



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
MATERIAIS

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM
ESTRÔNCIO ASSOCIADA À CLOREXIDINA

Mestranda: Carla Adriana Rodrigues de Sousa Brito

Orientador: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto

Teresina – Piauí

2016

CARLA ADRIANA RODRIGUES DE SOUSA BRITO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM
ESTRÔNCIO ASSOCIADA À CLOREXIDINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais da Universidade Federal do Piauí (UFPI) como requisito complementar à obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto

Teresina – Piauí

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

B862a Brito, Carla Adriana Rodrigues de Sousa.
Atividade antibacteriana da hidroxiapatita dopada com estrôncio associada à clorexidina / Carla Adriana Rodrigues de Sousa Brito – 2016.

97 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) –
Universidade Federal do Piauí, 2016.

“Orientação: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho.”

1. Hidroxiapatita. 2. Estrôncio. 3. Clorexidina. 4. Atividade Antibacteriana. I. Barreto, Humberto Medeiros. II. Título.

CDD 615.239

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM
ESTRÔNCIO ASSOCIADA À CLOREXIDINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais da Universidade Federal do Piauí (UFPI) como requisito complementar à obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Aprovada em: 07/07/2016



Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho
Universidade Federal do Piauí
Orientador



Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto
Universidade Federal do Piauí
Coorientador



Profa. Dra. Josie Haydee Lima Ferreira Paranaíba
Universidade Federal do Piauí
Examinadora externa ao Programa



Prof. Dr. Roberto Arruda Lima Soares
Instituto Federal do Piauí
Examinador Externo à Instituição

Teresina – Piauí

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^ª. Dr.^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETORIA DO CENTRO DE TECNOLOGIA

Profa. Dra. Nícia Bezerra Formiga Leite

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE TECNOLOGIA

Prof. Dr. Rafael Rocha Matias

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
DOS MATERIAIS**

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

Prof. Dr. Bartolomeu Cruz Viana Neto

DEDICATÓRIA

**A minha família, meus filhos, mãe e esposo pela compreensão na realização de
mais um objetivo e que em todos os momentos foram meu incentivo.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela conquista. Aos meus pais Francisco (*in memoriam*) e Antônia pelos valores passados na minha formação e que os levo até hoje na minha vida pessoal e profissional. E todos os meus familiares pelo apoio e carinho. Em especial ao meu esposo, amigo e companheiro por compartilharmos todos os dias a cumplicidade e o amor. Aos meus filhos Lucas e Caio razão da minha vida e meus maiores motivadores.

Ao prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho, pela orientação, confiança, paciência e incentivo. À prof^a. Dr^a. Josy Osajima o meu enorme agradecimento pelos ensinamentos e conselhos que levarei por toda vida. Agradeço ao prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto por compartilhar seus conhecimentos, pela sua paciência e companheirismo.

Agradeço a todos os professores do programa de pós-graduação em Ciência dos Materiais pelos conhecimentos transmitidos. A UFPI pelo incentivo a qualificação de seus servidores. Ao departamento de Parasitologia e Microbiologia meu local de trabalho pela compreensão e liberação de partes de minhas atividades para a conclusão do curso. A chefe do Departamento Josye Haydeé, aos professores e aos funcionários Leide, Caio, Elsie, Fernando, Evaldo, Raimundo, Polyana, Alessandra, Ribamar, Antônia todos meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas de turma Josany, Junior, Marcos Araújo, Marcos Guilherme, Fernando, Joyce, e em especial a Ariane por sempre está disponível, a Thátilla companheira de grupo e trabalho por compartilhar todas as aflições durante curso e a Avilnete amiga de muitos anos que sempre tem a palavra certa no momento certo. Aos amigos Solranny e Elton que me motivaram a realizar esse sonho.

Aos funcionários do LIMAV, Kelson Silva, Fabrícia Dourado, Raimundo, Kelson, Elton, Luciano e Edgar sempre dispostos a ajudar e compartilhar. A todo o grupo de pesquisa, pela troca de conhecimentos essenciais para a realização deste trabalho, Thátilla, Marcus, Ewerton, Marcos, Debora, e Alan Ícaro, companheiros que sempre estavam à disposição para tirar dúvidas e nos experimentos do laboratório.

Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

“Nada te perturbe, nada te espante, tudo passa, Só Deus não muda, Só Deus basta...”

Santa Teresa d’Avila

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS	4
2 CAPÍTULO 1–APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO : UMA PROSPECÇÃO.....	5
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2METODOLOGIA.....	12
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1 Artigos Pesquisados.....	14
3.2 Patentes Depositadas	25
4 CONCLUSÃO.....	32
5 REFERÊNCIAS	33
3 CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO ASSOCIADA À CLOREXIDINA	36
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1 INTRODUÇÃO.....	40
2 PARTE EXPERIMENTAL.....	43

2.1 Materiais e Reagentes	43
2.2 Síntese da Hidroxiapatita.....	43
2.3 Síntese da Hidroxiapatita Dopada com Estrôncio	44
2.4 Incorporação da Clorexidina na Hidroxiapatita.....	44
2.5 Caracterizações	45
2.5.1 Difração de Raios-X (DRX)	45
2.5.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	46
2.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	46
2.5.4 Análise Térmica.....	46
2.6 Atividade Antibacteriana.....	47
2.6.1 Cepas Bacterianas.....	47
2.6.2 Preparo do Inóculo Bacteriano	47
2.6.3 Teste do Contato Direto.....	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1 Caracterização da Hidroxiapatita Pura, da Hidroxiapatita Dopada com Estrôncio e dos Biocompósitos.....	49
3.1.1 Difração de Raios-X (DRX)	49
3.1.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	51
3.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	53
3.1.4 Análise Térmica.....	55
3.1.5 Adsorção.....	55
3.2 Atividade Antibacteriana.....	56
4 CONCLUSÃO.....	60

5 REFERÊNCIAS	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
PERSPECTIVAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

Figura 1.1 - Diferentes materiais utilizados nos implantes em vários locais do esqueleto..1

CAPÍTULO 1 - HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO EM APLICAÇÕES BIOLÓGICAS: UMA PROSPECÇÃO

Figura 1.1 - Classificação dos artigos quanto à aplicação do material..... 20

Figura 1.2 - Microrganismos testados nos artigos pesquisados..... 20

CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO ASSOCIADA À CLOREXIDINA

Figura 2.1 - Difratoograma da HAp pura 49

Figura 2.2 - DRX da HAp pura e HAp Sr 0,5%, 1,75% e 5%. 50

Figura 2.3 - FTIR da HAp pura e HAp Sr 0,5%, 1,75% e 5%. 51

Figura 2.4 - FTIR da HAp Sr0,5% e HAp Sr/CHX0,8, 2 e 5..... 52

Figura 2.5 -MEV: a) HAp pura, b) HAp Sr 0,5%, c) HAp Sr 1,75%, d) HAp 5Sr 5% e)HApSr/CHX0,8. 53

Figura 2.6 - EDS: a) HAp pura b) HApSr 0,5%, b) HAp Sr 1,75% c) HAp Sr 5% d) HApSr0,5/CHX0,8 53

Figura 2.7 - TG da HAp pura e da HAp dopada com estrôncio 0,5% 1,75% e 5% 54

Figura 2.8 -TG da HAp Sr0,5% e dos biocompósitos HApSr/CHX0,8, 2 e 5% 55

Figura 2.9 –Isotermas de adsorção da CHX na HAp pura e na HAp Sr0,5%. 55

Figura 2.10 - Efeito inibitório das HAp Sr 0,5%; HAp Sr 1,75% e HAp Sr 5% frente a cepa padrão da bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 25.923	56
Figura 2.11 - Efeito inibitório das HAp Sr 0,5%; HAp Sr 1,75% e HAp Sr 5% frente a cepa padrão da bactéria <i>E. coli</i> ATCC 25.922	57
Figura 2.12 - Efeito inibitório das HAp/CHX0,8 e HApSr0,5/CHX0,8 frente a cepa padrão da bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 25.923.	58
Figura 2.13 - Efeito inibitório das HAp/CHX0,8 e HApSr0,5/CHX0,8 frente a cepa padrão da bactéria <i>E. coli</i> ATCC 25.922.....	58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO EM APLICAÇÕES BIOLÓGICAS: UMA PROSPECÇÃO

Tabela 1.1 - Número de artigos encontrado por palavra chave e combinações na base Scopus.....	14
Tabela 1.2 - Número de artigos encontrado por palavra chave e combinações na base Web of Science.....	15
Tabela 1.3 - Número de artigos encontrado por palavra chave e combinações na base Scielo.....	16
Tabela 1.4 - Comparação entre os bancos de dados para palavras chaves as pesquisas.	18
Tabela 1.5 - Classificação dos artigos encontrados no SCOPUS e WEB OF SCIENCE quanto ao objetivo da pesquisa realizada.	19
Tabela 1.6 - Metais utilizados associados ao estrôncio para atividade antimicrobiana.	21
Tabela 1.7 - Testes antimicrobianos utilizados nos artigos pesquisados.....	22
Tabela 1.8 - Características dos artigos estudados.	23
Tabela 1.9 - Número de patentes encontradas por palavra chave e combinações nas bases EPO, USPTO e INPI.....	26
Tabela 1.10 - Quantidade de patentes depositadas no INPI, utilizando-se as palavras da expressão na língua portuguesa.	26
Tabela 1.11 - Descrição das patentes encontradas no USPTO e INPI.	28

CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO ASSOCIADA COM CLOREXIDINA

Tabela 2.1 - Bandas de Absorção na região do infravermelho da HAp $\text{Ca}(\text{OH})_2$	51
Tabela 2.2 - Dados da incorporação da Clorexidina na HAp pura.....	57

Tabela 2.3 - Dados da incorporação da Clorexidina na HApSr/CHX.....	57
Tabela 2.4 - Efeito inibitório da HAp dopada com estrôncio 0,5 1,75 e 5% sobre cepas padrão de <i>S. aureus</i> (ATCC 25.923) e <i>E. coli</i> (ATCC 25.922).....	57
Tabela 2.5 - Efeito inibitório da HApSr 0,5 %/CHX0,8% sobre cepas padrão de <i>S. aureus</i> (ATCC 25.923) e <i>E. coli</i> (ATCC 25.922).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACP = Fosfato de cálcio amorfo

ATCC = American Type Culture Collection

BHI = Brain heart infusion

β -TCP = Beta fosfato tricálcio

CHX = Clorexidina

CMI = Concentração mínima inibitória

DRX = Difratoograma de raio X

EDS = Energy Dispersive X-ray Spectroscopy

EPO = European patent office

FTIR = Infravermelho com transformada de Fourier

HAp = Hidroxiapatita

HApSr = Hidroxiapatita dopada com estrôncio

HAp/CHX = Hidroxiapatita pura com clorexidina incorporada

HApSr/CHX = Hidroxiapatita dopada com estrôncio e com clorexidina incorporada

INPI = Instituto nacional de propriedade intelectual

JCPDS-ICCD = Joint Committee on powder Diffraction Standard – International Center of Diffraction Data

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

MH = Mueller-Hinton

N_1 = Média aritmética das unidades formadoras de colônia das placas de controle

N_2 = Média aritmética das unidades formadoras de colônias de cada material testado

OCP = Octafosfato de cálcio

TCP = Fosfato tricálcio

TG = Termogravimetria

USPTO = United states patent and trademark

UFC = Unidade formadora de colônia

UV-vis = Ultravioleta – visível

η = Efeito inibitório

RESUMO

Novos biomateriais que venham substituir ou reparar tecidos ósseos danificados se tornam cada dia mais necessário, de forma que possam promover uma melhor qualidade de vida com mais saúde. A hidroxiapatita (HAp) se destaca entre as biocerâmicas como o material mais utilizado na prática clínica para essa finalidade. Por ser biocompatível e osteocondutor, é um excelente substituto ósseo em cirurgias ortopédicas. O presente estudo teve por objetivo a obtenção de uma hidroxiapatita dopada com estrôncio e adsorvida com clorexidina visando uma possível aplicação biomédica. Inicialmente realizou-se uma prospecção científica-tecnológica sobre as aplicações da hidroxiapatita dopada com estrôncio com atividade antimicrobiana. Cujos resultados indicaram uma escassez de artigos e ausência de patentes relacionadas com o tema pesquisado. A síntese da HAp pura e HApSr foi realizada pelo método de coprecipitação. Posteriormente, fez-se a adsorção da clorexidina (CHX), obtendo-se os biomateriais Hidroxiapatita com clorexidina incorporada (HAp/CHX) e Hidroxiapatita dopada com estrôncio e com clorexidina adsorvida (HApSr_{0,5}/CHX). Os biomateriais foram caracterizados pelas técnicas de DRX, FTIR, MEV e TG, com o UV-Vis verificou-se a incorporação da CHX na HAp pura e HApSr. A atividade antibacteriana dos biomateriais obtidos foi avaliada pelo método de contato direto, contra Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A dopagem com estrôncio melhorou significativamente a atividade do biomaterial, principalmente contra a cepa *E. coli*. No entanto, a adsorção da CHX na HApSr resultou em um efeito inibitório de 100% para todas as cepas testadas. Portanto, o biomaterial HApSr/CHX apresenta-se como um produto promissor para aplicações biomédicas.

Palavras-Chave: Hidroxiapatita, estrôncio, clorexidina e atividade antibacteriana.

ABSTRACT

New biomaterials that may replace or repair damaged bone tissue become increasingly necessary day, so they can promote a quality of life with better health. Hydroxyapatite (HAp) stands out among the bioceramics with material most used in clinical practice for this purpose. It is biocompatible and osteoconductive, is an excellent bone substitute in orthopedic surgeries. This study aimed to carry out the survey of the number of articles and patents that target the application of hydroxyapatite doped with strontium (HApSr) with antimicrobial activity and the incorporation of drugs to this material, following the synthesis of pure HAp and HApSr by coprecipitation method. Subsequently, there was the adsorption of chlorhexidine (CHX), obtaining the biomaterial Hydroxyapatite with built chlorhexidine (HAp/CHX) and hydroxyapatite doped with strontium and chlorhexidine adsorbed (HApSr / CHX). The biomaterials were characterized by XRD techniques, FTIR, TG and SEM with UV-Vis there was the incorporation of CHX in pure HAp and HApSr. The survey carried out showed a shortage of articles and absence of patents, emphasizing that implementation of this biocomposite as promising in the area of biomaterials. The antibacterial activity of biomaterials were tested against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, showing that doping with strontium significantly improved antibacterial activity of HAp mainly against *E. coli* strain, and with the adsorption of chlorhexidine in HApSr its activity was potentiated reaching 100% for all tested microorganisms. Therefore, the biomaterial HApSr / CHX is presented as a promising product for biomedical applications.

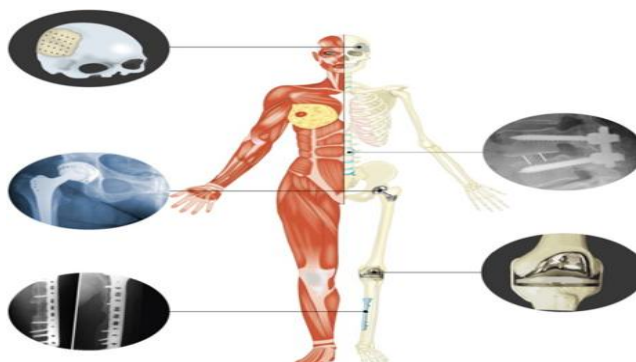
Keywords: hydroxyapatite, strontium, chlorhexidine and antibacterial activity.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial aliada a crescente expectativa de vida proporcionaram um avanço nas pesquisas de novos biomateriais, em decorrência da grande quantidade de pacientes idosos bem como de pacientes jovens envolvidos em acidentes automobilísticos. Demonstrando a real necessidade de se buscar materiais que agreguem mais propriedades a fim de minimizar possíveis falhas ou infecções. A ciência dos Biomateriais é uma área inovadora e multidisciplinar, que continua a evoluir em resposta às demandas clínicas e aos esforços dirigidos ao tratamento de doenças específicas. Os biomateriais híbridos, constituídos por metal e materiais não metálicos, são atualmente úteis para a obtenção dos benefícios de cada um dos materiais isolados(Lewallen, et al. 2015).

Os biomateriais são materiais que devem apresentar um conjunto de propriedades físicas, biológicas e químicas que permitam a estes desempenharem função de auxílio ou de substituição de partes do corpo dos seres vivos sem deixar de estimular uma resposta adequada dos tecidos (Gustaldi e Aparecida, 2010).Na Figura 1 temos uma visão geral da ampla utilização de diferentes materiais em nos mais diversos locais do esqueleto.

Figura 1.1- Diferentes materiais utilizados nos implantes em vários locais do esqueleto.



Fonte: Fernandez-Yague, et al. 2015.

A hidroxiapatita (HAp) é um fosfato de cálcio presente como componente mineral majoritário da matriz óssea. Características tais como a biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade fazem com que a HAp seja descrita como biomaterial de referência na reconstituição de tecidos ósseos e na fabricação de próteses articulares, as quais destacam-se como abordagens mais recentes (Gustaldi e Aparecida, 2010; Costa, et al. 2009). Além disto, a HAp vem sendo estudada como biomaterial para aplicações de enxertia óssea e engenharia de tecidos (Zilm, et al. 2016).

O sucesso desta aplicação depende da interface biológica entre material utilizado e o tecido hospedeiro circundante, pois o mesmo pode ter um efeito indesejável sobre o resultado clínico. Os efeitos esperados do biomaterial incluem crescimento ósseo (osseointegração), a estimulação da osteogênese (osteoindução), aumento da vascularização e maior estabilidade mecânica (Lewallen, et al. 2015).

