

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROXIAPATITA DOPADA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Flávio Augusto Cavadas da Silva Andrade¹, Eliana Cristina da Silva Rigo², Andrés Vercik², Luci Cristina de Oliveira Vercik², Gérman Ayala Valencia², Leticia Gavião Ferreira², João Manuel Domingos de Almeida Rollo¹

¹Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC-USP, Universidade de São Paulo, São Carlos (SP), Brasil

²Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga (SP), Brasil
E-mail: flavio.andrade@usp.br

RESUMO. *Hidroxiapatita dopada com nanopartículas de prata foi obtida por imersão do pó em diluições crescentes de uma solução contendo AgNPs. As nanopartículas de prata foram sintetizadas em diferentes tempos e caracterizadas por espectroscopia UV-vís. A avaliação da difração de raios X (DRX) demonstrou que não houve mudança na fase majoritária da HA após as dopagens com AgNPs. Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram características morfológicas dos pós após a dopagem e a presença de prata foi confirmada pela análise de raios X por energia dispersiva (EDAX). O efeito antibacteriano dos pós dopados foi avaliado usando-se cepas de Staphylococcus aureus pelo teste de disco-difusão. O halo de inibição encontrado varia de acordo com a quantidade de nanopartículas utilizada na dopagem, mesmo para baixas concentrações de AgNPs. Tais resultados indicam que o método de imersão da HA em soluções contendo AgNPs é promissor para a obtenção de materiais bioativos com baixa citotoxicidade e características antibacterianas.*

Palavras-chave: *hidroxiapatita, nanopartículas de prata, dopagem, efeito antimicrobiano*

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de materiais avançados para aplicações biomédicas está entre um dos problemas mais importantes enfrentados pela engenharia de materiais. Apesar do grande uso de materiais metálicos nas aplicações ortopédicas existe ainda uma série de problemas associadas como corrosão, desgaste e reações negativas. Como alternativa tem-se os biomateriais inorgânicos baseados em fosfatos de cálcio e, entre estes, a hidroxiapatita sintética (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) se destaca devido a suas propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade⁴. Hidroxiapatita tem sido utilizada amplamente em uma série de defeitos ósseos em cirurgias ortopédicas, maxilofaciais e bucais. Também se observa o uso como recobrimento em próteses metálicas para melhorar as propriedades biológicas destes materiais².

Embora as taxas de sucesso dos implantes sejam dependentes da osteointegração, a sobrevivência longa dos implantes é dependente da prevenção de infecções bacterianas após a colocação dos implantes¹⁴. Em artroplastias as taxas de infecções associadas são altas e causam efeitos devastadores nos pacientes tais como redução do tempo de vida útil e aumento das taxas de falhas das próteses. As infecções são ainda responsáveis por enormes custos médicos, aumento de morbidade e diminuição da satisfação dos pacientes.

Uma estratégia comum para tratar e prevenir infecções associadas aos implantes ortopédicos é injetar antibióticos de maneira controlada nos locais dos implantes com o

objetivo de administrar altas doses locais sem exceder a toxicidade sistêmica dos medicamentos¹⁹. Entretanto, a capacidade de certas cepas bacterianas desenvolverem resistências contra antibióticos tem despertado o interesse em entregas controladas por outros agentes antibacterianos com uma ampla atividade e baixa incidência de resistência, tais como prata e zinco⁷.

O amplo espectro antibacteriano da prata é conhecido há muitos anos na literatura e muitos trabalhos têm se dedicado a explicar como ocorre esse fenômeno¹⁶. O mecanismo mais aceitável indica que as nanopartículas se aderem na superfície carregada negativamente das membranas celulares conduzindo a desnaturação de proteínas e levando a uma consequente morte celular. Em paralelo, vários autores têm sugerido que as nanopartículas possam penetrar no interior celular causando danos pela interação com átomos de enxofre e fósforo presente em ligantes de proteínas e no DNA¹⁰. As cepas bacterianas comuns envolvidas em infecções estão incluídas na lista de patógenos que a prata pode eliminar. Da mesma maneira, a toxicidade para baixas concentrações de prata para células humanas é bem estabelecida. Nanopartículas de prata mostram propriedades antimicrobianas mais eficientes que outros sais de prata devido a maior área de superfície e a baixa solubilidade o que permite melhor contato com os microorganismos. Na maioria dos estudos as nanopartículas de prata são relatadas como atóxicas para baixas concentrações e com efeitos tóxicos para altas concentrações.

