



**André da Silva Luz Rafael Barreiro**

Licenciatura em Engenharia de Materiais

## **Desenvolvimento de Nano-pós de Hidroxiapatite Antimicrobiana Utilizando a Técnica de Sol-gel**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia de Materiais

**Orientador:** Professor Doutor João Paulo Miranda Ribeiro  
Borges, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade Nova de Lisboa

**Co-Orientador:** Jorge Alexandre Monteiro Carvalho Silva,  
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Abril 2018



## **Desenvolvimento de Nano-pós de Hidroxiapatite Antimicrobiana Utilizando a Técnica de Sol-gel Simples**

Copyright © André da Silva Luz Rafael Barreiro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

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



Ao Tiago,  
Porque sem ti isto não teria piada.



## Agradecimentos

Perto de concluir o meu percurso académico, chega a hora de agradecer a todos aqueles que me acompanharam durante estes anos, marcando-me para sempre, cada um à sua maneira.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, Professor. João Paulo Borges. Pela sua paciência e dedicação, pela motivação dada e pelos “apertos de orelha”, pelas horas de trabalho que lhe dei a mais. Pela sua orientação nesta tese e por todos os outros anos em que me acompanhou. Sempre foi e será um professor que me marcou muito, e isso não se esquece. Um muito obrigado da minha parte.

Depois, ao co-orientador, Professor Doutor Jorge Carvalho Silva, pela disponibilidade e ensinamentos dados nesta importante etapa da minha vida. Muito obrigado.

De referir que esta dissertação foi parcialmente financiada pelo projeto DentalBlast – Desenvolvimento de revestimentos antibacterianos à base de biovidros para implantes dentários (P2020; Projecto em Co-Promoção nº 17956 – AAC 33/SI/2015).

Ao Diogo Ramos, por tudo o que fez por mim. Durante este período foi professor, orientador, amigo, conselheiro e companheiro de gargalhadas. Muita desta tese é dele, e claramente sem ele, eu não a conseguiria acabar. Desde as roulotes, à net violenta, foram dias de trabalho que passaram a correr, muito graças à tua companhia. Foi essencialmente, um amigo que ganhei! Obrigado Super Diogo!

À minha Filipa Gonçalves. Não há muitas palavras que eu posso acrescentar sobre ela. À forma como todos os dias me ensina algo novo, e me faz acreditar que sou capaz de alcançar tudo aquilo que quero. Às reprimendas que me faz, porque sabe que consigo fazer mais e melhor. À companheira do dia-a-dia e às inúmeras aventuras passadas, que eu não trocava nem por nada. À minha Pipa. Obrigado do fundo do coração. Um agradecimento especial também à Mónica e à Francisca, por todos os bons momentos passados, e por me acolherem tão bem na vossa família. À malta da pesada. Ao meu “namorado” Miguel, por todos os dias ter algo para falar comigo e não desistir até me conseguir levar para a má vida. Ao Latapy, amigo de anos e anos (já nem sabemos quantos), que é a prova viva do que uma amizade para a vida é. Ao Pinto, por representar que os amigos verdadeiros nunca o deixam de ser, por mais adversidades que possam existir. Ao Gil, pelas aventuras passadas juntos e momentos que jamais esqueceremos. Obrigado a todos vós! Obrigado à Maria (mesmo sendo chata), ao Massa, ao meu querido Dias e ao meu tropa Barroso! Ao João Duarte. Ao longo destes anos tornou-se o melhor amigo que poderia ter. Ensinou-me que nos podemos divertir à grande e mesmo assim trabalharmos. À mítica Golegã, aos passeios de bicicleta e a todos os episódios passados, em que chorámos a rir até não podermos mais. Ao Gameiro, por estar sempre lá. Pelas apostas, pelos almoços na cantina e pelas férias de Verão. Um amigo para a vida. Ao Medeiros, o meu primeiro amigo da gloriosa FCT. Companheiro eterno, quando nos juntamos é impossível calarem-noa. Sempre de sorriso na cara, é só pedir que

ele está lá. Obrigado amigão. Quero também agradecer a todos aqueles bons amigos que me acompanharam durante estes anos na FCT, e que sem eles isto não seria possível. Chico Duarte, a minha Cláudia, aos grandes Piratas Areias, Charroco, Lourenço e Joel. Ao Milho e à Bia. Aos meus amigões Diogo, Vlad e Tomas. Ao Chico Lopes. A todos, um muito obrigado!

Por fim, os mais importantes. Ao meu pai João e à minha mãe Anabela. Sem eles nada disto seria possível. À sua força interior e sacrifício, que dia após dia me motivam e fazem “o barco andar para a frente”. Ao fantástico espírito da minha mãe e à responsabilidade inculcada pelo meu pai. Como costumo dizer, se fosse fácil estavam cá outros. Aos meus avós e tios, que me dão força e me mimam, sem pedir nada em troca. Ao meu avô Luz, por ser o meu modelo desde que me lembro. Por me ensinar o que realmente interessa. Por me chatear com “as coisas da faculdade”. Por tudo. Finalmente, ao Tiago, o meu irmão. Como digo anteriormente, isto sem ti não tinha tanta piada. Obrigado por me fazeres rir, por me chateares, por gozares comigo. Por estares lá sempre que eu preciso e por teres saudades minhas quando eu não estou (eu sei que tens). Obrigado essencialmente, por seres meu irmão.

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de pós de hidroxiapatite (HAp) com atividade antibacteriana. Para tal, procurou-se dopar a hidroxiapatite com prata (Ag) (0.5 a 8 mol %), zinco (Zn) (0.5 a 8 mol %) e ambos. Os pós foram sintetizados usando um método sol-gel simples em que o nitrato de cálcio e o pentóxido de fósforo são os precursores de cálcio e fósforo, respectivamente. Os pós sintetizados foram analisados quanto à sua estrutura (DRX), composição química (FTIR) e quanto à citotoxicidade e atividade antibacteriana. A dopagem provocou a alteração dos parâmetros de rede, sendo os resultados compatíveis com uma substituição dos dopantes nas duas posições cristalográficas dos íons de cálcio da estrutura da hidroxiapatite.

Verificou-se que para concentrações inferiores a 4 mol % de Ag e 2 mol % de Zn, os pós apresentam-se não citotóxicos com uma viabilidade celular relativa superior a 90%. Os pós dopados com Ag e Zn revelaram atividade antibacteriana para bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*) e gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), respectivamente.

As amostras co-dopadas (Ag/Zn = 2/0.5, 1.5/1 e 1.3/1.3 mol %) não revelaram citotoxicidade (viabilidade celular superior a 95 %) e actividade antibacteriana para ambas as espécies de bactérias.

**Palavras chave:** Hidroxiapatite; Ag; Zn; sol-gel simples; DRX; FTIR; citotoxicidade; atividade antibacteriana.



## Abstract

This work aimed to the development of hydroxyapatite (HAp) powders with antibacterial activity. For this purpose, hydroxyapatite was doped with Ag (0.5 a 8 mol %), Zn (0.5 a 8 mol %) and both. The powders were synthesized using a simple sol-gel method in which calcium nitrate and phosphorus pentoxide are the precursors of calcium and phosphorus, respectively. The synthesized powders were analyzed for their structure (XRD), chemical composition (FTIR) and for cytotoxicity and antibacterial activity. Doping caused changes in the lattice parameters, and the results were compatible with a substitution of the dopants in the tetrahedral (CaI) and octahedral (CaII) positions of the calcium ions of the hydroxyapatite structure.

It has been found that at concentrations below 4 mol% Ag and 2 mol% Zn, powders are non-cytotoxic with relative cell viability greater than 90%. Ag and Zn doped powders showed antibacterial activity for gram-negative (*Escherichia coli*) and gram-positive (*Staphylococcus aureus*) bacteria, respectively.

Co-doped samples (Ag/Zn = 2/0.5, 1.5/1 e 1.3/1.3 mol %) showed no cytotoxicity (cell viability greater than 95%) and antibacterial activity for both bacterial species.

**Keywords:** Hydroxyapatite; Ag; Zn; simple sol-gel; DRX; FTIR; cytotoxicity; antibacterial activity



# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>5</b>
2.1	Materiais	5
2.2	Preparação da hidroxiapatite dopada através do método de sol-gel	5
2.3	Caracterização	6
2.3.1	Difração de raios-X (DRX)	6
2.3.2	Calorimetria diferencial de varrimento e análise termogravimétrica (DSC-TGA)	6
2.3.3	Espetroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	6
2.3.4	Ensaio de Citotoxicidade	7
2.3.5	Ensaio de actividade antibacteriana	7
<b>3</b>	<b>Análise e Discussão de Resultados</b>	<b>9</b>
3.1	Estudo de cristalização das amostras	9
3.2	Análise estrutural das amostras de HAp dopadas com prata ou zinco	12
3.3	Análise estrutural das amostras de hidroxiapatite co-dopadas	19
3.4	Análise Físico-química dos pós sintetizados	21
3.5	Análise da citotoxicidade das amostras sintetizadas	22
3.6	Análise da actividade antibacteriana das amostras sintetizadas	25
<b>4</b>	<b>Conclusões e perspectivas futuras</b>	<b>29</b>
	<b>Referências</b>	<b>33</b>
	<b>Anexos</b>	<b>37</b>
	Anexo 1. Percentagem molar e massas dos constituintes	37
	Anexo 2. Processo de Sol-gel	38
	Anexo 3. Protocolo da análise citotóxica	39
	Anexo 4. Procedimento geral do ensaio de actividade antibacteriana	40
	Anexo 5. Difractogramas DSC/TGA	42
	Anexo 6. Difractogramas das amostras estudadas	44
	Anexo 7. Grau de cristalinidade das amostras estudadas	50
	Anexo 8. Tamanho de cristalito para todas as amostras sintetizadas	52
	Anexo 9. Valores de parâmetros de rede e volume celular das amostras estudadas	54
	Anexo 10. Valores de Viabilidade celulares relativos, desvio padrão e incerteza	55



## Índice de Figuras

Figura 1.1 Estrutura da hidroxiapatite (adaptado de [20]).	3
Figura 3.1 Termograma das amostras de HAp.	9
Figura 3.2 Difractogramas dos pós de HAp dopados com 2 mol% Ag (Ag2) sinterizados a diferentes temperaturas. Apresenta-se o difractograma da HAp não dopada para comparação.	10
Figura 3.3 Difractogramas dos pós de HAp dopados com 1 mol% Zn (Zn1) sinterizados a diferentes temperaturas. Apresenta-se o difractograma da HAp não dopada para comparação.	10
Figura 3.4 Difractogramas de amostras de HAp dopadas com diferentes concentrações molares de Ag (sem envelhecimento).	12
Figura 3.5 Difractogramas de amostras de HAp dopadas com diferentes concentrações molares de Zn. (sem envelhecimento).	13
Figura 3.6 Difractogramas da amostra Ag2 com diferentes tempos de envelhecimento. Todas as amostras foram sinterizadas a 700°C.	14
Figura 3.7 Difractogramas da amostra Zn1 com diferentes tempos de envelhecimento. Todas as amostras foram sinterizadas a 700°C.	14
Figura 3.8 Evolução dos parâmetros de rede a e c com o tempo de envelhecimento da amostra Ag2.	15
Figura 3.9 Evolução dos parâmetros de rede a e c com o tempo de envelhecimento da amostra Zn1.	16
Figura 3.10 Evolução dos parâmetros de rede a e c com a concentração molar de prata.	18
Figura 3.11 Evolução dos parâmetros de rede a e c com a concentração molar de zinco.	18
Figura 3.12 Representação do cristal de HAp alongado, segundo o eixo-a. (adaptado de [47]).	19
Figura 3.13 Difractograma de DRX com as várias amostras de HAp co-dopadas.	20
Figura 3.14 Espectros de FTIR das amostras de HAp dopadas com Ag, Zn e co-dopadas.	22
Figura 3.15 Viabilidade celular de células Vero com extratos de HAp dopada com Ag para cada concentração.	23
Figura 3.16 Gráfico de barras da análise citotóxica das amostras de HAp dopada com Zn para cada concentração.	24
Figura 3.17 Gráfico de barras da análise citotóxica das amostras de HAp co-dopada para cada concentração.	25
Figura 3.18 Unidades formadoras de colónias de amostras de HAp dopadas com Ag, expostas a E. coli e S. aureus.	26
Figura 3.19 Unidades formadoras de colónias de amostras de HAp dopadas com Zn, expostas a E. coli e S. aureus.	27
Figura 3.20 Gráfico de barras da análise à actividade antibacteriana das amostras de HAp co-dopadas.	28



## Índice de Tabelas

Tabela 3.1 Valores do grau de cristalinidade para as amostras Ag2 e Zn1 a diferentes temperaturas de sinterização.....	11
Tabela 3.2 Valores de tamanho de cristalito para as amostras Ag2 e Zn1 para os picos (2 2 0) e (0 0 2).....	17
Tabela 3.3 Valores dos graus de cristalinidade para as amostras de HAp co-dopadas.....	20
Tabela 3.4 Valores dos parâmetros de rede a e c para as amostras de HAp co-dopadas.....	21
Tabela 3.5 Modos de vibração FTIR identificados para HAp [33].....	21



## Símbolos Químicos e Acrónimos

<i>Ag</i>	Prata
<i>Ca</i>	Cálcio
CFU	Unidades formadoras de colónias
DRX	Difração de raios-X ( <i>X-ray Diffraction</i> )
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
<i>HAp</i>	Hidroxiapatite
<i>P</i>	Fósforo
ROS	Espécies reativas de oxigénio
Rpm	Rotações por minuto
SEM	Microscopia Eletrónica de Varrimento ( <i>Scanning Electron Microscope</i> )
<i>Ti</i>	Titânio
TGA	Análise Termogravimétrica
<i>Zn</i>	Zinco
$\lambda$	Comprimento de onda
$\chi_c$	Grau de cristalinidade



# 1 Introdução

Os ossos são um sistema bastante complexo, desempenhando funções de extrema importância para o funcionamento do corpo humano, como a sustentação do corpo e na proteção contra impactos. São essencialmente compostos por hidroxiapatite (HAp) (70%), fibras de colagénio tipo I (20%) e água (10%)[1]. A presente dissertação tem como foco principal a síntese da hidroxiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6((\text{OH})_2)$ ), um cerâmico da família dos fosfatos de cálcio com um rácio molar Ca/P (cálcio por fósforo) de 1.67. Trata-se de um biocerâmico bioativo não degradável<sup>1</sup>, quimicamente similar à fase mineral do osso, e com a capacidade de aceitar um grande número de substituintes aniónicos e catiónicos. Ela forma uma ligação com o tecido ósseo circundante quando implantado, sendo usado principalmente na produção de revestimentos para próteses metálicas e substitutos ósseos. Devido às características acima citadas, este biomaterial tem sido bastante utilizado para aplicações dentárias e ortopédicas tais como revestimentos de implantes médicos, reparação e substituição de tecidos rijos, matrizes porosas (*scaffold*) para enchimento ósseo e também para sistemas de libertação de drogas [2]–[4].

No domínio da medicina regenerativa a HAp é usada no fabrico de *scaffolds* para preenchimento de defeitos e regeneração do tecido ósseo [5]. Contudo, certas proteínas, aminoácidos e ainda outras substâncias orgânicas são adsorvidas à superfície da HAp, o que favorece a formação de filmes bacterianos. A contaminação bacteriana causada pela adesão e colonização na sua superfície é um problema clínico relevante. A eliminação destes biofilmes é difícil e requer doses elevadas de antibióticos, o que para além de poder ter um efeito tóxico pode conduzir à formação de bactérias multirresistentes [6]. Os implantes dentários de titânio (Ti) são um exemplo de dispositivos biomédicos onde a formação de biofilmes bacterianos pode ser particularmente grave. Estudos realizados consideram que as taxas de sucesso dos implantes rondam aproximadamente os 82,9% [7] da totalidade das intervenções realizadas. Porém, é de salientar que muitas vezes após as cirurgias de implantação dentária, se denota a predominância de infeções peri-implantares resultantes quer de deficiente osteointegração inicial do implante quer à formação a longo-termo de biofilmes bacterianos à sua superfície. As infeções peri-implantares podem classificar-se como moderadas e reversíveis (mucosite peri-implantar) ou severas (peri-implantite). A diferença entre ambas reside no facto de a primeira lesão estar confinada aos tecidos moles (mucosa marginal), enquanto que a segunda existe o envolvimento do osso de suporte, havendo assim a perda do mesmo [8], [9]. A mucosite ocorre em mais de 80% dos pacientes que receberam os implantes sendo que a peri-implantite se verifica em entre 26% a 56%

---

<sup>1</sup> A degradação dos fosfatos de cálcio depende da razão molar Ca/P. Para razões  $\text{Ca/P} \leq 1,5$  os fosfatos de cálcio são biodegradáveis [52] !

dos casos [10]. A peri-implantite consiste numa infecção provocada por bactérias Gram+ e Gram-anaeróbias [11], sendo que, em particular, bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* parecem desempenhar um papel predominante no desenvolvimento desta patologia, já que apresentam uma grande afinidade para o Ti [12]. Estes agentes formam um biofilme submucoso na lesão peri-implantar resultando em ulceração do epitélio sulcular, perda de fibras colagénias, migração apical do epitélio funcional, atividade osteoclástica, entre outros, de onde resulta a perda de capital ósseo [13]–[17]. Para o tratamento das peri-implantites dever-se-à incluir medidas antimicrobianas, uma vez que o biofilme bacteriano aparenta ser o fator etiológico primário [9]. No entanto, não existem atualmente regimes de antibioterapia profiláticos nem tratamentos universais para esta patologia, sendo que no geral, este tratamento é extremamente difícil, consistindo, regra geral, na remoção do implante. Nesse sentido, o desenvolvimento de HAp com atividade antibacteriana, para a produção quer de *scaffolds* para regeneração óssea quer de revestimentos para implantes, tem sido explorado pela comunidade científica.