Embora o osso humano tenha capacidade de auto-reparação, circunstâncias especiais como trauma, infecções e falhas de implantes anteriores, podem causar danos graves, ou um defeito grande o suficiente para que a reparação adequada do osso não seja possível. Nestes casos, enxerto de osso e/ou implantes de próteses são necessários. No entanto, as complicações infecciosas após cirurgia ortopédica ou trauma podem atrasar o processo de cura. A infecção ocorre quando a bactéria se instala no local da cirurgia e causa condições patológicas ou doenças (Ter Boo, et al. 2015).

Os custos médios adicionais para a remoção de dispositivos de fixação interna infectados e posterior tratamento destas infecções foram estimados a US \$ 15.000 em média por caso no ano 2000 nos Estados Unidos (Darouichi, et al. 2004). A morbidade e os custos socioeconômicos relacionados com infecções pós cirurgias ortopédicas, enfatizam a necessidade de medidas profiláticas eficazes para prevenir a infecção (Ter Boo, et al. 2015).

Com o intuito de conferir a Hap uma atividade antimicrobiana realizou-se a dopagem com metal estrôncio, o qual foi escolhido pela sua ampla utilização no tratamento e prevenção da perda óssea. E como forma de potencializar ainda mais a atividade antimicrobiana deste biomaterial surgiu a idéia de associar a atividade do metal com a clorexidina (CHX), uma substância antisséptica, preconizada em protocolos de diversos campos da medicina e da odontologia, com bom desempenho bactericida e bacteriostático, comprovado através de diversos estudos.

Assim, este trabalho teve como objetivo efetuar o levantamento do número de patentes e artigos que tenham como alvo a aplicação da hidroxiapatita dopada com estrôncio que apresente atividade antimicrobiana e a incorporação de fármacos a esse material, como também o objetivo de sintetizar HAp dopada com estrôncio pelo método de coprecipitação, buscando conferir uma atividade antibacteriana. Além disto, buscou-se incorporar clorexidina na HApSr para potencializar o seu efeito inibitório contra cepas Gram-positivas e Gram- negativas.

Os biomateriais obtidos foram caracterizados pelas técnicas de Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Termogravimetria (TG).A atividade antibacteriana foi testada contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. A pesquisa foi dividida em 5 partes principais, sendo elas: Introdução, 1º capítulo, 2º capítulo, Considerações finais e Perspectivas futuras.

O primeiro capítulo traz uma revisão bibliográfica (artigos) e uma revisão tecnológica (patentes), realizada através de um estudo prospectivo da hidroxiapatita dopada com estrôncio que apresente uma atividade antimicrobiana e incorporada com clorexidina.

O segundo capítulo é um Artigo Técnico-científico que descreve os procedimentos experimentais de síntese de HAp dopada com estrôncio e a incorporação de CHX na HApSr, assim como os testes para verificar sua possível aplicação como biomaterial com atividade antimicrobiana. As considerações finais sintetizam os resultados obtidos, bem como as perspectivas futuras para a continuidade da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Costa, A. C. F. M., Lima, M. G., Lima, L. H. M. A., Cordeiro, V. V., Viana, K. M. S., Sousa, C. V. (2009). Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista eletrônica de Materiais e Processos*, 4, 29-38.
- Del Pozo, J. L., & Patel, R. (2009). Infection associated with prosthetic joints. *New England Journal of Medicine*, 361, 787-794.
- Guastaldi, A. C., Aparecida, A. H. (2010). Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química Nova [online]*, 33, 1352-1358.
- Lewallen, E. A., Riester, S. M., Bonin, C. A., Kremers, H.M., Dudakovic, A., Kakar, S., Cohen, R. C. (2015). Biological Strategies for Improved Osseointegration and Osteoinduction of Porous Metal Orthopedic Implants. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 21, 218-230.
- Zilm, M. E., Chen, L., Sharma, V., McDannald, A., Jain, M., Ramprasad, R., Wei, M. (2016). Hydroxyapatite substituted by transition metals: experiment and theory. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18, 16457.
- Ter Boo, G. J. A., Grijpma, D. W., Moriarty, T., Richards, R. G., Eglin, D. (2015). Antimicrobial delivery systems for local infection prophylaxis in orthopedic- and trauma surgery. *Biomaterials*, 52, 113-125.
- Fernandez-Yague, M. A. (2015). Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicochemical strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, 1-29

1 CAPÍTULO 1

APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO: UMA PROSPECÇÃO

**APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM
ESTRÔNCIO: UMA PROSPECÇÃO**

*Carla Adriana Rodrigues de Sousa Brito¹, Edson Cavalcanti da Silva Filho¹, Humberto
Medeiros Barreto¹*

*¹Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Laboratório Interdisciplinar
de Materiais Avançados – LIMAV, Centro de Tecnologia-CT, Universidade Federal do
Piauí-UFPI, Teresina-PI, CEP 64049-550.*

*² Departamento de Parasitologia e Microbiologia, Universidade Federal do Piauí –
Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Teresina – PI.*

RESUMO

A busca de um Biomaterial capaz de reparar o tecido ósseo destruído por traumas, doenças metabólicas e degenerativas, o qual possa restituir a qualidade de vida desses pacientes é alvo de pesquisas há anos. Entre os diferentes biomateriais estudados, a hidroxiapatita tem merecido grande destaque, devido a sua excelente biocompatibilidade e osteocondutividade. Dessa forma, propõe-se uma avaliação do uso da hidroxiapatita dopada com estrôncio com propriedades antimicrobianas a fim de reduzir as infecções pós-operatórias e como consequência diminuir as taxas de rejeições nos implantes ósseos, através de um rastreamento das pesquisas já desenvolvidas e com resultados patenteados, que associe modificações da hidroxiapatita com o metal estrôncio visando a obtenção de um biomaterial com atividade antimicrobiana. A prospecção tecnológica foi realizada no European Patent Office (EPO), na United States Patent and Trademark Office (USPTO), e no Banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI), enquanto que os artigos científicos foram consultados na base Scopus, Web of Science e Scielo. O resultado das combinações Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium and chlorhexidine, não encontrou nenhuma patente e artigo nos bancos de dados pesquisados. O que indica que a utilização da Hidroxiapatita dopada com estrôncio e associada a um antimicrobiano é ainda pouco explorado.

Palavras-Chave: Hidroxiapatita, atividade antimicrobiana, Estrôncio, Clorexidina.

ABSTRACT

The search for a biomaterial which can be able to repair bone tissue destroyed by trauma, metabolic and degenerative diseases and thereby can restore the quality of life of these patients has been the subject of research for years. The hydroxyapatite shows excellent biocompatibility and it is osteoconductive. Thus, we propose an evaluation of hydroxyapatite doped with strontium with antimicrobial properties by tracking the of recent research and developed including patents, as well as modifications with strontium metal doping in those hydroxyapatite to improve antimicrobial activity. The survey was conducted in the European Patent Office (EPO), the United States Patent and Trademark Office (USPTO), and the database of the National Institute of Industrial Property of Brazil (INPI), scientific articles found in Scopus, Web of Science and Scielo and no results were found with the combinations of Strontium doped Hydroxyapatite with antimicrobial activity and chlorhexidine. Characterizations of the synthesized Sr-doped hydroxyapatite as an antimicrobial agent shows promising applications.

Keywords: Hydroxyapatite, antimicrobial activity, Strontium, Chlorhexidine.

1 INTRODUÇÃO

Os materiais cerâmicos se destacam em diversas áreas, mas sua ampla utilização para aplicações biomédicas cresceram por estes contemplarem diversas características dos biomateriais, tais como: biocompatibilidade, bioatividade, bioinerte, bioreabsorvíveis e porosidade. Entre os materiais cerâmicos, a hidroxiapatita(HAp) apresenta uma excelente similaridade e adaptabilidade com o meio fisiológico, devido a sua constituição por íons que também são encontrados neste meio.

Os Fosfatos de cálcio surgiram como candidatos favoráveis devido à sua capacidade para incorporar moléculas químicas e drogas, além das suas propriedades osteocondutoras. Por isso, eles podem atuar simultaneamente como um transportador de moléculas terapêuticas e um agente osteogênico em procedimentos clínicos (Soriano-Souza, et al.2015).

A HAp como o principal componente mineral de ossos e dentes, é o material de fosfato de cálcio mais estudado em práticas clínicas. Bastante utilizado como um enchimento de defeitos ósseos, pela sua semelhança química com a fase mineral do osso, que representa o seu potencial osteocondutor e biocompatibilidade, constituindo um excelente substituto ósseo em cirurgias ortopédicas, pois facilita a formação dessa estrutura(Dutta, et al. 2015).

Uma das principais complicações após os procedimentos cirúrgicos ortopédicos ou orais é a infecção bacteriana. Superfícies com propriedades antibacterianas intrinsecamente conferem uma atividade antibiótica profilática, e para isso podemos utilizar metais, não-metais e substâncias orgânicas, bem como suas combinações (Gallo,et al. 2014).

Um grande problema no tratamento das infecções ósseas com antibióticos convencionais é que os mesmos precisam atingir concentrações terapêuticas adequadas no

local da infecção. Este problema poderia ser resolvido com o desenvolvimento de biomateriais capazes de fazer a entrega local do antibiótico. Dentre as vantagens deste procedimento poderíamos citar a redução da dose, maior controle sobre a biodisponibilidade do fármaco, manutenção de concentrações terapêuticas no local da infecção, a prevenção dos efeitos secundários e custo reduzido, (Huh e Kwon, 2011).

A maioria das infecções associadas com implantes ortopédicos são causadas por agentes patogênicos oportunistas e bactérias que são normalmente encontradas na microbiota endógena da pele humana, (Pozo, et al. 2009). Considerando o grande número de espécies de bactérias presentes na pele humana, apenas uma pequena percentagem tem sido implicada nestes tipos de infecções ortopédicas.

Os estafilococos representam a grande maioria dos casos de infecções relacionadas com dispositivos para a maioria das classes de implantes, destacando-se os *Staphylococcus aureus* e vários estafilococos coagulase negativos, tais como *Staphylococcus epidermidis*, para mais de 65% das infecções de próteses articulares (Trampuz, et al. 2006; Esposito, et al. 2008).

O aumento na prevalência de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos como o *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), tanto na comunidade como no ambiente hospitalar, tem sido atribuído ao mau uso de antibióticos nos setores médico e agrícola, (Kardas, et al. 2005). A capacidade de certas cepas bacterianas desenvolverem resistência aos antibióticos vem despertando o interesse por outros agentes antimicrobianos, tais como a prata com amplo espectro de atividade. Com isso, outros metais que também apresentam atividade antimicrobiana, tais como Cério, Estrôncio e Gálio começam a ser investigados, (Chen, et al, 2016). No início do século 20, o estrôncio foi identificado como tendo um impacto positivo na construção óssea. Investigações revelaram que a adição de estrôncio na nutrição resultou num aumento de

ativação de células formadoras de osso (osteoblastos) e desse modo uma forte formação de novo tecido ósseo. Estudos adicionais demonstraram que ocorreu a inibição de células de reabsorção óssea (osteoclastos) em meio de cultura com células de osso inoculado com estrôncio. Este efeito é o resultado da capacidade de estrôncio para ativar a osteogênese, a auto-regeneração de células-tronco e a sua diferenciação em osteoblastos. Em razão disto, o estrôncio tem sido utilizado no tratamento de pacientes com osteoporose (Abertn, et al. 2014).

Partindo do pressuposto de que há uma necessidade cada vez maior de materiais com propriedade antimicrobiana, e por ser uma área relativamente nova, o objetivo deste trabalho foi efetuar o levantamento do número de patentes e artigos que tenham como objetivo a aplicação da hidroxiapatita dopada com estrôncio que apresente atividade antimicrobiana e a incorporação de fármacos a esse material.

2 METODOLOGIA

A prospecção foi baseada na pesquisa de artigos científicos e patentes. Foram utilizadas para a busca de artigos as bases de dados da Scopus, Web of Science e Scielo, e as patentes nas bases gratuitas do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI), Escritório Europeu de Patentes (EPO) e a United States Patent and Trademark Office (USPTO), utilizando as palavras-chave para verificar a utilização da hidroxiapatita dopada com estrôncio que apresente atividade antimicrobiana.

O método de busca utilizou palavras em inglês (Scopus, Web of Science, Scielo, Espacenet e United States Patent and Trademark Office) e português (INPI), explorando patentes e artigos com os termos: “*Hydroxyapatite*”, e combinações: “*Hydroxyapatite AND bone graft*”, “*Hydroxyapatite AND antimicrobial activity*”, “*Hydroxyapatite and strontium*”, “*Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium*”, “*Hydroxyapatite and strontium and chlorhexidine*” e “*Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium and chlorhexidine*”.

Nas bases de periódicos Scopus, Web of Science e Scielo foram analisados os documentos encontrados com as combinações *Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium* e *Hydroxyapatite and strontium and chlorhexidine*, por Título e ano de publicação, agente antimicrobiano ou outra modificação utilizada para a mesma finalidade e os resumos dos artigos. A pesquisa por artigos científicos e patentes foram realizadas no mês de maio de 2016, e os campos pesquisados foram o título e o resumo, restringindo-se as buscas ao período de 2006 a 2016.

Entre os artigos encontrados houve a exclusão com base em critérios, para que somente artigos relevantes para com o trabalho fossem analisados. Dentre os critérios de inclusão, podemos citar a função que a HAp desempenha no estudo e o tipo de artigo encontrado, se revisão ou artigo original e a se os mesmos eram acessíveis.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ARTIGOS PESQUISADOS

Nas Tabelas 1.1, 1.2 e 1.3 estão apresentados os números de artigos encontrados nas bases de periódicos Scopus, Web of Science e Scielo relacionadas às palavras chaves do trabalho.

Tabela 1.1 - Número de artigos encontrado por palavra chave e combinações na base Scopus.

Palavra-chave	Publicações (total)	Publicações (2006-2016)
Hydroxyapatite	46.269	25.561
Hydroxyapatite and bone graft	3.191	1.875
Hydroxyapatite and antimicrobial activity	299	260
Hydroxyapatite and strontium	664	472
Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium	6	6
Hydroxyapatite and strontium and chlorhexidine	1	0
Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium and chlorhexidine	0	0

Fonte: Autoria própria(2016).

Tabela 1.2 - Número de artigos encontrado por palavra chave e combinações na base Web of Science.

Palavra-chave	Publicações (total)	Publicações (2006-2016)
Hydroxyapatite	46.614	29.623
Hydroxyapatite and bone graft	3.629	2.542
Hydroxyapatite and antimicrobial activity	334	291
Hydroxyapatite and strontium	838	643
Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium	9	9
Hydroxyapatite and strontium and chlorhexidine	0	0
Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium and chlorhexidine	0	0

Fonte: Aatoria própria(2016).

A ampla utilização da Hidroxiapatita em aplicações biológicas e principalmente em enxertos ósseos é revelada pela grande quantidade de publicações com essas expressões para o período consultado nos bancos de dados pesquisados. Entretanto quando ampliamos a aplicação da hidroxiapatita com atividade antimicrobiana há uma redução dos artigos encontrados.

Tabela 1.3 - Número de artigos encontrado por palavra chave e combinações na base Scielo.

Palavra-chave	Publicações (total)	Publicações (2006-2016)
Hydroxyapatite	327	210
Hydroxyapatite and bone graft	27	20
Hydroxyapatite and antimicrobial activity	3	3
Hydroxyapatite and strontium	3	3
Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium	0	0
Hydroxyapatite and strontium and chlorhexidine	0	0
Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium and chlorhexidine	0	0

Fonte: Autoria própria (2016).

À medida que especificamos o tipo de material que incorporado acrescentaria essa atividade antimicrobiana, o número de publicações é reduzido, encontrando-se apenas 18 trabalhos com essa finalidade. Estes resultados demonstram a escassez de pesquisas para a hidroxiapatita dopada com estrôncio com atividade antimicrobiana ou hidroxiapatita dopada com estrôncio com fármaco adsorvido.

Analisando o aspecto tempo, nota-se que as pesquisas com a hidroxiapatita é recente como demonstrado nas tabelas 1.1, 1.2 e 1.3, uma vez que, as comparações dos dados pesquisados sem a limitação do tempo com os dados restritos ao período entre 2006 e 2016 apresentaram uma maior quantidade de publicações neste intervalo de tempo.

As palavras alvo do estudo foram *hydroxyapatite*, *antimicrobial activity*, *strontium* e *chlorhexidine*, onde se percebeu a ausência de pesquisa acerca deste tema, demonstrada pela inexistência de artigos nos bancos de dados pesquisados. Na Tabela 1.4 as expressões *Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium* foram analisadas em relação a quantidades de artigos encontrados nos diversos bancos de dados, com a restrição de tempo como também sem a restrição de tempo.

Outros dados encontrados na Tabela 1.4 retificam que a modificação da hidroxiapatita com o metal e incorporação de fármacos para utilização como agente antimicrobiano é uma área de pesquisa recente e pouco explorada.

Tabela 1.4 - Comparação entre os bancos de dados para palavras chaves as pesquisas.

Palavras – Chave	Scopus		Web of Science		SciELO	
	Sem restrição de tempo	2006 - 2016	Sem restrição de tempo	2006 - 2016	Sem restrição de tempo	2006 - 2016
Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium	4	4	9	9	0	0
Hydroxyapatite and strontium and chlorhexidine	1	0	0	0	0	0
Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium and chlorhexidine	0	0	0	0	0	0

Fonte: Autoria própria (2016).

