent and stabilizer. In the second step, the AgNPs were adsorbed to the HA matrix by the powder immersion method using one of the synthesized colloids, resulting in four hydroxyapatites containing AgNPs (HA-AgNPs) in disk and powder forms. In the third and final step, the materials produced were characterized using several techniques, with the powders (HA and HA-AgNPs) evaluated *in vitro*. The antibacterial effect was evaluated against strains of *S. aureus* and *E. coli* using qualitative (ágar diffusion test) and quantitative (bacterial colony counts) methods. The bacterial adhesion over the disks surface were observed by Scanning Electron Microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy. Cytotoxicity was evaluated *in vitro* using cell culture containing the osteoblast lineage (MG-63). In this assay, osteoblasts viability was studied using the resazurin test; the enzyme activity was investigated by alkaline phosphatase (ALP), and osteoblast adhesion was observed by SEM. The results showed that the HA produced is nanometric and the synthesized AgNPs are stable and spherical with diameters ranging from 5-10 nm. SEM, EDS and ICP-AES techniques confirmed the presence of silver in the HA-AgNPs. The others characterizations showed no significant changes in the structure, morphology and surface characteristics (hydrophobicity and net charge). However, the materials antibacterial activity was effective for both strains and with reduction of 99.9% of bacterial colonies in almost all materials within the first 4 h. It was also found that the removal was as great for *E. coli* as for powder materials. The bacterial adhesion study confirmed previous results showing superior effect for almost all HA-AgNPs produced compared to HA, except for the material with the lowest proportion of AgNPs (0.01% m/m). On the other hand, viability tests, ALP and adhesion demonstrated that HA-AGNPS with higher AGNPS quantities (0.25% m/m) has a negative effect on osteoblasts. Considering both cytotoxicity and antibacterial effects, combined with the simple methodology and low cost involved in the production of these materials, it is suggested that the HA containing synthesized AgNPs ranging from 0.05 to 0.10% m/m can be the most favorable for the development of the proposed material for future biomedical applications.

Keywords: Biomaterial. Chitosan. Adsorption. Bactericidal effect. Cell culture. Cell adhesion. Resazurin. Immersion method.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Disciplinas envolvidas na ciência dos biomateriais e o caminho a partir de uma necessidade do dispositivo médico até sua etapa final.	22
Figura 2 – Fluxograma representando as etapas e as caracterizações envolvidas na parte experimental do trabalho.	40
Figura 3 – Imagens mostrando os aparatos utilizados durante o processo de obtenção das AgNPs. Mistura de QS (6,92 mg/mL) e AgNO ₃ (52 mM) antes de ser transferida para o banho-maria (a) e o sistema de banho-maria com controle de temperatura fixado em 90 °C (b).	42
Figura 4 – Imagens mostrando o sistema construído para a filtração a vácuo da suspensão de HA-AgNPs (a) e a prensa hidráulica utilizada na prensagem dos pós (b). A inserção no canto inferior direito mostra a imagem da matriz cilíndrica de aço inoxidável.	44
Figura 5 – Representação esquemática dos elementos envolvidos na medição do ângulo de contato.....	51
Figura 6 – Representação do esquema de conversão da resazurina em resorufina.	59
Figura 7 – Representação da reação de hidrólise do pNPP em p-nitofenol com liberação de fosfato catalisada pela enzima ALP.....	60
Figura 8 – Espectros de DRX da HA sintetizada e da HA de um padrão do banco de dados..	62
Figura 9 – Imagens de MEV no modo SE da HA sintetizada com menor aumento (a) e maior aumento, na qual é possível notar detalhes das partículas (b). O espectro de EDS mostra os elementos identificados da HA sintetizada (c).	63
Figura 10 – Imagem mostrando a mudança de cor das soluções durante a síntese de nanopartículas de prata. Mistura de quitosana e nitrato de prata antes do aquecimento (a), após 6 horas (b) e 24 horas (c).	64
Figura 11 – Espectros de absorção do UV-vis para nanopartículas sintetizadas ao longo do tempo. As setas indicam o comprimento de onda máximo (λ_{max}) da banda de SPR para as síntese com 6 h, 12 h e 24 h.....	66
Figura 12 – Imagens de XHR-SEM no modo BF das AgNPs sintetizadas com 6 h (a), 12 h (b) e 24 h (c).	67

Figura 13 – Avaliação do potencial zeta das sínteses com 6 h, 12 h e 24 h ao longo de 90 dias.	68
Figura 14 – Espectros de UV-vis mostrando a banda de SPR das AgNPs antes, durante e após o acréscimo do pó de HA. Em cada quadrante são apresentadas as quatro diluições que deram origem as amostras HA-AgNP25 (a), HA-AgNP10 (b), HA-AgNP5 (c) e HA-AgNP01 (d).	69
Figura 15 – Imagem dos pós de HA-AgNPs antes (A) e após (B) calcinação das amostras 01, 05, 10 e 25 que correspondem a HA-AgNP01, HA-AgNP05, HA-AgNP10 e HA-AgNP25, respectivamente.....	70
Figura 16 – Espectros de DRX comparando o pó de HA e todas as HA-AgNPs produzidas.	71
Figura 17 – Imagem de XHR-SEM no modo HAADF da amostra HA-AgNP25 e análise de EDS contendo o espectro da quantificação dos elementos da região (a) destacada	72
Figura 18 – Imagens de MET da amostra HA-AgNP25 com diferentes aumentos. Partículas de HA contendo possíveis AgNPs (setas) adsorvidas (a) e detalhe de uma partícula de HA com as distâncias interatômicas dos planos cristalinos (b).	73
Figura 19 – Imagens de MEV da amostra HA-AgNP25 (SE), espectro de EDS mostrando os elementos identificados e, na lateral, o mapeamento da distribuição dos elementos O, Ag, Ca e P gerado através do EDS- <i>mapping</i> da região selecionada (SE).	74
Figura 20 – Imagens de MEV no modo BSE das amostras HA-AgNP01 (a), HA-AgNP05 (b), HA-AgNP10 (c) e HA-AgNP25 (d). O espectro de EDS com a quantificação dos elementos da área selecionada Z1 é exibido na parte inferior.	77
Figura 21 – Imagens das placas de Petri contendo os halos de inibição do crescimento bacteriano. São exibidas a HA e as amostras HA-AgNP01, HA-AgNP05, HA-AgNP10 e HA-AgNP25 indicados por 01, 05, 10 e 25, respectivamente. Placa de <i>S. aureus</i> com 10^8 UFC/mL (a), placa de <i>E. coli</i> com 10^8 UFC/mL (b) e placa de <i>S. aureus</i> com 10^5 UFC/mL (c).	81
Figura 22 – Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de <i>E. coli</i> formadas após contato da suspensão bacteriana com a amostra HA-AgNP05 nos tempos 0 h (a), 2 h (b) e 4 h (h).	84
Figura 23 – Redução bacteriana ao longo do tempo para os diferentes tipos de materiais e bactérias. <i>E. coli</i> usando material em pó (a) e em disco (b) e <i>S. aureus</i> usando o material em pó (c) e em disco (d).	84

Figura 24 – Imagem das placas de cultura utilizadas no ensaio de adesão bacteriana com as triplicatas dos materiais HA e HA-AgNPs (01-25) após 24 h de contato com <i>E. coli</i> (a) e <i>S. aureus</i> (b).....	86
Figura 25 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser mostrando a <i>E. coli</i> sobre a HA (a), HA-AgNP01 (b), HA-AgNP05 (c), HA-AgNP10 (d) e HA-AgNP25 (e) após 24 h de adesão e coloração com Live/Dead.	87
Figura 26 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser mostrando a <i>S. aureus</i> sobre a HA (a), HA-AgNP01 (b), HA-AgNP05 (c), HA-AgNP10 (d) e HA-AgNP25 (e) após 24 h de adesão e coloração com Live/Dead.....	88
Figura 27 – Imagens de MEV da adesão bacteriana após 24 h para a <i>E. coli</i> sobre os materiais HA (a)(b), HA-AgNP01 (c) e HA-AgNP05 (d).	90
Figura 28 – Imagens de MEV da adesão bacteriana após 24 h para a <i>S. aureus</i> sobre os materiais HA (a)(b), HA-AgNP01 (c) e HA-AgNP05 (d).....	91
Figura 29 – Atividade metabólica da cultura de MG-63 sobre HA e HA-AgNPs ao longo de quatro e sete dias. Os resultados são expressos em intensidade de fluorescência por mm ² e os valores representam a média ± desvio-padrão de seis culturas.	93
Figura 30 – Atividade enzimática da fosfatase alcalina após 7 dias de cultura de células MG-63 utilizando os materiais em disco de HA e HA-AgNPs. Os resultados são expressos em nmol de p-nitrofenol por µg de proteína total por minuto e os valores representam a média ± desvio-padrão de três culturas.....	95
Figura 31 – Imagens de MEV da adesão dos osteoblastos após 7 dias de cultura. HA (a)(b), HA-AgNP01 (c)(d), HA-AgNP05 (e)(f) com diferentes magnificações.....	96
Figura 32 – Imagens de MEV da adesão dos osteoblastos sobre os discos dos materiais após 7 dias de cultura celular. São mostrados os materiais HA-AgNP10 (a)(b) e HA-AgNP25 (c)(d) com diferentes magnificações.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações clínicas envolvendo as classes dos materiais sintéticos utilizados no corpo humano.	23
Tabela 2 – Família dos fosfatos de cálcio.....	25
Tabela 3 – Relação dos volumes coloidais de AgNPs, do fator diluição da solução de AgNO_3 e da massa de prata envolvida no preparo de 10,0 g de cada HA-AgNPs.....	43
Tabela 4 - Parâmetros operacionais na análise de ICP-AES.....	52
Tabela 5 – Resultados das análises químicas do elemento prata em cada amostra usando a técnica de ICP-AES.	76
Tabela 6 – Valores das medidas de potencial zeta e ângulo de contato para as amostras de HA e HA-AgNPs. São apresentadas as médias de cada medida com seus respectivos desvios-padrão.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AgNPs	Nanopartículas de prata
BSE	<i>Backscattered Electrons</i>
BF	<i>Bright Field</i>
CaP	Fosfatos de cálcio
CEMUP	Centro de Materiais da Universidade do Porto
CSP	<i>Colloidal Silver Protein</i>
DRX	Difração de Raios X
EDS	<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EUA	Estados Unidos da América
FMDUP	Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
FEG-SEM	<i>Field Emission Gun Scanning Electron Microscope</i>
HA-AgNPs	Hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata
HA	Hidroxiapatita
HAADF	<i>High-Angle Annular Dark-Field</i>
HEPM	Células mesenquimais embrionária humana
ICP-AES	<i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy</i>
LCE	Laboratório de Caracterização Estrutural
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
M-H	<i>Mueller-Hinton</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NP	Nanopartículas
PDF	<i>Powder Diffraction File</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
QS	Quitosana

SBF	<i>Simulated Body Fluid</i>
SE	<i>Secondary Electron</i>
STEM	<i>Scanning Transmission Electron Microscope</i>
TCP	Fosfato tricálcico
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
UV-vis	Ultravioleta-visível
XHR-SEM	<i>Extreme High Resolution Scanning Electron Microscope</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS BIOMATERIAIS	21
2.2	FOSFATOS DE CÁLCIO E A HIDROXIAPATITA.....	25
2.3	COMPLICAÇÕES DOS MATERIAIS IMPLANTÁVEIS	28
2.3.1	<i>Infecções cirúrgicas e contaminações com bactérias.....</i>	<i>28</i>
2.3.2	<i>Biofilmes bacterianos e sua relação com as infecções.....</i>	<i>29</i>
2.4	PROPRIEDADES GERAIS: PRATA, COLOIDES E NANOPARTÍCULAS	31
2.5	HIDROXIAPATITA CONTENDO PRATA	34
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	PREPARAÇÃO DOS MATERIAIS	41
4.1.1	<i>Síntese de hidroxiapatita</i>	<i>41</i>
4.1.2	<i>Síntese de nanopartículas de prata em suspensão coloidal.....</i>	<i>41</i>
4.1.3	<i>Obtenção do pó de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata</i>	<i>42</i>
4.2	CARACTERIZAÇÃO.....	44
4.2.1	<i>Espectroscopia ultravioleta-visível.....</i>	<i>44</i>
4.2.2	<i>Potencial zeta</i>	<i>45</i>
4.2.3	<i>Difração de raios X</i>	<i>46</i>
4.2.4	<i>Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios X por energia dispersiva</i>	<i>47</i>
4.2.5	<i>Microscopia eletrônica de transmissão.....</i>	<i>49</i>
4.2.6	<i>Microscopia confocal de varredura a laser.....</i>	<i>49</i>
4.2.7	<i>Medidas de ângulo de contato.....</i>	<i>50</i>
4.2.8	<i>Espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido.....</i>	<i>51</i>
4.3	AValiação <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	53
4.3.1	<i>Cepas bacterianas e condições de cultura</i>	<i>53</i>
4.3.2	<i>Teste de disco-difusão em ágar</i>	<i>54</i>
4.3.3	<i>Contagem de colônias bacterianas em placa</i>	<i>54</i>
4.3.4	<i>Adesão bacteriana</i>	<i>56</i>
4.4	AValiação <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS	56
4.4.1	<i>Cultura de células.....</i>	<i>57</i>
4.4.2	<i>Teste da resazurina.....</i>	<i>58</i>
4.4.3	<i>Atividade enzimática da fosfatase alcalina e adesão celular</i>	<i>60</i>
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA SINTETIZADA	62
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM SUSPENSÃO COLOIDAL	64
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA	68

5.3.1	<i>Análises iniciais das nanopartículas de prata na hidroxiapatita</i>	68
5.3.2	<i>Estrutura, morfologia e composição química do material produzido</i>	70
5.3.3	<i>Análise da hidrofobicidade e da carga líquida de superfície</i>	78
5.4	AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	79
5.4.1	<i>Análise qualitativa usando o teste de difusão em ágar.....</i>	79
5.4.2	<i>Análise quantitativa usando o método de contagem bacteriana em placa.....</i>	81
5.4.3	<i>Análise da adesão bacteriana sobre a superfície do material.....</i>	85
5.5	AVALIAÇÃO IN VITRO UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS	91
5.5.1	<i>Análise da viabilidade celular.....</i>	91
5.5.2	<i>Análise da atividade enzimática e da adesão celular sobre a superfície do material.....</i>	93
6	CONCLUSÃO.....	98
	TRABALHOS FUTUROS.....	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
	ANEXOS	116
	APÊNDICES.....	118

1 INTRODUÇÃO

O uso de materiais cerâmicos e metálicos para a construção ou substituição de partes do tecido ósseo lesado por trauma ou idade é uma necessidade que atinge centenas de milhões de pessoas pelo mundo. Dentre milhares de intervenções cirúrgicas em artroplastias, uma fração desenvolve infecções que por sua vez estão associadas às taxas de falhas das próteses e cirurgias de revisão elevando a morbidade dos pacientes (BIRRELL et al., 1999; PUOLAKKA et al., 2001).

Esse sério problema exige um desenvolvimento constante de materiais com características e propriedades novas capazes de realizar substituições ósseas com índices cada vez mais altos de sucesso, que possam trazer aumento na qualidade de vida para os indivíduos afetados. Isso envolve a atuação de diversos especialistas, formando um campo interdisciplinar que combina diferentes áreas como engenharia, ciências exatas e da saúde para solucionar problemas comuns.

Nesse sentido, materiais avançados para aplicações biomédicas tornam-se um dos mais importantes desafios da moderna engenharia de materiais. Dentre os utilizados na substituição óssea encontram-se uma classe denominada de biomateriais (CAMBIER, 2000; HENCH, 1991) na qual se destaca a hidroxiapatita – HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), cuja composição e estrutura química é similar à fase mineral dos tecidos ósseos. Essa cerâmica bioativa é um dos materiais mais promissores empregados como “ossos artificiais” devido à sua capacidade de desenvolver ligações na interface osso/implante (propriedade osteocondutora) e a ausência de toxicidade local ou sistêmica (propriedade de biocompatibilidade) (HENCH, 1998; TIRRELL et al., 2002; VERRET et al., 2005). São facilmente produzidas sinteticamente e usadas na forma de pó, blocos densos ou porosos principalmente para preenchimento ou reconstrução de defeitos ósseos e como recobrimento sobre diversas ligas metálicas para aumentar as propriedades biológicas (TANASKOVIC et al.¹, 2007 apud CIOBANU et al., 2011).

Embora as taxas de sucesso dos implantes envolvendo os biomateriais sejam dependentes da osteogênese², a longa sobrevivência destes está relacionada com a prevenção e o combate eficaz de infecções bacterianas no pós-operatório (CHEN et al., 2006). Caso

¹ TANASKOVIC, D. et al. Synthesis of functionally graded bioactive glass-apatite multistructures on Ti substrates by pulsed laser deposition. **Applied Surface Science**, V. 254, p. 1279-1282, 2007.

² Processo de formação óssea.

ocorra um inóculo bacteriano durante os procedimentos cirúrgicos haverá grande probabilidade de formar biofilmes dessas bactérias no local, já que uma adesão bacteriana inicial poderá competir com a integração do tecido celular na superfície externa dos materiais implantados. A adesão primária é reversível e envolve forças fracas de Van der Waals (BUCKLEY et al., 2010) e, por isso, o crescimento do biofilme pode ser inibido por meio de agentes antimicrobianos (CERCA et al., 2005). Quando não há tratamento correto pode-se desenvolver uma adesão secundária pelos microrganismos, dificultando a atuação dos agentes antimicrobianos. Nesta etapa, ocorre produção de uma matriz de polissacarídeo, tornando-as irreversivelmente vinculadas umas as outras e ancoradas às superfícies para o desenvolvimento das colônias (MACK et al., 2006).

Uma estratégia usual para tratar e prevenir as infecções associadas em alguns casos de implantes biomédicos é injetar antibióticos de maneira controlada antes e após os procedimentos cirúrgicos (PEERSMAN et al., 2001) com o objetivo de administrar altas doses locais sem exceder a toxicidade sistêmica dos medicamentos (GERHART et al., 1993; LEACH; WILSON, 1992). Entretanto, a capacidade de certas cepas bacterianas desenvolverem resistência contra antibióticos tem despertado o interesse na administração controlada por outros agentes antibacterianos, tais como prata e zinco, que apresentam ampla atividade e baixa incidência de resistência, incluindo as bactérias envolvidas nas infecções de implantes biomédicos (ZHANG; QIAO; CHEN, 2007).

O amplo espectro antibacteriano da prata é conhecido há anos na literatura e muitos trabalhos têm se dedicado a explicar como ocorre esse fenômeno (DURÁN et al., 2010; MORONES et al., 2005; PEDAHzUR et al., 1997; XIU et al., 2012). O mecanismo mais aceitável indica que as partículas podem aderir à superfície carregada negativamente das membranas celulares conduzindo a desnaturação de proteínas e levando a uma consequente morte celular. As cepas bacterianas comuns envolvidas em infecções de implantes, bem como microrganismos frequentemente associados à produção de biofilmes, estão incluídas na lista de patógenos que a prata pode eliminar. Além disso, já é bem conhecido que os íons Ag^+ possuem alta estabilidade térmica, bem como baixa volatilidade e toxicidade para as células humanas (BERGER et al., 1976; SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004; WILLIAMS et al., 1989). Por outro lado, as nanopartículas de prata – AgNPs apresentam propriedades antimicrobianas ainda mais eficientes que os sais de prata devido à alta razão entre superfície/volume e a baixa solubilidade o que permite melhor contato com os microrganismos (MORONES et al., 2005). Utilizando a mesma quantidade de material, as

AgNPs se mostram mais reativas e atóxicas para baixas concentrações (HIDALGO et al., 1998).

Motivados pelo aumento da reatividade dos materiais em nanoescala e baseados nas atividades bactericidas que envolvem as AgNPs (BAKER et al., 2005; MORONES et al., 2005) alguns pesquisadores visam aplicar aos biomateriais o efeito das AgNPs para obter propriedades antibacterianas (CHEN et al., 2007; CHUNG et al., 2005; RAMESHBABU et al., 2007), sem, no entanto, apresentar um produto final de uso comercial. No Brasil existem poucas empresas e trabalhos investindo nesse tipo de material.

Mediante a importância de utilizar um biomaterial eficaz no processo de recuperação óssea, foram produzidos neste trabalho pós de HA com baixas concentrações de AgNPs em diferentes proporções utilizando uma metodologia simples. Esses materiais foram avaliados quanto às características físico-químicas e também quanto à atividade antibacteriana *in vitro* sobre bactérias Gram-negativa (*Escherichia coli*) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*), bem como a citotoxicidade *in vitro* utilizando cultura de células.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS BIOMATERIAIS

Inicialmente, a definição de um biomaterial foi exibida na Conferência Consenso sobre Definições em Biomateriais, promovida pela Sociedade Européia de Biomateriais em Chester – Inglaterra, 1986, como sendo “um material não vivo, utilizado como dispositivo médico, projetado para interagir com sistemas biológicos” (WILLIAMS³, 1987 apud RATNER et al., 2004, p. 1). A definição do termo biomaterial foi aprimorada ao longo dos anos, principalmente após a 2ª Conferência Consenso sobre Definições em Biomateriais em 1991, e mais recentemente pode ser melhor definido como toda e qualquer combinação de substância (com exceção de fármacos) de origens naturais ou sintéticas, que, durante um período de tempo indeterminado, são destinados a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, ampliar ou substituir de quaisquer tecidos, órgãos ou funções dos organismos (BLACK, 1999).

Uma definição complementar e essencial para o entendimento das ciências dos biomateriais é a biocompatibilidade que pode ser entendida como a aceitação e interação de um biomaterial no tecido circundante pelo corpo humano (RATNER et al., 2004). Essa definição, junto com outras características (não-imunogênico, não-carcinogênico, estabilidade química, resistência à fadiga, densidade, etc.), permite selecionar um material para uma possível utilização médica. Um aspecto igualmente importante é que o material seja relativamente barato, reprodutível, fácil de fabricar e produzir a uma larga escala (PARK, J.; LAKES, 2007).

O forte crescimento dos biomateriais, em cerca de meio século de existência, envolveu as áreas da medicina, biologia, química e ciência dos materiais, marcando a multidisciplinaridade como uma característica central (RATNER et al., 2004). Mais do que em qualquer outro campo da tecnologia contemporânea, a ciência dos biomateriais reúne pesquisadores de diversas origens que precisam se comunicar com clareza. A Figura 1 destaca como o pesquisador precisa conectar os diversos fatores juntamente com os profissionais no

³ WILLIAMS, D. F. Definitions in Biomaterials. In: Consensus Conferences on Definitions, 1986, Chester, England. **Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials**. Amsterdam: Elsevier, 1987. 72 p.

processo de identificação de um biomaterial ou um dispositivo até chegar a sua fabricação, venda e implantação.

Figura 1 – Disciplinas envolvidas na ciência dos biomateriais e o caminho a partir de uma necessidade de dispositivo médico até sua etapa final.

Fonte: Ratner et al. (2004)

Os biomateriais podem dividir-se em materiais sintéticos (metais, cerâmicos ou polímeros), normalmente classificados como biomédicos, ou naturais (animal, vegetal ou humano), classificados como biológicos (VALLET-REGI, 2001). Na Tabela 1 são descritas algumas das aplicações clínicas de quatro grupos de materiais sintéticos.