Neste trabalho, apresentamos uma hidroxiapatita dopada com baixa quantidade de nanopartículas de prata buscando diminuir os efeitos citotóxicos pela inserção da prata no biomaterial, mas que ainda assim apresente efeito antimicrobiano. O efeito antimicrobiano da HA dopada foi avaliado contra bactérias Gram-positivas. As soluções coloidais de nanopartículas de prata utilizadas na imersão foram obtidas pela metodologia simples de D. Wei e W. Qian² e foram estudadas as relações entre a qualidade das nanopartículas formadas e a variável tempo de reação durante a síntese.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes utilizados na etapa de precipitação da HA foram de grau analítico, hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), ácido fosfórico (H_3PO_4). Para a obtenção das nanopartículas de prata usou-se quitosana com grau de desacetilação de 85% (Polymar S/A), nitrato de prata (AgNO_3) e ácido acético 99.5%, ambos da marca Synth. Para o teste de halo de inibição utilizou-se meio de cultivo Ágar Mueller-Hinton (padrão para antibiograma), discos de antibiótico gentamicina 10 μg (CEFAR) e cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (padrão usada em testes de susceptibilidade) doada pela Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ).

2.1 Síntese do pó de hidroxiapatita

Obteve-se a hidroxiapatita por precipitação química mediante a reação entre ácido fosfórico e hidróxido de cálcio. Uma solução 0,5 M de H_3PO_4 foi gotejada lentamente em uma solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ na concentração de 0,5 M, sob agitação constante e na temperatura ambiente. Após gotejamento, a solução foi mantida sob agitação constante por 18 horas e ajustou-se o pH para 7,0 com auxílio de uma solução 0,5 M de H_3PO_4 . Em seguida, a suspensão foi filtrada usando papel filtro (Qualy) com 14 μm , lavada duas vezes com água destilada e seca em estufa a 60°C. Esse sólido foi desaglomerado usando um almofariz de ágata, peneirado (<180 μm) e, finalmente, calcinado a 800°C por um período de 3 horas.

2.2 Síntese de nanopartículas de prata (AgNPs)

Preparou-se uma solução de quitosana na concentração de 6,92 mg/mL usando-se uma solução de ácido acético a 1% até completa homogeneização². Para a síntese de

nanopartículas foi preparado uma mistura usando a proporção de 4 mL de AgNO₃ (52 mM) com 10 mL de solução de quitosana na concentração de 6,92 mg/mL². Após 15 minutos sob agitação e em temperatura ambiente, a mistura foi transferida para tubos de ensaios de vidro para ocorrer redução em banho-maria a 95°C por 6, 12, e 24 horas.

2.3 Dopagem da hidroxiapatita com as AgNPs

Para as dopagens, foram preparadas quatro diluições com quantidades crescentes de nanopartículas de prata a partir de uma solução coloidal de AgNPs sintetizada previamente. A solução coloidal escolhida foi a sintetizada com tempo de 6 horas e que continha uma solução de 37 mM AgNO₃ antes da redução. Usou-se a imersão de 10 g da hidroxiapatita, preparada via precipitação química, em 50 mL de volume final contendo diferentes diluições da solução coloidal de AgNPs à temperatura ambiente por 30 minutos (Tabela 1). Logo em seguida, a suspensão foi filtrada, seca em estufa a 60°C por 24 horas e calcinadas novamente a 800°C. Parte do pó foi prensado em forma de discos com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura para o teste de halo de inibição.

