

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA**

**FABIANA MARIA ROSSATTO**

**SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA COM A ADIÇÃO DE ÍONS  $\text{Ag}^+$  PELO MÉTODO  
DE PRECIPITAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE  
ANTIMICROBIANA**

Pato Branco – PR  
2018

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA**

**FABIANA MARIA ROSSATTO**

**SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA COM A ADIÇÃO DE ÍONS  $\text{Ag}^+$  PELO MÉTODO  
DE PRECIPITAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE  
ANTIMICROBIANA**

Pato Branco – PR  
2018

**FABIANA MARIA ROSSATTO**

**SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA COM A ADIÇÃO DE ÍONS  $\text{Ag}^+$  PELO MÉTODO DE PRECIPITAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA**

Projeto de trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.  
Orientadora: Prof. Dra. Liliam Cristina Angelo.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

O trabalho de diplomação intitulado Síntese de Hidroxiapatita com a adição de íons Ag+ pelo método da precipitação: caracterização e avaliação da capacidade antimicrobiana foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 6.1.2018-B de 2018.

Fizeram parte da banca os professores.

Liliam Cristina Angelo

Henrique Emilio Zorel Junior

Péricles Inácio Khalaf

Dedico este trabalho aos meus pais Helio Walter Rossato e Catarina Juchnievski Rossato que não mediram esforços para estarem ao meu lado em todos os momentos e me acompanharem no curso, mesmo distantes, e por me incentivarem a buscar meus sonhos e nunca desistir. Dedico também à minha irmã Fernanda Catarina Rossatto e ao meu irmão Fábio Alex Rossato, que se fizeram presentes em muitos desses momentos.

Dedico também à todos os meus familiares que de alguma forma colaboraram comigo no decorrer do curso e me incentivaram na conclusão do mesmo.

E à minha orientadora Dra. Liliam Cristina Angelo, coorientadora Dra. Vidiany Aparecida Queiroz Santos e mestranda Gabrielle Cristina Calegari por todo o ensinamento que me passaram e pelo suporte no decorrer desse trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, de todo meu coração, ao meu pai Helio Walter Rossato que me deu forças para continuar com suas palavras sinceras e conselhos amorosos, sempre fazendo todo o possível para que eu concluísse o curso de graduação. À minha mãe, Catarina Juchnievski Rossato pelo amparo e palavras de conforto, sempre prezando pelo meu melhor.

Em especial, agradeço minha irmã gêmea Fernanda Catarina Rossatto, que foi meu alicerce durante toda a graduação, me ouvindo, me auxiliando de todas as formas possíveis e comemorando comigo cada momento e cada conquista.

Agradeço também aos meus amigos que estiveram comigo durante todo o curso, que me acompanharam em trabalhos, estágios, em momentos de dificuldade e sucesso. Em especial, agradeço ao amigo André Vinícius Desconsi e à Marcella Mano Mateus, que me auxiliaram na conclusão desse trabalho, sendo verdadeiros alicerces.

À responsável técnica, Dra. Edenes Schroll Loss, que me fez crescer pessoal e profissionalmente durante todo o tempo que estive trabalhando no laboratório. Obrigada por todo o acompanhamento e ensinamentos, por toda a ajuda oferecida e por ser esse exemplo de pessoa e profissional.

À todo corpo docente que contribuiu de alguma forma para minha formação acadêmica. Em especial, às minhas excelentes orientadora Dra. Liliam Cristina Angelo, coorientadora Dra. Vidianny Aparecida Queiroz Santos e à mestranda Gabrielle Cristina Calegari que me auxiliaram de todas as formas possíveis no decorrer desse trabalho, me proporcionando todo o suporte necessário, não medindo esforços para me acompanhar no laboratório e análises, sempre com muita paciência e compreensão.

À Central de Análises da UTFPR-Pato Branco por todos os serviços prestados, disponibilidade de equipamentos e auxílio nas análises.

Enfim, agradeço a todos que se fizeram presentes de alguma forma e contribuíram com meu crescimento.

*“Nunca se esqueça de quem você é, porque é certo que o mundo não se lembrará.  
Faça disso sua força. Assim, não poderá ser nunca a sua fraqueza. Arme-se com  
esta lembrança, e ela nunca poderá ser usada para magoá-lo.”*

*George R. R. Martin.*

## RESUMO

ROSSATTO, Fabiana Maria. Síntese de hidroxiapatita com a adição de íons  $\text{Ag}^+$  pelo método de precipitação: caracterização e avaliação da capacidade antimicrobiana. 38 f. TCC (Curso de Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2018.

A hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  é definida como um biomaterial formado basicamente por fosfato de cálcio e compõe de 30% a 70% a massa de ossos e dentes. Por esse motivo, têm recebido uma atenção muito grande por parte da comunidade científica já que existe uma constante busca por substituintes ósseos, principalmente na área médica. Porém, todo e qualquer procedimento pode estar sujeito à infecções e comprometer o material implantado a curto e médio prazo e assim, buscam-se alternativas para diminuir ou até mesmo evitar essas possíveis infecções. Uma dessas alternativas é associar metais bactericidas ao biomaterial, e nesse contexto, a prata ganhou destaque como aliado no controle de infecções pós cirúrgicas. Esse trabalho descreve a síntese de hidroxiapatita dopada com nitrato de prata por precipitação química e via úmida e os resultados das técnicas de caracterização de Difração de Raios X (DRX) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os resultados do DRX indicaram a presença de prata metálica caracterizada pelos picos em  $2\theta = 38,2^\circ$  e  $44,4^\circ$  para a amostra HAAg  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e a fase majoritária de HA caracterizada pelos picos em  $2\theta = 25,9^\circ$ ;  $31,6^\circ$ ;  $32,9^\circ$  e  $33,9^\circ$ . Nos espectros de Infravermelho verificou-se a presença das bandas que caracterizam a fase da HA referente aos grupamentos  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{OH}^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ . Este último como sendo uma fase formada devido à síntese ser realizada em sistema aberto. Para avaliar o efeito antimicrobiano da prata foi realizado o teste de disco difusão para as cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*. A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, e não houve inibição para nenhuma concentração de prata. Para *Staphylococcus epidermidis*, que é uma bactéria Gram-positiva, e para a levedura *Candida albicans* houve inibição apenas na concentração de prata de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Palavras-chave:** Biomaterial, Hidroxiapatita, prata, antimicrobiano.

## ABSTRACT

ROSSATTO, Fabiana Maria. Synthesis of hydroxyapatite with the addition of Ag<sup>+</sup> ions by the precipitation method: characterization and evaluation of antimicrobial capacity. 38 f. TCC (Course of Chemistry), Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2018.

Hydroxyapatite, Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> is defined as a biomaterial made primarily of calcium phosphate and contains 30% of the mass of bone and teeth. For this reason, have received great attention from the scientific community since there is a constant search for bone substitutes, especially in the medical field. However, any procedure can be subject to infections and compromise the material implanted in the short and medium term and thus, alternatives are sought to reduce or even prevent these possible infections. One of these alternatives is to associate bactericidal metals with the biomaterial and in this context, silver has gained prominence as an ally in the control of post surgical infections. This work describes the synthesis of silver nitrate doped hydroxyapatite by chemical and wet precipitation and the results of X-ray Diffraction (XRD) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) techniques. The results of XRD indicated the presence of metallic silver characterized by peaks at 2θ= 38.2° and 44.4° for the HA<sub>Ag</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup> sample and the majority phase of HA characterized by peaks at 2θ = 25.9°; 31.6 °; 32.9 ° and 33.9 °. In the Infrared spectra the bands that characterize the phase of the HA related to PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, OH<sup>-</sup> and CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> groups were verified. The latter being a phase formed due to the synthesis being performed in the open system. To evaluate the antimicrobial effect of silver, the diffusion disc test was performed for *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans* strains. *Escherichia coli* is a gram-negative bacterium, and there was no inhibition at any concentration of silver. For *Staphylococcus epidermidis*, which is a Gram-positive bacterium, and for the yeast *Candida Albicans* there was inhibition only at the concentration of silver of 0.1 mol L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** Biomaterial, Hydroxyapatite, silver, antimicrobial.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura da hidroxiapatita. Fonte: Kay et.al., 1964.....	19
Figura 2: Difratoograma de raios X das apatitas sintetizadas.....	25
Figura 3: Difratoograma de raios X das amostras sintetizadas ampliado.....	26
Figura 4: Espectro de FTIR das amostras sintetizadas.....	29
Figura 5: Figura 5: Teste de disco difusão para <i>Escherichia coli</i> .....	30
Figura 6: Teste de disco difusão para <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	31
Figura 7: Teste de disco difusão para <i>Candida albicans</i> .....	31