Tabela 1 – Aplicações clínicas envolvendo as classes dos materiais sintéticos utilizados no corpo humano.

Tipos de Materiais	Aplicações Clínicas
Polímeros (Polietileno, Poliéster, Poliuretano, PMMA, Silicone...)	Suturas, vasos sanguíneos; tecidos moles (oftalmologia, tendão artificial, cardiovascular); acetábulo, nariz, orelha
Metais (Aço inoxidável, Titânio e respectivas ligas, Liga de cobalto-cromo...)	Fixação de fraturas ósseas (parafusos, pinos, placas, fios e hastes); substituição da articulação (quadril, joelho); implantes de raiz dentária; marca-passos
Cerâmicos (Alumina, Zircônia, Carbono, Fosfatos de cálcio, Porcelana, Vidros bioativos...)	Implantes ortopédicos e dentários (ossos, juntas, dentes); substituição, aumento e reconstituição óssea; componentes acetabular e femoral
Compósitos (Fibra de carbono-resina termofixa, Fibra de carbono-termoplástico, Carbono-carbono, Fosfato de cálcio-colágeno...)	Cimento ósseo; resinas dentárias; válvula cardíaca artificial (carbono ou grafite pirolítico); implante de joelho

Fonte: Adaptado de Park J. e Lakes (2007) e Kawachi et al. (2000)

Pode-se ainda classificar os biomateriais sob o ponto de vista do comportamento fisiológico que é baseado na resposta tecido hospedeiro (HENCH; WILSON, 1993):

- Materiais biotoleráveis: são tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso, menor a tolerância dos tecidos ao material. Quase todos os polímeros sintéticos, assim como a grande maioria dos metais, são considerados biotoleráveis. Entre os representantes dos metais tem-se o aço inoxidável, ligas de cobalto-cromo.

- Materiais bioinertes: igualmente tolerados pelo organismo e com resposta interfacial mínima (formação de envoltório fibroso). Os mais utilizados são alumina, zircônia, dióxido de titânio e titânio e suas ligas.
- Materiais bioativos: promovem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo induzindo atividade biológica específica. Por sua similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, os tecidos dos mesmos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio do recobrimento de células ósseas. Os principais representantes são os biovidros, as vitrocerâmicas e a hidroxiapatita.
- Materiais reabsorvíveis: após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Com esses materiais não é necessária nova intervenção cirúrgica para a retirada do material implantado. Como exemplos têm-se o fosfato tricálcico – TCP e o poli (ácido láctico).

Os biomateriais utilizados atualmente cresceram muito e, como consequência, as áreas médicas-odontológicas têm à sua disposição inúmeros implantes, que variam na forma, tamanho, tipo de material e custo (CAPEK, 2004). Essa grande variedade obtida em termos de material implantável é principalmente representada pelas biocerâmicas.

A grande aceitação das biocerâmicas a base de sais de fosfato de cálcio – CaP deve-se, principalmente, ao seu alto grau de biocompatibilidade, que está relacionada com a sua similaridade química dos materiais normalmente encontrados no tecido ósseo (DAVIES, 1992).

Definem-se os materiais cerâmicos geralmente como materiais inorgânicos, não-metálicos caracterizados por ligações iônicas ou covalentes fortes (CHEVALIER; GREMILLARD, 2009). Em termos físico-químicos, pode-se dizer que os materiais cerâmicos são frágeis, duros e resistentes ao desgaste, além de altamente resistentes a ataques ácidos e estáveis a altas temperaturas (VALLET-REGI, 2001). Por outro lado, a rigidez (elevado módulo elástico⁴) e a fragilidade⁵ surgem como duas importantes desvantagens destes materiais (VALLET-REGI, 2001).

O uso das biocerâmicas tem se estendido desde o emprego isolado do material até outras formas de utilização, como por exemplo, no recobrimento de próteses metálicas ou na associação com materiais poliméricos, tais como o colágeno. Sua utilização varia desde a

⁴ Elasticidade é a capacidade que o material possui de retornar ao seu estado inicial, não apresentando deformações residuais.

⁵ A fragilidade é uma propriedade mecânica na qual o material apresenta baixa resistência aos choques. Esse tipo de falha inicia-se como uma fratura e se propaga até a ruptura total.

forma densa até a forma porosa. O aumento da porosidade pode diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, porém a existência de poros e grãos com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento de tecido através dele, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, assim, a resistência do material *in vivo* (KAWACHI et al., 2000).

2.2 FOSFATOS DE CÁLCIO E A HIDROXIAPATITA

Os fosfatos de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica, baixa resposta inflamatória, ausência de fibrose ou reação imunológica e aparente capacidade em se ligar ao tecido hospedeiro (VALLET-REGI, 2001). Tais características devem-se à natureza química destes materiais que por possuírem os mesmos íons formados pela fase mineralizada do osso natural (Ca e P) são capazes de participar ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e o cerâmico (KAWACHI et al., 2000; PULEO; NANJI, 1999).

Uma maneira conveniente de classificar e agrupar os fosfatos de cálcio é através da razão Ca/P entre os seus elementos. Os fosfatos de cálcio com elevada razão Ca/P são precipitados em meio básico, enquanto que os de baixo valor para esta razão são precipitados em meio ácido. As fases a serem obtidas irão depender do método e parâmetros envolvidos (KAWACHI et al., 2000). Os CaP podem ser obtidos por várias maneiras, tais como: precipitação seguida ou não da etapa de sinterização, reação do estado sólido, sol-gel, *gel-casting*, dentre outros (BOHNER, 2000; LEGEROS, 2002). A Tabela 2 apresenta os vários tipos de fosfatos de cálcio sintéticos com suas respectivas razões Ca/P.

Tabela 2 – Família dos fosfatos de cálcio

Ca/P	Fórmula	Nome	Abreviação
2,0	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tetracálcico	TTCP
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita	HA
	$\text{Ca}_{10-x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Fosfato de cálcio amorfo	ACP
1,5	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tricálcico (α , β , γ)	TCP

1,33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcico	OCP
1,0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato dicálcico dihidratado	DCPD
1,0	CaHPO_4	Fosfato dicálcico	DCP
1,0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Pirofosfato de cálcio	CPP
1,0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Pirofosfato de cálcio dihidratado	CPPD
0,7	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	Fosfato heptacálcico	HCP
0,67	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	Di-hidrogênio fosfato tetracálcico	TDHP
0,5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{O}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato monocálcico mono-hidratado	MCPM
0,5	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	Metafosfato de cálcio (α , β , γ)	CMP

Fonte: Adaptada de LeGeros (1991)

Os biomateriais de CaP têm sido amplamente usados na área clínica na forma de pó, grânulos, blocos densos ou porosos, recobrimentos e com várias composições (FERRAZ; MONTEIRO; MANUEL, 2004; VALLET-REGÍ, 2010). Devido à sua excelente biocompatibilidade, os CaP são hoje utilizados numa variedade de aplicações abrangendo todo o sistema esquelético, incluindo a fusão da espinal medula, reconstrução crânio-maxilo-facial, tratamento de defeitos ósseos ou fraturas, cirurgia de revisão e como recobrimento de próteses metálicas, para melhorar a ligação não cimentada ao osso hospedeiro. Ressalta-se que nem todos os compostos de CaP são úteis para implantação no corpo, principalmente os compostos com uma razão Ca/P menor que 1 devido à sua alta solubilidade (BEST et al., 2008).

Entre os cerâmicos de fosfatos de cálcio a HA, por ser o principal componente presente na fase mineral do osso, é, sem dúvida, a mais estudada e utilizada para as finalidades clínicas (KAWACHI et al., 2000) e aplicações biológicas (HENCH; WILSON, 1993; LEGEROS, 1991).

A HA, com a fórmula química $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, sendo mais tipicamente representada como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para indicar que a célula unitária compreende duas moléculas do cristal, tem uma razão molar Ca/P de 1,67 (BEST et al., 2008). É o constituinte mineral principal de ossos e dentes humanos, representando de 30 a 70 % da massa.

Seu uso abrange a área odontológica e médica, principalmente na implantodontia e ortopedia, no preenchimento de fraturas ósseas, correções de deformidades e recobrimento de implantes metálicos.

A estrutura da HA apresenta variações durante os estágios de remodelação óssea, resultado de substituições catiônicas e aniônicas que ocorrem com grande facilidade. O Ca^{2+} pode ser substituído por Mg^{2+} , Ba^{2+} , Na^+ , K^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , entre outros; os grupos fosfatos, por exemplo, por carbonatos e vanadatos e os grupos hidroxil por carbonatos, fluoreto (formando a fluoroapatita) e cloreto (formando a cloroapatita). Essas substituições podem alterar os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da estrutura da HA. Em geral, os cristais de HA são relativamente pequenos o que traduz em elevada superfície específica (VALLET-REGÍ, 2001).

Atualmente as aplicações da HA focam-se principalmente em situações em que há a necessidade de aumento ósseo (reconstruções maxilo-faciais ou aplicações dentárias). Nestas situações a HA atua como suporte, promovendo o rápido preenchimento das cavidades com um novo osso fazendo parte da estrutura óssea originada e reduzindo consideravelmente os tempos de recuperação quando comparados a situações nas quais não é usada como preenchimento ósseo. São utilizadas também no preenchimento de defeitos ósseos resultantes da remoção de vastas áreas de osso (remoção de cancrs ósseos e defeitos decorrentes de traumas ou acidentes). No tratamento de tumores ósseos, a hidroxiapatita vem sendo utilizada como suporte de ação prolongada associada a fármacos anticancerígenos. Essa união permite que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual dos fármacos *in situ*. Sob este aspecto essa técnica é atrativa, pois combina o tratamento do tumor com a substituição do osso doente.

O osso é uma estrutura formada por apatita, oxifosfato de cálcio e proteínas fibrinosas do colágeno, permitindo que o organismo obtenha certas vantagens de locomoção e, ao mesmo tempo, uma reserva de cálcio e fósforo com troca contínua (MAVROPOULOS, 1999). O desenvolvimento do osso como suporte para os tecidos moles tem uma longa história, durante a qual as vértebras começaram a endurecer com este mineral há aproximadamente 400 milhões de anos. Antes disso, existiam colunas vertebrais completamente cartilaginosas, as quais ainda são observadas em tubarões (RANG, 2000). No homem, o esqueleto adulto contém aproximadamente 700g de fósforo na forma de fosfato de cálcio inorgânico (BROWN; MATHEW; TUNG, 1981).

A estrutura porosa da hidroxiapatita permite a osteocondução, aumentando sua similaridade com o osso esponjoso. Sabe-se que para haver formação do osteócito⁶ é

⁶ São células em estado de “repouso” podendo diferenciar-se rumo à atividade blástica (crescimento em reparação) ou à atividade lítica (absorção).

necessário tamanho mínimo de 100 μm por poro, sendo o tamanho ideal para crescimento ósseo de 300-500 μm (BROWN; MATHEW; TUNG, 1981). Ainda dentro desta estrutura, é fundamental a interconexão entre os poros para garantir a manutenção da pressão parcial de oxigênio suficiente para diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos. Os padrões de difração de raios X de hidroxiapatita sintética e dos cristais ósseos são semelhantes. O tamanho dos cristais de hidroxiapatita, dependendo das condições de crescimento, pode variar dentro de um intervalo bastante amplo, alcançando as dimensões aproximadamente similares aos do osso natural (BOCKMAN et al., 1986).

2.3 COMPLICAÇÕES DOS MATERIAIS IMPLANTÁVEIS

Em geral, os materiais implantados sofrem alterações fisiológicas quando inseridos no organismo, devido aos fluidos corporais revestirem as superfícies externas do corpo estranho com uma camada de material contendo proteínas do plasma e plaquetas. Caso ocorra infecção direta de um patógeno, o primeiro passo será a competição entre a integração do tecido celular e a adesão bacteriana inicial sobre a mesma superfície implantada (LARIKKA, 2003).

2.3.1 *Infecções cirúrgicas e contaminações com bactérias*

Em 2003 estimava-se cerca de 500.000 artroplastias⁷ eram feitas por ano nos Estados Unidos e devido ao aumento da longevidade dos cidadãos esse número poderia ultrapassar 700.000 até o ano de 2030 (LARIKKA, 2003). Outros autores estimam que aproximadamente 30 % de todas as próteses implantadas mostram necessidade de cirurgias de revisão e, entre as causas, 7 % são devido às infecções (MORAN; HORTON, 2000; PUOLAKKA, 2001). No Brasil não existem números oficiais (BORGES, 2010).

Coventry (1975), e mais tarde Fitzgerald et al. (1977), descreveram um sistema simples para a classificação das infecções de próteses articulares de quadril. Esta classificação é baseada no modo ou no momento da infecção. As infecções do Tipo I são originadas no

⁷ Cirurgias realizadas para restaurar o movimento de uma articulação com o objetivo de restituir ou melhorar a mobilidade e a função do indivíduo.

momento da operação e tornam-se sintomáticas no pós-operatório imediato. Estas são chamadas de primeira infecção pós-operatória ou precoce. As infecções do tipo II também se originam no momento da operação, mas o início dos sintomas nesses casos é atrasado. O paciente geralmente é visto entre seis meses e dois anos após a operação. Infecções do tipo III, também chamadas de infecções hematógenas ou tardias, são menos comuns e geralmente ocorrem após dois anos ou mais do procedimento cirúrgico. No geral, a epidemiologia mais comum dessas infecções é devida a *Staphylococcus epidermidis* (31 % dos casos) e *Staphylococcus aureus* (20 %), sendo menos freqüente para *Escherichia coli* (11 %) e os demais (SPANGEHL et al., 1998; DAVIS et al., 1999; GAINÉ et al., 2000).

As infecções do Tipo I e II podem ser evitadas no momento da cirurgia utilizando técnicas adequadas de assepsia para evitar a implantação direta do patógeno. Além de técnicas assépticas padrões, existem outras medidas documentadas disponíveis para reduzir a incidência de infecções. Estas incluem o uso de ar ultra limpo no fluxo laminar da sala de operações, o uso de trajas cirúrgicos completos pela equipe médica (apelidadas de “roupas de astronautas”) e profilaxia com uso de antibióticos tanto no pré como no pós-operatório (PEERSMAN et al., 2001).

Estudos utilizando ambas as técnicas (ar ultra limpo e “roupas de astronautas”) demonstraram uma redução significativa da incidência de infecções nas cirurgias de próteses articulares (PEERSMAN et al., 2001; MALIK et al., 2006). Peersman et al. (2001) acrescentaram, ainda, que não há mudança na taxa de infecção quando o uso de antibióticos era diminuído de 48 para 24 horas no pós-operatório.

Embora estudos envolvendo o tratamento profilático com antibióticos tenham mostrado redução significativa das infecções de 3,3 % para 0,9 % (HILL et al., 1981), existem casos de bactérias que se tornam resistentes aos antibióticos e trazem falhas nessa terapia.

2.3.2 *Biofilmes bacterianos e sua relação com as infecções*

Um fator essencial para evolução e persistência das infecções relacionadas às próteses é a formação de biofilmes, e o seu entendimento pode facilitar o diagnóstico e o tratamento ideal. Tal compreensão explica porque os sinais e sintomas são aliviados por tratamentos de curto prazo com agentes antimicrobianos, mas reincidem logo após a retirada do tratamento.

Segundo Costerton et al. (1999, p. 1318) biofilmes são “comunidades estruturadas de células bacterianas encerradas em uma matriz polimérica auto-montada e aderente a uma superfície inerte ou viva”. Estes tipos de superfícies estão frequentemente presentes em próteses e sobre estas os biofilmes podem crescer lentamente e serem resistentes a respostas celulares e imunes. Este autor realizou, ainda, estudos envolvendo dispositivos ortopédicos relacionados às infecções em um modelo animal que confirmaram o lento crescimento de *S. aureus* e *E. coli*. Dentre os fatores que contribuem para a velocidade da formação de biofilmes pode-se citar o número e tipo de células presentes no líquido ao qual a superfície está exposta, a taxa de fluxo deste líquido através da superfície, as propriedades físico-químicas da superfície, a composição nutricional e temperatura do ambiente.

Vários mecanismos tornam as bactérias protegidas por biofilme menos suscetíveis a agentes antimicrobianos que as suas homólogas planctônicas (bactérias que vivem livres em um meio líquido). Quando estas bactérias planctônicas estão aderidas a uma superfície, passam a ser denominadas de bactérias sésseis. No estado sésil estas bactérias se diferenciam da sua condição planctônica e passam a adquirir algumas vantagens de sobrevivência. Nessa adesão secundária, uma substância amorfa extracelular a base de polissacarídeo é produzida e torna-se responsável pela promoção e a adesão intracelular, além da captura dos nutrientes. Esses polissacarídeos produzidos também podem bloquear a penetração de antibióticos e dificultar a eliminação das células bacterianas (WIDMER, 2001).

Sendo assim, a terapia padrão envolvendo uso de antibióticos nas infecções de próteses geralmente alivia os sintomas causados por bactérias planctônicas liberadas do biofilme, mas muitas vezes não é capaz de matar as bactérias no biofilme (Campoccia et al., 2010). Sabe-se que, no biofilme, após a colonização por bactérias, a resistência aos agentes antimicrobianos é extremamente aumentada (cerca de 1000 vezes) e mesmo os agentes antimicrobianos que possam ser eficazes contra células planctônicas, são ineficazes contra as mesmas bactérias que crescem em um biofilme (JONES et al. 2008; MARTIN et al. 2009; MONTEIRO et al. 2009). Logo, um tratamento bem sucedido de infecções de prótese deve incorporar o combate contra bactérias planctônicas e, essencialmente, as sésseis (WIDMER, 2001).

que a presença de antimicrobianos no meio possa afetar consideravelmente a formação de biofilmes.

2.4 PROPRIEDADES GERAIS: PRATA, COLOIDES E NANOPARTÍCULAS

Atualmente, existe um grande interesse pelas nanopartículas – NPs metálicas, entre as quais estão as AuNPs e AgNPs (KAMAT, 2002; MALLIN; MURPHY, 2002). O empenho por estes metais se destaca pelas suas peculiaridades essenciais, como estabilidade química, condutividade elétrica, alta atividade catalítica e as características referentes como interação com a luz por meio da banda plasmônica, seu uso em nanoeletrônica e área médica. Quanto às AuNPs, se concentra principalmente na construção de biossensores (HUANG; YUAN; YANG, 2005) por apresentar ótima interação com grupos nitrila (-CN), tiol (-SH) e amina primária (-NH₂), presentes em diversas biomoléculas, além de uma estabilidade superior as outras NPs metálicas, como as de prata. Apesar das AgNPs sofrerem oxidação mais facilmente que as AuNPs, seu estudo se faz intenso devido a seu efeito bactericida (MORONES et al., 2005). Assim, buscam-se sínteses de NPs com menor dispersão da morfologia e uso de reagentes ou rotas mais amigáveis ao meio ambiente (EDWARDS; THOMAS, 2007).

A mais convencional e interessante, entre as inúmeras rotas de síntese existentes, é a que usa água como meio reacional (CRESPILHO et al., 2006; FURLONG et al., 1984; KAMAT, 2002; TURKEVICH; KIM, 1970; TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). Nesta rota de síntese são adquiridas NPs em forma coloidal, contendo partículas com dispersão de tamanho entre 10⁻⁹ m até 10⁻⁶ m. Os coloides de prata são essencialmente soluções contendo tanto AgNPs quanto seus íons, com a presença ou não de algum estabilizante, como, por exemplo, a quitosana – QS. A QS é um biopolímero natural obtido por desacetilação da quitina que pode ser obtido dos exoesqueletos de artrópodes (KUBOTA et al., 2000).

A redução em meio aquoso de íons prata (Ag⁺) para prata metálica (Ag⁰) forma, inicialmente, núcleos de nanopartículas que por sua vez irão crescer lentamente dando origem as nanopartículas de prata metálicas com tamanhos definidos (HENGLEIN, 1993). Muitos autores utilizam como agentes precursores o iodeto de prata (AgI), perclorato de prata (AgClO₄), tetrafluorborato de prata (AgBF₄), hexafluorofosfato de prata (AgPF₆) e nitrato de prata (AgNO₃) (BARSOTTI, O'CONNELL; STELLACCI, 2004). Nas análises realizadas por Patakfalvi, Virányi e Dákány (2004), foi visto que os precursores AgClO₄, AgBF₄, AgPF₆ tinham uma rápida reação inicial para a formação das NPs, mas após 10 min, a velocidade sofria considerável diminuição. Por outro lado, o uso de AgNO₃ como precursor torna-se

interessante, pois promove uma reação lenta e constante, permitindo uma melhor distribuição de morfologia e tamanho a partir do controle da nucleação e crescimento das partículas (KIM, D.; JEONG; MOON, 2006).

Percebendo-se a potencial ação bactericida dos colóides de prata, outras partículas foram estudadas, resultando na seguinte escala de toxicidade contra microrganismos: Ag > Hg > Cu > Cd > Pb > Co > Au > Zn > Fe > Mn > Mo > Sn (GUGGENBICHLER et al., 1999). O suíço Karl Wilhelm Von Naegeli, em 1893, foi o primeiro a estudar a ação bactericida da prata iônica sobre células eucarióticas e procarióticas, sendo este considerado o primeiro estudo registrado (GUGGENBICHLER et al., 1999). Von Naegeli relatou que apenas 9,2 nM de íons de prata eram suficientemente tóxicos para algas, e que há uma baixa toxicidade da prata em células de animais (GOLUBOVICH; RABOTNOVA, 1974).

A prata possui ação bactericida sobre uma gama de bactérias Gram-positivas e negativas tais como *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecium*, *Tuberculosis*, *S. pneumoniae*, *V. cholera* e sobre alguns vírus (MORONES et al., 2005). Sun et al. (2005) mostraram que baixas concentrações de AgNPs (50 µM) são suficientes para inibir a replicação do vírus HIV-1. Estes autores ainda realizaram o mesmo teste utilizando AuNPs e revelaram também a menor atividade desta NPs, cerca de 6 a 20 % abaixo das apresentadas pelas AgNPs. Entretanto, alguns organismos mostram-se resistentes à ação da prata, como *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* (SADOWSKI et al., 2008). Esta resistência pode ser proveniente da produção de proteínas que agem como quelatos, complexando a prata ou outros metais pesados no interior das células, diminuindo assim sua toxicidade (GUGGENBICHLER et al., 1999). Outros organismos são capazes de sintetizar AgNPs por ação enzimática (*P. fungi*) ou por redução extracelular (*Fusarium oxysporum*), ou ainda realizar a degradação das mesmas, como a bactéria *Chromobacterium violaceum* (DURÁN et al., 2007).

Morones et al. (2005) observaram que concentrações de 75 µg.mL⁻¹ de AgNPs são suficientes para inibir o crescimento de *P. aeruginosa*, *V. cholera*, *E. coli* e *S. typhus*. Ainda que se conheça o efeito bactericida da prata, seu modo de ação é bastante discutido. No entanto, sabe-se que a ação da mesma está relacionada com a forma na qual ela se encontra (bulk, NPs ou íons) e que a ação das AgNPs envolve a sua oxidação a íons prata (XIU et al., 2012). Com relação às NPs, a ação está fortemente ligada ao seu tamanho, demonstrando que as NPs menores, de 5 - 10 nm, possuem maior reatividade, enquanto que, para *clusters* atômicos de 0,4 - 2 nm, a ação bactericida é maior ainda (MORONES et al., 2005). NPs de até 100 nm podem ser encontradas tanto no interior das células como em suas membranas, sendo

que a interação com aglomerados maiores não foi observada. Essa interação das AgNPs com as membranas pode ser dado através da grande afinidade de grupos que contém nitrogênio, enxofre e fósforo (HENGLEIN, 1993; MULVANEY; LINNERT; HENGLEIN, 1991; MORONES et al., 2005) e uma interação mais branda com o grupo hidroxila (OH) (MBHELE et al., 2003). De forma geral, tem-se que a ação das AgNPs está ligada a interações com a membrana e, no interior da célula, interagindo com o DNA e impedindo a replicação (RAI; YADAV, 2009).