A HAp possui uma estrutura hexagonal (grupo espacial  $P6_3/m$ ), e apresenta parâmetros de rede  $a=b=9,432 \text{ \AA}$  e  $c=6,881 \text{ \AA}$  [18]. A sua rede cristalina é descrita como conjuntos compactos de grupos fosfato tetraédricos ( $\text{PO}_4$ ), onde os iões de fósforo ( $\text{P}^{5+}$ ) se encontram no centro dos tetraedros e cujos topos dos mesmos estão ocupados por 4 átomos de oxigénio. Cada um destes tetraedros  $\text{PO}_4$  é partilhado com uma coluna e vai delimitar dois tipos de canais, não conectados. O primeiro canal possui um diâmetro de aproximadamente  $2.5 \text{ \AA}$  estando rodeado por iões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Encontram-se localizados em  $z=0$  e  $z=1/2$ , sendo denominados por Ca(I),  $\text{Ca}_1$  ou Ca(interior). O segundo canal desempenha um papel importante nas propriedades da hidroxiapatite, possuindo um diâmetro superior ao anterior, entre aproximadamente  $3$  e  $4.5 \text{ \AA}$ . Contém outros 6 iões  $\text{Ca}^{2+}$  e localizam-se em  $z=1/4$  e  $z=3/4$ . É denominado por Ca(II),  $\text{Ca}_2$  ou Ca(exterior), por se encontrar na parte exterior do hexágono. A existência de 2 tipos de iões cálcio na rede cristalina é de especial interesse devido às possibilidade de ser possível ajustar as propriedades de HAp, mudando a dopagem e a posição dos iões na rede cristalina [19].

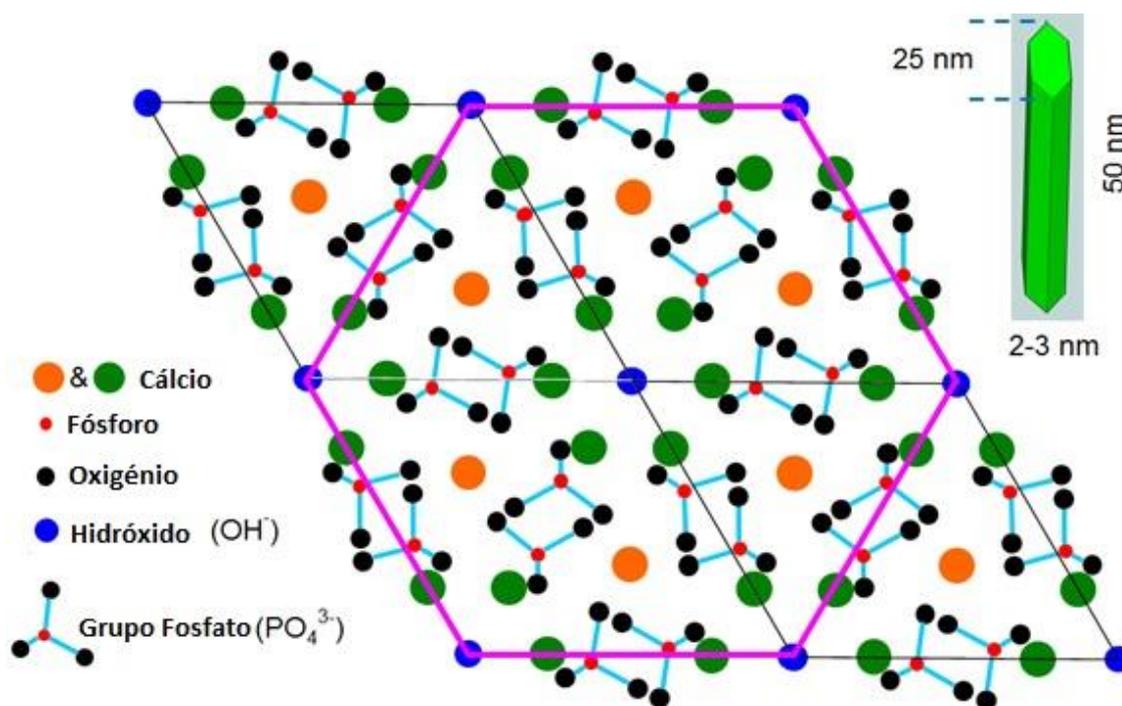


Figura 1.1 Estrutura da hidroxiapatite (adaptado de [20]).

Tal como referido anteriormente, a HAp permite substituições aniónicas e catiónicas na sua estrutura. A incorporação de iões na estrutura da HAp<sup>2</sup> conduz a alterações da estrutura, cristalinidade, carga superficial, solubilidade e bioatividade, sendo acompanhadas por alterações da resposta biológica ao material dopado. Encontram-se inúmeros relatos na literatura relativos à síntese e caracterização de pós e revestimentos de HAp dopada com diversos catiões e aniões, para aplicações biomédicas. Uma revisão completa sobre os estudos existentes neste domínio pode ser encontrada nas revisões da literatura feitas por Monika Supová [21], Ratnayake *et al.* [22] e Joanna Kolmas *et al.*[2]. Os catiões Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, são referidos como aqueles que conferem atividade anti-bacteriana à HAp [2].

A prata (Ag) tem sido bastante utilizada em diversos dispositivos médicos nos últimos anos, muito devido às suas ótimas propriedades antibacterianas e antimicrobianas, para além da pouca ou nenhuma evidência de citotoxicidade em pequenas quantidades (0.5-5 mol%) [23]. Além disso, é reportado na literatura que a atividade antibacteriana da prata é potenciada por junção com outros iões, devido a um efeito sinérgico. Entre estes iões encontra-se o Zn<sup>2+</sup> [24], [25].

O zinco (Zn) é um mineral essencial para o crescimento celular, estando também presente em mais de 300 enzimas envolvidas no metabolismo ósseo. Foi também verificado que a HAp dopada com iões Zn<sup>2+</sup> possui efeito inibitório para bactérias Gram + (*Staphylococcus aureus*) e Gram –

<sup>2</sup> Catiões incorporam a estrutura da HAp por substituição parcial do ião Ca<sup>2+</sup>, enquanto que os aniões poderão substituir quer os iões PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> quer os iões OH<sup>-</sup>.

(*Escherichia coli*). Por outro lado, a dopagem da HAp com o íon zinco provocou um aumento da atividade dos osteoblastos e uma diminuição da atividade dos osteoclastos, o que tem impacto direto no processo de regeneração óssea [2], [26], [27].

Face ao exposto, neste trabalho foram sintetizados pós de HAp dopada com íões  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e co-dopados ( $\text{Ag}^+ + \text{Zn}^{2+}$ ). O objetivo foi o de obter materiais com propriedades antibacterianas, que simultaneamente possam favorecer o processo de regeneração óssea e cujas aplicações potenciais são a produção de scaffolds e de revestimentos para implantes. Este estudo foi alinhado com a estratégia delineada no Projeto DENTALBLAST, coordenado pelo Prof. João Paulo Borges, e cujo objetivo é o de desenvolver novos revestimentos antibacterianos para implantes dentários. Na literatura, as técnicas mais usadas para a síntese de pós à base de HAp são a co-precipitação e o método sol-gel [24], [28]–[32]. O método sol-gel baseia-se numa sequência de reações de hidrólise, seguidas da condensação dos precursores. O objetivo é a formação de partículas colóides (sol), seguido da formação de uma rede tridimensional (gel) [24], [33], [34]. É um processo que permite um grande controlo da composição, proporcionando a criação de novos materiais com homogeneidade e pureza superiores às que se conseguem com a co-precipitação. Por estes motivos, o método sol-gel foi o eleito neste trabalho para a realização de todas as sínteses. Os precursores usados neste trabalho são não-alcóxidos e o processo sol-gel usado é simples, não requerendo qualquer controlo de temperatura ou de pH. Para além disso, o solvente usado na síntese é o etanol, cuja eliminação é simples e não prejudicial. Dadas as suas características, este processo pode ser facilmente industrializável com óbvios benefícios, nomeadamente económicos (precursores baratos e não preocupação com eliminação de resíduos tóxicos).

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Materiais

Para a síntese de hidroxiapatite dopada foi empregue um método de sol-gel simples usando como precursor de cálcio (Ca) o nitrato de cálcio tetrahidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , VWR, 99,1%) e como precursor de fósforo o pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ , Sigma-Adrich, 99 %). Para as dopagens foram utilizados nitrato de zinco hexahidratado ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Alfa Aesar, 99%) e nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ , Parneac) como precursores do zinco e da prata, respetivamente. Como solvente da reação foi utilizado o etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ , Sigma-Adrich, 99.8%).

### 2.2 Preparação da hidroxiapatite dopada através do método de sol-gel

Neste trabalho foram feitas dopagens de Ag, Zn, e misturas Ag-Zn de diferentes percentagens molares:

- Ag: 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 6%, 8%;
- Zn: 0.5%, 1%, 1.3%, 2%, 4%, 6%, 8%;
- Misturas Ag-Zn: 2. % Ag-0.5% Zn, 1,55% Ag – 1% Zn, 1.3% Ag – 1.3% Zn.

Para a síntese de HAp e HAp dopada pelo método de sol-gel, os precursores foram dissolvidos em etanol, separadamente, sendo que o precursor de Ca foi dissolvido em 10 ml de etanol, e quer o precursor de P, quer o precursor de Ag/Zn foram dissolvidos em 5 ml de etanol cada, perfazendo um total de 20 ml de solução. De acordo com as condições necessárias descritas anteriormente (rácio molar de Ca/P de 1.67), as percentagens molares e respetivas quantidades mássicas de cada um dos constituintes encontram-se representados na tabela do anexo 1. Após dissolução dos precursores em separado, estes são misturados, sob agitação mecânica (300-400 rpm) à temperatura ambiente. Após a homogeneização das soluções, as mesmas foram colocadas num banho de silicone a 90°C durante aproximadamente 1 hora, até ao término da reação (formação de um gel). Após esta etapa, ocorre uma de envelhecimento (*ageing*), com duração de 0, 4, 24 ou 48 horas. Seguidamente, ocorreu uma etapa de secagem desse mesmo gel na estufa a 80°C, durante 24 horas, e por fim, recorreu-se a uma etapa de sinterização, onde as amostras foram colocadas durante 1 hora às temperaturas de 600, 700 ou 800 °C, com uma rampa de aquecimento de 10°/ min. As temperaturas de sinterização encontram-se acima da temperatura de cristalização dos pós, determinada por análises de DSC-TGA. No caso da HAp apenas se efetuou a sinterização a 700 °C (ver secção 3.1, página 9). No fim de todo este processo, foram originados aglomerados de HAp, que após um processo de moagem resultaram em pós finos. Todo este processo de produção de HAp e HAp dopada pelo método de sol-gel está representado no esquema do anexo 2.

## 2.3 Caracterização

Os pós sintetizados foram analisados do ponto de vista estrutural (difração de raios-X - DRX), Físico-químico (Espectroscopia de Infravermelhos por transformada Fourier – FTIR) e do ponto de vista da sua citotoxicidade e atividade antibacteriana. Foram ainda efetuados estudos relativos à estabilidade térmica destes pós, por calorimetria diferencial de varrimento e análise termogravimétrica (DSC-TGA).

### 2.3.1 Difração de raios-X (DRX)

Os ensaios de DRX foram efetuados nas instalações do CENIMAT. Com esta análise foi possível analisar a cristalinidade dos pós de hidroxiapatite sinterizados, usando uma radiação monocromática de cobre ( $CuK\alpha$ ) com um comprimento de onda  $\lambda = 1.5405980 \text{ \AA}$ . As análises foram registadas em intervalos de  $0.033^\circ$  com 33 segundos de intervalo entre cada registo, existindo um intervalo de  $2\theta$  compreendido entre os  $10^\circ$  e os  $90^\circ$ .

### 2.3.2 Calorimetria diferencial de varrimento e análise termogravimétrica (DSC-TGA)

Os ensaios de DSC-TGA foram realizados nas instalações do CENIMAT. Foi analisada a estabilidade térmica das amostras produzidas, tendo sido descoberto a temperatura de cristalização das mesmas. Recorrendo ao equipamento Analyser STA 449 F3 Jupiter, foi utilizada uma rampa de aquecimento de  $5K/\text{minuto}$  até ser atingido os  $1100^\circ\text{C}$ . Foram utilizados cadinhos de alumina, como suporte da amostra durante o ensaio.

### 2.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Recorrendo às análises de FTIR, também realizadas no CENIMAT, foi possível estudar a caracterização da estrutura química da amostra sinterizada. Recorrendo a um espectrofotómetro FTIR Thermo Nicolet 6700, e em modo de absorvância, obtiveram-se os espectros utilizando pastilhas de KBr e a uma temperatura ambiente. Os resultados foram medidos num intervalo de número de onda compreendido entre  $1800$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$  em intervalos de  $10 \text{ cm}^{-1}$ , tendo sido efetuadas 5 repetições por cada medida.

### 2.3.4 Ensaio de Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade realizados às amostras produzidas foram feitos no Departamento de Física (DF, FCT/UNL) da faculdade sob orientação do professor Jorge Carvalho Silva.

Para a realização dos ensaios foi utilizada uma concentração inicial de 50 mg/ml de cada amostra, tendo sido efetuadas 5 diluições por amostra. Em todos os ensaios se recorreu às células Vero. Foi utilizado o método de extrato, sendo o procedimento baseado na norma ISO 10993-5:2009, que se encontra no anexo 3.

### 2.3.5 Ensaio de actividade antibacteriana

Os ensaios de actividade antimicrobiana foram realizados no Departamento de Ciências da Vida (DCV, FCT/UNL) sob a orientação da professora Isabel Sá Nogueira. Foram utilizadas 2 espécies bacterianas diferentes, uma para microrganismos gram-negativos (*Escherichia coli*) e outra para gram-positivos (*Staphylococcus aureus*). A quantidade utilizada no ensaio foi de 100 mg relativamente às amostras de Ag e HAp co-dopada, e 50 mg para as amostras de Zn. O procedimento do ensaio encontra-se no anexo 4.



### 3 Análise e Discussão de Resultados

Numa fase inicial, foi feita uma primeira análise a todas amostras sintetizadas (ver secção 2.2.) no que à citotoxicidade diz respeito. As amostras não citotóxicas (Ag = 0.5, 1, 2, 3 e 4 mol%; Zn = 0.5, 1 e 1.3 mol%; Ag/Zn = 2.0/0.5, 1.5/1 e 1.3/1.3 mol%) foram então amplamente caracterizadas do ponto de vista estrutural, físico-químico e biológico (actividade antibacteriana).

#### 3.1 Estudo de cristalização das amostras

Inicialmente foi realizado um estudo de DSC/TGA, onde foram analisadas as amostras de HAp e HAp dopadas com zinco. O objetivo foi descobrir a temperatura de cristalização do material. De referir que esta análise apenas foi realizada para as amostras dopadas com Zn, pois a utilização de amostras dopadas com Ag iria causar a contaminação dos cadinhos com que se efetuam estes ensaios. Contudo, é expetável que mudando o dopante não haja alteração nos resultados. Aliás, o que se observou é que a introdução do Zn não alterou significativamente a temperatura de cristalização da HAp. Não é expetável que a introdução de Ag na estrutura da HAp provoque efeitos diferentes dos observados para o Zn. Na Figura 3.1 encontra-se, a título de exemplo, o gráfico com o estudo realizado para a amostras de HAp. No anexo 5 encontram-se todos os termogramas obtidos para as amostras estudadas.

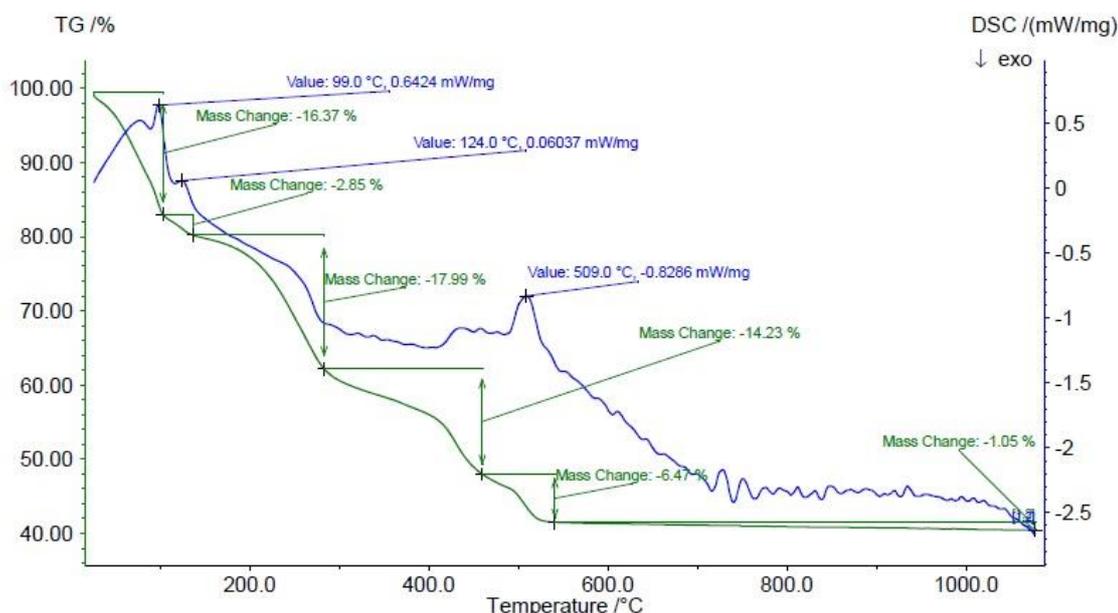


Figura 3.1 Termograma das amostras de HAp.

Ao analisarmos o gráfico, conclui-se que a cristalização da amostra de HAp ocorre para uma temperatura de 509°C. No caso das amostras dopadas com zinco as temperaturas de cristalização situam-se entre as temperaturas de 530°C e 538°C. Foram utilizadas diferentes temperaturas de sinterização, acima das temperaturas de cristalização obtidas, para ambos os materiais, de 600,

700 e 800°C. Os gráficos seguintes (Figuras 3.2 e 3.3) apresentam, a título de exemplo, os difratogramas das amostras que contêm 2 mol% de Ag (Ag2) e 1 mol% de Zn (Zn1), para as diferentes temperaturas de sinterização. As amostras de HAp não dopadas foram sinterizadas a 700°C. Os gráficos para as restantes concentrações molares encontram-se no anexo 6. Uma primeira análise dos difratogramas das amostras dopadas com Ag mostra claramente que para as temperaturas de sinterização estudadas estas amostras já são cristalinas.