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Tamanho médio de cristalito das amostras sintetizadas.....	25
--	----

## LISTA DE SIGLAS

DRX	Difratometria de Raios X
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
Ag <sup>+</sup>	Íon prata
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
CaOH <sub>2</sub>	Hidróxido de cálcio
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de prata
Ca	Cálcio
P	Fósforo
KBr	Brometo de potássio
UFC	Unidades formadoras de colônia
HA	Hidroxiapatita
HAAg	Hidroxiapatita contendo prata
2θ	Ângulo de Bragg
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Íon fosfato
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	Íon carbonato
OH <sup>-</sup>	Hidroxila

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
3.1 TECIDO ÓSSEO.....	16
3.2 BIOMATERIAIS.....	17
3.2.1 Biocerâmicas.....	17
3.2.2 Hidroxiapatita.....	18
3.3 COMPLICAÇÕES DOS MATERIAIS IMPLANTÁVEIS.....	19
3.3.1 Propriedades da prata.....	20
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 SÍNTESE DA AMOSTRA CONTROLE.....	21
4.1.1 Secagem.....	22
4.2 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA COM ADIÇÃO DE ÍONS PRATA.....	23
4.3 CARACTERIZAÇÃO.....	23
4.3.1 Difração de raios X (DRX).....	23
4.3.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	23
4.4 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE MICROBIANA.....	24
4.4.1 Teste de disco difusão em ágar.....	24
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>25</b>
5.1 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X.....	25
5.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	28
5.3 TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM ÁGAR.....	30
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A reparação e reconstrução de defeitos ósseos bem como preenchimentos dérmicos têm uma longa história. De início, os tratamentos cosméticos consistiam de pigmentos de fonte animal e vegetal e eram aplicados superficialmente. Já na metade do século XIX, com o advento da anestesia e melhora nos procedimentos cirúrgicos, os métodos estéticos e procedimentos em geral, se tornaram mais invasivos e a pesquisa nessa área teve uma grande ascensão devido à crescente demanda por tais procedimentos.

Um dos grandes desafios na área da ciência é criar materiais avançados para aplicações ortopédicas que sejam mais parecidos possíveis com o tecido ósseo natural, principalmente para não ocorrer rejeição por parte do organismo. Dentre os produtos utilizados para a substituição e regeneração da estrutura óssea, os biomateriais merecem destaque, especialmente a hidroxiapatita – HA ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), devido à similaridade química e estrutural com a fase mineral presente nos ossos e dentes (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para a obtenção do pó de HA, e a obtenção via precipitação química é o procedimento mais utilizado por ser simples e de baixo custo. A síntese por precipitação consiste na adição de grupos fosfatos a suspensões que contenham íons cálcio, e pode-se partir de diferentes reagentes (RIGO et al., 2007).

A hidroxiapatita, por apresentar características químicas e estruturais peculiares, é amplamente utilizada na área médica como material biocompatível em implantes, próteses e preenchimentos faciais com resultados duradouros, onde o produto permanece em torno de três anos no organismo sendo absorvido após esse período, e estimula a produção de colágeno na região que foi aplicado. É indicado principalmente quando há perda de volume facial, correção de sulcos da face, atenuação de rugas e preenchimento de olheiras (EANES, 1980).

Na ortopedia existe o interesse em usar a hidroxiapatita como revestimento de próteses metálicas para promover uma ligação interfacial estável entre o material implantado e o tecido vivo. No tratamento de tumores, esse biomaterial vem sendo usado como suporte de ação prolongada. A introdução de drogas anticancerígenas em blocos de hidroxiapatita porosa permite que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual da droga no organismo (FULMER; MARTIN; BROWN, 1992).

Conforme Bertucci et al., (2010), em qualquer procedimento estético ou cirúrgico, há a possibilidade de ocorrer infecções microbianas. Entretanto, entre as infecções associadas a dispositivos médicos implantáveis, a ocorrência de contaminações e infecções em próteses ortopédicas é considerada como de maior risco, pois acarreta em intervenções cirúrgicas repetidas, perda do implante e dependendo da severidade da infecção pode levar o paciente ao óbito (BERTUCCI et al., 2010).

Na tentativa de evitar essas infecções, pode-se injetar antibióticos controlados antes e após os procedimentos cirúrgicos, porém, algumas bactérias podem desenvolver certa resistência a esses antibióticos, diminuindo ou eliminando sua eficiência contra as inflamações.

Isto tem despertado o desenvolvimento de biomateriais com agentes antibacterianos, tais como a prata e zinco, que apresentam ampla atividade antimicrobiana e baixa incidência de resistência, frente à bactérias envolvidas nas infecções de implantes biomédicos (ANDO et al., 2009; BOSE; TARAFDER, 2012).

A ampla atividade antibacteriana da prata é conhecida há anos na literatura e muitos trabalhos têm se dedicado a explicar como isso de fato ocorre. O que se acredita é que os íons de prata liberados das nanopartículas durante sua interação com a membrana celular das bactérias podem atuar no fosfato das moléculas do DNA, inativando sua replicação. Outra teoria fundamenta-se na ideia da nanopartícula de prata, quando em contato com a membrana celular da bactéria, causar danos estruturais e, assim, a morte celular (SONDI, 2004; LOK et al., 2006).

As cepas bacterianas comumente envolvidas em infecções em implantes, e microrganismos frequentemente associados à produção de biofilmes, estão incluídos 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 às células humanas (BERGER et al., 1976; SONDI, 2004; WILLIAMS et al., 1989).

Devido à importância de utilizar um biomaterial eficaz para procedimentos estéticos e de recuperação óssea e que evite possíveis infecções microbianas, o presente trabalho propõe a realizar a síntese de hidroxiapatita pelo método de precipitação química, dopada com nitrato de prata, bem como analisar a ação antibacteriana do material frente à uma bactéria Gram-positiva, uma Gram-negativa e uma levedura.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Sintetizar e caracterizar a hidroxiapatita dopada com diferentes concentrações de nitrato de prata a fim de avaliar sua atividade antimicrobiana.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

O presente trabalho tem como objetivo sintetizar a hidroxiapatita por meio da precipitação química, dopar esse material com diferentes concentrações de nitrato de prata e caracterizá-lo avaliando as fases cristalinas por meio da técnica de difração de raios X e grupamentos iônicos através do infravermelho. Além disso foi avaliada a atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em ágar.

## **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **3.1 TECIDO ÓSSEO**

O tecido ósseo é constituído por uma fase mineral, formada essencialmente por cristais de fosfato de cálcio, sob a forma de HA, que assenta numa organizada matriz colagênica (fase orgânica). A combinação da fase mineral e da fase orgânica confere ao tecido ósseo propriedades biomecânicas únicas. As fibras de colágeno conferem certa elasticidade ao tecido, bem como capacidade de resistência. Os cristais de hidroxiapatita proporcionam elevada dureza e resistência à compressão (JUDAS et al., 2012).

O tecido ósseo funciona como suporte para os órgãos vitais, aloja e protege a medula óssea e proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis. Além dessas funções, os ossos funcionam como depósitos de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons no organismo humano (KATCHBURIAN, 1999; JUNQUEIRA, 2008; JUDAS et al., 2012).

Apesar de seu aspecto inerte, o tecido ósseo participa de um contínuo e dinâmico processo de remodelamento, para formar e manter suas propriedades mecânicas e capacidades metabólicas. Os ossos quando lesados têm capacidade regenerativa, onde o processo de reparação óssea é efetuado através da formação de osso novo. (JUNQUEIRA, 2008).

Dependendo do tipo e da extensão da lesão no tecido ósseo, a regeneração do mesmo fica comprometida, sendo necessária a utilização de substitutos, denominados de biomateriais. Estes biomateriais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos, de modo a estimular uma resposta adequada. (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; KAWACHI et al., 2000).

### 3.2 BIOMATERIAIS

Biomaterial é todo composto que ao entrar em contato com o sistema biológico humano, permite tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido e restituir uma determinada função do organismo (MARTINS et al., 2010).

Uma propriedade essencial relacionada à biomateriais é a biocompatibilidade, que pode ser definida como a habilidade de um material em desempenhar uma resposta apropriada em determinada aplicação com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas quando em contato com tecidos vivos ou fluidos. Além disso, o material deve ser biofuncional, ou seja, deve ser capaz de exercer a função que lhe é incumbida como se fosse próprio do organismo (RATNER et al., 2004; PARK, 2007).