A ingestão em altas concentrações de AgNPs por seres humanos pode gerar problemas neurológicos e nos rins, indigestão, dores de cabeça e a *Argyria*, patologia que pode ocasionar o azulamento da pele (FOXNEWS, 2012). No século XIX, o uso intenso de coloides de prata se dava por meio de um produto conhecido como *Colloidal Silver Protein* – CSP que era promovido como cura para diversos males e para tratar doenças como o tétano e reumatismo. Até a Segunda Guerra Mundial, os CSP foram amplamente usados para tratar resfriados e gonorréia, e nas décadas seguintes seu uso foi sendo substituído por terapias mais eficazes e seguras (PURE HEALTH SYSTEMS, 2012). Além dos CSPs, o contato dos seres humanos com a prata ainda pode ser oriundo de resíduos industriais ou por ingestão de alimentos ou águas. Dessa forma, a *Environmental Protection Agency* – EPA, órgão regulador dos Estados Unidos da América – EUA, publicou uma série de referências estimadas na exposição de prata máxima diária em que indivíduos dificilmente desenvolverão riscos significativos ou efeitos deletérios ao longo da vida (EPA, 1991). A dose de referência para a exposição da prata por via oral é de 5 µg/Kg/dia, com uma dose crítica estimada em 14 µg/Kg/dia para uma pessoa normal. Sabe-se ainda que um indivíduo normal em uma dieta regular pode consumir por volta de 90 µg/dia de prata, devido aos conteúdos de prata em alimentos (trigo – 0,3 µg/g, cogumelos – centenas de µg/g e leite – 27 a 54 µg/g) (FUNG; BOWEN, 1996).

A descoberta dos antibióticos e sua progressiva introdução como uso medicinal fizeram com que os coloides metálicos fossem progressivamente descartados. Entretanto, cada vez mais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, conduzindo a procura e síntese constante de novas drogas, que muitas vezes também apresentam efeitos colaterais. Ainda assim, são poucos os antibióticos que acompanham a velocidade de mutação dos vírus e bactérias (GIBBS, 2012). Nesta linha, inúmeros trabalhos foram publicados usando nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos em substituição aos antibióticos (RAI; YADAV; GADE, 2009). Mais recentemente, alguns autores têm mostrado que a combinação de antibióticos e AgNPs pode melhorar antigos antibióticos existentes contra bactérias Gram-negativas (MORONES-RAMIREZ et al., 2013).

Aliado a essa gama de efeitos positivos, torna-se atrativa a busca de AgNPs com maior estabilidade e rotas de síntese que causem menos impactos ao meio ambiente (RAVEENDRAN; FU; WALLEN, 2003).

2.5 HIDROXIAPATITA CONTENDO PRATA

Existem várias possibilidades de se obter fosfato de cálcio com prata, sendo que estas podem ocorrer durante ou após a síntese por meio de mecanismos de sorção – termo geral que descreve a ligação de espécies em solução à superfície de um sólido coexistente em um mesmo sistema (XU; SCHWARTZ; TRAINA, 1994). Podem também ocorrer diferenças no processo químico, na origem dos materiais utilizados e no tipo de prata utilizada. Entre os mecanismos mais comuns de sorção dos íons metálicos em solução pelos fosfatos de cálcio tem-se: a precipitação e a co-precipitação na superfície com formação de fase distinta, a troca iônica, a difusão através do sólido e a adsorção. Cabe ressaltar que estes mecanismos podem ocorrer simultaneamente e sem predominância específica (REIS, 2008).

A literatura apresenta resultados de fosfatos de cálcio contendo prata, incluindo patentes, desde a década de 70, condizente com o período em que ocorreu um avanço na busca por materiais que tinham respostas específicas dentro do organismo. Aparentemente, essa linha de pesquisa avançou lentamente nas décadas seguintes e mais recentemente tem adquirido novos rumos, principalmente com o avanço de novas tecnologias como a nanotecnologia.

No caminho do desenvolvimento dos fosfatos de cálcio com atividade antibacteriana, os estudos envolvendo a hidroxiapatita passaram de menor (DÍAZ, 2009) para maior extensão. Vários autores têm descrito a associação de diferentes formas de HA com complexos metálicos de prata e avaliado seu efeito contra diversas bactérias. Esses materiais podem ser utilizados em forma de grãos ou densos, e as aplicações biomédicas variam desde a utilização em restauração de ossos danificados, traumatizados ou perdidos a recobrimentos de implantes metálicos para melhorar a interação osso-implante (GROSS; BERNDT; IACONO, 1998).

Diferentes métodos já foram propostos na literatura para produzir hidroxiapatita dopada e/ou recoberta com prata. Além de modificações nas metodologias, alguns autores utilizam maiores proporções de Ag na tentativa de produzir biomateriais com efeitos

antibacterianos de longa duração com a liberação constante de prata. Contudo, essa característica pode alterar a biocompatibilidade da hidroxiapatita e produzir também toxicidade para células humanas. Isso justifica a utilização extensiva das avaliações de citotoxicidade *in vitro* por muitos autores (CHEN et al., 2007; KARLOV; SHAKHOV; KOLOBOV, 2000; OH et al., 2004).

Na busca da quantidade ideal de Ag na HA, muitos trabalhos relatam o limite em diferentes termos de concentrações, tais como porcentagem em massa (% m/m), porcentagem atômica (% at.), mol (quantidade de matéria) e partes por milhão (ppm) (BAI et al., 2012). Chen et al. (2006) utilizando recobrimento de HA com aproximadamente 2 % m/m de Ag demonstraram efeito inibitório significativo para bactérias depois de 3 horas de contato. As avaliações antibacterianas foram feitas utilizando ensaios de adesão com cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Os autores ainda avaliaram a citotoxicidade após 24 h de cultura, utilizando células mesenquimais embrionária humana – HEPM, precursores de osteoblastos, por meio de medidas da proliferação celular. Não foram encontradas diferenças significativas na citotoxicidade *in vitro* para os materiais produzidos.

Por outro lado, Nath, Kalmodia e Basu (2010) produziram compósitos de HA com aproximadamente 10 % m/m de Ag e mostraram propriedade bactericida e baixa citotoxicidade para os materiais produzidos. Os ensaios antibacterianos foram realizados utilizando apenas a *E. coli* e para a citotoxicidade foram utilizadas duas linhagens celular – uma de fibroblasto de rato (L929) e outra de osteossarcoma humano (MG-63). Os experimentos envolvendo as células desses autores revelaram que o material produzido não causou diferença significativa na adesão e na proliferação celular que foi feita com ensaios colorimétricos utilizando o composto MTT⁸. A atividade celular avaliada através da expressão de proteínas como fosfatase alcalina – ALP reforçaram o comportamento da baixa citotoxicidade dos materiais.

Park, S. et al. (2005) produziram filmes de HA dopadas com Ag (5 a 10 % v/v) usando técnicas de pulverização catódica, também conhecida como *magnetron sputtering*. A metodologia utilizada por esses autores quando comparada com *plasma spray* apresenta a vantagem de obter melhor adesão e uniformidade de espessura do filme depositado. Foram encontradas variações na microestrutura e nas propriedades mecânicas dependendo da quantidade de Ag adicionada. Análise dos elementos cálcio, fósforo e prata indicaram que os íons Ca^{2+} foram substituídos na estrutura da HA por íons Ag^+ .

⁸ Composto conhecido como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico que é capaz de ser bio reduzido por enzimas localizadas no interior de mitocôndrias de células vivas.

Jelinek et al. (2010) prepararam uma HA dopada com prata por meio do método de deposição a laser pulsado (*Pulsed Laser Deposition* – PLD) que também permite deposições de finas camadas controladas. Os autores usaram concentrações de 0,06 a 13,7 % at. de Ag sobre a HA e estudaram as modificações da topologia, molhabilidade e energia livre de superfície. Foram encontradas dependências entre a quantidade de prata adicionada e as características físico-químicas medidas dos materiais produzidos. Ainda nesse estudo, a atividade antibacteriana dos materiais produzidos foi avaliada para a *E. coli* e foram encontradas como melhores materiais aqueles com concentrações acima de 1,2 % at. de Ag.

Outros métodos mais complexos de recobrimento da HA com prata como *thermal* (NODA et al., 2008) e *cold spraying* (SANPO et al., 2009) foram descritos. Noda et al. (2008), em seu trabalho, verificaram que embora ocorra uma liberação lenta da Ag ao longo do tempo, com boa atividade antibacteriana para *S. aureus*, o material desenvolvido não eliminou totalmente as bactérias presentes nas suspensões bacterianas.

Com relação à carga elétrica excedente e a estrutura cristalina aberta da HA podem ainda ocorrer substituições catiônicas e aniônicas com grande facilidade. Os íons Ca^{2+} que se encontram livres para se mover na solução podem ser preferencialmente trocados por outros íons em solução (REIS, 2008). O processo de troca iônica na obtenção da HA com prata foram observados por Shirkhanzadeh; Azadegan e Liu (1995). Esses autores, utilizando técnicas químicas analíticas, determinaram a cinética de incorporação de íons Ag^+ na HA e descreveram que não há mudanças significativas na estrutura cristalina da HA quando se usa 60 ppm de íons prata em solução de fluido corporal simulado (*Simulated Body Fluid* – SBF).

Feng et al. (1998) utilizaram a imersão de substratos recobertos com HA em soluções de AgNO_3 para promover a troca iônica entre Ag^+ e o Ca^{2+} da HA. As concentrações de prata utilizadas variaram de 20 a 100 ppm e o efeito bactericida para essas concentrações foi comprovado para quatro microrganismos (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermidis*). Lee et al. (2006) também obtiveram prata incorporada em HA por meio de metodologias de imersão dos substratos em amostras contendo 0,4 M de AgNO_3 . Os materiais produzidos apresentaram efeito bactericida quando inoculados diretamente em suspensões bacterianas de *E. coli*.

Além dos processos apresentados, podemos citar a precipitação em solução aquosa, que é o mais comum dos processos de obtenção de HA com prata (CHUNG et al., 2005; RIGO et al., 2010; BRAJENDRA et al., 2011). Tal precipitação pode ser realizada por métodos que diferem na ordem de adição dos reagentes: método direto (uma solução contendo cátions cálcio é adicionada lentamente a uma solução contendo ânions fosfato) e o método

inverso (uma solução contendo ânions de fosfato é adicionada lentamente a uma solução contendo cátions cálcio) (ASADA et al., 1988).

Oh, Park e Jeong (2004) utilizaram uma rota de co-precipitação por método inverso para sintetizar HA dopada com prata usando soluções de partida de AgNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. O estudo mostrou a dependência direta do conteúdo de prata com o efeito antibacteriano *in vitro* para *S. aureus* e *E. coli*. Com a metodologia de co-precipitação, houve diferenças de 70 a 90 % entre as quantidades de prata introduzida inicialmente e incorporada após o processo (com máximo de aproximadamente 4 % m/m de Ag). Por fim, os autores mostraram que o efeito antibacteriano é superior para materiais com conteúdo similar de prata incorporada e produzido por troca iônica quando comparados com os produzidos por co-precipitação.

Ciobanu et al. (2013) adotaram as mesmas soluções e rota de co-precipitação que Oh, Park e Jeong (2004) para sintetizar compostos de HA/Ag. Os autores não encontraram quaisquer influências na morfologia de superfície e na estrutura cristalina da HA após a dopagem. Os métodos qualitativos usado nos ensaios antimicrobianos revelaram que os compostos produzidos possuem efeito antimicrobiano e que interagem de maneira diferente com os microrganismos: três bactérias Gram-positivas, quatro Gram-negativas e um fungo. Os autores ainda encontraram com ensaios qualitativos que os materiais produzidos podem inibir a formação inicial de biofilme.

A utilização de métodos de precipitação e troca iônica no desenvolvimento de HA com nanopartículas de prata têm sido relatadas por diversos autores (BERA; RAMACHANDRARAO, 2009; DÍAZ et al., 2009; NAZARI et al., 2011; LARA et al., 2011). Rameshbabu et al. (2007) sintetizou HA substituída com AgNPs usando precipitação e soluções de AgNO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ por meio de irradiação proveniente de um forno de microondas doméstico. Os produtos obtidos, com variações de 0,5 a 3 % at. de Ag, foram caracterizados e foram avaliados em termos da atividade antibacteriana para cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Foram encontradas diferentes respostas dos materiais produzidos que apresentaram dependência quanto ao tipo e a concentração de bactéria utilizada (melhor resultado foi para *E. coli* e concentrações de 10^8 bactérias/mL). Os autores também avaliaram a adesão de células osteoblásticas humanas sobre os materiais e verificaram distribuição celular significativamente melhor na amostra com menor concentração, sugerindo que amostras com menor quantidade de prata são mais favoráveis para aplicações em implantes.

Com relação à capacidade de adsorção da HA e ao tamanho nanométrico que os seus cristais podem alcançar, a HA pode ser utilizada em processos ambientais. Muitos autores

foram motivados a aplicá-la como removedora tanto de metais em águas e solos contaminados (JEANJEAN; VINCENT; FEDOROFF, 1994; KRESTOU; XENIDIS; PANIAS, 2004; TAKEUCHI; SUZUKI; ARAI, 1988), como de dejetos industriais (MA et al., 1993). A HA também foi aplicada como adsorvente em cromatografia líquida devido a sua grande afinidade por proteínas (AKAZAWA; KOBAYASHI, 1996). No entanto, a utilização da adsorção da HA com Ag e AgNPs para produzir biomateriais antibacterianos ainda é pouco explorada. Tal procedimento pode ser obtido por processos simples de imersão, tornado-se atrativo já que não necessita de equipamento tecnológico sofisticado e os reagentes químicos necessários são de baixo custo.

Marsich et al. (2013) em seu trabalho, produziram compósitos *scaffolds* de HA e alginato através de adsorção coloidal de AgNPs (1 mM) sem requerer manipulação química sobre a superfície dos materiais, apenas interações eletrostáticas. Os autores estudaram nos materiais a liberação de íons Ag^+ e avaliaram *in vitro* a propriedade antibacteriana para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Foi encontrada uma liberação de íons Ag^+ praticamente linear ao longo de sete dias e um bom efeito antibacteriano nas primeiras cinco horas de contato dos materiais com as suspensões bacterianas. Mesmo após 10 dias de imersão em diferentes soluções os materiais mostraram efeito antibacteriano para *S. aureus* com três ordens de grandeza superior. Os autores ainda estudaram a proliferação celular *in vitro* ao longo do tempo através de ensaios colorimétricos usando MTS⁹ (MOSMANN, 1983). Utilizando duas linhagens celulares de osteossarcoma humano (MG-63 e Saos-2), os autores verificaram que não houve diferença significativa para os materiais com e sem prata.

⁹ Composto conhecido como 3- (4,5 dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H- tetrazólio) também capaz de ser bio reduzido no interior de mitocôndrias de células ativas por enzimas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir hidroxiapatitas com propriedades antibacterianas, utilizando baixas porcentagens de nanopartículas de prata, por meio de metodologias simples e de baixo custo, envolvendo processos de adsorção.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar a hidroxiapatita obtida.
- Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de prata obtidas.
- Obter e caracterizar o pó de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata.
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos materiais obtidos.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos materiais obtidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas e as caracterizações utilizadas neste trabalho estão esquematizadas no fluxograma da Figura 2. O referencial teórico mínimo para o entendimento das técnicas, bem como as metodologias utilizadas em cada etapa serão descritos detalhadamente nas seções subsequentes.

Figura 2 – Fluxograma representando as etapas e as caracterizações envolvidas na parte experimental do trabalho.

4.1 PREPARAÇÃO DOS MATERIAIS

4.1.1 *Síntese de hidroxiapatita*

A hidroxiapatita foi obtida por precipitação química através da reação entre ácido fosfórico e hidróxido de cálcio, ambos com grau analítico de alta pureza. A precipitação ocorreu, em temperatura ambiente e sob agitação constante, por gotejamento lento de 300 mL de H_3PO_4 a 0,5 M em uma solução aquosa contendo 500 mL de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a 0,5 M. Após o gotejamento, a solução continuou sob agitação constante por 6 h. Em seguida, o precipitado foi separado por filtração usando papel filtro (Qualy, 14 μm), lavado duas vezes com água destilada a fim de remover o excesso de quaisquer íons e contaminantes, e seco em estufa a 100 °C por 24 h. O sólido obtido foi desaglomerado em almofariz de ágata e peneirado usando malha 180 (abertura $\leq 180 \mu\text{m}$). Em seguida, o pó resultante foi calcinado a 800 °C por 3 h usando uma taxa de aquecimento de 15 °C por min e resfriado em temperatura ambiente.

4.1.2 *Síntese de nanopartículas de prata em suspensão coloidal*

A rota de síntese escolhida neste trabalho descrita por Wei e Qian (2008) utiliza a quitosana para a produção de nanopartículas de prata como agente redutor e estabilizante. Essa rota utiliza reagentes baratos disponíveis e menos tóxicos, envolve poucas etapas e permite produzir AgNPs em grandes quantidades, justificando sua escolha.

A solução de QS, com grau de desacetilação de 85 % (Polymar S/A), foi preparada na concentração de 6,92 mg/mL utilizando como solvente uma solução 1 % (v/v) de ácido acético (Synth). Após completa solubilização a solução passou por filtração a vácuo, com o papel filtro de mesma característica utilizado na síntese da HA (Qualy, 14 μm), para retirar quaisquer impurezas. Preparou-se, também, uma solução de nitrato de prata (Synth) com uma concentração de 52 mM usando água destilada como solvente. Todos os reagentes utilizados da Synth possuíam grau de pureza analítica – PA.

Para que ocorresse a síntese das AgNPs, as soluções preparadas foram misturadas na proporção de 2 partes de AgNO_3 para 5 partes de QS em um béquer de vidro (Figura 3a). Após 30 min sob agitação e em temperatura ambiente, a mistura foi transferida para tubos de vidro e mantida em repouso a 90 °C durante diferentes tempos entre 1 e 24 h usando um sistema de banho-maria com controle de temperatura (Figura 3b). Após a síntese, os coloides obtidos foram resfriados em temperatura ambiente e armazenados em tubos de vidro cobertos com papel alumínio.

Figura 3 – Imagens mostrando os aparatos utilizados durante o processo de obtenção das AgNPs. Mistura de QS (6,92 mg/mL) e AgNO_3 (52 mM) antes de ser transferida para o banho-maria (a) e o sistema de banho-maria com controle de temperatura fixado em 90 °C (b).

4.1.3 Obtenção do pó de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata

A síntese mais interessante na relação tempo *versus* qualidade de nanopartículas, obtida no coloide de AgNPs com 6 h na etapa anterior, foi utilizada na preparação das amostras de hidroxiapatita contendo diferentes proporções de nanopartículas de prata (HA-AgNPs). Foram feitas quatro diluições distintas usando o coloide e água destilada como

solvente em um volume final de 50 mL (Tabela 3). Em seguida, 10,0 g do pó de HA foram imersos em cada diluição à temperatura ambiente e sob agitação constante. Os pós imersos foram designados como HA-AgNP01, HA-AgNP05, HA-AgNP10 e HA-AgNP25, de acordo com a adição de 1, 5, 10 ou 25 mg de AgNPs. O fator diluição da solução precursora das nanopartículas de prata, a concentração média dos íons Ag^+ e a máxima quantidade em massa de prata envolvida durante o processo foram evidenciados na Tabela 3. Foram retiradas pequenas alíquotas de cada coloide diluído preparado (antes, durante e após o acréscimo do pó de HA) para análises posteriores.

Tabela 3 – Relação dos volumes coloidais de AgNPs, do fator diluição da solução de AgNO_3 e da massa de prata envolvida no preparo de 10,0 g de cada HA-AgNPs.

Amostras	Coloide de AgNPs (mL)	Água destilada (mL)	Fator diluição de AgNO_3	$[\text{Ag}^+]$ (mM)	m_{Ag} (mg)
HA-AgNP01	1	49	$\frac{2}{5} \cdot \frac{1}{50}$	0,19	1,0
HA-AgNP05	5	45	$\frac{2}{5} \cdot \frac{1}{10}$	0,94	5,1
HA-AgNP10	10	40	$\frac{2}{5} \cdot \frac{1}{5}$	1,88	10,1
HA-AgNP25	25	25	$\frac{2}{5} \cdot \frac{1}{2}$	4,7	25,3

Após 30 min, as suspensões de HA-AgNPs foram filtradas usando um sistema a vácuo construído para volumes de 50 mL (Figura 4a) com papel filtro (Qualy, 14 μm), seca em estufa a 60 °C por 24 h e calcinadas novamente a 800 °C por 3 h com a mesma velocidade usada na preparação do pó de HA (15 °C por min).

Parte do pó de todas as amostras produzidas foi prensada em forma de discos com 0,100 g de massa usando uma matriz cilíndrica de aço inoxidável com 8,0 mm de diâmetro e uma prensa uniaxial hidráulica semi-automática (Figura 4-b) com pressão média de 70 MPa. Essa compactação do pó foi realizada no Laboratório de Tribologia e Compósitos, localizado no Departamento de Engenharia Mecânica da Escola de Engenharia de São Carlos – EESC. Os discos foram calcinados novamente por 3h e com velocidade de 15 °C por min para permitir manipular o material durante os ensaios.

Os materiais obtidos foram caracterizados por uma série de técnicas e submetidos a avaliações *in vitro* da atividade antibacteriana utilizando cepas de *S. aureus* e *E. coli* e da citotoxicidade utilizando cultura de células.

Figura 4 – Imagens mostrando o sistema construído para a filtração a vácuo da suspensão de HA-AgNPs (a) e a prensa hidráulica utilizada na prensagem dos pós (b). A inserção no canto inferior direito mostra a imagem da matriz cilíndrica de aço inoxidável.

4.2 CARACTERIZAÇÃO

4.2.1 Espectroscopia ultravioleta-visível

As propriedades ópticas das nanopartículas metálicas são basicamente tratadas com base na eletrodinâmica clássica, pelas teorias de Rayleigh e Mie, e pela teoria quântica utilizada, principalmente, para explicar partículas com tamanhos nanométricos. A mudança de cores nas soluções que contém nanopartículas se origina pelo fenômeno conhecido como ressonância plasmônica de superfície, que é a excitação coletiva dos elétrons na interface entre um condutor e um isolante. Esse efeito é muito sobressalente nas partículas metálicas, seja de ouro ou prata, devido à alta razão superfície/volume. Quando uma onda

eletromagnética (EM) incide sobre uma nanopartícula faz sua nuvem eletrônica oscilar, gerando uma frequência de oscilação entre o núcleo e a nuvem por meio das interações de Coulomb. Sabe-se que nas nanopartículas esféricas ocorre a formação de dipolos e nas nanopartículas anisotrópicas quadrupolos ou multipolos (ZHANG et al., 2003). Assim, a onda EM incidente provoca a oscilação dos dipolos induzidos, sendo grande parte da luz espalhada com a mesma frequência ν_0 da onda incidente (espalhamento elástico). Alguns dos fatores que determinam a faixa espectral de absorção, ou seja, onde ocorre a ressonância, são: densidade eletrônica, massa efetiva e principalmente o tamanho e formato das nanopartículas, além da interação com seus estabilizantes e o meio no qual se encontram (NOGUEZ, 2007). Em princípio, a produção de qualquer forma de partícula ou coloides contendo nanopartículas metálicas como as de prata podem apresentar absorção por praticamente todo o espectro visível (ZHANG; NOGUEZ, 2008). Outro ponto interessante é a possibilidade de inferir características importantes como tamanho, forma e distribuição das nanopartículas em solução por meio da espectroscopia no Ultravioleta-visível (UV-vis).