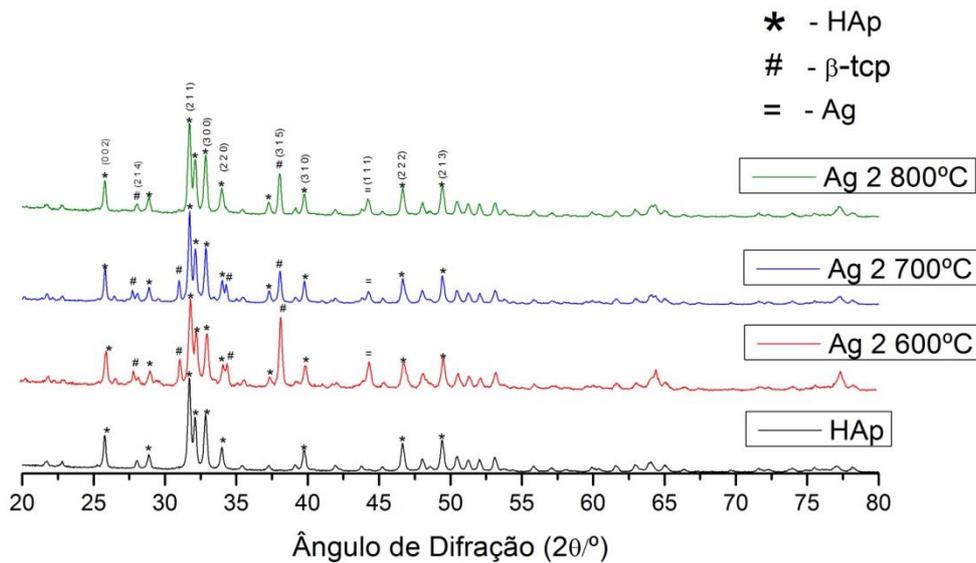


Figura 3.2 Difratogramas dos pós de HAp dopados com 2 mol% Ag (Ag2) sinterizados a diferentes temperaturas. Apresenta-se o difratograma da HAp não dopada para comparação.

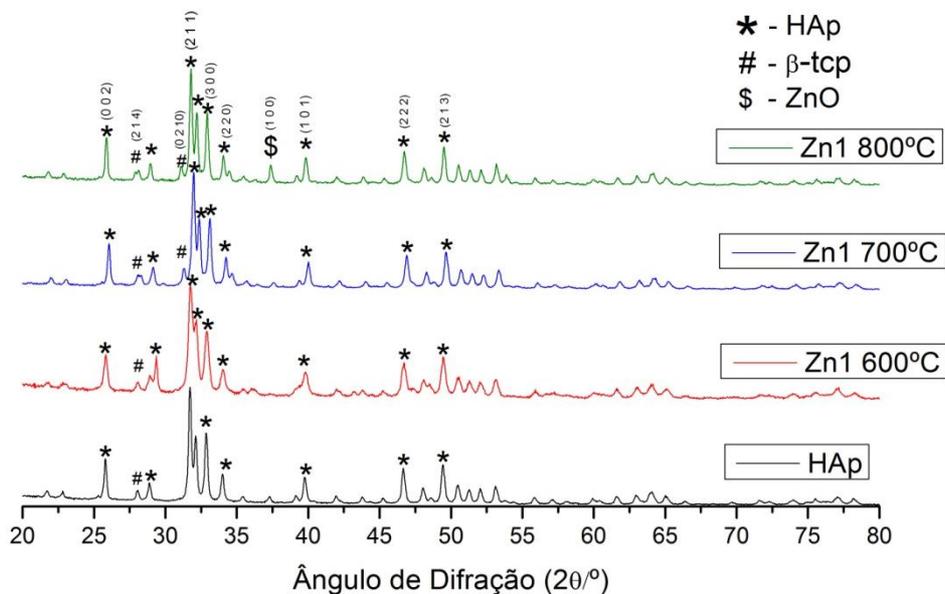


Figura 3.3 Difratogramas dos pós de HAp dopados com 1 mol% Zn (Zn1) sinterizados a diferentes temperaturas. Apresenta-se o difratograma da HAp não dopada para comparação.

Analisando os gráficos da Figura 3.2 e Figura 3.3, podemos observar o aparecimento de fases secundárias em ambos os casos. A fase de β-TCP surge a todas as temperaturas analisadas, sendo

que no caso dos 800°C se verifica um maior aparecimento da mesma (mais picos desta fase presentes no difractograma). Aliado a isso, o aparecimento de picos de Ag e ZnO, para as amostras de HAp dopadas com Ag e Zn, respectivamente, são outras das fases secundárias que aparecem com o aumento da temperatura.

Para complementar, foi calculado o grau de cristalinidade de forma a avaliar a melhor temperatura do tratamento térmico. Segundo Iconaru *et al.* e Chung *et al.*, o método sol-gel conduz a graus de cristalinidades relativamente elevados e superiores a métodos mais complexos de síntese de HAp, como o método de spray pirolise [35]–[37]. Devido à simplicidade do processo, e aos valores de cristalinidade obtidos com o mesmo, foi este o método escolhido para este trabalho. Pós de HAp sintetizados pelo método usado neste trabalho já foram estudados por Franco *et al.* e Fathi *et al.* tendo-se verificado que o grau de cristalinidade aumenta com o aumento de temperatura, no intervalo 600-800°C [33], [38]. Tal como verificado aqui, para as amostras dopadas com Ag e Zn, o aumento da temperatura de sinterização também conduz ao aparecimento de fases secundárias na HAp.

A equação seguinte foi a utilizada para o cálculo do grau de cristalinidade [38].

$$\chi_C = \frac{I_{(3\ 0\ 0)} - V_{(1\ 1\ 2)/(3\ 0\ 0)}}{I_{(3\ 0\ 0)}} \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde  $\chi_C$  é o grau de cristalinidade,  $I_{(3\ 0\ 0)}$  a intensidade do pico com índices de Miller (3 0 0) e  $V_{(1\ 1\ 2)/(3\ 0\ 0)}$  o valor da intensidade do vale entre os picos com índices de Miller (1 1 2) e (3 0 0).

Na Tabela 3.1, encontram-se os valores dos graus de cristalinidade referentes às amostras Ag2 e Zn1. Todos os restantes valores de grau de cristalinidade para as restantes amostras encontram-se no anexo 7.

Tabela 3.1 Valores do grau de cristalinidade para as amostras Ag2 e Zn1 a diferentes temperaturas de sinterização.

Amostra	Grau Cristalinidade (%)	Amostra	Grau Cristalinidade (%)
Ag2 600	69	Zn1 600	68
Ag2 700	80	Zn1 700	75
Ag2 800	84	Zn1 800	78

Ao analisarmos os valores referentes ao grau de cristalinidade presentes na tabela Tabela 3.1, é possível concluir que com o aumento da temperatura, existe um aumento do grau de cristalinidade, algo que era expectável tal como referido na literatura [39][38]. Os graus de cristalinidade a 700 e 800°C revelaram-se bastante similares. No entanto, pretende-se uma otimização entre o grau de cristalinidade e a presença de fases secundárias na estrutura das

amostras, nomeadamente  $\beta$ -TCP. A diferença dos valores do grau de cristalinidade entre 700 e 800°C não é suficientemente relevante, enquanto que o número de fases secundárias que surgem nos difratogramas das amostras analisadas para a temperatura de 800 °C é consideravelmente maior. Desta forma, verifica-se que 700°C é a temperatura mais indicada para todos os estudos subsequentes.

Após o estudo anterior procedeu-se à sinterização de todas as amostras, produzidas no âmbito deste trabalho, a 700°C.

### 3.2 Análise estrutural das amostras de HAp dopadas com prata ou zinco

Nas Figura 3.4 e Figura 3.5 encontram-se representados os conjuntos de difratogramas das amostras de HAp não dopada e HAp dopada com diferentes concentrações de Ag (0.5 (Ag0.5), 1 (Ag1), 2(Ag2), 3 (Ag3) e 4 mol% (Ag4)) e Zn (0.5 (Zn0.5), 1 (Zn1) e 1.3 mol% (Zn1.3)).

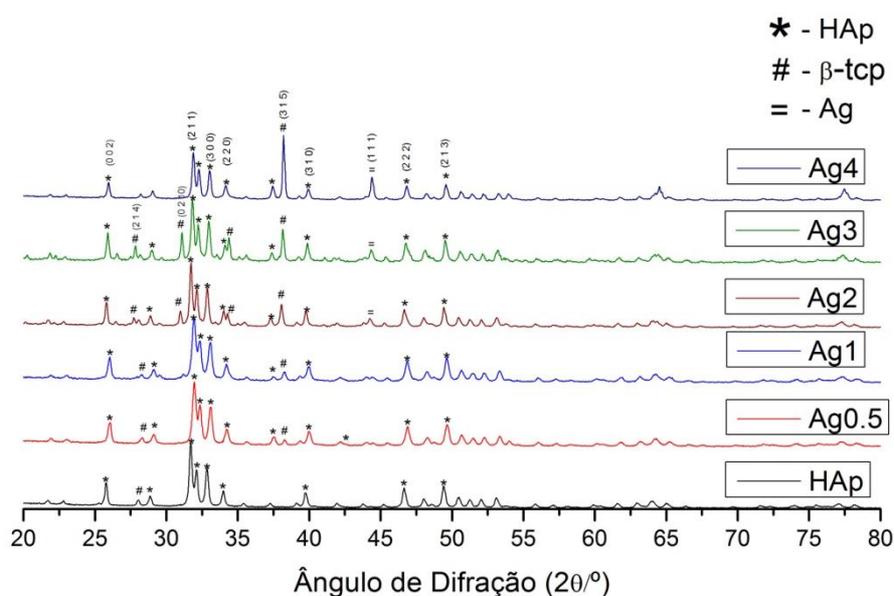


Figura 3.4 Difratogramas de amostras de HAp dopadas com diferentes concentrações molares de Ag (sem envelhecimento).

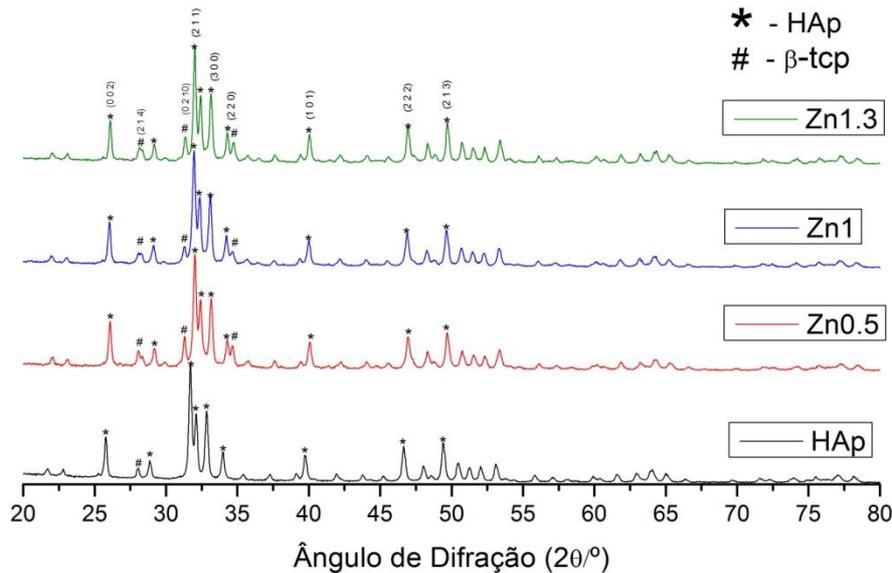


Figura 3.5 Difratogramas de amostras de HAp dopadas com diferentes concentrações molares de Zn. (sem envelhecimento).

Os picos assinalados referem-se às diferentes fases cristalinas encontradas nos difratogramas das amostras de HAp, HAp dopada com Ag e HAp dopada com Zn. A HAp é a fase predominante, existindo vários picos, tendo sido identificados segundo a ficha de difração da HAp, com o código 09-0432. A uma segunda fase cristalina,  $\beta$ -TCP que aparece no difratograma estão associados os picos a, aproximadamente,  $27.8^\circ$ ,  $34.4^\circ$  e  $37.8^\circ$ , sendo que o primeiro e terceiro picos vão aumentando de intensidade à medida que a concentração de Ag nas amostras vai aumentando. A formação de  $\beta$ -TCP deve-se à decomposição de HAp durante o processo de sinterização a  $700^\circ\text{C}$ . [38]

O pico a  $44.5^\circ$  corresponde à prata metálica, Ag, que aparece em amostras onde a concentração de Ag é superior a 2 mol% de Ag. Tal acontece devido ao excesso de quantidade de prata existente na amostra. Devido a tal, não é possível ocorrer a total substituição dos iões de cálcio pelos iões de prata, na estrutura de HAp. Desta forma, acaba por ocorrer a precipitação na forma de Ag metálica, originando o aparecimento do pico referido [2].

Em relação às amostras dopadas com Zn, os difratogramas estão apresentados na Figura 3.5. Tal como para as amostras dopadas com prata, a fase cristalina predominante é a HAp, como é possível visualizar nos picos assinalados na imagem. Como referido anteriormente, há também a presença da fase cristalina de  $\beta$ -TCP.

Após os resultados apresentados anteriormente, foi feita uma análise aos tempos de envelhecimento dos pós sintetizados.

Nas Figura 3.6 e Figura 3.7 apresentam-se, a título de exemplo, os difratogramas das amostras de HAp dopadas com Ag e Zn, mais concretamente as amostras Ag2 e Zn1, para vários tempos de envelhecimento. Como referido anteriormente, os tempos de envelhecimento foram 0,4, 24 e 48 horas.

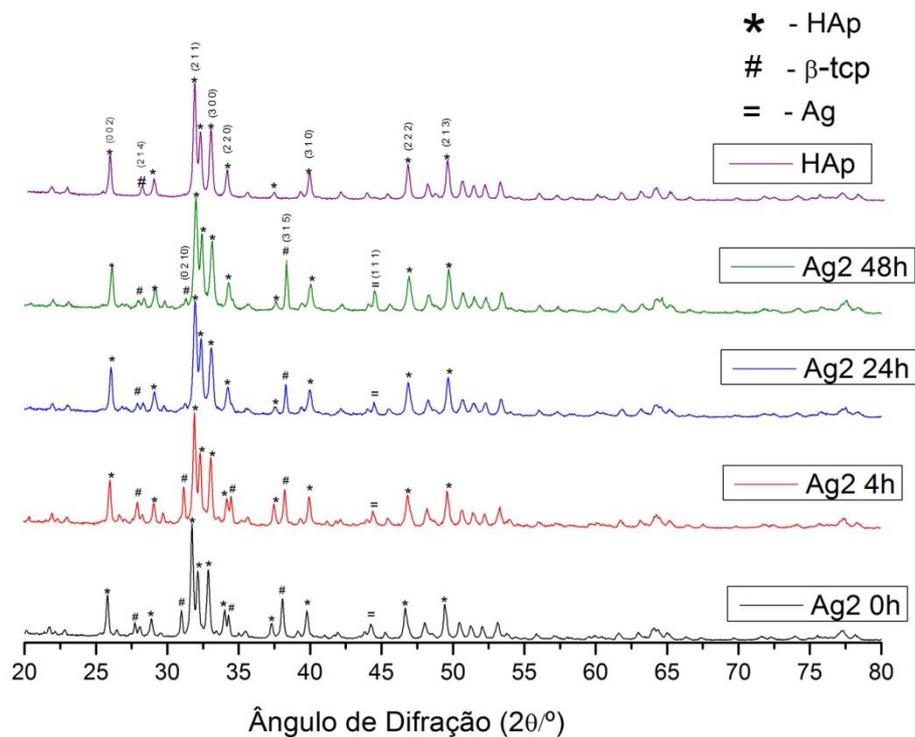


Figura 3.6 Difratomogramas da amostra Ag2 com diferentes tempos de envelhecimento. Todas as amostras foram sinterizadas a 700°C.

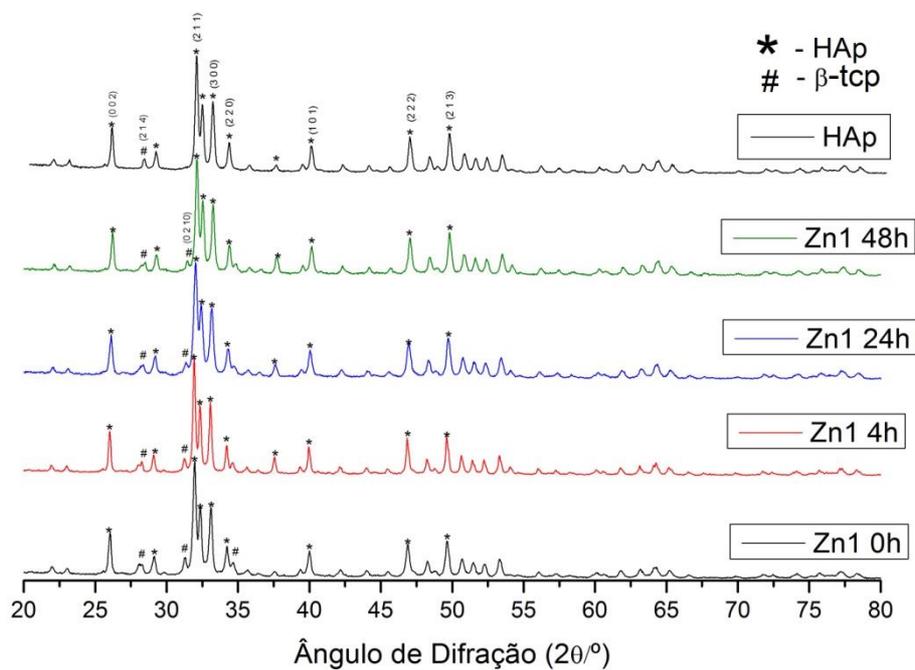


Figura 3.7 Difratomogramas da amostra Zn1 com diferentes tempos de envelhecimento. Todas as amostras foram sinterizadas a 700°C.

Com base na Figura 3.6, na Figura 3.7, e nas figuras do anexo 6, verifica-se que não existiram alterações significativas nos difratogramas das amostras com aumento do tempo de

envelhecimento, independentemente das concentrações de dopante. Foram calculados os parâmetros de rede  $a$  e  $c$ , para cada uma das concentrações estudadas e para os diferentes tempos de envelhecimento. Os valores obtidos foram calculados a partir da equação 3.2 [40].

$$\sin^2 \theta = \left(\frac{\lambda^2}{4}\right) \times \left(\frac{4}{3} \times \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2}\right) + \frac{l^2}{c^2}\right) \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde,  $\theta$  é o ângulo do pico utilizado,  $\lambda$  o comprimento de onda da radiação incidente (neste caso:  $\lambda = 1.5404$  nm),  $h$ ,  $k$  e  $l$  são os índices de Miller de cada pico utilizado e  $a$  e  $c$  são os parâmetros de rede obtidos.

