



Márcio Guerreiro da Costa Gomes
Licenciado em Engenharia Biomédica

Development of antimicrobial hydroxyapatite coatings by CoBlast™

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Mestrado integrado em Engenharia Biomédica

Orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, FCT/UNL
Co-orientador: Eduardo Pires, CEO, CERAMED

Júri:

Presidente: Carla Quintão, Professora Auxiliar, FCT/UNL
Arguente(s): Susana Sérgio, Professora Auxiliar, FCT/UNL
Vogal(ais): João Paulo Borges, Professor Auxiliar, FCT/UNL



Dezembro de 2016

Development of antimicrobial hydroxyapatite coatings by CoBlast™

Copyright © 2016. Todos os direitos reservados. Márcio Guerreiro da Costa Gomes, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de usar esta secção para agradecer a todas as pessoas que me ajudaram na realização da dissertação de mestrado em Engenharia Biomédica, tais como:

- O meu Orientador, Professor João Paulo Borges, da FCT-UNL, pela proposta do tema da dissertação, pela confiança depositada em mim para a realização do mesmo, por toda a disponibilidade, dedicação, incentivo e ajuda mesmo quando o mesmo se encontrava sobre grande pressão de todos os temas que tinha que orientar, o meu Grande Obrigado;

- Os meus co-orientadores, que apesar de uma questão burocrática só me permitir identificar um, não os mencionar seria-lhes feita uma grande Injustiça:

- Os meus Co-Orientadores Doutora Ana Oliveira e Doutor Eduardo Pires, da CERAMED, pela disponibilidade em acolherem-me na empresa, ajuda e confiança;

- O meu Co-Orientador Professor Jorge Silva, da FCT-UNL, pela enorme ajuda em toda a parte de células, já que foi uma área nova para mim e por toda a disponibilidade, dedicação e incentivo;

- A minha Co-Orientadora Professora Isabel Nogueira, da FCT-UNL, por sua vez, pela enorme ajuda em toda a parte de bactérias, já que também foi uma área nova para mim e por toda a dedicação e disponibilidade;

Gostaria ainda de agradecer à Senhora Augusta por toda a ajuda que me prestou com material e técnicas nos laboratórios onde trabalhei. Agradeço ainda ao Jaime, à Paula e a Professora Maria Carmo pela ajuda prestada. Ainda agradeço à Doutora Joana Pinto pela ajuda e explicação do DRX e software e à Doutora Rita Branquinho pela ajuda com FTIR, tal como agradeço ao Professor Rui Silva e a Doutora Daniela Gomes pela ajuda com o SE. Agradeço ainda ao Diogo Ramos pela ajuda na CERAMED e boleias dadas. Igualmente agradeço à minha melhor amiga Bruna Laranjeiro pelas boleias dadas e motivação dada. Por fim agradeço à minha mãe por toda a motivação que me deu para conseguir realizar a dissertação.

Resumo

Infecção em implantes metálicos é a segunda maior razão que leva a cirurgias de revisão dos mesmos. Pretendia-se com o tema desta dissertação obter revestimentos de hidroxiapatite que fossem biocompatíveis e antibacterianos. Obteve-se hidroxiapatite com concentrações variáveis de Prata (1%, 2%, 4% 7% e 10% m/m) através de um método modificado, simples e rápido, de Sol-Gel. Avaliou-se a toxicidade celular dos mesmos pós, só havendo citotoxicidade moderada na amostra de 10% Ag-HA. Revestiu-se placas de Titânio (Ti-6Al-4V) com pó de hidroxiapatite com prata (4%) através de uma nova técnica de revestimento, CoBlast®. Avaliou-se a citotoxicidade e as propriedades antibacterianas dos revestimentos. Os resultados antibacterianos foram inconclusivos. Os revestimentos demonstraram citotoxicidade ao fim de 48 horas em contacto.

Abstract

Metallic implants related infections are the second cause of surgery implant revision. The goal of this thesis was to obtain biocompatible and antibacterial hydroxyapatite coatings. Hydroxyapatite with variable concentrations of silver (1%, 2%, 4%, 7% and 10% m/m) was obtained from a modified, fast and simple, sol-gel procedure. Cell toxicity of the powders was studied having only registering mild toxicity with the sample of 10% Ag-HA. Titanium (Ti-6Al-4V) samples were coated with hydroxyapatite with silver (4%) via a new coating technique, CoBlast®. Cell toxicity and antibacterial properties of the coatings was studied. The antibacterial results were inconclusive. The coatings showed cell toxicity after 48 hours in contact.

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xv
Lista de abreviaturas	xvii
Capítulo 1 – Introdução.....	1
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	17
2.1 – Preparação do Sol-Gel de Ag-HA	17
2.2 – Sinterização e filtração da Ag-HA.....	19
2.3 – Diálise da Ag-HA.....	19
2.4 – Avaliação da citotoxicidade dos pós de Ag-HA.....	19
2.5 – Preparação dos revestimentos via Coblast®	20
2.6 – Avaliação da citotoxicidade dos revestimentos	24
2.7 – Estudo antibacteriano dos revestimentos	24
2.8 - Técnicas de caracterização	25
2.8.1 - Difracção de raio-x (DRX).....	25
2.8.2 - Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR)	26
2.8.3 – Microscopia de varrimento electrónico (SEM) e energy-dispersive x-ray spectroscopy (EDS)	26
Capítulo 3 – Resultados e discussão	29
3.1 – Pó de Ag-HA.....	29
3.2 - Citotoxicidade dos pós de Ag-HA	40
3.3 - Citotoxicidade dos revestimentos.....	43
3.4 - Propriedades antibacterianas dos revestimentos	44
3.5 - SEM e EDS dos revestimentos	47
Capítulo 4 - Conclusões	55
Referências Bibliográficas	57
Anexo 1 – Razão da Precipitação dos precursores da Hidroxiapatite.....	61

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema de um aparelho de Coblast® com 1 aspersor (nozzle). [23].....	16
Figura 2 - Espectro FTIR das Hidroxiapatites obtidas por diferentes protocolos. Em A) trata-se da amostra com o protocolo inalterado. Em B) é a amostra com o protocolo que acabou por ser o protocolo aplicado durante a dissertação. A amostra A) tem uns picos entre 750-800 cm ⁻¹ que são desconhecidos.	17
Figura 3 - Difractogramas das Hidroxiapatites obtidas por diferentes protocolos. Em A) trata-se da amostra com o protocolo inalterado. Em B) é a amostra com o protocolo que acabou por ser o protocolo a aplicado durante a dissertação. Verifica-se em A) a existência de uns picos entre 25-30 graus que são de compostos desconhecidos. A amostra B) assemelha-se mais ao que se pretende obter. Legenda: trata-se de HA, AgNPs [21], [34], [35]. β-TCP [36].	18
Figura 4 - Imagens do Misturador em V. Em a) encontra-se uma representação esquemática da porção interna do misturador, com a forma da letra V, onde ficam colocados os pós que se pretendem misturar[45]. Em b) a porção externa do misturador que se encontra presa em um aparelho que a faz girar.	21
Figura 5 – Alimentador (Powder Feeder Single-10C da Sultzer Metco) com um reservatório (Powder Insert) acoplado em a). Em b) encontra-se uma representação do interior do reservatório onde é possível ver todos os seus componentes. As setas representam onde ficava colocada cada mistura.	22
Figura 6 - Plataforma usada onde se colocou as placas de titânio onde iriam ser feitos os revestimentos.	22
Figura 7 - Câmara do Coblast®. Em A) encontra-se a parte externa da câmara com um ecrã e teclado para se inserir instruções. Em B encontra-se a parte interna da câmara onde se coloca a plataforma com as amostras. Também é possível visualizar o aspersor em B.	23
Figura 8 - Representação da plataforma aonde se colocam as placas de titânio (cubos a cinzento) para fazer o revestimento. Também está representado o movimento de vaivem (setas) que foi planeado no código executar para realizar o revestimento de forma ideal. A distância 1) trata-se da distância entre cada movimento vaivem numa fila de placas de titânio. A distância 2) trata-se da distância entre cada fila de placas de titânio. Por fim, a branco encontra-se uma representação da mistura para melhor visualização.	23
Figura 9 - XRD das Ag-HA pré-dialise. De referir que a amostra de 0% trata-se do espectro a azul em (a), 1% em (b), 2% em (c) e 4% Ag-HA em (d). Legenda: HA; AgNPs [21], [34], [35]; β-TCP [36]. A posição exacta dos picos na literatura e na figura pode ser visualizada na tabela 4. O traço serve para demonstrar o pico de 29,4° mencionado na discussão e na figura 11.	29
Figura 10 - XRD de Ag-HA pós-dialise. De referir que a amostra de 0% trata-se do espectro a azul em (a), 1% em (b), 2% em (c), 4% em (d), 7% em (e) e 10% em AgNO ₃ -HA (f). Legenda: Hidroxiapatite; Nanopartículas de Prata [21], [34], [35]; β-TCP [36]. A posição exacta dos picos na literatura e na figura pode ser visualizada na tabela 5.	30
Figura 11 – Em a) trata-se do difractograma da amostra de 4% Ag-HA pré-dialise. Em b) trata-se do difractogramas da amostra de 4% Ag-HA pós-dialise em b). A seta representa o pico que desapareceu com a dialise. Este pico, com angulo de 29,4°, parece ser o pico mais intenso do Carbonato de Cálcio (Calcite), com base em M. A. Rahman et al [37].	33
Figura 12 – Espectro de FTIR das amostras de 0% (a), 1% (b), 2% (c) e 4% Ag-HA (d). De referir que estas amostras são amostras de hidroxiapatite pré-dialise.	37

Figura 13 – Espectro de FTIR das amostras de 0% (a), 1% (b), 2% (c), 4% (d), 7% (e) e 10% Ag-HA (f). De referir que estas amostras são amostras de hidroxiapatite pós-dialise.	37
Figura 14 - Imagens das culturas realizadas onde é possível visualizar as células. Em b) e c) é possível visualizar pequenas partículas que provavelmente tratam-se de hidroxiapatite. Relativamente às imagens tem-se que: a) – HA controlo; b) 1% Ag-HA; c) 2% Ag-HA; d) 4% Ag-HA; e) controlo positivo (Citotóxico); f) controlo negativo	41
Figura 15 - Imagens das culturas realizadas onde é possível visualizar as células. Em c), g) e h) é possível visualizar pequenas partículas que provavelmente tratam-se de hidroxiapatite. Relativamente às imagens tem-se que: a) 7%Ag-HA com concentração de 61 mg/ml; b) 7% Ag-HA com concentração de 24,4 mg/ml; c) 10% Ag-HA com concentração de 61 mg/ml; d) 10% Ag-HA com concentração de 24,4 mg/ml. As culturas do e) a h) tratam-se de culturas em que o meio esteve em contacto com as amostras de hidroxiapatite durante 30 dias e concentração de 152,5 mg/ml. A cultura e) trata-se da amostra de HA controlo; f) trata-se da amostra de 1% Ag-HA; g) trata-se da amostra de 2% Ag-HA e por fim a h) trata-se da amostra de 4% Ag-HA. É possível visualizar que tanto a de 10% Ag-HA e a de 4% Ag-HA apresentam toxicidade.	42
Figura 16 – Ensaio SEM nos revestimentos de Ti-HA e Ti-4AgHA após terem estado em contacto com as bactérias. Legenda: A) Ti-HA que esteve em contacto com <i>S.aureus</i> , B) Ti-4AgHA com <i>S.aureus</i> , C) Ti-HA com <i>E. coli</i> , D) Ti-4AgHA com <i>E. coli</i> . As setas representam bactérias <i>S.aureus</i>	45
Figura 17 – Imagens de SEM dos revestimentos em Ti de A) Ti-HA, B)Ti-1Ag-HA, C) Ti-3Ag-HA e D) Ti-4Ag-HA. A amostra em E) trata-se de Ti sem revestimento. A ampliação é de 200 vezes. Verifica-se no caso do revestimento em B) que existe uma diferença na uniformidade do revestimento na superfície representado por setas.	48
Figura 18 – Imagens de SEM dos revestimentos em Ti de A) Ti-HA, B) Ti-1Ag-HA, C) Ti-3Ag-HA e D) Ti-4Ag-HA. A amostra em E) trata-se de Ti sem revestimento. A ampliação é de 1000 vezes. Verifica-se no caso do revestimento em B) que existe uma diferença na uniformidade do revestimento representado por setas.....	49
Figura 19 - Imagens de SEM dos revestimentos em Ti de A) Ti-HA, B) Ti-1Ag-HA, C) Ti-3Ag-HA e D) Ti-4Ag-HA. A ampliação é de 3000 vezes. Verifica-se no caso do revestimento em B) que existe uma diferença de homogeneidade. É visível que parece ser causado por diferenças de granulometria entre a HA e a Ag-HA.	50
Figura 20 - EDS dos revestimentos de Ti-HA em A) e C) e Ti-4Ag-HA em B) e D). Consegue-se visualizar a presença de Prata na amostra de Ti-4Ag-HA. Observa-se ainda a presença de Ca e P em ambas as superfícies. Observa-se ainda as superfícies escolhidas para analisar. Neste caso específico escolheu-se toda a superfície presente nas imagens em A) e B).....	52
Figura 21 - EDS do revestimento de Ti-4Ag-HA com ampliação de 2000 vezes em A), B) e C) e respectivos espectros em D), E) e F). Observa-se as superfícies escolhidas para analisar. Neste caso específico escolheu-se 3 zonas diferentes da superfície.	53
Figura 22 - EDS do revestimento de Ti-1Ag-HA com ampliação de 2000 vezes em A) B) e respectivos espectros em C), D). Observa-se as superfícies escolhidas para analisar. Neste caso específico escolheu-se 3 zonas diferentes da superfície.	54

Índice de tabelas

Tabela 1 – Múltiplos estudos sobre Hidroxiapatite substituída com Prata, Nesta tabela é possível visualizar as técnicas utilizadas e os resultados principais obtidos.	4
Tabela 2 – Tabela adaptada de Dorozhkin et al. [20] que mostra as vantagens e desvantagens de multiplas técnicas de deposição de fosfatos de cálcio.	12
Tabela 3- Composição teórica dos revestimentos preparados via Coblast®. Os valores presentes na tabela são de percentagem do volume total.	21
Tabela 4 – Planos correspondentes aos Picos de DRX das amostras de Hidroxiapatite pré-dialise. Também se encontra representado os valores dos picos dos difractogramas de cada amostra e os valores de Literatura[21], [34]–[36]. N significa que não existe esse pico nos difractogramas. A negrito o angulo que verifica uma diminuição nas amostras com Ag comparativamente ao controlo.	31
Tabela 5 – Planos correspondentes aos Picos de DRX das amostras de Hidroxiapatite pós-dialise. Também se encontra representado os valores dos picos dos difractogramas de cada amostra e os valores de Literatura[21], [34]–[36]. N significa que não existe esse pico no difractograma. A negrito o angulo que verifica uma diminuição nas amostras com Ag comparativamente ao controlo.	32
Tabela 6 – Valores de pH medidos antes de se proceder com a dialise e 48 horas após começar com a dialise.	33
Tabela 7 – Rácio de cada amostra admitindo total dopagem pela Prata.	36
Tabela 8 – Picos e Bandas do FTIR associadas aos grupos funcionais [42], [43] e respectiva existência dos mesmos nas amostras de hidroxiapatite pré-dialise. Legenda: S = existe, N= não existe, número indica o número mais perto onde se verifica o “pico” no caso de picos ligeiramente desviados. Números repetidos indica situações em que um pico pode pertencer a 2 diferentes situações.	38
Tabela 9 – Picos e Bandas do FTIR associadas aos grupos funcionais [10], [12] e respectiva existência dos mesmos nas amostras de hidroxiapatite pós dialise. Legenda: S = existe, N= não existe, número indica o numero mais perto onde se verifica o “pico” no caso de picos ligeiramente desviados. Números repetidos indica situações em que um pico obtido no FTIR pode pertencer a 2 diferentes situações.	39
Tabela 10 - Valores de população celular relativa ao controlo negativo registados nos ensaios citotoxicidade. Um valor da população relativa superior a 90% é considerado como indicando que o extracto não é citotóxico. Verifica-se citotoxicidade moderada na amostra de 10% Ag-HA na concentração de 61 mg/ml. A amostra de 4% Ag-HA demonstrou citotoxicidade severa quando esteve 30 dias no frigorifico a 4°C. A concentração dessas amostras foi superior pois o volume que ficou em contacto os 30 dias foi de 1,167 ml (sem os 0,833ml que tinham sido retirados para os ensaio anterior). O valor dessa concentração está calculado.	40
Tabela 11 - Adesão celular nos revestimentos de HA preparados por CoBlast®	43
Tabela 12 - pH do revestimento de Ti-4Ag-HA em 14 ml de água millipore no inicio e ao fim de 48 horas .	44
Tabela 13 - Número de colónias contadas nas na superfície do meio sobre a placa de titânio com diferentes revestimentos e a diferença empercentagem entre os revestimentos.	46

Lista de abreviaturas

AFM - Microscopia de força atómica;

Ag-CP – Fosfato de cálcio com prata;

Ag-HA – Hidroxiapatite com prata;

AgNPs – Nanopartículas de prata;

β -TCP – Trifosfato de cálcio do tipo β , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$;

Ca – Cálcio;

CFU – Colony forming unit;

CP – Fosfato de cálcio;

DRX – Difracção por raio-X;

E. coli - *Escherichia coli*;

EDS - Energy-dispersive x-ray spectroscopy;

FTIR – Fourier transformer infrared;

ICP-AES- Espectroscopia de emissão atómica por plasma acoplado indutivamente;

HA – Hidroxiapatite;

LB – Meio de cultura para bactérias desenvolvido por Luria Broth;

NPs – Nanopartículas;

PEEK - poli(eter-eter-cetona);

PTN- Pressão e temperatura normais;

RPM – Rotações por minuto;

S. aureus - *Staphylococcus aureus*;

SEM – Microscopia de varrimento electrónico;

UV-Vis- Espectroscopia ultravioleta – visível;

Capítulo 1 – Introdução

A esperança média de vida dos cidadãos têm vindo a aumentar nas últimas décadas[1]. Tal se deve, à melhoria das condições de saúde. No entanto, com o progressivo envelhecimento do ser humano, torna-se maior a probabilidade de surgirem problemas de saúde. Um destes problemas são as fracturas ósseas desencadeadas devido a osteoporose. Com o progressivo enfraquecimento dos ossos torna-se mais fácil ocorrerem fracturas devido a quedas acidentais. Por outro lado, têm vindo a aumentar o número de pessoas a precisar de reconstrução dentária tanto por fracturas como por estética. Ambos os casos têm levado a que exista uma maior necessidade dos cidadãos de acesso a tratamentos de regeneração/substituição tanto óssea como dentária de qualidade. Segundo o INE (Instituto nacional de estatística) [1], existia, em Portugal, em 2006, cerca de 654 mil pessoas com osteoporose. Destas, cerca de 625 mil são pessoas com idade igual ou superior a 45 anos. É expectável que tal necessidade aumente com a melhoria das condições de saúde e também com a continuação do aumento da esperança média de vida. [2]–[5]

Um dos materiais mais usados na substituição óssea é a hidroxiapatite. A hidroxiapatite (HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é um cerâmico biocompatível, bioactivo e osteocondutor. Tal deve-se à sua grande similaridade com a parte mineral do osso, o que permite a formação de ligações químicas com o tecido vivo do osso e, portanto, leva a proliferação dos osteoblastos. [2], [6]–[10] Esta é a principal razão da sua utilização como material de reconstrução de tecido ósseo ou de dentes danificados. Também é usado como cimento ósseo ou no revestimento de implantes metálicos ortopédicos (anca, joelho, ombro, etc.) de forma a facilitar a osteointegração. Existem ainda reportadas na literatura aplicações na área dos implantes dentários e tem havido investigação como possível meio de transporte de fármacos (em forma de nanopartículas). [2], [7]–[10]

A hidroxiapatite, apesar das suas vastas aplicações na área da medicina, apresenta alguns problemas. A taxa de sucesso dos implantes está dependente da sua capacidade de se integrarem em ambiente biológico (humano), sem efeitos nefastos. Um dos maiores problemas aquando da utilização de implantes trata-se de infecções. Segundo R. Torrecillas et al. [2] e V. Stanić et al. [9] a taxa de infecção associada a implantes nas articulações situa-se entre os 1% e os 9% dependendo do tipo de implante. As infecções são, aliás, a segunda maior razão (primeira é a falha na osteointegração) que leva a cirurgias de revisão do implante. Isto, muitas vezes, não resolve o problema e força a remoção do implante. Tal causa um enorme custo e causa sofrimento físico e psicológico ao paciente afectado. Segundo R. Torrecillas et al. [2] a taxa de infecção em cirurgia de revisão do implante é 40% maior que na primeira intervenção. Isto só piora o problema. [2], [4], [9] Por outro lado, segundo um estudo realizado por S. Filho et al. [11] a taxa de infecção associada a implantes dentários, a peri-implatite, situou-se nos 28%. Segundo Renvert et al. [12], em múltiplos estudos realizados a peri-implatite tem uma taxa de incidência variável entre 1,8%, 9,1% e 37%. A peri-implatite é uma infecção que afecta tanto os tecidos moles como os duros, nomeadamente o osso. Isto torna-se problemático pois leva a

perda de massa óssea o que têm muitas vezes a consequência de levar à perda do implante. Como tal, torna-se muito importante o desenvolvimento de materiais com propriedades antibacterianas.[11]–[15] Segundo W. Chen et al. [3] infecção em implantes está associada à formação de biofilme. Bactérias que se desenvolvem no biofilme exibem maior resistência a fármacos. Biofilmes podem formar-se quando são introduzidos implantes no corpo humano. Estes formam-se na superfície dos implantes e levam à destruição localizada do osso. [3] Segundo Q. Yu et al. [16] foram desenvolvidas vários tipos de superfícies antibacterianas nos implantes. As mesmas podem-se dividir em 3 tipos, conforme o seu mecanismo de actuação:

- 1- Superfícies com bactericida para matar bactérias aderidas;
- 2- Superfícies resistentes a bactérias de forma a prevenir que as mesmas adiram;
- 3- Superfícies que levam a libertação de bactéria que adira às superfícies, por força externa, e, portanto, reduzem a sua adesão a superfície dos implantes;

No entanto, segundo o autor Q. Yu et al. [16] as mesmas superfícies apresentam desvantagens. No caso das superfícies com bactericida, as mesmas podem ficar contaminadas com bactérias mortas que pode causar reacções imunológicas ou inflamações em alguns pacientes. Mais ainda, estas superfícies têm problemas de biocompatibilidade devido a, muitas vezes, os bactericidas afectarem também células do ser humano. No caso de tanto as superfícies resistentes a bactérias como as superfícies que dificultam a adesão das bactérias, as mesmas não previnem a 100% a adesão bacteriana. Isto implica que as bactérias continuam a conseguir aderir ao implante mesmo que em menor número, o que, portanto, não resolve o problema. [16]

Uma forma de solucionar o problema das infecções é através do uso de fármacos em sistemas de libertação controlada. Estes sistemas de libertação, que são implantados no local, têm a função de libertar fármacos de forma controlada ao longo do tempo. Estes sistemas têm sido muito estudados e estão dependentes dos tipos de materiais utilizados, podendo caracterizar-se em 2 tipos:

- 1- Materiais não biodegradáveis;
- 2- Materiais biodegradáveis;

O primeiro tipo de materiais, regra geral, polímeros como o PMMA (Polimetacrilato de metilo) têm a desvantagem de não se decomporem e forçarem uma posterior intervenção cirúrgica para a sua remoção. O segundo tipo de materiais, nomeadamente PLA (*poly L-lactic acid*), PLGA (*poly(lactico-glycolic)*), HA (Hidroxiapatite), entre outros, têm a vantagem de se decomporem no ambiente biológico sem consequências adversas. No entanto, no caso dos primeiros dois polímeros, a sua hidrofobicidade causa problemas de manuseamento na criação dos poros. Isto dificulta a impregnação de fármacos no material.