Os biomateriais utilizados atualmente evoluíram muito e, como consequência, as áreas médicas-odontológicas têm à sua disposição inúmeros implantes, que variam na forma, tamanho, tipo de material e custo, tendo as biocerâmicas como principal representação (CAPEK, 2004).

Esta maior aceitação pelas biocerâmicas à base de sais de fosfato de cálcio, deve-se ao seu alto grau de biocompatibilidade, que está relacionada com a sua similaridade química à dos materiais normalmente encontrados no tecido ósseo (DAVIES, 1992).

#### 3.2.1 Biocerâmicas

A utilização de cerâmicas como biomateriais iniciou quando Dreesman, em 1894, relatou a utilização de gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ ) como um possível substituto para ossos. Porém, devido a sua baixa resistência mecânica e capacidade de ser completamente reabsorvido pelo organismo, seu uso tornou-se inviável para implantes ósseos (KAWACHI et al., 2000).

Biocerâmicas são cerâmicas específicas para uso em Medicina e Medicina Dentária, onde são utilizadas na substituição de tecidos ou no recobrimento de

metais, com a finalidade de aumentar sua biocompatibilidade. Na área da saúde, as biocerâmicas alumina, zircônia, hidroxiapatita, fosfato de cálcio, silicato de cálcio e cerâmicas de vidro são amplamente empregadas (KOCH et al., 2010).

Dentre as biocerâmicas, os fosfatos de cálcio apresentam-se como os principais materiais estudados e empregados como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como principais características: a semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados; excelente biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade; taxas de degradação variáveis; e osteocondutividade (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; VALLETI-REGÍ, 2010).

### 3.2.2 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita de estrutura apresentada na figura 1, é o constituinte mineral natural encontrado no osso representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes. A HA sintética possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, o que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses, por isso, o grande interesse em sua produção (EANES, 1980).

O uso da HA é muito difundido em aplicações ortodônticas e ortopédicas. Na área de biomateriais, a ampla aplicabilidade deste fosfato de cálcio está relacionada ao fato da sua composição química ser semelhante à fase mineral de ossos, dentes e alguns tecidos calcificados, pois é composta basicamente por cálcio e fósforo. Desta forma, este material tem a capacidade de induzir a formação do osso na região comprometida. Além do mais, pode favorecer a biocompatibilidade de próteses e implantes, atuando na interface implante-tecido (CAPANEMA, 2014).

O grupo fosfato, a hidroxila e o cálcio presentes na HA distribuem-se espacialmente segundo um arranjo em forma hexagonal como mostrado na figura 1. Uma das características interessantes dessa estrutura é que ela permite que os grupos hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) sejam retirados com relativa facilidade, gerando canais vazios entre os hexágonos, formados pelos íons de cálcio, por onde outros íons e moléculas podem ser conduzidos para dentro da estrutura do material cerâmico. A estrutura dos fosfatos cerâmicos permite que seus constituintes sejam substituídos facilmente por uma grande variedade de íons metálicos, como a prata ( $\text{Ag}^+$ ), ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) e flúor ( $\text{F}^-$ ) (MUNDSTOCK, 2004).

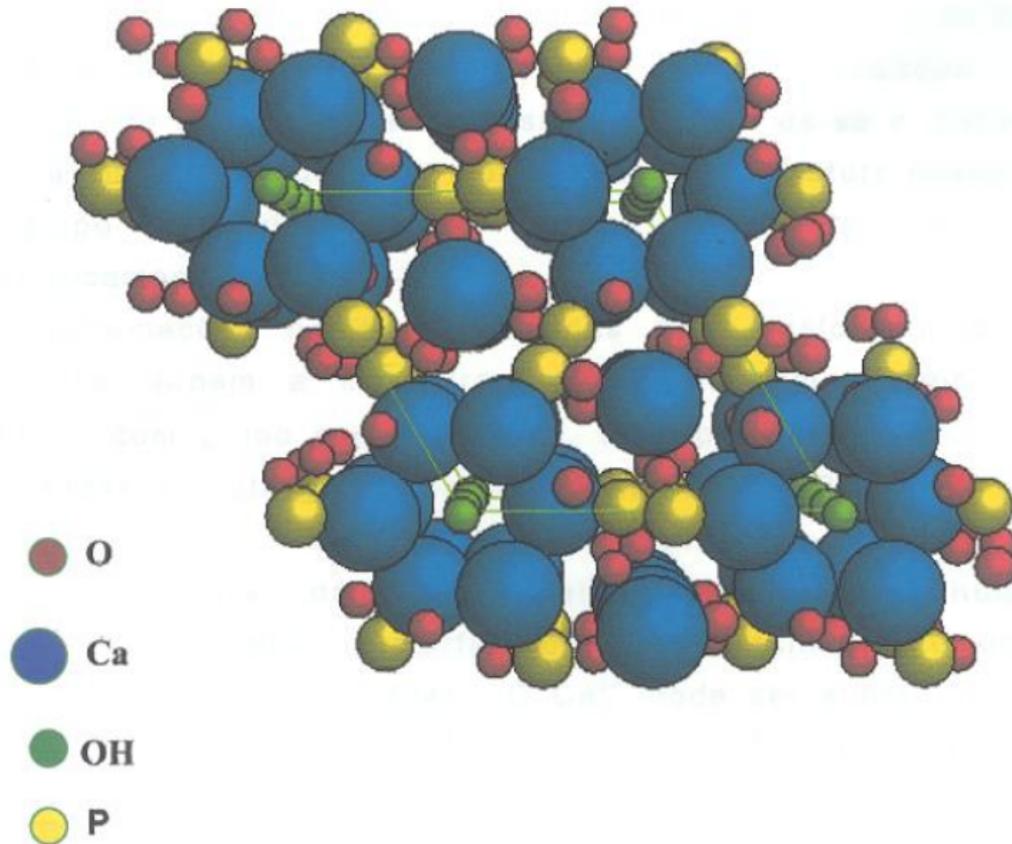


Figura 1: Estrutura da hidroxiapatita. Fonte: Kay et.al., 1964.

### 3.3 COMPLICAÇÕES DOS MATERIAIS IMPLANTÁVEIS

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

Segundo PEERSMAN et al., (2001), muitas das infecções podem ser evitadas no momento da cirurgia, utilizando técnicas adequadas de assepsia para impedir contaminações com o 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 trajes cirúrgicos completos pela equipe médica e profilaxia com uso de antibióticos tanto no pré como no pós-operatório.

As bactérias mais comumente encontradas em infecções associadas a próteses ortopédicas são o *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus epidermidis*, representando a classe das bactérias Gram-positivas. As infecções causadas por bacilos Gram-negativos, tais como *Escherichia coli* e por fungos como *Candida sp* vêm sendo relatadas com maior frequência em todo o mundo (LIMA; OLIVEIRA, 2010).

Os crescentes números de casos de perda de implantes ocasionados por contaminações bacterianas têm estimulado pesquisas em busca de materiais capazes de reduzir o número de casos de intervenções cirúrgicas causadas por alguma infecção (SHI et al., 2015).

### 3.3.1 Propriedades da prata

O efeito antimicrobiano da prata é conhecido há muitos anos. Na antiguidade, a mesma era utilizada no tratamento de queimaduras e como agente quimioterápico contra patologias provocadas por bactérias, como a *Staphylococcus aureus*. Após a descoberta da penicilina, o uso da prata como agente bactericida diminuiu consideravelmente. Porém, com a seleção de cepas resistentes à antibióticos, a prata voltou a despertar interesse na comunidade científica em virtude do desenvolvimento de novos antimicrobianos (CHOPRA, 2007).

O cátion de prata ( $Ag^+$ ) é ativo contra uma grande variedade de patógenos, pois a prata interfere no metabolismo bacteriano, podendo romper a parede da célula bacteriana e ligar-se ao seu DNA. Os íons de prata reagem com as proteínas conduzindo à inativação das mesmas. Como resultado, o DNA das bactérias perde sua capacidade de replicação e as proteínas bacterianas tornam-se inativadas, levando a morte dos microrganismos (BAI et al., 2011; MORONES et al., 2005, FENG et al., 2000).

A maioria dos casos de contaminação ocorre durante a colocação das próteses, por contato direto do biomaterial com o meio externo ou com tecidos colonizados. Os aspectos biofísicos da superfície do biomaterial e a concentração bacteriana são fatores determinantes para a adesão definitiva do microrganismo (ERCOLE; CHIANCA, 2002).