Nos gráficos das Figura 3.8 e Figura 3.9 apresenta-se, a título de exemplo, a variação desses mesmos parâmetros com os diferentes tempos de envelhecimento, para as amostras Ag2 e Zn1. Na tabela do anexo 9 encontram-se todos os valores obtidos para as amostras sintetizadas neste trabalho. Å

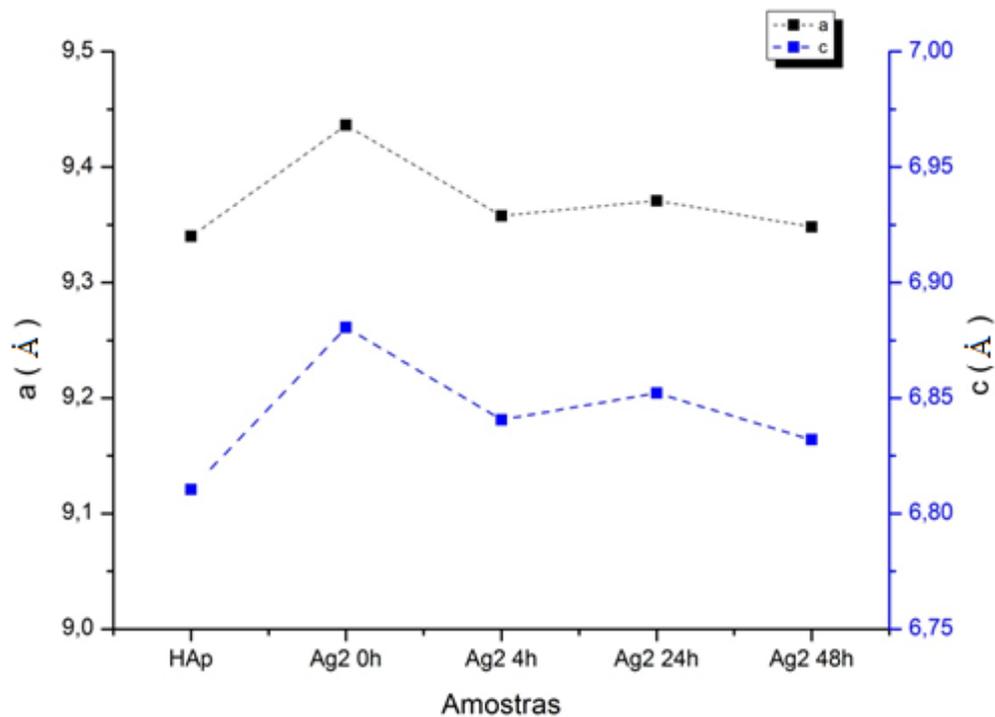


Figura 3.8 Evolução dos parâmetros de rede  $a$  e  $c$  com o tempo de envelhecimento da amostra Ag2.

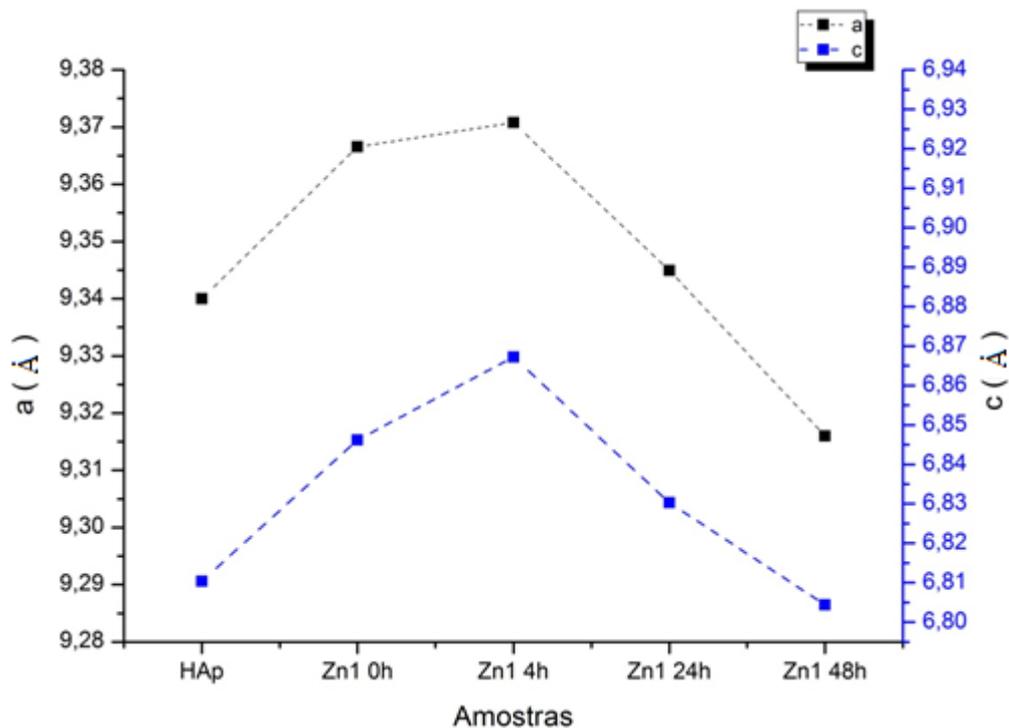


Figura 3.9 Evolução dos parâmetros de rede a e c com o tempo de envelhecimento da amostra Zn1.

A variação dos parâmetros a e c com o tempo de envelhecimento não é monotônica, tal como se pode observar pelos gráficos das Figura 3.8 e Figura 3.9 e pelos valores no anexo 9.

Foi possível calcular os valores de tamanho de cristalito de cada uma das amostras utilizando a equação 3.3 [38].

$$D_{hkl} = \frac{K \times \lambda}{\beta \cos \theta} \quad \text{Equação 3.3}$$

Onde,  $K$  é uma constante com valor igual a 0.9 e  $\lambda$  o comprimento de onda da radiação eletromagnética ( $\lambda = 0.15406$  nm para a radiação Cu K). O  $\beta$  é a largura do pico a meia altura (rad) e  $\theta$  o ângulo de difração. Os picos utilizados têm como índices de Miller (0 0 2) e (2 2 0), e encontram-se a  $2\theta \approx 26.00^\circ$  e  $34.30^\circ$ , respectivamente. Na tabela 3.2. apresentam-se, a título de exemplo, os valores do tamanho de cristalito das amostras Ag2 e Zn1 com diferentes tempos de envelhecimento. No anexo 8 encontra-se uma tabela com os valores calculados para todas as amostras sintetizadas.

Segundo a Tabela 3.2, observa-se um aumento do tamanho do cristalito com o aumento do tempo de envelhecimento, como podemos comprovar com a amostra de 2% de prata. Fathi *et al.* [38] referem o aumento do tamanho de cristalito com o aumento do tempo de envelhecimento.

Tabela 3.2 Valores de tamanho de cristalito para as amostras Ag2 e Zn1 para os picos (2 2 0) e (0 0 2).

<b>D</b>		
<b>Amostra</b>	<b>(2 2 0)</b>	<b>(0 0 2)</b>
<b>Ag2 0h</b>	26,800	36,880
<b>Ag2 4h</b>	30,787	37,065
<b>Ag2 24h</b>	28,370	37,065
<b>Ag2 48h</b>	32,901	38,835
<b>D</b>		
<b>Amostra</b>	<b>(2 2 0)</b>	<b>(0 0 2)</b>
<b>Zn1 0h</b>	29,364	34,847
<b>Zn1 4h</b>	35,548	39,785
<b>Zn1 24h</b>	31,136	40,370
<b>Zn1 48h</b>	30,795	35,458

No presente trabalho, não se verificou uma variação monotónica do tamanho de cristalito com o tempo de envelhecimento, tal como se pode ver pela análise dos dados apresentados na Tabela 3.2. A literatura refere como possível causa deste efeito a distribuição não homogénea do dopante na estrutura da HAp [21], [38]. Aquilo que é evidente dos resultados obtidos (Tabela 3.2 e anexo 8) é o maior valor do tamanho de cristalito segundo os planos (0 0 2), indicando um crescimento preferencial dos cristais segundo a direção do eixo a. Por outro lado, a variação dos valores dos parâmetros de rede com o tempo de envelhecimento não é significativa e, inclusive, praticamente não se verifica variação do volume da célula unitária (ver tabela do anexo 9). Desta forma, foi escolhido o tempo de 0h de envelhecimento para o resto do estudo.

A evolução dos valores dos parâmetros de rede com a concentração de dopante pode ser observada nas Figura 3.10 e Figura 3.11.

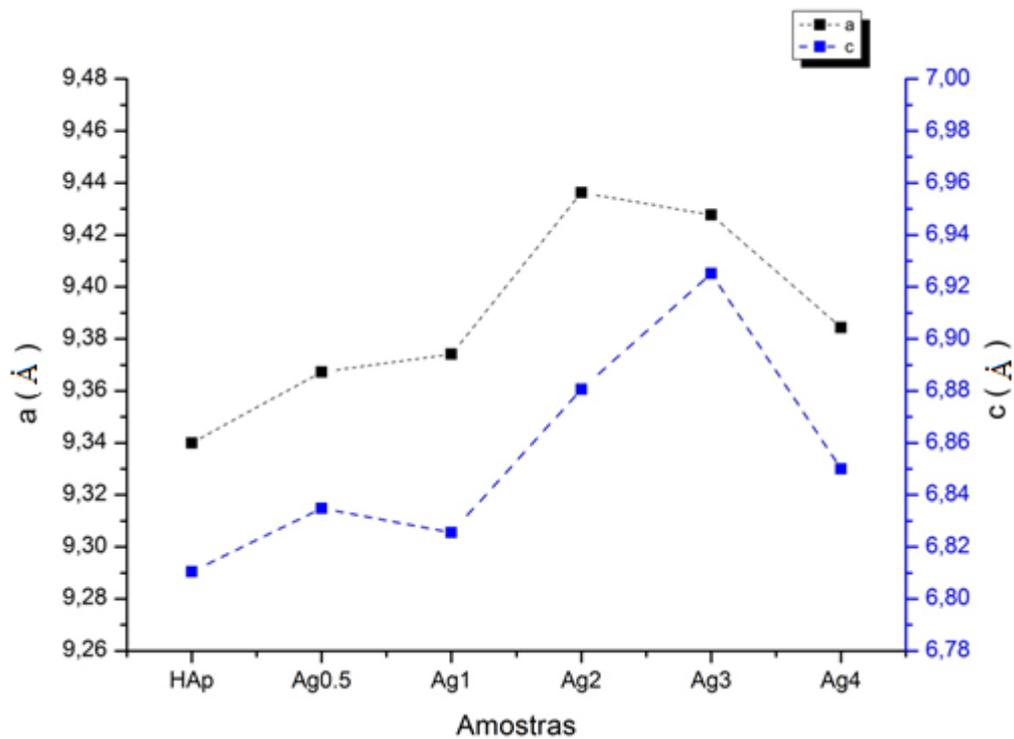


Figura 3.10 Evolução dos parâmetros de rede  $a$  e  $c$  com a concentração molar de prata.

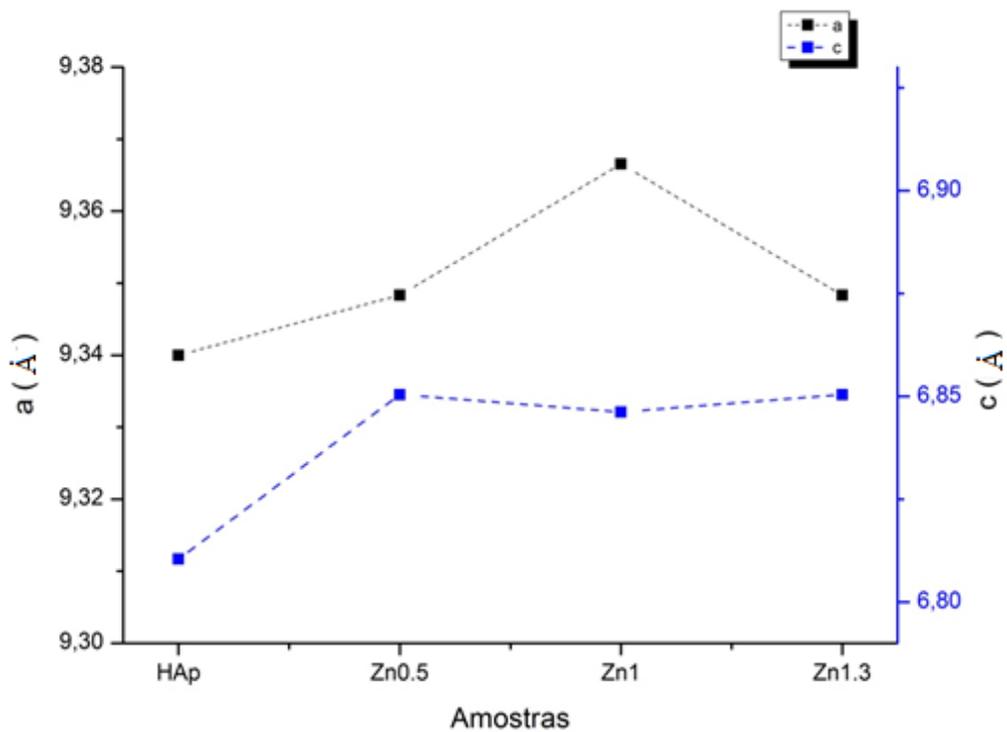


Figura 3.11 Evolução dos parâmetros de rede  $a$  e  $c$  com a concentração molar de zinco.

Em relação à prata, há um consenso na literatura, verificando-se que o aumento da substituição de cálcio por prata conduz ao aumento de ambos os parâmetros  $a$  e  $c$  [41], [42]. Tal deve-se ao facto de o ião  $\text{Ag}^+$  possuir um diâmetro superior ao do ião  $\text{Ca}^{2+}$ . No presente trabalho, a diminuição dos parâmetros  $a$  e  $c$  a partir de Ag2, inclusive, pode estar associado à precipitação

de prata metálica. Com o aumento de concentração de prata na amostra, vai ocorrer a não incorporação da mesma na estrutura de HAp, havendo um excesso [2]. A presença de prata metálica foi verificada nos difratogramas das amostras dopadas com 2% ou mais de Ag. Contudo, em relação ao Zn, não existe concordância entre os resultados apresentados na literatura: existem casos onde  $a$  aumenta e  $c$  diminui [40], [43] ou onde ambos os parâmetros aumentam ou diminuem simultaneamente [43]–[46]. A carbonatação da amostra é um dos fatores referidos para explicar a evolução dos parâmetros de rede nos dois últimos casos [43]. Conforme se pode verificar pela análise de FTIR (secção 3.3, página 21) as amostras produzidas neste trabalho são todas carbonatadas, o que pode explicar a evolução aleatória dos valores dos parâmetros de rede com a concentração de dopante. Contudo, os valores obtidos para os parâmetros de rede encontram-se na mesma ordem de grandeza que os reportados na literatura [24]. O parâmetro  $a$  é, para qualquer condição (concentração molar e tempo de envelhecimento), superior ao parâmetro  $c$ , indicando que os cristais de HAp são achatados, tal como está expresso na Figura 3.12.

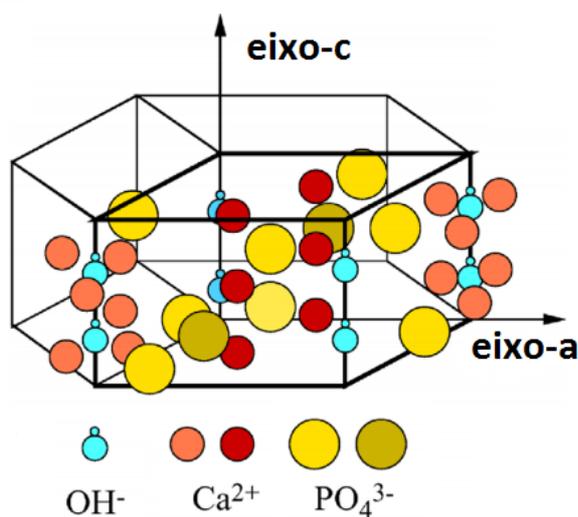


Figura 3.12 Representação do cristal de HAp alongado, segundo o eixo- $a$ . (adaptado de [47]).

Contudo, tal como acontece com o tempo de envelhecimento, a variação dos parâmetros de rede com a concentração de dopante não é significativa. De igual forma não se verifica variação apreciável do volume da célula unitária com o aumento da concentração de dopante.

### 3.3 Análise estrutural das amostras de hidroxiapatite co-dopadas

Tendo em conta os resultados obtidos com todas as análises efetuadas, foram criadas 3 amostras de HAp co-dopadas com Ag e Zn, para diferentes concentrações de ambos os dopantes. Como referido anteriormente, a Mistura 1 foi dopada com 2 mol% de Ag e 0.5 mol% de Zn, a mistura 2 com 1.5 mol% Ag e 1 mol% Zn e finalmente a mistura 3 com 1.3 mol% de Ag e Zn. Foi utilizada

uma temperatura de sinterização de 700°C, temperatura estudada que se provou ser ideal, e um tempo de envelhecimento de 0 horas para todas as amostras.

Inicialmente, foram analisados os difratogramas das 3 amostras, encontrando-se os mesmos na Figura 3.13.

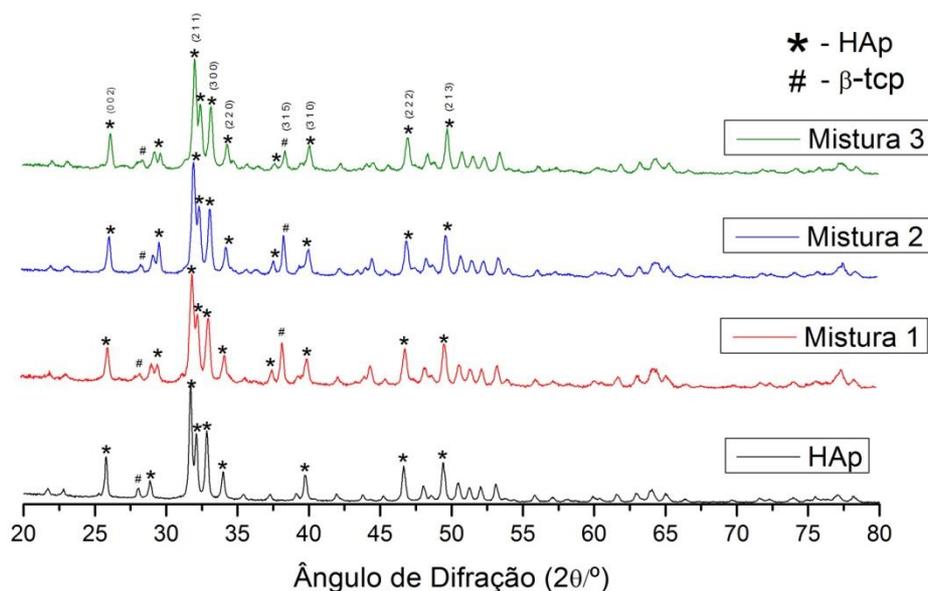


Figura 3.13 Difratograma de DRX com as várias amostras de HAp co-dopadas.