A Hidroxiapatite tem sido usada sob a forma de revestimentos com o fármaco incorporado na estrutura do revestimento. Contudo a Hidroxiapatite apresenta problemas com fármacos. A acidez ou basicidade dos fármacos interfere com o seu perfil de libertação. Segundo R. Torrecillas et al. [2] fármacos mais acídicos são incorporados com maior eficácia que fármacos mais básicos na hidroxiapatite. Segundo os mesmos autores, os fármacos usados com a hidroxiapatite, dependendo da sua natureza química, terão perfis de libertação diferentes e por vezes não ideais. Os mais acídicos demorarão mais tempo a serem libertados ficando disponíveis em concentrações abaixo das necessárias à morte das bactérias, o que pode conduzir à formação de bactérias multi-resistentes. Os mais básicos poderão ser libertados em concentrações mais elevadas que o recomendado, o que poderá criar toxicidade localizada e problemas de osteointegração. [2] Como tal, e segundo R. Torrecillas et al. [2] a eficácia do perfil da libertação de fármacos do polímero está dependente da similaridade química entre o fármaco e o material e das propriedades físicas do material em si. [17]

Outro problema que deve ser considerado com os sistemas de libertação de fármacos é que os mesmos são temporários. Actualmente com o aumento da esperança média de vida sistemas que só solucionam o problema de forma temporária e não previnem, em maior escala de tempo, infecções poderão não ser os mais adequados para pacientes cujos implantes necessitam durar mais tempo. [9]

Com todas as vantagens que os sistemas de libertação de fármacos possam vir a ter com mais investigação há um problema que se manterá: a capacidade de certos tipos de bactérias desenvolverem resistência aos fármacos é um problema grave [2]. Isto tem levado a que tenha-se ponderado alternativas ao uso de fármacos localizados.

Uma destas alternativas consiste em impregnar a superfície em iões metálicos como por exemplo a prata. [2]–[5], [9], [17], [18] Desde há muito tempo que se sabe que prata tem propriedades antimicrobianas. [19] A prata é bastante usada na medicina como agente antimicrobiano. Prata não é tóxica ao ser humano desde que em baixas concentrações. A prata é conhecida por ser antibacteriana em baixas concentrações. Elevadas concentrações podem causar citotoxicidade o que merece sempre alguma cautela. [2], [9]

Vários estudos foram feitos com a síntese de partículas de hidroxiapatite com prata através de múltiplas metodologias [2]–[6], [9], [10], [17], [18]. Os métodos usados e resultados obtidos de alguns destes estudos podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1 – Múltiplos estudos sobre Hidroxiapatite substituída com Prata, Nesta tabela é possível visualizar as técnicas utilizadas e os resultados principais obtidos.

Autor	Métodos de obtenção da Ag-HA	Métodos de caracterização	Bactérias usadas	Resultados
M. Diaz et al. [2]	<p>- Síntese de HA nanoparticulas por sol-gel;</p> <p>- Precipitação de Ag₂O a partir de uma solução aquosa de nitrato de prata. Posterior redução com uma mistura de gás de Ar/H₂ a baixa temperatura para obter nanoparticulas de Ag aderidas as nanoparticulas de HA;</p> <p>- Criou-se 3 soluções de Ag-HA com concentração 1, 5 e 10 mg/cm³.</p>	<p>-XRD</p> <p>-Microscopia de transmissão electrónica (TEM);</p> <p>-UV-Vis;</p>	<p>-<i>Staphylococcus aureus</i> ;</p> <p>-<i>Pneumococcus</i> ;</p> <p>-<i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>-Ao fim de 24 horas as amostras com as concentrações anteriormente referidas inibiram o crescimento bactérias em 62%, 88% e 100% (sic).</p>
W. Chen et al. [3]	<p>-Titânio puro em forma de discos de 15 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram usados como superfícies para HA;</p> <p>-O Titânio teve tratamento de passivação com ácido nítrico 40% volume a temperatura ambiente por 30 min (ASTM F86-91);</p> <p>-A superfície de titânio foi revestida com “sol” de HA. (sic);</p> <p>-Síntese de HA e Ag-HA pelo método sol-gel;</p> <p>- Os discos de Ti foram revestidos com os “sol” de HA por “spin-coating” a 5000 rpm durante 50s. As superfícies de titânio foram posteriormente secadas a 70°C durante 12 horas e depois tratadas a 650°C durante 3 horas.</p>	<p>-XRD</p> <p>-Ângulo de contacto estudado com um goniómetro;</p> <p>-Ensaio de DNA <i>Double-Stranded</i>;</p> <p>-Medição da actividade da fosfatase alcalina;</p>	<p>-<i>Staphylococcus aureus</i>;</p> <p>-<i>Staphylococcus epidermidis</i>;</p>	<p>-Adesão das bactérias à superfície do titânio com Ag-HA foi significativamente reduzida, sendo o menor na com 1% wt em AgNO₃</p> <p>- No ensaio de “Double-Stranded” não se verificou diferenças nas células em culturas com HA e culturas com Ag-HA 1% wt e Ag-HA 1,5% wt. durante 15 dias em cultura.</p> <p>-ALP baixou em Ag-HA com 1,5% wt ao fim de 12 e 15 dias quando comparado com HA e Ag-HA com 1% wt;</p>

	-Foram preparadas amostras de HA, Ag-HA com 1% wt em AgNO ₃ e Ag-HA com 1,5% wt em AgNO ₃ ;			
W. Chen et al. [4]	-Titânio puro em forma de discos de 15 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram usados como superfícies para a HA; -O Titânio teve tratamento de passivação com ácido nítrico 40% volume a temperatura ambiente por 30 min (ASTM F86-91); -HA e Ag-HA feitos pelo método de <i>co-sputtering</i> ;	-XRD; -Ângulo de contacto estudado com um goniómetro; -Ensaio de profilometria para medição de dureza da superfície	- <i>Staphylococcus aureus</i> ; - <i>Staphylococcus epidermidis</i> ;	-Não existe diferenças de citotoxicidade entre HA e Ag-HA; -Adesão de bactérias à superfície do Ti com Ag-HA foi menor que HA e Ti sem HA; -Angulo de contacto menor na superfície com HA e de Ag-HA, comparado ao Ti sem HA. Não existem diferenças significativas entre os 2 anteriores;
I. Noda et al. [5]	-Discos de titânio puro foram usados (20 mm de diâmetro, 1 mm de espessura) como superfícies para a hidroxiapatite; -CP e Ag-CP preparados pelo método de <i>spraying</i> a 2700°C;	- XRD; - SEM; - ICP-AES;	- <i>Staphylococcus aureus</i> ;	-Adesão de bactérias à superfície do Ti com Ag-CP foi menor que Ti com CP e Ti sem CP;
A. Mocanu et al. [6]	- Solução A, 0,2 M de Ca(NO ₃) ₂ (2500 ml) com 1 ml de <i>nonylphenol</i> . Zn(NO ₃) ₂ , Ag(NO ₃) ₂ e ácido <i>tetrachloroauric (III)</i> foram adicionados até se atingir a composição de 0,2% Zn, 0,25% Ag e 0,025 Au. O pH da solução foi 6,3; -Solução B, 0,12 M de fosfato de di-amónio de hidrogénio (2500 ml) com 1 ml de <i>nonylphenol</i> . O pH da	-SEM; -TEM; -AFM; -XRD; -UV-Vis; -FTIR -ICP-AES;	- <i>Staphylococcus aureus</i> ; - <i>Staphylococcus spp</i> (isolado de uma cabra); - <i>Escherichia coli</i> ; - <i>Bacillus cereus</i> ;	-Adsorção de AgNPs em HA não alterou a estrutura interna da HA; - Taxa de libertação da Ag é mais elevada no 1º dia e diminui com o tempo até ao fim de 7 dias tornando-se constante; -Quantidade de Ag libertada ao fim de

	<p>solução foi ajustado para entre 11,5-12 adicionando uma solução de NaOH. Borohidreto de Sódio foi adicionado para assegurar a completa redução da prata e do ouro;</p> <p>-Solução A foi adicionada rapidamente à solução B sobre grande agitação (800 rpm). A temperatura de ambas as soluções antes da adição era de 70° C. A solução final foi mantida em movimento durante 24 h a 70° C;</p> <p>-O precipitado foi separado por filtração, lavado com água destilada até que nenhum NO₃⁻ fosse detectado. Posteriormente foi congelado a seco a -80°C, sob a pressão de 0,67 Pa;</p> <p>-O material obtido após isso foi calcinado a 650°C durante 8 horas. O produto final foi moído numa <i>planetary ball 60d Pulverisette 6</i>;</p> <p>-Solução de 0,001 M de AgNO₃, (2000 ml) foi misturada com 0,104g de glucose e 80 µl de <i>TEOS</i> (Si(OC₂H₅)₄) dissolvido em 20 ml de etanol. A temperatura das soluções foi de 50°C. Após a mistura, o pH da solução foi ajustado para 11 com uma solução de 10% KOH.</p> <p>-A solução de Ag coloidal foi adicionada gradualmente a HA preparada anteriormente sobre vigorosa agitação. Isto foi feito até que a composição de 9% wt de Ag fosse atingida nas NPs. A amostra foi posteriormente agitada</p>		<p>-<i>Candida albicans</i>;</p>	<p>40 dias é muito inferior à quantidade presente na HA;</p> <p>-Amostras de Ag-HA com mais de 2,5% wt prata demonstraram inibição total local a todas as bactérias estudadas;</p> <p>-Maior concentração de prata implicou maior inibição;</p> <p>-Após retirar as amostras inibição local manteve-se;</p> <p>-Amostras de HA com baixa concentração de zinco e ouro e Ag (0,2%, 0,025% e 0,25%) e sem AgNPs não mostraram inibição;</p>
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	----------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p>com um agitador magnético durante 4-5h à temperatura ambiente. Por último, a solução foi filtrada e secada a seco semelhante ao procedimento anterior na obtenção das NPs.</p> <p>-Por fim obteve-se matrizes orgânicas com as NPs de HA com AgNPs em diferentes concentrações. O método em causa de obtenção das matrizes não irá ser referido aqui mas tal pode ser consultado no artigo [6].</p>			
V. Stanic et al. [9]	<p>- HA pura e HA alterada foram preparadas pelo método da neutralização;</p> <p>- Foram preparadas amostras de HA com diferentes concentrações em Ag;</p>	<p>- XRD;</p> <p>- FTIR;</p> <p>- TEM;</p> <p>- ICP-AES;</p> <p>- AFM;</p> <p>- Teste de Hemolise;</p>	<p>-<i>Staphylococcus aureus</i> ;</p> <p>-<i>Bacillus cereus</i> ;</p> <p>-<i>Candida albicans</i> ;</p>	<p>-Todas as amostras de HA com Ag afectaram as bactérias sendo que a têm maior composição em Ag afectou mais.</p> <p>-E. Coli é a mais susceptível à prata.</p> <p>-O teste de hemólise indicou que as amostras eram biocompatíveis.</p>
C. Shi et al. [10]	<p>- Nanocristais de HA e Ag-HA foram sintetizadas pelo método hidrotérmico.</p> <p>- Foram preparadas amostras de Ag-HA com diferentes concentrações em Ag;</p>	<p>- XRD;</p> <p>- SEM;</p> <p>- Potencial de Zeta;</p> <p>- Ensaio de adsorção em Albumina de Soro Bovino;</p>	<p>-<i>Staphylococcus aureus</i>;</p> <p>-<i>Escherichia coli</i>;</p>	<p>- Libertação de iões de prata foi em concentração (197 ppm) inferior à concentração considerada tóxica (300 ppm);</p> <p>- Potencial de Zeta superior (-21,4 mV) na amostra de 197 ppm de Ag-HA para HA sem Ag (-25,7 mV);</p> <p>- Todas as amostras de Ag-HA</p>

				<p>afectaram as bactérias sendo que a têm maior composição em Ag afetou mais.</p> <p>- Quanto mais Ag tem a amostra menor a capacidade de proliferação celular.</p> <p>- Em valores mais baixos de Ag nas amostras não existe diferenças significativas quando comparado com HA sem Ag ao nível da proliferação celular.</p>
<p>P. N. Lim et al. [17]</p>	<p>-Múltiplos visto tratar-se de um artigo de revisão aos estudos já realizados na área.</p>	<p>-Múltiplos;</p>	<p>-<i>Staphylococcus aureus</i> ; -<i>Bacillus Cereus</i> ; -<i>Candida albicans</i> ; -<i>Staphylococcus epidermidis</i> ; -<i>Pneumococcus</i> ; -<i>B. subtilis</i> ; -<i>MRSA</i>; -<i>S. mutans</i>; -<i>Escherichia coli</i>;</p>	<p>-Em todos os estudos analisados verificou-se uma redução significativa do número de bactérias vivas independentemente do tipo de técnica escolhida para revestimento;</p> <p>-A forma de libertação da Ag da HA parece variar conforme a técnica usada para revestimento;</p> <p>-Citotoxicidade em baixas concentrações de Ag na HA em todos os estudos é desde muito reduzida a nula. O tipo de célula usado para os múltiplos estudos não parece ter influenciado este resultado.</p>

				<ul style="list-style-type: none"> - Contudo existem problemas, por um lado existe citotoxicidade muito devido à taxa de libertação da Ag, por outro o efeito antibacteriano é temporário. - Uma solução estudada consiste em combinar Si com Ag nas HA e isto demonstrou resultados promissores. -O autor no entanto acha que deve haver ainda mais estudos.
N. Sanpo et al. [18]	<ul style="list-style-type: none"> - Ag-HA foi preparada através da substituição do cálcio por um ião de prata do composto de AgNO₃; - A percentagem de prata foi variada entre amostras. A síntese é semelhante a HA pura. Uma solução de Ca(OH)₂ é aquecida e mantida a 98°C. Outra solução aquosa de H₃PO₄ foi lentamente adicionada (em gotas) à solução anterior a um ritmo de 2 L/h; - A mistura foi agitada, durante o processo, com um agitador magnético de forma a garantir a homogeneização da solução; - Quando o pH começou a baixar rapidamente de 12, adicionou-se AgNO₃ à solução. Posteriormente NH₄OH foi adicionada à solução para aumentar o pH até cerca de 8. A suspensão foi deixada a mexer durante 2 h a 98 °C. A 	<ul style="list-style-type: none"> -SEM; -XRD; 	- <i>Escherichia coli</i> ;	<ul style="list-style-type: none"> - Maior concentração de Ag-HA levou a uma maior inibição das bactérias; - Todas as amostras com Ag-HA inibiram, em parte, o número de bactérias;

	<p>suspensão foi deixada durante a noite para estabilizar. A mesma foi muito bem lavada durante pelo menos 3 dias antes de ser posta em um fogão a 100 °C. O “bolo” de HA foi posteriormente esmagado em pó.</p> <ul style="list-style-type: none">- Uniu-se à Ag-HA, pós de PEEK que são mais dúcteis. <p>Ambos os pós foram misturados em taxas de 80:20, 60:40, 40:60 e 20:80 (% wt);</p> <ul style="list-style-type: none">- A mistura final será o revestimento de amostras de vidro;			
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--	--

De uma forma geral, os estudos presentes na tabela 1 indicam que a Prata melhora de forma significativa as propriedades antibacterianas da Hidroxiapatite mantendo a biocompatibilidade.

Segundo I. Noda et al. [5], no Japão, mais de 50% das infecções relacionadas com cirurgia ortopédica devem-se a 2 tipos específicos de bactérias, a *Staphylococcus aureus* e a *Staphylococcus epidermidis*. Isto explica a razão de uma grande porção dos estudos serem com as mesmas, como é possível ver na tabela 1. I. Noda et al [5] também refere que a razão da prata ser antibacteriana deve-se ao facto de esta impedir a replicação do DNA das bactérias. Segundo V. Stanic et al. [9], o mecanismo de acção dos iões de prata nos microrganismos é muito complexo. Existem várias propostas para explicar os efeitos antimicrobianos da prata. Segundo o mesmo, os iões ligam-se à membrana da célula levando a uma modificação da sua estrutura, permeabilidade e inactivação de proteínas. Por fim os iões penetram a membrana entrando na célula onde inibem múltiplas proteínas presentes no citoplasma e ribossoma. Os mesmos interagem com os ácidos nucleicos impedindo tanto a replicação como a tradução do ADN levando à morte celular.

Existem várias técnicas de deposição da HA cada uma com as suas vantagens e desvantagens, como é possível visualizar na tabela 2.

Tabela 2 – Tabela adaptada de Dorozhkin et al. [20] que mostra as vantagens e desvantagens de múltiplas técnicas de deposição de fosfatos de cálcio.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Pulverização por plasma	-Simples e flexível; -Revestimentos uniformes; -Baixo custo; -Elevada taxa de deposição;	-“Line of sight”; -Elevadas temperaturas; -Elevado arrefecimento;
Pulverização por “oxy-fuel” a elevada velocidade	-Elevada taxa de deposição; -Melhor resistência à corrosão e desgaste; -Melhor biocompatibilidade;	-“Line of sight”; -Elevadas temperaturas; -Elevado arrefecimento;
“RF magnetron sputtering”	-Revestimento uniforme em superfícies lisas; -Elevada adesão e pureza; -Depósitos densos e sem porosidade; -Bom para cobrir pequenos defeitos; -Pode revestir substratos sensíveis a calor;	-“Line of sight”; -Elevado custo; -Baixa taxa de deposição; -Produz revestimentos amorfos; -Elevadas temperaturas previnem incorporação de compostos biológicos;
“Pulsed laser deposition (laser ablation)”	-Revestimentos com fases amorfas e cristalinas; -Revestimentos densos e porosos; -Revestimentos com elevada adesão; -Pode produzir uma multiplicidade de revestimentos com diferentes materiais;	-“Line of sight”; -Elevado custo; -Elevadas temperaturas; -Falta de uniformidade;
Deposição assistida por feixe de iões	-Revestimento uniforme; -Fiável e reprodutível; -Elevada adesão; -Zona de mistura entre o revestimento e o substrato;	-“Line of sight”; -Elevado custo; -Revestimentos amorfos;
Deposição por pulverização electrostática	-Baixo custo; -Fácil “set-up”; -Condições ambiente; -Permite uma elevada escolha de precursores;	-“Line of sight”; -Problemas a revestir superfícies grandes; -Baixa taxa de deposição; -Necessita de elevadas

		temperaturas para decompor solventes e precursores;
Revestimento por “dip”	-Fácil “set-up”; -Baixo custo; -Revestimentos aplicados rapidamente; -Pode revestir substratos complexos;	-Elevadas temperaturas devido à sinterização; -Fendas;
Revestimento por “spin”	-Fácil “set-up”; -Baixo custo; -Revestimentos aplicados rapidamente;	-Elevadas temperaturas devido à sinterização; -fendas; -Não pode revestir substratos complexos;
Sol-Gel	-Pode revestir formas complexas; -Baixas temperaturas; -Revestimentos finos; -Pode incorporar moléculas biológicas;	-Alguns necessitam de atmosfera controlada; -Materiais caros; -Elevada permeabilidade; -Difícil de controlar porosidade; -Baixa resistência; -A HA necessita de sinterização[21];
Deposição “electrophoretic”	-Revestimentos com espessura uniforme; -Elevadas taxas de deposição; - “Set-Up” simples; -Baixo custo; -Pode revestir substratos complexos; -Pode incorporar moléculas biológicas;	-Difícil de produzir revestimentos sem fendas; -Elevadas temperaturas de sinterização;
-Deposição electroquímica catódica	-Boa conformidade de formas; -Temperatura ambiente; -Revestimentos com espessura uniforme; -Curta duração; -Pode incorporar moléculas biológicas;	-Por vezes cria revestimentos “stressed” o que causa má adesão ao substrato; -Necessita de bom controlo dos parâmetros do electrólito;
Processo “biomimetic”	-Baixas temperaturas;	-Taxa de deposição muito baixa;

	<ul style="list-style-type: none"> -Pode formar apatite com forma de osso; -Pode revestir formas complexas; -Pode incorporar moléculas biológicas; 	<ul style="list-style-type: none"> -Necessita de um pH constante; -Necessita de constante fornecimento das soluções de simulação (SBF, etc)
Deposição hidrotérmica	<ul style="list-style-type: none"> -Revestimentos cristalinos; -Pode revestir formas complexas; 	<ul style="list-style-type: none"> -Elevadas temperaturas e pressão;
Deposição térmica no substrato	<ul style="list-style-type: none"> -Deposição é melhorada com o calor e a corrente; -Podem se formar diferentes fases de CP; 	<ul style="list-style-type: none"> -Técnica pouco comum; -Revestimentos de diversas cristalinidades;
Deposição por pressionamento isostático a quente;	<ul style="list-style-type: none"> -Produz revestimentos densos; -Estrutura homogénea; -Elevada uniformidade; -Elevada precisão; -Não tem limitações na forma ou dimensão; 	<ul style="list-style-type: none"> -Não pode revestir substratos complexos; -Elevada temperaturas; -Elevado custo; -Diferenças nas propriedades elásticas; -Não incorpora moléculas biológicas; -Interage ou remove material de encapsulamento;
Oxidação por “micro-arc”	<ul style="list-style-type: none"> -Simples, económica e amiga do ambiente; -Adequada para revestir geometrias complexas; 	<ul style="list-style-type: none"> -Trata-se mais de uma técnica de pré-deposição;
Método da mistura dinâmica	<ul style="list-style-type: none"> -Elevada adesão; 	<ul style="list-style-type: none"> -“Line of sight”; -Elevado custo; -Produz revestimentos amorfos;

No entanto, a técnica que é considerada a padrão e a mais usada na deposição trata-se da Pulverização por plasma.[22]–[25]. Contudo segundo Barry et al. [22] existem algumas preocupações inerentes à técnica. Nomeadamente, a alteração da fase cristalina da HA e da estrutura granular devido às elevadas temperaturas da técnica. Estas alterações podem levar a que exista uma maior dissolução da HA in vivo e, como tal, menor osteointegração, a longo prazo. A técnica de pulverização por plasma pode atingir a temperatura de 500°C, no substrato metálico, aquando da deposição do revestimento. Segundo o mesmo autor, é ainda aceite que os revestimentos depositados por plasma têm piores propriedades mecânicas a curto (extensão, compressão) e a longo prazo (fadiga).[22]. Para piorar a situação, Barry et al. [22] refere que existem estudos que indicam que aumentos rápidos de temperaturas podem levar a alterações das fases do titânio. Isto têm a consequência de afectar as propriedades mecânicas do mesmo. Isto é comum acontecer em implantes mais pequenos como por exemplo: Parafusos de fixação ou implantes dentários. A razão de tal deve-se à menor área de superfície por onde o calor pode precipitar levando a uma acumulação de forma mais rápida. De referir que existem alternativas à pulverização por plasma, como por exemplo, o Sol-Gel. No entanto esta tem a consequência de necessitar de uma posterior sinterização o que na prática, não resolve o problema[22], [24], [26]. Observando a tabela 1 verifica-se que o problema da temperatura elevada é comum a uma grande parte das técnicas. Uma outra alternativa trata-se de uma técnica denominada de Coblast®.