A administração de antibióticos de maneira controlada nos sítios dos implantes é uma maneira de controlar infecções. A crescente preocupação com o aumento de resistência pelas bactérias ou ocorrência de mutações causadas por

antibióticos aumenta a necessidade de procurar substâncias com poder antibacteriano como a prata, capazes de inserir-se na estrutura da hidroxiapatita (ZHANG, 2010).

Embora a prata apresente propriedades antimicrobianas, ela pode ser tóxica às células humanas se a concentração ultrapassar um limiar (CHEN et al., 2006). O resultado é uma descoloração na pele, unhas e mucosas. A prata é absorvida pelo corpo e permanece no sangue até se depositar nas membranas das mucosas (SYSTAGENIX, 2013).

Andrade (2014), obteve a HA por precipitação química e utilizou a quitosana para a produção de nanopartículas de prata como agente redutor e estabilizante. 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.

Mazzarolo (2013) obteve a HA com prata utilizando a técnica de precipitação via úmida, para analisar o comportamento químico (constitucional) e morfológico em relação à variação da temperatura de calcinação e teor de prata adicionado, para posteriormente testar a efetividade do material como agente bactericida.

Com o objetivo de encontrar um material que além de possuir as propriedades de um biomaterial (bioatividade, biocompatibilidade, osteoindução e osteocondutividade), possa diminuir ou prevenir as infecções de implantes e preenchimentos, foi dada ênfase ao estudo da hidroxiapatita com adição de prata.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 SÍNTESE DA AMOSTRA CONTROLE

A hidroxiapatita foi obtida por meio de precipitação química por via úmida tomando como referência a metodologia proposta por (ANGELO, 2008). Esse método ocorre pela reação entre o ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) e uma suspensão contendo hidróxido de cálcio ( $Ca(OH)_2$ ) ambos com alto grau de pureza, conforme a reação:



Esse método foi selecionado devido à simplicidade da reação e por haver somente formação de água como subproduto, não interferindo no material final e

não gerando riscos ao meio ambiente devido à não formação de resíduos. Os reagentes foram utilizados na concentração  $1,2 \text{ mol L}^{-1}$  para o ácido fosfórico e  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  para o hidróxido de cálcio, para seguir a razão Ca/P igual à 1,67 a fim de garantir a formação da hidroxiapatita, ter um material termicamente estável e com boa cristalinidade.

A solução de hidróxido de cálcio foi mantida em um béquer a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob agitação constante e em seguida, o gotejamento do  $\text{H}_3\text{PO}_4$  foi realizado lentamente, adicionando-se em torno de 2 a 5 mL/min. Durante o processo, foi verificado o pH da solução com fita de papel universal para que o mesmo permanecesse em torno de 10-12.

Durante a adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , a temperatura e agitação permaneceram em torno de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após o gotejamento, a agitação e o aquecimento permaneceram constantes por cerca de 60 minutos para completar a síntese e verificar as alterações no pH.

O conteúdo do béquer foi mantido à temperatura ambiente por um período de envelhecimento de 24 horas. Durante o processo de síntese, o pH foi monitorado e mantido entre 10 e 12 até a completa reação dos reagentes da hidroxiapatita. É de fundamental importância a manutenção dos valores de pH até que a reação se complete, garantindo assim, a formação de uma única fase de hidroxiapatita.

#### 4.1.1 Secagem

Ao término do período de envelhecimento o pH foi monitorado e após a decantação, foi retirado o excesso de água. O resíduo no béquer foi seco completamente em estufa à temperatura de  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas, para a retirada de água. Após a secagem, o resíduo foi desaglomerado em almofariz de ágata e a amostra foi peneirada em malha de 200 mesh.

Por fim, a amostra foi acondicionada em cadinhos de alumina e calcinada com passo de aquecimento igual a  $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  até  $700 \text{ }^\circ\text{C}$  em atmosfera de ar, para estabilização da fase de hidroxiapatita. O período de residência a  $700^\circ\text{C}$  em forno foi de 1 hora. Após a calcinação, a amostra foi caracterizada e submetida a análise da atividade antimicrobiana.

## 4.2 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA COM ADIÇÃO DE ÍONS PRATA

A hidroxiapatita com prata foi obtida por precipitação química mediante a reação entre ácido fosfórico e uma solução aquosa de nitrato de prata e hidróxido de cálcio em temperatura ambiente. Foi adicionado  $\text{Ca(OH)}_2$  em soluções de  $\text{AgNO}_3$  0,1 mol L<sup>-1</sup>; 0,01 mol L<sup>-1</sup> e 0,001 mol L<sup>-1</sup> e após completa homogeneização, iniciou-se o gotejamento de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  sob agitação constante.

Após o gotejamento, a suspensão foi mantida sob agitação constante por 1 hora. Em seguida o material foi filtrado e seco em estufa a 110 °C por 24 horas. O sólido foi desaglomerado em almofariz de ágata e o pó foi calcinado a 700 °C por 1 hora com taxa de aquecimento de 5 °C/min e por fim, as amostras foram peneiradas em malha de 200 mesh e caracterizadas.

## 4.3 CARACTERIZAÇÃO

As amostras de hidroxiapatita e hidroxiapatita com prata foram caracterizadas por Difração de raios X (DRX) e Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

### 4.3.1 Difração de raios X (DRX)

As amostras sintetizadas foram caracterizadas por difratometria de Raios X em equipamento Rigaku, modelo MiniFlex 600, com intervalo de ângulo de Bragg de 5° a 110° usando passos de 0,03° com velocidade de varredura de 2 °/min, radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ), tensão de 40 kV e corrente de 15 mA. Todas as análises foram realizadas na Central de Análises da UTFPR - Pato Branco.

A técnica foi utilizada para determinação do tamanho médio dos cristalitos através da equação de Scherrer, de fases cristalinas e características do cristal obtido, bem como a presença da prata após a dopagem. O pico utilizado para os cálculos foi em  $2\theta = 25,9$ , por não apresentar sobreposições.

### 4.3.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As medidas de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier foram realizadas na Central de Análises da UTFPR – Pato Branco, em equipamento PerkinElmer configurado como padrão para trabalho na região de IR

médio 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com acumulação de 32 varreduras e resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  mediante o uso de pastilhas de KBr (Aldrich).

A técnica foi utilizada para identificar os grupamentos iônicos e possíveis substituições ou alterações importantes na composição da hidroxiapatita.

#### 4.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE MICROBIANA

Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para medir a atividade antimicrobiana *in vitro* de agentes antimicrobianos frente a microrganismos. Como tais métodos não são todos baseados no mesmo princípio, os resultados obtidos serão também influenciados também pelos microrganismos utilizados e pelo grau de solubilidade de cada agente antimicrobiano (VANDEN; BERGHE et al., 1991).

O método de disco-difusão 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).

##### 4.4.1 Teste de disco difusão em ágar

Para o teste de disco difusão foi utilizado meio de cultura *Ágar Müller-Hintone* e os microrganismos foram repicados e incubados por aproximadamente 17 horas a 37 °C para *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* e 28 °C para *Candida albicans*. Após, foram padronizados em escala de McFarland 0,5 que contém aproximadamente  $10^8$  UFC/mL.

Em seguida, poços de 8,0 mm de diâmetro foram perfurados na superfície das placas de Petri que continham o *Ágar Müller-Hintone* e os microrganismos foram inoculados com swabs esterelizados na superfície do meio de cultivo. Em seguida, 50 mg das amostras foram adicionadas nos poços junto com 20  $\mu\text{L}$  de água peptonada e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 17 a 24 horas a 37 °C para *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* e 28 °C para *Candida albicans*. Após esse período foram realizadas as medidas dos halos de inibição do desenvolvimento microbiano. Os resultados foram expressos em mm.

Como controle positivo para os microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* foi utilizado o antibiótico tetraciclina na concentração de 5 mg/L, que inibe o desenvolvimento microbiano e como controle negativo foi

utilizado água peptonada que irá permitir o crescimento. Para *Candida albicans* foi utilizado o antifúngico fluconazol na concentração de 5 mg/L para o controle positivo e para o controle negativo foi utilizado água peptonada.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

Os difratogramas (Figura 2) apresentaram perfis constituídos de picos relativamente estreitos e intensos, características associadas à cristalinidade da amostra. (ANGELO, 2008).

A fase da HA foi identificada pela verificação de seus picos característicos em  $2\theta = 25,9^\circ$ ;  $31,6^\circ$ ;  $32,9^\circ$  e  $33,9^\circ$  e ao comparar com a ficha padrão ICDD 01-089-6437 (*International Centre for Diffraction Data*) podemos confirmar a formação de HA como fase majoritária.