As técnicas de espectroscopia UV-vis foram usadas para confirmar a existência de AgNPs e fornecer informações iniciais sobre a estrutura básica das nanopartículas formadas. Foram também analisados, por espectroscopia UV-vis, a incorporação de AgNPs pela matriz da HA durante o processo de obtenção da HA-AgNPs. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro modelo DU 800 (Beckman Coulter) situado no laboratório de Química Biológica da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga. Todas as leituras contendo os coloides sintetizados foram feitas no modo varredura do espectrofotômetro e diluídas na proporção de 1:10 com o objetivo de obter valores com absorção máxima ($A_{\text{máx}}$) abaixo de 1,0.

4.2.2 Potencial zeta

A estabilidade de uma suspensão depende do seu potencial total, que é a soma do potencial devido ao solvente, do potencial atrativo e do potencial repulsivo, que contém o termo de potencial zeta (ζ), de acordo com a DLVO (oriunda dos nomes dos cientistas Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek). Para não ocorrer o fenômeno da aglomeração, o potencial repulsivo deve ser maior que o potencial atrativo. A estabilidade de partículas em soluções ocorre quando o valor do potencial zeta é de $\zeta < -30$ mV ou $\zeta > 30$ mV, caso

contrário a aglomeração das partículas irá ocorrer, sendo que a velocidade de aglomeração aumenta quanto mais próximo de zero for o potencial zeta (SKOOG; HOLLER, 2002).

Pode-se medir o potencial zeta através do espalhamento dinâmico da luz usando-se uma cela composta por dois eletrodos no qual é aplicada uma diferença de potencial – ddp gerando uma movimentação das partículas na solução. Com o espalhamento de luz determina-se a velocidade das partículas em função da ddp, e conhecendo a viscosidade e a constante dielétrica do material tem-se o valor do potencial Zeta.

O equipamento utilizado na medida do potencial zeta foi o Zeta Sizer Nano ZS da Malvern Instruments situado no Laboratório de Instrumentação da Empresa Brasileira de Agropecuária – EMBRAPA de São Carlos – SP. As medidas foram feitas em triplicata, com 20 corridas em cada uma, aplicando o método de modo automático. O potencial zeta foi estudado primeiramente para as soluções coloidais de AgNPs recém-sintetizada. As medidas foram feitas com intervalos cada vez maiores até completar 90 dias e durante esse período as soluções coloidais foram mantidas cobertas com papel alumínio na temperatura de 25 °C.

A estabilidade das suspensões aquosas dos pós de HA e HA-AgNPs também foi estudada com medidas do potencial zeta, utilizando o mesmo equipamento (Zeta Sizer Nano ZS, Malvern), porém localizado no Instituto de Engenharia Biomédica – INEB, em Porto-Portugal. As suspensões foram preparadas na concentração de 0,1 g/L para cada amostra usando-se água destilada. A cada medição a cela era limpa e seca para evitar corrosão ou deposição das partículas sobre o eletrodo.

4.2.3 Difração de raios X

O princípio da técnica de difração de raios X – DRX consiste na interação de dois feixes de raios X coerentes, ou seja, procedentes de uma fonte, que incide sobre a amostra. Devido à proximidade do comprimento de onda de raios X e as distâncias interplanares de um cristal, este último atua como grade de difração. Dependendo do ângulo de incidência, diferentes planos refletem os raios iniciais que já tem uma diferença de fase. Estes dois feixes refletidos permitem caracterizar a distância interplanar e, como os planos são numerosos, o quadro total vai caracterizar a estrutura cristalina do composto. Estes dados permitem computar os parâmetros da rede cristalina e identificar o composto através de uma base de

dados. Essa técnica é às vezes chamada de difratometria de pó, já que não precisa de monocristais para o refinamento da estrutura, mas apenas o produto triturado.

A identificação da fase e cristalinidade dos materiais obtidos em pó (HA e HA-AgNPs) foi verificada por DRX em difratômetro Siemens D5005 (Bruker AXS, Alemanha) usando radiação $\text{Cu}_{\alpha 1}$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), situado no Laboratório de Caracterização Estrutural – LCE da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. A varredura angular (2θ) foi de 20° a 60° com passo de $0,033^\circ$ a cada segundo. Os difratogramas obtidos foram analisados com o *software* de difração DIFFRAC^{plus} EVA 7.0 (Bruker Advanced X-ray Solutions) que utiliza uma coletânea de padrões de DRX por pó conhecido como *Powder Diffraction File* – PDF.

4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios X por energia dispersiva

A Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV é a técnica de caracterização microestrutural mais versátil disponível hoje, encontrando aplicações em diversos campos do conhecimento, mais particularmente na engenharia e ciências de materiais, engenharias metalúrgica e de minas, ciências biológicas, dentre outros. A interação de um fino feixe de elétrons focalizado é capaz de produzir imagens de alta resolução e ampliação, gerando uma série de sinais que podem ser utilizados para caracterizar importantes propriedades das amostras, tais como composição, superfície topográfica e cristalografia (RATNER et al., 2004).

No MEV os sinais de maior interesse, usualmente, referem-se às imagens de elétrons secundários (*Secondary Electrons* – SE) e de elétrons retroespalhados (*Backscattering Electrons* – BSE). Neste último os elementos químicos com maior número atômico (mais pesados) espalham mais elétrons e aparecem mais brilhantes nas imagens e por isso são usados na detecção de contraste entre diferentes composições químicas. Há ainda a utilização de microssondas eletrônicas, conhecidos como espectrômetros de energia dispersiva de raios X (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy* – EDS) que complementam a caracterização microscópica dos materiais. Esses detectores de EDS podem ser acoplados na câmara de vácuo dos microscópios para analisar o sinal correspondente aos raios X característicos, resultante do bombardeamento do feixe de elétrons sobre a amostra, permitindo uma análise

semi-quantitativa e pontual dos elementos químicos (EDS-*spot*) bem como a distribuição espacial dos elementos sobre um microvolume (EDS-*mapping*) (GOLDSTEIN, 2003).

O princípio de funcionamento consiste na emissão de feixes de elétrons a partir de um filamento, no qual o mais usual corresponde a emissão termo-iônica gerada por um capilar de tungstênio, aquecido a 2700 K e mantido em um potencial negativo de 0,5 a 40 kV. Alternativamente, pode-se recorrer a um filamento de LaB₆ que fornece uma densidade maior de corrente, em temperatura inferior a do tungstênio (1800 K), além de apresentar maior vida útil. Já os MEVs de alta resolução, conhecido como *Field Emission Guns* – FEG-SEM e de extrema alta resolução, conhecido como *Extreme High Resolution Scanning Electron Microscope* – XHR-SEM, combinam baixa propagação de energia com desaceleração do feixe de elétrons e detectores de alta eficiência para oferecer alta qualidade de imagem e resolução (GOLDSTEIN, 2003).

Dentre os diferentes tipos de detectores para captar os sinais gerados nas interações elétrons-amostra tem-se o acoplamento de EDS e detectores para microscopia eletrônica de transmissão e varredura (*Scanning Transmission Electron Microscope* – STEM) que podem gerar os modos de imagens conhecidos como *bright field* – BF e *high-angle annular dark-field* – HAADF. Cabe ressaltar que os mecanismos de contraste, como as imagens geradas com HAADF-STEM, mostram pouco ou nenhum efeito de difração e podem fornecer imagens bem resolvidas para análise de partículas em escala nanométrica (WEYLAND, 2002). Atualmente, essa técnica é também interessante para a construção de tomografia eletrônica de amostras, uma vez que fornece imagens de forte contraste com as variações no número atômico dos átomos (SHIOJIRI, 2008).

As nanopartículas recém-sintetizadas e o pó preparado com maior concentração de AgNPs (HA-AgNP25) foram estudados com maiores detalhes usando o Magellan 400L da FEI company (XHR-SEM), localizado no LCE da UFSCar. Os materiais preparados foram depositados diretamente sobre grades de cobre recobertas com filme de carbono (CF200-Cu, Electron Microscopy Sciences) após serem dispersos em etanol e ultra-som de banho por 5 min.

O mapeamento da distribuição de elementos químicos (Ca, P, O e Ag) por EDS foi avaliado para a amostra HA-AgNP25 que foi recoberta com uma camada de carbono. Para essa caracterização foi utilizado o Inspect F50 da FEI company localizado no Centro de Tecnologia de Materiais Híbridos da Universidade de São Paulo – CTMH e foram gentilmente analisadas com a ajuda do técnico Wagner Rafael Correr.

A presença de prata nas amostras de HA-AgNPs e a morfologia das células e bactérias sobre os materiais após os ensaios de adesão foram feitas usando o Quanta 400F da FEI company (FEG-SEM) equipado com EDS, localizado no Centro de Materiais da Universidade do Porto – CEMUP. As amostras utilizadas na análise de EDS eram os controles negativos dos ensaios de adesão bacteriana. Todas as amostras foram preparadas sobre uma fita de carbono usando discos qual foi depositada uma camada de ouro-paládio para melhorar o contraste e prevenir a acumulação de campos eletrostáticos durante a produção da imagem.

4.2.5 *Microscopia eletrônica de transmissão*

As imagens de MET são formadas por elétrons que atravessam a amostra carregando toda a informação do volume analisado. O contraste presente nas imagens (claro e escuro) é majoritariamente proveniente de três mecanismos: i - contraste de massa e espessura, que está relacionado com a seção de choque de espalhamento elástico. Esta seção de choque depende do número atômico do átomo espalhador (proporcional à Z^2), assim, regiões com átomos de maior número atômico aparecem mais escuras; ii - contraste de difração causado por orientações cristalográficas ou por perturbações locais da estrutura cristalina da amostra e iii - contraste de fase produzido pela modulação em fase do elétron quando é refratado pelo material. Este último mecanismo é o predominante na MET de alta resolução.

A técnica foi aplicada na amostra preparada com maior quantidade de AgNPs (HA-AgNP25) para investigar a presença de nanopartículas de prata no pó e as possíveis modificações na morfologia do pó de HA após a imersão em AgNPs. Para preparação, as amostras foram dispersas usando etanol, sonicadas por 5 min e depositadas em uma grade de cobre revestida com filme de carbono de 300 *mesh* e carbono tipo A (Ted Pella Inc.). O equipamento utilizado foi um CM 200 da Philips operado em 200 keV, localizado no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista – UNESP de Araraquara.

4.2.6 *Microscopia confocal de varredura a laser*

A técnica de microscopia de fluorescência consiste em captar os fótons emitidos por moléculas (fluoróforo) que ao sofrerem transições energéticas gera imagens (ALBERTS, 2004). Entre as técnicas de microscopia de fluorescência, a microscopia confocal de varredura a laser, associada à aplicação de marcadores fluorescentes (fluorocromos) específicos à amostra a ser analisada, proporciona a análise de biofilmes sem o preparo dos espécimes, dispensando procedimentos como a desidratação e a fixação (ZAURA-ARITE; VAN MARLE; TEN CATE, 2001). Deste modo, a arquitetura e organização interna do biofilme formado após adesão bacteriana são mantidas e podem ser visualizadas em termos de espessura e a viabilidade celular (WOOD et al., 2000).

A fluorescência das imagens na microscopia confocal envolve composto de dois fluorocromos com afinidade pelos ácidos nucleicos, o SYTO-9 e o iodeto de propídeo. Através da coloração atribuída por esses fluorocromos, é possível se determinar a viabilidade microbiana tendo como parâmetro a integridade da membrana citoplasmática que é imprescindível para manutenção da viabilidade celular. Quando usado sozinho, o SYTO-9 penetra tanto em células vivas, quanto em células mortas. Em contraste, o iodeto de propídeo penetra somente em microrganismos mortos, com membrana comprometida. Quando utilizados simultaneamente, o iodeto de propídeo reduz o SYTO-9 no interior das células mortas. Deste modo, microrganismos vivos, com membrana citoplasmática intacta, demonstram fluorescência verde, enquanto microrganismos mortos, com membrana comprometida, apresentam fluorescência vermelha (JIN et al., 2005).

Após o ensaio da adesão bacteriana, os discos das amostras (HA e AgNPs) foram coradas com o Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit L-7007 (Molecular Probes Inc., Invitrogen) de acordo com o procedimento do fabricante. As imagens de confocal foram adquiridas usando o microscópio Leica TCS SP5 II (Leica Microsystems), localizados no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto – IPATIMUP. Foram capturadas imagens de áreas aleatórias sobre a superfície de cada disco e estas foram tratadas com o software LAS AF versão 2.6.0 (Leica Microsystems).

4.2.7 *Medidas de ângulo de contato*

A hidrofobicidade da superfície de materiais pode ser determinada pela técnica da gota sésil (*sessile drop*) através da medição de ângulos de contato. Esse método de referência

consiste, basicamente, na observação do ângulo interno de uma gota, iluminada por uma fonte de luz difusa de um dos lados. Quando a gota encontra a amostra forma-se um ângulo entre o plano da amostra e a reta tangente ao ponto de interseção onde coexiste líquido, gás e sólido denominado ângulo de contato (Figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática dos elementos envolvidos na medição do ângulo de contato

Os ensaios foram realizados usando um sistema automatizado de medição de ângulo de contato (θ), modelo OCA 15 plus (Data physics Instruments GmbH, Alemanha) equipado com câmera de vídeo, situado no INEB em Porto – Portugal. Os ângulos de contato foram obtidos usando água *Milli-Q* em uma câmara saturada com a amostra do líquido a 25 °C. Foram registradas imagens digitais com a câmera de vídeo a cada 40 ms. Devido à absorção dos materiais, o ângulo de contato foi calculado através função tangente no momento em que a gota (2 μ L de água *Milli-Q*) entrou em contato com a superfície. Os ângulos de contato foram calculados para todos os discos das amostras (HA e HA-AgNPs) com pelo menos 6 medidas para cada amostra. Os resultados apresentados indicam a média com seu respectivo desvio-padrão.

4.2.8 Espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido

Espectrometria de emissão atômica por plasma induzido (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry* – ICP-AES), também conhecido como *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* – ICP-OES, é uma técnica analítica utilizada para a análise quantitativa de elementos em níveis de concentrações na ordem de mg/L ou ppm

(parte por milhão) (GINÉ, 1998). Trata-se de uma espectroscopia de emissão que usa plasma acoplado indutivamente para produzir átomos excitados e íons que emitem radiação eletromagnética em comprimentos de onda característicos de um elemento em particular (STEFÁNSSON; GUNNARSSON; GIROUD, 2007). A intensidade desta emissão pode ser correlacionada às concentrações e identificação dos elementos no interior da amostra através de curvas de calibração obtidas pela medição prévia de padrões certificados.

O ensaio foi realizado usando o equipamento CCD Simultaneous ICP-OES modelo Vista-MPX (Varian Analytical Instruments), situado no Instituto de Física de São Carlos – IFSC da Universidade de São Paulo – USP. As amostras foram preparadas dissolvendo-se aproximadamente 200 mg dos pós de HA-AgNPs em 10 mL de 65% (v/v) de HNO₃. Utilizou-se um comprimento de onda específico para a detecção da prata e as medidas foram repetidas em duplicata. Os parâmetros técnicos na realização das medidas de ICP-AES são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros operacionais na análise de ICP-AES.

Parâmetros Operacionais	ICP-AES
Frequência do gerador (MHz)	40
Potência RF (kW)	1,0
Gás de plasma – fluxo (L/min)	15,0
Gás auxiliar – fluxo (L/min)	0,5
Nebulizador de gás – fluxo (L/min)	1,0
Fluxo na amostra (mL/min)	1,0
Fluxo de ar (L/min)	18,0
Fluxo de água (L/min)	1,0
Tocha injetora de alumina	2,0 mm diâmetro interno
Bomba	Peristáltica, 3-canais
Comprimento de onda da Ag (nm)	328,066

4.3 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os métodos utilizados para a determinação da atividade antibacteriana podem ser divididos em dois grupos, os qualitativos e os quantitativos. Entre os testes qualitativos, destacam-se o método de disco-difusão que foi idealizado por Bauer et al. (1966), e desde então é um dos métodos mais utilizados nos laboratórios de microbiologia clínica no Brasil para testar a suscetibilidade aos antimicrobianos (SEJAS et al., 2003). O princípio original deste método baseia-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel filtro que leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano.

Em relação aos testes quantitativos, destaca-se a contagem bacteriana total, em que é estimado o número de unidades formadoras de colônias de bactérias por mililitros de solução (UFC/mL) (CASSOLI, 2005). Existem vários métodos disponíveis para determinação das UFC/mL e entre estes a contagem bacteriana em placa é considerada o método referência (HILLERTON, 2000). A contagem das bactérias usando esse método considera apenas as células viáveis, enquanto outras técnicas contam o número de bactérias tanto mortas como vivas. Embora alguns autores considerem essa característica do método como negativa, no presente estudo esse fato representa uma vantagem. Como real desvantagem do método, podemos citar a possibilidade de subestimar a contagem celular já que uma colônia pode ter sido originada de várias bactérias (HILLERTON, 2000). Além disso, trata-se de um procedimento que demanda grande mão-de-obra e requer uma considerável quantidade de equipamento comparativamente com outras formas de contagem (WEIR et al., 2008).

4.3.1 Cepas bacterianas e condições de cultura

Para todos os ensaios envolvendo a atividade antibacteriana dos materiais foram utilizadas cepas obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo escolhida uma bactéria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e uma Gram-negativa, *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os inóculos desses microrganismos foram todos obtidos a partir da fase logarítmica após cultivo em culturas frescas a 37 °C usando caldo peptona de caseína e soja (*Tryptic soy broth* – TSB). As densidades ópticas das suspensões bacterianas foram sempre medidas em comprimento de onda de 620 nm usando o leitor de microplacas

(Spectra II Microplate Reader, Tecan) no modo de medidas de absorbância. Todos os materiais utilizados foram esterilizados por via úmida e sob pressão com auxílio de uma autoclave (120 °C, 15 min e 1,0 kgf/cm²).

Os ensaios usando o teste de difusão em ágar e a contagem de unidades formadoras de colônias foi realizada sob a supervisão da Prof.^a Dr.^a Carla Raquel Fontana do Departamento de Análises Clínicas e da farmacêutica Dr.^a Elaine Toscano Miranda, do Laboratório de Microbiologia, ambas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP. Já os ensaios da adesão bacteriana foram realizados sob a supervisão do Prof. Dr. Fernando Jorge Monteiro com a ajuda da Me. Liliana Grenho durante estágio no *Biocomposites Group* na Universidade do Porto – Portugal.

4.3.2 *Teste de disco-difusão em ágar*

A avaliação qualitativa do potencial antimicrobiano dos materiais em discos produzidos foi baseada no método de disco-difusão da norma global consensual M2-A8 (2003) do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – NCCLS, atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI. As suspensões bacterianas foram ajustadas para uma concentração de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL, equivalentes a 0,5 na escala McFarland, e semeadas 100 µL em placas de Petri contendo o meio ágar *Mueller-Hinton* – M-H. Foi também preparada uma placa com concentração de aproximadamente 1 x 10⁵ UFC/mL para a bactéria *S. aureus* para investigar o efeito da variável concentração bacteriana no efeito antibacteriano. Em seguida, foram depositados sobre a superfície de cada placa cinco discos estéreis, sendo quatro de cada preparação de HA-AgNPs (HA-AgNP01, HA-AgNP05, HA-AgNP10 e HA-AgNP25) e um de HA, usado como controle negativo. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 h e, após este período, foram registradas imagens fotográficas contendo os halos de inibição formados ao redor dos discos.

4.3.3 *Contagem de colônias bacterianas em placa*

A quantificação das bactérias viáveis após contato com os materiais foi estudada através de adaptações do método de avaliação do tempo de morte bacteriana ao longo do tempo (*time-kill*) contido na norma global consensual M26-A da NCCLS/CLSI (1999). Outros autores na literatura (CHEN et al., 2006; RADETIC et al., 2008; STANIC et al., 2010) também descreveram modificações semelhantes com a mesma finalidade do presente estudo. Os ensaios foram feitos em dias diferentes para cada bactéria utilizando as amostras de HA-AgNP01, HA-AgNP05 na forma de pó e disco, todos com massas 0,100 g.

As amostras testadas foram colocadas em tubos cônicos estéreis de 50 mL contendo 9,9 mL de tampão fosfato salina (*Phosphate Buffered Saline* – PBS) seguido da adição de 0,1 mL das suspensões bacterianas preparadas na concentração de 0,5 McFarland, gerando uma concentração final em cada tubo entre $0,5-5 \times 10^5$ UFC/mL. Foram também preparados dois tubos controles nas mesmas condições, um contendo a HA e outro contendo a bactéria em estudo.

Logo após o primeiro contato das amostras com as suspensões bacterianas, os tubos foram homogeneizados usando um agitador de soluções tipo *vortex* e diluídos apropriadamente (0, 10, 10^2 e 10^3 vezes) para viabilizar a contagem das UFCs. Em seguida, uma alíquota de 100 μ L foi semeada sobre placas de Petri contendo meio ágar M-H para contabilizar o tempo zero. As placas semeadas foram colocadas em estufa a 37 °C por 24 h e os tubos contendo os materiais foram incubados em um *shaker* rotatório (37 °C, 150 rpm) por 2 e 4 h. Em cada tempo, os tubos com as amostras foram retirados do *shaker* e submetidos a homogeneização vigorosa com *vortex* por 20 s para garantir que tanto as bactérias aderidas nos materiais quanto as presentes na solução de contato fossem contabilizadas. Em seguida, foram repetidos os mesmos passos após a homogeneização realizada para o tempo zero.

As placas foram examinadas visualmente, fotografadas e as unidades formadoras de colônias foram contadas. Os experimentos foram repetidos duas vezes e cada placa semeada foi feita em duplicata ou triplicata. Os dados contendo as médias e os desvios-padrão das UFCs foram utilizados para calcular a porcentagem da redução bacteriana em cada tempo, usando relação:

$$R = (C_0 - C) / C_0 \times 100 \%,$$

onde C_0 é o número médio de UFC na amostra de HA (livre de AgNPs) e C é o número médio de UFC nas amostras contendo AgNPs.