Coblast® é uma técnica de deposição de revestimentos em superfícies metálicas. A técnica consiste na deposição de um dito pó na superfície de um metal por micro-pulverização, podendo ser executado em ambiente sem vácuo. Resumidamente, através do uso de um agente abrasivo com ar comprimido “pulveriza-se” a superfície metálica com esse mesmo agente. A partir daqui existem 2 possibilidades. Ou o aparelho têm um aspersor (nozzle) e então o agente a depositar encontra-se misturado com o agente abrasivo no alimentador (powder feeder), como é possível ver na figura 1. Ou então existem 2 aspersores (nozzles) e o agente abrasivo é pulverizado na superfície metálica, ao mesmo tempo que é pulverizado o agente a depositar (à mesma pressão). O agente abrasivo remove a camada de óxido da superfície do metal e ao mesmo tempo é incorporado o agente a depositar na superfície reactiva. De referir que parte do agente abrasivo também acaba por ficar incorporado no revestimento, sendo esta uma desvantagem da técnica. As vantagens desta técnica são a sua simplicidade, baixo custo de operação e do equipamento e, a mais relevante, baixa temperatura de deposição. Múltiplos estudos demonstram que Coblast® Produz revestimentos com HA biocompatíveis, homogêneos, muito estáveis e com composições muito semelhantes ao pó a depositar. Mais ainda, todas as superfícies estudadas demonstraram maior adesão nos revestimentos quando comparados com à técnica de pulverização por plasma. [22]–[26]

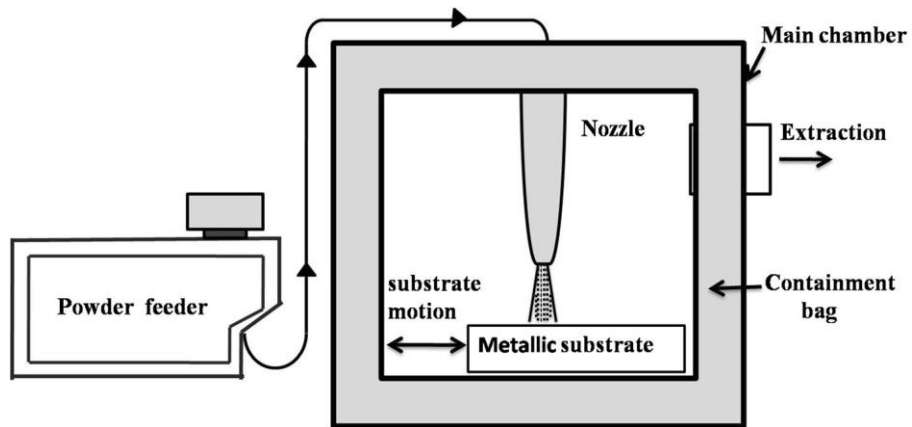


Figura 1 - Esquema de um aparelho de Coblast® com 1 aspersor (nozzle). [23]

O objectivo desta dissertação é assim de produzir revestimentos de Ag-HA, por Coblast®, que fossem biocompatíveis e antibacterianos. Para que tal seja possível é também apresentado um estudo sobre a produção de Ag-HA pelo método sol-gel..

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1 – Preparação do Sol-Gel de Ag-HA

Inicialmente aplicou-se o protocolo de preparação de Qu, et al. [21]. Resumidamente preparou-se os precursores de cálcio e fosforo (0,03mol) em 65 ml de etanol absoluto. O precursor de cálcio foi preparado através da adição de nitrato de cálcio tetra-hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ACS reagente 99-103% da Sigma-Aldrich, 0,1mol) a etanol absoluto ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, Analytical Grade, ACS 99% Scharlau). Por sua vez, o precursor de fosforo foi preparado adicionando pentóxido de fosforo (P_2O_5 , ACS reagente $\geq 98\%$ da Sigma-Aldrich, 0,03mol) a etanol absoluto. Pretendeu-se assim manter a taxa de 1,67 Ca/P. Deixou-se 6 horas em agitação para garantir a homogeneidade. Posteriormente adicionou-se as soluções uma a outra e deixou-se em agitação até estar homogéneo. Seguidamente o sol transparente deveria ficar opaco ao estar a 60°C em banho-maria de óleo de silicone (Baysilone Sigma-Aldrich) durante 1 hora. Tal não aconteceu. Deixou-se o “sol-gel” ao ambiente durante 48 horas. Depois adicionou-se a solução de nitrato de prata (AgNO_3 , PA-ACS-HA, 99,8%, 1,6% m/m) com etanol absoluto ao “sol-gel”. A solução final foi agitada a 500 rpm durante 15 minutos para garantir a homogeneidade. Posteriormente evaporou-se o solvente do etanol a 80°C . Por fim colocou-se a hidroxiapatite, a 80°C , durante 24 horas.

Ao mesmo tempo, e como forma de reduzir o tempo passado nas múltiplas fases do protocolo anterior alterou-se o mesmo. Estas alterações ficaram como protocolo final. As razões prendem-se pela maior pureza da HA produzida pelo novo protocolo, como é possível ver pelas figuras 2 e 3 de dos difractogramas e Espectros de Infravermelhos obtidos.

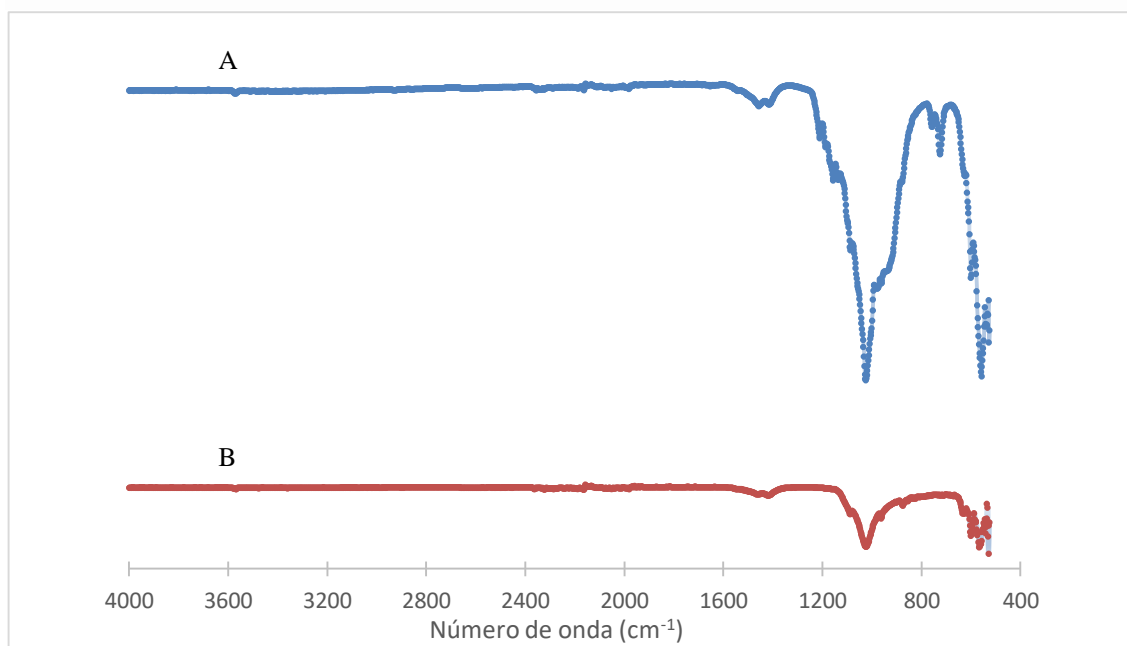


Figura 2 - Espectro FTIR das hidroxiapatites obtidas por diferentes protocolos. Em A) trata-se da amostra com o protocolo inalterado. Em B) é a amostra com o protocolo que acabou por ser o protocolo aplicado durante a dissertação. A amostra A) tem uns picos entre $750\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ que são desconhecidos.

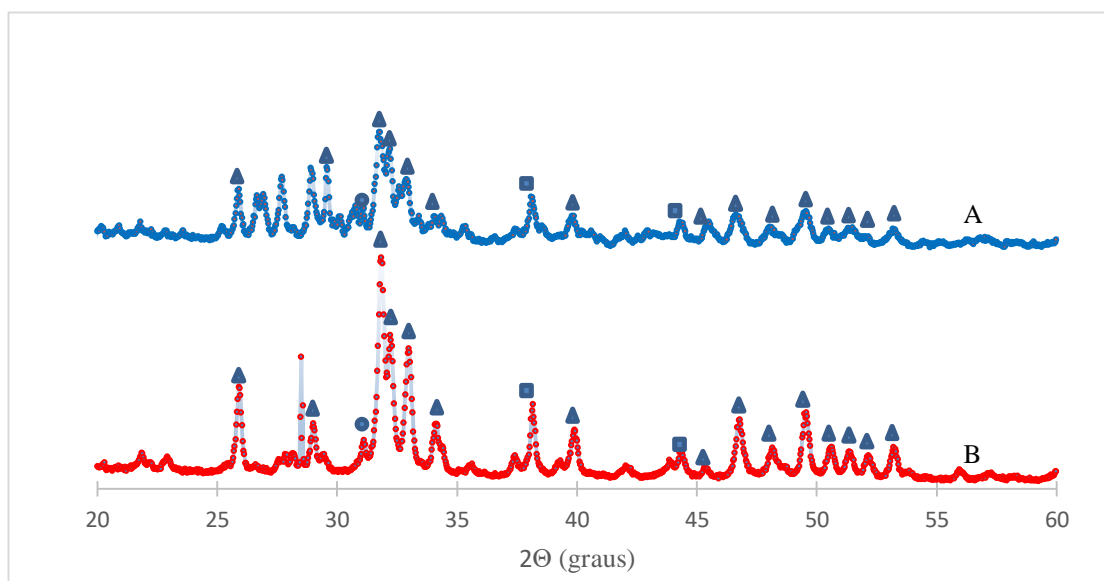


Figura 3 - Difractogramas das hidroxiapatites obtidas por diferentes protocolos. Em A) trata-se da amostra com o protocolo inalterado. Em B) é a amostra com o protocolo que acabou por ser o protocolo a aplicado durante a dissertação. Verifica-se em A) a existência de uns picos entre 25-30 graus que são de compostos desconhecidos. A amostra B) assemelha-se mais ao que se pretende obter. Legenda: ▲ trata-se de HA, ■ AgNPs [21], [34], [35]. ● β-TCP [36].

Verifica-se na figura 2 a existência de uns picos no protocolo inalterado que não são identificáveis. Por sua vez na figura 3, nos difractogramas encontra-se uns picos entre 25°-30° que são de compostos desconhecidos. De uma forma geral verifica-se que a HA mais pura foi a que foi realizada com base no protocolo alterado. Essa, juntamente com a simplificação do protocolo, foram as razões principais das alterações ao protocolo. Sendo assim, as alterações foram:

A solução final do precursor de cálcio foi uma solução com 788,6 g/L de nitrato de cálcio tetra-hidratado (3,33(3) mols). A solução final do precursor de fosforo foi uma solução com 141,8 g/L de pentóxido de fosforo (1 mol). Imediatamente após preparação, ambas as soluções foram deixadas sob agitação magnética (500 rpm) durante 30 minutos para homogeneização. Seguidamente, juntou-se ambas as soluções, com a atenção de adicionar o precursor de fósforo ao precursor de cálcio. A razão de tal foi que era a única configuração que, após vários testes de ordem de adição, não precipitava (anexo 1). Deixou-se a solução final em agitação durante 30 minutos a 500 rpm para homogeneização. Preparou-se um banho-maria em óleo de silicone a 60°C aonde se colocou a solução durante 1 hora. Deixou-se a solução arrefecer durante 30 minutos. De seguida preparou-se uma solução nitrato de prata em etanol absoluto. As concentrações preparadas foram de 1%, 2%, 4%, 7% e 10% de massa do nitrato de prata comparativamente à massa total dos precursores. Deixou-se a solução de nitrato de prata em agitação de 500 rpm durante 1 hora visto o nitrato de prata ter uma baixa solubilidade em etanol absoluto. Seguidamente, juntou-se a solução de nitrato de prata à mistura dos precursores. Agitou-se a mesma solução a 500 rpm durante 30 min. Posteriormente aqueceu-se o banho-maria a 100°C onde se colocou a solução até se começar a formar um gel. Seguidamente colocou-se a amostra numa estufa a 80°C durante aproximadamente 24 horas para secar o material produzido. Por fim com o

auxílio de um almofariz de cerâmico, moeu-se a amostra até se obter um pó amarelo (ou branco se HA controlo – amostra produzida sem adição de nitrato de prata).

2.2 – Sinterização e filtração da Ag-HA

A sinterização da Ag-HA foi feita em um forno a 600°C. O perfil de crescimento da temperatura foi de aproximadamente 10°C por minuto. O patamar de 600°C durou 1 hora e o perfil de arrefecimento foi de 5°C por minuto. Por fim realizou-se uma filtração após a sinterização para filtrar possíveis restos de reacção. Para a filtração foi preparada uma suspensão do pó sintetizado, em etanol absoluto, que se deixou em agitação magnética (500 rpm) durante 15 min. Posteriormente verteu-se a suspensão no papel de filtro (Whatman Cat N° 1001-110 com diâmetro de 110 mm) e retirou-se o filtrado. Por fim deixou-se o filtrado a secar numa estufa a 80°C durante 24 horas.

2.3 – Diálise da Ag-HA

Antes de se poder proceder à avaliação da citotoxicidade, procedeu-se a medição do pH das várias amostras de HA. Verificou-se a existência de um problema de pH com as amostras pelo facto de este ser muito elevado. Para não correr o risco de a avaliação da citotoxicidade ser afectada pelo pH, foi necessário fazer diálise a todas as amostras de Ag-HA. Pretendia-se assim tornar o pH inferior a 8,5. De forma simplificada, suspendeu-se as várias amostras de Ag-HA em água millipore. Deixou-se as amostras em agitação durante 15 minutos. Posteriormente colocou-se as suspensões nas membranas de diálise (Spectra/Por, Standard RC tubing, MWCO: 12-14Kda). Por fim, colocou-se as mesmas membranas em recipientes com água millipore, em agitação de 200 rpm. Foi-se trocando a água dentro dos recipientes de 2 em 2 horas. No final de cada dia media-se o pH da água dentro dos recipientes e da água dentro das membranas. Ao fim de aproximadamente 2 semanas conseguiu-se dialisar 500 mg de cada amostra com pH inferior a 8,5.

2.4 – Avaliação da citotoxicidade dos pós de Ag-HA

A avaliação da citotoxicidade da Ag-HA foi realizada através de contacto indirecto (método do extracto). Os procedimentos de segurança recomendados pela agência de protecção da saúde foram aplicados [27]. De notar que as amostras de Ag-HA foram deixadas numa estufa a 130°C durante 24 horas para esterilização. Sumariamente, suspendeu-se 122 mg de cada uma das várias amostras de hidroxiapatite em 2 ml de meio de cultura. Colocaram-se estas amostras na estufa a 37°C, em agitação, durante 24 horas, para obtenção do extracto. Ao mesmo tempo, prepararam-se as células vero, células epiteliais do rim de macaco. A sementeira foi realizada através da colocação em cada poço, de uma

placa de 96 poços, de 100 µl de meio com células. A densidade da sementeira foi de 25 mil células por cm². Colocou-se a placa na incubadora a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂.

24 horas depois, retirou-se da incubadora a placa e o meio em contacto com a Ag-HA. Colocou-se o meio que esteve em contacto com uma das amostras num microtubo (cerca de 833 µL) e extraiu-se o meio das células nos poços. Adicionou-se 100 µL do extracto a cada uma das 5 réplicas da primeira condição (concentração 61 mg/ml). Após isto adicionou-se 500 µL de meio completo ao extracto restante para proceder a uma diluição de 2,5 vezes. De seguida colocou-se 100 µL em cada 1 dos 5 poços na segunda condição (24,4 mg/ml). Repetiu-se o protocolo até chegar-se à oitava condição (7^a diluição por um factor 2,5). O procedimento foi repetido para as 3 restantes amostras. Ao controlo positivo foram adicionados 10 µl de DMSO, composto que é citotóxico, e no controlo negativo não se alterou o meio. Após isto colocou-se a placa na incubadora durante 48 horas.

Ao fim das 48 horas retirou-se a placa da incubadora. De seguida, retirou-se o meio aos poços e colocou-se uma solução de meio completo com resazurina em todos os poços (90% de meio completo com 10% de uma solução de resazurina a 0,2mg/ml em PBS). A resazurina foi o composto escolhido para avaliar a viabilidade celular [28]. É com base na mudança de cor do meio de azul para rosa que se consegue verificar a presença de células vivas[28]. Colocou-se a placa na incubadora durante 4 horas. Por fim mediram-se as absorvâncias a 570 nm e a 600 nm com um leitor de microplacas Biotek ELX800.

As amostras de 7% e 10% Ag-HA foram feitas numa data posterior com similar procedimento. A únicas alterações foram as seguintes: 1- Não foram feitas tantas diluições (5 em vez de 8); 2- Em 16 poços colocou-se o meio que esteve no frigorífico em contacto com as amostras de 0%, 1% 2% e 4% m/m Ag-HA durante 30 dias a 4°C, em estático, para estudar se existia diferenças na toxicidade.

2.5 – Preparação dos revestimentos via Coblast®

Para se poder realizar os revestimentos via Coblast® com a amostra de 4% Ag-HA, foi necessário limpar as amostras de titânio (Ti-6Al-4V com 15mm × 15mm × 1mm) com detergente a 55°C durante 30 minutos em ultrassons. Posteriormente, lavou-se as amostras com água corrente e com metanol durante 5 minutos. Deixou-se as amostras a secarem durante 12 horas. No dia seguinte preparou-se as misturas para revestir as amostras de titânio. As composições das misturas encontram-se presentes na tabela 3.

Tabela 3- Composição teórica dos revestimentos preparados via Coblast®. Os valores presentes na tabela são de percentagem do volume total.

Designação	Abrasivo (Al_2O_3)	HA	4% Ag-HA
Ti-HA	50%	50%	0%
Ti-1Ag-HA	50%	33,5%	16,5%
Ti-3Ag-HA	50%	16,5%	33,5%
Ti-4Ag-HA	50%	0%	50%

De referir que as percentagens indicadas na tabela 3 são em volume/volume, já que era necessário preparar 600 ml da mistura para ser misturado, de forma eficiente, no misturador em V. As diferentes percentagens de HA foram usadas como forma de estudar diferentes composições de Ag e seus efeitos nas bactérias e nas células. Na figura 4 encontra-se uma representação do mesmo misturador.

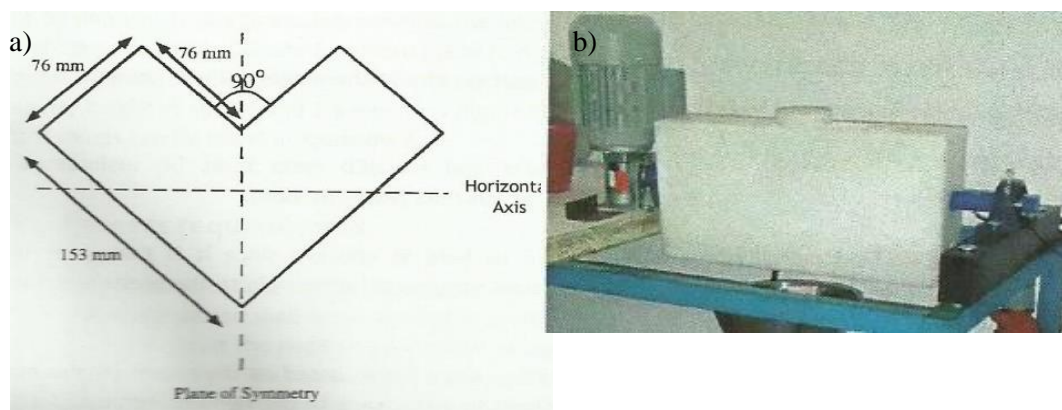


Figura 4 - Imagens do Misturador em V. Em a) encontra-se uma representação esquemática da porção interna do misturador, com a forma da letra V, onde ficam colocados os pós que se pretendem misturar[45]. Em b) a porção externa do misturador que se encontra presa em um aparelho que a faz girar.