Para a discussão e compreensão da forma de utilização dos elementos chaves pesquisados com as outras combinações encontrou-se 4 artigos no SCOPUS e 9 artigos na WEB OF SCIENCE para a combinação *Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium*. Deste total de 14 artigos, 5 estavam presentes em ambos os bancos de dados. Com a combinação *Hydroxyapatite and strontium and chlorhexidine*,

apenas 1 artigo foi encontrado na busca sem restrição de tempo na base SCOPUS. O mesmo apresenta como título *Factors affecting the adsorption of Chlorhexidine Gluconate by Hydroxyapatite*, do ano 1980, o qual estudou alguns fatores como temperatura, pH e íons inorgânicos, e analisou como esses fatores poderiam afetar a adsorção da clorexidina na HAp. Neste artigo a HAp foi apenas o suporte para simulação do tecido dentário.

Ao se fazer uma análise dos 7 artigos com a finalidade de se traçar um perfil das pesquisas com hidroxiapatita dopada com estrôncio que apresente atividade antimicrobiana, elaborou-se uma classificação, de acordo com o objetivo que cada trabalho apresentou. A classificação é mostrada na Tabela 1.5.

Tabela 1.5 - Classificação dos artigos encontrados no SCOPUS e WEB OF SCIENCE quanto ao objetivo da pesquisa realizada.

Classificação	Quantidade de artigos
Revestimento de prótese de titânio	4
Atividade antimicrobiana da HApSr	1
Síntese de Hidroxiapatita dopada e utilização para suporte de fármacos	1
Revisão	1
Total	7

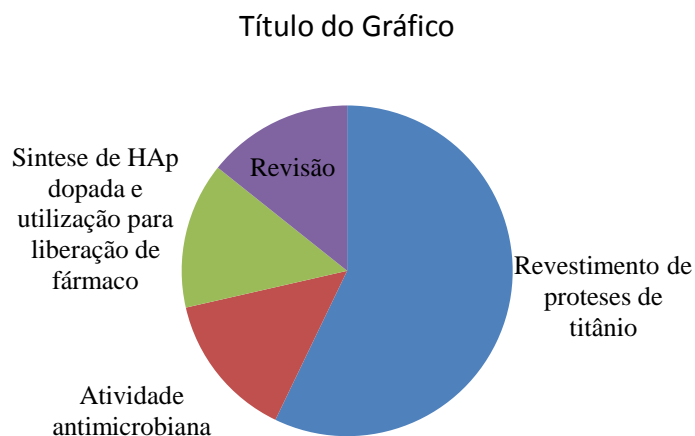
Fonte: Autoria própria(2016).

Considerando os critérios de exclusão, e de acordo com a classificação da Tabela 5 foram analisados 7 artigos. A análise dos 7 artigos revelou peculiaridades da temática da atividade antimicrobiana da HApSr, extraíndo-se informações importantes, como o objetivo de cada pesquisa, os microrganismos testados, e que tipos de testes

antimicrobianos são mais executados, além de quais antimicrobianos estão sendo testados para a finalidade da pesquisa.

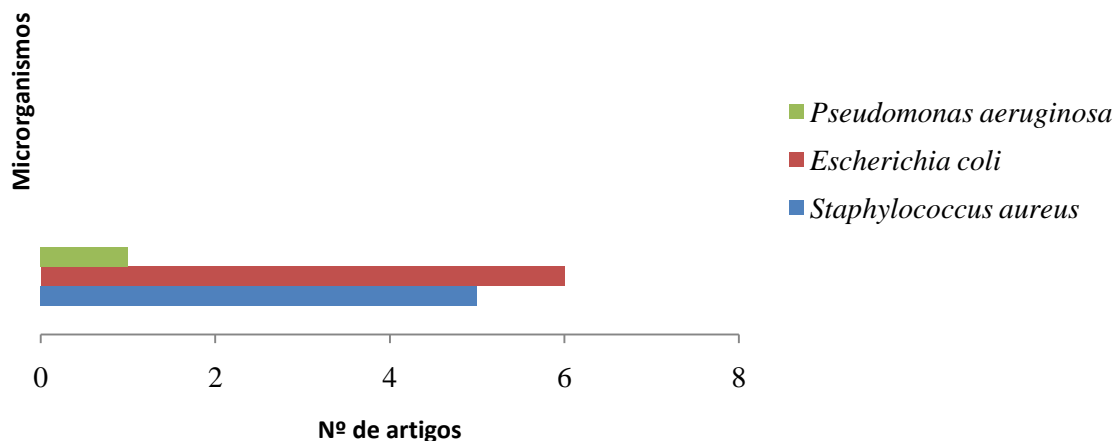
A Figura 1.1 destaca os trabalhos pesquisados quanto a aplicação do material sintetizado, mostrando que mais de 50% das pesquisas realizadas com HApSr estão voltadas para o revestimento de prótese de titânio com a finalidade principal de melhorar sua biocompatibilidade e conferir uma atividade antimicrobiana ao material. E somente um artigo pesquisou a HApSr como suporte para liberação de fármaco.

Figura 1.1 - Classificação dos artigos quanto à aplicação do material.



Todos os trabalhos com finalidade de revestimento de próteses também estavam voltados para uma aplicação antibacteriana. Uma visão mais detalhada dos microrganismos mais utilizados está ilustrada na Figura 1.2.

Figura 1.2 - Microrganismos testados nos artigos pesquisados.



Os microrganismos utilizados direcionaram o material para um amplo espectro de atividade, testando tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas, destacando em primeiro lugar, as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, que são as causas mais comuns de complicações infecciosas associadas a cirurgias ortopédicas (Gallo, et al. 2014).

Enquanto para as Gram-negativas, a mais testada foi principalmente a *Escherichia coli*, que apesar do número reduzido na causa deste tipo de infecção, é um grupo relevante na prática clínica, apresentando uma maior dificuldade em seu tratamento, pela virulência destes microrganismos e crescente resistência aos agentes antimicrobianos, além das condições de comorbidade do paciente. (Hsieh, et. al.2009).

Com a finalidade de conferir a HAp uma atividade antimicrobiana, diversos metais e fármacos vem sendo combinados e incorporados a mesma, para esta finalidade. Para a pesquisa realizada enfatizou-se a HApSr, em que alguns artigos apresentam além do estrôncio uma associação de outros metais para melhorar as propriedades biológicas e conferir uma atividade antimicrobiana ao material. Os trabalhos que realizaram algum

tipo de modificação com estrôncio ou associada a outros metais estão listados na Tabela 1.6.

Tabela 1.6 - Metais utilizados associados ao estrôncio para atividade antimicrobiana.

Somente o metal estrôncio	2
Estrôncio + prata	3
Estrôncio+ magnésio+ zinco	1
Estrôncio + cobre	1

Fonte: Autoria própria.

Em geral, os compostos dopados foram utilizados com a finalidade de melhorar as propriedades do material bem como a conferir uma atividade antimicrobiana. A prata tem se destacado devido ao seu amplo espectro de atividade, e sua citotoxicidade reduzida quando associada ao estrôncio. O estrôncio como único dopante apresenta uma atividade antimicrobiana significativa, considerado como um bom resultado para aplicação *in vivo* devido à baixa citotoxicidade do metal (Abert, et al. 2014).

Os íons de estrôncio, além de ser antibacteriano, também são conhecidos por regular a proliferação de osteoblastos e a formação de osteoclastos. A sua atividade bacteriostática tem sido relacionada com o seu potencial zeta altamente negativo em comparação com HAp pura (Ravi, et al. 2012), o que pode ser comprovado pelos artigos. A Tabela 1.7 apresenta os principais testes antimicrobianos empregados nos artigos.

Tabela 1.7 - Testes antimicrobianos utilizados nos artigos pesquisados.

Contato direto	4
Método de diluição	1

Fonte: Autoria própria.

Por se tratar de uma material insolúvel em meio aquoso, o teste antimicrobiano mais utilizado foi o de contagem de colônia, adaptado por Zheng e Zhu (2003) que se tornou referência para testes com esse tipo de material, seguida da difusão e da diluição .

Todas as informações como título do artigo, ano, metal utilizado e seus resumos individuais estão descrito na Tabela 1.8, facilitando uma análise do que trata cada artigo.

Tabela 1.8 - Características dos artigos estudados.

Título/Ano de publicação	Metais utilizados	Resumo dos artigos
<p>Strontium and copper co-substituted hydroxyapatite-based coatings with improved antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by electrodeposition/ 2016</p>	<p>Estrôncio e cobre</p>	<p>Este trabalho tem por objetivo fabricar hidroxiapatita dopada com cobre e estrôncio para revestimento de implantes de titânios comercialmente puro. Avaliando seu efeito antibacteriano e citocompatibilidade in vitro. O revestimento exibiu uma resistência a corrosão quando comparado a taxa de corrosão do titânio puro. E apresentou uma atividade antimicrobiana contra <i>E. coli</i> nos primeiros dias.</p>
<p>Strontium incorporation to optimize the antibacterial and biological characteristics of silver-substituted hydroxyapatite coating/2015</p>	<p>Estrôncio e prata</p>	<p>O objetivo deste trabalho foi conferir a hidroxiapatita dopada com prata e estrôncio uma atividade antimicrobiana, sendo que o estrôncio entrou como segundo elemento para melhorar a biocompatibilidade. Amostras revestiram um substrato de titânio para avaliação de sua atividade antimicrobiana e biológica. A hidroxiapatita dopada com prata apresentou uma boa atividade antimicrobiana para <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> mas se mostraram citotóxicas, porém quando acrescentado do metal estrôncio reduziu consideravelmente sua citotoxicidade.</p>
<p>Coating manufacturing with divalent ions replaced in hydroxyapatite / nanocomposite gelatin electron beam treated titanium: mechanical, anti-corrosion, anti-bacterial reviews and bioactives./2015</p>	<p>Estrôncio/ magnésio/zinco</p>	<p>O trabalho buscou obter um biomaterial hidroxiapatita gelatina dopada com três metais (estrôncio, magnésio e zinco) para revestimento de titânio. Para avaliação de suas propriedades mecânicas, anticorrosão.</p>

<p>Strontium-Substituted Calcium Deficient Hydroxyapatite Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Antibacterial Properties/2012</p>	<p>Estrôncio</p>	<p>Neste estudo, hidroxiapatita de cálcio-deficiente substituída com nanopartículas estrôncio (CDHA) com (Ca + Sr)/P proporção de 1.61 foram sintetizados por meio de processamento de micro-ondas acelerada. Os substituído-estrôncio CDHAs mostraram atividade antimicrobiana significativa contra as bactérias <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> por método de contagem de colônias. A 10 % Sr substituído CDHA mostram a redução máxima microbiana de 56% para <i>E. Coli</i> e 35% para <i>S.aureus</i> com 1×10^5 células / mL da respectiva cultura bacteriana.</p>
<p>Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings/2012</p>	<p>Estrôncio e prata</p>	<p>Neste estudo foi realizada a incorporação Ag₂O e SrO em plasma pulverizado revestimentos de HA para melhorar a atividade antimicrobiana e as interações célula-material. Os revestimentos foram caracterizados quanto a pureza de fase e estabilidade mecânica. Eficácia antimicrobiana do HA, Sr-HA, Ag-HA e SR/revestimentos de Ag-HA foi determinada utilizando a bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Este estudo também investigou o citocompatibilidade dos revestimentos usando células de osteoblastos fetais humanos (hFOB).</p>
<p>Gentamicin-loaded strontium-containing hydroxyapatite bioactive bone cement-an efficient bioactive antibiotic drug delivery system/2010</p>	<p>Estrôncio e gentamicina</p>	<p>A possibilidade de aplicação de HASr cimento ósseo como uma transportador droga para a entrega de gentamicina com melhor bioatividade em comparação com cimento PMMA foi confirmada no presente estudo. HASr cimento libera grande quantidade de gentamicina durante todo o período de estudo, ela aparece como uma alternativa atraente mais que cimento PMMA. A adição de gentamicina em HÁSr cimento ósseo não compromete o seu desempenho mecânico.</p>

<p>Deposition of substituted apatites with anticolonizing properties onto titanium surfaces using a novel blasting process./2010</p>	<p>Estrôncio e prata</p>	<p>Neste estudo, a tecnologia CoBlast foi usada para depositar vários apatitas substituídas. Uma série de testes in vitro foram realizados para determinar se os materiais contaminantes podem produzir uma modificação na superfície que era simultaneamente osteocondutor e anticolonizante e os resultados foram interpretados com estudos de caracterização detalhada da superfície.</p>
--	--------------------------	--

Fonte: Autoria própria.

Estes resultados demonstram que a associação da Hidroxiapatita dopada com estrôncio e associada à clorexidina para aplicação com atividade antimicrobiana, é uma área pouco explorada.

3.2 PATENTES DEPOSITADAS

Na Tabela 1.9 estão representados os números de patentes encontradas nas bases EPO (*European Patent Office*), USPTO (*United States Patent and Trademark Office's*) e INPI (*Instituto Nacional da Propriedade Industrial*), relacionadas às palavras chaves e as combinações da pesquisa realizada.

Tabela 1.9- Número de patentes encontradas por palavra chave e combinações nas bases EPO, USPTO e INPI.

PALAVRA- CHAVE	EPO	USPTO	INPI
Hydroxyapatite	6108	550	35
Hydroxyapatite and bone graft	80	86	0
Hydroxyapatite and antimicrobial activity	8	4	0
Hydroxyapatite and strontium	66	62	0
Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium	0	0	0
Hydroxyapatite and strontium and chlorhexidine	0	3	0
Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium and chlorhexidine	0	0	0
TOTAL	6265	716	35

Fonte: Autoria própria.

A prospecção efetuada utilizou combinações em inglês para os bancos EPO e USPTO. Enquanto na busca realizada no INPI todas as combinações foram escritas em português como descrito na Tabela 1.10.

Tabela 1.10- Quantidade de patentes depositadas no INPI, utilizando-se as palavras da expressão na língua portuguesa.

Palavras - Chave	INPI
Hidroxiapatita	35
Hidroxiapatita and enxerto ósseo	0
Hidroxiapatita and atividade antimicrobiana	0
Hidroxiapatita and estrôncio	0
Hidroxiapatita and atividade antimicrobiana and estrôncio	0
Hidroxiapatita and estrôncio and clorexidina	0
Hidroxiapatita and atividade antimicrobiana and estrôncio and clorexidina	0

Fonte: Autoria própria(2016).

Para as combinações *Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium*, *Hydroxyapatite and antimicrobial activity and chlorhexidine* e *Hydroxyapatite and antimicrobial activity and strontium and chlorhexidine* não foi encontrada nenhuma patente relacionada aos termos citados, nas bases do EPO, USPTO e INPI o que demonstra que as pesquisas com a hidroxiapatitata dopada com estrôncio que apresente uma atividade antimicrobiana e associada à clorexidina são pouco exploradas, podendo ser uma alternativa para a redução das infecções no pós-operatório dos enxertos ósseos, reduzindo a rejeição nos implantes.

A combinação *Hydroxyapatite and strontium and chlorhexidine* apresentou três patentes às quais utilizam os materiais citados, mas não diretamente o estrôncio para atividade antimicrobiana, e sim como agente de dessensibilização, ou como outros compostos que podem ser misturados a HAp para tornar o material mais opaco.

Nenhumas das patentes encontradas relatam a utilização da HAp dopada com estrôncio para a finalidade de adsorção de fármacos, o que demonstra o caráter inovador do presente trabalho, com base na quantidade de depósitos encontrados para a expressão “*hydroxyapatite and strontium and chlorhexidine*” e, apoiado nos resultados obtidos pela pesquisa da quantidade de artigos e patentes com a expressão citada acima.

As análises das patentes encontradas mostram que, as invenções têm sempre a finalidade voltada para aplicações médicas e odontológicas. Na Tabela 1.11 encontra-se as descrições das 4 patentes encontradas.

Tabela 1.11- Descrição das patentes encontradas no USPTO e INPI.

Título / Data de depósito	Inventor	Classificação	País	Resumo
USPTO Methods of treatment of the dental pulp and filling root canals using water-based material Fev/2007	Primus; Carolyn M.(Bradenton, FL), Gutmann; James L. (Dallas, TX), Breuer; Miklos M. (Brookline, MA), Jefferies; Steven R. (Media, PA)	A61K/ C08L/ A61L	Estados Unidos	A presente invenção refere-se genericamente a composições dentárias melhorados para o tratamento de canais da polpa e de raízes em um dente. As composições contêm uma mistura de materiais em partículas, tais como silicato de cálcio, aluminato de cálcio, hidróxido de cálcio, e hidroxiapatita; vários materiais poliméricos orgânicos solúveis em água; e tensoactivos que interagem com os materiais poliméricos
USPTO Medical and dental biomaterial and method of use for the same	Asgary; Saeed (Tehran, IR)	A61C/ A61K	Irã	O presente invento fornece um biomaterial médico e odontológico e seu uso para a vedação e / ou preenchendo as cavidades dos dentes e dos ossos. Em formas de realização aqui, o sal de cálcio, óxido de cálcio,

silicato de cálcio, e compostos de fosfato de cálcio são misturados com uma solução à base de água, e uma mistura de fosfato de cálcio e enriquecido bioativo é preparado. O biomaterial dental / médico é biocompatível, antibacteriano e capaz de formar uma vedação eficaz contra a entrada de microrganismos na cavidade preenchida. O biomaterial é compatível para aplicação em ambiente aquoso e estimular a cicatrização e regeneração dos tecidos..