4.3.4 Adesão bacteriana

Os ensaios de adesão bacteriana foram realizados sob condição estática usando todos os materiais em disco (HA e HA-AgNPs). As cepas isoladas de *S. aureus* e *E. coli* foram cultivadas em TSB (Liofilchem) e incubadas durante 24 h a 37 °C. Após esse tempo, as suspensões bacterianas foram ajustadas à concentração de 1 a 2×10^8 UFC/ml utilizando solução salina e um densitômetro (Densimat, bioMérieux). Os materiais foram colocados, em triplicata, nos poços de duas placas de cultura de células de 24 poços, uma para cada tipo de bactéria. Foram adicionados 1 mL em cada poço de cada suspensão bacteriana preparada anteriormente e as placas foram incubadas em banho-maria a 37 °C com agitação moderada durante 24 h. A amostra de HA foi utilizada como controle positivo em cada placa e uma amostra de todos os outros materiais contendo apenas solução salina foram utilizados como controle negativo. Após 24 h de adesão, as amostras foram lavadas cuidadosamente duas vezes com uma solução de PBS, de forma a remover as células que não aderiram e as que se encontravam fracamente aderida ao material.

As células bacterianas foram fixadas com 1,5 % de glutaraldeído durante 20 min e cada amostra foi desidratada por passagens em soluções com concentrações crescentes de álcool (50, 60, 70, 80, 90 e 100 % v/v) durante 10 min em cada solução. No ensaio em que se trabalhou com a espécie Gram negativa (*E. coli*), as amostras foram levadas ao ponto crítico tratando as amostras com soluções graduadas e crescentes (70, 80, 90 e v/v) de hexametildisiloxano – HMDS (Sigma Aldrich) para impedir o colapso das células. O tratamento final foi feito com HMDS absoluto e deixado *overnight* em câmara de fluxo laminar a 25°C até a secagem total das amostras (NATION, 1983).

A adesão bacteriana foi avaliada sobre os discos dos materiais usando microscopia confocal de varredura a laser, descrito anteriormente e por MEV. As observações de MEV foram realizadas no CEMUP para visualizar a extensão e morfologia das bactérias. Estas foram buscadas sobre as superfícies dos discos utilizando diversos campos de imagem com ampliações apropriadas para revelar maiores detalhes das interações entre bactérias e bactérias-material.

4.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS

4.4.1 Cultura de células

Um método comum para testar a biocompatibilidade do biomaterial é por meio de testes de citotoxicidade *in vitro* (WATAHA; LOCKWOOD, 1998). Este sistema baseia-se em estudos de cultura de células, os quais são ferramentas úteis na investigação de pontos específicos como adesão, proliferação celular e atividade enzimática das células, de novos materiais ou compostos tóxicos que seriam difíceis de estudar *in vivo* (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Assim, linhagens de células osteoblásticas MG-63, originalmente isoladas a partir de um osteossarcoma humano (BILLIAU et al., 1975), podem ser usadas como modelos de cultura de células (PAUTKE et al., 2004). Esses tipos de células têm a vantagem de permitir o cultivo contínuo com uma expectativa de vida teoricamente infinita (RYAN, 2008; FRESHNEY, 2010), enquanto que a maioria das células normais tem um tempo de vida finito (entre 20 a 100 gerações).

Para os experimentos com cultura de células, utilizou-se a linhagem celular MG-63 (ATCC, USA). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo com modificação alfa (α -MEM) da Sigma-aldrich e suplementadas com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina e 2,5 μ g/mL de fungizona (todas da Gibco). O meio de cultura foi preparado conforme instrução do fabricante e esterilizado em câmara de fluxo por filtração usando membrana de 0,2 μ m (Millipore). As alíquotas das células MG-63, contendo em média 10^6 células/mL, foram retiradas do congelador a -80 °C e colocadas no banho-maria a 37 °C por 2 a 3 min. Depois de descongelada, 1 mL da alíquota foi adicionada cuidadosamente (usando pipeta de Pasteur e agitação gentil nos frascos) em um frasco de cultura celular com área de crescimento de 25 cm², contendo 20 mL do meio de cultura preparado. As células foram mantidas e incubadas em estufa contendo atmosfera úmida, composta de 5 % CO₂/ar, à temperatura de 37 °C. Durante essa etapa de expansão celular o meio de cultura foi substituído por novo α -MEM suplementado a cada 48 h usando uma pipeta de Pasteur de vidro acoplado a uma bomba a vácuo para aspirar o meio antigo. Quando atingiu uma boa confluência celular (80 %) no frasco, as células foram lavadas com PBS (Gibco), destacadas do frasco com solução de tripsina a 37 °C por 5 min e contadas usando um contador automático de células (MEK-5103K, Nihon Kohden Celltac). Em seguida, discos estéreis de cada amostra (6 réplicas) foram colocados no fundo de uma placas de

cultura celular de 24 poços e semeados com 1 mL de células, resultando na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/cm². Um dos poços da placa de poliestireno foi utilizado como controle (meio de cultura + células). Antes de receber as células, todas as amostras testadas foram pré-incubadas com o α -MEM suplementado e mantidos por 30 min a 37 °C na mesma estufa utilizada na cultura celular. Esse passo também permitiu a adesão de proteínas do soro aos materiais. O meio de cultura suplementado foi trocado nos dias 1, 4 e 7, sendo a viabilidade celular avaliada nos dias 4 e 7 para todas as amostras, incluindo o controle, com o teste da resazurina. A adesão celular foi observada no dia 7 utilizando microscopia eletrônica de varredura. Ainda no último dia, foram avaliadas a atividade enzimática da fosfatase alcalina e o conteúdo de proteínas totais. Todos os ensaios com as culturas foram realizados na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto – FMDUP sob a supervisão da técnica Mónica Garcia e da Pós-Doutoranda Christiane Salgado.

4.4.2 *Teste da resazurina*

O teste de redução da resazurina (corante azul de Alamar) pode ser utilizado para avaliar indiretamente a toxicidade, viabilidade e migração em células de mamíferos (AL-NASIRY et al., 2007; NAKAYAMA, et al. 1997). O reagente azul de Alamar é uma forma oxidada do indicador redox (resazurina) que é de cor azul e não-fluorescente. Quando o reagente é incubado com células viáveis, há uma conversão metabólica (redução) nas mitocôndrias e muda da cor azul para rosa (resorufina), emitindo fluorescência em 590 nm (Figura 6). A mudança de cor ou fluorescência pode ser medida por espectrofotometria de fluorescência ou no UV-vis que por sua vez é proporcional ao número de células viáveis em cultura (PERROT et al., 2003).

O estudo da viabilidade celular utilizou o Resazurin Cell Viability Kit (Cell Signaling Technology) sobre as amostras HA, HA-AgNPs e o controle. As células usadas com esse Kit dispensam preparos (fixação ou permeabilização) e permite reutilizar os materiais já que não danifica as células. Os dias selecionados para avaliação (dias 4 e 7) coincidiu com a troca do meio de cultura celular. Os discos dos materiais foram transferidos para uma nova placa, exceto o controle, e adicionado novo meio de cultura suplementado contendo resazurina 0,1 mg/mL (100 μ L, 1:10 v/v). Também foi adicionado um poço com resazurina e meio de cultura

celular, sem as células, para controle de cor. A placa foi levada para estufa de 5 % CO₂/ar a 37 °C e incubada durante 3 h.

Figura 6 – Representação do esquema de conversão da resazurina em resorufina.

Fonte: Adaptado de Promega Corporation (2013)

Após esse período, foram transferidas alíquotas (100 µl) em triplicata do sobrenadante de todas as amostras, incluindo os controles (meio de culturas com e sem células), para uma placa de 96 poços preta de fundo transparente. Em seguida, o meio de cultura no qual foi adicionado a resazurina foi aspirado e as amostras foram lavadas com PBS (500 µL). Logo após, foi adicionado 1 mL novo meio suplementado e a placa foi devolvida para estufa de 5 % CO₂/ar a 37 °C. A leitura da fluorescência da resorufina ($\lambda_{\text{excitação}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissão}} = 590 \text{ nm}$) foi realizada em um leitor de microplacas multidetecção (Synergy HT, Biotek) e os valores de fluorescência de cada amostra foram subtraídos dos valores do controle de cor (contendo apenas o meio de cultura) na tentativa de minimizar interferências e indicar fluorescência apenas dos osteoblastos. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência por milímetro quadrado para permitir comparações com o controle (Apêndice A) e os valores correspondem a média $\pm$ desvio-padrão de 6 amostras.

4.4.3 Atividade enzimática da fosfatase alcalina e adesão celular

A fosfatase alcalina (*Alkaline Phosphatase* – ALP) é uma enzima presente em altas concentrações nos ossos (osteoblastos). Tem uma função essencial na formação do osso, mediando a liberação do fosfato através da catálise da reação de hidrólise do p-nitrofenilfosfato dissódico – pNPP em p-nitrofenol. Dependendo do pH, o p-nitrofenol pode ser dissociado em p-nitrofenolato, um composto amarelo que absorve luz em 400 nm (Figura 7) (COLEMAN, 1992). Assim, o aumento da atividade osteoblástica reflete em um aumento nos dos níveis de ALP. Tais níveis podem, ainda, fornecer informação sobre o estado da cultura de células, e sua análise ocorre normalmente ao final da cultura celular já que o uso do método promove a lise celular determinando o fim da mesma (WANG et al., 2006).

Figura 7 – Representação da reação de hidrólise do pNPP em p-nitrofenol com liberação de fosfato catalisada pela enzima ALP.

Fonte: BioFX Laboratories (2006)

A atividade da ALP foi avaliada ao fim do dia 7 através da determinação por espectrofotometria do p-nitrofenol formado. Após a remoção do meio de cultura de cada amostra (HA e HA-AgNPs), as células contidas em cada poço foram lavadas duas vezes com tampão PBS e lisadas com Triton X-100, a 0,1 % (v/v) por 5 min. Em seguida, os lisados celulares foram transferidos para uma placa de 96 poços e adicionado o substrato, solução de p-NPP a 10 µmol/mL (Phosphate substrate powder, Sigma Aldrich), em tampão alcalino com pH = 10. O substrato preparado foi imediatamente utilizado sendo necessário cuidado quanto à incidência de luz. A mistura foi incubada a 37 °C por 60 min em estufa de 5 % CO₂/ar e após esse período a reação foi interrompida pela adição de 10 % (v/v) de NaOH a 5 M. A

absorbância foi determinada a 400 nm usando um espectrofotômetro (6300 Spectrophotometer, Jenway) e comparada com os valores obtidos pela reta de calibração que foi gerada por diluições sucessivas de p-nitrofenol. As amostras foram feitas em triplicatas e os resultados foram normalizados em relação à proteína total dos lisados celulares, determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

A adesão celular foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura, localizado no CEMUP. Após 7 dias de cultura celular, dois discos de cada material (HA e HA-AgNPs) foram aleatoriamente selecionados, lavados duas vezes com PBS e fixados com 1,5% de glutaraldeído por 1 h. Em seguida, foi feita uma lenta desidratação inicial usando soluções graduadas de etanol e depois um tratamento com HMDS (Sigma Aldrich), da mesma forma como foi preparado no ensaio de adesão bacteriana. As imagens foram registradas utilizando campos aleatoriamente escolhidos cinco campos com a mesma ampliação

A fim de avaliar o grau e a extensão da adesão osteoblástica, foram escolhidos aleatoriamente cinco campos em cada material com a mesma ampliação. Sempre que necessário foram utilizadas ampliações maiores para avaliar as interações entre os osteoblastos, bem como as interações osteoblastos-material.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA SINTETIZADA

O pó da hidroxiapatita recém-preparado foi analisado pela técnica de DRX. Com base na Figura 8 foi identificada no material uma estrutura cristalina bem definida (picos estreitos e definidos) e um possível alto grau de cristalinidade (LANDI et al., 2000). Pode-se notar ainda a comparação do espectro obtido com os picos de uma hidroxiapatita de estrutura hexagonal baseada no padrão PDF 09-0432 (em Anexo). Há coincidência entre os picos e o padrão, indicando que a fase obtida do material sintetizado corresponde de fato a HA. Foram feitas buscas por outras fases, inclusive para outros fosfatos de cálcio, mas nenhuma concordância foi encontrada.

Figura 8 – Espectros de DRX da HA sintetizada e da HA de um padrão do banco de dados.

A morfologia do pó de HA, analisada por MEV, revelou partículas bem pequenas, tendendo ao formato esférico com a presença de partículas aglomeradas (Figura 9a). Na Figura 9b tem-se os detalhes da superfície do disco confeccionado com o pó de HA. É difícil detalhar a morfologia dessas partículas porque estão aglomeradas, mas podemos identificar formatos aparentemente esféricos e com tamanhos entre 70 - 100 nm, configurando o pó

obtido como nano-hidroxiapatita. Segundo Laranjeira, Fernandes e Monteiro (2010), esse tipo de pó apresenta vantagens em relação à micro-hidroxiapatita devido à maior área de superfície (levada superfície específica) e porosidade dos grânulos, além de melhores respostas biológicas quando em contato com células osteoblásticas (CHEVALIER et al., 2009).

A análise por EDS dessa superfície permitiu, ainda, identificar os elementos constituintes de forma semiquantitativa (Figura 9c). É possível notar os picos altos de Ca, P e O que são os principais elementos que compõe a hidroxiapatita. A pequena quantidade identificada do elemento carbono é devido à utilização de fita de carbono na preparação das amostras. Foi também identificado um pequeno pico do elemento magnésio (Mg), que pode estar presente na HA precipitada como um contaminante em pequena quantidade.

Figura 9 – Imagens de MEV no modo SE da HA sintetizada com menor aumento (a) e maior aumento, na qual é possível notar detalhes das partículas (b). O espectro de EDS mostra os elementos identificados da HA sintetizada (c).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM SUSPENSÃO COLOIDAL

As nanopartículas de prata obtidas em suspensão coloidal foram sintetizadas em diferentes tempos utilizando apenas quitosana, nitrato de prata e temperatura, conforme a metodologia apresentada. Apesar de simples, a rota de síntese escolhida exige cuidados no preparo dos reagentes (concentração e grau de desacetilação dos reagentes) e nas variáveis envolvidas (temperatura, tempo, agitação) para conseguir boa reprodutibilidade. Segundo Wei et al. (2009a), o uso do sal inorgânico nitrato de prata como agente precursor de íons Ag^{+2} e da quitosana como agente dispersante e redutor na síntese de AgNPs, permite uma reação constante e lenta durante horas promovendo uma melhor distribuição (forma e tamanho) com taxas de nucleação e crescimento das nanopartículas ordenada.

Inicialmente, a formação das AgNPs foi acompanhada e confirmada através de observações macroscópicas da cor dos coloides. As suspensões passaram de incolor (mistura de QS e AgNO_3 antes do aquecimento) para marrom com intensidades cada vez maiores com o aumento do tempo de síntese (Figura 10). Essa observação forneceu o primeiro indício da relação entre a variável tempo e a quantidade de AgNPs formadas.

Figura 10 – Imagem mostrando a mudança de cor das soluções durante a síntese de nanopartículas de prata. Mistura de quitosana e nitrato de prata antes do aquecimento (a), após 6 horas (b) e 24 horas (c).

A posição e a forma da banda de ressonância plasmônica de superfície (SPR) das nanopartículas de prata são bem estabelecidas na literatura e localizam-se por volta de 400 nm

(DAL LAGO et al., 2011; WEI; QIAN, 2007; MIRANDA et al., 2010). Sabe-se ainda que essa banda de SPR é sensível ao tamanho, forma e a distribuição espacial das partículas e que o aumento da banda de SPR está normalmente associado a um maior número de partículas (MANNA; BATABYAL; NANDI, 2006).

A Figura 11 mostra o resultado do espectro de absorção na faixa UV-vis para as AgNPs sintetizadas com intervalos de tempo crescente. É possível localizar a banda de SPR das AgNPs sintetizadas em torno do comprimento de onda de 420 nm. Para 1 h de síntese não há absorção perceptível por todo o espectro. Com o incremento do tempo de síntese a banda de SPR torna-se cada vez mais evidente e desloca-se verticalmente, indicando que sínteses mais longas podem promover o aumento do número de nanopartículas. Além disso, podemos inferir que os reagentes utilizados na síntese estavam em excesso, visto que o aumento do tempo de síntese forma cada vez mais AgNPs, sem atingir um patamar por até 24 h. Cabe ressaltar que devido aos reagentes estarem em excesso os coloides formados podem conter íons prata em solução que ainda não foram reduzidos para formar as AgNPs.

Na Figura 11, tem-se que o aumento do tempo de síntese promove pequenos deslocamentos horizontais no comprimento de onda máximo (λ_{max}) da banda (conhecido como *red shift*) para a região do espectro com comprimentos de onda maiores. As setas na Figura 11 identificam os comprimentos de onda das sínteses com 6, 12 e 24 h com 415, 418 e 421 nm, respectivamente. Esse deslocamento tem sido descrito como um indicativo do aumento do diâmetro ou da agregação das AgNPs (ELGHANIAN et al., 1997; PANACEK et al., 2006).

Figura 11 – Espectros de absorção do UV-vis para nanopartículas sintetizadas ao longo do tempo. As setas indicam o comprimento de onda máximo (λ_{max}) da banda de SPR para as sínteses com 6 h, 12 h e 24 h.

Devido as relações descritas na literatura entre as características de tamanho, distribuição e forma das AgNPs com a atividade biológica, particularmente, com o efeito antibacteriano das nanopartículas (MORONES et al., 2005), três das sínteses (6, 12 e 24 h) foram investigadas utilizando microscopias avançadas para caracterizar as nanopartículas.

A Figura 12 mostra imagens do microscópio XHR-SEM com o módulo de transmissão acoplado (STEM) das nanopartículas de prata. A imagem, feita no modo de campo claro (BF), mostram as AgNPs como pontos escuros devido a alta densidade desse elemento que absorve parte da luz. Por outro lado, o fundo claro é devido ao elemento carbono que possui baixa densidade. Nota-se que as AgNPs sintetizadas apresentam formatos esféricos e tamanhos aproximados de 10 nm de diâmetros, sendo mais monodispersas (partículas de mesmo tamanho) na síntese com 6 h. Percebe-se ainda que o aumento do tempo de síntese forma um maior número de nanopartículas, mas também aumenta a presença de agregados formando partículas maiores (polidispersidade). Essas características confirmam os resultados anteriores de espectroscopia UV-vis.

Figura 12 – Imagens de XHR-SEM no modo BF das AgNPs sintetizadas com 6 h (a), 12 h (b) e 24 h (c).

A estabilidade das AgNPs sintetizadas foi avaliada através de medidas do potencial Zeta ao longo de 90 dias (Figura 13). As três sínteses analisadas (6, 12 e 24 h) apresentaram um potencial Zeta bem acima da linha limite de estabilidade (30 mV) com valor médio em torno de 50 mV. Wei e Qian (2007) também encontraram em suas sínteses valores positivos (aproximadamente 40 mV) para a carga de superfície das AgNPs. Isso indica uma grande estabilidade das nanopartículas sintetizadas por até 90 dias e explica porque as AgNPs dessa síntese são mais difíceis de formar agregados. Essa característica permite a manutenção das propriedades e pode aumentar o período de validade desses coloides.

O uso de outras rotas de síntese, utilizando a quitosana como agente redutor, pode alterar significativamente a estabilidade dos coloides de AgNPs. Em um estudo semelhante realizado por Berni-Neto (2010), porém usando técnicas de UV-vis, foi encontrado baixa estabilidade dos coloides de AgNPs ao longo do tempo, sendo que após 100 h mais de 50 % das AgNPs tinham sido degradadas.

Com base nos resultados das caracterizações das AgNPs, a síntese utilizando 6 horas mostrou-se mais interessante para o processo de adsorção na hidroxiapatita. Nessa síntese tem-se um menor gasto de tempo e são produzidas nanopartículas com boas qualidades (monodispersas, estáveis, razoavelmente numerosas e com tamanhos nanométricos).

Figura 13 – Avaliação do potencial zeta das sínteses com 6 h, 12 h e 24 h ao longo de 90 dias.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA

5.3.1 Análises iniciais das nanopartículas de prata na hidroxiapatita

As diluições preparadas com o coloide sintetizado em 6 h permitiu adicionar diferentes proporções de AgNPs na HA. O método de imersão do pó de HA em coloides contendo íons e nanopartículas de prata explora a alta capacidade que a HA possui para adsorção de íons metálicos (REIS, 2008).

A remoção das AgNPs que se encontra em meio líquido pela superfície da HA (adsorção das AgNPs pela HA) foi acompanhada através do sinal da banda de SPR das AgNPs utilizando espectroscopia UV-vis. Na Figura 14 tem-se o sinal da banda de SPR das AgNPs para as quatro diluições realizadas antes, durante e após 30 min da imersão do pó de HA. Podemos observar que a remoção das AgNPs do meio líquido é total para três das

preparações, já que o sinal da banda SPR é nulo após o processo. A preparação que envolveu maior quantidade de nanopartículas adicionadas, houve um sinal da banda SPR mesmo após o processo indicando que a HA não conseguiu remover todas as AgNPs. Isso sugere que as AgNPs em solução está acima da quantidade máxima adsorvida pela HA utilizada.

Vários mecanismos têm sido postulados para explicar a adsorção de íons em solução em apatitas, mas pouco tem sido explorado quanto à adsorção de nanopartículas metálicas. Em relação aos íons metálicos, Reichert e Binner (1996) descreveram que pode haver formação de complexos por atrações eletrostáticas com íons fosfato e OH^- na superfície da HA, assim como complexos com o íon em solução ou diretamente nos defeitos da estrutura que funcionam como sítios ativos (REIS, 2008).

Figura 14 – Espectros de UV-vis mostrando a banda de SPR das AgNPs antes, durante e após o acréscimo do pó de HA. Em cada quadrante são apresentadas as quatro diluições que deram origem as amostras HA-AgNP25 (a), HA-AgNP10 (b), HA-AgNP5 (c) e HA-AgN01 (d).

Após a imersão da HA, o pó obtido, agora denominado HA-AgNPs foi tratado termicamente para eliminar qualquer molécula de água restante e volatilizar as moléculas de quitosana que estivessem aderidas ao material. Assim, garantimos que o material resultante é

composto em grande maioria de hidroxiapatita e prata. As HA-AgNPs antes e após o tratamento térmico (calcinação) pode ser observado na Figura 15. Os pós possuem cor branca predominante, mesmo nas amostras com maior quantidade de AgNPs, tornando-se este um atrativo para o desenvolvimento comercial do produto, já que as aplicações da área dentária envolve exigências estéticas como cor e translucidez além das especificações mecânicas (). Miranda et al. (2010) e Díaz et al. (2009) também produziram pós de nanocompósitos de HA contendo baixa concentração de prata (1 % m/m), mas o produto final resultou em cor escura (marrom à cinza). A concentração utilizada por esses autores foi quatro vezes superior a maior concentração utilizada nesse trabalho (0,25 %) o que pode justificar as diferenças de cor do produto final.

A confirmação da prata nos pós foi verificada com técnicas de EDS e MEV. Os detalhes da interação entre a prata adsorvida e HA e maiores características do tamanho e forma foram investigadas por técnicas de MET.

Figura 15 – Imagem dos pós de HA-AgNPs antes (A) e após (B) calcinação das amostras 01, 05, 10 e 25 que correspondem a HA-AgNP01, HA-AgNP05, HA-AgNP10 e HA-AgN25, respectivamente.