O misturador girava a 20 rpm e ficou a misturar durante 10 minutos. Após isto, extraiu-se as misturas do misturador e colocou-se as mesmas no reservatório (Powder Insert) que é possível visualizar na figura 5 a) e 5 b) (indicado com as setas).

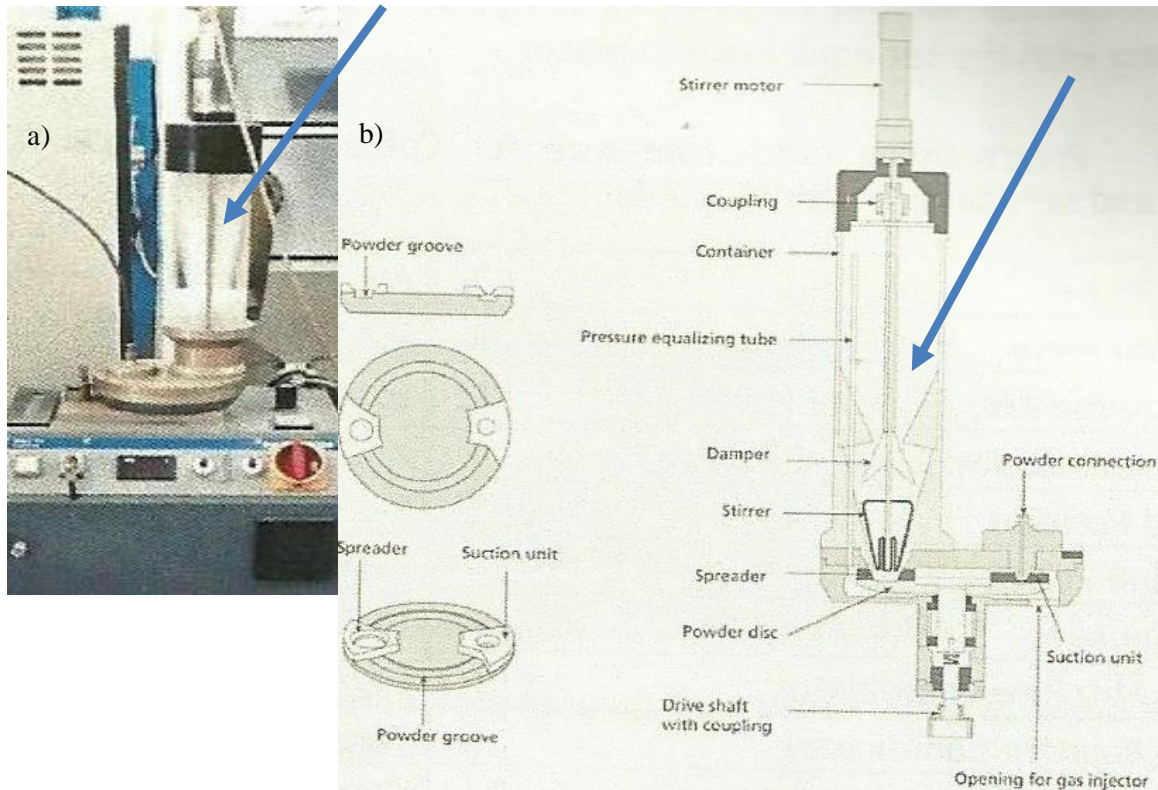


Figura 5 – Alimentador (Powder Feeder Single-10C da Sultzer Metco) com um reservatório (Powder Insert) acoplado em a). Em b) encontra-se uma representação do interior do reservatório onde é possível ver todos os seus componentes. As setas representam onde ficava colocada cada mistura.

Em simultâneo colocou-se as amostras de titânio numa plataforma semelhante à representada na Figura 6.

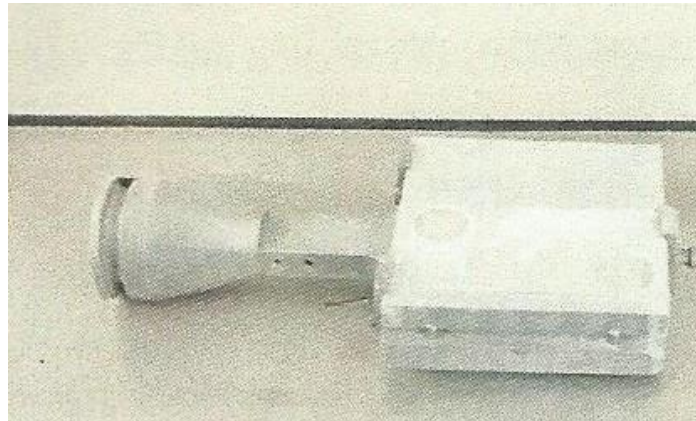


Figura 6 - Plataforma usada onde se colocou as placas de titânio onde iriam ser feitos os revestimentos.

Nessa mesma plataforma colou-se uma fita adesiva para colar as amostras de titânio. Colocou-se a plataforma dentro de uma camara como é possível visualizar na Figura 7B. Na Figura 7A encontra-se a parte externa da camara com um ecrã onde se insere as instruções que o programa deve tomar.

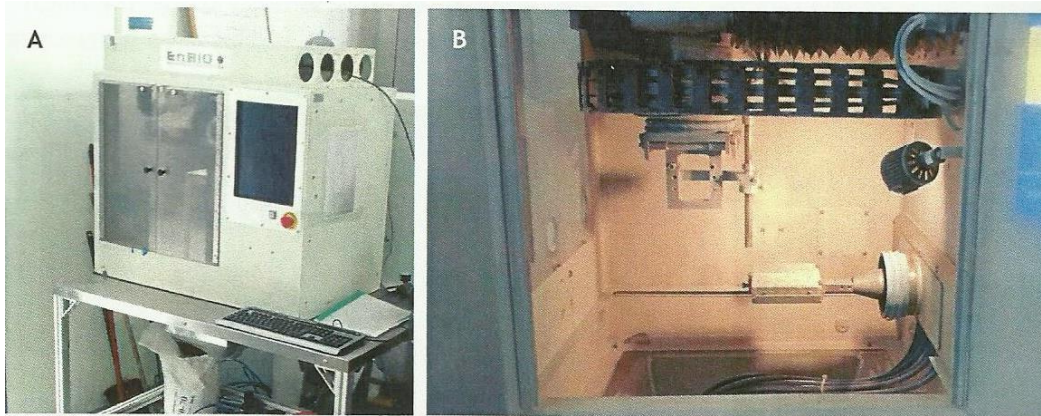


Figura 7 - Câmara do Coblast®. Em A) encontra-se a parte externa da câmara com um ecrã e teclado para se inserir instruções. Em B encontra-se a parte interna da câmara onde se coloca a plataforma com as amostras. Também é possível visualizar o aspersor em B.

Após colocar a plataforma era verificado se o código precisava de ajustes. O código que foi criado programava o hardware para, através de um movimento vaivém, revestir as amostras. A figura 8 tenta representar o que o código fazia. Na mesma figura 8 está representado 2 distâncias (1) e 2)) que eram necessárias ajustar entre revestimentos de amostras diferentes. A razão disto está no erro humano associado na colagem das amostras de titânio à plataforma. Ao colar-se as amostras nas fitas a distância 2), entre filas de amostras de titânio, variava. No caso da distância 1) a mesma não variava, no entanto, o número de movimentos vaivém entre cada fila de amostras de titânio poderia variar de forma a garantir a criação de um revestimento homogéneo. Isto só podia ser visualizado com base na distancia 1). A distância 1) foi decidida com base no diâmetro que a mistura bombeada fazia quando ia contra a amostra de titânio.

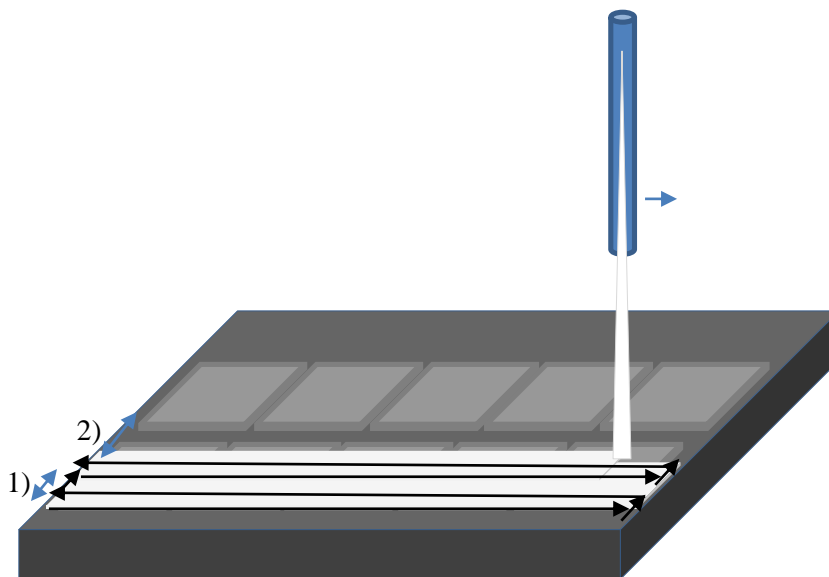


Figura 8 - Representação da plataforma aonde se colocam as placas de titânio (cubos a cinzento) para fazer o revestimento. Também está representado o movimento de vaivem (setas) que foi planeado no código executar para realizar o revestimento de forma ideal. A distância 1) trata-se da distância entre cada movimento vaivem numa fila de placas de titânio. A distância 2) trata-se da distância entre cada fila de placas de titânio. Por fim, a branco encontra-se uma representação da mistura para melhor visualização.

Após isto, prosseguiu-se com o revestimento bombeando a mistura. De referir que a pressão de bombeamento foi de aproximadamente 6 Bar. A taxa de fluxo de massa foi de aproximadamente 40 g/min. Um típico revestimento de 15 amostras de titânio demorava aproximadamente 2 minutos. As amostras revestidas foram limpas em ar comprimido para retirar restos da mistura. Por fim, há a mencionar que parte das placas de Ti não foram revestidas para serem usadas como controlo.

2.6 – Avaliação da citotoxicidade dos revestimentos

A citotoxicidade dos revestimentos foi testada através do contacto directo entre as células e os revestimentos. Neste caso utilizaram-se osteoblastos (linha celular Saos-2) para testar a citotoxicidade. O protocolo em si foi muito semelhante ao anteriormente mencionado na avaliação da citotoxicidade dos pós de Ag-HA. Resumidamente, colocou-se 4 placas de Ti, por cada uma das condições, em 2 placas de Petri estéreis. Ou seja, foram usadas 10 placas de petri e 20 placas de Ti (5 condições). Seguidamente mergulharam-se as amostras em etanol durante 15 minutos. Ao mesmo tempo, prepararam-se as células. A sementeira foi realizada através da colocação em cada placa de 4 ml de meio com células através do auxílio de uma micropipeta. A densidade da sementeira foi de 25 mil células por cm². Colocou-se as placas na incubadora a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂ durante 24 horas.

Posteriormente retirou-se as placas de petri da incubadora. Retirou-se o meio às placas de Ti e colocaram-se as placas de Ti em outras placas de Petri passando a existir assim 4 placas de Petri por condição. A todas as placas adicionou-se meio completo com resazurina (90% de meio completo com 10% de resazurina). Colocaram-se as placas na incubadora durante 4 horas. Posteriormente, mediram-se as absorvâncias a 570 nm e a 600 nm. Por fim colocou-se novo meio completo nas placas de petri com os revestimentos e colocaram-se na incubadora. A cada 2 ou 3 dias repetiu-se o procedimento de retirar-se o meio das placas de Ti e colocar-se meio completo com resazurina para avaliar a evolução da população de células.

2.7 – Estudo antibacteriano dos revestimentos

Pretendeu-se estudar o efeito que teria o contacto dos revestimentos preparados com bactérias. Para tal estudou-se o efeito antibacteriano em duas espécies de bactérias distintas, nomeadamente a *E.coli* (Gram negativa) e a *S.aureus* (Gram positiva). Preparou-se um stock de meio semi-sólido LB (Luria Broth; [29]) com agar. O meio aquoso continha 10 g/L de triptona, 5g/L de extracto de levedura e 5g/L de NaCl e 8g/L de agar que dava a consistência semi-sólida quando presente a temperaturas mais elevadas como 50°C. Colocou-se em cada caixa de petri (50 mm de diâmetro) uma amostra de titânio, e adicionou-se 8 ml de meio LB semi-sólido com cerca de 10³ CFUs por ml da bactéria indicadora, *E. coli*, ou *S. aureus*. Foi realizada uma placa referente a cada condição e com cada cultura da bactéria

indicadora. Após solidificação do meio as placas foram colocadas numa incubadora a 37°C durante 18h. No dia seguinte contou-se o número de colónias presentes em cada placa à superfície do meio na zona da placa de titânio.

Adicionalmente, realizou-se uma segunda metodologia baseada no protocolo realizado por Huang et al. [30]. Resumidamente mergulhou-se cada revestimento em 5 ml de culturas de *S. aureus* com aproximadamente 10⁸ CFUs por ml em meio LB seguida de incubação a 37°C durante 6 horas. Posteriormente os revestimentos foram lavados com cuidado com PBS e imersos em 2,5% glutaraldeído durante 2 horas. Antes do ensaio de SEM os revestimentos foram lavados em PBS e imersos em água destilada durante 10 minutos. De seguida, os revestimentos foram desidratados por imersão em etanol (com as concentrações de 50%, 70%, 90%, 95% e 100% durante 10 minutos cada). Por fim os revestimentos foram secados em um exsiccador durante 1 hora em vácuo.

O ensaio em SEM dos revestimentos foi realizado no SEM-FID (Zeiss) no CENIMAT na FCT-UNL.

2.8 - Técnicas de caracterização

2.8.1 - Difracção de raio-x (DRX)

Esta técnica não destrutiva consiste em fazer incidir radiação raio-x na amostra. Através da lei de Bragg (equação (1)) é possível caracterizar estruturalmente a amostra:

$$\lambda = 2d \operatorname{sen}\theta$$

(1)

Onde λ trata-se do comprimento de onda da radiação incidente, d a distância entre os planos cristalográficos e θ o ângulo de incidência da radiação com os planos de reflexão.

Ao aplicar-se um feixe de raio-x nas amostras ocorre difracção dos raios-x. Isto deve-se à semelhança dos comprimentos de onda, da radiação, com as distâncias interplanares. Os planos de difracção e, como tal, as distâncias interplanares, as densidades dos átomos ao longo de cada plano e o padrão de difracção gerado, são características específicas e únicas de cada substância cristalina. Torna-se assim possível a caracterização de amostras cristalinas.[31]

Recorreu-se assim ao DRX para, através dos difractogramas, conseguir caracterizar as amostras de Hidroxiapatite produzidas. Para tal realizou-se difractogramas em todas as amostras estudadas com varrimento de 2θ entre 10° e 90° com passo de 0,33°. A radiação incidente usada tratou-se de $K\alpha_1$ e $K\alpha_2$ com comprimentos de onda de 1,541Å e 1,544Å respectivamente. O ratio entre ambos foi de 0,5. O material do Ânodo foi uma ampola de cobre alimentada a 45 kV e 40 mA.

2.8.2 - Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR)

FTIR trata-se de uma técnica, não destrutiva, muito usada na identificação de grupos funcionais com que são constituídas as amostras analisadas. FTIR baseia-se nos princípios físicos de que todas as moléculas vibram e que cada composto molecular tem energias de vibração muito específicas associadas. Para se poder detectar estas vibrações torna-se necessário transmitir radiação infravermelha com comprimento de onda (energia) semelhante ao comprimento de onda (energia) com que ocorrem estas vibrações. Cada composto molecular tem energias de vibração muito específicas associadas. Estas vibrações, regra geral, dividem-se em 2 tipos, nomeadamente, Extensão, onde varia a distância interatómica entre os átomos e moléculas envolvidas e Flexão, onde varia o ângulo de ligação entre os átomos ou moléculas envolvidas. É com esse conhecimento que se consegue identificar grupos funcionais. De referir que as energias dos estados vibracionais são essencialmente no espectro dos infravermelhos, explicando-se assim a razão do nome da técnica. O espectro de FTIR pode ser adquirido no modo de transmissão (radiação que chegou ao detector) ou absorção (radiação que foi absorvida). Para tal efectua-se um varrimento de frequências de radiação electromagnética na zona dos infravermelhos e com isso obtém-se o espectro. Através desse espectro verificar-se-à a existência de picos que corresponderão a grupos funcionais.[32]

De modo a caracterizar os pós de hidroxiapatite produzidos realizou-se FTIR a todas as amostras produzidas. Utilizou-se o equipamento de Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR. O mesmo encontra-se no CENIMAT. A análise foi realizada em um intervalo de número de onda entre 4000cm^{-1} e 500cm^{-1} com um passo de 2cm^{-1} .

2.8.3 – Microscopia de varrimento electrónico (SEM) e energy-dispersive x-ray spectroscopy (EDS)

SEM consiste numa técnica que permite analisar a morfologia e topografia da superfície de um material. Para tal, utiliza um feixe de electrões que varre a superfície do mesmo. O feixe é acelerado do cátodo, em direcção ao ânodo, através da aplicação de um potencial que pode atingir os 50 kV. É através da interacção destes electrões com as nuvens de electrões dos elementos químicos que existem electrões retrodifundidos e a libertação de electrões secundários e raios-x. Tanto os electrões secundários como os electrões retrodifundidos são usados para caracterizar informação topográfica da amostra. Os raios-x são característicos dos elementos químicos presentes na amostra. Como tal, acoplado ao SEM costuma estar um detector espectrométrico de raios-x para ou medir comprimentos de onda (WDS) ou níveis de energia (EDS). No caso específico do detector da FCT-UNL é o EDS. Isto torna a técnica ideal para caracterização de elementos químicos. Existe, no entanto, limitações. Elementos químicos mais leves são mais difíceis de caracterizar pois as nuvens electrónicas são menos densas. Ao serem menos densas ocorrem menos interacções, o que torna mais difícil os elementos

serem detectados. Por outro lado, se a superfície de um material for composta de um elemento pesado, torna-se impossível caracterizar o que se encontra abaixo dessa superfície pois todo o feixe pode ser retrodisperso.[33]

De forma a caracterizar os revestimentos na superfície das amostras de Titânio recorreu-se ao SEM. Por outro lado, de forma a saber a composição dos revestimentos recorreu-se ao EDS. Para tal, depositou-se nas amostras uma camada de ouro via pulverização em um Agar Sputter Coater. Isto foi necessário pois as hidroxiapatites não são condutoras. As análises foram realizadas no CENIMAT, em um Microscópio Electrónico de Varrimento DSM 962 Zeiss Germany.

Capítulo 3 – Resultados e discussão

3.1 – Pó de Ag-HA

As figuras 9 e 10 apresentam os difractogramas das amostras pré dialise e pós dialise respectivamente. Nessas mesmas figuras foram representadas, através de formas, a que composto pertence cada pico. Por outro lado, nas tabelas 4 e 5 encontram-se os planos correspondentes à HA e AgNPs da literatura. Nessas tabelas encontra-se assinalados os ângulos exactos obtidos dos picos dos Difractogramas realizados para análise de possível tendências.

Verifica-se que, devido à enorme similaridade com HA na Literatura[21], [34], [35], que as amostras produzidas tratam-se de HA. Verifica-se que as mesmas amostras têm AgNPs. Mais ainda, ao observar-se as Figuras 9 e 10, verifica-se que os 2 picos ($38,1^\circ$ e $44,3^\circ$) apresentam aumento de intensidade, com o aumento da quantidade de Ag. Estes picos são referentes a AgNPs.

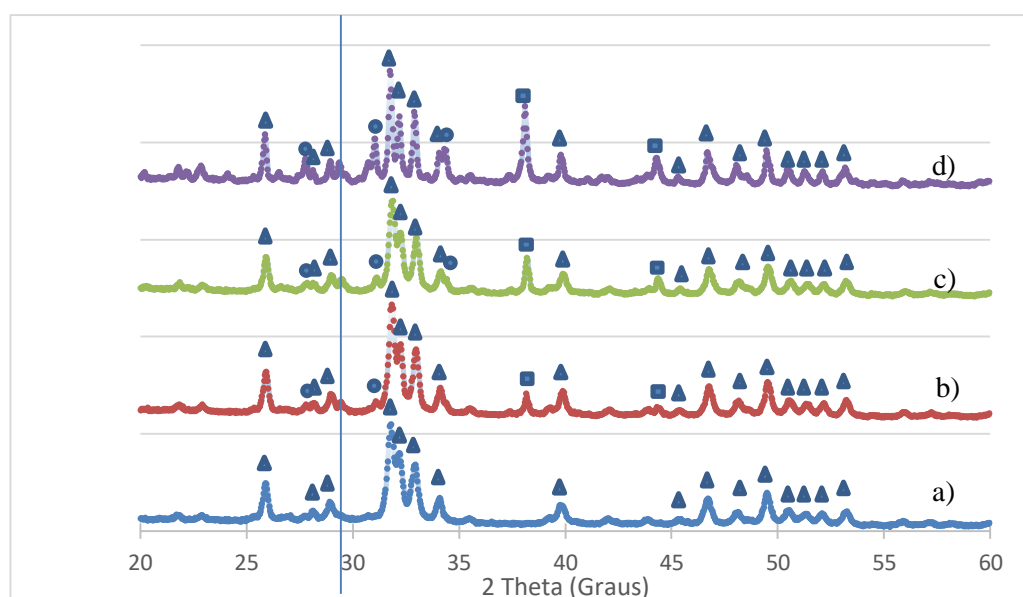


Figura 9 - XRD das Ag-HA pré-dialise. De referir que a amostra de 0% trata-se do espectro a azul em (a), 1% em (b), 2% em (c) e 4% Ag-HA em (d). Legenda: ▲ HA; ■ AgNPs [21], [34], [35]; ● β -TCP [36]. A posição exacta dos picos na literatura e na figura pode ser visualizada na tabela 4. O traço serve para demonstrar o pico de $29,4^\circ$ mencionado na discussão e na figura 11.