Tabela 1. Relação das amostras de hidroxiapatita dopadas com soluções coloidais de AgNPs durante o processo de imersão

Amostra	Volume de AgNPs (mL)	Volume de água destilada (mL)	Proporção das diluições
1	1	49	1:50
2	5	45	1:10
3	10	40	1:5
4	25	25	1:2

2.3 Atividade antibacteriana – halo de inibição

A metodologia seguida foi adaptada da norma global consensual M2-A8 do NCCLS¹. O meio Ágar Mueller-Hinton foi preparado conforme as instruções do fabricante, esterilizado e distribuído em placas de Petri. Para a obtenção da bactéria, 100 µL da solução estoque de *S. aureus* (armazenada em glicerol 10% e mantida sob congelamento) foram incubadas em 10 mL de caldo BHI e ficaram sob agitação lenta e constante por 18 horas a 37°C. A cultura foi diluída para 3x10⁸ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia/mL) e 100 µL desta suspensão foram inoculadas nas placas de Petri já preparadas. Sobre superfície da placa semeada foram depositados 5 discos com 10 mm de diâmetro (hidroxiapatita pura e amostras 1, 2, 3 e 4) e 1 disco com 6 mm de diâmetro contendo o antibiótico Gentamicina 10 µg (CEFAR) que corresponde ao controle positivo. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após este período, foi realizada a leitura dos halos de inibição com o auxílio de uma régua e registradas imagens fotográficas. Os resultados foram feitos em triplicata e os halos de inibição foram comparados entre as diferentes dopagens da HA com nanopartículas de prata.

2.4 CARACTERIZAÇÃO

As propriedades ópticas das soluções de nanopartículas foram medidas por um espectrofotômetro Uv-vís utilizando-se uma diluição de 1:10.

Os pós antes e após dopagem (amostras 1, 2, 3 e 4) foram caracterizados por difração de raios X (Analytical X-Ray Systems, Siemens D5005, com radiação Cu-K_α e passo de 0,032°), por microscopia eletrônica de varredura e por EDAX (MAGELAN 400L, FEI Company, Apollo X).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o espectro do UV-vís mostrado na Figura 1, a máxima absorção da luz para as nanopartículas sintetizadas foi em torno de 420 nm. Todas as análises dos colóides sintetizados (de cor amarela) foram diluídas para na proporção de 1:10 de forma a obter valores de absorção máxima ($A_{\text{máx}}$) abaixo de 1,0 u.a. (linearidade da Lei de Beer), possibilitando melhores comparações entre os espectros.

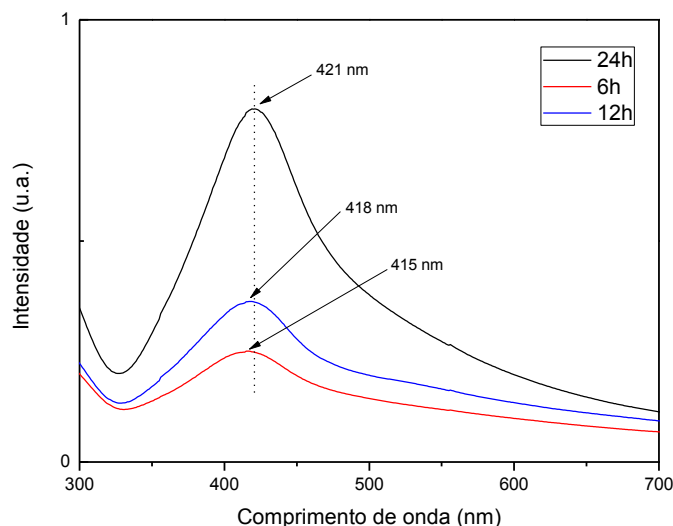


Figura 1. Espectro de absorção do Uv-vís para nanopartículas sintetizadas em 6 h (inferior), 12 h (intermediária) e 24 h (superior)

A posição e a forma da banda de absorção da superfície plasmônica obtida é similar a nanopartículas de prata esféricas encontrada na literatura. Avaliando o comprimento de onda no máximo de absorção das diferentes soluções sintetizadas (λ_{max}), temos informações sobre o tamanho médio das AgNPs. As nanopartículas que possuem menor diâmetro tendem a ter o comprimento de onda do máximo de absorção deslocado para a região do espectro de luz do ultravioleta (colóide sintetizado com 6 h na Figura 1), enquanto um aumento do tamanho médio das nanopartículas é seguido por um deslocamento para a região do espectro de luz do vermelho (colóide sintetizado com 12 h na Figura 1). Assim, com o aumento do tempo de síntese das AgNPs temos maior quantidade de nanopartículas formadas, porém um pequeno aumento do diâmetro médio de nanopartículas formadas que não é interessante para a dopagem proposta. Como desejamos partículas de menores tamanhos com o objetivo de aumentar a área superficial total da prata iremos escolher a síntese com 6 horas para o processo de dopagem da hidroxiapatita.