USPTO	Bristow; Neil J.	A61K/A61Q	Países Baixos	Uma composição oral para o tratamento de dentes sensíveis, que compreende uma fonte de potássio e/ou de íons estrôncio como agente de dessensibilização.
Oral compositions	(New South Wales,			
Mai 1989	AU), Carter; Peter			
	(Burton, GB3),			
	Coulson; Bryony E.			
	(Port Sunlight,			
	GB3), Trevethan;			

Michael A. (Bebington, GB3)a				
INPI	Alexandre Malta	A61K/A61Q/A	Rio de	Biocomposito à base de hidroxiapatita e alginato de
Biocompósito, usos	Rossi, / Maria	61P	Janeiro/Brasil	sódio na forma de esferas/microesferas, associada
relacionados, processos para	Helena Miguez da			preferencialmente ao agente antimicrobiano catiônico
a produção do mesmo, e	Rocha Leao Carlos			diglucanato de clorexidina, com o objetivo de promover
método de liberação	Alberto Soriano de			a regeneração de lesões teciduais e combater infecções
controlada de substâncias	Souza			microbianas por funcionar como veículo de liberação
antimicrobianas./2010				controlada da substância.

Fonte: Autoria própria.

Entende-se que a área de dopagem da HAp com o metal estrôncio e sua aplicação para adsorção de fármacos se apresenta bastante promissora, uma vez que se encontraram poucos artigos e nenhuma patente com esta finalidade.

4 CONCLUSÃO

Os artigos demonstram que a hidroxiapatita dopada com estrôncio direciona-se para aplicação como revestimento de próteses de titânio, para uma melhor biocompatibilidade em 4 artigos encontrados e com atividade antimicrobiana em apenas 1 artigo. Destacando-se o microrganismo *S. aureus* como o mais testado, por ser considerado o agente mais comum em infecções ósseas. E a *E. coli* como a Gram-negativa mais testada por ser o padrão para o grupo. O método de contato direto foi a metodologia mais utilizada, devido sua melhor aplicação a materiais insolúveis em meio aquoso, se apresentando como o mais satisfatório para esse tipo de material. E como metal utilizado destaca-se a prata reconhecidamente eficaz contra microrganismos diversos e o mais utilizado em combinação com estrôncio para essa aplicação. Sobre as patentes, nenhuma foi encontrada, demonstrando que a busca por biomateriais que apresentem atividade antimicrobiana é uma área promissora com inúmeras possibilidades a serem testadas.

Agradecimentos: CAPES, CNPQ, e UFPI.

5 REFERÊNCIAS

- Abert, J., Bergmann, C. & Fischer, H. (2014). Wet chemical synthesis of strontium-substituted hydroxyapatite and its influence on the mechanical and biological properties. *Ceramics International*, 40, 9195–9203.
- Aparecida, A. H., Fook, M. V. L., Santos, M. L., Gustaldi, A. C. (2007). Estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo(ACP) e conversão a fosfato octacálcico(OCP). *Química Nova*, 30,892-896.
- Chen, D., Li, X., Soule, T., Yorio, F., Orr, L.(2016). Effects of solution chemistry on antimicrobial activities of silver nanoparticles against *Gordonia sp.* *Science of the total Environment*,1, 566-567.
- Costa, A. C. F. M., Lima, M. G., Lima, L. H. M. A., Cordeiro, V. V., Viana, K. M. S., Sousa, C. V. (2009). Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista eletrônica de Materiais e Processos*,4, 29-38.
- Dutta, S. R., Passi, D., Singh, P., Bhuibbar, A. (2015). Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. *Irish Journal of Medical Science*,184, 101-106
- Esposito S. & Leone S.(2008). Prosthetic joint infections: microbiology, diagnosis,management and prevention. *Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 287-293.
- Fielding, G. A., Roy, M., Bandyopadhyay, A., Bose, S.(2012). Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *Acta Biomaterialia*,8, 3144–3152.
- Geng, Z., Cui Z., Li Z., Zhu S., Liang Y., Liu Y., Li X., He X., Yu X., Wang R., Yang X.(2015). Strontium incorporation to optimize the antibacterial and biological characteristics of silver-substituted hydroxyapatite coating. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 467–477.

Guastaldi, A. C., Aparecida, A. H.(2010) Fosfatos de Cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química Nova* [online], 33, 1352-1358.

Hsieh,P. H., Lee, M. S., Hsu, K. Y., Chang, Y. H., Shih, H. N., Ueng, S. W. (2009). Gram-Negative Prosthetic joint infections: risk factors and Outcome of treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1036-43.

Huang, Y. Hao, M., Nian, X., Qiao, H., Zhang, X., Song, G., Guo, J., Pang, X. Zhang, H. (2016). Strontium and copper co-substituted hydroxyapatite-based coatings with improved antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by electrodeposition. *Ceramics International*, 42, 11876–11888.

Huh, A. J & Kwon,Y. J. (2011). “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*,156, 128–145

Kardas P, Devine S, Golembesky A, Roberts C.(2005). A systematic review and metaanalysis of misuse of antibiotic therapies in the community. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 106-113.

Liu,W. C., Wong, C. T, Fong, M.K., Cheung, W. S., Kao, R. Y.T., Luk, K.D.K., Lu,W.W.(2010). Gentamicin-loaded strontium-containing hydroxyapatite bioactive bone cement—An efficient bioactive antibiotic drug delivery system. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 95B, 397–406.

O’ Sullivan, C., O’ Hare, P., O’ Leary, N. D., Crean, A. M., Ryan, K., Dobson, A. D. W., O’Neill, L. (2010). Deposition of substituted apatites with anticolonizing properties onto titanium surfaces using a novel blasting process. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*,95B, 141–149.

Popa, C. L., Ciobanu, C. S., Voicu, G., Vasile, E. (2015). Effect of heat treatment on the antimicrobial activity of silver doped Apatite Biological. *Nanoscale Research Letters*, 10, 1-10

Pozo D., J. L., Patel, R. (2009) Infection associated with prosthetic joints. *New England Journal of Medicine*, 361, 787-794.

Ravi, N. D. & Sampath Kumar, T.S. (2012). Strontium-Substituted Calcium Deficient Hydroxyapatite Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Antibacterial Properties. *Journal the american ceramic society*. 95, 2700–2708.

Sakko, M., Tjaderhane, G., Sorsa, T., Hietala, P., Rautemaa, R. (2016). Antimicrobial 2-hydroxyisocaproic acid and chlorhexidine resist inactivation by dentine. *International Endodontic Journal*, 49, 352–360.

Soriano-Souza, C. A., Rossi, A. L., Mavropoulos, E., Hausen, M. A., Tanaka, M. N., Calasans-Maia, M. D., Granjeiro, J. M., Rocha-Leão, M. H. M., Rossi, A. M. (2015). Chlorhexidine-loaded hydroxyapatite microspheres as an antimicrobial delivery system and its effect on in vivo osteo-conductive properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26, 166.

Trampuz A, Zimmerli W. (2006). Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury*, 37, 59-66.

Ter Boo, G. J. A., Grijpma, D. W., Moriarty, T., Richards, R. G., Eglin, D. (2015). Antimicrobial delivery systems for local infection prophylaxis in orthopedic and trauma surgery. *Biomaterials*, 52, 113-125.

2 CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO ASSOCIADA COM CLOREXIDINA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM
ESTRÔNCIO ASSOCIADA COM CLOREXIDINA**

*Carla Adriana Rodrigues de Sousa Brito¹, Edson Cavalcanti da Silva Filho¹, Humberto
Medeiros Barreto²*

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Laboratório Interdisciplinar de
Materiais Avançados – LIMAV, Centro de Tecnologia-CT, Universidade Federal do Piauí-
UFPI, Teresina-PI, CEP 64049-550.*

²*Departamento de Parasitologia e Microbiologia, Universidade Federal do Piauí – Campus
Universitário Ministro Petrônio Portella, Teresina – PI.*

RESUMO

Dentre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita (HAp) é o material mais utilizado em implantes ósseos, devido a sua similaridade com o osso humano. O metal estrôncio se destaca pela sua utilização na prevenção da perda óssea. O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de uma HAp dopada com o metal estrôncio (Sr^{2+}) seguida da adsorção da clorexidina (CHX) a fim de produzir um biomaterial capaz de prevenir e combater de forma eficaz as infecções bacterianas no pós-operatório. A síntese da HAp dopada com Sr^{2+} nas concentrações 0,5%, 1,75% e 5% foram obtidas pelo método de coprecipitação. Em seguida a clorexidina foi incorporada a HApSr 0,5% por adsorção na interface sólido/liquido. O novo biomaterial foi caracterizado por diferentes técnicas, que comprovaram a existência da fase desejada. A Hidroxiapatita dopada com estrôncio e com clorexidina adsorvida 0,8 % (HApSr/CHX0,8) apresentou 100% de atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, mostrando-se promissora para aplicações biomédicas.

Palavras- chave: Hidroxiapatita, estrôncio, clorexidina, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Among calcium phosphates, hydroxyapatite (HAp) is the material most commonly used for bone implants, because of its similarity to human bone. Strontium metal stands out for its use in preventing bone loss. Thus, to improve their properties, HAp was doped with strontium metal (Sr^{2+}), followed by adsorption of chlorhexidine (CHX) to produce a biomaterial which has potential to prevent and combat bacterial infections effectively in post- operational conditions. The synthesis of Sr^{2+} doped HAp with concentrations 0.5%, 1.75% and 5% were obtained by coprecipitation method. Then chlorhexidine was incorporated to HApSr 0,5% by adsorption at the solid / liquid interface. The new biomaterial was characterized by different techniques, which showed the existence of the desired phase. The hydroxyapatite doped with strontium and chlorhexidine adsorbed 0,8%(HApSr/CHX0,8) showed 100% antimicrobial activity for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922.

Keywords: calcium phosphate, hydroxyapatite, strontium and antibacterial activity.

1 INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes desafios da moderna engenharia de materiais são os materiais avançados para aplicações biomédicas (Hench, 1991). O desenvolvimento constante de materiais com características e propriedades novas, capazes de realizar substituições ósseas, com altos índices de sucesso, e que possam trazer um aumento na qualidade de vida para os indivíduos torna-se cada dia mais necessário, (Andrade, 2013).

Houve um crescimento dos biomateriais utilizados hoje e, como consequência, uma maior disponibilidade de implantes nas áreas médicas e odontológicas, que variam na forma, tamanho, tipo de material e custo, (Capek, 2004). Essa grande diversidade obtida em termos de material para implante é principalmente representada pelas biocerâmicas, (Andrade, 2013).

A hidroxiapatita (HAp) destaca-se entre as biocerâmicas, por ser o principal componente presente na fase mineral do osso, sendo sem dúvida, a mais estudada e utilizada para finalidades clínicas, (Kawachi, et al.2000), e aplicações biológicas, (Hench& Wilson, 1993; Legreiros,1991). Características como a biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade fazem com que a HAp seja descrita como biomaterial de referência na reconstituição de tecidos ósseos e na fabricação de próteses articulares, as quais destacam-se como abordagens mais recentes, (Guastaldi& Aparecida, 2010; Costa,et al. 2009).

Apesar das taxas de sucesso dos implantes que envolvem biomateriais dependerem da osteogênese, a prevenção e combate eficaz de infecções bacterianas no pós-operatório contribuem para a longa sobrevivência destes. Segundo dados da Food and Drug Administration(FDA) há uma crescente queda da produção de novos antibióticos e em paralelo um aumento da capacidade de certas cepas bacterianas desenvolverem resistência aos antibióticos, o que tem despertado o interesse na administração controlada por outros agentes antibacterianos, tais como a prata com amplo espectro de atividade, bem como outras metais

que também possam apresentar uma atividade antimicrobiana, (Chen, et al, 2016). Assim, a utilização de biomateriais que possuam além da biocompatibilidade, também propriedades antibacterianas torna-se uma estratégia interessante e eficaz para o combate *in situ* da infecção, (Namba,et al. 2013; Nagano e Yokouchi, 2014).

Por ser um material com estrutura cristalina e fórmula molecular estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, a HAp permite substituições catiônicas como também aniônicas, às quais proporcionam mudanças nas propriedades de cristalinidade, parâmetros de rede, dimensões dos cristais, estabilidade e solubilidade do material, (Mavropoulos, 1999). Tais substituições catiônicas podem conferir à HAp características antimicrobianas, já que a presença de alguns metais rompem as paredes celulares das bactérias, impedindo assim a sua proliferação, (Sygnatowicz, et al. 2010).

Uma tendência bastante atual é a utilização de propriedades antibacterianas de certos íons, como a prata, cobre e zinco. Além destes, há uma tentativa de olhar para a possibilidade da utilização de outros íons, tais como samário, cério, gálio, selênio, titânio, estrôncio, entre outros, para melhorar as características físico-químicas, biológicas ou mecânicas da HAp, além de conferir a esse material uma propriedade antibacteriana (Kolmas,et al. 2014).

Nos últimos anos o estrôncio foi identificado como tendo um impacto positivo sobre a formação óssea. Estudos revelaram que a adição de estrôncio resultou em um aumento da ativação dos osteoblastos proporcionando um aumento na formação de novo tecido ósseo. Outras pesquisas demonstraram que concentrações crescentes de estrôncio inibiram a reabsorção do osso pelos osteoclastos, (Abert,et al. 2014). A introdução destes íons na estrutura da HAp melhoraram sua biocompatibilidade e bioatividade, acelerando o processo de osseointegração. Além disso, melhoraram as propriedades mecânicas da HAp (Kolmas, et al. 2014).

O estrôncio se destaca pelas suas peculiaridades, sendo alvo de potencial interesse na prevenção da perda óssea, (Sariibrahimoglu, et al. 2015). Presente no fármaco ranelato de estrôncio, o mesmo já é bem descrito na literatura, tem demonstrado que ajuda o crescimento dos ossos, aumenta a densidade óssea e diminui a incidência de fraturas em pacientes com osteoporose, e sua ampla utilização tem comprovado ser bem tolerado pelo organismo, (Chellan, et al. 2015).

A Clorexidina (CHX fórmula molecular: $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$) é usada em todo o mundo como um agente antimicrobiano catiônico, de baixa toxicidade, fácil acesso, baixo custo e com uma boa resposta contra uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos, (Soriano-Souza, et al. 2015).

Diante do contexto abordado, o presente trabalho propõe sintetizar um biocomposito a base de HAp dopada com Sr^{2+} , seguida da incorporação da CHX e avaliar a sua atividade antibacteriana, na procura por um material que associe as características de biomaterial existentes na HAp com a atividade antibacteriana gerada e/ou potencializada pelo metal, ampliada com a CHX.

2 PARTE EXPERIMENTAL

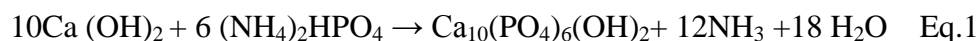
2.1 MATERIAIS E REAGENTES

Foram utilizados os seguintes reagentes: Hidróxido de cálcio (VETEC)- $\text{Ca}(\text{OH})_2$; Fosfato de amônio dibásico (VETEC) – $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; Nitrato de estrôncio (SIGMA-ALDRICH) - $(\text{Sr}(\text{NO}_3)_2)$; Clorexidina a 20% - $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10}$ (POLYORGANIC), Brain Heart Infusion Broth (HIMEDIA); Blood Agar Base (COLUMBIA); salina fisiológica - NaCl e água deionizada. Os reagentes disponíveis foram utilizados sem nenhum tratamento de purificação.

2.2 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA

A síntese foi realizada pelo método de coprecipitação, utilizando como reagentes soluções de hidróxido de cálcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e fosfato de amônio dibásico $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ nas quantidades estequiométricamente determinadas de acordo com os valores das razões entre átomos de cálcio e fósforo Ca/P de 1,67.

Primeiramente, para a síntese da HAp $\text{Ca}(\text{OH})_2$, deixou-se sob agitação, em 50 mL de água deionizada, a massa de hidróxido de cálcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ até que a mesma fosse completamente dissolvida. Posteriormente, ocorreu a adição de fosfato de amônio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ dissolvido em 50 mL de água deionizada. A síntese ocorreu à temperatura ambiente, sob agitação, durante aproximadamente 3h, em pH básico. Após o término do processamento, as soluções resultantes foram centrifugadas, lavadas com água deionizada e os produtos seco em estufa a 110 °C por 24h, (Unabia, et al.2015). Os sólidos obtidos foram desaglomerados com o auxílio do almofariz e pistilo e passados em uma peneira de malha 35, abertura de 425 μm . Em seguida, os pós brancos obtidos, foram levados para as caracterizações e teste da atividade antibacteriana.



2.3 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO

Para a síntese da HAp dopada com 0,5%, 1,75% e 5% de Sr^{2+} , foi utilizada a rota sintética do método da coprecipitação. O biomaterial foi sintetizado a partir do hidróxido de cálcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$, do fosfato de amônio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, e o íon dopante foi obtido do nitrato de estrôncio $(\text{Sr}(\text{NO}_3)_2)$. A síntese das hidroxiapatitas modificadas com estrôncio foi realizada utilizando o mesmo procedimento adotado para a síntese da hidroxiapatita pura, porém com a adição do dopante nitrato de estrôncio $(\text{Sr}(\text{NO}_3)_2)$ em quantidades de 0,5%, 1,75% e 5% em mol com relação ao cálcio. Os sólidos obtidos foram denominados HApSrx (em que $x = 0,5\%$, $1,75\%$ e 5%). Na síntese da HAp dopada ocorreu a adição simultânea $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e dos nitratos de estrôncio nas proporções utilizadas, também dissolvidos em 50 mL de água deionizada no hidróxido de cálcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dissolvido em 50 mL de água deionizada. As sínteses ocorreram à temperatura ambiente, sob agitação, durante aproximadamente 3h, em pH básico. Após o término do processamento, as soluções resultantes foram centrifugadas, lavadas com água deionizada e os produtos secos em estufa a 110°C por 24h,(Gopi, et al. 2014),os sólidos obtidos foram desaglomerados com o auxílio do almofariz e pistilo e passados em uma peneira de malha 35, abertura de $425\ \mu\text{m}$. Em seguida, os pós brancos obtidos, foram levados para as caracterizações e teste da atividade antibacteriana.