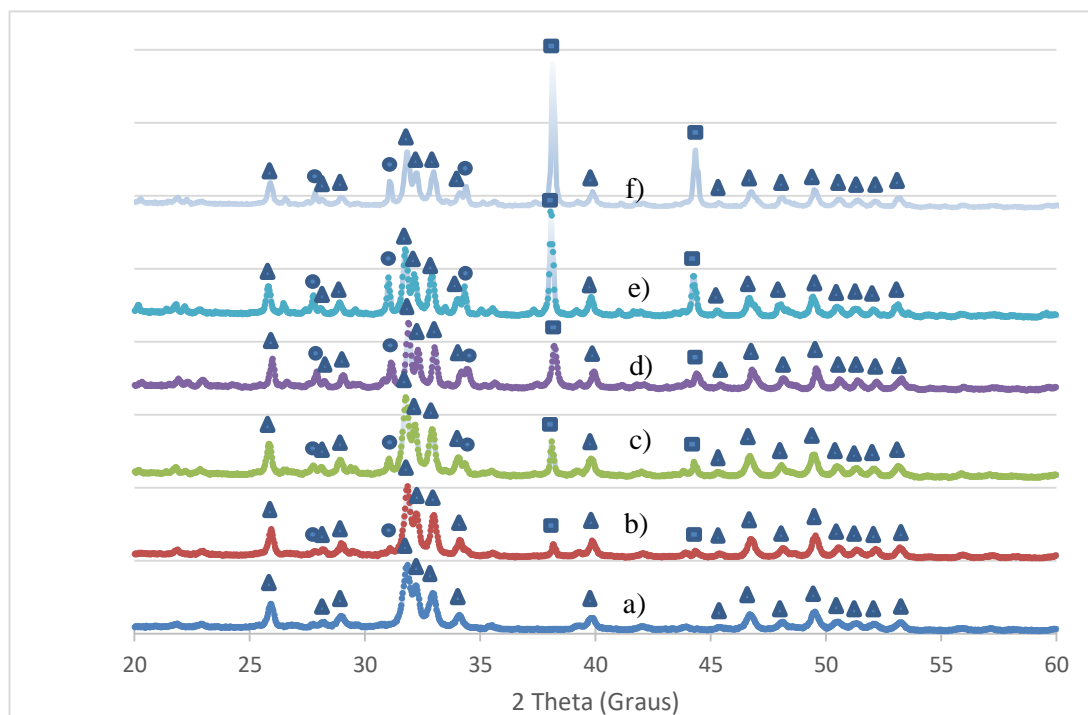


Figura 10 - XRD de Ag-HA pós-dialise. De referir que a amostra de 0% trata-se do espectro a azul em (a), 1% em (b), 2% em (c), 4% em (d), 7% em (e) e 10% em AgNO₃-HA (f). Legenda: ▲ Hidroxiapatite; ■ Nanopartículas de Prata [21], [34], [35]; ● β-TCP [36]. A posição exacta dos picos na literatura e na figura pode ser visualizada na tabela 5.

Se a HA for dopada com Ag existirá desvios nos ângulos medidos nos difractogramas devido ao Ag estar a substituir o Ca na estrutura da HA. Isto poderá verificar-se de 2 formas possíveis.

1-Com o aumentar da Ag entre amostras verificar-se-ia uma tendência de diminuição do ângulo dos picos da HA.

2-Se a amostra de 1%Ag-HA saturou a capacidade de dopagem da HA, ou seja, a HA não aceita mais Ag, não se verificará uma tendência a partir da dita amostra. Tal aconteceria, pois, aumentar a quantidade de prata não influenciaria a dopagem da mesma devido à saturação. De referir que neste caso, as amostras com prata teriam os seus picos todos próximos, mas todos em ângulos menores apenas quando comparados com a amostra controlo.

Comparando os valores dos picos da tabela 4 com a 5, o que se verifica é a inexistência de uma tendência de diminuição de ângulos, com o aumento da Prata. A única tendência verificada comum entre as 2 tabelas tratou-se do ângulo 53,2, onde comparando com a amostra controlo verifica-se um ligeiro desvio para valores mais baixos. No entanto, esta tendência é independente da quantidade de prata. Em suma, nada se pode afirmar sobre a existência, ou não, de dopagem de prata nas amostras de HA com base nos resultados do DRX.

Tabela 4 – Planos correspondentes aos Picos de DRX das amostras de Hidroxiapatite pré-dialise. Também se encontra representado os valores dos picos dos difractogramas de cada amostra e os valores de Literatura[21], [34]–[36]. N significa que não existe esse pico nos difractogramas. A negrito o angulo que verifica uma diminuição nas amostras com Ag comparativamente ao controlo.

Literatura[21], [34]–[36]	Planos Correspondentes	0% Ag-HA	1% Ag-HA	2% Ag-HA	4% Ag-HA
25,8	(0 0 2) da HA	25,91	25,94	25,94	25,87
27,8	(2 1 4) de β -TCP	N	27,81	27,88	27,78
28,2	(1 0 2) da HA	28,15	28,18	28,15	28,15
29,0	(2 1 0) da HA	28,91	28,98	28,98	28,95
31,0	(0 2 1) de β -TCP	N	31,09	31,15	31,05
31,7	(2 1 1) da HA	31,83	31,86	31,89	31,76
32,2	(1 1 2) da HA	32,20	32,26	32,26	32,19
33,0	(3 0 0) da HA	32,96	32,99	33,03	32,89
34,1	(2 0 2) da HA	34,10	34,13	34,16	34,06
34,3	(2 2 0) de β -TCP	34,33	34,40	34,43	34,33
38,1	(1 1 1) da Ag	N	38,17	38,21	38,11
39,8	(1 3 0) da HA	39,78	39,88	39,88	39,81
44,3	(2 0 0) da Ag	N	44,32	44,39	44,29
46,7	(2 2 2) da HA	46,73	46,76	46,76	46,70
48,2	(3 1 2) da HA	48,13	48,17	48,17	48,07
49,5	(2 1 3) da HA	49,50	49,54	49,57	49,47
50,5	(3 2 1) da HA	50,47	50,54	50,64	50,51
51,4	(4 1 0) da HA	51,34	51,34	51,34	51,24
52,2	(4 0 2) da HA	52,08	52,18	52,21	52,11
53,2	(0 0 4) da HA	53,28	53,25	53,21	53,18

Tabela 5 – Planos correspondentes aos Picos de DRX das amostras de Hidroxiapatite pós-dialise. Também se encontra representado os valores dos picos dos difractogramas de cada amostra e os valores de Literatura[21], [34]–[36]. N significa que não existe esse pico no difractograma. A negrito o ângulo que verifica uma diminuição nas amostras com Ag comparativamente ao controle.

Literatura[21], [34]–[36]	Planos Correspondentes	0%Ag-HA	1%Ag-HA	2%Ag-HA	4%Ag-HA	7%Ag-HA	10%Ag-HA
25,8	(0 0 2) da HA	25,93	25,92	25,82	25,99	25,80	25,89
27,8	(2 1 4) de β -TCP	27,76	27,80	27,73	27,90	27,76	27,83
28,2	(1 0 2) da HA	28,23	28,16	28,10	28,20	28,06	28,13
29,0	(2 1 0) da HA	28,93	28,97	28,90	29,03	28,90	29,00
31,0	(0 2 1) de β -TCP	N	31,10	31,04	31,14	31,01	31,07
31,7	(2 1 1) da HA	31,85	31,85	31,78	31,88	31,74	31,84
32,2	(1 1 2) da HA	32,21	32,25	32,15	32,31	32,14	32,21
33,0	(3 0 0) da HA	32,98	32,98	32,91	33,01	32,91	32,98
34,1	(2 0 2) da HA	34,12	34,12	34,05	34,18	34,05	34,11
34,3	(2 2 0) de β -TCP	N	N	34,31	34,45	34,31	34,38
38,1	(1 1 1) da Ag	N	38,20	38,10	38,22	38,06	38,16
39,8	(1 3 0) da HA	39,83	39,87	39,80	39,93	39,83	39,86
44,3	(2 0 0) da Ag	N	44,35	44,28	44,37	44,24	44,34
46,7	(2 2 2) da HA	46,75	46,79	46,68	46,81	46,68	46,75
48,2	(3 1 2) da HA	48,12	48,12	48,08	48,15	48,05	48,12
49,5	(2 1 3) da HA	49,52	49,56	49,49	49,59	49,45	49,49
50,5	(3 2 1) da HA	50,49	50,56	50,49	50,59	50,49	50,56
51,4	(4 1 0) da HA	51,33	51,33	51,29	51,39	51,29	51,39
52,2	(4 0 2) da HA	52,09	52,16	52,09	52,19	52,06	52,16
53,2	(0 0 4) da HA	53,30	53,20	53,13	53,26	53,13	53,16

Devido a inexistência de diferenças significativas entre as tabelas 4 e 5 e em especial na Figura 11, onde se compara as amostras de 4% Ag-HA dialisada e não dialisada, a dialise não parece influenciar a HA ou a Ag de forma significativa.

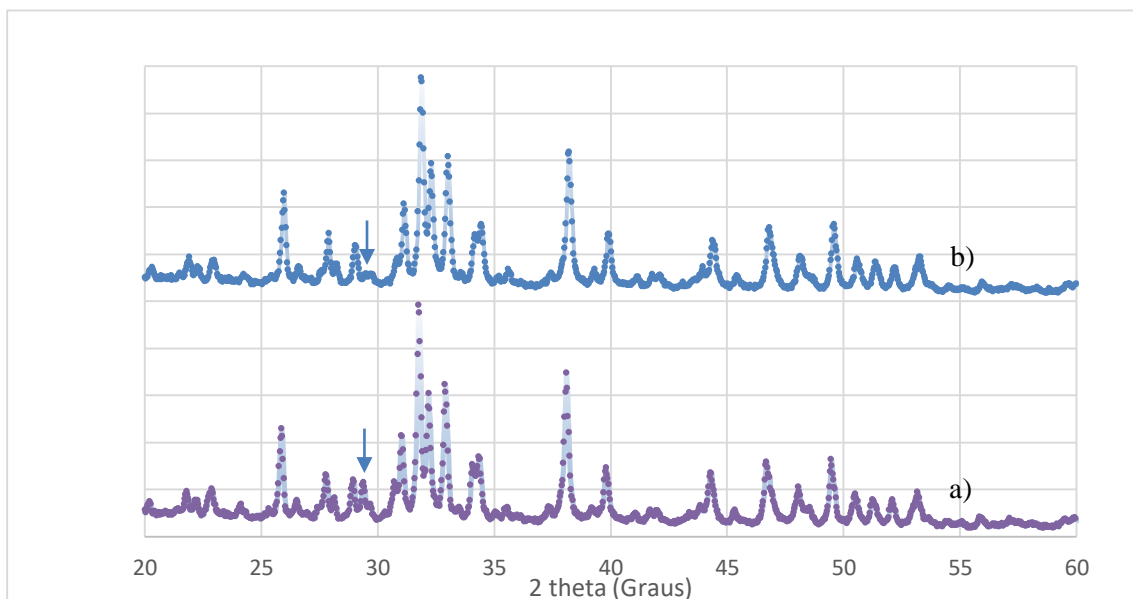


Figura 11 – Em a) trata-se do difractograma da amostra de 4% Ag-HA pré-dialise. Em b) trata-se do difractogramas da amostra de 4% Ag-HA pós-dialise em b). A seta representa o pico que desapareceu com a dialise. Este pico, com angulo de 29,4°, parece ser o pico mais intenso do Carbonato de Cálcio (Calcite), com base em M. A. Rahman et al [37].

O que a dialise parece ter alterado é um pico a 29,4°. Após alguma procura na literatura chegou-se à conclusão de poder tratar-se de carbonato de cálcio (CaCO_3). CaCO_3 (calcite), com base em M. A. Rahman et al [37] tem o seu pico mais intenso no angulo 29,4° dos difractogramas. Tal possibilidade pode ser observada na figura 11, onde é visível o desaparecimento do pico a 29,4°. Isto levanta a hipótese de o problema do pH ter sido causado por a existência deste composto nas amostras de Ag-HA. Mais ainda, verifica-se que esse pico não existe na amostra controlo da figura 9 (pré-dialise) o que reforça a hipótese apresentada.

A hipótese de carbonato ganha força ao observar-se os valores de pH obtidos pré-dialise para as amostras de hidroxiapatite. Estes valores encontram-se na tabela 6.

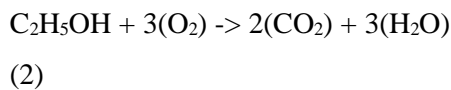
Tabela 6 – Valores de pH medidos antes de se proceder com a dialise e 48 horas após começar com a dialise.

Amostra	pH (inicio)	pH (48 horas após)
HA (controlo)	8,4 ± 0,1	7,4 ± 0,1
1% Ag-HA	10,2 ± 0,1	10,3 ± 0,1
2% Ag-HA	10,3 ± 0,1	10,6 ± 0,1
4% Ag-HA	10,2 ± 0,1	10,6 ± 0,1

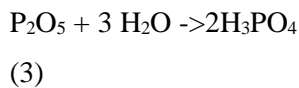
Ao observar-se a tabela 6 verifica-se o valor de pH comum de aproximadamente 10,3 para as amostras com Prata. O pKa_2 do ácido Carbónico (H_2CO_3) referente à mudança iónica de

$CO_3^{2-} \rightleftharpoons HCO_3^-$ é de cerca de 10,3[38], [39]. Outro pormenor é que 48 horas depois não existiu variação do pH (tabela 6). De referir que as amostras foram dialisadas com pH inferior a 8,5, apenas demorou-se muito mais tempo que o esperado. Algumas amostras, nomeadamente a de 7% Ag-HA e a de 10% Ag-HA demoraram 3 semanas a serem dialisadas. Isto indica que o composto que causou a variação do pH tem uma baixíssima solubilidade em água. Carbonatos são conhecidos por terem muito baixa solubilidade em água. [40] Isto explicaria a dificuldade em dialisar a hidroxiapatite.

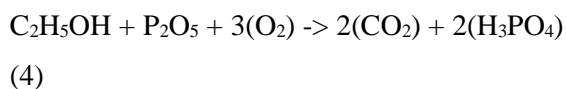
O pico a 29,4° parece aumentar de intensidade com o aumentar da quantidade de Ag adicionada a cada amostra de HA como é possível ver na figura 9. Uma explicação possível para isto pode estar em que ao adicionar Ag, a mesma poderá substituir o Ca. Ao existir mais Ca substituído por Ag na HA, existirá mais Ca que não é usado na produção de HA. Este Ca, por sua vez, poderá ligar-se ao carbonato para formar mais $CaCO_3$. Para se perceber tal, torna-se necessário demonstrar o que ocorre durante o todo o processo, em termos químicos. A presença do carbonato será consequência da presença de O_2 ou de CO_2 no ar. A razão de poder ser O_2 está nas seguintes reacções. A reacção de Combustão do etanol é a seguinte:



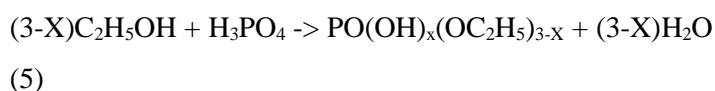
A reacção espontânea de criação de ácido fosfórico, por sua vez, é a seguinte:

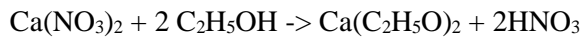


As mesmas separadas não dizem muito, especialmente quando a reacção 2 só ocorre quando existe combustão[41] e a 3 necessita de água[42], algo que não existe no sistema de etanol em quantidade significativa. No entanto, nas 2 reacções em conjunto poder-se-à ter:

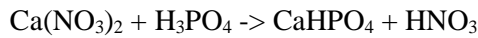


A reacção em 4 é necessária para explicar a sequencia de reacções que ocorrem segundo Franco et al. [42]. As mesmas podem ser visualizadas em (5) – (11).



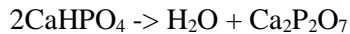


(6)

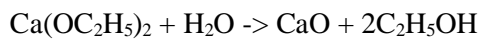


(7)

A temperaturas entre 200°C e 500°C ocorrem ainda as seguintes reacções:



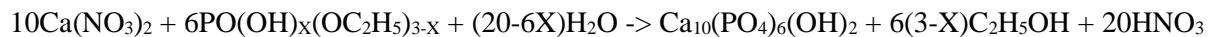
(8)



(9)

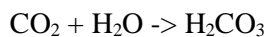


(10)



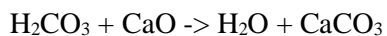
(11)

O carbonato surge da seguinte reacção[41].



(12)

De referir que este CO_2 pode ser da atmosfera e da reacção em 4. E por fim o carbonato de cálcio forma-se com base na seguinte reacção.



(13)

O óxido de cálcio formou-se na reacção 8 durante a sinterização. Consegue-se assim explicar a presença de carbonato de cálcio nos resultados obtidos.

Observando a reacção 11 verifica-se que o ratio de Ca/P é de 10/6 ou seja, 1,66(6). O protocolo aplicado foi um em que o rácio de Ca/P = 1,6(6). Este rácio, no entanto, ignora a presença da Ag que poderá substituir o Ca. Isto significa que o rácio deveria ser semelhante a

$$\frac{\text{Ca+Ag}}{\text{P}}$$

(14)

O que não foi o considerado no Protocolo. De referir que este rácio alternativo tem a limitação de não considerar que Ag possa formar nanopartículas e não ocorrer dopagem a 100%. O valor calculado do rácio referido em 14 aplicado em cada amostra está representado na tabela 7.

Tabela 7 – Rácio de cada amostra admitindo total dopagem pela Prata.

	HA	1%Ag-HA	2%Ag-HA	4%Ag-HA	7%Ag-HA	10%Ag-HA
Rácio	1,667	1,669	1,672	1,678	1,686	1,694

Observando a tabela 7 verifica-se que existe um aumento do rácio com o aumento de Ag, admitindo que haja dopagem total. Isto poderá ter consequências. HA normal tem um rácio Ca/P de 1,6(6). Qualquer afastamento deste valor levará a excesso de um dos precursores. É aqui que se torna importante perceber a parte química do processo. Ao observar-se a reacção 6, verifica-se a formação de óxido de cálcio. Admitindo que haja dopagem, a hidroxiapatite na reacção 8 poderá ter cálcio substituído por prata. Isto implica que alguns óxidos de cálcios poderão não reagir para formar HA nessa mesma reacção. E como tal esse mesmo óxido através da reacção em 12 formará mais carbonato de cálcio. Explicar-se-ia assim o aumento da Prata levar a um aumento do carbonato de cálcio e a sua inexistência na amostra controlo.

A última coisa que falta explicar trata-se da presença de β -TCP. B-TCP, segundo Franco et al. [42] existe devido à decomposição térmica da HA como é possível ver na reacção 15.



(15)

Nesta mesma reacção verifica-se a criação de óxido de cálcio que com base na reacção 13, levará a maior quantidade de carbonato de cálcio. Ou seja, verifica-se assim uma dependência da quantidade de CaCO_3 com a quantidade de β -TCP. Explica-se assim porque aumenta o β -TCP com o aumento do CaCO_3 . Em suma, verifica-se que todas as amostras obtiveram HA com nanopartículas de prata. O facto dos picos obtidos via DRX serem largos indica que o tamanho das partículas encontra-se nos nanómetros [43]. Isto indica que este protocolo modificado é apropriado para a obtenção de hidroxiapatite com prata de uma forma simples e rápida.

As figuras 12 e 13 apresentam os espectros de FTIR das amostras sintetizadas pré-dialise e pós dialise, respectivamente.

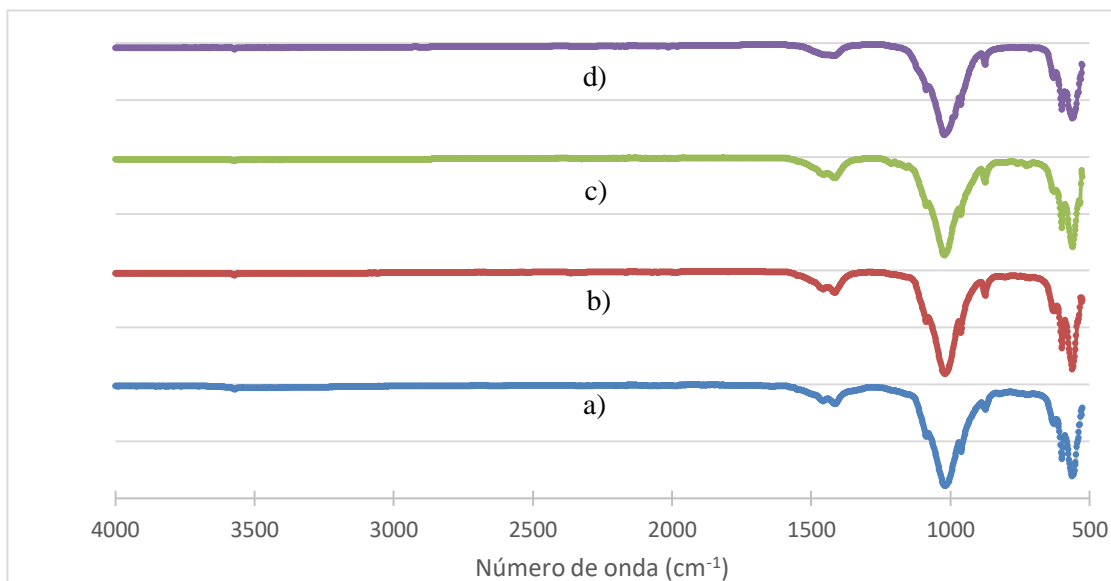


Figura 12 – Espectro de FTIR das amostras de 0% (a), 1% (b), 2% (c) e 4% Ag-HA (d). De referir que estas amostras são amostras de hidroxiapatite pré-dialise.

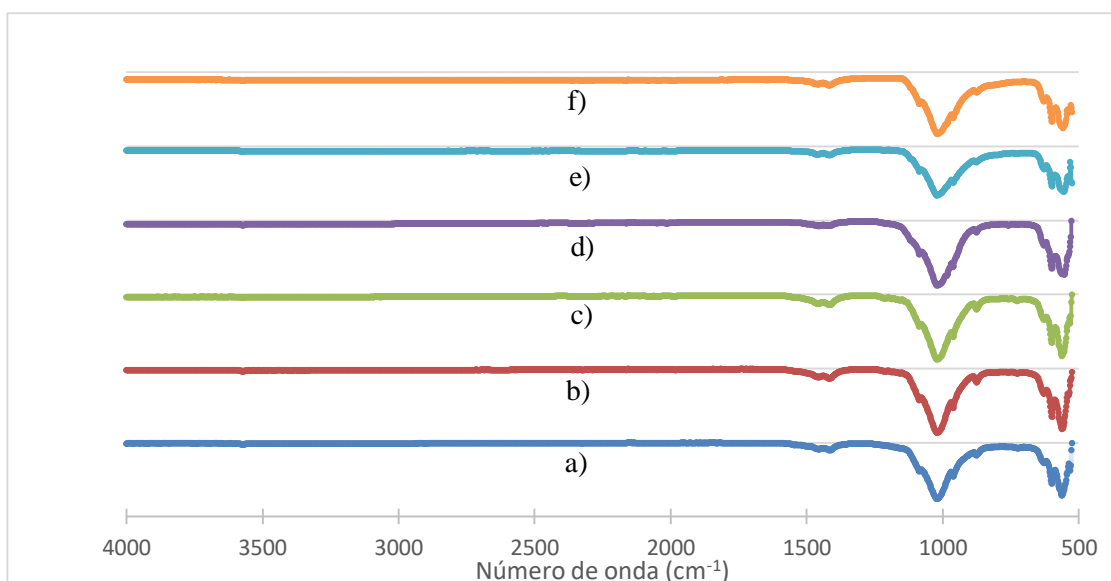


Figura 13 – Espectro de FTIR das amostras de 0% (a), 1% (b), 2% (c), 4% (d), 7% (e) e 10% Ag-HA (f). De referir que estas amostras são amostras de hidroxiapatite pós-dialise.