Analisando a Figura 3.13, a fase cristalina predominante é a HAp, como é possível visualizar nos vários picos assinalados na figura. Os difratogramas apresentados são na generalidade muito semelhantes aos apresentados pelas amostras dopadas apenas com um dos íons metálicos, sendo também o  $\beta$ -TCP a fase secundária presente em todas as misturas estudadas.

Após a análise dos difratogramas das 3 amostras, foi calculado o grau de cristalinidade, tendo sido utilizada a equação 3.1, referida anteriormente.

Tabela 3.3 Valores dos graus de cristalinidade para as amostras de HAp co-dopadas.

Amostras	Grau Cristalinidade (%)
HAp	82
M1	70
M2	73
M3	70

Os valores obtidos são bastante semelhantes entre as 3 misturas, não existindo uma grande diferença em relação aos obtidos comparativamente às amostras de HAp dopadas com Ag ou Zn.

Seguidamente, estão apresentados na Tabela 3.4 os parâmetros de rede para as 3 misturas.

Tabela 3.4 Valores dos parâmetros de rede *a* e *c* para as amostras de HAp co-dopadas.

Amostra	a (nm)	c (nm)
HAp	9,340	6,810
M1	9,344	6,810
M2	9,340	6,789
M3	9,332	6,835

De acordo com a tabela acima, é possível concluir que os parâmetros *a* e *c* obtidos possuem a mesma ordem de grandeza, embora inferiores, comparando com o estudo de Samani *et al.* [24]. Contudo, este estudo foi realizado com o objetivo de revestir peças metálicas, não tendo sido efetuado um estudo sistemático dos pós e da produção dos mesmos, ao contrário deste trabalho, sendo algo que se justifica. As amostras utilizadas foram co-dopadas com uma única composição de Zn [24].

### 3.4 Análise Físico-química dos pós sintetizados

A análise de FTIR, tem como objetivo fundamental identificar os grupos funcionais característicos das amostras produzidas. Na Tabela 3.5 indicam-se os números de onda correspondentes às vibrações observadas em FTIR dos grupos funcionais presentes na HAp.

Tabela 3.5 Modos de vibração FTIR identificados para HAp [33].

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais	
450	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - Deformação simétrica.	Reflexões indicam reordenamento dos poliedros de PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> na estrutura do cristal. Esta tripla degeneração indica a presença de fase apatítica.
550,570 e 600	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - Deformação angular assimétrica.	
1000	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - Deformação simétrica.	
1100	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - Deformação assimétrica.	
1380	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - Stretching N-O do NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .	
630 e 3570	OH <sup>-</sup> da HAp - Bandas características da estrutura apatítica, stretching de um grupo livre OH.	
870, 1430 e 1460	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> - Bandas que sugerem a carbonatação da HAp do tipo B.	
880, 1457 e 1550	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> - Bandas que sugerem a carbonatação da HAp do tipo A.	
3300 a 3800	OH <sup>-</sup> - Deformação simétrica do OH.	

Na Figura 3.14 encontramos os espectros resultantes de FTIR em absorvância para as amostras de HAp dopadas com Ag, Zn e co-dopadas com Ag e Zn, sinterizadas a 700°C e com um tempo de envelhecimento de 0 horas.

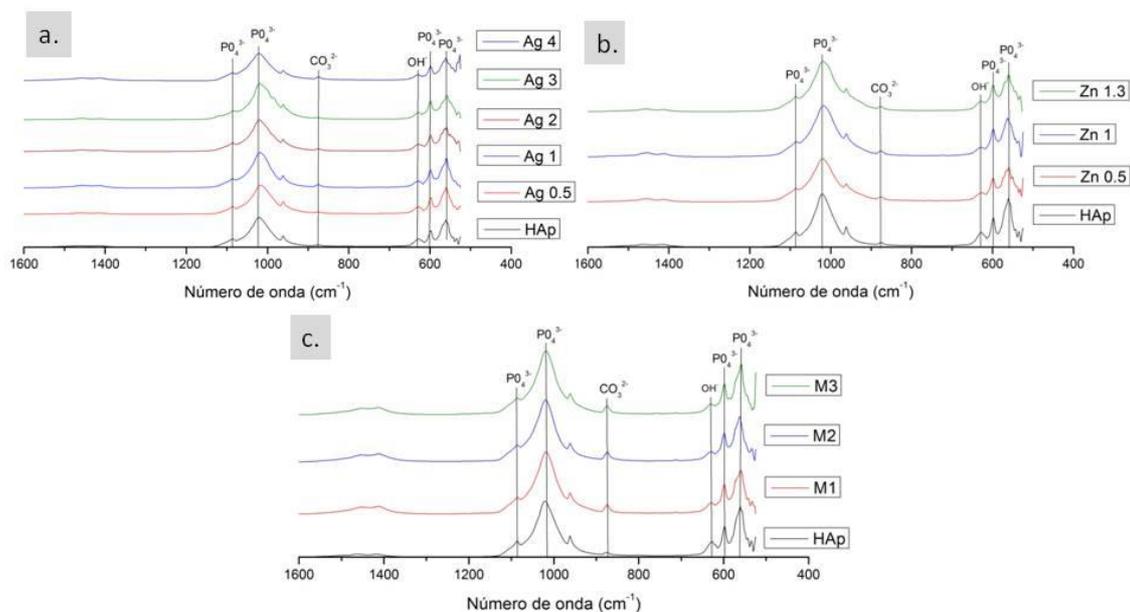


Figura 3.14 Espectros de FTIR das amostras de HAp dopadas com Ag, Zn e co-dopadas.

As bandas a 560, 600, 1020 e 1086  $\text{cm}^{-1}$  são características dos grupos funcionais  $\text{PO}_4^{3-}$ . Desta forma, é possível mostrar a presença da fase apatítica nas amostras analisadas, como seria expectável. Seguidamente, a banda a 630  $\text{cm}^{-1}$  comprova a existência de grupos hidroxilo, característicos da HAp. Por fim, a banda que aparece a 875  $\text{cm}^{-1}$  sugere a existência de uma HAp carbonatada. Contudo, não é conclusivo o tipo de carbonatação apresentada, podendo ser do tipo A, tipo B ou tipo A-B, com base na Tabela 3.5. As substituições do tipo A ocorrem quando os grupos OH são substituídos pelos grupos carbonatos e as substituições do tipo B são caracterizadas por carbonatos que ocupam o lugar de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  [33].

### 3.5 Análise da citotoxicidade das amostras sintetizadas

A análise da citotoxicidade tem como objetivo perceber se o material promove ou não a morte celular. Isto significa que com os resultados obtidos irá ser possível determinar se o material analisado pode estar em contacto com o organismo, não afetando o mesmo negativamente, ou seja, determinar se o material é ou não biocompatível. Na Figura 3.15 encontra-se o gráfico onde estão presentes os resultados obtidos da análise às amostras de HAp dopadas com Ag, para diferentes concentrações de material em contacto com meio biológico. A primeira medida - C0 - corresponde à concentração máxima de HAp em meio, ou seja, 50  $\text{mg/mL}$ , C0/2 a uma redução para metade e assim sucessivamente. Foram ainda calculados o desvio padrão e incertezas, para cada concentração, que se encontram no anexo 10.

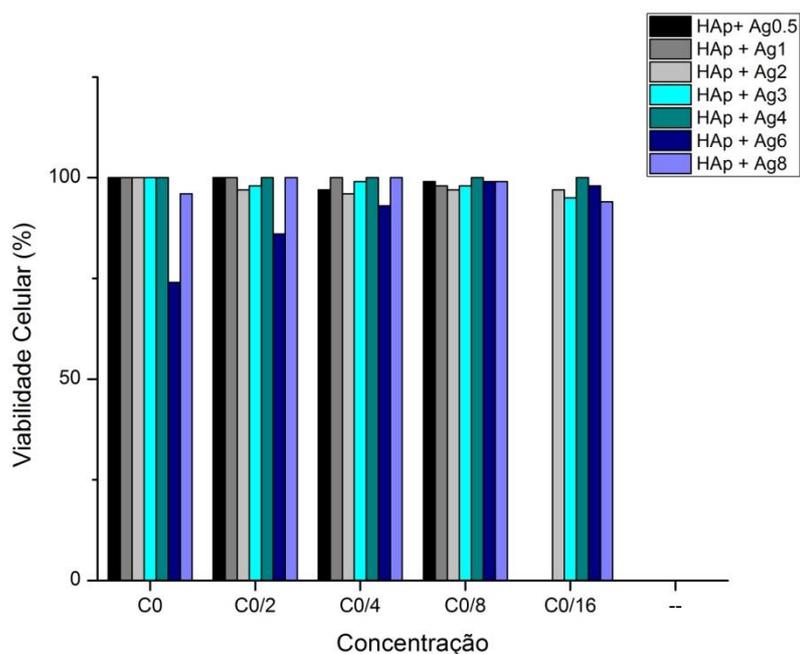


Figura 3.15 Viabilidade celular de células Vero com extratos de HAp dopada com Ag para cada concentração.

Os valores obtidos para a concentração inicial, C0, serviram de base para a seleção de amostras a utilizar em estudos posteriormente efetuados, sendo apenas selecionadas as amostras não citotóxicas. Ao analisarmos o gráfico é possível observar que para C0, todas as amostras possuem um valor de viabilidade celular de 100%, excetuando as amostras de HAp dopadas com 6 e 8%. Estas últimas revelaram-se então levemente citotóxicas ao contrário das restantes, que não são citotóxicas. A citotoxicidade evidenciada pelas amostras com uma concentração mais elevada de prata (6% e 8%) deve-se a uma possível saturação de prata no decorrer da reação. Os íons de prata vão sendo incorporados na estrutura cristalina de HAp, substituindo os íons de cálcio. Contudo, com o aumento de concentração de prata, é atingido o ponto de saturação, a partir do qual já não se consegue substituir mais íons  $Ca^{2+}$  por íons  $Ag^+$ . Desta forma, os íons  $Ag^+$  em excesso acabam por precipitar na forma de prata metálica e óxidos de prata. Com a análise de difratogramas de DRX feitos posteriormente, foi possível comprovar este fenómeno, podendo ser observados picos dessas fases. Tendo em conta a toxicidade da prata, e a presença de tais picos para concentrações mais altas de pó, pode levar aos resultados obtidos nesta análise de citotoxicidade.

Na Figura 3.16, encontra-se o gráfico referente à análise da citotoxicidade das amostras de HAp dopadas com Zn, para diferentes concentrações.

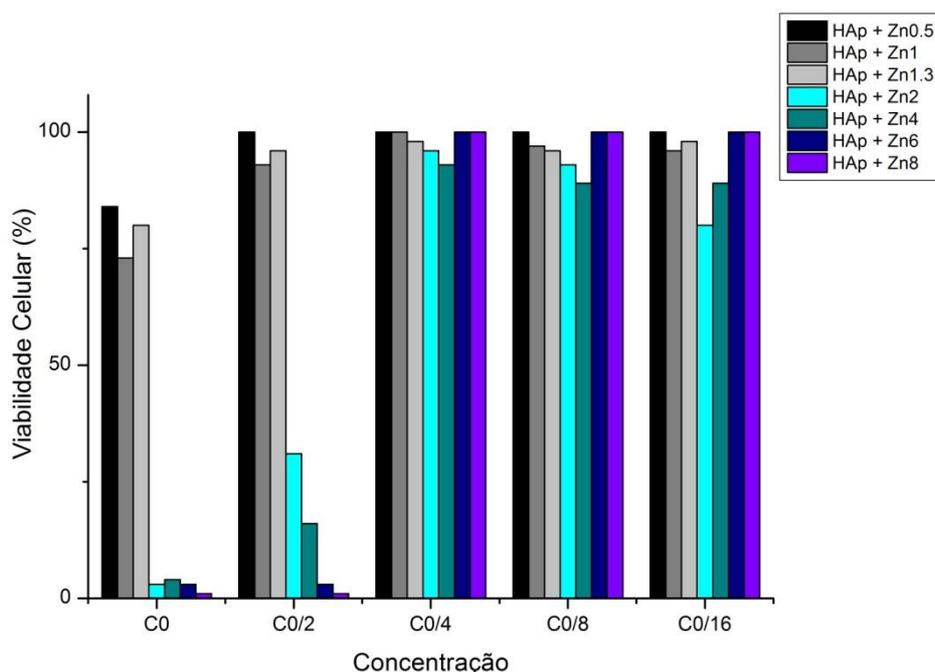


Figura 3.16 Gráfico de barras da análise citotóxica das amostras de HAp dopada com Zn para cada concentração.

Analisando a Figura 3.16, podemos confirmar que as amostras Zn2, Zn4, Zn6 e Zn8 são altamente citotóxicas, possuindo uma viabilidade celular abaixo dos 5%, não sendo por isso escolha válidas para análises posteriores. Quanto às amostras restantes, Zn0.5, Zn1 e Zn1.3, para a concentração inicial C0, apresentam uma viabilidade celular que ronda os 75%, sendo por isso levemente citotóxicas. Segundo a literatura, uma das possíveis razões para a citotoxicidade evidenciada pelas amostras dopadas com Zn pode estar associada à presença intracelular deste ião. Para além disso, estes fatores estão também relacionados com a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS). Os ROS são compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigénio molecular (O<sub>2</sub>) ou derivados dos produtos da redução [48], [49]. Os valores obtidos revelam que as amostras dopadas com zinco só poderão ser usadas em aplicações biomédicas em concentrações inferiores a 12,5 mg/mL (C0/4).

Por fim, na Figura 3.17 está o gráfico com as amostras de HAp co-dopadas:

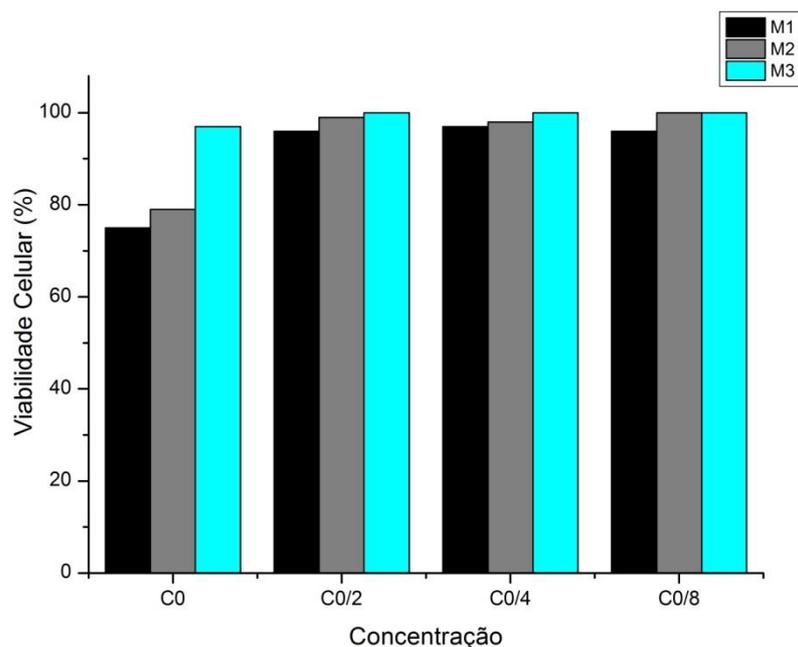


Figura 3.17 Gráfico de barras da análise citotóxica das amostras de HAp co-dopada para cada concentração.

Ao observarmos a Figura 3.17, podemos constatar que existe uma diferença entre as 3 amostras, no que toca à sua citotoxicidade. A Mistura 3 é amostra com melhor resultado (97%), para a concentração inicial C0, sendo esta a mistura com menor concentração molar de Ag (1.3%) e maior concentração molar de Zn (1.3%) das 3 amostras. É possível detetar um aumento da viabilidade celular com a diminuição da concentração de Ag e aumento da concentração de Zn, sendo a amostra M1 (com 2 mol% de prata) a amostra com menor viabilidade celular. Utilizando uma concentração mais baixa, concluímos que o valor da viabilidade celular sobe, aproximando-se dos 100 %, tornando as amostras não citotóxicas. Desta forma, qualquer HAp co-dopada pode ser usada em aplicações biomédicas em concentrações inferiores a 25 mg/mL (C0/2).

### 3.6 Análise da actividade antibacteriana das amostras sintetizadas

Como referido anteriormente, foram utilizadas 2 espécies de microorganismos diferentes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, que representam as bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente. Os ensaios foram realizados para HAp, HAp dopada com diferentes concentrações de Ag (0,5, 1 e 3%), Zinco (0,5 e 1,3%) e HAp co-dopada. Para a análise da actividade antibacteriana foram usados os pós sintetizados, em concentrações no meio de cultura onde não se verificou efeito citotóxico.

No gráfico da Figura 3.18, podemos observar as unidades formadoras de colónias por mililitro (CFU/mL) relativamente às amostras dopadas com diferentes concentrações de prata, para ambas as colónias de microorganismos.

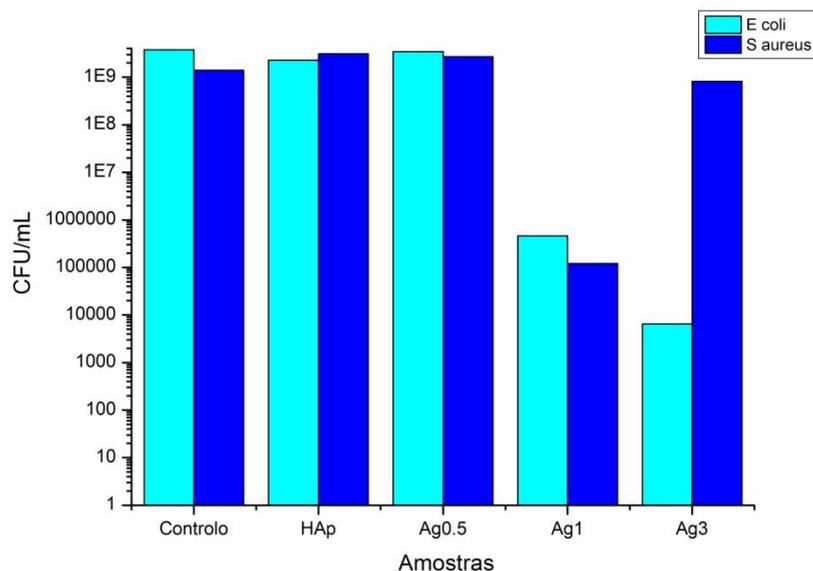


Figura 3.18 Unidades formadoras de colónias de amostras de HAp dopadas com Ag, expostas a *E. coli* e *S. aureus*.