2.4 INCORPORAÇÃO DA CLOREXIDINA NA HIDROXIAPATITA

A incorporação da clorexidina na hidroxiapatita foi executada através do processo de adsorção na interface sólido-líquido. Esse processo se desenvolveu com o preparo de soluções diluídas a partir da solução de CHX a 20%, concentração encontrada a disposição no comércio. A incorporação ocorreu utilizando-se 6 erlenmeyers de 50 mL, onde se adicionavam a estes 1,0 g do pó de HAp pura e da HAp dopada Sr 0,5%, onde logo em seguida era adicionado 25 mL de uma das soluções diluída preparada a partir da solução comercial de CHX a 20%, com agitação em orbital. Os erlenmeyers foram levados para a mesa agitadora, deixando estes por um período de 24h com a taxa de agitação de 150 rpm e temperatura fixa em 25°C.

A solução do sobrenadante foi separada por centrifugação e quantificada através do UV-Vis ($\lambda=255\text{nm}$) para a determinação do valor da concentração final das soluções através da equação 1.

$$Q_e = \frac{(C_1 - C_2) \times V}{m} \text{Eq. 2}$$

Sendo Q_e a quantidade de CHX incorporada na HAp em mg/g, C_1 a concentração inicial da solução de CHX em mg/L, C_2 a concentração do sobrenadante em mg/L, V é o volume que foi utilizado no teste de adsorção (L) e m é a massa de HAp que foi utilizada no teste de adsorção (g).

A recuperação do pó se deu pelo processo de centrifugação, onde a HAp/CHX ficou retida no fundo do tubo falcon. O pó retido e presente no tubo falcon foi removido para uma placa de petri, em seguida levado à estufa por um período de tempo de 1 h a temperatura de aproximadamente 50°C.

2.5 CARACTERIZAÇÕES

2.5.1 Difração de Raios-X (DRX)

A identificação da fase HAp e cristalinidade dos materiais obtidos foram realizadas por meio da análise de difração de raios x, em um difratômetro da marca Shimadzu, modelo XR-D600 A, na faixa 2θ entre 5° a 75° . A velocidade de varredura foi de 2° min^{-1} , utilizando a fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$, com comprimento de onda $1,5406 \text{ \AA}$.

2.5.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR da HAp e dopadas foram obtidos usando o espectrofotômetro Varian 660-IR pelo método da pastilha em KBr 1% (m/m) de amostra, em 32 varreduras na região de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . A espectroscopia no infravermelho permite identificar substituições ou alterações importantes na composição da HAp. Essas informações são obtidas pela excitação dos modos de energia vibracionais dos grupos moleculares dentro da estrutura dos sólidos.

2.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura com fonte de elétrons por emissão de campo FEG (Field Emission Gun), QUANTA FEI 250 e acoplado ao EDS (Espectroscopia de Energia Dispersiva), para análise da morfologia e composição dos materiais sintetizados.

2.5.4 Análise Térmica

As análises termogravimétricas foram realizadas no aparelho SDT Q600 V20.9 Build 20 da TA Instruments utilizando aproximadamente 5 mg de amostra com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de Argônio com fluxo de $100,0\text{ mL min}^{-1}$ em porta amostra de alumina na faixa de temperatura de 25 a $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

2.6.1 Cepas Bacterianas

As cepas bacterianas utilizadas foram das espécies *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) as quais pertencem ao acervo de microrganismos do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da UFPI (LPM).

2.6.2 Preparo do Inóculo Bacteriano

A partir das culturas bacterianas mantidas em ágar nutriente a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, transferiu-se uma alçada do crescimento bacteriano para um tubo falcon contendo 3,0 mL do meio Brain Heart Infusion Broth a 3% (BHI), seguido de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24h. A partir desta cultura em BHI preparou-se uma suspensão bacteriana padronizada para uma densidade equivalente a 0,5 na escala Mac Farland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias - UFC). E em seguida foram realizadas diluições decimais seriadas, em solução salina fisiológica, obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^4$ UFC/mL para ambos os microrganismos.

2.6.3 Teste do Contato Direto

O teste antimicrobiano foi realizado por contato direto, segundo a metodologia de Zheng e Zhu (2003), tendo como resultado a contagem de unidade formadora de colônias (UFC). Para a realização do teste a suspensão bacteriana padronizada foi submetida a diluições seriada decimais até obtenção da diluição 10^{-4} ($1,5 \times 10^4$ UFC/mL). Em seguida, 2000 μ L desta suspensão diluída foram transferidas para um tubo tipo falcon esterilizado, ao qual foi adicionado 2000 μ g do biomaterial. Para determinação do efeito inibitório, 100 μ L desta suspensão foram transferidos para placas de Petri contendo o meio ágar Blood Agar Base (Columbia) e semeadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky pelo método *spread plate*. As placas foram incubadas na estufa microbiológica por 24h a 37°C, em seguida foi feita a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). O teste foi realizado em triplicata para cada uma das concentrações testadas. No Controle positivo os produtos foram substituídos por uma solução salina (2000 μ L) para posterior comparação das soluções com os produtos testados.

O efeito inibitório produzido por cada solução-teste foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\eta = \frac{N_1 - N_2}{N_1} \times 100\% \quad \text{Eq.3}$$

Onde η é definido como o efeito inibitório, N_1 é a média aritmética das unidades formadoras de colônia das placas controle e N_2 é a média aritmética das unidades formadoras de colônia de cada uma das soluções testadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

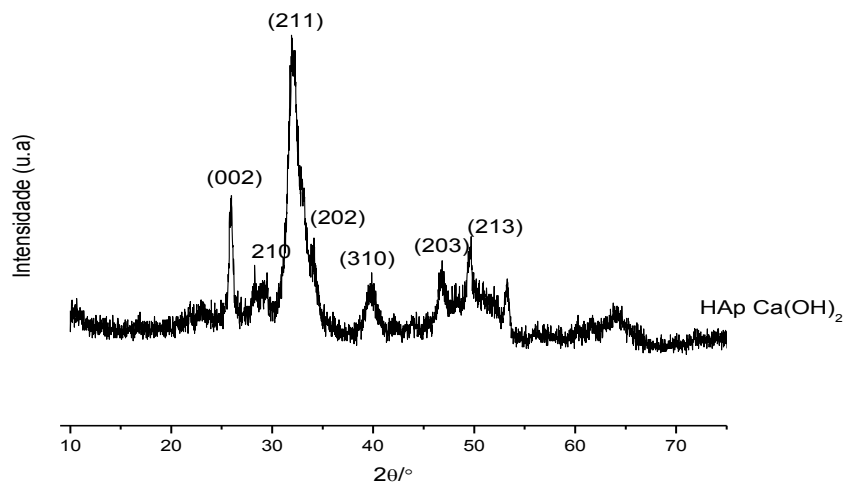
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA PURA, DA HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO E DOS BIOCAMPÓSITOS

3.1.1 Difração de Raios-X (DRX)

A análise por DRX foi utilizada para identificar as fases cristalinas presentes no material e confirmar a pureza da fase da HAp. A identificação cristalográfica de fases das amostras sintetizadas foi realizada por comparação de padrões experimentais de DRX para as fases constituídas no banco de dados no Centro Internacional de Difração Dados (ICDD). Seguindo como parâmetros de semelhança a ficha n° 001-1008 do JCPDS, destacando os principais planos cristalinos.

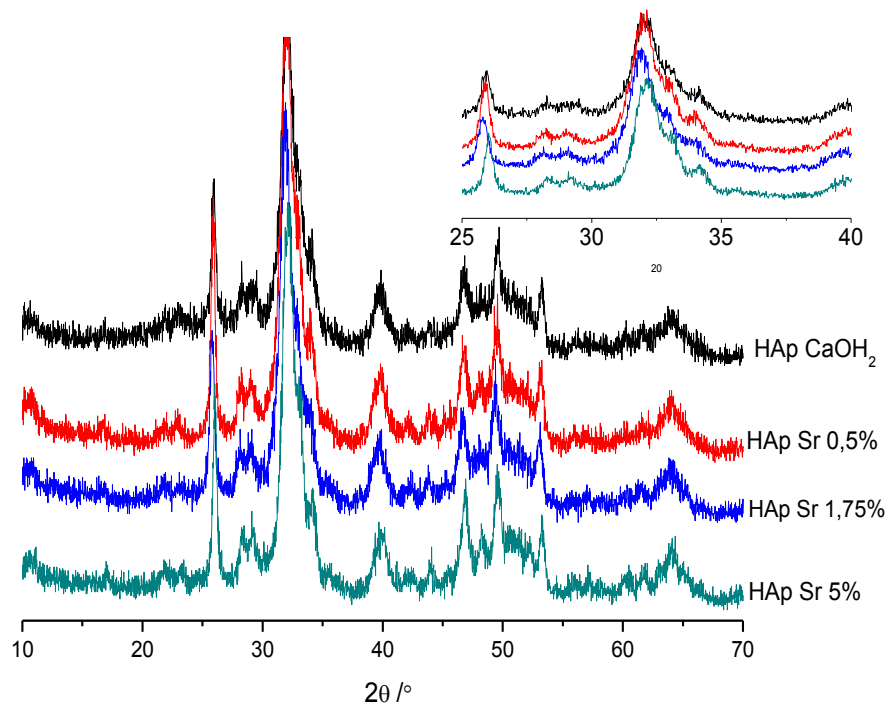
Na Figura 2.1 destacamos o difratograma da HAp, em que podemos observar vários picos de alta intensidade correspondentes para a posição dos planos da HAp, que são o (002), (211), (112), (202), (310), (203) e (213) localizados em 2θ iguais a 25,9°, 31,9°, 32,2°, 34,2°, 39,7°, 46,7° e 49,6° respectivamente. A presença destes planos confirma a formação da HAp como única fase (Unabia, et al. 2015).

Figura 2.1 - Difratoograma da HAp.



Na Figura 2.2 podemos observar os difratogramas das HAp dopadas com estrôncio nas concentrações de HAp Sr 0,5%, HAp Sr 1,75% e HAp Sr 5%. Os DRXs das diferentes dopagens não apresentaram diferença na localização dos picos e indicam a presença da HAp como única fase nas amostras analisadas, de acordo com o DRX da HAp Figura 2.1. Apresentando uma boa cristalinidade e conservando as intensidades dos picos em 2θ característico da HAp em torno de $25,9^\circ$, $31,9^\circ$, $34,2^\circ$ e $39,7^\circ$ (Szatkowski, et al. 2015). Nas HAp Sr 1,75% e Sr 5% os planos (002) e (211) encontram-se ligeiramente deslocados. Esse deslocamento pode ser indicativo da presença do íon estrôncio na rede cristalina da HAp, pois o íon estrôncio apresenta um raio atômico maior (0,200nm) que o íon cálcio (0,197nm), provocando esse deslocamento à medida que aumentamos a concentração do mesmo. O'donnell, et al. (2008) observou o mesmo tipo de deslocamento para amostras de HAp Sr com diferentes teores do metal.

Figura 2.2 - DRX da HAp e HAp Sr 0,5%, 1,75% e 5%.



3.1.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros da HAp e das HAp dopadas são mostrados na Figura 2.4. No espectro da HAp observa-se vibrações de estiramentos de grupos OH provenientes da HAp como também da molécula de água que não foi removida a temperatura ambiente, mas retida nos canais da estrutura, sendo representada pela banda larga de absorção entre 3200 e 3500 cm^{-1} , e sua deformação aparece em torno de 1640 cm^{-1} , sugerindo uma maior hidratação deste material, (Ravi, et al. 2012; Melnikov, et al. 2015).

No espectro da HAp, percebe-se as absorbâncias características da deformação assimétrica do grupo PO_4^{3-} entre 1100 e 962 cm^{-1} e em torno de 875 cm^{-1} , associado ao estiramento P-OH em HPO_4^{2-} . A banda próxima a 603 cm^{-1} é correspondente à deformação assimétrica da ligação P-O do grupo PO_4^{3-} , já a absorção em 566 cm^{-1} corresponde à

deformação assimétrica da ligação P-O(H) do grupo HPO_4^{2-} (Armed, et al. 2014). A Tabela 2.1 apresenta um resumo das principais absorções observadas nos espectros de infravermelho para as HAps sintetizadas e as respectivas atribuições.

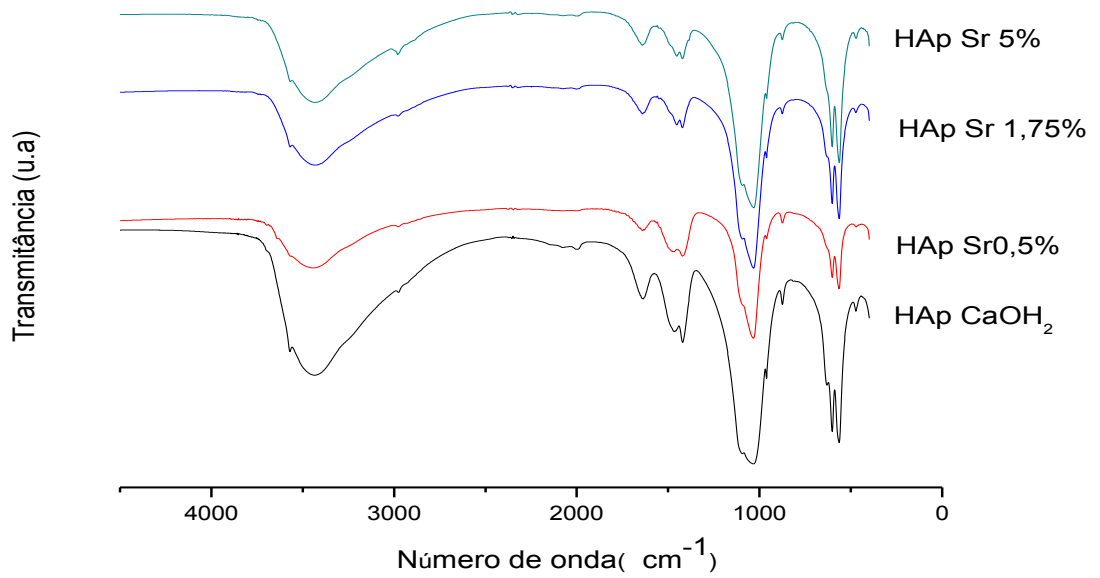
Tabela 2.1 - Bandas de Absorção na região do infravermelho da HAp e da HApSr/CHX.

Região de Absorção (cm^{-1})	Designação
3570	ν OH de hidroxila
3500,3200	ν OH de H_2O
1640	δ H-O-H de H_2O
1100	ν assimétrico PO_4^{3-}
962	ν simétrico PO_4^{3-}
875	ν P-OH em HPO_4^{2-}
631	δ OH de hidroxila
603,566,472	δ O-P-O em PO_4^{3-} ou O-P-O em HPO_4^{2-}
1660-1580	δ N-H

Fonte: Autoria própria (2016).

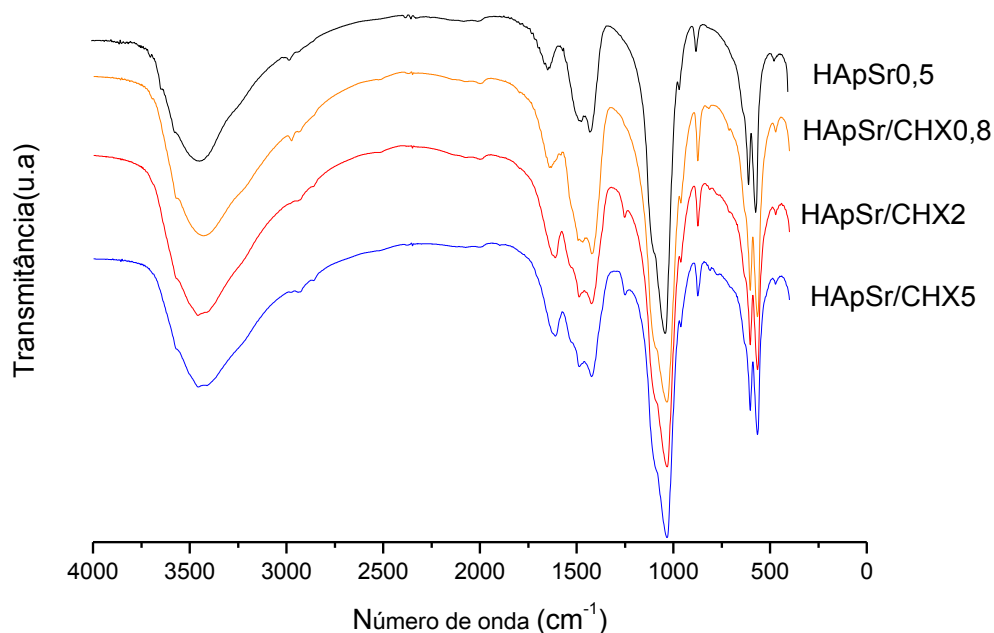
A Figura 2.3 traz uma comparação entre os espectros da HAp e da HAp dopada com estrôncio nas diferentes concentrações. Percebe-se perfeitamente que não existem diferenças espectrais significativas entre o sistema de HAp e o sistema das HAps dopadas. Todas as amostras apresentam apenas as bandas típicas de uma composição de HAp.

Figura 2.3 - FTIR da HAp e HAp Sr 0,5%, 1,75% e 5%.



Na Figura 2.4 apresentamos os espectros da HApSr0,5% e dos biocompósitos HApSr/CHX0,8, HApSr/CHX2 e HApSr/CHX5.