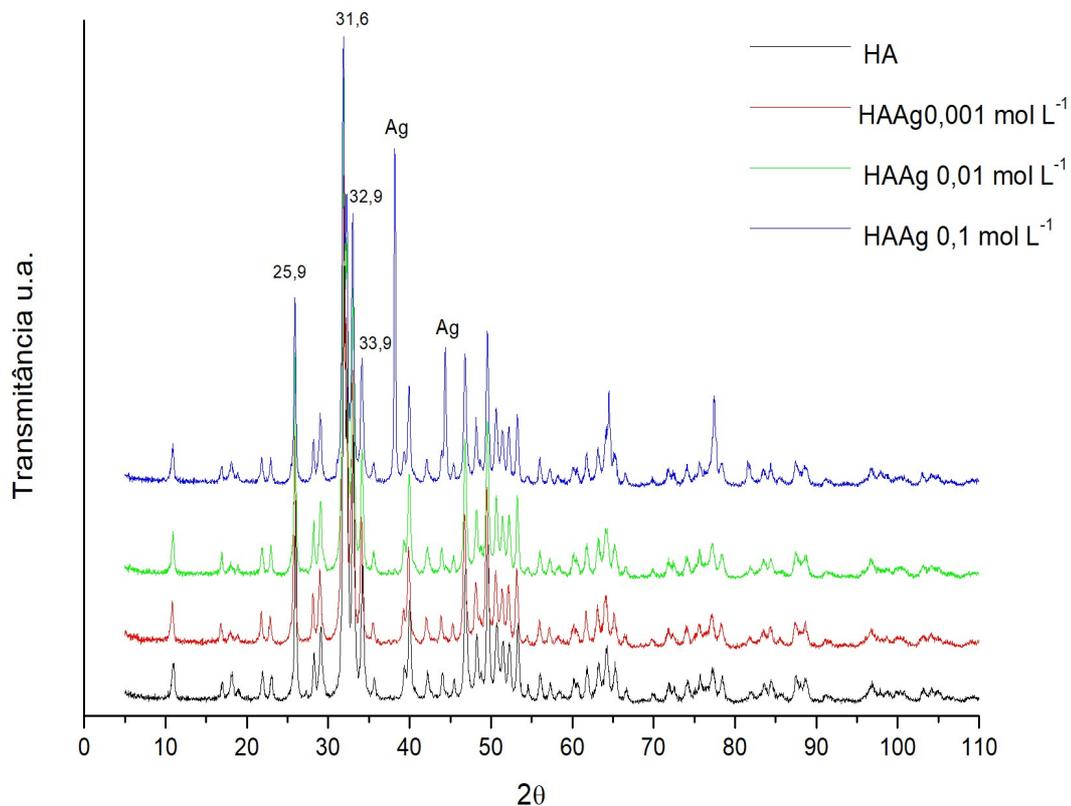


Figura 2: Difratograma de raios X das apatitas sintetizadas.

Nas amostras contendo prata também podemos observar a formação da hidroxiapatita e o pico característico da prata metálica em  $2\theta = 38,1^\circ$  e  $44,3^\circ$  para a

amostra de concentração  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , que apresenta maior intensidade comparada às concentrações de  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ . Na figura 3 é possível ter uma melhor visualização dos sinais correspondentes à prata. Verifica-se que quanto maior a concentração de prata, maior a intensidade dos picos.

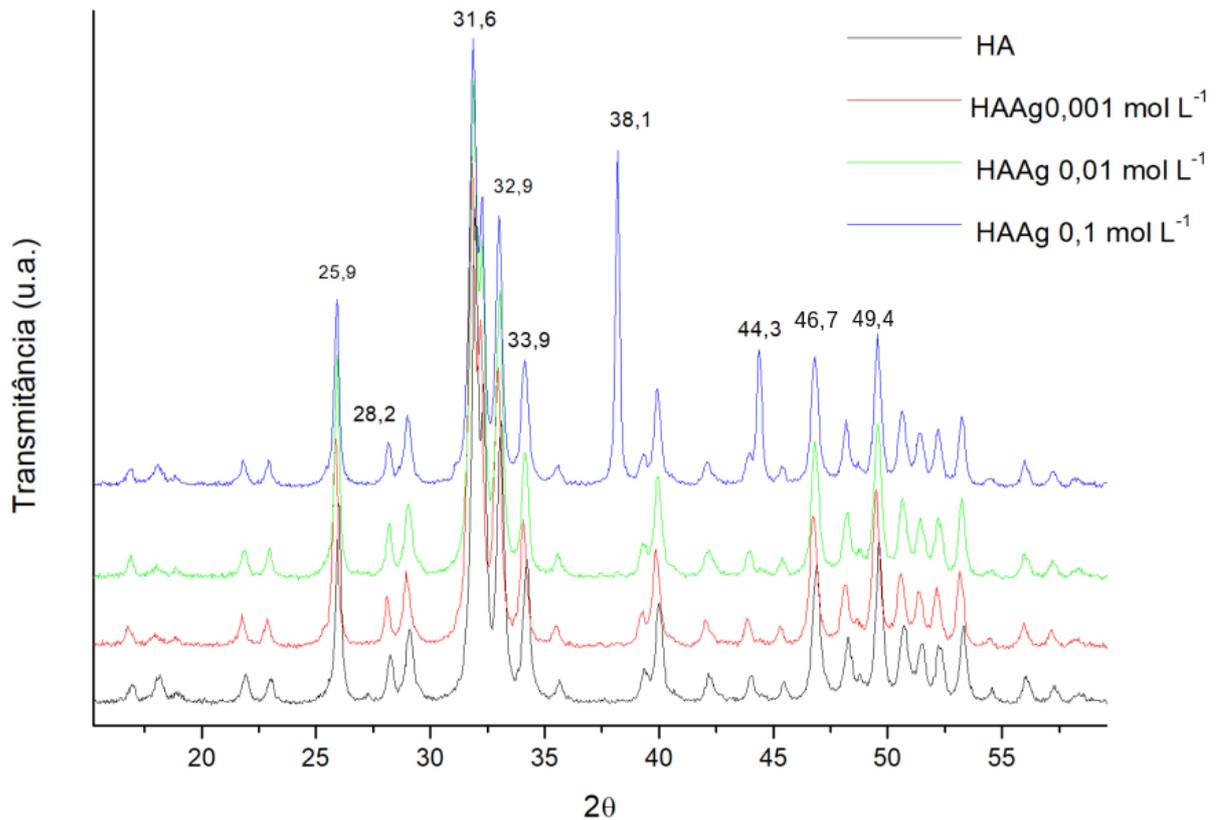


Figura 3: Difratograma de raios X das amostras sintetizadas ampliado.

Katakam et al. (2003) utilizaram hidroxiapatitas comercial e óxido de prata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ). Concentrações de 5 e 10% em mol de óxido de prata foram espalhados homogeneamente sobre a HA e as misturas compactadas à pressão. As amostras foram aquecidas em forno micro-ondas doméstico e irradiadas durante 3 horas. Observaram a formação de prata metálica em  $2\theta = 38,1^\circ$  e  $44,3^\circ$  nas amostras, através do ensaio de difratometria de raios X.

Miranda et al. (2010) estudaram e caracterizaram nanopartículas de prata incorporadas a uma matriz de HA, a qual foi obtida pelo método sol gel e posteriormente adicionada a uma solução contendo  $\text{AgNO}_3$  a fim de se obter HA/nAg com 1% em peso de prata metálica. O padrão DRX para as amostras resultou na presença de Ag metálica caracterizada pelos picos  $2\theta = 38,1^\circ$  e  $44,3^\circ$ .

Ohtsuki e colaboradores (2010) realizaram a caracterização das amostras de HA obtidas pelo método hidrotermal e imersas em solução de nanopartículas de prata através da difratometria de raios X e observaram também a presença de prata metálica caracterizada pelo pico  $2\theta = 38,1^\circ$ .

Ainda, observa-se que no difratograma com maior dopagem com íons de prata ocorre um sutil alargamento das reflexões, indicando que existe modificações na estrutura da rede cristalina da hidroxiapatita tornando-a menos cristalina (BAI et al., 2010). Isso acontece devido que os íons cálcios possuem raios iônicos hexacoordenados de 100 pm enquanto os íons de prata ( $Ag^+$ ) com mesma coordenação, possuem raios de 115 pm, essa substituição é mais facilitada em virtude que as apatitas aceitam melhor a inclusão de íons com raios maiores no sítio do cálcio (LEGEROS, 1984).