5.3.2 Estrutura, morfologia e composição química do material produzido

Os espectros obtidos pela técnica de DRX das HA-AgNPs foram comparados com a HA sintetizada e não mostraram diferenças (Figura 16). Esses resultados indicam que a adsorção de nanopartículas de prata não altera a estrutura cristalina da HA que continua bem definida e sem formação de qualquer nova fase. No entanto, não há evidências suficientes para afirmar se houve substituição de Ag^+ (0,128 nm) por Ca^{2+} (0,099 nm). Possivelmente, o cálculo dos parâmetros de rede, como descrita nos estudos de Jadalannagari et al. (2013), poderia fornecer maiores informações sobre as substituições iônicas envolvidas.

Não é possível detectar no espectro os picos referentes às reflexões de Bragg para a prata metálica (contida nas AgNPs) provavelmente devido a baixa porcentagem em massa de nanopartículas de prata no pó (a maior é 0,25% m/m), visto que a sensibilidade dos difratômetros é por volta de 5 % (m/m). Ichikawa et al. (2009) produziram AgNPs hibridizada em HA e mesmo utilizando maior porcentagem de prata encontraram picos bem fracos em $38,1^\circ$ referentes a cristal cúbico de face centrada da Ag.

Figura 16 – Espectros de DRX comparando o pó de HA e todas as HA-AgNPs produzidas.

Na Figura 17 são mostrados imagens de XHR-MEV no modo HAADF do material em pó contendo maior concentração de AgNPs (HA-AgNP25) e o espectro EDS de uma região destacada contendo os elementos quantificados. Com o pó desaglomerado nota-se que as

partículas esféricas da HA são na verdade alongadas. Na região em destaque (a), há um aglomerado de partículas contendo prata no seu interior (dois pontos mais claros no interior do aglomerado). Os picos do elemento prata são evidentes do espectro EDS. Após essa caracterização não apenas confirma-se que existe prata na amostra, mas também fica evidente que após todo o processo a nanopartícula adicionada não muda seu tamanho de nanômetros.

Figura 17 – Imagem de XHR-SEM no modo HAADF da amostra HA-AgNP25 e análise de EDS contendo o espectro da quantificação dos elementos da região (a) destacada

A análise de MET da amostra HA-AgNP25 evidenciou maiores informações sobre a morfologia das partículas após a inserção de AgNPs (Figura 18). As partículas do pó apresentam poucos aglomerados, são nanométricas, de aparência alongada (semelhantes a uma estrutura hexagonal irregular) e possuem tamanhos entre 100-150 nm de largura e 40-50 nm de espessura. Esses resultados são consistentes com os resultados de DRX e mostram que a adição de baixas concentrações de AgNPs tem pouca influência sobre a estrutura e morfologia dos pós produzidos. Os pontos escuros, no interior de duas partículas da HA e indicados pelas setas (Figura 18a), possuem tamanhos médios de 10 nm e indica serem as

nanopartículas de prata que estão adsorvidas na HA. Esses tamanhos identificados são compatíveis com a apatita dos ossos como demonstrou Weiner e Wagner (1998), e são consistentes com o MEV dos resultados anteriores que mostraram a HA sintetizada com tamanhos nanométricos.

Na Figura 18b tem-se um aumento sobre uma partícula de HA na qual se observa as distâncias interatômicas (espaçamentos entre as franjas) correspondentes aos planos da sua estrutura cristalina.

Figura 18 – Imagens de MET da amostra HA-AgNP25 com diferentes aumentos. Partículas de HA contendo possíveis AgNPs (setas) adsorvidas (a) e detalhe de uma partícula de HA com as distâncias interatômicas dos planos cristalinos (b).

Na Figura 19 foi feito um mapeamento EDS sobre o pó de HA-AgNP25. As imagens na lateral mostram a distribuição dos elementos cálcio (Ca), fósforo (P), oxigênio (O) e prata (Ag) na área da amostra exibida no modo SE. Podemos observar nessa imagem que a prata encontra-se em uma região pontual e bem pequena da amostra (concentração maior de pontos amarelos), enquanto os demais elementos constituintes da HA acompanham o formato das partículas identificadas. Foi feita uma análise semiquantitativa dos elementos da região pontual para comprovar a prata e o espectro foi exibido no final da figura.

Figura 19 – Imagens de MEV da amostra HA-AgNP25 (SE), espectro de EDS mostrando os elementos identificados e, na lateral, o mapeamento da distribuição dos elementos O, Ag, Ca e P gerado através do EDS-*mapping* da região selecionada (SE).

Imagens no modo BSE (Figura 20) da superfície dos discos de cada uma das amostras permitem ilustrar melhor a distribuição da prata. Como esperado, tem-se que a distribuição de prata, identificada pelos pontos brilhantes, está relacionada com a quantidade de AgNPs adicionada durante a preparação das amostras de HA-AgNPs. Na amostra HA-AgNP01 os pontos claros são praticamente inexistentes, já que a concentração de prata é da ordem de 0,01

% m/m. Nas amostras seguintes (HA-AgNP05 e HA-AgNP10), notam-se pontos claros, com uma diferença discreta entre essas amostras. Já a amostra com 0,25 % m/m (HA-AgNP25) possui centenas de pontos brilhantes, inclusive com a presença de alguns aglomerados (tamanhos da ordem de micrômetros). Foi feita uma análise com EDS sobre um dos aglomerados de pontos claros da amostra HA-AgNP25. O resultado (espectro de EDS) dessa análise é exibido no final da Figura 20. Com base nesse espectro, não há dúvidas que os pontos brilhantes são prata. A presença do elemento Cl sugere que parte dessa prata é devido aos possíveis precipitados de AgCl, já que os discos dos materiais analisados ficaram em contato com uma solução salina por 24 h. Os discos usados nesse ensaio eram o controle negativo (apenas solução salina e sem bactérias) do ensaio de adesão bacteriana que foram reaproveitados para estudo. Esses resultados ao mesmo tempo comprovam que não houve contaminação com quaisquer bactérias durante a realização dos ensaios de adesão bacteriana.

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos através das análises químicas dos pós de HA contendo AgNPs (HA-AgNPs) por ICP-AES. Os valores obtidos da % (m/m) de Ag final foram calculados dividindo os valores identificados da massa de Ag (chamada de massa final) por a massa de cada amostra. A massa calculada de cada amostra (chamada de massa inicial) foi retirada da Tabela 3 e a % (m/m) foi calculada de maneira semelhante.

Observa-se com estes resultados que há um aumento gradativo na % (m/m) de Ag em cada amostra com duas diferenças significativas. A quantidade maior de prata identificada nas amostras HA-AgNP01 e HA-AgNP05 pode estar associada a possíveis erros experimentais da pipeta graduada, utilizada na preparação das amostras. Pequenas variações nos volumes pipetados de AgNPs, naturalmente, podem refletir em grandes diferenças na quantidade de massa adicionada e essa sensibilidade é mais acentuada para as amostras que foram adicionadas com volumes menores (HA-AgNP01 e 05). Já as diferenças encontradas nas amostras em que foi adicionado maior volume de AgNPs (HA-AgNP10 e 25) podem estar associada a perda de AgNPs durante o processo. Além disso, as quantidades de AgNPs adicionada nessas preparações podem estar próximas ou acima do limite máximo adsorvido pela matriz da HA. Esse fato já tinha sido observado para a amostra HA-AgNP25 no estudo inicial da adsorção de AgNPs (Figura 14).

Os resultados da análise química concordam e explicam melhor os resultados apresentados na Figura 20. As pequenas diferenças entre as amostras HA-AgNP05 e HA-AgNP10 dados pelos pontos brilhantes é devido às quantidades finais de prata próximas nesses materiais.

Tabela 5 – Resultados das análises químicas do elemento prata em cada amostra usando a técnica de ICP-AES.

Amostra	Massa da amostra (mg)	m _{Ag} (µg)		% (m/m) de Ag	
		Inicial	Final	Inicial	Final
HA-AgNP25	21,1±0,1	53,59	48±2	0,25	0,23±0,01
HA-AgNP10	20,1±0,1	20,30	14,4±0,4	0,10	0,075±0,002
HA-AgNP05	22,3±0,1	11,15	16,8±0,5	0,05	0,072±0,002
HA-AgNP01	23,6±0,1	2,36	5,6±0,6	0,01	0,024±0,002

Figura 20 – Imagens de MEV no modo BSE das amostras HA-AgNP01 (a), HA-AgNP05 (b), HA-AgNP10 (c) e HA-AgNP25 (d). O espectro de EDS com a quantificação dos elementos da área selecionada Z1 é exibido na parte inferior.

5.3.3 *Análise da hidrofobicidade e da carga líquida de superfície*

A hidrofobicidade dos materiais foi avaliada por medições nos ângulos de contato. Os resultados da Tabela 6 mostram valores baixos de ângulo de contato para todos os materiais produzidos, indicando que a superfície destes são hidrofílicas (ou “molháveis”) e que não há diferenças significativas entre os materiais.

Segundo Grenho et al. (2012), a hidrofobicidade da HA pode ser modificada com diferenças no tratamento térmico e no tamanho das partículas. Os valores encontrados por esses autores para uma nano-hidroxiapatita comercial tratada termicamente a 725 °C foi de $11,9 \pm 1,4$ °. Esse valor pertence ao intervalo encontrado para os materiais dados na Tabela 6.

Com base nos resultados do potencial zeta exibido na Tabela 6 temos que as suspensões não são estáveis, e que essas partículas tendem a aglomerar formando precipitados. A carga líquida negativa (em torno de - 16 mV) concorda com a carga mostrada pela maioria das cerâmicas de hidroxiapatita na literatura (LOPES et al., 1999; SUZUKI et al., 1996). As medidas de potencial zeta indicam que as AgNPs adsorvidas sobre a superfície da HA não exibem carga capaz de alterar a superfície das partículas de HA, já que não houve diferença relevante entre as amostras estudadas. Esse resultado corrobora com a idéia de que a prata adsorvida na HA encontra-se como partículas de Ag^0 que não apresenta carga.

Tabela 6 – Valores das medidas de potencial zeta e ângulo de contato para as amostras de HA e HA-AgNPs. São apresentadas as médias de cada medida com seus respectivos desvios-padrão.

Materiais	Potencial zeta (mV)	Ângulo de contato (°)
HA	-15,1 $\pm$ 2,5	13,2 $\pm$ 1,9
HA-AgNP01	-16,9 $\pm$ 1,8	12,6 $\pm$ 1,4
HA-AgNP05	-17,2 $\pm$ 2,6	11,8 $\pm$ 1,3
HA-AgNP10	-16,8 $\pm$ 2,8	11,5 $\pm$ 1,2
HA-AgNP25	-17,4 $\pm$ 2,3	10,8 $\pm$ 1,6

Os resultados da caracterização superficial dos materiais produzidos são importantes no entendimento na adesão bacteriana. Sabe-se que a adesão irá ocorrer mais facilmente nas superfícies que são mais hidrofóbicas, e que bactérias em suspensões aquosas encontram-se carregadas negativamente devido à ionização dos seus grupos de superfície (KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004). No entanto, o processo de adesão é muito mais

complexo e pode depender de diversas variáveis. Parâmetros como velocidade de fluxo, temperatura da água ou concentração de nutrientes podem conduzir a um aumento de adesão bacteriana. Além disso, as características da superfície celular dos microrganismos, especialmente a presença de fímbrias, flagelos e polissacarídeos podem proporcionar uma vantagem na adesão (DONLAN, 2002).

Finalizado as caracterizações físico-químicas, foram realizadas avaliações *in vitro* para investigar o efeito das HA-AgNPs quando em contato com bactérias e células.

5.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana dos materiais produzidos (HA-AgNPs e HA) foi investigada frente às bactérias patogênicas *S. aureus* e *E. coli*. Foram avaliadas as respostas das bactérias para os diferentes materiais com porcentagens específicas de prata, além da influência das diferentes cepas e do tipo de material (particulado e prensado). Inicialmente, foi realizada uma avaliação qualitativa usando o teste de difusão em ágar. Foram também aplicados testes quantitativos para verificar a eliminação de uma suspensão de bactérias quando em contato com os materiais. Por fim, o efeito antibacteriano foi verificado sobre a superfície dos materiais utilizando o ensaio de adesão bacteriana.

Cabe salientar que o efeito antibacteriano das AgNPs sintetizadas usando quitosana, semelhante a produzida nesse trabalho, já foram estudadas para as mesmas bactérias (*E. Coli* e *S. aureus*) por Wei et al. (2009b). Portanto, torna-se dispensável a investigação do efeito antibacteriano desses coloides para esses microrganismos.

5.4.1 *Análise qualitativa usando o teste de difusão em ágar*

O resultado do teste de difusão em ágar para todos os discos preparados é mostrado na Figura 21. Observa-se, nas três placas de Petri, halos de inibição circulares ao redor dos discos de HA-AgNPs e ausência de halo nos discos de HA. Houve crescimento uniforme das bactérias no restante da placa que não entrou em contato com os materiais, sendo mais confluyente para as placas com maior concentração bacteriana (Figura 21a e b). Ainda

podemos notar, para ambas as bactérias, que a amostra com menor porcentagem de AgNPs (HA-AgNP01) possui halo ligeiramente menor, enquanto as demais amostras (HA-AgNP05, 10 e 25) apresentaram halos maiores e de tamanhos similares.

A atividade antibacteriana de compostos HA-Ag, semelhantes ao obtido no presente estudo, tem sido atribuída à liberação de Ag^+ no meio (CHEN et al., 2006, 2008; SIMON; ALBON; SIMON, 2008). Sabe-se que os íons e compostos à base de prata podem destruir as membranas e as paredes celulares das bactérias, afetando seu crescimento (FURR et al., 1994; JUNG et al., 2008). Baseando-se nos resultados anteriores de ICP-AES (Tabela 5) é possível estimar a liberação de íons prata de cada material e correlacionar com a inibição das bactérias. Assim, os halos de inibição são coerentes com as quantidades de prata identificada para cada amostra: menor para a amostra com mais baixa concentração e maior para as amostras com concentrações superiores. As amostras HA-AgNP05 e HA-AgNP10 contendo concentrações semelhantes apresentaram halos praticamente iguais. Embora a amostra HA-AgNP25 apresentasse maior concentração de prata, seu halo de inibição não foi maior que as demais. Isso pode ser atribuído à mobilidade limitada dos íons prata sobre o meio sólido do ágar, que sendo baixa indica ser um dos fatores limitantes para a formação de halos maiores.

A resposta antimicrobiana dos biomateriais produzidos também foi avaliada após modificar a concentração de bactérias para 10^5 UFC/mL. De acordo com Rameshbabu et al. (2007), a concentração de 10^8 UFC/mL pode ser muito maior do que os valores reais encontrados nos locais cirúrgicos envolvendo os biomateriais. Poelstra et al. (2000), utilizando um modelo de implante de coluna vertebral, demonstraram que a taxa de infecção foi de 100% quando 10^3 bactérias de *S. aureus* resistentes à meticilina entraram em contato no local cirúrgico dos biomateriais.

O resultado dos halos de inibição após diminuição do número de bactérias (Figura 21c) mostrou uma inibição ligeiramente maior para todas as amostras. Essa observação é mais nítida quando comparamos as mesmas amostras de placas com diferentes densidades bacterianas e mesma cepa (Figura 21b e c). Dessa forma, o halo de inibição formado por uma amostra contendo menor concentração de prata (HA-AgNP01) torna-se equivalente a amostra de maior concentração de AgNPs (HA-AgNP25) fornecendo indícios que os materiais produzidos, em geral, tem uma melhor atuação antibacteriana na situação mais próxima de uma infecção real.

Embora os resultados de difusão em ágar demonstrem a atividade antibacteriana dos materiais, não obtemos informações sobre o número de bactérias afetadas. Além disso, o fato das colônias não crescerem ao redor dos materiais não esclarece se as bactérias foram mortas

ou estão apenas inibidas de crescer. Com a necessidade de responder esses questionamentos e a intenção de simular condições mais próximas ao líquido circundante corpóreo, foi planejado um experimento quantitativo utilizando suspensões bacterianas para a avaliação da atividade antibacteriana.

Figura 21 – Imagens das placas de Petri contendo os halos de inibição do crescimento bacteriano. São exibidas a HA e as amostras HA-AgNP01, HA-AgNP05, HA-AgNP10 e HA-AgNP25 indicados por 01, 05, 10 e 25, respectivamente. Placa de *S. aureus* com 10^8 UFC/mL (a), placa de *E. coli* com 10^8 UFC/mL (b) e placa de *S. aureus* com 10^5 UFC/mL (c).

5.4.2 Análise quantitativa usando o método de contagem bacteriana em placa

A ação antibacteriana de parte das amostras foi estudada utilizando duas formas desses materiais, sendo uma os discos compactados que apresenta pouca mobilidade e a outra o pó no qual as partículas possuem maior grau de liberdade. A razão para a escolha de apenas dois materiais (HA-AgNP01 e 05) foi baseada nos agentes limitantes do experimento (mão de obra, tempo e material) e nos resultados de ICP que demonstraram concentrações de prata semelhantes nas amostras HA-AgNP05 e 10, dispensando a investigação dessa última. Ressalta-se, ainda, que a escolha de períodos de incubação curtos e o uso de suspensões bacterianas com ausência de nutrientes já foram utilizados por outros autores (AN et al, 1998; CHRISTENSEN et al., 1995; RAMESHBABU et al., 2007; STANIC et al., 2010).

A Figura 22 mostra as colônias originadas por bactérias viáveis após diferentes tempos de contato das suspensões bacterianas com um dos materiais produzidos. A observação macroscópica da morfologia das colônias (forma, borda, tamanho, cor e superfície) revelou que não houve alterações nesses aspectos, sugerindo que a viabilidade das bactérias remanescentes não foram afetadas após contato com os materiais contendo AgNPs.

Foram analisadas e comparadas aproximadamente 500 placas com as colônias da amostra controle (HA) para o cálculo da redução bacteriana e o resumo encontra-se representado na Figura 23. Foi observada excelente redução bacteriana ao longo do tempo para os materiais produzidos. No entanto, existem diferenças nas primeiras horas de contato quando modificamos as cepas e o tipo de material no experimento. A Figura 23a mostra que aproximadamente 30 % das *E. coli* foram eliminadas nos primeiros minutos de contato quando utilizamos o material em pó e com 2 h de contato a redução atingiu 99,9 %. Na Figura 23b, os materiais em discos apresentaram menos de 5 % de redução de *E. coli* nos minutos iniciais e atingiu 99,9 % após 4 h. Com o uso da cepa *S. aureus* ocorre comportamento similar entre os materiais de discos e pó, porém a eliminação das bactérias apresentou maior dificuldade ao longo do tempo. O índice de 99,9 % de redução para *S. aureus* ocorreu somente após 4 h para o material em pó (Figura 23c), enquanto que no material em disco os índices alcançaram um máximo de aproximadamente 60 % de redução após 4 h (Figura 23d). Segundo a NCCLS (1999), porcentagens de redução de 99,9 % indicam que o agente antimicrobiano nas condições testadas apresenta efeito bactericida.

A diferença entre reduções bacterianas (R %) de dois tempos consecutivos de um mesmo material, permite comparar a velocidade da morte bacteriana desempenhada através das diferentes concentrações de AgNPs. Quanto maior essa diferença, mais rápida é a atividade bactericida do material. Na Figura 23 observa-se que a velocidade de redução

bacteriana foi aproximadamente igual sempre que ocorreu uma redução significativa. Para a maioria dos materiais isso ocorreu nas duas primeiras horas e para o material HA-AgNP01 em disco com *S. aureus* ocorreu entre duas e quatro horas. Possivelmente são nesses tempos que os materiais atingem o limiar de íons prata liberado e promovem a morte bacteriana acentuada.

Stanic et al. (2010) em estudo semelhante, produziram HA dopada com prata e encontraram maiores velocidades de redução nas primeiras duas horas de contato, sendo mais lento nas horas seguintes. Para a NCCLS (1999), a avaliação das velocidades de redução bacteriana pode ser mais importante do que apenas o índice final de 99,9 %.

Comparando esses resultados com o ensaio anterior de difusão em ágar, fica claro que os agentes antimicrobianos (Ag^+) presentes nos discos dos materiais apresentam menor coeficiente de difusão quando em meio de cultura sólido. Por outro lado, os íons prata, quando em movimento browniano, promovem contato mais próximo e efetivo com as bactérias em suspensão, resultando em inibições mais significativas.

Os altos erros apresentados pelos desvios-padrão nas primeiras horas com o material em pó (Figura 23a e b) foram devidos, provavelmente, a maior variação de bactérias viáveis nesse período. Além disso, devemos levar em consideração os possíveis erros associados às pipetas automáticas utilizadas no experimento.

É interessante destacar que a utilização do *shaker* rotatório e a pausa nos intervalos de tempo em que os tubos foram abertos para colher alíquotas do meio líquido pode ter intensificado o ambiente aeróbico dos experimentos. Segundo Xiu et al. (2012), experimentos conduzidos nesse tipo de ambiente pode promover a liberação de íons Ag das AgNPs, permitindo uma melhor ação antibacteriana.

Figura 22 – Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de *E. coli* formadas após contato da suspensão bacteriana com a amostra HA-AgNP05 nos tempos 0 h (a), 2 h (b) e 4 h (h).

Figura 23 – Redução bacteriana ao longo do tempo para os diferentes tipos de materiais e bactérias. *E. coli* usando material em pó (a) e em disco (b) e *S. aureus* usando o material em pó (c) e em disco (d).

Os resultados exibiram melhor efeito antibacteriano para a bactéria Gram-negativa (*E. coli*) quando comparada a Gram-positiva (*S. aureus*). Essa diferença foi encontrada por Diaz-visurraga et al. (2010), Jadalannagari et al. (2013) e Ciobanu et al. (2012) e levam em conta a hipótese de que as AgNPs podem causar modificações na parede celular de forma diferente. Segundo Katsikogianni e Missirlis (2004), diferentes cepas bacterianas aderem de forma diferente uma vez que apresentam características físico-químicas distintas.

Sabe-se que os íons de prata têm maior afinidade com a parede celular de organismos Gram-negativos que possuem uma membrana exterior com carga negativa à superfície e estão ausentes em bactérias Gram-positivas. Além disso, a interação de íons de prata com membranas biológicas resulta em produção de espécies reativas de oxigênio, que danificam a membrana da célula (DIBROV et al., 2002; DRAGIEVA et al., 1999; RUSSELL et al., 1996). Os Ag^+ podem ainda reagir com várias proteínas no espaço citossomal, ribossomal e dos ácidos nucléicos, impedindo assim a replicação e a tradução causando a morte celular (KIM, T. N. et al., 1998; KLASSEN, 2000).

5.4.3 Análise da adesão bacteriana sobre a superfície do material

As placas utilizadas no ensaio de adesão bacteriana após 24 h de contato com a suspensão bacteriana são mostradas na Figura 24. É possível observar a turbidez do meio de cultura em ambas as bactérias para as amostras controle (HA) e com menor proporção de AgNPs (HA-AgNP01), indicando o crescimento bacteriano. A adesão bacteriana e a avaliação do efeito antibacteriano de cada amostra foram estudadas com o auxílio de microscopia confocal de varredura a laser e eletrônica de varredura. Enquanto a primeira forneceu informações sobre a viabilidade das bactérias utilizando amplos campos de visão, a segunda permitiu observar detalhes da morfologia das bactérias e das interações entre estas e a superfície dos materiais.

Figura 24 – Imagem das placas de cultura utilizadas no ensaio de adesão bacteriana com as triplicatas dos materiais HA e HA-AgNPs (01-25) após 24 h de contato com *E. coli* (a) e *S. aureus* (b).