Figura 0.4- FTIR da HApSr0,5% e das HApSr/CHX0,8 , 2 e 5.

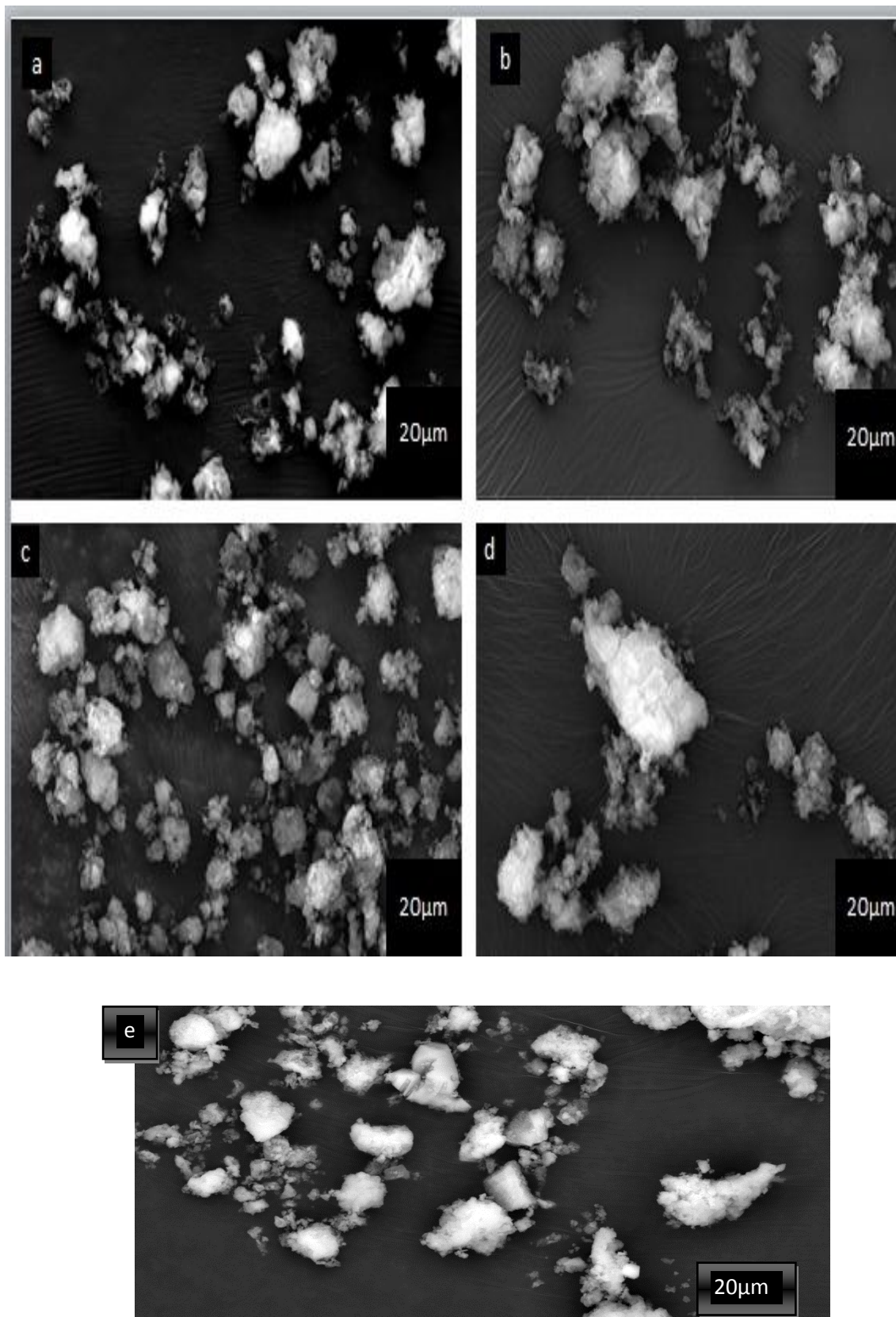


Analisando os espectros FTIR dos biocompósitos (HApSr/CHX), notamos que todos apresentam características dos dois precursores(HAp e CHX). Podemos destacar a banda na região de 1100 cm^{-1} que corresponde a deformação assimétrica dos grupos fosfatos. Outra banda característica da HApSr aparece na região entre 631 e 875 cm^{-1} , que são provenientes da deformação da hidroxila OH e do estiramento do grupamento P-OH, respectivamente. Uma modificação observada é o alargamento da banda na região de 1700 a 1450 cm^{-1} , que se deve a deformação angular resultante dos grupos aminos incorporados. A Figura 2.4 mostra a comparação dos espectros da HapSr e dos biocompositos com diferentes concentrações de CHX. E devido às baixas concentrações utilizadas poucas diferenças significativas podem ser observadas. Destacando a região de 1690 a 1350 cm^{-1} , onde este alargamento se deve aos grupos aminos da CHX incorporados a HApSr.

3.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A Figura 2.5 mostra a morfologia da HAp e das HAp dopadas com estrôncio apresentando aglomerados característicos da HAp por coprecipitação, e com pH acima de 9, (Ahmed et al., 2014). Resultado semelhante já foram descritos na literatura, (Cox et al., 2014). Mesmo com a incorporação da CHX, nenhuma alteração significativa foi observada.

Fig. 2.5 MEV: a) HAp b) HAp Sr 0,5% c) HAp Sr 1,75% d) HApSr 5%
e) HApSr0,5/CHX0,8.

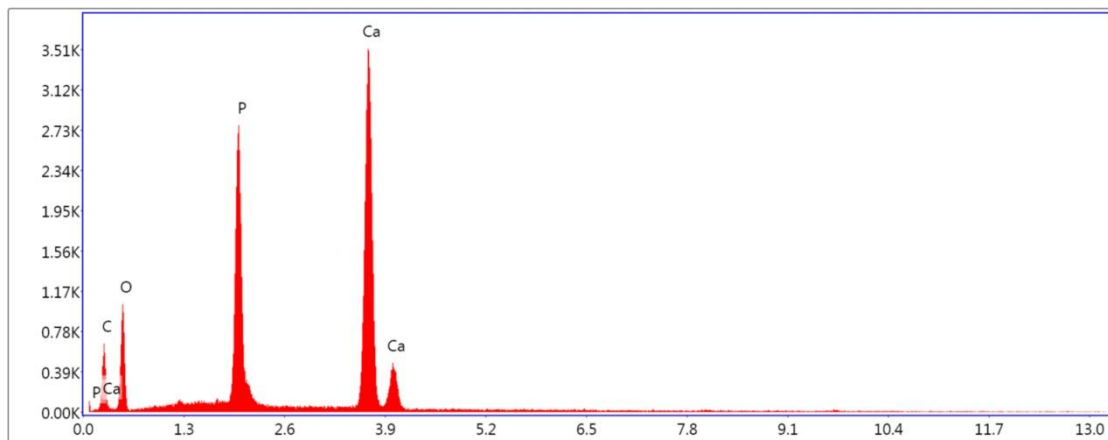


A composição química dos elementos presentes nas amostras, como a comprovação da dopagem do estrôncio e a incorporação da clorexidina na HAp foram obtidas por espectroscopia de energia dispersiva(EDS) acoplada ao microscópio eletrônico de bancada, MEV-EC FEI QUANTA FEG 250.

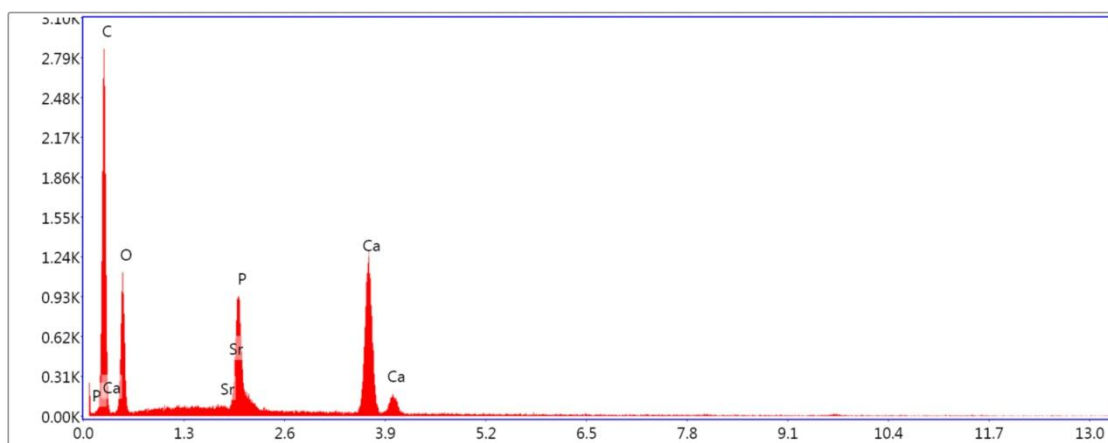
A Figura 2.6 refere-se à análise de EDS da HAp, das HAp dopadas com estrôncio, e do biocomposito HApSr/CHX0,8 verificando a distribuição homogênea dos elementos característicos das amostras nos pós obtidos. Todos os picos elementares esperados foram identificados incluindo Sr^{2+} , sugerindo que o elemento de substituição foi incorporado na HAp precipitada,(Cox,et al.2014), além do cloro (Cl) presente na composição do fármaco utilizado, confirmando sua incorporação.

No entanto, as densidades dos pontos de Ca, P e O são mais elevados do que os dos outros elementos como o Sr^{2+} e Cl devido a sua alta concentração na síntese e na incorporação da HAp. Na figura 2.6 apresentamos um resumo das concentrações médias de Sr^{2+} , analisadas a partir de medições EDS realizadas em diferentes localizações das amostras.

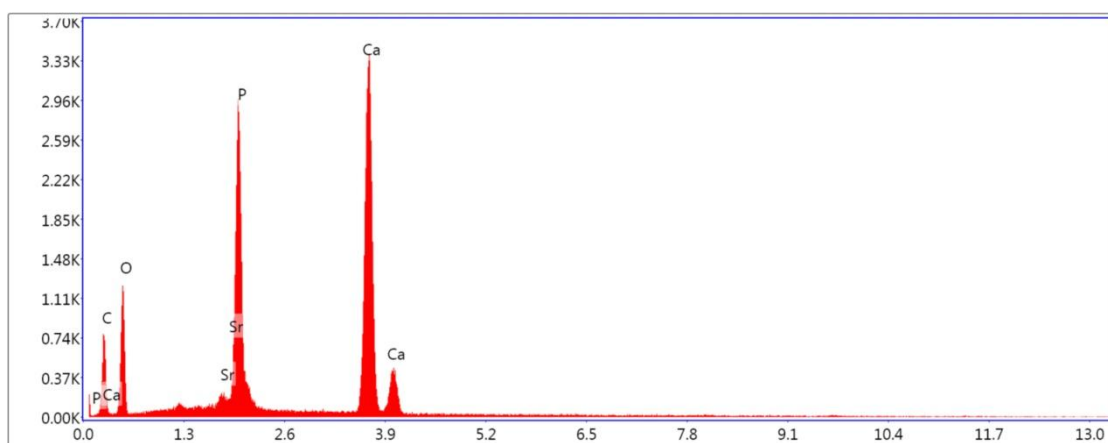
Figura 0.6 - EDS: a) HAp b)HAp Sr 0,5%, c) HAp Sr 1,75% ,d) HAp Sr 5% e HApSr/CHX0,8.



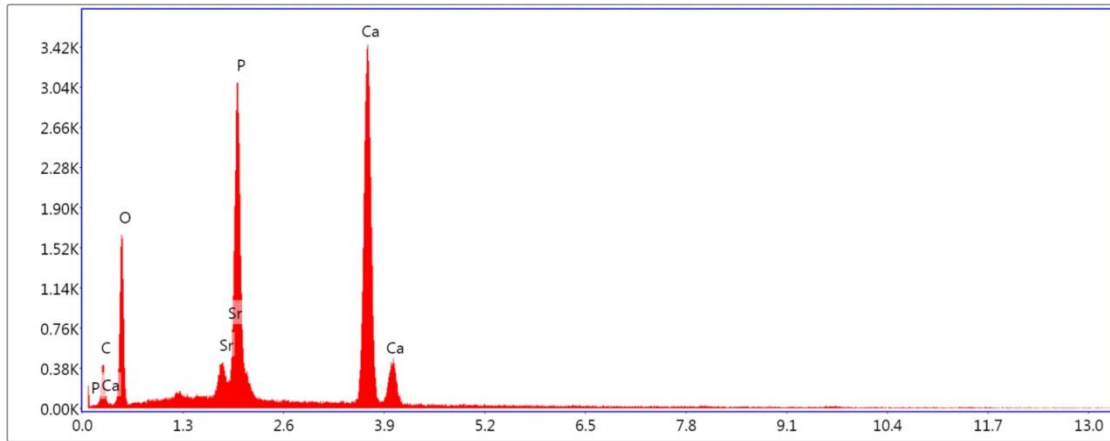
a)



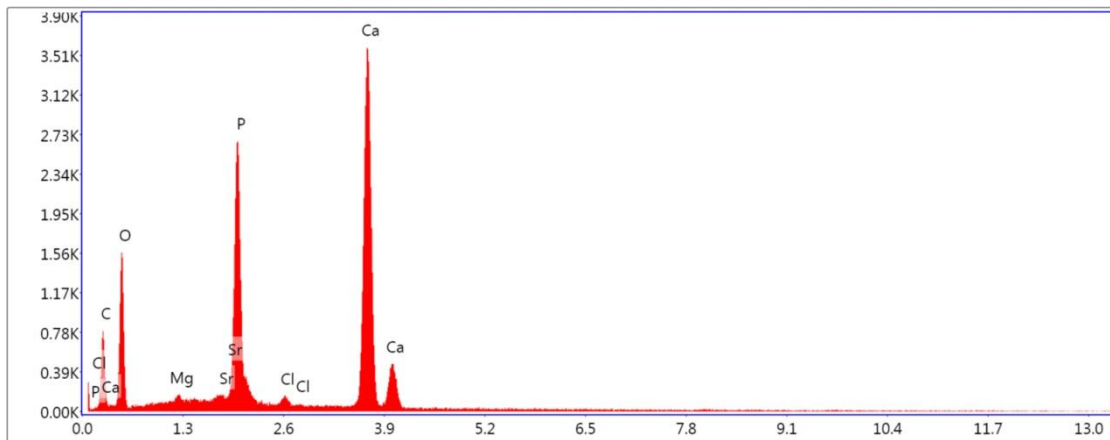
b)



c)



d)

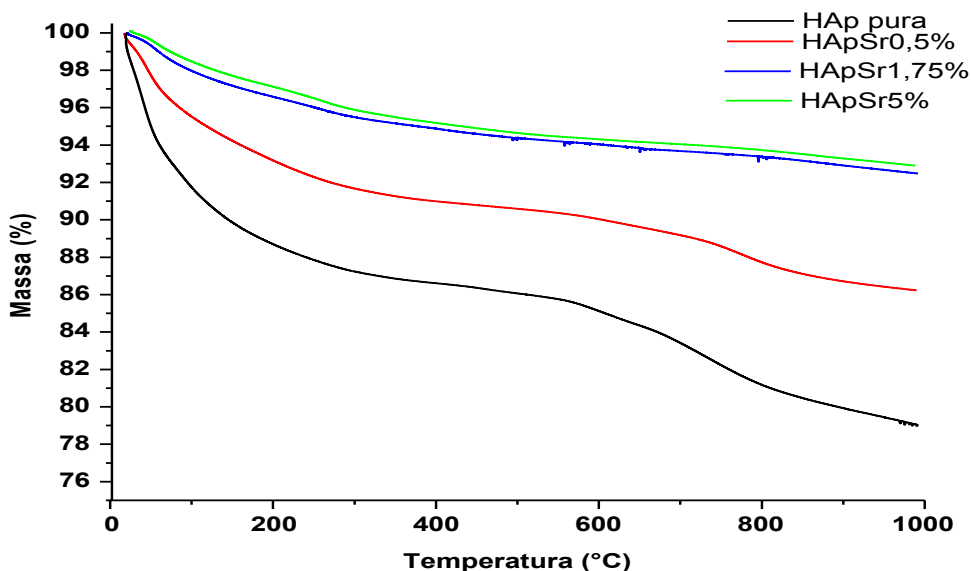


e)

3.1.4 Análise Térmica

A análise da curva TG da HAp e dopada na Figura 2.7 demonstram que aHAp pura apresenta uma perda de massa de 12% até 200°C, representada pela saída de água adsorvida na superfície do material, confirmando a hidratação do material verificada no infravermelho.

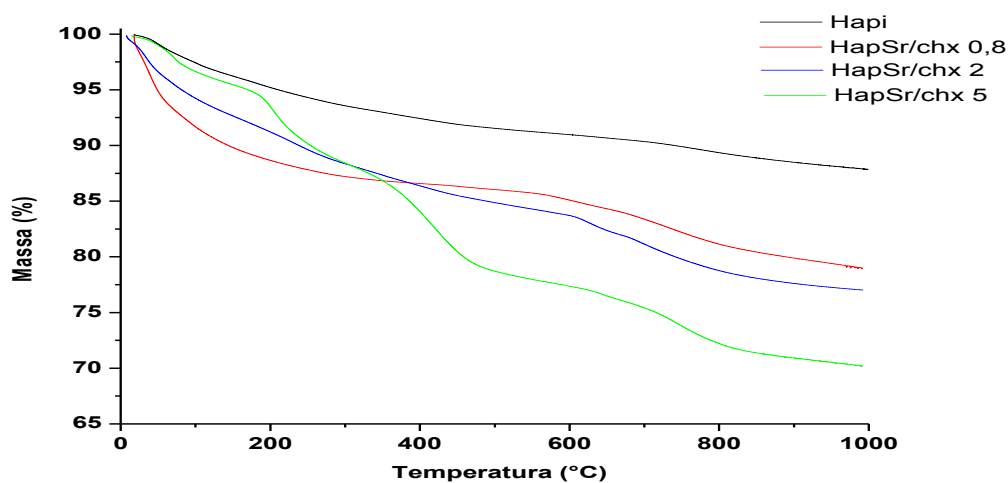
Figura 0.7 - TG da HAp e das HAp dopadas com estrôncio 0,5% 1,75% e 5%.