Capanema (2014), associou a menor cristalinidade à carbonatação da HA. O estudo reporta que HA carbonatadas apresentam satisfatória concordância com os picos da fase cristalina identificada na HA, e com picos na fase menos cristalina devido à falta de periodicidade a longo alcance em decorrência das deformações introduzidas pela substituição de grupos fosfato ( $PO_4^{3-}$ ), e/ou hidroxilas, ( $OH^-$ ) pelos grupos carbonato ( $CO_3^{2-}$ ). O fato de a síntese ser realizada em sistema aberto pode justificar a carbonatação da HA. As reflexões características para HA e HA carbonatada são respectivamente em  $2\theta$ : 25,90; 31,80 e 32,93 e 25,75; 32,19 e 33,43. Portanto, os picos possivelmente apresentam sobreposição, dificultando o processo de identificação das fases. (ANGELO, 2008).

A fim de se confirmar possíveis substituições ou interações na estrutura da HA calculou-se o tamanho médio dos cristalitos empregando-se a equação de Scherrer:

$$D_m = \frac{\kappa \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

$\kappa$  = constante de proporcionalidade que depende da forma das partículas, assumida como sendo esférica (0,9).

$\lambda$  = comprimento de onda da radiação  $CuK\alpha$  (0,15406 nm).

B = largura do pico à meia altura.

$\theta$  = ângulo de difração de Bragg.

Na tabela abaixo podemos verificar o tamanho médio dos cristalitos das amostras sintetizadas:

**Tabela 1: Tamanho médio de cristalito das amostras sintetizadas.**

Amostra	Tamanho do cristalito (nm)
HA	30,44
HAAg 0,001 mol L <sup>-1</sup>	30,47
HAAg 0,01 mol L <sup>-1</sup>	32,04
HAAg 0,1 mol L <sup>-1</sup>	33,14

Analisando os valores obtidos é possível observar um crescente aumento no tamanho do cristalito nas amostras que contém prata quando comparadas à HA pura, indicando que o metal pode ter incorporado na estrutura da hidroxiapatita.

A amostra com maior concentração de prata, HAAg 0,1 mol L<sup>-1</sup> apresentou o maior tamanho de cristalito, o que sugere a incorporação do íon metálico possivelmente nas posições do grupo hidroxila (OH<sup>-</sup>) como verificado nos espectros de FTIR, dado o decréscimo da intensidade da banda atribuída a este grupamento.

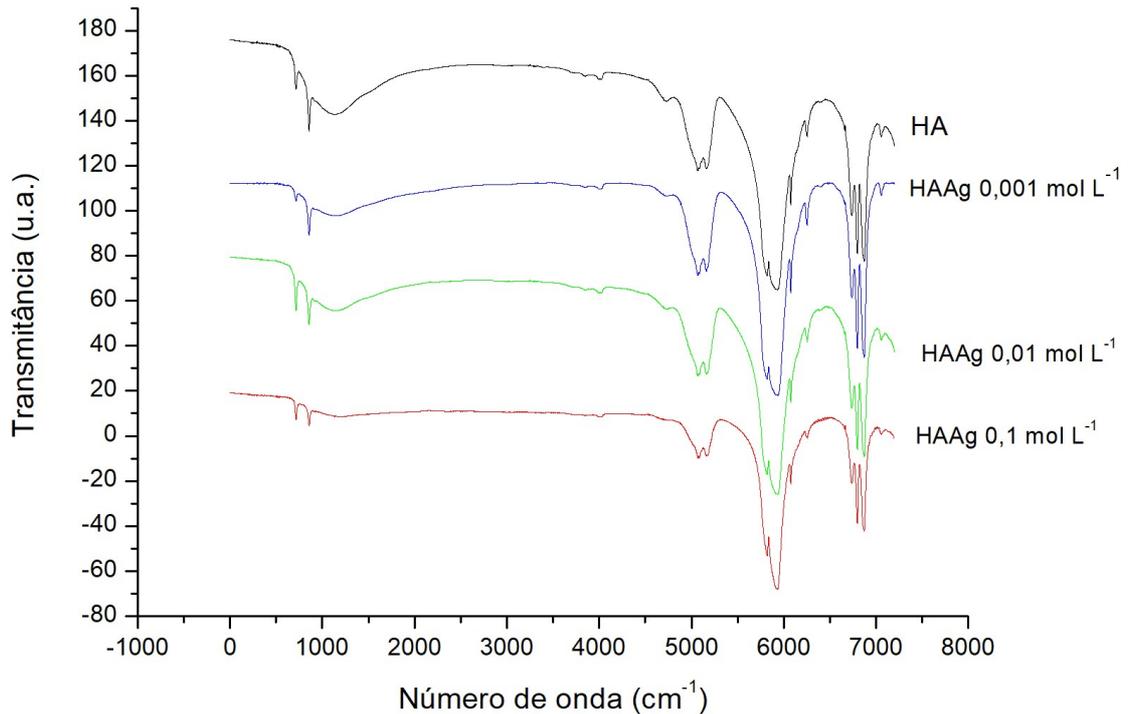
Mundstock, (2004) destaca que o arranjo em forma hexagonal da HA permite que os grupos hidroxila (OH<sup>-</sup>) sejam retirados com relativa facilidade, gerando canais vazios entre os hexágonos, formados pelos íons de cálcio, por onde outros íons e moléculas podem ser conduzidos para dentro da estrutura do material cerâmico.

Mavropolous et. al., (2002) sugere a substituição dos íons Ca<sup>2+</sup> por cátions metálicos tais como o Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> e Ag<sup>+</sup> devido à estrutura da HA permitir substituições isomorfas catiônicas e aniônicas com facilidade. Costa et al., (2009) também sugere a substituição dos íons Ca<sup>2+</sup> pelos íons Ag<sup>+</sup>.

## 5.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

O espectro de FTIR da figura 4 apresenta para a amostra sem adição de íons prata (HA) banda correspondente a deformação axial de O-H próximas à 3670 cm<sup>-1</sup>. As bandas presentes em torno de 1650 cm<sup>-1</sup> e 1460 cm<sup>-1</sup>, sugerem a deformação axial do C=O do íon CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> e de C-O respectivamente. É possível também visualizar banda de baixa intensidade próximo a 870 cm<sup>-1</sup> atribuída a deformação fora do

plano. Também é observável bandas características do íon  $\text{PO}_4^{3-}$  onde é evidenciado bandas de deformação axial de  $\text{P}=\text{O}$  em  $1420\text{ cm}^{-1}$  e sinais de deformação axial de  $\text{P}-\text{O}$  de  $900\text{ cm}^{-1}$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$ . Abaixo de  $500\text{ cm}^{-1}$ , observa-se a banda atribuída a deformação angular de  $\text{O}-\text{P}-\text{O}$  (ANGELO, 2008; CAPANEMA, 2014 e SANTOS, 2013).



**Figura 4: Espectro de FTIR das amostras sintetizadas.**

Na amostra com menor concentração de prata (HAAg  $0,001\text{ mol L}^{-1}$ ), observou-se as mesmas bandas características da amostra sem dopagem de prata (HA). Todavia, houve diminuição da intensidade das bandas próximas a  $3670\text{ cm}^{-1}$  referentes ao grupo  $\text{O}-\text{H}$  e entre  $1460\text{ cm}^{-1}$  relacionado ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$ . Apesar de a diferença de intensidade das bandas entre as amostras seja sutil pequena, é possível sugerir a incorporação de íons prata principalmente referente aos sítios da hidroxila.

Para a amostra (HAAg  $0,01\text{ mol L}^{-1}$ ) é verificada a presença das mesmas regiões de absorção características da hidroxiapatita sem adição de prata (HA), com a diferença em que o sinal associado ao  $\text{C}=\text{O}$ , próximo a  $1460\text{ cm}^{-1}$  demonstra diminuição de intensidade que também pode se relacionar com uma possível

inserção de prata ao grupo ou apenas a menor absorção de  $\text{CO}_{2(g)}$  atmosférico no processo de síntese ou realização da análise.

A amostra com maior concentração de prata (HAAg 0,1 mol L<sup>-1</sup>) em analogia aos demais espectros, contém as mesmas bandas atribuídas à HA. Mas com duas diminuições consideráveis de intensidade que ocorrem em paralelo. Nas bandas atribuídas aos estiramentos C=O e OH. De acordo com Mundstock, (2004) essas diminuições estão relacionadas com a incorporação da prata aos sítios referidos já que o arranjo em forma hexagonal da HA permite que os grupos hidroxila (OH<sup>-</sup>) sejam retirados com relativa facilidade, gerando canais vazios entre os hexágonos, formados pelos íons de cálcio, por onde outros ions e moléculas podem ser conduzidos para dentro da estrutura do material cerâmico.