Ao analisarmos a Figura 3.18 podemos concluir que a Ag apresenta resultados para a actividade antibacteriana bastante significativos, principalmente, para bactérias Gram-. No caso da *E. coli*, é possível notar um decréscimo de várias ordens de grandeza dos CFU por mL com o aumento da concentração molar de Ag. Sendo a *E. coli* uma bactéria Gram-, o efeito antibacteriano da prata vai ser superior ao efeito sobre uma bactéria Gram+ neste caso a *S. aureus*. Existem pequenas diferenças morfológicas entre ambas, nomeadamente no seu carácter estrutural. As proteínas presentes na parede celular das bactérias gram-positivas, principalmente peptidoglicano, tornam as mesmas muito mais densas, sendo por isso mais difíceis de penetrar por parte dos iões Ag [50]. Por isso, o comportamento antibacteriano de Ag em relação à *S. aureus* é muito mais irregular e, mesmo com a execução de vários ensaios, não foi possível chegar a uma conclusão quanto ao efeito da prata sobre esta bactéria.

Em relação às amostras de Zn, podemos observar os resultados na Figura 3.19.

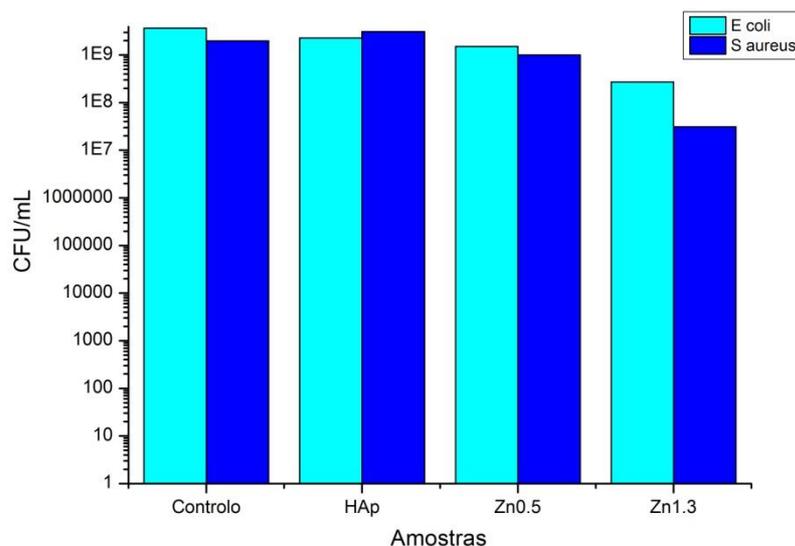


Figura 3.19 Unidades formadoras de colónias de amostras de HAp dopadas com Zn, expostas a *E. coli* e *S. aureus*.

Na Figura 3.19, observamos a análise à actividade antibacteriana feita para as amostras de HAp e HAp dopadas com diferentes concentrações molares de Zn. Soderberg *et al.* relatou que os iões  $Zn^{2+}$  têm mais influência sobre as bactérias gram-positivas, comprovando a actividade antibacteriana que o Zn possui [51]. Analisando o gráfico, podemos confirmar o que foi dito por Soderberg, existindo uma diminuição dos CFU/mL para a estirpe da *S. aureus* mais significativa que para a estirpe da *E. coli*, para as amostras Zn0.5 e Zn1.3. Esta última, amostra com maior concentração molar de Zn desta análise, tem uma diminuição de 2 ordens de grandeza em comparação com o controlo e com a amostra Zn0.5, para a *S. aureus*. Para a *E. coli* a diminuição é menor (1 ordem de grandeza, aproximadamente). Podemos então considerar estas amostras antibacterianas.

Por fim, na Figura 3.20, estão demonstrados os resultados das 3 amostras de HAp co-dopadas:

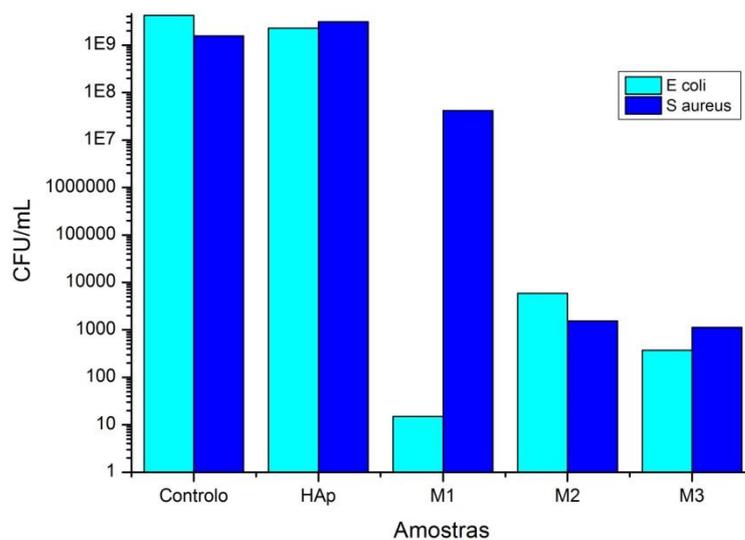


Figura 3.20 Gráfico de barras da análise à actividade antibacteriana das amostras de HAp co-dopadas.

A actividade antibacteriana, quer da prata, quer do zinco, está relacionada com a libertação dos seus iões, daí ser possível assumir que ambos os iões podem trabalhar em conjunto, promovendo um efeito ainda maior do que individualmente. Esta interação entre ambos pode ser denominada por sinergia [24]. É possível concluir que a utilização de ambos os iões confere ótimas características antibacterianas. Analisando a amostra M1 (2mol% Ag, 0.5mol% Zn), é possível observar uma diferença na casa das 8 ordens de grandeza, para o caso da *E. coli*, obtendo um resultado bastante mais positivo que o obtido nas amostras dopadas apenas com Ag. Quanto às amostras M2 e M3, é possível comprovar a sinergia que existe entre os iões de Ag e Zn, pois o número de CFU que existe por mL é bastante menor que os valores do controlo, da amostra de HAp não dopada e ainda que os valores de CFU obtidos nas análises feitas às amostras dopadas quer com Ag ou Zn. Existe uma diminuição de 5 a 6 ordens de grandeza, correspondendo a um efeito antibacteriano evidente. Ainda assim, comparando ambas as amostras, a amostra M3 (1.3 mol% Ag, 1.3 mol% Zn) é a que obtém um melhor resultado. Enquanto que para as bactérias Gram+, os resultados são bastante idênticos aos obtidos para a amostra M2, para as Gram- há uma diminuição de 2 ordens de grandeza. Com estes valores obtidos, foi possível primeiramente concluir que a junção de ambos os iões foi bastante favorável, melhorando bastante os resultados já obtidos anteriormente.

## 4 Conclusões e perspectivas futuras

A presente dissertação teve como objetivo a produção e caracterização de pós de HAp dopada com Ag, Zn e Ag/Zn, estudando o efeito antibacteriano das mesmas. Para tal foi utilizada uma proporção molar de  $(Ca + Dopante)/P=1.67$ , tendo sido feita produção dos pós pelo método de sol-gel.

Iniciou-se o trabalho produzindo pós de HAp dopada com diferentes concentrações molares de Ag (0.5, 1, 2, 3, 4, 6 e 8 mol%) e Zn (0.5, 1, 1.3, 2, 4, 6 e 8 mol%) e co-dopagem de ambos os dopantes (2 mol% Ag e 0.5 mol% Zn, 1.5 mol% Ag e 1 mol% Zn, 1.3 mol% de Ag e Zn). Foi realizado um ensaio de DSC/TGA às amostras dopadas com Zn de maneira a conhecer-se a temperatura de cristalização das amostras produzidas, concluindo-se que variava entre os 509 e 538 °C. Tais valores indicaram que a presença do dopante não alterava a temperatura de cristalização da HAp. Deste modo, foram escolhidas temperaturas de sinterização superiores às descritas anteriormente.

Pela análise de DRX efetuada aos pós sinterizados a diferentes temperaturas (600,700 e 800°C), para além da fase principal (HAp), foi possível detetar a presença de fases secundárias (maioritariamente  $\beta$ -TCP), existindo um efeito da temperatura na presença da mesma. A 800°C, o número de picos representativos da fase secundária no difractograma aumenta. Aliado a isso, o aparecimento de picos de Ag e ZnO, para as amostras de HAp dopadas com Ag e Zn, respectivamente, são outras das fases secundárias que aparecem com o aumento da temperatura. Conclui-se ainda que, calculando o grau de cristalinidade das amostras, que o aumento da temperatura faz aumentar o grau de cristalinidade. Comparando os valores apresentados pelas amostras sinterizadas a 700 e 800°C, conclui-se que 700°C é a temperatura ideal, aliando os valores de cristalinidade bastante positivos à menor presença de fases secundárias na sua estrutura cristalina.

Utilizando a temperatura de 700°C, foi feita uma análise de DRX às amostras, variando as concentrações molares de cada um dos dopantes. Os difratogramas revelaram novamente a presença de  $\beta$ -TCP, devendo-se à decomposição de HAp durante o processo de sinterização. Para concentrações molares superiores a 2%, surgiram picos de prata metálica. Conclui-se que tal aconteceu devido ao excesso de quantidade de prata existente na amostra. A substituição de iões de cálcio por iões de prata na estrutura de HAp não ocorre na totalidade, originando precipitação na forma de Ag metálica, e por consequência, a formação do respetivo pico. No caso das amostras dopadas com Zn, os difratogramas revelaram resultados idênticos, sendo a HAp a fase cristalina predominante, e a existência da fase cristalina de  $\beta$ -TCP.

Analisando os tempos de envelhecimento dos pós sintetizados, não foram reveladas alterações significativas na estrutura cristalina das amostras, independentemente do aumento do tempo de envelhecimento ou da concentração da amostra. Com o cálculo dos parâmetros de rede a e c,

conclui-se que a variação dos mesmos com o tempo de envelhecimento não é monotónica, mas o volume celular praticamente não varia. Desta forma, foi escolhido o tempo de 0h de envelhecimento para a continuação do estudo. Os resultados obtidos para o tamanho de cristalito revelaram valores superiores segundo o plano (0 0 2) indicando um crescimento dos cristais segundo a direção do eixo a.

Analisando os parâmetros de rede para diferentes concentrações molares de dopante, verificou-se que para percentagens maiores que 2 mol% de Ag, existe a presença de prata metálica. Quanto às amostras dopadas com zinco, os difratogramas apresentam-se idênticos aos da HAp. Os valores dos parâmetros de rede variam, relativamente à HAp, e encontram-se concordantes com a literatura, sendo o parâmetro a maior que o parâmetro c em qualquer condição (seja variação da concentração molar ou do tempo de envelhecimento), indicando mais uma vez que os cristais da HAp são achatados. Da mesma maneira, não se verificam variações significativas do volume celular com o aumento de concentração de dopante.

A análise de FTIR revelou a existência de grupos funcionais  $\text{PO}_4^{3-}$ , nas bandas a 560, 600, 1020 e  $1086\text{ cm}^{-1}$ , confirmando a existência de fase apatítica nas amostras produzidas. Na banda a  $630\text{ cm}^{-1}$ , há a presença de grupos hidroxilo, característicos da HAp. Por fim, a banda a  $875\text{ cm}^{-1}$  evidencia a presença de HAp carbonatada, não sendo conclusivo o tipo de carbonatação apresentado (tipo A, tipo B ou tipo A-B)

Prosseguiu-se o estudo com ensaios de citotoxicidade e atividade antibacteriana. Os ensaios de citotoxicidade, para as amostras dopadas com prata até uma concentração de 4 mol%, resultaram numa total ausência de citotoxicidade para todas as concentrações analisadas (sendo a mais alta de 50 mg de amostra por mililitro de meio). Quanto às amostras de Zn, mesmo para as percentagens mais baixas de dopante e que foram analisadas com mais detalhe, houve uma citotoxicidade associada à concentração inicial do ensaio, revelando-se como amostras ligeiramente citotóxicas. Contudo, para concentrações de 25 mg de amostra por mililitro e inferiores, as amostras dopadas com zinco apresentam-se como não citotóxicas. Deste modo, para as concentrações referidas anteriormente, as amostras são assim biocompatíveis.

Quanto às análises da actividade antibacteriana, a prata apresentou uma actividade antibacteriana bastante significativa, principalmente para bactérias Gram- (*E. coli*), resultando num decréscimo de várias ordens de grandeza em relação ao controlo e à HAp não dopada. O Zn possui uma maior influencia sobre as bactérias Gram+ (*S. aureus*), traduzindo-se numa redução de 2 ordens de grandeza no número de unidades formadoras de colónias. Podemos considerar ambas as amostras antibacterianas.

Quanto as amostras co-dopadas, revelaram difratogramas muito semelhantes às amostras dopadas com Ag ou Zn, apresentando um grau de cristalinidade bastante significativo (70-75%), possuindo parâmetros de rede da mesma ordem de grandeza que os apresentados anteriormente. Qualquer HAp co-dopada pode ser usada em aplicações biomédicas em concentrações inferiores

a 25 mg/mL (C0/2), já que nesse caso não apresentam citotoxicidade. Nas amostras co-dopadas verificou-se uma atividade antibacteriana resultante de uma sinergia entre os iões  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , concluindo que a junção de ambos os iões foi bastante favorável, reduzindo significativamente o número de colónias em relação às amostras iniciais.

Concluimos então que a Mistura 3 (com 1.3 mol% de Ag e Zn) foi a que apresentou os resultados mais satisfatórios, não evidenciando qualquer alteração química e estrutural em relação à HAp não dopada e, em termos antibacterianos, a que apresentou maior eficiência.

Futuramente, a compreensão do mecanismo de ação que conduz à actividade antibacteriana, causando a morte das bactérias, será de extrema importância para que se possa assim aperfeiçoar a produção do material. Analisar as espécies oxidativas, testar outras combinações de amostras co-dopadas, por exemplo Ag/Cu, são possibilidades de trabalho futuro a desenvolver.



## Referências

- [1] A. Szcześ, L. Hołysz, and E. Chibowski, "Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 249, pp. 321–330, 2017.
- [2] J. Kolmas, E. Groszyk, and D. Kwiatkowska-Rózycka, "Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.
- [3] N. Koju, P. Sikder, Y. Ren, H. Zhou, and S. B. Bhaduri, "Biomimetic coating technology for orthopedic implants," *Curr. Opin. Chem. Eng.*, vol. 15, pp. 49–55, 2017.
- [4] S. L. Aktug, I. Kutbay, and M. Usta, "Characterization and formation of bioactive hydroxyapatite coating on commercially pure zirconium by micro arc oxidation," *J. Alloys Compd.*, vol. 695, pp. 998–1004, 2017.
- [5] J.-H. Zeng *et al.*, "Scaffolds for the repair of bone defects in clinical studies: a systematic review," *J. Orthop. Surg. Res.*, vol. 13, no. 1, p. 33, 2018.
- [6] K. Szurkowska, A. Laskus, and J. Kolmas, "Hydroxyapatite-Based Materials for Potential Use in Bone Tissue Infections," *Hydroxyapatite - Adv. Compos. Nanomater. Biomed. Appl. Its Technol. Facet.*, 2018.
- [7] S. Pierre, D. Thomas, and T. Henri, "Long- term implant survival and success: a 10–16-year follow- up of non- submerged dental implants," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 21, no. 7, pp. 772–777, Apr. 2010.
- [8] ALBREKTSSON and T., "Consensus report of session IV," *Proceeding 1st Eur. Work. Periodontol.*, pp. 365–369, 1985.
- [9] J. Lindhe and J. Meyle, "Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 35, no. SUPPL. 8, pp. 282–285, 2008.
- [10] N. U. Zitzmann and T. Berglundh, "Definition and prevalence of peri-implant diseases," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 35, no. SUPPL. 8, pp. 286–291, 2008.
- [11] C. G., L. Å., R. P., and D. G., "Clinical and microbiological characteristics of peri-implantitis cases: a retrospective multicentre study," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 23, no. 9, pp. 1045–1054, Aug. 2012.
- [12] S. G. E., F. M. M., L. N. P., and P. G. Rutger, "One- year bacterial colonization patterns of Staphylococcus aureus and other bacteria at implants and adjacent teeth," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 19, no. 3, pp. 242–248, Jan. 2008.
- [13] M. A., O. M. A. C., S. E., and L. N. P., "The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants," *Oral Microbiol. Immunol.*, vol. 2, no. 4, pp. 145–151, Dec. 2007.
- [14] G. A. Alcoforado, T. E. Rams, D. Feik, and J. Slots, "Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans," *J. Parodontol.*, vol. 10, no. 1, pp. 11–18, 1991.
- [15] V. Mehrotra, S. Mehrotra, V. Kirar, R. Shyam, and K. Misra, "Antioxidant and antimicrobial activities of aqueous extract of Withania somnifera against methicillin-resistant Staphylococcus aureus," *J. Microbiol. Biotechnol. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 40–45, 2011.
- [16] M. Augthun and G. Conrads, *Microbial Findings of Deep Peri-implant Bone Defects*, vol. 12. 1997.
- [17] J. M. Salcetti, *The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant* /. 2018.
- [18] 1992 Park, Joon e Lakes, Roderic. 1992. Biomaterials: An introduction. s.l. : Birkhäuser and P. 120-130., "No Title."
- [19] A. Fihri, C. Len, R. S. Varma, and A. Solhy, *Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis*, vol. 347. 2017.
- [20] "Bone Biology And Mechanics LAB At IUPUI." [Online]. Available:

<http://www.iupui.edu/~bbml/boneintro.html>.