O segundo evento de perda ocorre no intervalo de 200-550°C, que foi atribuído à remoção de água quimicamente adsorvida com um percentual de 3,07%. E uma terceira perda de massa de 6,71% foi observada no intervalo de 550 a 991°C, sendo atribuída à eliminação de grupos OH- da superfície da HAp, (Liao, et al. 1999; Capanema, et al. 2015).

Nas curvas TG das HAp dopadas com Sr^{2+} observamos que a incorporação do metal melhorou a estabilidade térmica do material. Embora a amostra de HAp dopada apresente uma curva de degradação semelhante ao da HAp, a perda de massa das HAp dopadas é menor do que a HAp, (Ghorbani, et al. 2016). A melhoria na estabilidade térmica das HAp dopadas foi mais pronunciada a medida que aumentamos o teor do metal para 5% de estrôncio. Estas observações revelaram claramente as interações favoráveis entre HAp e o Sr^{2+} .

Figura 0.8 - TG da HApSr 0,5% e Biocompósito HAp Sr 0,5%/CHX.



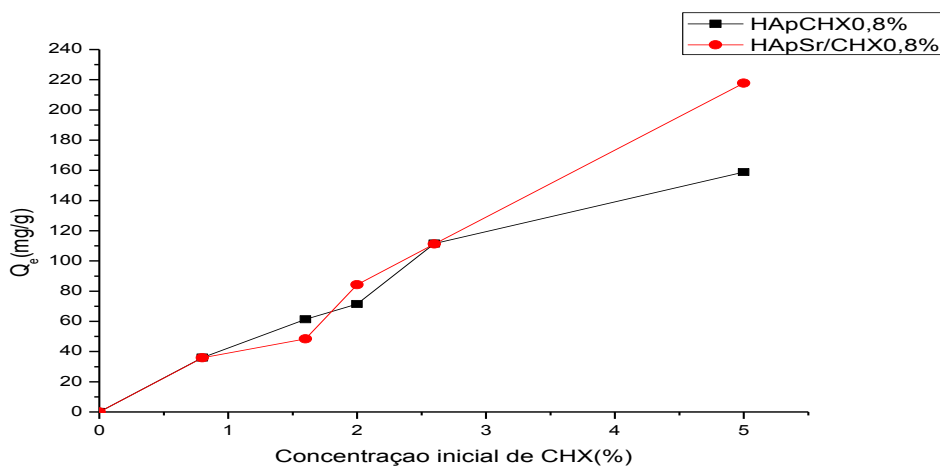
Ao analisarmos a Figura 2.8 podemos verificar que a incorporação do fármaco reduz a estabilidade térmica do material, isso ocorre devido ao fármaco ser um composto orgânico que se decompõe em temperaturas relativamente baixas, e comprova-se essa perda pelo aumento da saída de massa à medida que a quantidade de clorexidina é aumentada. A curva TG da HApSr0,5% apresenta uma perda de massa de 7% até 200°C, enquanto a HApSr0,5/CHX 0,8 perde 12% na mesma temperatura, a qual representa em ambos os materiais a saída de água adsorvida da superfície do material. O segundo evento na HApSr0,5/CHX0,8 na faixa de temperatura 200 a 400°C corresponde à saída dos grupos externos da CHX, o que representa uma perda de massa 2%.

O terceiro evento ocorre pela decomposição da CHX que ainda se encontra no biocomposito, que ocorre entre 400 e 600°C, correspondendo a uma perda de 1%. O quarto evento atribui-se a condensação dos grupos hidroxilas, com a saída de água da HAp que ocorre de 600 até 900°C atribuídos a decomposição da HAp com uma perda de 5%. O biocomposito HApSr0,5/CHX0,8 com relação as outras concentrações utilizadas foi o que apresentou melhor estabilidade térmica.

3.1.5 Adsorção

A CHX foi incorporada na HApSr0,5% pela interface sólido – líquido, analisada pela curva de adsorção mostrada na Figura 2.9.

Figura 2.9–Isortemas de adsorção da CHX na HAp e na HApSr0,5%.



A curva apresenta os valores de CHX incorporados, a qual podemos analisar que em ambos os materiais na concentração 0,8% de CHX apresentaram a mesma capacidade de adsorção, e nas concentrações 2% e 5% a HApSr0,5% adsorveu mais a clorexidina que HAp, destacando a HApSr/CHX5 com um percentual de 0,21% a mais em relação a HAp. O comparativo entre as capacidades de adsorção são mostrados nas Tabelas 2.2 e 2.3.

Tabela 2.2 Dados da incorporação da Clorexidina na HAp pura.

Biocompósito	Teórico e Relativo em solução %	Porcentagem adsorvida % HAp	Quantidade adsorvida mg/g HAp
--------------	---------------------------------	-----------------------------	-------------------------------

HAp/CHX0,8	0,8 (0,16)	0,1131	35,8
HAp/CHX2	2,0 (0,4)	0,2264	71,52
HAp/CHX5	5 (1)	0,4770	158,9

% Relativo – refere-se ao percentual retirado da solução comercial 20%.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 2.3 Dados da incorporação da Clorexidina na HApSr/CHX.

Biocompósito	Teórico e Relativo em solução %	Porcentagem adsorvida % estroncio	Quantidade adsorvida mg/g estroncio
HApSr/CHX0,8	0,8 (0,16)	0,1132	35,9
HApSr/CHX2	2,0 (0,4)	0,2650	84,3
HApSr/CHX5	5 (1)	0,68514	217,74

% Relativo – refere-se ao percentual retirado da solução comercial 20%.

Fonte: Autoria própria.

Estes dados demonstram que a HAp dopada com estrôncio favoreceu a adsorção da clorexidina, o que pode ser ampliando para outros antimicrobianos ou substâncias orgânicas com atividade antimicrobiana comprovada.

3.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A HAp apresentou um efeito antibacteriano de 2,62% para *S. aureuse* 6,45% para *E. coli*. Essa pequena atividade poderia ser explicada pela possível interação eletrostática provocada pela provável polarização entre cargas das interações de hidrogênio provenientes da HAp com a parte negativa das paredes celulares das bactérias fazendo com que o seu crescimento seja interrompido. No entanto, a pouca quantidade de grupos hidroxilas na estrutura da HAp, não proporcionou uma atividade antibacteriana ao material,(Voet, 2006).

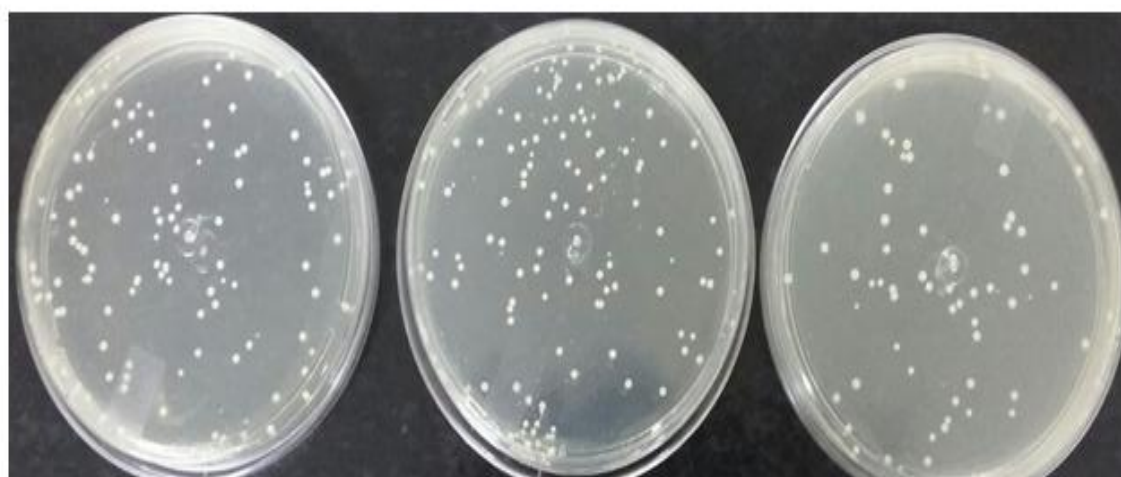
Os teste antibacterianos com a HApSr, apresentados na Tabela 2.4, demonstraram que a incorporação do estrôncio nas concentrações utilizadas aumentaram a atividade da HAp. Destacando-se a HAp Sr 0,5% para ambos os microrganismos testados, com um aumento de aproximadamente 27% para *S. aureus* (Figura 2.10) e de 62% para a *E. coli* em relação a HAp (Figura 2.11).

Tabela 0.4 - Efeito inibitório da HAp dopada com estrôncio 0,5 1,75 e 5% sobre cepas padrão de *S. aureus* (ATCC 25.923) e *E. coli* (ATCC 25.922).

Amostras	Efeito Inibitório (%)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Salina	0,0	0,0
HAp pura	2,62 ±2,30	6,45±3,48
HApSr 0,5%	29,93 ±4,90	69,35±1,32
HAp Sr 1,75%	10,20 ±4,03	36,56±4,62
HApSr 5%	10,86 ±4,06	34,41±2,01

Fonte: Autoria própria (2016)

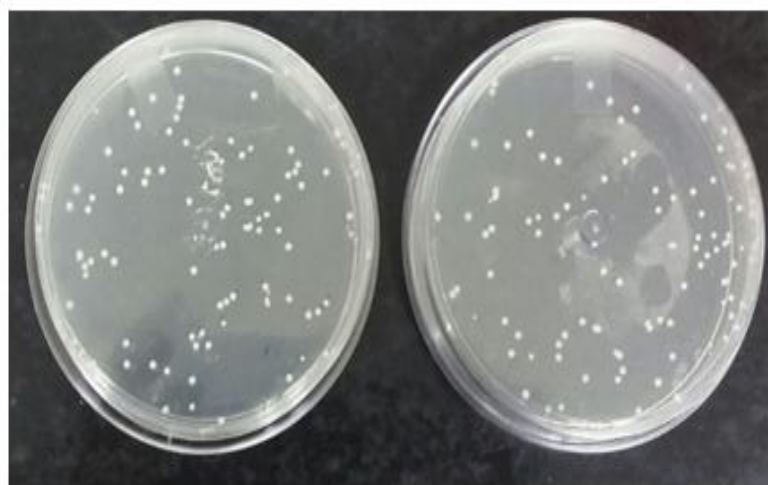
Figura 2.10 - Efeito inibitório das HAp Sr 0,5%; HAp Sr 1,75% e HAp Sr 5% frente a cepa padrão da bactéria *S. aureus* ATCC 25.923



Controle *S. aureus*
ATCC 25923

HAp pura

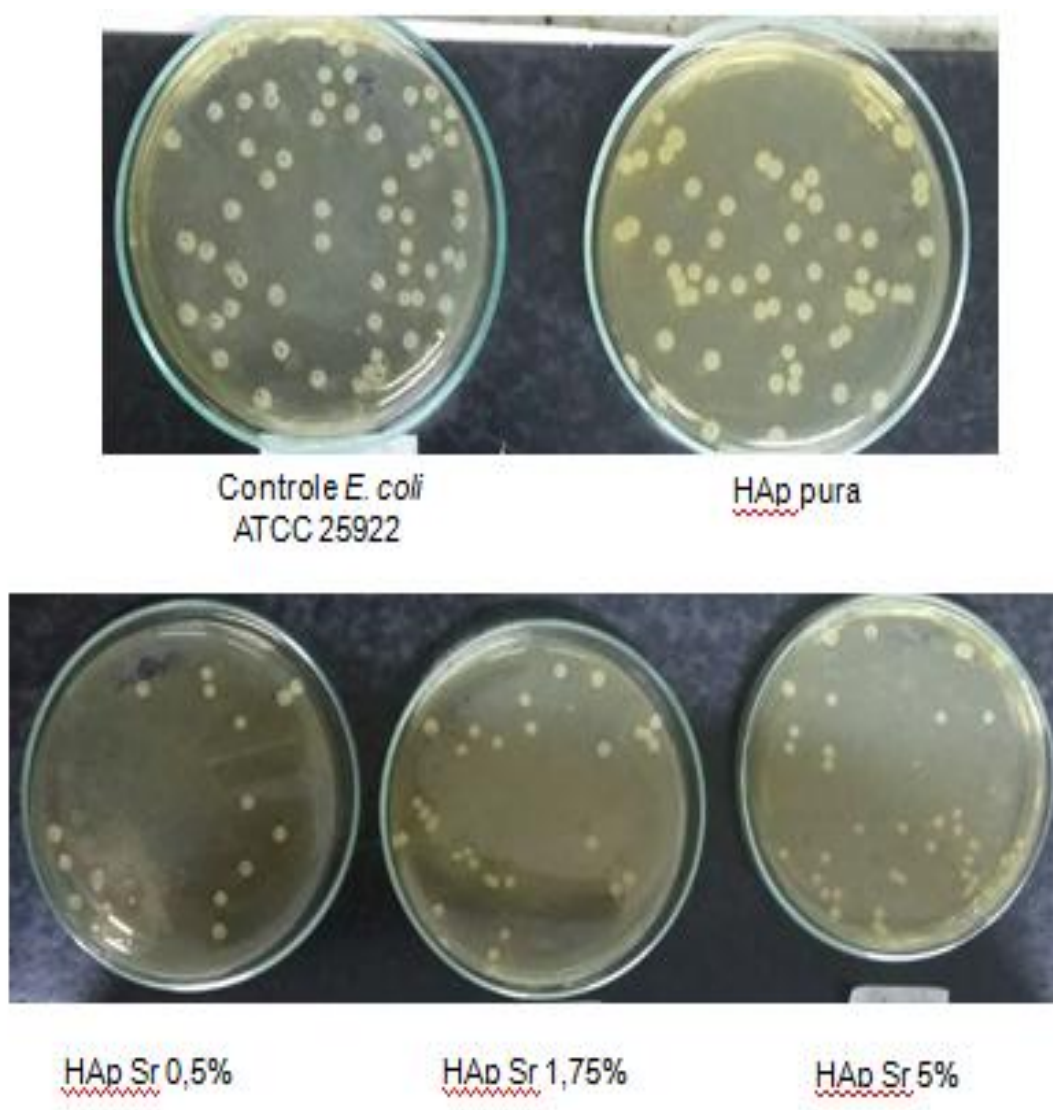
HAp Sr 0,5%



HAp Sr 1,75%

HAp Sr 5%

Figura 2.11 - Efeito inibitório das HAp Sr 0,5%; HAp Sr 1,75% e HAp Sr 5% frente a cepa padrão da bactéria *E. coli* ATCC 25.922.



Ravi et al. (2012), estudando a atividade antimicrobiana da hidroxiapatita de cálcio deficiente substituída com estrôncio (CDHAs) encontraram significativa atividade contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* pelo método de contato direto. A CDHA substituída com 10% Sr^{2+} mostrou uma redução microbiana de 56% para *E. coli* e 35% para *S. aureus*. Os resultados expostos na tabela 2.4 demonstram que a atividade apresentada pelo material sintetizado com estrôncio a 0,5% foi superior ao relatado por Ravi et. al.(2012).

Confirmando que o estrôncio, além de suas propriedades osteogênicas, melhora a atividade antimicrobiana da HAp quando substituído em sua estrutura.

A atividade antibacteriana foi mais acentuada contra a cepa Gram negativa, o que vai de encontro a uma característica atípica deste grupo, que seria a presença dos lipopolissacarídeos (LPS) na face externa de sua membrana, a qual é altamente carregada com cargas aniônicas em pH neutro, devido à exposição de grupos carboxil e fosforil que podem ser ionizados, (Camesano, et al. 2003). A presença destes grupos atribui à superfície celular uma densidade de carga negativa que é capaz de interagir com os íons ou moléculas carregadas presente no meio externo, tornando-se os locais responsáveis pela ligação dos metais ao microrganismo (Araújo, et al. 2010).

Apesar das bactérias Gram-negativas serem menos comumente associadas com infecção de prótese articular, constituindo 6% - 23% de todos os episódios, (Zimmerli, 2003), elas apresentam uma significativa importância clínica, pois, o tratamento de tais infecções é considerado mais complicado, como resultado da virulência destes microrganismos, sua crescente resistência aos agentes antimicrobianos, e as condições de comorbidade do paciente (Hsieh, et al. 2009).

Com a finalidade de potencializar a atividade antimicrobiana do biomaterial e ampliar sua futura aplicação, foi incorporado o fármaco clorexidina na concentração de 0,8% na HApSr 0,5%, pois essa concentração de estrôncio utilizada na dopagem foi a que apresentou uma atividade antimicrobiana mais significativa.

Ao analisarmos a incorporação de 0,8 % da clorexidina na HAp pura e na HApSr0,5 % podemos observar que ambos os materiais adsorveram a mesma quantidade de clorexidina, mas os resultados dos testes da atividade antimicrobiana foram diferentes Tabela 2.5. A HAp/CHX0,8 mostrou uma redução de 67,35 % para *S. aureus* e 51,27 % para *E. coli*.

Por outro lado, a HApSr/CHX0,8 apresentou um efeito inibitório de 100 % contra os microrganismos testados, Figuras 2.12 e 2.13 respectivamente.