Na etapa da dopagem com a solução de nanopartículas sintetizada em 6 horas, foi feita uma leitura no Uv-vís das diluições contendo diferentes quantidades de nanopartículas antes da imersão da hidroxiapatita e logo após 30 minutos da imersão (o filtrado da solução). Os espectros são mostrados na Figura 2.

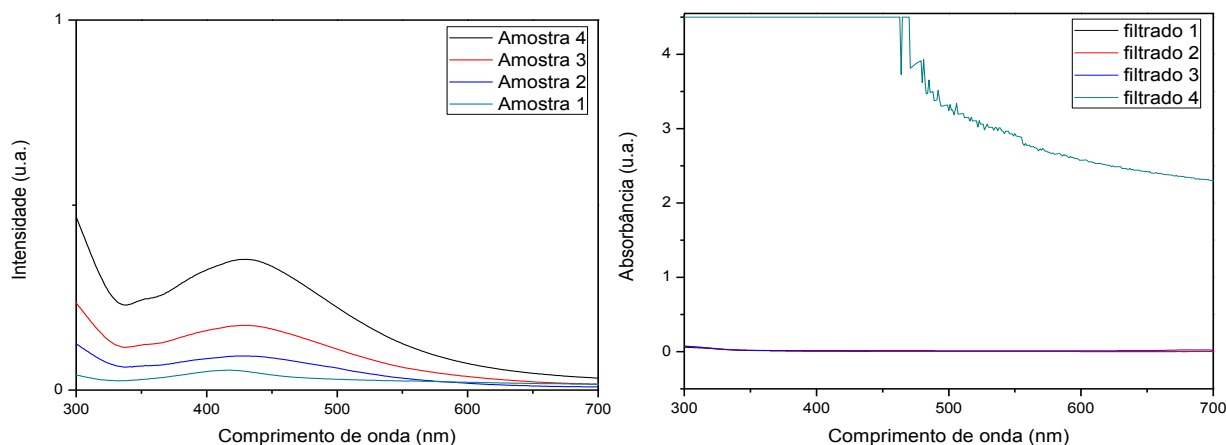


Figura 2. Espectro de absorção do Uv-vís para as soluções diluídas do colóide sintetizado com 6 horas antes da dopagem (esquerda) e após a dopagem (direita).

Nota-se que houve absorção das nanopartículas com a matriz da hidroxiapatita para as amostras 1, 2 e 3. Na amostra 4 (diluição 1:2 do colóide sintetizado), provavelmente houve saturação no processo de imersão da hidroxiapatita, já que após a filtração existia uma cor característica de nanopartículas de prata (amarelo) numa suspensão de pó dopado que atravessou o filtro.

Todos os pós dopados, inclusive a hidroxiapatita pura obtida por precipitação química, foram analisados pela técnica de DRX. Foi obtido majoritariamente a fase da HA tanto para o pó precipitado quimicamente quanto para as amostras dopadas com AgNPs. Os picos característicos da hidroxiapatita ($2\theta=31,7^\circ$; $32,9^\circ$; $32,2^\circ$; $25,9^\circ$; $49,4^\circ$; $46,7^\circ$; $39,8^\circ$; 34° ; $28,9^\circ$) podem ser observados na Figura 3 que contém os espectros de DRX para o pó puro da HA e da amostra 4 (de maior concentração) que é igual ao espectro das outras amostras dopadas. Como a quantidade adicionada de nanopartículas na dopagem foi bem pequena não é possível detectar no espectro as reflexões de Bragg para a prata metálica.