As imagens obtidas da superfície dos discos com o microscópio confocal de varredura a laser são mostradas na Figura 25. Os pontos verdes foram considerados bactérias viáveis, enquanto os pontos vermelhos e amarelos foram considerados bactérias mortas. Foram encontradas bactérias maiores e mais alongadas, típicas de bastonetes de *E. coli*, sendo o maior número de bactérias viáveis identificados para a amostra de HA (Figura 25a). Para a HA-AgNP01 (Figura 25b) observou-se uma mistura de bactérias viáveis e mortas, enquanto nas demais amostras houve uma redução acentuada de bactérias viáveis.

O resultado para *S. aureus* é mostrado na Figura 26. Foi encontrado um número mais elevado de bactérias aderidas sobre a superfície da HA, com a presença de agrupamentos regulares de cocos característicos desse tipo de bactéria. Para a amostra HA-AgNP01 também houve um número reduzido e disperso de bactérias viáveis com presença de algumas mortas (Figura 26b). Nos campos analisados das demais amostras praticamente não foram encontradas bactérias viáveis e notam-se poucas bactérias mortas.

Figura 25 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser mostrando a *E. coli* sobre a HA (a), HA-AgNP01 (b), HA-AgNP05 (c), HA-AgNP10 (d) e HA-AgNP25 (e) após 24 h de adesão e coloração com Live/Dead.

Figura 26 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser mostrando a *S. aureus* sobre a HA (a), HA-AgNP01 (b), HA-AgNP05 (c), HA-AgNP10 (d) e HA-AgNP25 (e) após 24 h de adesão e coloração com Live/Dead.

Os resultados de MEV da adesão bacteriana são mostrados nas Figura 27 e Figura 28. Foram encontradas, em ambas as cepas, um maior número bactéria aderida sobre toda a superfície do disco de HA. Nas imagens de maior aumento com esse material, observou-se que a morfologia das bactérias não apresentou alterações morfológicas. Houve também o estabelecimento de ligações entre algumas bactérias que se encontravam próximas e entre bactérias e material. Para *E. coli* observou-se de maneira mais perceptível a ligação entre as bactérias e material (Figura 27b). Essa característica pode está envolvida na adesão inicial e formação de biofilme sobre a superfície dos materiais (O'GARA, 2007; OTTO, 2012; PODBIELSKA et al., 2010). A morfologia arredondada de *S. aureus* e maiores detalhes de um agrupamento de cocos sobre o material é evidenciado na Figura 28b. Nas amostras com menor quantidade de AgNPs (HA-AgNP01) as bactérias, quando encontradas, estavam isoladas (indicado pelas setas) sobre a superfície do material (Figura 27c e Figura 28c). Houve dificuldade para encontrar as bactérias sobre a amostra HA-AgNP05, sendo que para *S. aureus* não foi identificado qualquer bactéria na superfície (Figura 28d). Nas amostras HA-AgNP10 e 25 que possuem maior porcentagem de AgNPs não foi possível visualizar quaisquer bactérias e, por esse motivo, as imagens não foram apresentadas.

Os resultados obtidos indicam que a superfície dos materiais acima de 0,05 % m/m de AgNPs incorporado (HA-AgNP05, HA-AgNP10 e HA-AgNP25) não permite a adesão bacteriana durante as primeiras 24 h. Esse número reduzido de bactérias aderidas nas superfícies dos materiais já era esperado e concordam com os resultados anteriores que mostraram altas porcentagens de redução de bactérias já nas primeiras 4 h de contato. Assim, com mais tempo de contato com as suspensões bacterianas, esperava-se manter os altos níveis de redução bacteriana.

A amostra HA-AgNP01 embora apresente redução de bactérias aderidas para ambas as cepas, possui quantidade de AgNPs incorporada insuficiente para evitar a adesão bacteriana inicial como nas demais amostras. Tais resultados corroboram com os encontrados anteriormente da quantificação bacteriana por contagem em placa no qual revelou os índices mais baixos de redução da suspensão bacteriana para os discos da HA-AgNP01. Isso sugere que a eficácia da atividade antibacteriana é uma função dependente da quantidade de nanopartículas acrescentadas no material. Embora os materiais desenvolvidos apresentem boas propriedades antibacterianas que implica na diminuição de infecções bacterianas, a definição do melhor material (para aplicação envolvendo o tecido ósseo) deve passar por uma investigação da forma como osteoblastos interagem quando em contato com esses materiais.

Assim, na etapa posterior, todos os materiais foram avaliados, usando cultura de células na tentativa de selecionar a faixa de porcentagem de AgNPs ideal adsorvidos na HA.

Figura 27 – Imagens de MEV da adesão bacteriana após 24 h para a *E. coli* sobre os materiais HA (a)(b), HA-AgNP01 (c) e HA-AgNP05 (d).

Figura 28 – Imagens de MEV da adesão bacteriana após 24 h para a *S. aureus* sobre os materiais HA (a)(b), HA-AgNP01 (c) e HA-AgNP05 (d).

5.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS

5.5.1 *Análise da viabilidade celular*

A biocompatibilidade dos materiais foi analisada por exposição indireta, utilizando ensaios com a resazurina, técnica largamente utilizada na literatura para a medida de

viabilidade ou proliferação celular (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989; O'BRIEN, et al., 2000; SCHWEIKL; SCHMALZ, 1996).

O resumo do ensaio utilizando a resazurina e células osteoblásticas humanas de linhagem MG-63 é mostrado na Figura 29. A disposição dos resultados como a razão da intensidade de fluorescência por milímetros quadrados foi a mesma utilizada por Coelho et al. (2012). Após 4 dias com a cultura de células, observa-se que a resposta celular para as amostras contendo prata foi bem baixa e sem diferença significativa entre todas as amostras. Por outro lado, a hidroxiapatita livre de AgNPs e o controle demonstraram respostas celulares mais altas e com valores próximos. No sétimo e último dia da cultura celular o comportamento das amostras apresentou resultados bem diferentes. A amostra HA-AgNP25 teve um pequeno aumento de proliferação, mas ainda assim apresentou mais baixa resposta. As demais amostras contendo AgNPs e a HA mostraram respostas com valores intermediários e similares, com cerca de 4x maior resposta em relação a HA-AgNP01 e 4x menor em relação ao controle positivo.

A maior viabilidade celular do controle era esperada, já que existia na superfície desse poço uma maior facilidade de migração celular sobre uma área maior e sem os efeitos de bordas quando comparados aos materiais em discos. Além disso, as células aderidas sobre os discos foram submetidas a um maior estresse durante a movimentação da superfície desses substratos durante as trocas dos meios de cultura.

Podemos inferir que proporções entre 0,01-0,10 % m/m de Ag na HA equivalente a 0,024-0,075 mg de Ag reais, de acordo com as análises de ICP-AES Tabela 4, permitem a proliferação de osteoblastos, enquanto que em 0,25 % m/m de Ag (equivalente a 0,23 mg de Ag real) apenas uma quantidade mínima de células osteoblásticas proliferam. Os resultados encontrados contrastam com o estudo de Bai et al. (2012) que relataram não ser possível nenhum osteoblasto sobreviver em materiais de HA contendo quantidades superiores a 0,0021 mg de Ag. No entanto, a quantidade encontrada como citotóxica no presente trabalho (0,23 mg de Ag) é duas ordens de grandeza (ou 100x) maior que a quantidade máxima descrita.

A partir desse resultado, podemos inferir que as quantidades máximas e mínimas de toxicidade relacionadas a células osteoblásticas podem ser amplamente variáveis. Uma justificativa provável para esse fato envolve as diferentes velocidades em que os materiais podem liberar a prata para o meio. Assim, com as amostras produzidas no presente trabalho, a prata adsorvida não deve ser totalmente liberada para o meio circundante, o que explicaria a grande diminuição da citotoxicidade para os osteoblastos na concentração utilizada.

Figura 29 – Atividade metabólica da cultura de MG-63 sobre HA e HA-AgNPs ao longo de quatro e sete dias. Os resultados são expressos em intensidade de fluorescência por mm^2 e os valores representam a média $\pm$ desvio-padrão de seis culturas.

5.5.2 Análise da atividade enzimática e da adesão celular sobre a superfície do material

A distribuição dos osteoblastos sobre as superfícies dos materiais no dia 7 pode ser observada na Figura 31 e Figura 32. A morfologia dos osteoblastos variou drasticamente apenas para a amostra com a maior quantidade de AgNPs adicionada, (Figura 32c-d). Nas demais amostras houve uma alta densidade celular sem aparentemente seguir um padrão de orientação paralelo, mas com regiões de contato entre as células próximas. Sobre os discos observaram-se células distribuídas aleatoriamente pela superfície, com projeções celulares de discretos filopódios representando pontos de adesão focal, no qual as células apresentaram maior proximidade umas com as outras.

Segundo Junqueira e Carneiro (2008), a forma cuboide representa maior atividade dos osteoblastos, enquanto formas achatadas indicam baixa atividade. Na Figura 31d-f (materiais HA-AgNP01 e 05, respectivamente) foi possível notar osteoblastos com características mais cubóides quando comparado com a Figura 31b (HA), que se mostram com características

mais achatadas. Esses resultados concordam com a avaliação da atividade metabólica da Figura 29, que mostrou níveis maiores de atividade para a HA-AgNP05 quando comparada com o material HA controle (Figura 32).

A atividade funcional das células foi avaliada sobre as amostras HA-AgNPs e HA através da medida da atividade enzimática de ALP após 7 dias de cultura celular. Os resultados foram normalizados em relação ao conteúdo de proteínas totais e expressos em nmol/μg/min como mostra a Figura 30. Este resultado ilustra a influência das AgNPs inseridas na hidroxiapatita na atividade celular funcional e mostra que há uma tendência no aumento da expressão de ALP com a diminuição da porcentagem de AgNPs adicionada. Foi observada a formação de três grupos distintos: a amostra controle (HA), sem adição de AgNPs com a maior atividade de ALP; a amostra contendo a maior porcentagem de prata (HA-AgNP25) com diminuição mais acentuada da atividade; e as amostras com porcentagens menor (HA-AgNP01) e intermediárias (HA-AgNP05 e 10) que apresentaram atividade média similar, sem diferença significativa relevante. Estes resultados estão de acordo com resultados anteriores de proliferação celular também avaliado no dia 7 da cultura celular (Figura 29) no qual mostrou a separação das amostras em 3 grupos distintos. No entanto, com os resultados de ALP, a HA que antes tinha comportamento similar com as amostras intermediárias, agora se separa das demais inferindo que a atividade funcional das células nesse material é, de fato, maior em relação às demais amostras contendo AgNPs.

Outros autores apontam que a medida de ALP é também um indicador comum da expressão de fenótipos osteoblásticos (REN et al., 2002). Dessa forma, relacionando os valores de ALP com as duas análises posteriores *in vitro* usando cultura celular, os resultados encontrados podem significar que as linhagens MG-63 utilizadas apesar de proliferarem satisfatoriamente sobre quatro dos substratos produzidos (HA-AgNP01, 05, 10 e HA), podem ter desenvolvido mais osteoblastos maduros na amostra de HA. Segundo Hattar et al. (2002), a linhagem celular MG-63 utilizadas em estudos *in vitro* é composta também por células imaturas e por isso são úteis para conduzir estudos de eventos celulares que simulam o que ocorre *in vivo* quando um biomaterial é implantado. Assim, as primeiras células que de fato entram em contato com o material implantado podem passar de osteoprogenitoras para osteoblastos maduros indicando integração com o tecido ósseo (RATNER et al., 2004).

Cabe salientar que na condição *in vivo* diversos fatores podem influenciar a disponibilidade de Ag. A superfície dos materiais implantados pode ser influenciada pela formação de uma camada de proteína rica em apatita, que ocorre normalmente quando em contato com fluidos biológicos, podendo alterar a liberação e a disponibilidade de Ag

(SCHIERHOLZ et al., 1998). Além disso, a prata liberada pode ser adsorvida pela albumina e precipitada em cloreto de prata insolúvel, reduzindo ainda mais a forma livre de Ag com atividade biológica (NODA et al., 2009). Assim, estudos posteriores envolvendo a liberação da prata utilizando, de preferência, meios com proteínas e íons similares ao sangue humano, como sugerido pelo NCCLS (1999), poderão contribuir para a compreensão dos processos de interação de superfície e suas consequências.

Figura 30 – Atividade enzimática da fosfatase alcalina após 7 dias de cultura de células MG-63 utilizando os materiais em disco de HA e HA-AgNPs. Os resultados são expressos em nmol de p-nitrofenol por μg de proteína total por minuto e os valores representam a média $\pm$ desvio-padrão de três culturas.

Figura 31 – Imagens de MEV da adesão dos osteoblastos após 7 dias de cultura. HA (a)(b), HA-AgNP01 (c)(d), HA-AgNP05 (e)(f) com diferentes magnificações.

Figura 32 – Imagens de MEV da adesão dos osteoblastos sobre os discos dos materiais após 7 dias de cultura celular. São mostrados os materiais HA-AgNP10 (a)(b) e HA-AgNP25 (c)(d) com diferentes magnificações.

6 CONCLUSÃO

A hidroxiapatita foi obtida por precipitação química e sua estrutura cristalina foi identificada por DRX. Suas partículas foram identificadas com tamanhos nanométricos (100-150 nm de largura e 40-50 nm de espessura) através de MEV e MET.

As nanopartículas de prata foram obtidas em suspensões coloidais e por meio das caracterizações foi possível classificar as nanopartículas em estáveis e esféricas, com diâmetros entre 5 – 10 nm.

O pó de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata foi obtido por imersão do pó. As Técnicas de MEV, EDS e ICP-AES confirmaram a presença de Ag nas HA-AgNPs e demonstraram que não há alterações relevantes na estrutura, morfologia e características de superfície, tais como hidrofobicidade e carga líquida.

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* mostrou que os materiais produzidos na forma de pó são mais eficientes para ambas as cepas e com uma redução de 99,9% - atividade bactericida - das colônias bacterianas nas primeiras 4 h. Para os materiais em discos, a redução foi mais lenta ao longo do tempo, sendo alcançados 99,9 % apenas para a *E. coli* após 4 h. Para a amostra com menor concentração de prata (HA-AgNP01) foi obtido menor efeito antibacteriano na adesão de ambas as bactérias.

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* utilizando cultura de células revelou boa viabilidade, atividade metabólica e adesão para quase todos os materiais diante de células osteoblásticas. O efeito negativo sobre os osteoblastos foi apenas para o material HA-AgNP25 que possui maior quantidade de AgNPs (0,25 % m/m).

Considerando ambos os efeitos de citotoxicidade e antibacteriano, aliado a metodologia simples e de baixo custo envolvido na produção desses materiais, sugere-se que hidroxiapatitas contendo entre 0,05 – 0,10 % m/m das nanopartículas de prata sintetizadas pode ser a mais favorável para o desenvolvimento proposto visando futuras aplicações biomédicas.

TRABALHOS FUTUROS

- Estudar por quanto tempo os materiais desenvolvidos ainda apresenta efeitos antibacterianos usando protocolos sob condição estática e dinâmica.
- Estudo da liberação dos íons prata ao longo de tempo por meio de métodos químicos analíticos (ICP-AES) utilizando soluções que simulam o plasma sanguíneo como *Simulated Body Fluid* – SBF ou *Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth With Human Serum* – CAMHB/HS.
- Avaliar o efeito antimicrobiano dos materiais para outras bactérias de grande incidência em infecção de implantes como as *Staphylococcus epidermidis*, incluindo as hospitalares associadas à infecção óssea resistente e sensível à meticilina, respectivamente, MRSA (*Methicillin-Resistant S. Aureus*) e MSSA (*Methicillin-Susceptible S. Aureus*)
- Estudos *in vivo* usando os materiais desenvolvidos com as melhores condições (baixa citotoxicidade e alta atividade antibacteriana) em modelos de infecções com animais

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹⁰

- AKAZAWA, T.; KOBAYASHI, M. Surface characteristics of hydroxyapatites controlling albumin adsorption behaviour. **Journal of Materials Science Letters**, v. 15, n. 15, p. 1319-1320, 1996.
- ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- AL-NASIRY, S. et al. The use of alamar blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v. 22, n.5, p. 1304-1309, 2007.
- AN, Y. H.; FRIEDMAN, R.J. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. **Journal of Microbiological Methods**, v. 30, n.2, p. 141-152, 1997.
- ASADA, M. et al. Hydroxyapatite crystal growth on calcium hydroxyapatite ceramics. **Journal of Materials Science**, v. 23, n. 9, p. 3202-3205, 1988.
- BAI, X. et al. Antibacterial effect and cytotoxicity of Ag-doped functionally graded hydroxyapatite coatings. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied biomaterials**, v. 100B, n. 2, p. 553-561, 2012.
- BAKER, C. et al. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.5, n. 2, p. 244-249, 2005.
- BARSOTTI, R. J.; O'CONNELL, M. S.; STELLACCI, F. Morphology control in self assembled monolayers written by dip pen nanolithography. **Langmuir**, v. 20, n. 12, p. 4795-4798, 2004.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n.4, p. 493-496, 1966.
- BERA, T.; RAMACHANDRARAO, P. Morphological changes in biomimetically synthesized hydroxyapatite and silver nanoparticles for medical applications. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 9, p. 2264-2270, 2009.
- BERGER T. J. et al. Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 9, n. 2, p. 357-358, 1976.
- BERNI-NETO, E. A. **Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas**. 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- BEST, S. M. et al. Bioceramics: Past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 28, n. 7, p. 1319-1327, 2008.

¹⁰ Elaborada de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

BILLIAU, A. et al. In Vitro cultivation of human tumor tissues. **Oncology**, v. 31, n.5-6, p. 257-272, 1975.

BIOFX LABORATORIES . Thomas M. Charcoal Woerner. **Stabilization of phenyl phosphates**. US Patent 7001717, 5 Dec. 2003, 21 Feb. 2006.

BIRRELL, F.; JOHNELL, O.; SILMAN, A. Projecting the need for hip replacement over the next three decades: influence of changing demography and threshold for surgery. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 58, n. 9, p. 569-572, 1999.

BLACK, J. **Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility**. 3 ed. United States of America: CRC Press, 1999. 463 p. ISBN 0824771060.

BOCKMAN, R. S. et al. Gallium increases bone calcium and crystallite perfection of hydroxyapatite. **Calcified Tissue International**, v. 39, n. 6, p. 376-381, 1986.

BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **Injury**, v. 31, p. 37-47, 2000.

BORGES, V. S. **Desempenho muscular e funcional em idosos após artroplastia total de quadril**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

BRAJENDRA, S. et al. In vitro biocompatibility and antimicrobial activity of wet chemically prepared hydroxyapatites. **Materials Science & Engineering: C**, v. 31, n. 7, p. 1320-1329, 2011.

BROWN, W. E.; MATHEW, M.; TUNG, M. S. Crystal chemistry of octacalcium phosphate. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**. v. 4, p. 59-87, 1981.

BUCKLEY, J. J. et al. Hydroxyapatite supported antibacterial Ag₃PO₄ nanoparticle. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 8056-8063, 2010.

CAMBIER, F. Ceramics, the biomaterials the search for implants. **Euroceram**, 4^o avenida Gouverneur Cornez 7000 Mons, Belgique, 2000.

CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. **Biomaterials**, v. 27, n.11, p. 2331-2339, 2006.

CAMPOCCIA, D., et al. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. **Biomaterials**, v. 31, n. 25, p. 6363-6377, 2010.

CAPEK, I. Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 110, n. 1-2, p. 49-74, 2004.

CASSOLI, L. D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru**. 2005. 46 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CERCA, N. et al. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Research in Microbiology**, v. 156, n.4, p. 506-514, 2005.

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

_____. Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process. **Journal of Biomedical Materials Research: Part A**, v. 82, n. 4, p. 899-906, 2007.

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

CHEVALIER, J.; GREMILLARD, L. Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, n. 7, p. 1245-1255, 2009.

CHOI, J.W. et al. Effect of Ag-Doped hydroxyapatite as a bone filler for inflamed bone defects. **Key Engineering Materials**, v. 254-256, p. 47-50, 2004.

CHUNG et al. Anti-microbial hydroxyapatite particles synthesized by a sol-gel route. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 229-239, 2005.

CIOBANU, C. S. et al. Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100A degrees C. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, n.613, p. 1-8, 2011.

_____. Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 1, p. 324, 2012.

_____. Synthesis and antimicrobial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles. **BioMed Research International**, v. 2013, Article ID 916018, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents**; approved guideline. NCCLS document M26-A. Wayne, 1999.

_____. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**; approved standard. 8thed. NCCLS document M2-A8. Wayne, 2003.

COELHO, J. et al. Development and characterization of Ag₂O-Doped ZnLB glasses and biological assessment of Ag₂O–ZnLB–Hydroxyapatite composites. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 95, n. 9, p. 2732-2740, 2012.

COLEMAN, J. E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 21, p. 441-83, 1992.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n.5418, p. 1318-1322, 1999.

COVENTRY, M. B. Treatment of infections occurring in total hip surgery. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 6, n.4, p. 991-1003, 1975.

CRESPILHO, F. N. et al. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry: B**, v. 110, n. 35, p. 17478-17483, 2006.

DAL LAGO, V. et al. Size-selective silver nanoparticles: future of biomedical devices with enhanced bactericidal properties. **Journal of Materials Chemistry**, v.21, n.33, p.12267-12273, 2011.

DAVIES, J. E. The bone biomaterial interface. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 26, n. 10, p. 1395-1396, 1992.

DAVIS, N. et al. Intraoperative bacterial contamination in operations for joint replacement. **Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 81, n.5, p.886–889, 1999.

DÍAZ, M. et al. Synthesis and antimicrobial activity of a silver-hydroxyapatite nanocomposite. **Journal of Nanomaterials**. v. 2009, n. 14, 2009.

DIAZ-VISURRAGA, J. et al. Semitransparent Chitosan-TiO(2) nanotubes composite film for food package applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, n. 6, p. 3503-3515, June 2010.

DIBROV, P. et al. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in vibrio cholerae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2668-2670, 2002.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DRAGIEVA, I. et al. Complex formation in solutions for chemical synthesis of nanoscaled particles prepared by borohydride reduction process. **Nanostructured Materials**, v. 12, n. 1–4, p. 267-270, 1999.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia**: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Antenna, 2006.

DURÁN, N. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, n. 2, p. 203-208, 2007.

_____. Potencial use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949-959, 2010.

EDWARDS, P. P.; THOMAS, J. M. Gold in a metallic divided state-from faraday to present-day nanoscience. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 46, n. 29, p. 5480 – 5486, 2007.

ELGHANIAN, R. et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. **Science**, v.277, n.5329, p.1078-1081, 1997.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment Risk**. Washington, DC, EPA/600/FR-91/001, 1991.

FENG, Q. L. et al. Antibacterial effects of Ag-HAp thin films on alumina substrates. **Thin Solid Films**, v. 335, n. 1-2, p. 214-219, Dec. 14 1998.

FERRAZ, M. P.; MONTEIRO, F. J.; MANUEL, C. M. Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. **Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics**, v. 2, n. 2, p. 74-80, 2004.

FITZGERALD JUNIOR, R.H. et al. Deep wound sepsis following total hip arthroplasty. **Journal of Bone & Joint Surgery**, v.59, n.7, p.847-855, 1977.