Na tabela 8 e 9 encontram-se os picos e bandas do FTIR e a sua correspondência aos grupos funcionais segundo a Literatura [42], [43]. Nas mesmas tabelas encontra-se a verificação da existência dos mesmos picos. Em ambas as tabelas se verifica a existência de carbonatação da hidroxiapatite. Parece ter ocorrido carbonatação do tipo B, se bem que a proximidade dos picos em $1455-1460\text{ cm}^{-1}$, devido a carbonatações diferentes, torna difícil excluir carbonatação do tipo A [42], [43]. Apesar de tudo, nas amostras com maior concentração de Ag (4%, 7% e 10%) também parece existir carbonatação do tipo A. Isto poderá indicar que tenha ocorrido uma carbonatação AB, mas em que tenha existido uma clara preferência por a do tipo B. Carbonatação do tipo A da Hidroxiapatite, trata-

se de uma substituição de íons carbonato pelos íons hidroxilo da hidroxiapatite. Por outro lado, carbonatação do tipo B trata-se de uma substituição de íons carbonato pelos íons fosfato da HA[44]. Verifica-se também a existência de fosfatos que são típicos de HA e β -TCP e do grupo OH que é típico da HA.

Tabela 8 – Picos e Bandas do FTIR associadas aos grupos funcionais [42], [43] e respectiva existência dos mesmos nas amostras de hidroxiapatite pré-dialise. Legenda: S = existe, N= não existe, número indica o número mais perto onde se verifica o “pico” no caso de picos ligeiramente desviados. Números repetidos indica situações em que um pico pode pertencer a 2 diferentes situações.

Picos e bandas retiradas da literatura[42], [43]		Picos e bandas observadas nas amostras sintetizadas			
		0% Ag-HA	1% Ag-HA	2% Ag-HA	4% Ag-HA
550	Flexão do fosfato	561,1	561,1	559,9	561,1
570		561,1	561,1	559,9	561,1
600-602		597,8	597,8	597,8	597,8
630-632	Estiramento do grupo OH	628,6	628,6	626,8	626,8
870	Carbonato-banda que sugere carbonatação do tipo B	873,6	873,6	873,6	875
880	Carbonato-banda que sugere carbonatação do tipo A	N	N	N	875
900-1200	Flexão e estiramento do fosfato	S	S	S	S
975	Vibração do Ag ₃ PO ₄	N	N	N	N
988	β -TCP	N	N	N	N
1017	Vibração do Ag ₃ PO ₄	N	N	N	N
1024	Banda de fosfato	1018,2	1018,2	1020,2	1020,2
1123	β -TCP	N	N	N	N
1421	Carbonato	1411,6	1413,5	1415,5	1413,5
1430	Sugere carbonatação do tipo B	N	N	N	N
1455-1460	Sugere carbonatação tipo A ou B	S	S	S	S
1550	Sugere carbonatação do tipo A	N	N	N	N
1630	Flexão do H ₂ O	N	N	N	N
3300	Estiramento do OH	N	N	N	N
3400	Estiramento do H ₂ O	N	N	N	N
3570-3571	Estiramento do OH	S	S	S	S
3800	Estiramento do OH	N	S	N	N

Tabela 9 – Picos e Bandas do FTIR associadas aos grupos funcionais [10], [12] e respectiva existência dos mesmos nas amostras de hidroxiapatite pós dialise. Legenda: S = existe, N= não existe, número indica o numero mais perto onde se verifica o “pico” no caso de picos ligeiramente desviados. Números repetidos indica situações em que um pico obtido no FTIR pode pertencer a 2 diferentes situações.

Picos e bandas retiradas da literatura[42], [43]		Picos e bandas observadas nas amostras sintetizadas					
		0% Ag- HA	1% Ag- HA	2% Ag- HA	4% Ag- HA	7% Ag- HA	10% Ag- HA
550	Flexão do fosfato	561,1	561,1	561,1	553,5	555,4	557,3
570		561,1	561,1	561,1	N	N	N
600- 602		597,8	597,8	597,8	597,8	597,8	597,8
630- 632	Estiramento do grupo OH	626,8	626,8	626,8	626,8	628,7	626,7
870	Carbonato-banda que sugere carbonatação do tipo B	873,6	873,6	873,6	875	873,6	873,6
880	Carbonato-banda que sugere carbonatação do tipo A	N	N	N	875	N	N
900- 1200	Flexão e Estiramento do fosfato	S	S	S	S	S	S
975	Vibração do Ag ₃ PO ₄	N	N	N	N	N	N
988	β-TCP	N	N	N	N	N	N
1017	Vibração do Ag ₃ PO ₄	N	N	N	N	N	N
1024	Banda de fosfato	1020,2	1020,2	1020,2	1020,2	1020,2	1020,2
1123	β-TCP	N	N	N	N	N	N
1421	Carbonato	1415,5	1413,5	1415,5	1417,4	1417,4	1417,4
1430	Sugere carbonatação do tipo B	N	N	N	N	N	N
1455- 1460	Sugere carbonatação tipo AB	S	S	S	S	S	S
1550	Sugere carbonatação do tipo A	N	N	N	1548	1548	1548
1630	Flexão do H ₂ O	N	N	N	N	N	N
3300	Estiramento do OH	N	N	N	N	N	N
3400	Estiramento do H ₂ O	N	N	N	N	N	N

3570-3571	Estiramento do OH	S	S	S	S	S	S
3800	Estiramento do OH	N	N	N	N	N	N

3.2 - Citotoxicidade dos pós de Ag-HA

Os resultados dos testes de citotoxicidade podem ser visualizados na tabela 10.

Tabela 10 - Valores de população celular relativa ao controlo negativo registados nos ensaios citotoxicidade. Um valor da população relativa superior a 90% é considerado como indicando que o extracto não é citotóxico. Verifica-se citotoxicidade moderada na amostra de 10% Ag-HA na concentração de 61 mg/ml. A amostra de 4% Ag-HA demonstrou citotoxicidade severa quando esteve 30 dias no frigorífico a 4°C. A concentração dessas amostras foi superior pois o volume que ficou em contacto os 30 dias foi de 1,167 ml (sem os 0,833ml que tinham sido retirados para os ensaio anterior). O valor dessa concentração está calculado.

Concentração da amostra	0%Ag-HA	1%Ag-HA	2%Ag-HA	4%Ag-HA
61,00 mg/ml	107,5 ± 4,6 %	115,7 ± 3,3 %	98,6 ± 4,8 %	107,6 ± 7,1 %
24,40 mg/ml	115,2 ± 5,2 %	113,6 ± 3,4 %	106,2 ± 5,4 %	105,6 ± 8,4 %
9,76 mg/ml	109,0 ± 4,0 %	106,4 ± 4,8 %	106,8 ± 7,3 %	105,3 ± 7,9 %
3,90 mg/ml	102,7 ± 4,3 %	107,1 ± 4,9 %	99,5 ± 5,2%	103,5 ± 5,4 %
Concentração da amostra		7%Ag-HA	10%Ag-HA	
61,00 mg/ml		105,7 ± 6,2 %	59,2 ± 7,3 %	
24,40 mg/ml		110,8 ± 6,4 %	116,8 ± 6,1 %	
9,76 mg/ml		106,8 ± 6,5 %	113,1 ± 6,6 %	
3,90 mg/ml		105,6 ± 7,0 %	109,8 ± 6,3 %	
$Cf \times Vf = Ci \times Vi \Leftrightarrow Cf = \frac{Ci \times Vi}{Vf} \Leftrightarrow$ Sabendo que: $Ci = 61 \text{ mg/ml}; Vi =$ $2\text{ml}; Vf = 1,167\text{ml}; \Rightarrow Cf = \frac{61 \times 2}{1,167} =$ 104,5 mg/ml		0%Ag-HA	1%Ag-HA	
		107,7 ± 6,3 %	107,2 ± 6,9%	
		2%Ag-HA	4%Ag-HA	
		108,3 ± 7,1 %	7,1 ± 12,0 %	

Verifica-se que a única amostra que revelou citotoxicidade foi a de 10% Ag-HA na concentração de 61mg/ml. Mesmo esta, com uma diluição de 2,5 vezes deixou de ter toxicidade. Todas as restantes tiveram toxicidade nula. No entanto, de referir que ao colocar o meio completo em contacto com as amostras durante 30 dias, a 4°C verificou-se citotoxicidade na amostra de 4% Ag-HA. Isto provavelmente deveu-se à prata libertada durante 30 dias e a maior concentração (104,5 mg/ml vs 61 mg/ml) do pó. O maior valor da concentração deve-se ao facto de que quando se realizou o primeiro ensaio, retirou-se 833 µL dos 2 ml que estavam em contacto com os pós. Sendo assim ficaram no meio

apenas 1,167ml. De referir que o meio biológico humano é dinâmico, o que torna improvável uma acumulação de prata, localmente durante 30 dias. Nas figuras 14 e 15 é possível visualizar imagens das culturas nos meios. Verifica-se que as células estão com alguma confluência. Em algumas das imagens verifica-se a presença de umas partículas que provavelmente são hidroxiapatite. É possível ainda ver a citotoxicidade verificada na amostra de 10% Ag-HA (maior concentração) e na amostra de 4% Ag-HA que tinha mais tempo de contacto. Por fim, de notar que neste estudo de citotoxicidade, o meio só esteve 24 horas em contacto com a Ag-HA. Isto será importante mais a frente quando se analisarem os resultados de adesão com os revestimentos.



Figura 14 - Imagens das culturas realizadas onde é possível visualizar as células. Em b) e c) é possível visualizar pequenas partículas que provavelmente tratam-se de hidroxiapatite. Relativamente às imagens tem-se que: a) – HA controlo; b) 1% Ag-HA; c) 2% Ag-HA; d) 4% Ag-HA; e) controlo positivo (Citotóxico); f) controlo negativo

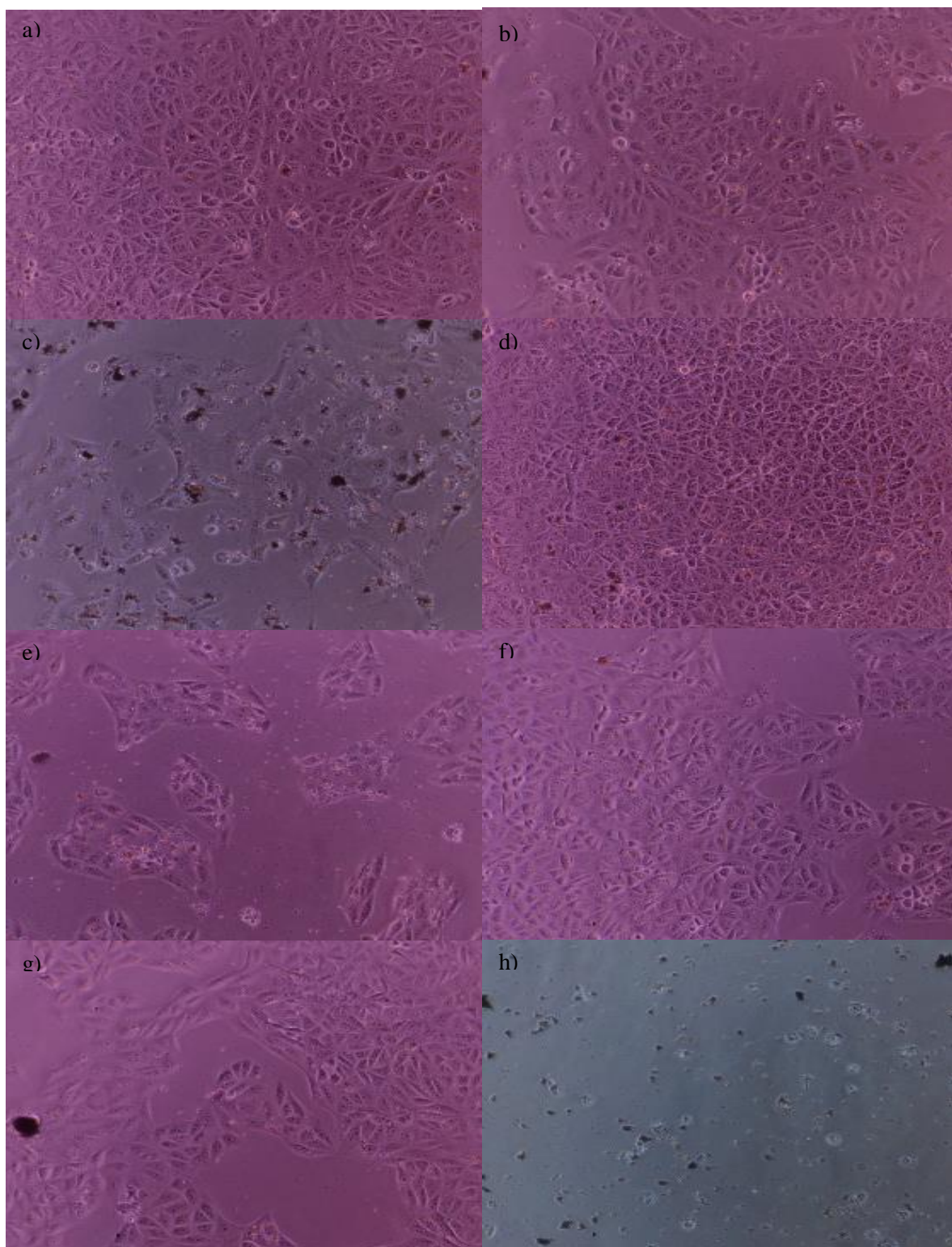


Figura 15 - Imagens das culturas realizadas onde é possível visualizar as células. Em c), g) e h) é possível visualizar pequenas partículas que provavelmente tratam-se de hidroxiapatite. Relativamente às imagens tem-se que: a) 7% Ag-HA com concentração de 61 mg/ml; b) 7% Ag-HA com concentração de 24,4 mg/ml; c) 10% Ag-HA com concentração de 61 mg/ml; d) 10% Ag-HA com concentração de 24,4 mg/ml. As culturas do e) a h) tratam-se de culturas em que o meio esteve em contacto com as amostras de hidroxiapatite durante 30 dias e concentração de 152,5 mg/ml. A cultura e) trata-se da amostra de HA controlo; f) trata-se da amostra de 1% Ag-HA; g) trata-se da amostra de 2% Ag-HA e por fim a h) trata-se da amostra de 4% Ag-HA. É possível visualizar que tanto a de 10% Ag-HA e a de 4% Ag-HA apresentam toxicidade.

Com o conhecimento de que a amostra de 10% Ag-HA era moderadamente citotóxica na concentração mais elevada decidiu-se não escolher a mesma para ser usada na técnica de Coblast®. Com isto restava as amostras de 1%, 2%, 4% e 7% Ag-HA para escolher. A amostra escolhida foi a de 4% Ag-HA. A razão principal tratou-se de uma questão de o protocolo ser mais fácil de realizar com a de 4%, comparativamente a de 7%. Isto acontecia porque o nitrato de prata demonstrou ter uma baixíssima solubilidade em etanol absoluto. Se fosse escolhido para produzir em massa, a quantidade de etanol absoluto que seria necessário para dissolver o nitrato de prata seria de 400 ml (quase o dobro da amostra de 4% Ag-HA). Isto tornava muito mais demorado o processo de evaporação do etanol absoluto (450ml vs 650ml) e criava questões de protocolo muito complicadas de se gerir.

3.3 - Citotoxicidade dos revestimentos

Os resultados do estudo da adesão celular aos revestimentos podem ser visualizados na tabela 11.

Tabela 11 - Adesão celular nos revestimentos de HA preparados por CoBlast®

Revestimentos	1º dia	3º dia	6º dia	8º dia	10º dia
Ti-HA	0,89 ± 0,09	1,29 ± 0,17	2,11 ± 0,27	2,75 ± 0,34	3,03 ± 0,38
Ti-1HA	0,82 ± 0,07	0,58 ± 0,18	0,22 ± 0,10	0,15 ± 0,08	0,14 ± 0,11
Ti-3HA	1,10 ± 0,12	0,70 ± 0,28	0,21 ± 0,06	0,09 ± 0,07	0,08 ± 0,07
Ti-4HA	0,83 ± 0,09	0,48 ± 0,09	0,05 ± 0,08	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,01
Ti	1,00 ± 0,11	1,58 ± 0,24	3,11 ± 0,46	3,68 ± 0,54	3,76 ± 0,47

Na mesma tabela verifica-se que todos os revestimentos com Ag apresentaram elevada adesão. No entanto a população celular foi diminuindo com o tempo nos mesmos. Isto pode-se dever ao aumento da presença de Ag no meio. De referir que no 1º dia (24 horas de exposição aos revestimentos) não se verificou toxicidade. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com os pós. A toxicidade verificada nos restantes dias pode-se dever ao facto de que o meio só foi trocado ao fim de 48 horas ou 72 horas o que poderá ter permitido que houvesse uma acumulação de Ag que fosse tóxica para as células. No entanto também poderá ser que o pH variasse para valores tóxicos ao fim de 48 ou 72 horas. Como forma de despistagem do efeito do pH sujeitou-se o revestimento de Ti-4AgHA (o que tem maior quantidade de HA não dialisada) a água millipore durante 48 horas numa estufa a 40°C. Os valores do pH podem ser visualizados na tabela 12.

Tabela 12 - pH do revestimento de Ti-4Ag-HA em 14 ml de água millipore no início e ao fim de 48 horas

Amostra	pH inicial	pH após 48 horas
Ti-4AgHA	$7,3 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,1$
Água Millipore	$6,6 \pm 0,1$	

Verificou-se uma ligeira variação do pH ao fim de 48 horas. No entanto, devido a limitações no medidor do pH, não é possível retirar conclusões porque idealmente devia-se medir o pH em 3 ml de água millipore. O sensor, infelizmente não conseguia medir o pH pois precisava de mais água (devido à forma do mesmo) o que forçou o uso de 14ml. Isto indica que o valor real do pH é capaz de ser bem mais elevado.

Por fim há a referir que quando havia medição do valor de pH nos pós, o valor ia instantaneamente para o valor de 10,3. Não havia aumento do valor de pH com o tempo. Tal deve-se ao facto de ser um revestimento onde apenas uma porção da Ag-HA encontrasse em contacto directo com a água. Devido a tal, é mais demorado a normalização do pH entre o mesmo e o meio aquoso.

3.4 - Propriedades antibacterianas dos revestimentos

Na figura 16 encontram-se representadas as superfícies dos revestimentos que estiveram em contacto com as bactérias.

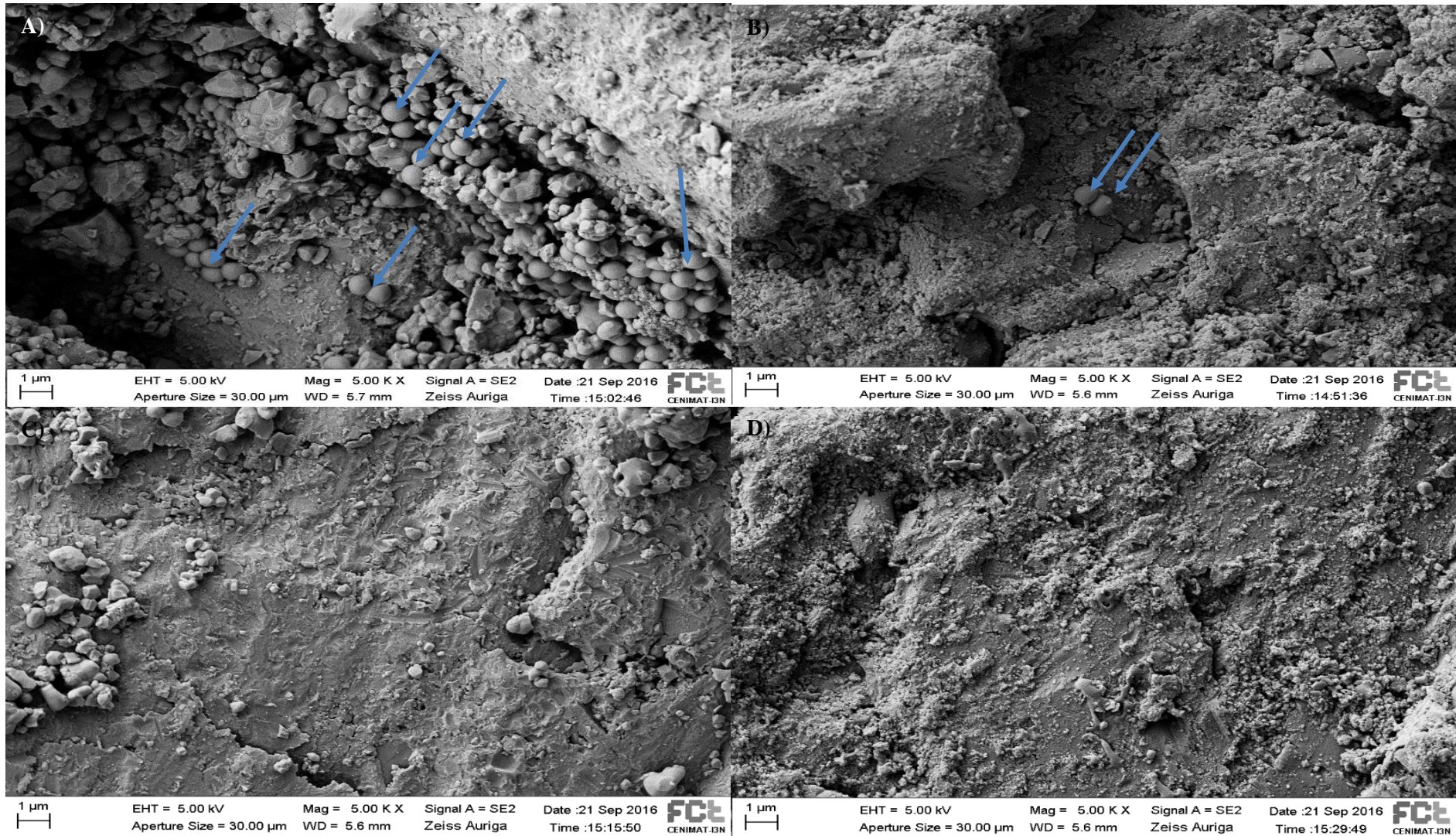


Figura 16 – Ensaio SEM nos revestimentos de Ti-HA e Ti-4AgHA após terem estado em contacto com as bactérias. Legenda: A) Ti-HA que esteve em contacto com *S.aureus*, B) Ti-4AgHA com *S.aureus*, C) Ti-HA com *E. coli*, D) Ti-4AgHA com *E. coli*. As setas representam bactérias *S.aureus*.