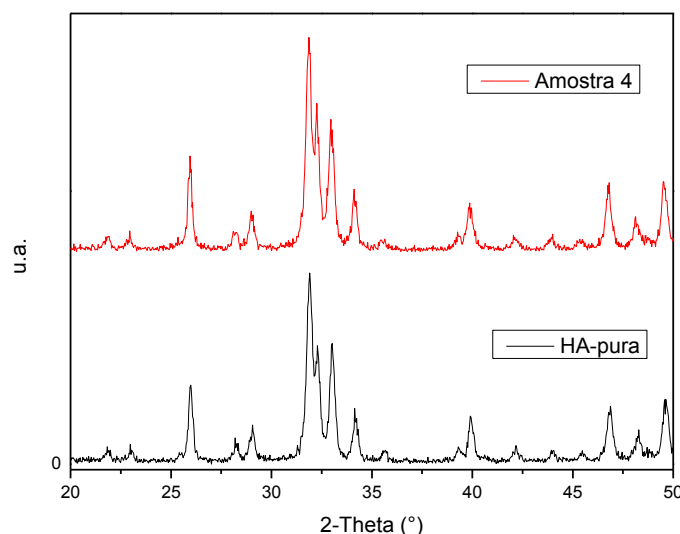


Figura 3. Comparativo dos espectros de DRX obtidos através da HA pura e da amostra 4 dopada. A estrutura cristalina é majoritária para a hidroxiapatita.

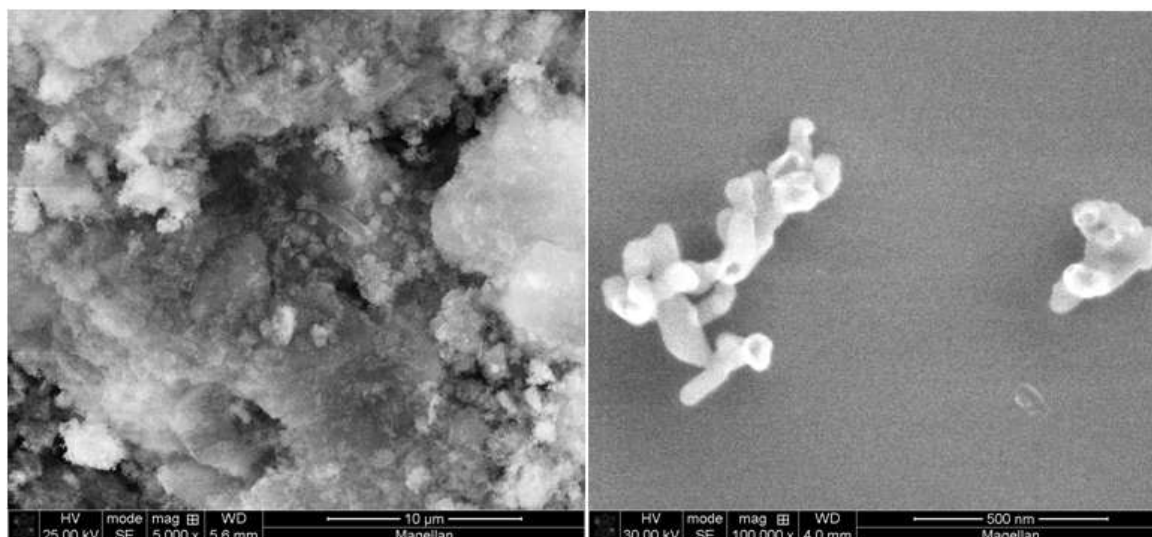


Figura 4. Micrografias eletrônicas de varredura para dois aumentos diferentes. Na direita, detalhes da morfologia do MEV com módulo de transmissão de uma estrutura da amostra 4 após desaglomeração com acetona.

As imagens da micrografia eletrônica de varredura (MEV) evidenciam a presença de prata quando investigado a amostra dopada com maior concentração de prata (amostra 4). Na Figura 4 é possível ver ao lado esquerdo o pó aglomerado em um aumento de 5.000x. Após desagolmerar o pó com acetona e usando o módulo de transmissão do microscópio MAGELAN, podemos observar maiores detalhes da morfologia da HA dopada. A morfologia indica boa estrutura cristalina com tamanhos médios de 50nm.