### 5.3 TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM ÁGAR

Os resultados do teste de disco difusão em ágar para os microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida Albicans* são mostrados nas figuras 5, 6 e 7 respectivamente.

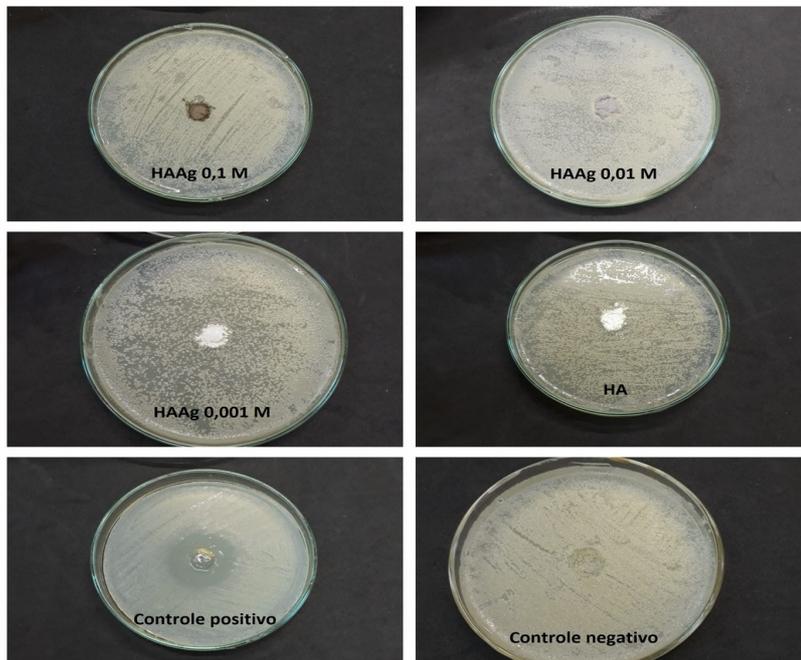


Figura 5: Teste de disco difusão para *Escherichia coli*.

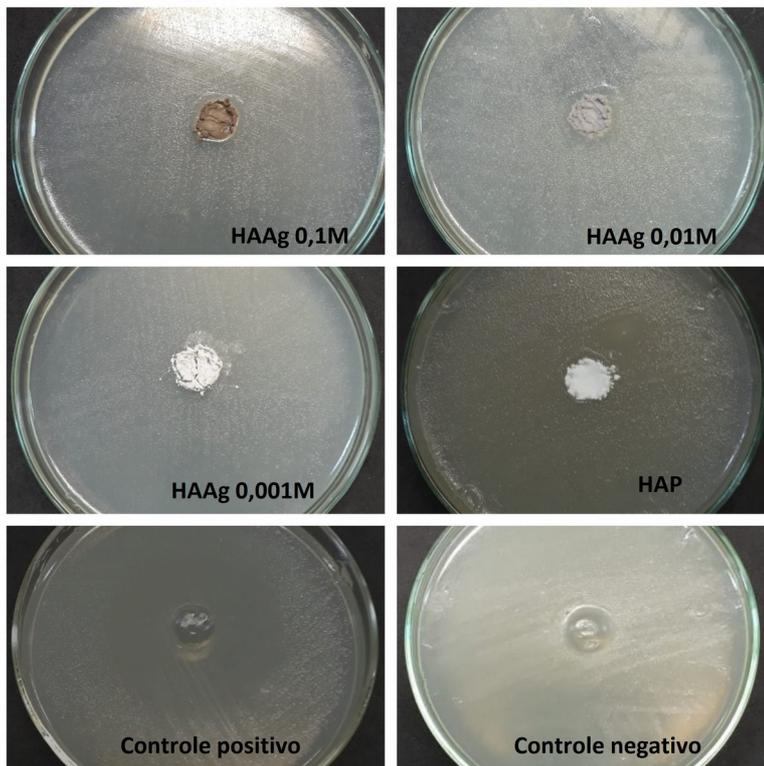


Figura 6: Teste de disco difusão para *Staphylococcus epidermidis*.

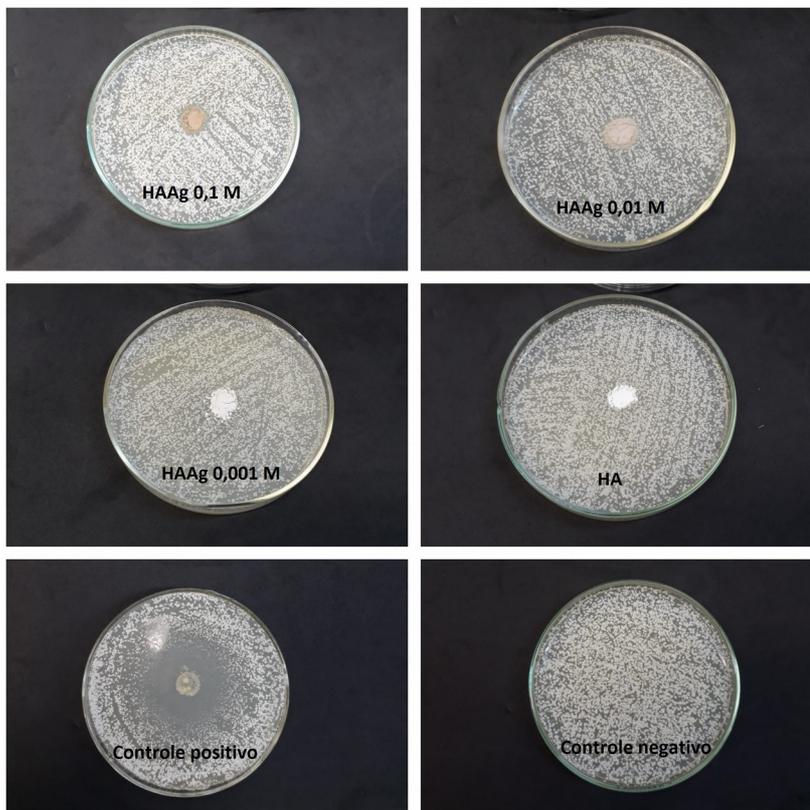


Figura 7: Teste de disco difusão para *Candida albicans*.

A bactéria Gram-negativa, *Escherichia coli*, foi resistente a todas as amostras de HA e HAAg testadas. Por outro lado, a bactéria Gram positiva *Staphylococcus epidermidis* foi sensível a presença de HA em concentração de prata de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  apresentando halo de inibição de 6,0 mm. Nas demais concentrações de Ag avaliadas não houve efeito antibacteriano. O controle positivo, realizado com o antibiótico tetraciclina, exerceu o efeito antimicrobiano esperado, com halo de inibição de 29 mm (*E. coli*) e 36 mm para *S. epidermidis* e para o controle negativo, realizado com água peptonada, houve ausência de inibição para ambos os microrganismos testados. Tais resultados verificados nos controles, demonstram a eficiência da realização do método e confiabilidade dos resultados.

Estes resultados possivelmente estejam relacionados com a espessura da parede celular das bactérias Gram-negativas, pois essas possuem uma membrana externa a mais, constituída de lipossacarídeos. Sendo assim as bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação de antibióticos, que não são capazes de cruzar efetivamente esta barreira lipídica (ROCHA, 2011).

Conforme demonstrado na figura 7, dentre as amostras de HA testadas, apenas a HAAg a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  exerceu efeito antifúngico contra a *Candida albicans*, com halo de 7,0 mm. As demais amostras não exerceram efeito inibitório frente a levedura estudada. Para o controle positivo (fluconazol, 5 mg/mL) houve formação de halo de inibição de 23 mm e para a água peptonada (controle negativo) não houve inibição.

O mecanismo de ação antimicrobiana da prata ocorre por meio de interações 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).

Félix (2015) obteve resultados similares para a bactéria Gram-negativa (*E. coli*), onde não houve formação de halos de inibição para as amostras de HA e HAAg. Também obteve resultados similares com a bactéria *Staphylococcus aureus*, que é do mesmo gênero que *Staphylococcus epidermidis*. Apenas a amostra contendo prata na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  apresentou halo de inibição, apresentando melhor efeito antibacteriano para a bactéria Gram-positiva quando comparada a Gram-negativa.

Estes resultados podem se dever ao fato da 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 atividade antibacteriana de compostos HAAg, semelhantes ao obtido no presente estudo, tem sido atribuída à liberação de  $\text{Ag}^+$  no meio (CHEN et al., 2007; SIMON; ALBON; SIMON, 2008).