FOXNEWS. **Man claims skin treatment turned face permanent blue**. Disponível em: <<http://www.foxnews.com/story/0,2933,317564,00.html>>. Acesso em: 10 Jun. 2012.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique and specialized suplications. 6th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010.

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of calcium deficient hidroxyapatite at near-physiological temperature. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, v. 3, n. 4, p. 299-305, 1992.

FUNG, M. C.; BOWEN, D. L. Silver products for medical indications: risk-benefit assessment. **Clinical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 119-126, 1996.

FURLONG, D. N. et al. Colloidal platinum sols - preparation, characterization and stability towards salt. **Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions**, v. 1, n. 80, p. 571-588, 1984.

FURR, J. R. et al. Antibacterial activity of actisorb-plus, actisorb and silver-nitrate. **Journal of Hospital Infection**, v. 27, n. 3, p. 201-208, July 1994.

GAINE, W.J. et al. Wound infection in hip and knee arthroplasty. **Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 82, n. 4, p.561-565, 2000.

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, 1993.

GHAFAARI NAZARI, A. et al. Ion exchange behaviour of silver-doped apatite microand nanoparticles as antibacterial biomaterial . **Micro and Nanoletters**, v. 6, n. 8, p. 713-717, 2011.

GIBBS, R. J. **Silver colloids**: do they work? Disponível em:<www.silver-colloids.com>. Acesso em: 20 June 2012.

GINÉ, M. F. **Espectrometria de emissão atômica**. Piracicaba: CPG-CENA-USP, 1998. v.1. (Série Didática III).

GOLDSTEIN, J. et al. **Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis**. 3 ed. Springer, 2003. 690 p. ISBN 978-1-4615-0215-9.

GOLUBOVICH, V. N.; RABOTNOVA, I. L. Kinetics of growth inhibition by silver ions. **Microbiology**, v. 43, p. 948-950, 1974.

GRENHO, L. et al. Adhesion of staphylococcus aureus, staphylococcus epidermidis, and pseudomonas aeruginosa onto nanohydroxyapatite as a bone regeneration material. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100A, n. 7, p. 1823-1830, 2012.

GROSS, K. A.; BERNDT, C. C.; IACONO, V. J. Variability of hydroxyapatite-coated dental implants. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 13, n. 5, p. 601-610, Sept./Oct. 1998.

GUGGENBICHLER, J. P. et al. A New technology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity in central venous catheters. **Infection**, v. 27, p. 16-23, 1999.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, n. 2, p. 203-210, 1989.

HATTAR, S. et al. Behaviour of moderately differentiated osteoblast-like cells cultured in contact with bioactive glasses. **European Cells & Materials**, v. 4, p. 61-69, Dec. 2002.

HEATH, J. R.; KNOBLER, C. M.; LEFF, D. V. Pressure/temperature phase diagrams and superlattices of organically functionalized metal nanocrystal monolayers: the influence of particle size, size distribution, and surface passivant. **Journal of Physical Chemistry: B**, v. 101, n. 2, p. 189-197, 1997.

HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.

_____. Bioceramics. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 81, n. 7, p. 1705-1728, 1998.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction to bioceramics**. Singapore: Word Scientific, 1993. p.1-15.

HENGLEIN, A. Physicochemical properties of small metal particles in solution: "microelectrode" reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition. **Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 21, p 5457-5471, 1993.

HIDALGO, E.; DOMÍNGUEZ, C. Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts. **Toxicology Letters**, v.98, n.3, p. 169-179, 1998.

HILL, C. et al. Prophylactic cefazolin versus placebo in total hip replacement. Report of a multicentre double-blind randomised trial. **The Lancet**, v. 317, n.8224, p.795-796, 1981.

HILLERTON, E. Contagem bacteriana no leite: importância para a indústria e medidas de controle. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2, 2010, Curitiba. **Anais...** Curitiba: [s.n.], 2000. p.26-31

HSU, J. C. **Multiple comparisons: theory and methods**. Ohio: Chapman & Hall, 1996.

HUANG, H.; YUAN, Q.; YANG, X. Morphology study of gold-chitosan nanocomposites. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 282, n. 1, p. 26-31, 2005.

ICHIKAWA, Y. et al. Hybridization of silver nanoparticles on hydroxyapatite in an aqueous solution. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 117, n. 1363, p. 294-298, 2009.

INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM. **Reference dose for chronic oral exposure of silver**. Washington: Chemical Screening and Risk Assessment Division. Disponível em: < <http://www.epa.gov/iris/subst/0099.htm>>. Acesso em: 1 Jun. 2013.

JADALANNAGARI, S. et al. Antimicrobial activity of hemocompatible silver doped hydroxyapatite nanoparticles synthesized by modified sol-gel technique. **Applied Nanoscience**, p. 1-9, 2013.

JEANJEAN, J.; VINCENT, U.; FEDOROFF, M. Structural modification of calcium hydroxyapatite induced by sorption of cadmium ions. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 68-72, 1994.

JELINEK, M. et al. Antibacterial properties of Ag-doped hydroxyapatite layers prepared by PLD method. **Applied Physics: A-materials science & processing**, v. 101, n. 4, p. 615-620, Dec. 2010.

JIN, Y. et al. The Use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v.159, n.3, p. 353-360, 2005.

JONES, D.S. et al. Characterization of the physicochemical, antimicrobial, and drug release properties of thermoresponsive hydrogel copolymers designed for medical device applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 85, n. 2, p. 417-426, 2008.

JUNG, W. K. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in staphylococcus aureus and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 2171-2178, Apr. 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAMAT, P. V. Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 32, p. 7729-7744, 2002.

KARLOV, A. V.; SHAKHOV, V. P.; KOLOBOV, J. R. Definition of silver concentration in calcium phosphate coatings on titanium implants ensuring balancing of bactericidity and cytotoxicity. **Bioceramics**, v. 192-1, p. 207-209, 2000.

KATAKAM, S.; KRISHNA, D. S. R.; KUMAR, T.S.S. Microwave processing of functionally graded bioactive materials. **Materials Letters**, v.57, n.18, p.2716–2721, 2003.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y.F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European Cells and Materials**, v. 8, p. 37-57, 2004.

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

KEY, F. S.; MAASS, G. **Ions, atoms and charged particles**. Disponível em: <www.silvercolloids.com>. Acesso em: 20 Jun. 2012.

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, 1998.

KIM, D.; JEONG, S.; MOON, J. Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection. **Nanotechnology**, v. 17, n. 16, p. 4019, 2006.

KLASEN, H. J. A Historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. **Burns**, v. 26, n. 2, p. 131-138, 2000.

KRESTOU, A.; XENIDIS, A.; PANIAS, D. Mechanism of aqueous uranium(VI) uptake by hydroxyapatite. **Minerals Engineering**, v. 17, n. 3, p. 373-381, Mar. 2004.

KUBOTA, N. et al. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Research**, v. 324, n. 4, p. 268-274, 2000.

LANDI, E. et al. Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 20, n. 14-15, p. 2377-2387, Dec. 2000.

LARA H. H. et al. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 30, 2011.

LARANJEIRA, M. S.; FERNANDES, M. H.; MONTEIRO, F. J. Innovative macroporous granules of nanostructured-hydroxyapatite agglomerates: bioactivity and osteoblast-like cell behaviour. **Journal of Biomedical Materials Research: Part A**, v.95, n.3, p. 891-900, 2010.

LARIKKA, M. **Diagnosis of orthopaedic prosthesis infections with radionuclide techniques clinical application of various imaging methods**. 2003. 67 f. Academic Dissertation - Faculty of Medicine, University of Oulu, Oulu University Hospital, 2004.

LE GEROS, R. Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine**. New York: Karger, 1991. (Monographs in Oral Science).

LE GEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 395, p. 81-98, 2002.

LEACH, W. J.; WILSON, N. I. Trends in infection prophylaxis in orthopaedics. **Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh**, v. 37, n. 4, p.265–266, 1992.

LEE, I. S. et al. Formation of silver incorporated calcium phosphate film for medical applications. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam interactions with materials and atoms**, v. 242, n. 1-2, p. 45-47, Jan. 2006.

LIU, D. M. Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, v. 8, n.4, p. 227-232, 1997.

LOPES, M. A. et al. Hydrophobicity, surface tension and zeta potential measurements of glass reinforced hydroxyapatite composites. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 45, n.4, p. 370-375, 1999.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p 265-276, 1951.

MA, Q. Y. et al. In Situ lead immobilization by apatite. **Environmental Science & Technology**, v. 27, n. 9, p. 1803-1810, 1993.

MACK, D. et al. Biofilm formation in medical device-related infection. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 29, n. 4, p. 343–359, 2006.

MALIK, M. et al. Comfort assessment of personal protection systems during total joint arthroplasty using a novel multi-dimensional evaluation tool. **Annals the Royal College of Surgeons of English**, v.88, n.5, p.465-469, Sept. 2006.

MALLIN, M. P.; MURPHY, C. J. Solution-phase synthesis of sub-10 nm au-ag alloynanoparticles. **Nano Letters**, v. 2, n. 11, p. 1235-1237, 2002.

MANNA, S.; BATAYAL, S.K.; NANDI, A.K. Preparation and characterization of silver – poly (vinylidene fluoride) nanocomposites. **The Journal of Physical Chemistry: B**, v. 110, n. 25, p.12318-12326, 2006.

MARQUES, P. R. B. O. et al. Double-tagging polymerase chain reaction with a thiolated primer and electrochemical genosensing based on gold nanocomposite sensor for food safety. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 1332-1339, 2009.

MARSICH, E. et al. Nano-composite scaffolds for bone tissue engineering containing silver nanoparticles: preparation, characterization and biological properties. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, v. 24, n. 7, p. 1799-1807, 2013.

MARTIN, J.M., Zenilman J.M. and Lazarus G.S. Molecular microbiology: new dimensions for cutaneous biology and wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 1, p. 38-48, 2009.

MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como absorvedor de metais** 1999. 105p. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

MBHELE, Z. H. et al. Fabrication and characterization of silver-polyvinyl alcohol nanocomposites. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 26, p. 5019-5024, 2003.

MERGA, G. et al. Redox catalysis on “naked” silver nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 33, p. 12220-12226, 2007.

MIRANDA, M. et al. Silver-hydroxyapatite nanocomposites as bactericidal and fungicidal materials. **International Journal of Materials Research** v. 1, p. 122-127, 2010.

MONTEIRO, D.R. et al. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **International journal of antimicrobial agents**, v. 34, n. 2, p. 103-110, 2009.

MORAN, C. G.; HORTON, T.C. Total knee replacement: the joint of the decade: a successful operation, for which there's a large unmet need. **BMJ**, v.320, n.7238, p-820, 2000.

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

MORONES-RAMIREZ, J. R. et al. Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 190, p.190-281, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MULVANEY, P.; LINNERT, T.; HENGLEIN, A. Surface chemistry of colloidal silver in aqueous solution: observations on chemisorption and reactivity. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 95, n. 20, p. 7843-7846, 1991.

NAKAYAMA, G.R. et al. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v.204, n. 2, 205-8, 1997.

NATH, S.; KALMODIA, S.; BASU, B. Densification, phase stability and in vitro biocompatibility property of hydroxyapatite-10 wt% silver composites. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, v. 21, n. 4, p. 1273-1287, 2010.

NATION, J.L. A New method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. **Stain Technology**, v. 58, n. 6, p. 347-351, 1983.

NAZARI, A. G. et al. Ion exchange behaviour of silver-doped apatite micro- and nanoparticles as antibacterial biomaterial. **Micro & Nano Letters**, v.6, n.8, p.713-717, 2011.

NODA, I. et al. Development of novel thermal sprayed antibacterial coating and evaluation of release properties of silver ions. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied biomaterials**, v. 89B, n. 2, p. 456-465, 2009.

NOGUEZ, C. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 10, p. 3806-3819, 2007.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

O'GARA, J. P. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, n. 2, p. 179-188, 2007.

OH, K. S.; PARK, S. H.; JEONG, Y. K. Antimicrobial effects of ag doped hydroxyapatite synthesized from co-precipitation route. **Key Engineering Materials**, v. 264-268, n.2004, p.2111-2114, 2004.

OH, K. S. et al. Cytotoxicity and antimicrobial effect of Ag doped hydroxyapatite. **Key Engineering Materials**, v.264-268, p.2107-2110, May 2004.

OHTSUKI, C. et al. Sensing of protein adsorption with a porous bulk composite comprising silver nanoparticles deposited on hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, v. 21, n. 4, p. 1225-1232, 2010.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v.64, p.175-188, Aug. 2013.

PAAVOLAINEN, P. et al. Registration of arthroplasties in Finland. A Nationwide prospective project. **Acta Orthopaedica Scandinavica: supplementum**, v.241, p. 27-30, 1991.

PANACEK, A. et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The Journal of Physical Chemistry: B**, v.110, n.33, p.16248-53, 2006.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials - An introduction**. 3 ed. New York: Springer, 2007. 564 p. ISBN 978-0-387-37880-0.

PARK, S.S. et al. Effects of Ag-doping on microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite films. **Key Engineering Materials**, v. 277-279, n. 2005, p. 113-118, 2005.

PATAKFALVI, R.; VIRÁNYI, Z.; DÉKÁNY, I. Kinetics of silver nanoparticle growth in aqueous polymer solutions. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, n. 3, p. 299-305, 2004.

PAUTKE, C. et al. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. **Anticancer Research**, v. 24, n.6, p. 3743-3748, 2004.

PEDAHZUR R.; SHUVAL H.I.; ULITZUR, S. Silver and hydrogen peroxide as potential drinking water disinfectants: their bactericidal effects and possible modes of action. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 11-12, p. 87-93, 1997.

PEERSMAN, G. et al. Infection in total knee replacement: a retrospective review of 6489 total knee replacements. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.392, p.15–23, 2001.

PERROT, S. et al. Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. **Toxicological Sciences**, v. 72, n.1, p.122-129, 2003.

PODBIELSKA, A. et al. Slime production by staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis strains isolated from patients with diabetic foot ulcers. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 58, n. 4, p. 321-324, 2010.

PROMEGA CORPORATION. **CellTiterBlue Cell Viability Assay Protocol**. Disponível em: <<http://www.promega.com/tbs>>. Acesso em: 1 Jul. 2013.

PULEO, D. A.; NANCI, A. Understanding and controlling the bone–implant interface. **Biomaterials**, v. 20, n. 23–24, p. 2311-2321, 1999.

POELSTRA, K. A. et al. A Novel spinal implant infection model in rabbits. **Spine**, v. 25, n. 4, 2000.

PUOLAKKA, T.J. et al. The Finnish arthroplasty register: report of the hip register. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 72, n.5, p.433–441, 2001.

PURE HEALTH SYSTEMS. Disponível em: <<http://www.purehealthsystems.com/colloidal-silver.html>>. Acesso em: 30 Jul. 2012.

RADETIC, M. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles deposited on coronatreated polyester and polyamide fabrics. **Polymers for Advanced Technologies**, v.19, n.12, p. 1816–1821, 2008.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 76–83, 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, 2007.

RANG M. **The story of orthopaedics**. Philadelphia: Saunders, 2000.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science - Introduction to Materials in Medicine**. 2nd ed. London: Elsevier, 2004. 913 p. ISBN 978-0-12-582463-7

RAVEENDRAN, P.; FU, J.; WALLEN, S. L. Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 46, p. 13940–41, 2003.

REICHERT, J.; BINNER, J. G. P. An Evaluation of hydroxyapatite-based filters for removal of heavy metal ions from aqueous solutions. **Journal of Materials Science**, v. 31, n.5, p. 1231-41, 1996.

REIS, P. C. **Estudo da remoção e fixação de mercúrio usando hidroxiapatitas modificadas como adsorventes específicos**. 2008. 138 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro , 2008.

REN, L. et al. Novel approach to fabricate porous gelatin–siloxane hybrids for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 23, n. 24, p. 4765-4773, 2002.

RIGO, E.C.S. et al. Hidroxiapatita/prata: avaliação do efeito bactericida. In: VI LATIN AMERICAN CONGRESSO OF ARTIFICIAL ORGANS AND BIOMATERIALS, 2010, Gramado. **Anais...** Gramado: FAURGS, 2010.

RUSSELL, S. W. et al. Chemical and structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite thin films under rapid thermal processing. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 79, n. 4, p. 837-842, 1996.

RYAN, J. A. **Introduction to animal cell culture**: technical bulletin. Chelmsford: Corning Incorporated Life Sciences, 2008.

SADOWSKI, Z. et al. Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms. **Materials Science Poland**, v. 26, n. 2, p. 421-424, 2008.

SANPO, N. et al. Antibacterial property of cold-sprayed HA-Ag/PEEK coating. **Journal of Thermal Spray Technology**, v. 18, n. 1, p. 10-15, 2009.

SCHIERHOLZ, J. M. et al. Efficacy of silver-coated medical devices. **Journal of Hospital Infection**, v. 40, n. 4, p. 257-262, 1998.

SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. **European Journal of Oral Sciences**, v. 104, n. 3, p. 292-299, 1996.

SEJAS, L. M. et al. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.1, p.27-35, 2003.

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, 2010.

SHIOJIRI, M. Imaging of high-angle annular dark field scanning transmission electron microscopy and microscopy studies of GaN-based light emitting diodes and laser diodes. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 35, n. 3, p. 495-452, 2008.

SHIRKHZANZADEH, M.; AZADEGAN, M.; LIU, G. Q. Bioactive delivery systems for the slow-release of antibiotics - incorporation of Ag⁺ ions into micro-porous hydroxyapatite coatings. **Materials Letters**, v. 24, n. 1-3, p. 7-12, June 1995.

SIMON, V.; ALBON, C.; SIMON, S. Silver release from hydroxyapatite self-assembling calcium-phosphate glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 354, n. 15-16, p. 1751-1755, Mar. 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN T. A. **Principios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.

SPANGEHL, M. J. et al. Diagnosis of infection following total hip arthroplasty. **Instructional course lectures**, v. 47, p. 285-295, 1998.

STANIC, V. et al. Synthesis of antimicrobial monophase silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 20, p. 6083-6089, 2010.

STEFÁNSSON, A.; GUNNARSSON, I.; GIROUD, N. New methods for the direct determination of dissolved inorganic, organic and total carbon in natural waters by reagent-free ion chromatography and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 582, n. 1, p. 69-74, 2007.

STEHR, J. et al. Gold nanostoves for microsecond DNA melting analysis. **Nano Letters**, v. 8, n. 2, p. 619-623, 2008.

SUN, R. W. Y. et al. Silver nanoparticles fabricated in hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. **The Royal Society of Chemistry**, v. 40, p. 5059-5061, 2005.

SUZUKI, T. et al. Time-dependent variation of the surface-structure of bioceramics in tissue-culture medium and the effect on adhesiveness of cells. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 226-232, 1996.

TAKEUCHI, Y.; SUZUKI, T.; ARAI, H. A Study of equilibrium and mass-transfer in processes for removal of heavy-metal ions by hydroxyapatite. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 21, n. 1, p. 98-100, Feb. 1988.

TIRRELL, M.; KOKKOLI, E.; BIESALSKI, M.; The Role of surface science in bioengineered materials. **Surface Science**, v.500, n.1-3, p. 61–83, 2002.

TURKEVICH, J.; KIM, G. Palladium: preparation and catalytic properties of particles of uniform size. **Science**, v. 169, n. 3948, p. 873-879, 1970.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Faraday Discussions**, v. 11, p. 55-57, 1951.

US Environmental Protection Agency: **Reference dose for chronic oral exposure of silver**. Washington, DC, Chemical Screening and Risk Assessment Division. CASRN 7440-22-4, 1991.

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

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

VERRET, D.J. et al. Hydroxyapatite cement in craniofacial reconstruction. **Otolaryngology: head and neck surgery**, v. 133, n. 6, p. 897-899, 2005.

WANG, J.Y. et al. Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro. **Biomaterials**, v.17, 23, p. 2233-2240, 1996.

WATAHA, J.C.; LOCKWOOD, P.E. Release of elements from dental casting alloys into cell-culture medium over 10 months. **Dental Materials**, v.14, n. 2 p. 158-163, 1998.

WEI, D., QIAN, W. Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 62, n.1, p. 136-142, 2008

WEI, D. et al. Synthesis, Properties, and Surface Enhanced Raman Scattering of Gold and Silver Nanoparticles in Chitosan Matrix. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 4, p. 2566-2573, 2009a.

_____. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 17, p. 2375-2382, 2009b.

WEINER, S.; WAGNER, H.D. The Material bone: structure–mechanical function relations. **Annual Review of Materials Research**, v. 28, p. 271-298, 1998.

WEIR, E. et al. The Use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization. **Analyst**, v. 133, n. 7, p. 835-845, 2008.

WEYLAND, M. Electron tomography of catalysts. **Topics in Catalysis**, v. 21, n. 4, p. 175-183, 2002.

WIDMER, A. F. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 2, p. 94–106, 2001.

WILLIAMS, R.L. et al. The Biocompatibility of silver. **Critical Reviews in Biocompatibility**, v. 5, p. 221-223, 1989.

WOOD, S. R. et al. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 1, p. 21-27, 2000.

XIU, Z. M. et al. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano Letters**, v. 12, n. 8, p. 4271-4275, 2012.

XU, Y.; SCHWARTZ, F. W.; TRAINA, S. J. Sorption of Zn²⁺ and Cd²⁺ on hydroxyapatite surfaces. **Environmental Science Technology**, v. 28, n. 8, p.1472-1480, 1994.

ZAURA-ARITE, E.; VAN MARLE, J.; TEN CATE J.M. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. **Journal of Dental Research**. v. 80, n. 5, p. 1436-40, 2001.

ZHANG, J. Z.; NOGUEZ, C. Plasmonic optical properties and applications of metal nanostructures. **Plasmonics**, v. 3, n. 4, p. 127-150, 2008.

ZHANG, L. et al. Ambient light reduction strategy to synthesize silver nanoparticles and silver-coated TiO_2 with enhanced photocatalytic and bactericidal activities. **Langmuir**, v. 19, n. 24, p. 9972-10380, 2003.

ZHANG, W.; QIAO, X.; CHEN, J. Synthesis of nanosilver colloidal particles in water/oil microemulsion. **Colloids and Surface A: physicochemistry and engineering aspects**, v. 299, n. 1-3, p. 22-28, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Padrão de difração da Hidroxiapatita (PDF 09-0432)

Pattern : 84-1998		Radiation = 1.540600		Quality : Calculated									
Ca ₅ (P O ₄) ₃ (O H)													
Hydroxylapatite / Calcium Phosphate Hydroxide													

APÊNDICES

APÊNDICE A – Conversão da intensidade de fluorescência durante o teste da resazurina

A intensidade de fluorescência emitida do controle (I_c) e dos materiais (I_m) foi dividida pela área total disponível para a adesão dos osteoblastos A_1 e A_2 , respectivamente. O poço da placa de poliestireno foi medido e apresentou 15 mm de diâmetro enquanto os discos dos materiais apresentavam 8 mm de diâmetro.

A área de cada superfície circular é dado por $A = \pi.R^2$, onde $R = D/2$ e D é o diâmetro. Assim, substituindo os valores dos diâmetros, tem-se que:

$$I'_c = \frac{I_c}{\pi.\left(\frac{15}{2}\right)^2} \quad \text{e} \quad I'_m = \frac{I_m}{\pi.\left(\frac{8}{2}\right)^2} ,$$

onde I'_c e I'_m são as intensidades de fluorescência corrigidas para o controle e os materiais, respectivamente.