Com o espectro de EDAX sobre a amostra 4 foi possível confirmar a presença de prata na dopagem. O mapeamento da distribuição simultânea dos elementos numa região escolhida é evidenciado na Figura 5-a. Para um bom mapeamento como o da Figura 5 foi necessário um tempo de 30 minutos para o equipamento atingir o máximo de contagem dos elementos.

Para avaliar a atividade antibacteriana aos pós de HA dopados com as diferentes concentrações de nanopartículas de prata foi usado o teste de disco-difusão para a bactéria *Staphylococcus aureus*. Nesse método, um gradiente de concentração é criado ao redor dos discos após plaqueamento com as cepas de bactérias. Após 24 horas de incubação foi observado um tapete confluyente de crescimento de bactérias e halos de inibição uniformes e circulares. A cepa utilizada apresentou sensibilidade ao antimicrobiano comercial Gentamicina 10µg (controle positivo) com um halo de inibição médio de 19,5 mm (incluindo diâmetro do disco de 6,0 mm). Esse valor corresponde de forma correta a zona limite na tabela padrão de interpretação de halos de inibição para esse antibiótico e prova que o ensaio ocorreu dentro dos padrões de qualidade. Para as amostras de HA dopadas com nanopartículas de prata devemos utilizar outro critério para interpretação do halo, já que os discos possuem diâmetro com 10,0 mm e inviabiliza comparações com as tabelas padrões da norma que são baseadas em discos de 6,0 mm. Assim, o teste de disco-difusão torna-se aceitável ao compararmos entre si os discos de 10,0 mm usados, avaliando o tamanho do halo para cada concentração diferente de nanopartículas de prata usada.