## 6 CONCLUSÕES

Pela análise dos difratogramas de raios X (DRX) podemos confirmar a formação da hidroxiapatita como fase majoritária e a presença considerável de prata nas amostras com concentrações de  $\text{AgNO}_3$  de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .

Os resultados dos cálculos utilizando a equação de Scherrer mostraram que houve um aumento crescente no tamanho dos cristalitos, conforme aumentava-se a concentração de prata na amostra, sugerindo a incorporação de prata na estrutura da hidroxiapatita.

Os espectros de FTIR mostraram bandas características dos grupamentos funcionais alusivos a estrutura da hidroxiapatita. Ainda, observou-se o decréscimo da intensidade das bandas atribuídas aos estiramentos C=O e O-H a medida que aumentava-se a concentração de íons prata na amostra, sugerindo a incorporação do íon metálico a estrutura da hidroxiapatita.

O teste de disco difusão em ágar teve melhor resultado para a bactéria Gram-positiva *S. epidermidis* e para a levedura nas concentrações de prata de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Para as demais concentrações e para a bactéria Gram-negativa *E. coli* não houveram resultados satisfatórios. Isso pode ser atribuído à complexidade da parede celular das bactérias Gram-negativas e da mobilidade limitada dos íons de prata sobre o meio sólido do ágar, impedindo a formação de halos maiores.

Os resultados obtidos poderão servir de referência para futuras avaliações com modelos experimentais mais complexos. São necessários mais ensaios microbiológicos, como a concentração mínima inibitória (MIC) para confirmar a atividade antimicrobiana e determinar a concentração mínima inibitória para espécies associadas à infecções importantes.

## REFERÊNCIAS

- ANDO, J. Tricalcium Phosphate and its Variation. Bulletin of the Chemical Society of Japan, v.31, 1958.
- ANDRADE, F. A. C. Desenvolvimento de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata com propriedades antibacterianas / Flávio Augusto Cavadas Andrade; São Carlos, 2013.
- ANGELO, L. C. Síntese e caracterização de nanocompósitos hidroxiapatita gelatina obtidos pelo método de precipitação utilizando o método de Rietveld e IVTF. 2008. 122 f. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa- PR, Brasil. 2008.
- 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, 2012.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Microbiol., 40: 2413-5, 1966.
- BERGER T. J. et al. Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. Antimicrob Agents Chemother, v. 9, n. 2, 1976.
- BERTUCCI, F. N; TEDRUS, G. M. A. S. Infecções em próteses ortopédicas. Anais do XV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas - 26 e 27 de outubro de 2010.
- BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. Acta Biomaterialia, v. 8, 2012.
- CAPANEMA, N. S. V.; Síntese e caracterização de biocerâmicas à base fosfatos de cálcio modificado com nióbio. 2014. 163 f. Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de Materiais e Metalúrgica - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte- MG, 2014.
- CAPEK, I. Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions. Advances in Colloid and Interface Science, 2004.
- CHEN, W.; OH, S.; ONG A.P., et al. Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007.
- CHEN, W.; LIU, Y.; COURTNEY, H.S.; BETTENG, M.; AGRAWAL, C.M.; BUNGARDNER, J.D.; ONG, J.L. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. Biomaterials, 2006.
- CHOPRA, IAN. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2007.

COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v 4.3, 2009.

DAVIES, J. E. The bone biomaterial interface. Journal of Biomedical Materials Research, v. 26, n. 10, 1992.

DIBROV P.; DZIOBA J.; GOSINK K.; HASE C. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag in vibrio cholera. Antimicrob Agents Chemother, 2002.

DRAGIEVA I.; STOEVA S.; STOIMENOV .; PAVLIKIANOV E.; KLABUNDE K.; Complex formation in solutions for chemical synthesis of nanoscaled particles prepared by borohydride reduction process. Nanostruct Mater, 1999.

EANES, E. D. Program Crystal Growth Characteristics. Vol. 3. 1980.

ERCOLE, F. F; CHIANCA, T. C. M.; Infecção de sítio cirúrgico em pacientes submetidos a artroplastias de quadril. Rev Latino-am Enfermagem, março-abril; 2002.

FÉLIX, M. Desenvolvimento de hidroxiapatita contendo prata via precipitação e imersão: avaliação do efeito antimicrobiano / Milena Félix. -- Pirassununga, 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.

FENG, Q. L et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ion on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. John Wiley & Sons, Inc, 2000.

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 3, 1992.

GUASTALDI, A. C; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. Química Nova, vol. 33, 2010.

HILLERTON, E. Contagem bacteriana no leite: importância para a indústria e medidas de controle. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2, 2010, Curitiba, 2000.

JUDAS F. Contribuição para o estudo de enxertos ósseos granulados alógenos e de biomateriais; Tese de Doutorado, FMUC, Coimbra, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. ISBN 978-85-277-1402-0, 2008.

KARCHBURIAN, E.; ARANA, V. Histologia e Embriologia Oral. Editorial Médica Panamericana, S.A, 1999.

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

KOCH K.; BRAVE D. Bioceramic technology: the game changer in endodontics. Endod Pract, 2009.

KOCH K. A.; BRAVE D.G.; NASSEH A. A. Bioceramic technology: closing the endorestorative circle, Part I 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.

LIMA, A. L. M; OLIVEIRA, P .R. D. Atualização em infecções em próteses articulares. Rev. Bras. ortop., São Paulo , v. 45, n. 6, 2010.

LEGEROS, R. Z. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. In: Monographs in Oral Science. Edited by Howard M. Myers, São Francisco, California, 1984.

MARTINS, J. V.; PERUSSI, M. R.; ROSSI, A. C.; FREIRE, A. R.; PRADDO, F. B. Principais biomateriais utilizados em cirurgia de levantamento de seio maxilar: abordagem clínica. Revista odontológica de Araçatuba, v.31, n.2, 2010.

MAVROPOULUS, E. A. M.; ROCHA, N. C. C.; SOARES, G. D. A.; MOREIRA, J. C.; ROSSI, A. M.; Studies on the Mechanisms of Lead Immobilization by Hydroxyapatite. Environmental Science and Technology, v.36, 2002.

MAZZAROLO, J. Síntese e caracterização de hidroxiapatita nanométrica com adição de prata. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanopartículas. Nanotechnology, v. 16, n. 10, 2005.

MUNDSTOK, K.B. Preparação e caracterização de novo biocompósito cerâmico a partir do farelo de arroz. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

OHTSUKI, C.; ICHIKAWA, Y.; SHIBATA, H. et al. Sensing of protein adsorption with a porous bulk composite comprising silver nanoparticles deposited on hydroxyapatite. J Mater Sci: Mater Med., 21, 2010.

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

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

RATNER, B. D. et al. Introduction - Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor. 2 ed. In: Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine. London: Elsevier, cap. Introduction - Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor, ISBN 978-0-12-582463-7, 2004.

RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. Maringá, 2007.

ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. Quím. Nova [online]. vol.34, n.1. ISSN 0100-4042, 2011.

RUSSELL S. W.; LUPTAK K. A.; SUCHICITAL C. T. A.; ALFORD T. L.; PIZZICONI V. B. Chemical and structural evolution of sol-gel derived hydroxyapatite thin films under rapid thermal processing. J Am Ceram, 1996.

SANTOS, M. H.; Síntese e caracterização de biocompósitos fosfatos de cálcio/colágeno dopados com zinco. 2005. 179 f. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte- MG, 2005.

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

SEJAS, L. M.; SILBERT, S.; REIS, A. O.; SADER, H. S. 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, 2003.

SETTLE F. A. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Prentice Hall. New Jersey. USA. 1997.

SHI C., GAO J., WANG M., FU J., WANG D., ZHU Y., Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity, Materials Science and Engineering C, v. 55, 2015.

SIMON, V.; ALBON, C.; SIMON, S. Silver release from hydroxyapatite self-assembling calcium-phosphate glasses. Journal of Non-Crystalline Solids, v. 354, Mar. 2008.

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, 2004.

SYSTAGENIX. A prata aplicada ao tratamento de feridas. Artigo obtido no site: [www.systagenix.com.br](http://www.systagenix.com.br) em 12 janeiro, 2018.

VANDEN BERGH, M. F. Q.; VERBRUGH, H. A. Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v.133, 1991.

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

ZHANG,Y.; YIN, Q.; ZHAO, H.; LI, J.; WEI,Y.; CUI,F.; HUANG, H.; Antibacterial and biological properties of silver- loaded coralline hydroxyapatite, *Materials Science China*, v.4, 2010.