Verifica-se que nas superfícies C) e D) da figura 16 não existe qualquer presença de *E. coli*. Este resultado muito provavelmente deveu-se ao facto de que a cultura de *E. coli* aparentava sofrido lise após contacto com as placas de Ti. Quanto às superfícies A) e B) da figura 16 verifica-se uma inibição significativa do número de células de *S.aureus* na superfície B), ou seja, no revestimento de Ti-4AgHA (setas). Contudo não é possível retirar conclusões porque que existem 2 efeitos possíveis a actuar, o pH (como foi mencionado em 9.4) e a quantidade de Ag. O outro estudo antibacteriano que foi realizado foi através do contacto dos revestimentos com as células de *E. coli* e *S. aureus* incorporadas em meio LB semi-sólido. Os resultados obtidos em duas experiências independentes podem ser visualizados na tabela 13

Tabela 13 - Número de colónias contadas nas na superfície do meio sobre a placa de titânio com diferentes revestimentos e a diferença em percentagem entre os revestimentos.

Revestimentos	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Ti-HA	42 / 52	45 / 47
Ti-4AgHA	31 / 41	40 / 41
Diferença (%)	23,40%	11,95%

Tal como no estudo anterior verifica-se alguma inibição. Contudo esta é menos significativa, muito provavelmente devido ao facto de haver menor difusão entre a superfície das placas de Ti e o meio LB (semi-sólido). Tal como no estudo anterior, não é possível retirar conclusões pois existe também 2 factores variáveis em actuação aqui, pH e Ag. Pois como referido anteriormente não foi possível dialisar os pós usados nos revestimentos por CoBlast® por falta de tempo.

3.5 - SEM e EDS dos revestimentos

Os resultados do ensaio em SEM podem ser visualizados nas figuras 17, 18 e 19. Verifica-se que Ti-4Ag-HA (Figs. 17D, 18D e 19D) produziu revestimentos uniformes, tal como produziu a Ti-HA (Figs. 17A, 18A e 19A). Verifica-se, no entanto, que Ti-1Ag-HA existe diferenças na superfície. Isto pode ter sido causado por diferenças de granulometria entre os 2 pós. A HA comercial da Altakitin tem tamanho de partícula entre 20 e 60 μm enquanto a HA produzida tem tamanho de partícula na casa dos nanómetros. Provavelmente ocorreu agregação dos pós nanométricos que deu origem a clusters micrométricos. Isto é facilmente visualizável na imagem B da figura 19. Esta situação foi posteriormente analisada em EDS para confirmação.

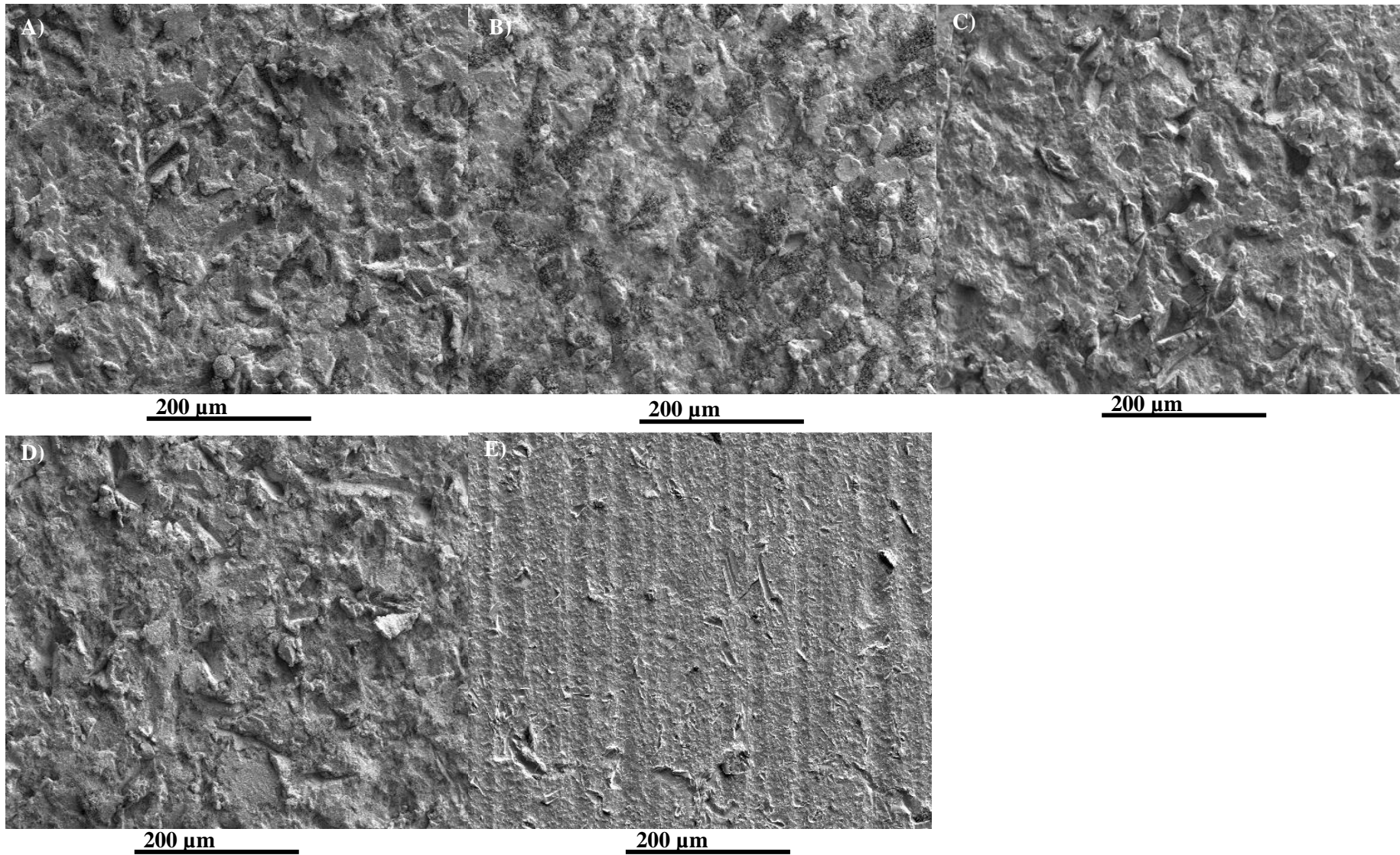


Figura 17 – Imagens de SEM dos revestimentos em Ti de A) Ti-HA, B)Ti-1Ag-HA, C) Ti-3Ag-HA e D) Ti-4Ag-HA. A amostra em E) trata-se de Ti sem revestimento. A ampliação é de 200 vezes. Verifica-se no caso do revestimento em B) que existe uma diferença na uniformidade do revestimento na superfície representado por setas.

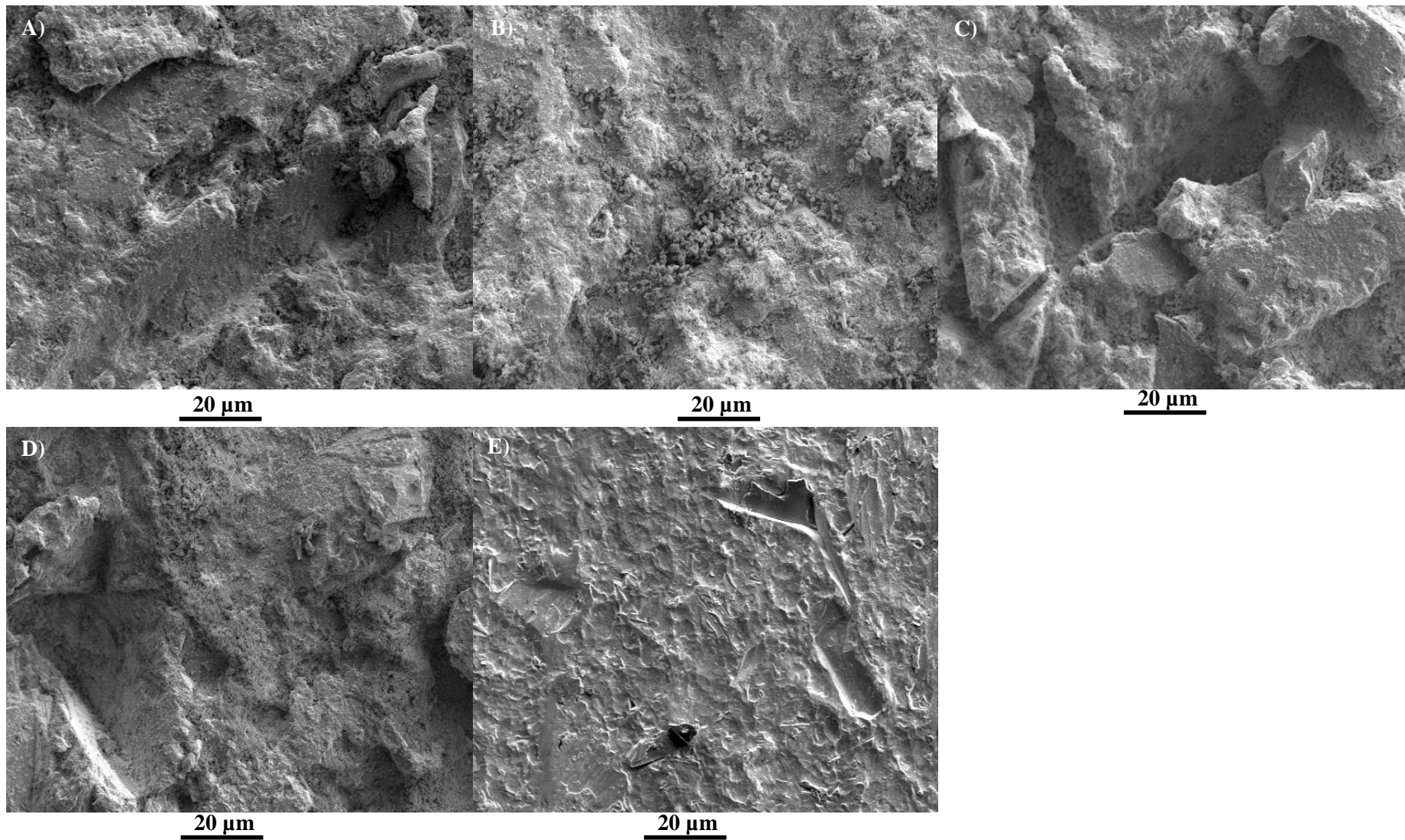


Figura 18 – Imagens de SEM dos revestimentos em Ti de A) Ti-HA, B) Ti-1Ag-HA, C) Ti-3Ag-HA e D) Ti-4Ag-HA. A amostra em E) trata-se de Ti sem revestimento. A ampliação é de 1000 vezes. Verifica-se no caso do revestimento em B) que existe uma diferença na uniformidade do revestimento representado por setas.

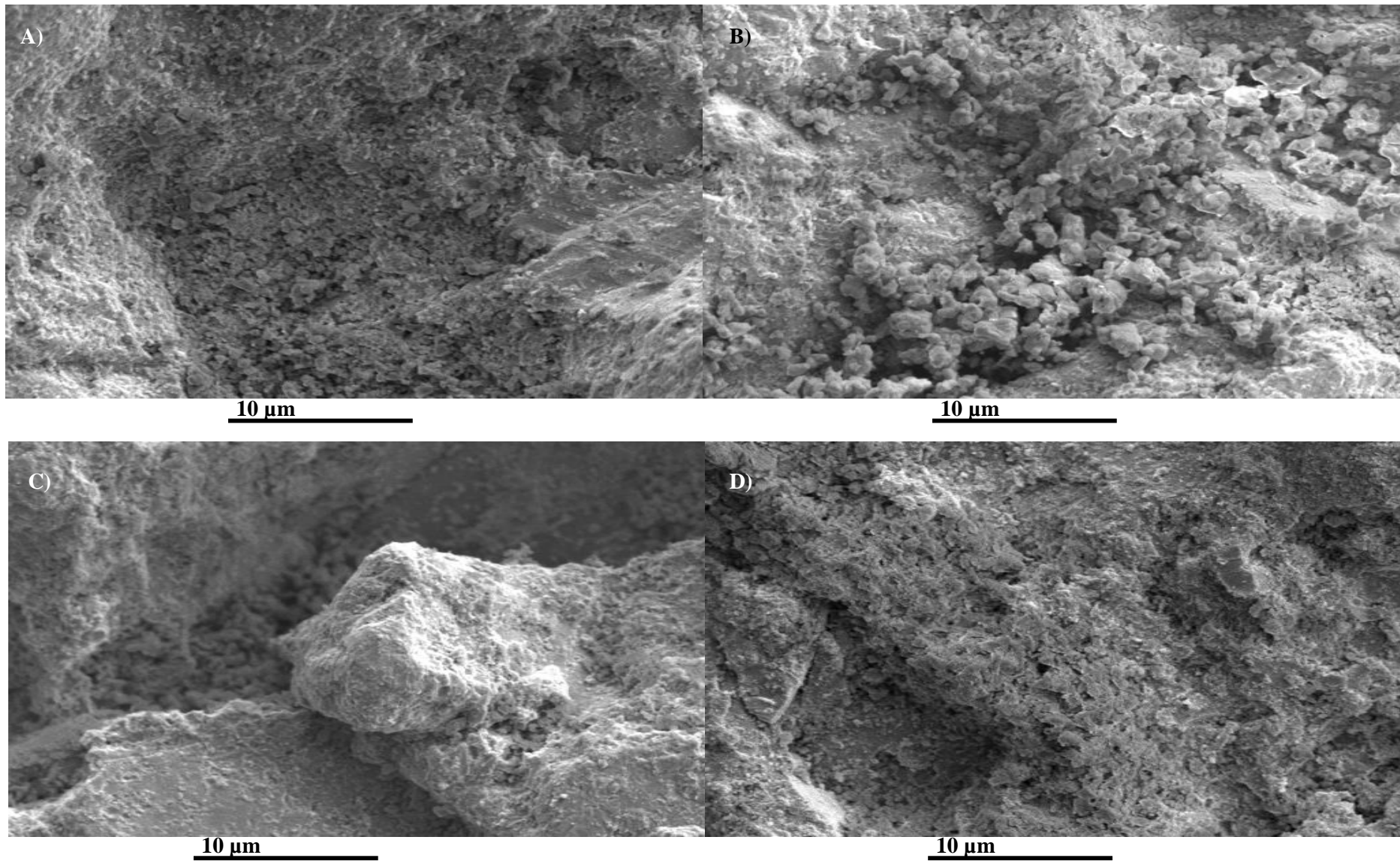


Figura 19 - Imagens de SEM dos revestimentos em Ti de A) Ti-HA, B) Ti-1Ag-HA, C) Ti-3Ag-HA e D) Ti-4Ag-HA. A ampliação é de 3000 vezes. Verifica-se no caso do revestimento em B) que existe uma diferença de homogeneidade. É visível que parece ser causado por diferenças de granulometria entre a HA e a Ag-HA.

Os resultados do EDS podem ser visualizados nas figuras 20, 21 e 22. Verifica-se que os revestimentos são compostos por Ca e fósforo, o que é o esperado da HA. Verifica-se ainda que o revestimento de Ti-4Ag-HA tem Ag. Observa-se que o mesmo revestimento tem nanopartículas de prata (figura 20 A e D). Na Figura 21 C e F detectou-se uma baixa quantidade de prata comparativamente à HA e não são visíveis nanopartículas. Isto parece indicar dopagem da mesma com Prata. Numa tentativa de tentar identificar as diferentes fases do revestimento obtido na amostra de Ti-1Ag-HA, em SEM, estudou-se a sua composição via EDS. Verificou-se na Figura 22 C e F que o pó que parece ter a granulometria mais elevada parece tratar-se do pó de 4% Ag-HA. Isto confirma o já mencionado nos resultados em SEM de haver uma agregação dos pós nanométricos preparados por sol-gel. Isto poderá ter dado origem a clusters micrométricos de 4% Ag-HA. E como já foi mencionado no SEM, tal deveu-se à diferença de granulometria entre as hidroxiapatites usadas. A HA da Alkatin tinha 20-60 μm de tamanho de poro enquanto a Ag-HA preparada por Sol-Gel tem dimensão tipicamente nanométrica[17], [43].

A presença de Titânio, em especial na figura 21B e 21E, nos revestimentos poderá dever-se a que o impacto entre o abrasivo e o Titânio tenha levado a um desalojamento de algum titânio superficial. Este posteriormente poderá ter sido incorporado no revestimento (figura 21B e 21E). De referir que será sempre detectado algum titânio, devido aos electrões conseguirem penetrar o revestimento e chegar até à placa de Titânio. Isto levará a emissão de fótons de raio-x característicos do mesmo, mas o mesmo nunca seria detectado com a intensidade que se verificou na figura 21B e 21E. Também parece ter havido a incorporação de algum do abrasivo (alumina). Isto verifica-se devido à emissão intensa de raio-x característicos do alumínio.

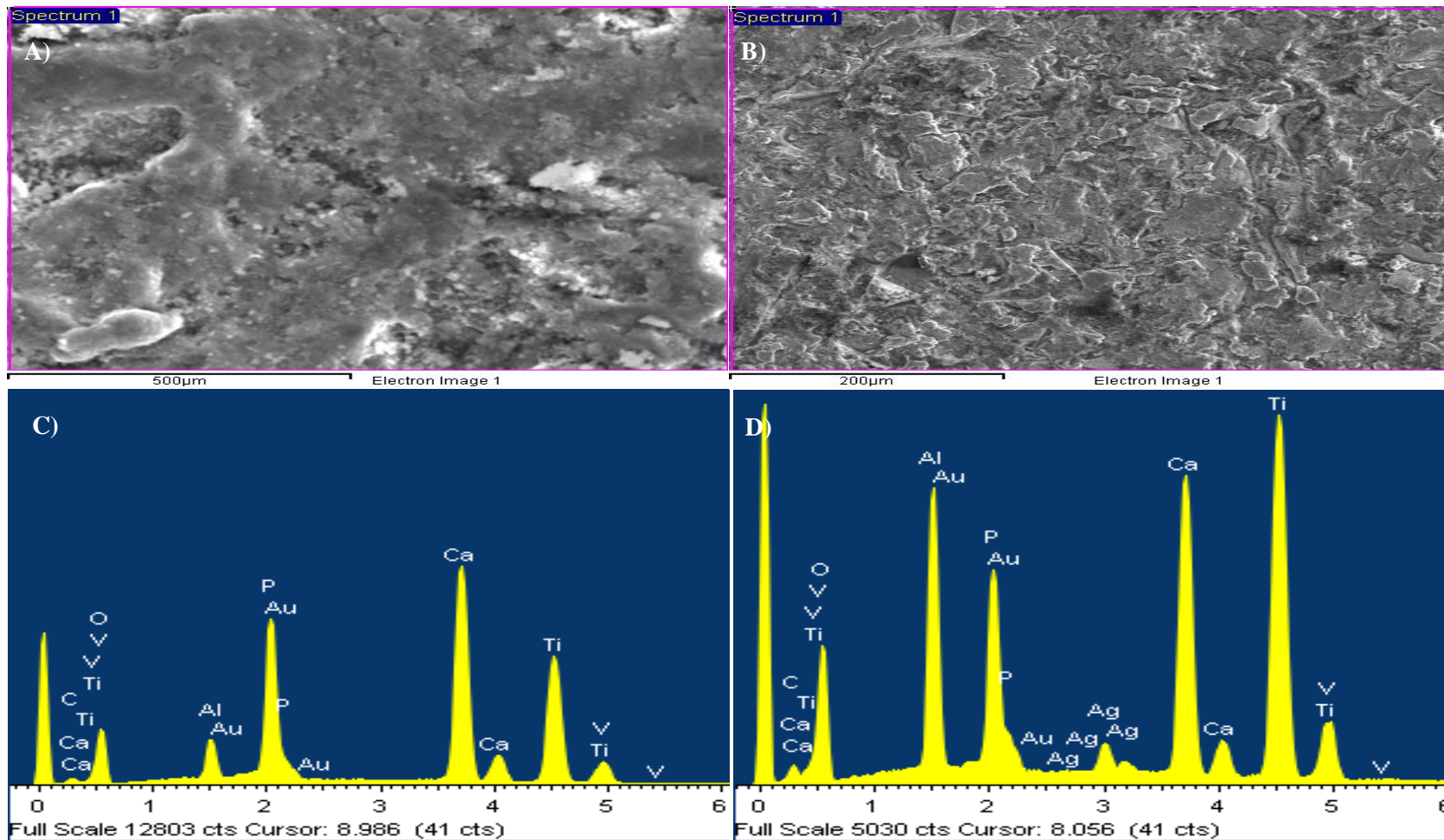


Figura 20 - EDS dos revestimentos de Ti-HA em A) e C) e Ti-4Ag-HA em B) e D). Consegue-se visualizar a presença de Prata na amostra de Ti-4Ag-HA. Observa-se ainda a presença de Ca e P em ambas as superfícies. Observa-se ainda as superfícies escolhidas para analisar. Neste caso específico escolheu-se toda a superfície presente nas imagens em A) e B).