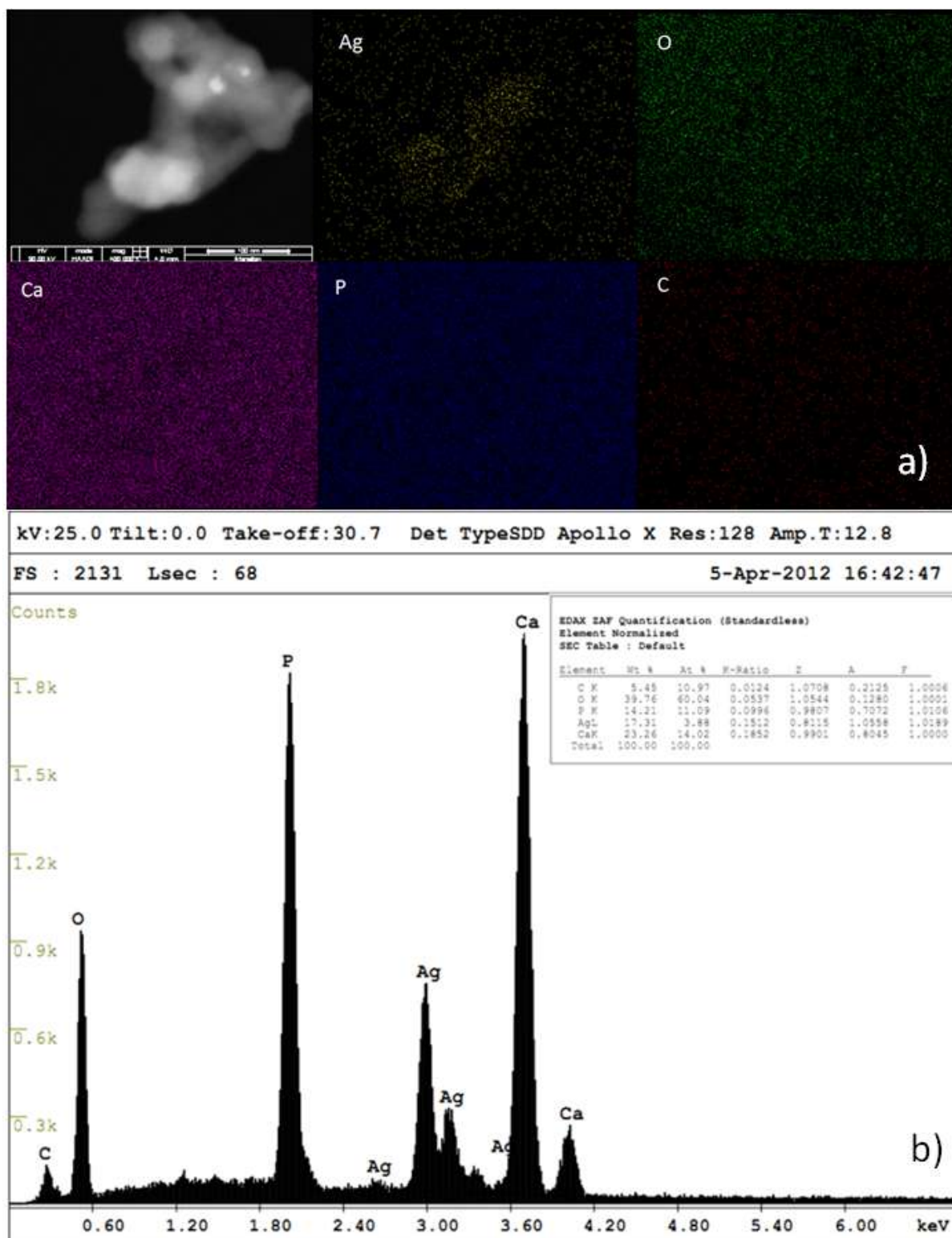


Figura 5. Resultado do EDAX para a amostra 4 do pó dopado (maior concentração de nanopartículas). Na figura (a) tem-se a imagem do mapeamento da distribuição simultânea dos elementos baseados numa região da amostra e na figura (b) o espectro da quantificação dos elementos normalizados.



Figura 6. Halos de inibição contra *Staphylococcus aureus* observadas em volta dos discos de hidroxiapatita dopados para diferentes concentrações de AgNPs. Ao centro da foto temos o controle positivo usando Gentamicina 10 μ g e no topo temos o controle negativo usando a HA pura (HAp).