Tabela 2.5. Efeito inibitório da HApSr/CHX0,8 sobre cepas padrão de *S. aureus* (ATCC 25.923) e *E. coli*(ATCC 25.922).

Amostras	Efeito Inibitório (%)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
HAp/CHX 0,8	67,35 ±4,34	51,27±3,68
HAp/CHX 2	100,00 ±0,00	100,00 ±0,00
HAp/CHX 5	100,00 ±0,00	100,00±0,00
HApSr/CHX 0,8	100,00 ±0,00	100,00±0,00
HAp Sr/CHX 2	100,00 ±0,00	100,00±0,00
HAp Sr/CHX 5	100,00 ±0,00	100,00±0,00

Fonte: Autoria própria.

Figura 2.12 – Efeito inibitório da HAp/CHX0,8 e HApSr/CHX0,8 sobre cepas padrão de *S. aureus* (ATCC 25.923).

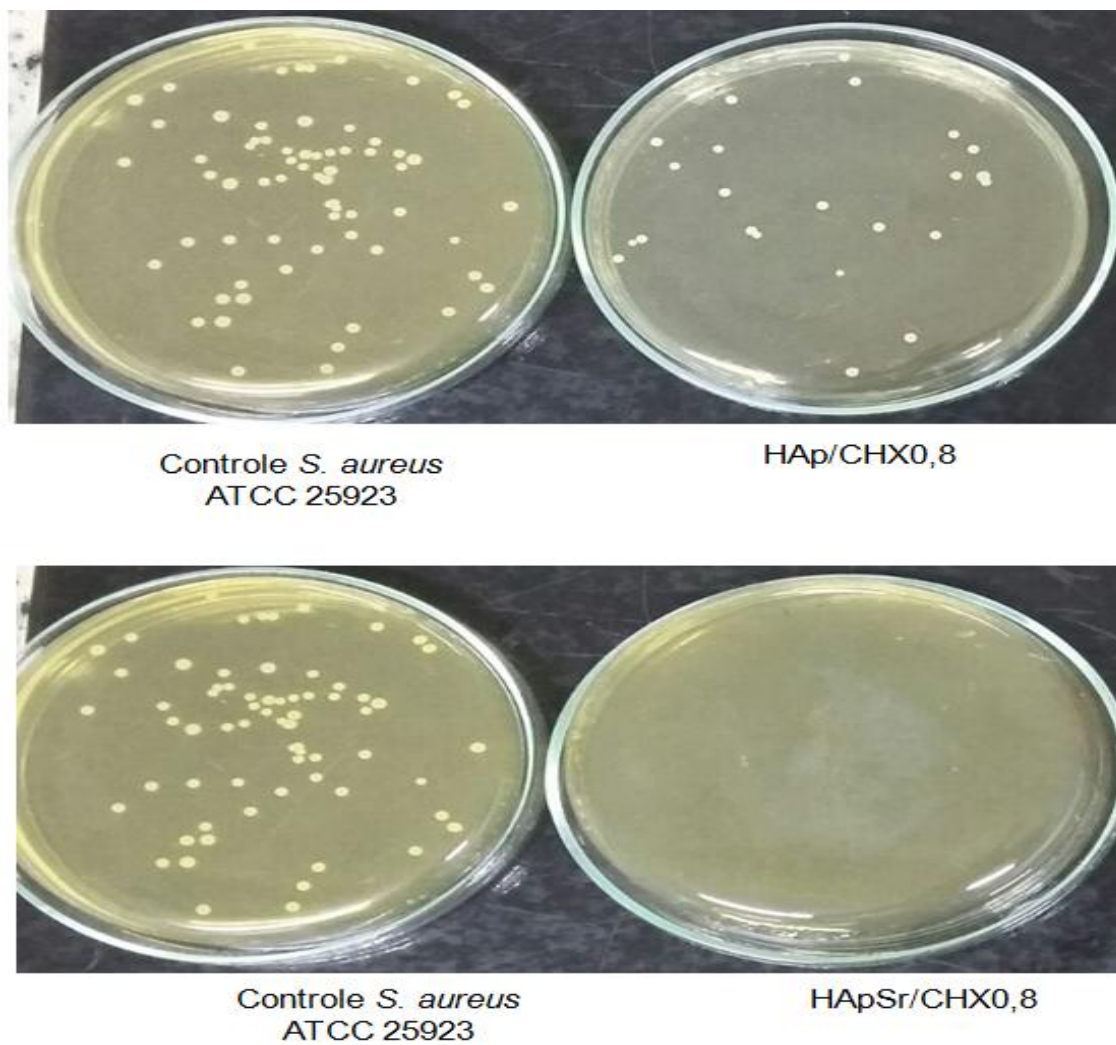
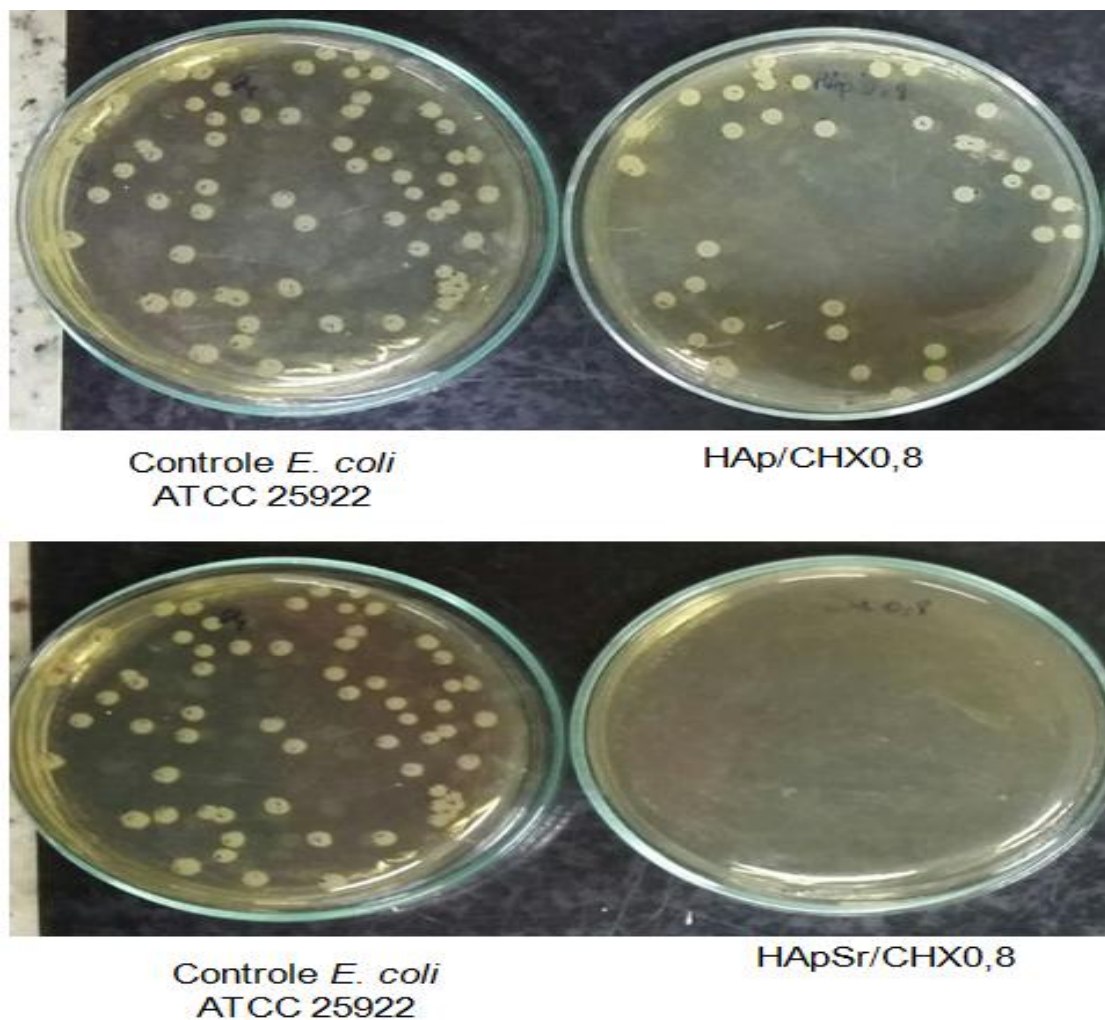


Figura 2.13 – Efeito inibitório da HAp/CHX0,8 e HApSr/CHX0,8 sobre cepa padrão de *E. coli* (ATCC 25.922).



O fato da HApSr/CHX0,8 ter apresentado uma maior atividade antimicrobiana, pode estar relacionado tanto ao efeito antimicrobiano do metal estrôncio, confirmado nos testes anteriores, como ao efeito que o metal desempenha na performance da HAp, aumentando a liberação de clorexidina durante os ensaios de contato direto. Pretende-se confirmar essa hipótese, com a realização de ensaios de liberação.

4 CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que a HAp foi obtida com sucesso na dopagem com o estrôncio pelo método da coprecipitação, confirmada pelo DRX com planos característicos, bem como pela presença de bandas típicas no FTIR . O MEV apresentou uma análise da morfologia comparativa, comprovando que a dopagem manteve a morfologia da HAp, e a análise térmica revelou que a presença do metal aumentou sua estabilidade térmica.

Após a incorporação da clorexidina na HApSr,também verificou-se que não houve alteração de sua composição química e morfologia, porém apresentou uma redução da estabilidade térmica do material. Além disto, a dopagem a HAp Sr 0,5% foi a que melhor preservou as características da HAp.O estudo das isotermas de adsorção evidenciaram um aumento da adsorção do fármaco, nas concentrações acima de 2%, revelando que a HApSr é um biomaterial promissor para incorporação de fármacos.

Os testes de atividade antibacteriana frente *S. aureus* e *E. coli* mostraram que HAp dopada com estrôncio apresentou uma melhora considerável de sua atividade antibacteriana, principalmente para as bactérias Gram- negativas(*E.coli*).E com a incorporação da clorexidina,a sua atividade foi de 100% nas menores concentrações utilizadas, para ambos os microrganismos testados.

A presença do metal estrôncio e da clorexidina potencializaram a atividade antimicrobiana do material, e com esse resultado positivo necessita-se de mais estudos para uma melhor avaliação da futura aplicação *in vivo* deste biomaterial.

5 REFERÊNCIAS

- Abert, J., Bergmann, C. & Fischer, H. (2014). Wet chemical synthesis of strontium-substituted hydroxyapatite and its influence on the mechanical and biological properties. *Ceramics International*, 40, 9195–9203.
- Ahmed, M. A., Mansour, S. F., El-dek, S. I., Abd-Elwabab, S. M., Ahmed, M. K. (2014). Characterization and annealing performance of calcium phosphate nanoparticles synthesized by coprecipitation method. *Ceramics International*, 40, 12807-12820.
- Andrade, F.A. C.(2013).Desenvolvimento de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata com propriedades antibacterianas. Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação interunidades Bioengenharia. Instituto de química de São Carlos, Universidade de São Paulo. 119 p.
- Araújo.,E. A., Andrade, N.J., Carvalho, A. F.,Ramos, M. A., Silva, C. A. S., Silva, L.H.M.(2010). Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. *Quimica Nova*, 33, 1940-1948.
- Cameson, T.,& Abul-Lail, N.(2003).Role of Lipopolysaccharides in the Adhesion, Retention, and Transport of *Escherichia coli* JM109.*Environmental Science Technology*, 37, 2173.
- Capanema, N. S. V., Mansur, A. A. P., Carvalho, S. M., Silva, A. R. P., Ciminelli, V. S., Mansur, H. S.(2015). Niobium-doped hydroxyapatite bioceramics: synthesis, characterization and in vitro cytocompatibility. *Materials*, 8, 4191-4209.
- Cape, I.(2004). Preparation of metal nanoparticles in water-i-oil (w/o) microemulsion. *Advances in colloid and interface Science*, 110, 49-74.
- Chellan, P., Sadler, P.J.(2015). The elements of life and medicines. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 373, 2037.

Chen, D., Li, X., Soule, T., Yorio, F., Orr, L.(2016). Effects of solution chemistry on antimicrobial activities of silver nanoparticles against *Gordonia sp.* Science of the total Environment,1, 566-567.

Costa, A. C. F. M., Lima, M. G., Lima, L. H. M. A., Cordeiro, V. V., Viana, K. M. S., Sousa, C. V. (2009). Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. Revista eletrônica de Materiais e Processos,4, 29-38.

Cox, S. C., Janshidi, P., Grover, L. M., Malleck, K.K.(2014).Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. Materials Science and Engineering: C, 35, 106–114.

Dabsie,F., Gregoire, G., Sixou, M., Sharrock, P. (2009). Does strontium play a role in the cariostatic activity of glass ionomer?: Strontium diffusion and antibacterial activity.Journal of Dentistry.37, 554–559.

Ghorbani, F. M, Kaffashi, B., Shokrollahi, P., Akhloghi, S., Hedengvist, M. S.(2016). Effect of hydroxyapatite nano-particles on morphology, rheology and thermal behavior of poly(caprolactone)/chitosan blends. Materials Science and Engineering: C, 59, 980–989

Guastaldi, A. C., Aparecida, A. H. (2010). Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. Química Nova [online], 33, 1352-1358.

Hench, L.L; Wilson, J. (1993). Introduction to bioceramics. Singapore: Word Scientific, 1-15.

Hench, L.L. (1991). Bioceramics: from concept to clinic. Journal of the American Ceramic Society, 74, 1487-1510.

Hsieh,P. H., Lee, M. S., Hsu, K. Y., Chang, Y. H., Shih, H. N., Ueng, S. W. (2009). Gram-Negative Prosthetic joint infections: risk factors and Outcome of treatment. Clinical Infectious Diseases, 49, 1036-43.

- Kawachi, E. Y., Bertan, C. A., Reis, R. R., Alves, O. L. (2000). Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química nova*, 23, 518-522.
- Kolmas, J., Groszyk, E., Kwiatkowska-Rózycka, D.(2014) Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties. *BioMed Research International*, Artigo ID 178123, 15 pages.
- Legeros, R.Z.(1991). Calcium phosphates in oral biology and medicine. New York: Karger. (Monographs in Oral Science).
- Liao, C-J., Lin, F-H., Chen, K-S., Sun, J-S.(1999). Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomaterials*, 20, 1807-1813.
- Mavropoulos, E.(1999). A hidroxiapatita como absorvedor de metais. 1999. Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 105 p.
- Nagano, S., Yokouchi, T. Setoguchi et al., (2014). Analysis of surgical site infection after musculoskeletal tumor surgery: risk assessment using a new scoring system. *Sarcoma*, Articles ID 645496, 9 pages.
- Namba, R. S;Inacio, M.C., Paxtone, E. W. (2013). Risk factors associated with deep surgical site infections after primary total knee arthroplasty: an analysis of 56,216 knees. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 95, 775–782.
- O'Donnell, M. D., Fredholm, Y., Rouffignac, A., Hill, R. G..(2008). Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites. *Acta Biomaterialia*, 4, 1455-1464.
- Ravin, N. D., Balu, R., Sampath Kumar, T. S.(2012). Strontium-Substituted Calcium Deficient Hydroxyapatite Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Antibacterial Properties. *Journal of the American Ceramic Societ.*, 95, 2700–2708.
- Rigo, E.C.S., Gehrke, S.A., Carbonari, M.(2007). Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtido pelo método da precipitação. *Rev. Dental Press Periodontia Implantol.* 1, 39-45.
- Sariibrahimoglu, K., Yang, W., Leeuwenburgh, S. C., Yang, F., Wolke, J. G., Zuo, Y., Li, Y., Jansen, J. A.(2015). Development of porous polyurethane/strontium-substituted

hydroxyapatite composites for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103A, 1930–1939.

Sygnatowicz, M., Keushar, K., Tiwari, A. (2010). Antimicrobial Properties of Silver-doped Hydroxyapatite Nano-powders and Thin Films. *Biological and Biomedical Materials*, 62, 65-70.

Szatkowski, T., Kolodziejczak-Rdzimska, A., Zdzarta, J., Jesionowski, T. (2015). Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan composites. *Physicochemical problems of Mineral Processing*, 51, 575-585.

Unabia, R., Piagola, J. C., Guerrero, J. R., Vequizo, R., Gambe, J., Odarve, M. k., Sambo, B. R. (2015). Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate using $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$. *Physica Status Solidi C*, 12, 572-575.

Voet, D. & Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*. (3 ed). Porto alegre: Artemed. (capitulo 11).

Zamarian, A., Yasaei, M., Moztarziadeb, F., Hesaraki, S., Hafezi, M. (2012). Influence of nano-hydroxyapatite addition to calcium hydroxide cement on its Properties. *Source of the Document Key Engineering Materials*, 493-494, 655-660.

Zheng, L. & Zhu, J. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54, 527-530.

Zimmerli, W. & Ochsner, P. E. (2003). Management of infection associated with prosthetic joints. *Infection*, 31, 99-108.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa demonstrou a possibilidade de sintetizar a HApSr como também a possibilidade de se incorporar um fármaco amplamente utilizado nas áreas odontológica e medica, como agente antimicrobiano na prevenção e tratamento de infecções de enxertos ósseos e implantes. No entanto, estudos adicionais, tais como: ensaios de liberação da CHX na HAp pura e HApSr , e testes de toxicidade se fazem necessários para futuras aplicação clínicadeste biomaterial.

PERSPECTIVAS

- Testar o biomaterial contra os microrganismos da cavidade oral;
- Estudar a liberação da CHX;
- Determinar a concentração mínima inibitória;
- Produzir novos biomateriais a partir da HApSr com moléculas biologicamente ativas;
- Testar concentrações menores de CHX;
- Testar HApSrCHX contra fungos;
- Realizar ensaios de toxicidade.