- [21] M. Šupová, "Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 8, pp. 9203–9231, Sep. 2015.
- [22] J. T. B. Ratnayake, M. Mucalo, and G. J. Dias, "Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 105, no. 5, pp. 1285–1299, 2017.
- [23] J. W. Choi *et al.*, "Effect of Ag-Doped Hydroxyapatite as a Bone Filler for Inflamed Bone Defects," *Key Eng. Mater.*, vol. 254–256, no. 3, pp. 47–50, 2004.
- [24] S. Samani, S. M. Hossainipour, M. Tamizifar, and H. R. Rezaie, "In vitro antibacterial evaluation of sol-gel-derived Zn-, Ag-, and (Zn + Ag)-doped hydroxyapatite coatings against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, no. 1, pp. 222–230, 2013.
- [25] N. Silvestry Rodriguez, E. Sicairos-Ruelas, C. Gerba, and K. Bright, "Silver as a disinfectant," *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 191, no. February, pp. 23–45, 2007.
- [26] R. C. Selahattin Atmaca, Kadriil Gul, "The effect of zinc on microbial growth," *J. iMedical Sci.*, vol. 28, pp. 595–597, 1998.
- [27] S. Miao *et al.*, "Sol-gel preparation of Zn-doped fluoridated hydroxyapatite films," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 198, no. 1–3 SPEC. ISS., pp. 223–226, 2005.
- [28] U. Anjaneyulu, B. Priyadarshini, A. Nirmala Grace, and U. Vijayalakshmi, "Fabrication and characterization of Ag doped hydroxyapatite-polyvinyl alcohol composite nanofibers and its in vitro biological evaluations for bone tissue engineering applications," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 81, no. 3, pp. 750–761, 2017.
- [29] C. L. Popa *et al.*, "Influence of Thermal Treatment on the Antimicrobial Activity of Silver-Doped Biological Apatite," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2015.
- [30] C. S. Ciobanu, S. L. Iconaru, P. Le Coustumer, and D. Predoi, "Vibrational investigations of silver-doped hydroxyapatite with antibacterial properties," *J. Spectrosc.*, vol. 1, no. 1, pp. 2–7, 2013.
- [31] F. J. Martínez-Vázquez, M. V. Cabañas, J. L. Paris, D. Lozano, and M. Vallet-Regí, "Fabrication of novel Si-doped hydroxyapatite/gelatine scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 15, no. 2015, pp. 200–209, 2015.
- [32] E. Landi, G. Logroscino, L. Proietti, A. Tampieri, M. Sandri, and S. Sprio, "Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: From synthesis to in vivo behaviour," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 1, pp. 239–247, 2008.
- [33] P. Q. Franco, J. Silva, and J. P. Borges, "Produção de Fibras de Hidroxiapatite por Electrofição," *Ciência Tecnol. dos Mater.*, vol. 22, no. 1/2, pp. 57–64, 2010.
- [34] D. M. Liu, T. Troczynski, and W. J. Tseng, "Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: Process development," *Biomaterials*, vol. 22, no. 13, pp. 1721–1730, 2001.
- [35] S. L. Iconaru, P. Chapon, P. Le Coustumer, and D. Predoi, "Antimicrobial activity of thin solid films of silver doped hydroxyapatite prepared by sol-gel method," *Sci. World J.*, vol. 2014, 2014.
- [36] R. J. Chung, M. F. Hsieh, K. C. Huang, L. H. Perng, F. I. Chou, and T. S. Chin, "Anti-microbial hydroxyapatite particles synthesized by a sol-gel route," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 33, no. 2, pp. 229–239, 2005.
- [37] M. Honda *et al.*, "In vitro and in vivo antimicrobial properties of silver-containing hydroxyapatite prepared via ultrasonic spray pyrolysis route," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 8, pp. 5008–5018, 2013.
- [38] M. H. Fathi, A. Hanifi, and V. Mortazavi, "Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 202, no. 1–3, pp. 536–542, 2008.

- [39] Y. X. Pang and X. Bao, "Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 23, no. 10, pp. 1697–1704, 2003.
- [40] F. Miyaji, Y. Kono, and Y. Suyama, "Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite," *Mater. Res. Bull.*, vol. 40, no. 2, pp. 209–220, 2005.
- [41] R. N., S. K. T.S., P. T.G., S. V.S., M. K.V.G.K., and P. R. K., "Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 80A, no. 3, pp. 581–591, Jan. 2007.
- [42] V. Stanić *et al.*, "Synthesis of antimicrobial monophase silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 9, pp. 4510–4518, 2011.
- [43] G. S. Kumar, A. Thamizhavel, Y. Yokogawa, S. N. Kalkura, and E. K. Girija, "Synthesis, characterization and in vitro studies of zinc and carbonate co-substituted nano-hydroxyapatite for biomedical applications," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 134, no. 2–3, pp. 1127–1135, 2012.
- [44] R. Z. LeGeros and J. P. LeGeros, "DENSE HYDROXYAPATITE," in *An Introduction to Bioceramics*, vol. Volume 1, WORLD SCIENTIFIC, 1993, pp. 139–180.
- [45] M. Li, X. Xiao, R. Liu, C. Chen, and L. Huang, "Structural characterization of zinc-substituted hydroxyapatite prepared by hydrothermal method," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 797–803, 2008.
- [46] F. Ren, R. Xin, X. Ge, and Y. Leng, "Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 8, pp. 3141–3149, 2009.
- [47] H. Akazawa and Y. Ueno, "Distinct crystallinity and orientations of hydroxyapatite thin films deposited on C- and A-plane sapphire substrates," *J. Cryst. Growth*, vol. 404, pp. 241–245, 2014.
- [48] C. Shen, S. A. James, M. D. De jonge, T. W. Turney, P. F. A. Wright, and B. N. Feltis, "Relating cytotoxicity, zinc ions, and reactive oxygen in ZnO nanoparticle-exposed human immune cells," *Toxicol. Sci.*, vol. 136, no. 1, pp. 120–130, 2013.
- [49] K. H. Müller *et al.*, "PH-dependent toxicity of high aspect ratio ZnO nanowires in macrophages due to intracellular dissolution," *ACS Nano*, vol. 4, no. 11, pp. 6767–6779, 2010.
- [50] G. Chen *et al.*, "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 662–668, 2000.
- [51] T. A. Söderberg, B. Sunzel, S. Holm, T. Elmros, G. Hallmans, and S. Sjöberg, "Antibacterial effect of zinc oxide in vitro," *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.*, vol. 24, no. 3, pp. 193–197, 1990.
- [52] J. H. Kim, S. H. Kim, H. K. Kim, T. Akaike, and S. C. Kim, "Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 62, no. 4, pp. 600–612, 2002.

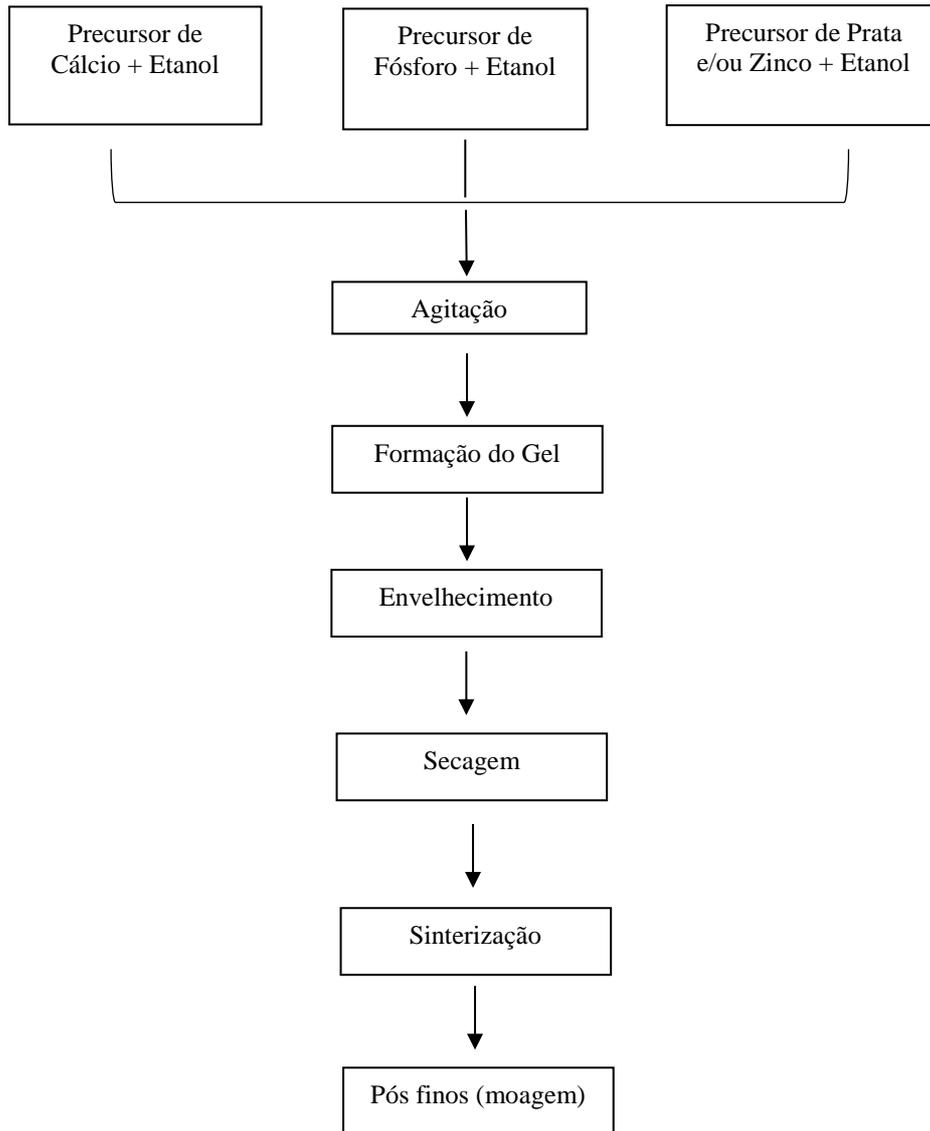


## Anexos

### Anexo 1. Percentagem molar e massas dos constituintes

Nome Amostra	Ca		P		Ag		Zn			
	% molar	Massa precursor (g)								
<b>Ag 0.5</b>	62	7.810	37.5	1.42	0.5	0.043	-	-		
<b>Ag 1</b>	61.5	7.750			1	0.083	-	-		
<b>Ag 2</b>	60.5	7.637			2	0.180	-	-		
<b>Ag 3</b>	59.5	7.511			33	0.272	-	-		
<b>Ag 4</b>	58.5	7.382			44	0.364	-	-		
<b>Ag 6</b>	56.5	7.132			46	0.544	-	-		
<b>Ag 8</b>	54.5	6.877			88	0.727	-	-		
<b>Zn 0.5</b>	62	7.830			-	-	0.5	0.08		
<b>Zn 1</b>	61.5	7.760			-	-	1	0.159		
<b>Zn 1.3</b>	61.2	7.730			-	-	1.3	0.207		
<b>Zn 2</b>	60.5	7.640			-	-	2	0.315		
<b>Zn 4</b>	58.5	7.385			-	-	4	0.637		
<b>Zn 6</b>	56.5	7.134			-	-	6	0.952		
<b>Zn 8</b>	54.5	6.879			-	-	8	1.273		
<b>Mistura 1</b>	60	7.569			-	-	2.045	0.186	0.455	0.080
<b>Mistura 2</b>					-	-	1.55	0.140	1.00	0.159
<b>Mistura 3</b>			-	-	1.27	0.116	1.27	0.202		

## Anexo 2. Processo de Sol-gel



### Anexo 3. Procedimento para avaliação da citotoxicidade

A amostra de pós foi inicialmente suspensa em 2 mL de meio de cultura. Para a obtenção do substrato, a suspensão foi colocada a agitar numa incubadora durante 24 horas a 37°C. Para a preparação da sementeira, foram colocados em cada um dos poços da microplaca 100 µL de meio com células [cerca de 25 mil células/cm<sup>2</sup>). A placa foi de seguida colocada na incubadora a 37°C com uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Posteriormente, retirou-se da incubadora a placa e o meio em contato com a amostra. O meio em contato com a amostra foi então colocado num microtubo (1 mL) e retirado o meio das células de cada um dos poços. De notar que a placa usada contém 8 linhas de poços (a primeira corresponde a uma concentração C<sub>0</sub> ou seja, uma concentração mais alta de pó, a segunda C<sub>0</sub>/2, correspondente a uma dissolução para metade e assim sucessivamente). Cada concentração foi replicada 5 vezes. Na mesma placa foi também realizado o controlo positivo (C+) onde foram adicionados 10 µL de DMSO, composto extremamente citotóxico, e no controlo negativo (C-) não se realizou qualquer alteração do meio. Colocou-se por fim a placa de novo na incubadora durante 48 horas. Para a análise da viabilidade celular foi usada a resazurina. Após as 48 horas na incubadora, a placa foi retirada e o meio contido em cada poço foi também removido. De seguida foi colocado em cada poço uma solução de 90% de meio completo e 10% de resazurina. A análise da viabilidade consiste numa mudança de coloração da solução (caso hajam células vivas a solução torna-se rosa, caso contrário fica azul). A placa foi então colocada na incubadora durante 4 horas. Após esse período, foram medidas as absorvâncias de cada poço (a 570 nm e a 600 nm) num leitor de microplacas Biotek ELX800.

Para os cálculos da viabilidade celular, controlo de meio e incertezas foram inicialmente feitas as médias das 5 réplicas para cada poço e foram usadas as seguintes expressões:

$$\text{Controlo Meio} = \text{"Média}_i\text{"} - \text{"Média CM"} \quad \text{Equação 6.1}$$

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{"Controlo Meio}_i\text{"}}{(\text{"Média C-"} - \text{"Média CM"})} \quad \text{Equação 6.2}$$

$$\text{Incerteza} = \sqrt{\sigma^2 + \sigma_{CM}^2} \quad \text{Equação 6.3}$$

onde  $\sigma$  representa o desvio padrão para cada uma das concentrações usadas e  $\sigma_{CM}$  o desvio padrão do controlo do meio. Para analisar a viabilidade celular é preciso ter em conta quatro denominações consoante a percentagem de viabilidade que se obtém e são elas: viabilidade superior a 90% o material é não citotóxico; com viabilidade celular entre os 80% e 89% considera-se levemente citotóxico; entre os 50 % e 79 % é moderadamente citotóxico; caso seja inferior a 50 % é severamente citotóxico.

## Anexo 4. Procedimento geral do ensaio de actividade antibacteriana

### Dia 0:

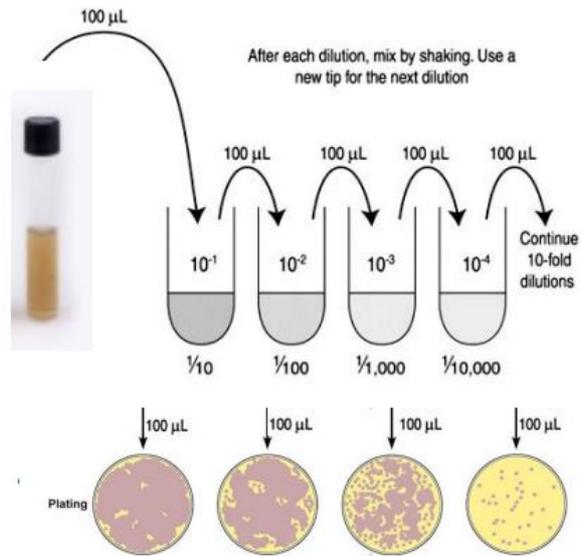
- Passo 1: utilizando uma placa de Petri, que contém uma colónia de microrganismos (*Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus*), inoculando a mesma com 4 mL de LB.
- Passo 2: incubar os tubos na estufa a 37°C, com agitação, durante aproximadamente 15 horas;

### Dia1:

- Passo 1: adicionar o material a ser testado (50-100 mg) a um tubo de vidro contendo 2 mL de LB esterilizado;
- Passo 2: inocular cada tubo com  $10^4$  CFU do microorganismo apropriado;
- Passo 3: incubar a 37 °C com agitação durante exatamente 24 horas.

### Dia 2:

- Passo 1: retirar os tubos da estufa e deixá-los a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas, de maneira ao material sedimentar;
- Passo 2: preparar tubos de microcentrifugação esterilizados contendo 1.5 mL num suporte. Identificar cada um dos tubos com a diluição respetiva;
- Passo 3: usando a micropipeta, dispensar 900 µL de uma solução tampão (sais SP1X) para cada um dos tubos identificados;
- Passo 4: usando a micropipeta, transferir 100 µL da suspensão sujeita ao ensaio para o primeiro tubo da diluição, e misturar. Esta é a primeira diluição de 1:10;
- Passo 5: com uma nova ponta, usar a micropipeta para realizar a segunda diluição de 1:10;
- Passo 6: continuar a série de diluições de 1:10, até ao último tubo ( $10^{-7}$ );
- Passo 7: usar a micropipeta para transferir 100 µL de cada diluição utilizada para cada placa com o meio, 2 placas por cada diluição;
- Passo 8: usar as contas de vidro estéril de maneira a espalhar o inóculo sobre o meio de ágar;
- Passo 9: inverter as placas e incubar durante a noite a 37°C.

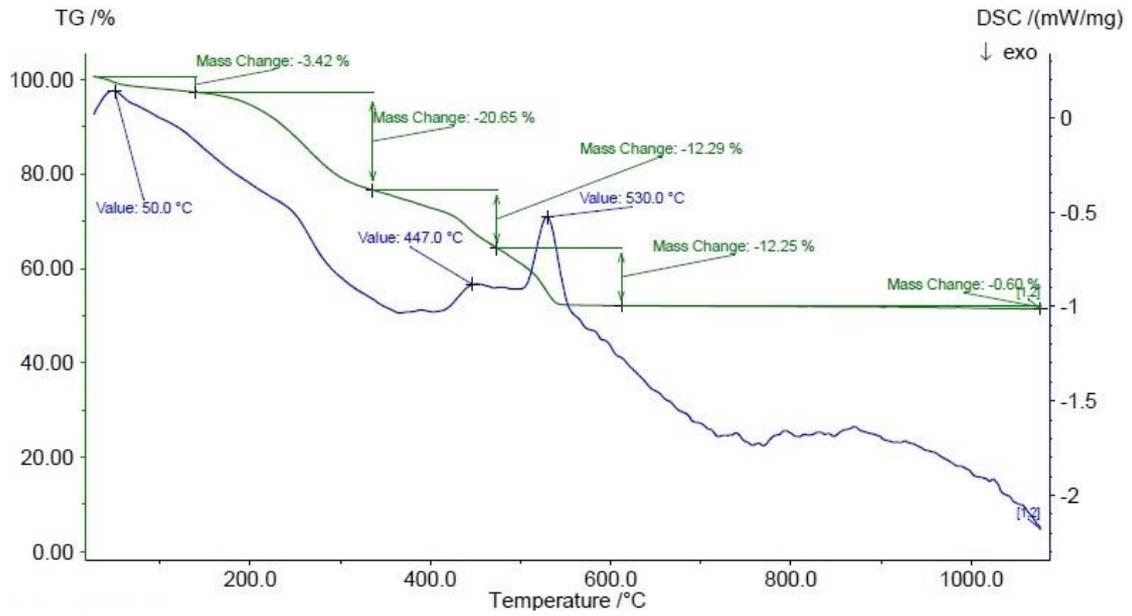


### Dia 3:

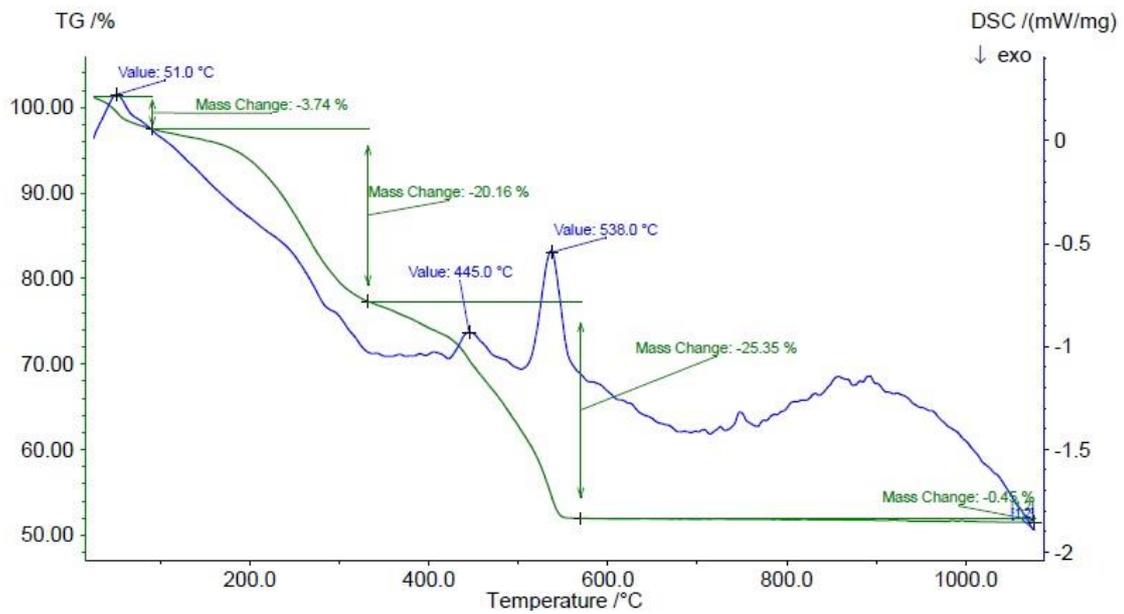
- Passo 1: registrar o número de colónias (CFU) em cada placa;
- Passo 2: determinar o número de CFU's por mL =  $n^{\circ} \text{colónias} \times \frac{1}{0.1 \text{ mL}} \times \frac{1}{\text{diluição}}$ .