As amostras apresentaram uma relação direta entre halo de inibição e a quantidade de nanopartículas adicionadas na dopagem. Com base na Figura 6 temos que o aumento da quantidade de AgNPs resulta em um aumento do halo de inibição contra a *Staphylococcus aureus*. Assim o halo é crescente da amostra 1 até a amostra 4, onde torna-se mais nítido. Resultados similares, porém com menor efeito da lixiviação das partículas de prata foram observados por Rameshbabu et. al.⁵.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, descreveu-se um método simples, fácil e de baixo custo para dopar a hidroxiapatita com nanopartículas de prata. Mesmo para baixas quantidades de AgNPs foi observado efeito antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*. Foi estabelecida uma relação direta entre quantidade de nanopartículas de prata adicionadas e halo de inibição. A microestrutura da hidroxiapatita não se alterou após a dopagem com as nanopartículas de prata. Dessa forma, o método de imersão da HA em soluções contendo AgNPs mostra-se promissor para a obtenção de materiais bioativos e de baixa citotoxicidade com características antimicrobianas.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- [1] NCCLS M2-A8—Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition (ISBN 1-56238-485-6).
- [2] Wei D, Qian W.:Col. Surf B Biointerfaces. 2008 Mar 15;62(1):136-42.
- [3] Morris HF, Ocbi S: Hydroxyapatite-coated implants: a case for their use. JOral Maxillofac Surg 1998, 56:1303-1313.
- [4] Miriam Miranda, Adolfo Fernández, Marcos Díaz, Leticia Esteban-Tejeda, Sonia López-Esteban, Francisco Malpartida, Ramón Torrecillas, José Serafín Moya: Journal of Materials Research 2010/01, Page 122-127.
- [5] Rameshbabu N, Sampath Kumar TS, Prabhakar TG, Sastry VS, Murty KV, Prasad Rao K.,J Biomed Mater Res A. 2007 Mar 1;80(3):581-91.
- [6] Hench LL: Bioceramics. J Am Ceram Soc 1998, 81:1705-1728.
- [7] w. Zhang , X. Qiao, J. Chen: Colloids and Surface A: Pysicalchemistryand Engenireering Aspects 299 (2007) 22.
- [8] Zakharov NA, Polunina IA, Polunin KE, Rakitina NM, Kochetkova EI,Sokolova NP, Kalinnikov VT: Calcium hydroxyapatite for medical applications. Inorg Mater 2004, 40:641-648.
- [9] Verret DJ, Ducic Y, Oxford L, Smith J: Hydroxyapatite cement in craniofacial reconstruction. Otolaryngol Head Neck Surg 2005, 133:897-899.
- [10] A. Panacek, L. Kvitek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova,N. Pizurova, V. K. Sharma, T. Nevecna and R. Zboril, J. Phys.Chem. B, 2006, 110, 16248–16253.
- [11] Tanaskovic D, Jokic B, Socol G, Popescu A, Mihailescu IN, Petrovic R, Janackovic D: Synthesis of functionally graded bioactive glass-apatite multistructures on Ti substrates by pulsed laser deposition. Appl Surf Sci 2007, 254:1279-1282.
- [12] Hayashi K, Mashima T, Uenoyama K: The effect of hydroxyapatite coating on bony ingrowth into grooved titanium implants. Biomaterials 1999,20:111-119.
- [13] Keir, R.; Sadler, D.; Smith, W. E. Applied Spectroscopy 2002, 56, 551-559.; Guingab, J. D.; Lauly, B.; Smith, B. W.; Omenetto, N.; Winefordner, J. D. Talanta 2007, 74, 271-274).
- [14] W. Chen, Y. Liu, H.S Courtney,M. Bettenga, C.M. Agrawal, J.D. Bumgardner, J.L. Ong: Biomaterials 27 (2006) 5512.DOI.
- [15] S. Nasser: Orthopedic Clinics of North America (2) (1992) 265.DOI.
- [16] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri,J. T. Ramirez and M. J. Yacaman, Nanotechnology, 2005, 16, 2346–2353.
- [17] Guingab, J. D.; Lauly, B.; Smith, B. W.; Omenetto, N.; Winefordner, J. D. Talanta 2007, 74, 271-274.; Leopold, N.; Lendl, B. J.Phys.Chem. 2003, 107, 5723.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100-S21 e M02-A10.
- [19] W.J. Leach, N.I.L. Wilson: J. Royal Coll. Surg. Edinb. 37 (1992)265.

Synthesis and characterization of hydroxyapatite-doped silver nanoparticles

Flávio Augusto Cavadas da Silva Andrade¹, Eliana Cristina da Silva Rigo², Andrés Vercik², Luci Cristina de Oliveira Vercik², German Ayala Valencia², Leticia Gavião Ferreira², João Manuel Domingos de Almeida Rollo¹

¹Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC-USP, Universidade de São Paulo, São Carlos (SP), Brazil

²Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga (SP), Brazil
E-mail: flavio.andrade@usp.br

Abstract. *Hydroxyapatite-doped silver nanoparticles was obtained by immersing the powder in increasing dilutions of a solution containing AGNPS which were synthesized in different times and were characterized by UV-vis spectroscopy. The X-ray diffraction (XRD) studies demonstrate no change in the major phase of HA. Scanning Electron Microscopy (SEM) revealed morphological characteristics of powders after doping and the presence of silver*

was confirmed by energy dispersive X-ray (EDAX) analysis. The antibacterial effect of the doped powders was evaluated using strain of Staphylococcus aureus by disc-diffusion test. The zone of inhibition was found to vary with the amount of silver nanoparticle in the doped powder even for low concentrations of AgNPs. These results indicate that the method of immersion hydroxyapatite in solutions containing AgNPs is promising to obtain bioactive materials with low cytotoxicity and antibacterial effects.

Keywords: *hydroxiapatite, silver nanoparticle, doped, antibacterial effect*