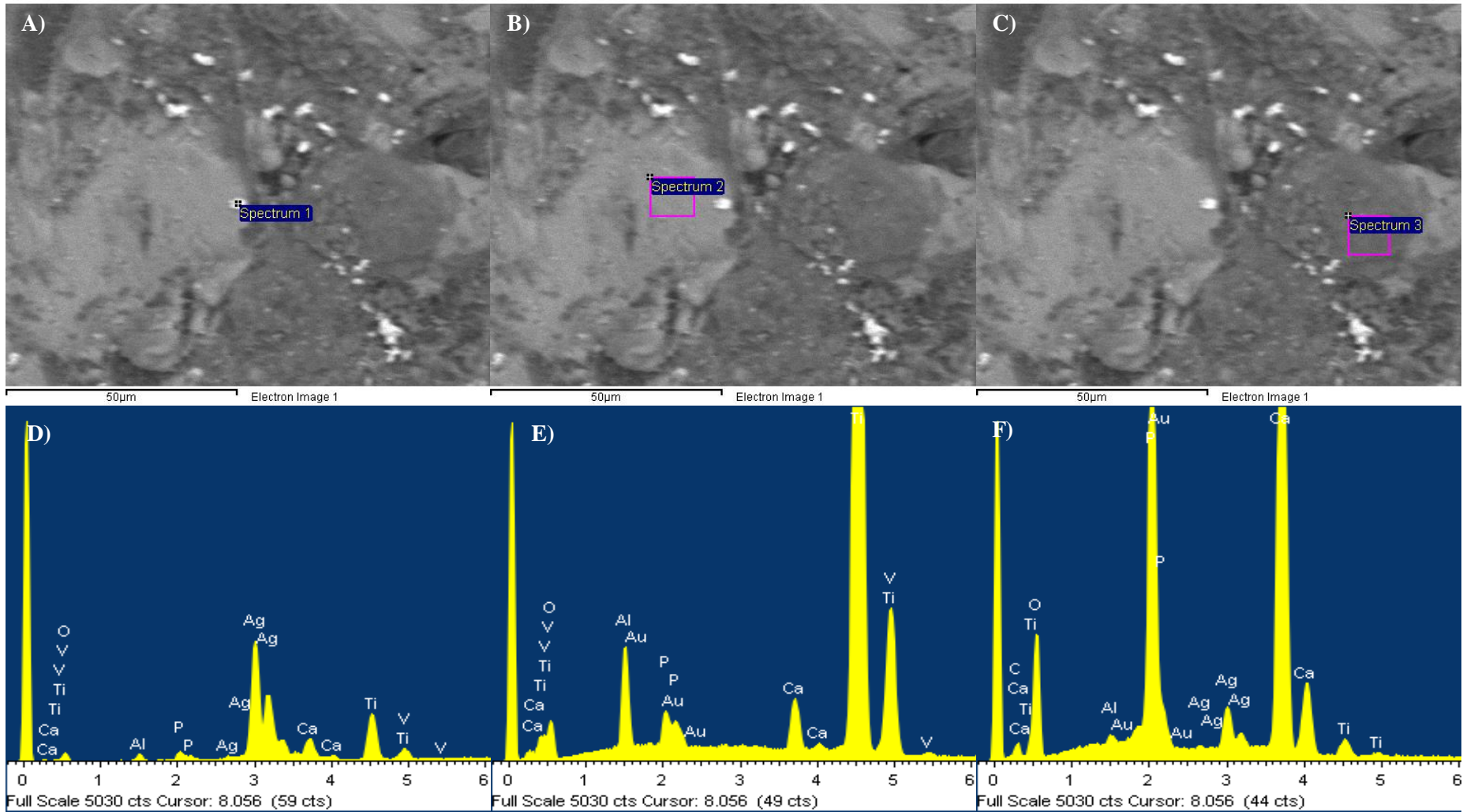


Figura 21 - EDS do revestimento de Ti-4Ag-HA com ampliação de 2000 vezes em A), B) e C) e respectivos espectros em D), E) e F). Observa-se as superfícies escolhidas para analisar. Neste caso específico escolheu-se 3 zonas diferentes da superfície.

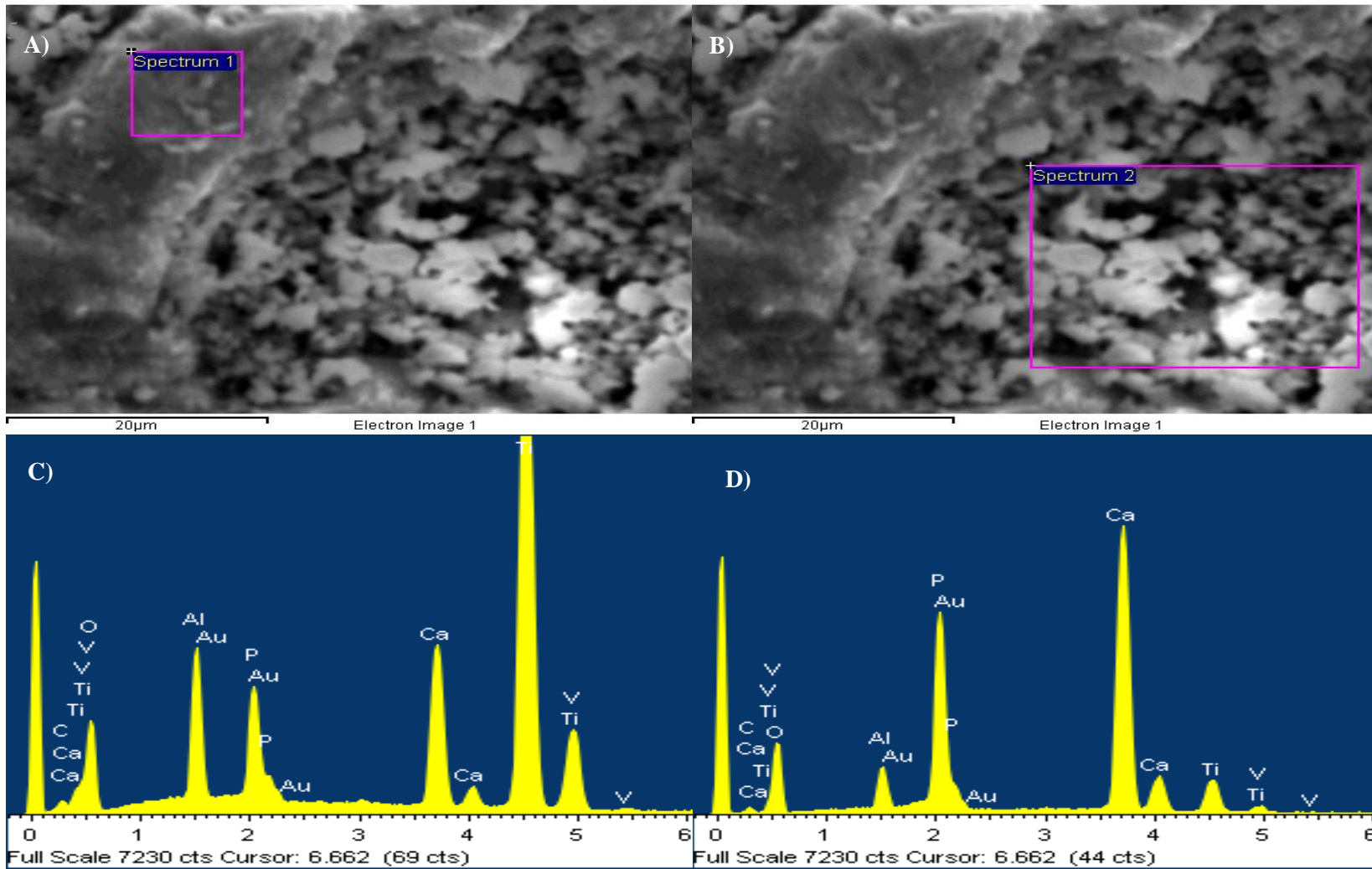


Figura 22 - EDS do revestimento de Ti-1Ag-HA com ampliação de 2000 vezes em A) B) e respectivos espectros em C), D). Observa-se as superfícies escolhidas para analisar. Neste caso específico escolheu-se 3 zonas diferentes da superfície.

Capítulo 4 - Conclusões

Pretendeu-se com esta dissertação obter revestimentos de Hidroxiapatite que fossem antibacterianos e não citotóxicos. Pretendia-se usar o método do sol-gel para tal e apesar dos problemas iniciais que ocorreram até se obter Ag-HA e levaram a uma modificação do Protocolo inicial, assim que se conseguiu obter Ag-HA obteve-se a mesma de forma fácil e rápida. Mais ainda conseguiu-se obter Ag-HA com diferentes quantidades de Ag. O problema de pH verificado deveu-se à presença de carbonato na amostra. As mesmas amostras tinham a presença de carbonato de cálcio. Após a dialise, tal composto tinha desaparecido. As Ag-HAs produzidas pareceram ter essencialmente carbonatação do tipo B com alguma carbonatação do tipo A. A dialise realizada não influenciou as Ag-HAs obtidas.

A Ag-HA com composição de Ag até 7% provou-se ser não tóxica em forma de pó nas condições de realização do teste de citotoxicidade. Verificou-se ainda que todas as amostras obtiveram Ag-HA com AgNPs. O facto dos picos obtidos via DRX serem largos indica que o tamanho das partículas encontra-se nos nanómetros.

A única amostra, em forma de pó, que obteve citotoxicidade foi a de 10% Ag-HA na concentração de 61mg/ml. Mesmo esta, com uma diluição de 2,5 vezes deixou de ter toxicidade. No entanto, ao colocar o meio completo em contacto com as amostras durante 30 dias, a 4°C verificou-se citotoxicidade na amostra de 4% Ag-HA. Isto provavelmente deveu-se à prata libertada durante 30 dias e a maior concentração (152,5 mg/ml vs 61 mg/ml) do pó.

Verificou-se uniformidade no revestimento de Ti-4Ag-HA produzido por CoBlast®[®], o que foi semelhante à amostra de Ti-HA. O revestimento de Ti-4Ag-HA demonstrou inibição ao desenvolvimento bacteriano com a bactéria *S.aureus*, em SEM. Mais ainda, o seguinte revestimento demonstrou ligeira inibição ao desenvolvimento de bactérias *S. aureus* e *E. coli* em placa de petri. Contudo por falta de tempo para conseguir realizar dialise, não foi possível concluir se tal se deve ao efeito da Ag ou do pH. O mesmo revestimento demonstrou citotoxicidade, quando em contacto com Osteoblastos durante 48 ou 72 horas sem trocar o meio.

EDS confirmou a existência de AgNPs e parece indicar a presença de dopagem da HA com Ag. EDS ainda confirmou a incorporação nos revestimentos de alguma alumina e de titânio.

Para trabalho futuro, além dos estudos de citotoxicidade e das propriedades antibacterianas dos revestimentos com o problema do pH resolvido, sugere-se o seguinte:

-Obter o perfil de libertação e prata é muito importante. Com isto consegue-se saber em qualquer instante a quantidade aproximada de Ag presente no meio e se a mesma se encontra dentro de valores aceitáveis. Tal pode ser feito através de um estudo de deixar em, por exemplo, água millipore ou SBF, revestimentos de Ti-4Ag-HA. Realizando ICP aos líquidos que estiveram em contacto em diferentes quantidades de tempo consegue-se obter a quantidade de Ag que existia no meio. Por outro lado, é

interessante testar estes meios em contacto com osteoblastos de forma a obter-se, aproximadamente, a quantidade de Ag que apresenta toxicidade. O mesmo pode ser feito com bactérias.

-No caso de o ponto anterior demonstrar uma libertação muito rápida da Ag, testar-se dopagem com outros compostos como Zn, que em alguns estudos mencionados na introdução demonstraram algumas propriedades antibacterianas e pareciam ter um perfil de libertação mais lento. Isto poderá ser particularmente útil para implantes dentários, onde se pretende que o efeito antibacteriano seja mais prolongado.

-Por fim testar dopagem de Ag em Fluroapatite. Fluroapatite é um caso de um fosfato de cálcio semelhante à HA onde ocorreu uma substituição de grupos Fosfato por Fluor, havendo assim uma maior resistência à corrosão existente no meio bucal. Isto é importante no meio bucal pois devido à alimentação humana, é natural haver pH tão baixo como 4. Isto leva a que haja uma corrosão da apatite mais rápida do que se pretende.

Referências Bibliográficas

- [1] A. D. C. Carvalho, *2011 Statistical Yearbook of Portugal*. 2012.
- [2] R. Torrecillas, M. Díaz, F. Barba, M. Miranda, F. Guitián, and J. S. Moya, “Synthesis and antimicrobial activity of a silver-hydroxyapatite nanocomposite,” *J. Nanomater.*, vol. 2009, pp. 1–6, 2009.
- [3] J. L. O. W. Chen, S. Oh, A.P. Ong, N. Oh, Y. Liu, H.S. Courtney, M. Appleford, “Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process,” *Wiley Period. Inc. J Biomed Mater Res*, vol. 82, no. A, pp. 899–906, 2007.
- [4] W. Chen, Y. Liu, H. S. Courtney, M. Bettenga, C. M. Agrawal, J. D. Bumgardner, and J. L. Ong, “In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 32, pp. 5512–5517, 2006.
- [5] I. Noda, F. Miyaji, Y. Ando, H. Miyamoto, T. Shimazaki, Y. Yonekura, M. Miyazaki, M. Mawatari, and T. Hotokebuchi, “Development of novel thermal sprayed antibacterial coating and evaluation of release properties of silver ions,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 89, pp. 456–465, 2009.
- [6] A. Mocanu, G. Furtos, S. Rapuntean, O. Horovitz, C. Flore, C. Garbo, A. Danisteanu, G. Rapuntean, C. Prejmerean, and M. Tomoaia-Cotisel, “Synthesis; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 298, pp. 225–235, 2014.
- [7] C. S. Ciobanu, E. Andronescu, and D. Predoi, “BET and XRD studies on the hydroxyapatite and europium doped hydroxyapatite,” *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, vol. 13, no. 7, pp. 821–824, 2011.
- [8] S. Jadalannagari, S. More, M. Kowshik, and S. R. Ramanan, “Low temperature synthesis of hydroxyapatite nano-rods by a modified sol–gel technique,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, no. 7, pp. 1534–1538, 2011.
- [9] V. Stanić, D. Janačković, S. Dimitrijević, S. B. Tanasković, M. Mitrić, M. S. Pavlović, A. Krstić, D. Jovanović, and S. Raičević, “Synthesis of antimicrobial monophasic silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 9, pp. 4510–4518, 2011.
- [10] C. Shi, J. Gao, M. Wang, J. Fu, D. Wang, and Y. Zhu, “Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 55, pp. 497–505, 2015.
- [11] B. M. Schuldt Filho G, Dalago HR, Oliveira de Souza JG, Stanley K, Jovanovic S, “Prevalence of peri-implantitis in patients with implant-supported fixed prostheses,” *Quintessence Int*, vol. 45(10), no. 861–8, 2014.
- [12] S. Renvert, A. Aghazadeh, H. Hallström, and G. R. Persson, “Factors related to peri-implantitis

- a retrospective study,” *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 25, no. 4, pp. 522–529, 2014.
- [13] M. F. De Araújo, A. F. L. Filho, G. P. Da Silva, M. L. R. De Melo, M. H. Napimoga, D. B. R. Rodrigues, P. M. Alves, and S. A. De Lima Pereira, “Evaluation of peri-implant mucosa: Clinical, histopathological and immunological aspects,” *Arch. Oral Biol.*, vol. 59, no. 5, pp. 470–478, 2014.
- [14] S. S. Saini R, Giri PA, Saini S, “Peri-Implantitis: A review,” *Provara Med Rev*, vol. 6, no. 4, pp. 1–4, 2014.
- [15] J. Neilands, C. Wickström, B. Kinnby, J. R. Davies, J. Hall, B. Friberg, and G. Svensäter, “Bacterial profiles and proteolytic activity in peri-implantitis versus healthy sites,” *Anaerobe*, vol. 35, pp. 28–34, 2015.
- [16] Q. Yu, Z. Wu, and H. Chen, “Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications,” *Acta Biomater.*, vol. 16, pp. 1–13, 2015.
- [17] P. N. Lim, L. Chang, and E. S. Thian, “Development of Nanosized Silver-Substituted Apatite for Biomedical Applications: A Review,” *Nanomedicine*, vol. 11, no. 6, pp. 1331–1344, 2015.
- [18] N. Sanpo, M. L. Tan, P. Cheang, and K. a. Khor, “Antibacterial property of cold-sprayed HA-Ag/PEEK coating,” *J. Therm. Spray Technol.*, vol. 18, no. March, pp. 10–15, 2009.
- [19] J. A. Spadaro, T. J. Berger, S. D. Barranco, S. E. Chapin, and R. O. Becker, “Antibacterial Effects of Silver Electrodes with Weak Direct Current Cu (Aent,” vol. 6, no. 5, pp. 637–642, 1974.
- [20] S. V. Dorozhkin, “Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 55, pp. 272–326, 2015.
- [21] J. Qu, X. Lu, D. Li, Y. Ding, Y. Leng, J. Weng, S. Qu, B. Feng, and F. Watari, “Silver/hydroxyapatite composite coatings on porous titanium surfaces by sol-gel method,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 97 B, no. 1, pp. 40–48, 2011.
- [22] J. N. Barry, B. Twomey, A. Cowley, L. O’Neill, P. J. McNally, and D. P. Dowling, “Evaluation and comparison of hydroxyapatite coatings deposited using both thermal and non-thermal techniques,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 226, pp. 82–91, 2013.
- [23] a. M. Oladoye, J. G. Carton, and a. G. Olabi, “Characterization of Graphite Coatings Produced by CoBlast™ Technology,” *Jom*, vol. 66, no. 4, pp. 602–607, 2014.
- [24] F. Tan, M. Naciri, D. Dowling, and M. Al-Rubeai, “In vitro and in vivo bioactivity of CoBlast hydroxyapatite coating and the effect of impaction on its osteoconductivity,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 1, pp. 352–62, 2012.
- [25] C. Stenson, M. C. Meyer, B. Twomey, and R. Lupoi, “Particle Speed Analysis in CoBlast,” *Procedia CIRP*, vol. 37, pp. 77–82, 2015.
- [26] T. Coblast, “CoBlast Technology,” pp. 1–4.
- [27] Health Protection Agency, “Fundamentals Techniques in Cell Culture,” pp. 1–66, 2010.
- [28] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, H. A. Benink, T. J. Worzella, and L. Minor, “Cell

- viability assays,” *Assay Guid. Man.*, 2013.
- [29] J. H. Miller, “Experiments in molecular genetics,” *Cold Spring Harb. NY. Cold Spring Harb. Lab.*, 1972.
- [30] H. L. Huang, Y. Y. Chang, M. C. Lai, C. R. Lin, C. H. Lai, and T. M. Shieh, “Antibacterial TaN-Ag coatings on titanium dental implants,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 205, no. 5, pp. 1636–1641, 2010.
- [31] B. Fultz and J. M. Howe, *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials (Third Edition)*. 2007.
- [32] A. Esteves, M. do C. Lança, and J. P. Borges, “Estudo das Propriedades Elétricas de Filmes de Quitosano e Quitosano/Hidroxiapatite para Possíveis Aplicações em Implantes ósseos,” *Diss. Mestr. FCT-UNL*, 2016.
- [33] M. Dunlap and J. E. Adaskaveg, “Introduction to the Scanning Electron Microscope,” *Microsc. Microanal.*, p. 52, 1997.
- [34] M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y. Y. Kim, M. J. Kaufman, E. P. Douglas, and L. B. Gower, “Bone structure and formation: A new perspective,” *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 58, no. 3–5, pp. 77–116, 2007.
- [35] N. Agasti and N. K. Kaushik, “One Pot Synthesis of Crystalline Silver Nanoparticles,” *Am. J. Nanomater.*, vol. 2, no. 1, pp. 4–7, 2014.
- [36] D. D. S. Tavares, L. D. O. Castro, G. D. D. A. Soares, G. G. Alves, and J. M. Granjeiro, “Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted β -tricalcium phosphate,” *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 21, no. 1, pp. 37–42, 2013.
- [37] M. A. Rahman, R. Shinjo, and J. Halfar, “X-Ray Diffraction Is a Promising Tool to Characterize Coral Skeletons,” *Adv. Mater. Phys. Chem.*, vol. 2013, no. April, pp. 120–125, 2013.
- [38] N. Takeno, “Atlas of Eh-pH diagrams Intercomparison of thermodynamic databases,” *Natl. Inst. Adv. Ind. Sci. Technol. Tokyo*, no. 419, p. 285, 2005.
- [39] S. S. K. Lower, “Carbonate equilibria in natural waters,” *Simon Fraser Univ.*, vol. Chem 1, no. Environmental Chemistry, pp. 1–26, 1999.
- [40] S. Panthi, “Carbonate Chemistry and Calcium Carbonate Saturation State of Rural Water Supply Projects in Nepal,” *Water-Observatory.Net*, no. April, pp. 545–560, 2003.
- [41] A. E. . Contini, “Calorimetric Investigations of a Series of Energetic Polyphosphazenes Defence Academy of the United Kingdom,” 2005.
- [42] P. Q. Franco, J. Silva, and J. P. Borges, “Produção de Fibras de Hidroxiapatite por Electrofição,” *Ciência Tecnol. dos Mater.*, vol. 22, no. 1/2, pp. 57–64, 2010.
- [43] N. Rameshbabu, T. S. S. Kumar, T. G. Prabhakar, V. S. Sastry, K. V. G. K. Murty, and K. Prasad Rao, “Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 80, no. 3, pp. 581–591, 2007.

- [44] I. R. Gibson and W. Bonfield, "Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 59, no. 4, pp. 697–708, 2002.
- [45] M. C. (Investigador P. do I. Coelho, "Tecnologia De Pós," *Tecnol. Ind. - Fac. Farmácia da Univ. Lisboa*.

Anexo 1 – Razão da Precipitação dos precursores da Hidroxiapatite

De forma a poder-se perceber porque havia precipitação durante a fase crítica da adição dos precursores um ao outro testou-se as seguintes hipóteses:

- 1- Adicionar rapidamente o precursor de cálcio ao do fosforo
- 2- Adicionar rapidamente o precursor de fosforo ao de cálcio.
- 3- Adicionar lentamente o precursor de fosforo ao de cálcio.
- 4- Adicionar lentamente o precursor de cálcio ao de fosforo.

Apenas as hipóteses 2 e 3 não precipitaram. Aplicou-se assim a hipótese 2 durante toda a dissertação. De referir que durante o resto da fase de produção de hidroxiapatite não houve mais precipitação desde que se aplicou a hipótese 2.