## Anexo 5. Termogramas DSC/TGA

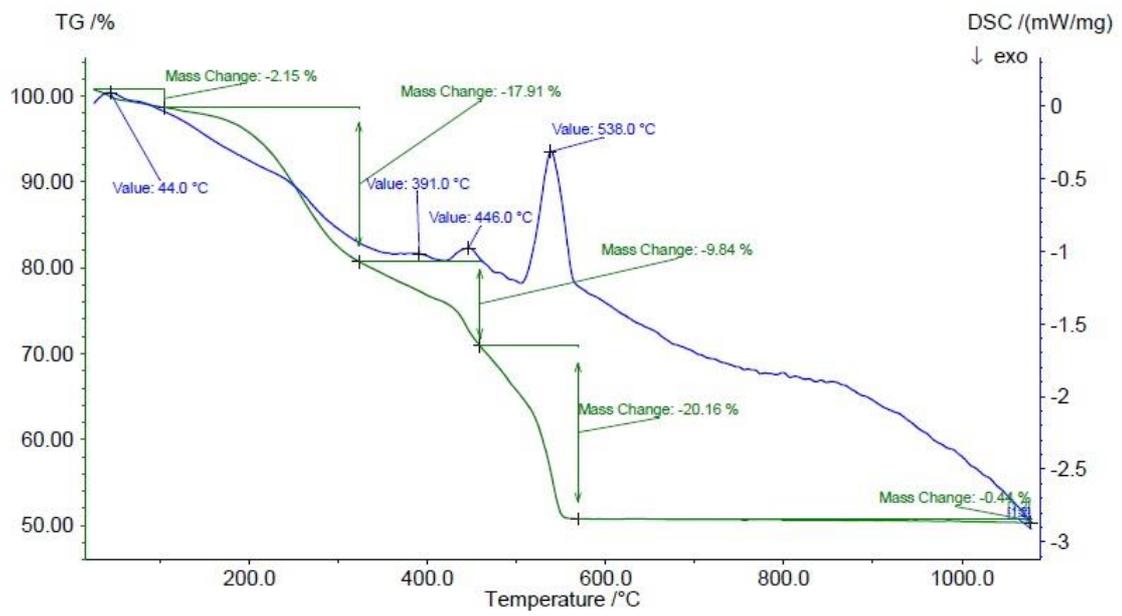
### . Amostra Zn0.5



### . Amostra Zn1

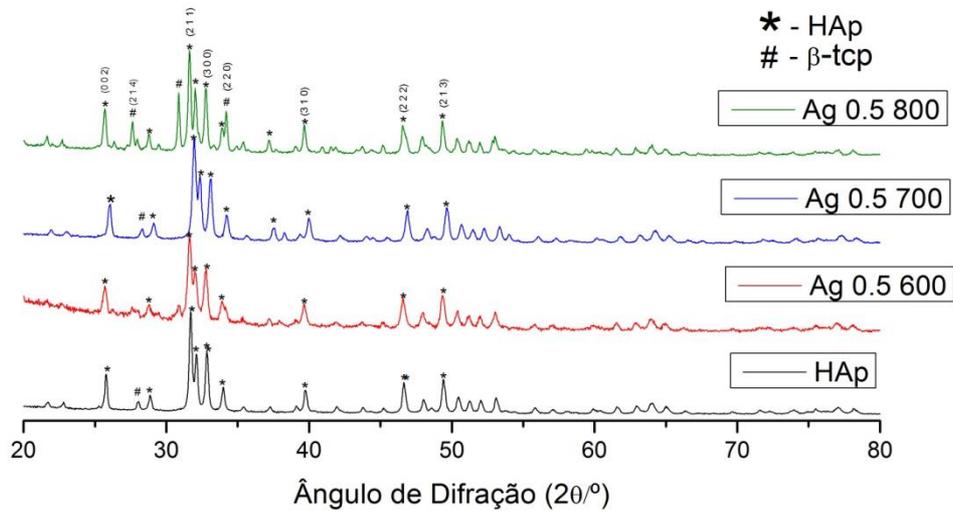


. Amostra Zn1.3

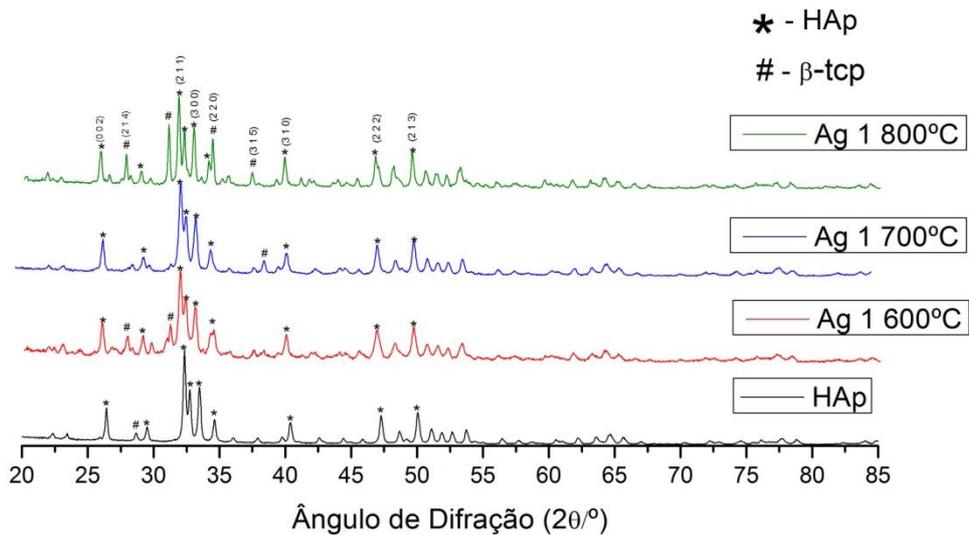


## Anexo 6. Difratogramas das amostras estudadas

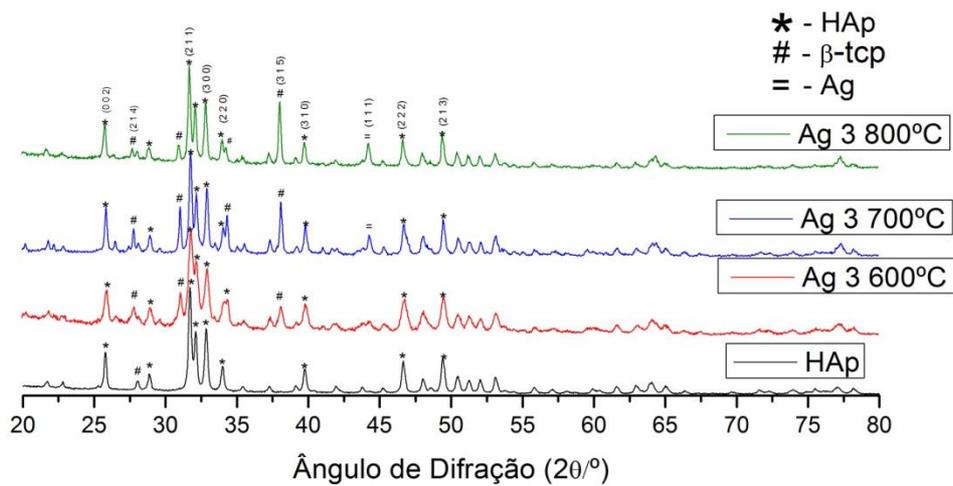
### . Amostras dopadas com Ag (influência da temperatura)



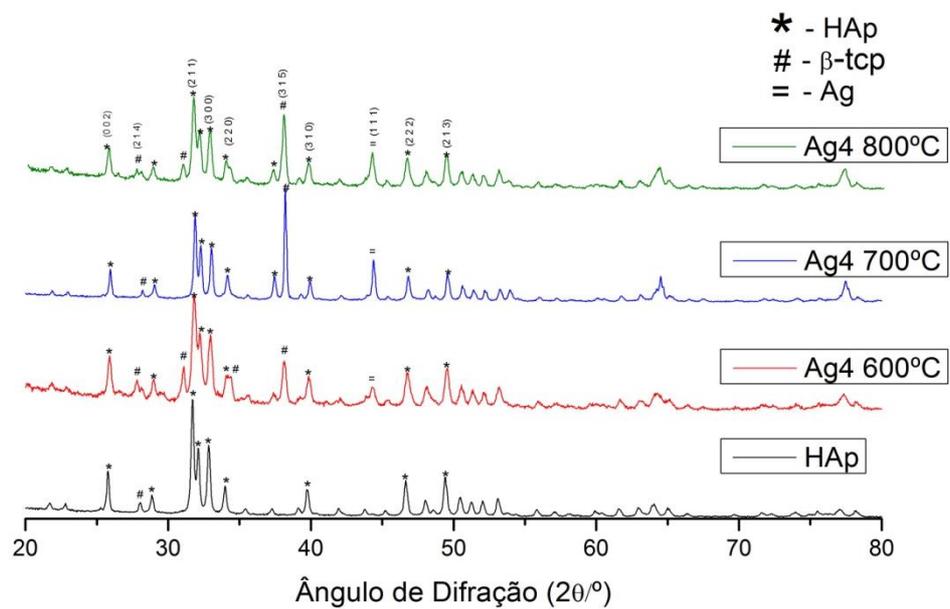
Difratogramas dos pós de HAp dopados com 0.5 mol% Ag (Ag0.5) sinterizados a diferentes temperaturas. Apresenta-se o difratograma da HAp não dopada para comparação



Difratogramas dos pós de HAp dopados com 1 mol% Ag (Ag1) sinterizados a diferentes temperaturas. Apresenta-se o difratograma da HAp não dopada para comparação

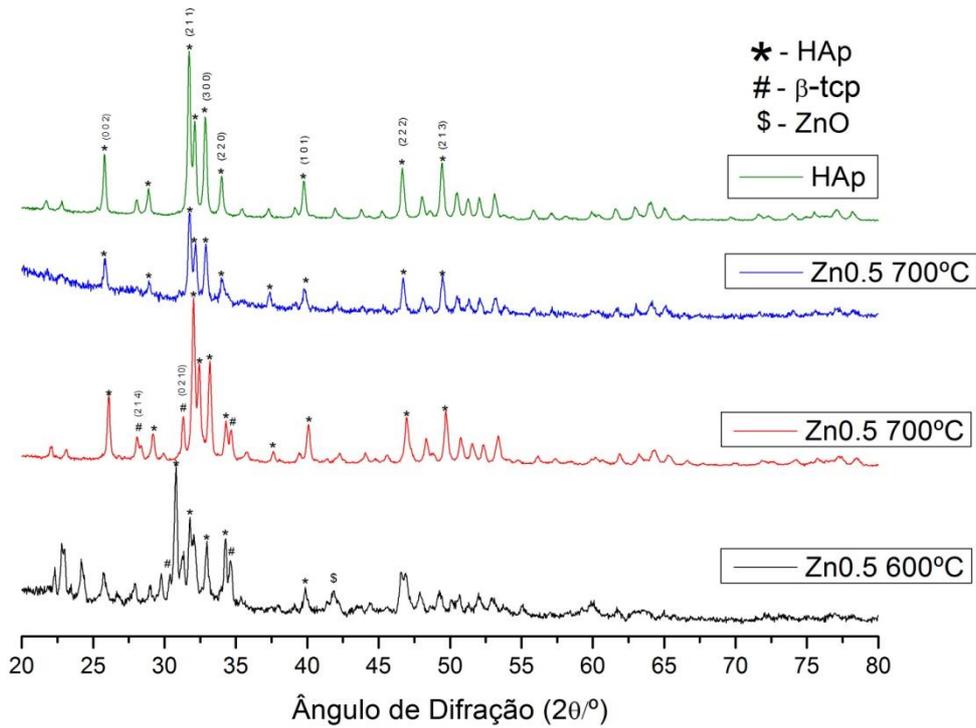


Difratogramas dos pós de HAp dopados com 3 mol% Ag (Ag3) sinterizados a diferentes temperaturas. Apresenta-se o difratograma da HAp não dopada para comparação

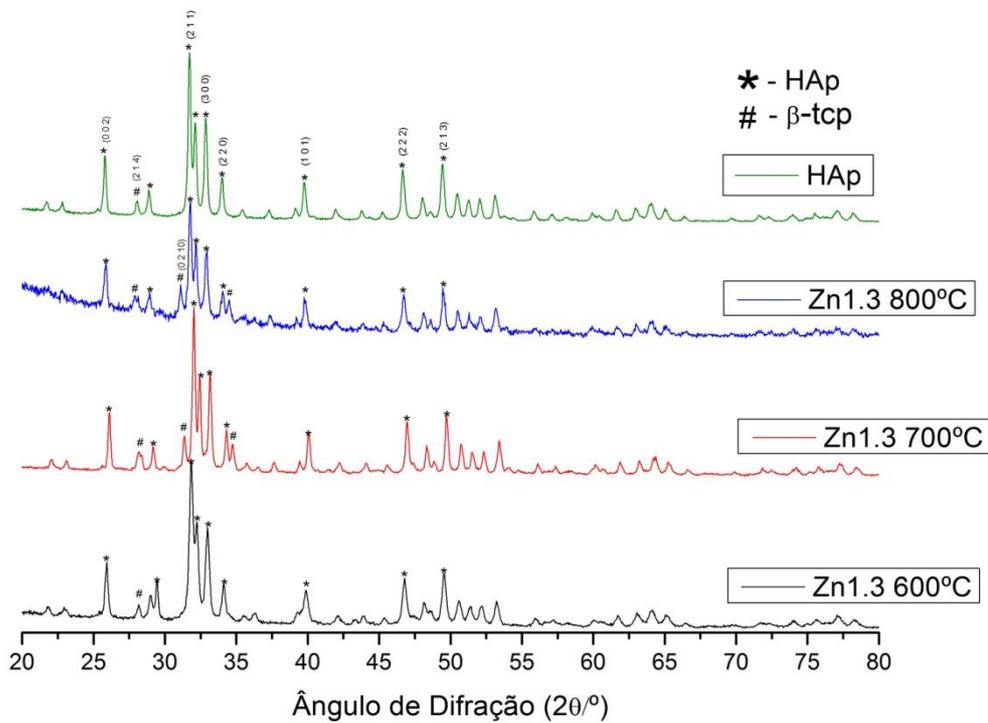


Difratogramas dos pós de HAp dopados com 4 mol% Ag (Ag4) sinterizados a diferentes temperaturas. Apresenta-se o difratograma da HAp não dopada para comparação

Amostras dopadas com Zn (influência da temperatura)

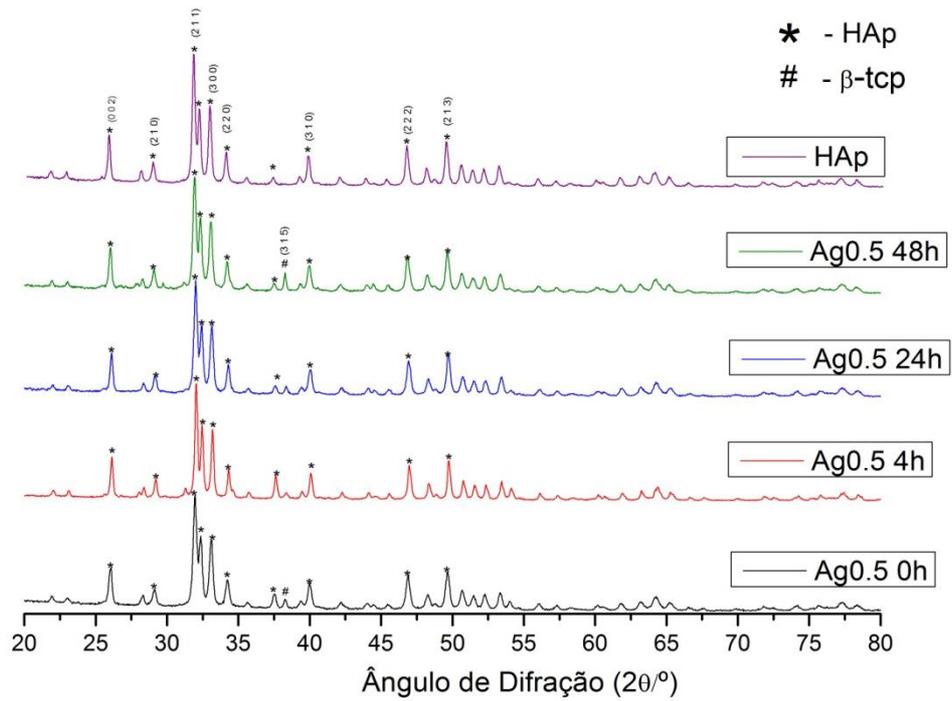


Difratogramas dos pós de HAp dopados com 0.5 mol% Zn (Zn0.5) sinterizados a diferentes temperaturas. Apresenta-se o difratograma da HAp não dopada para comparação

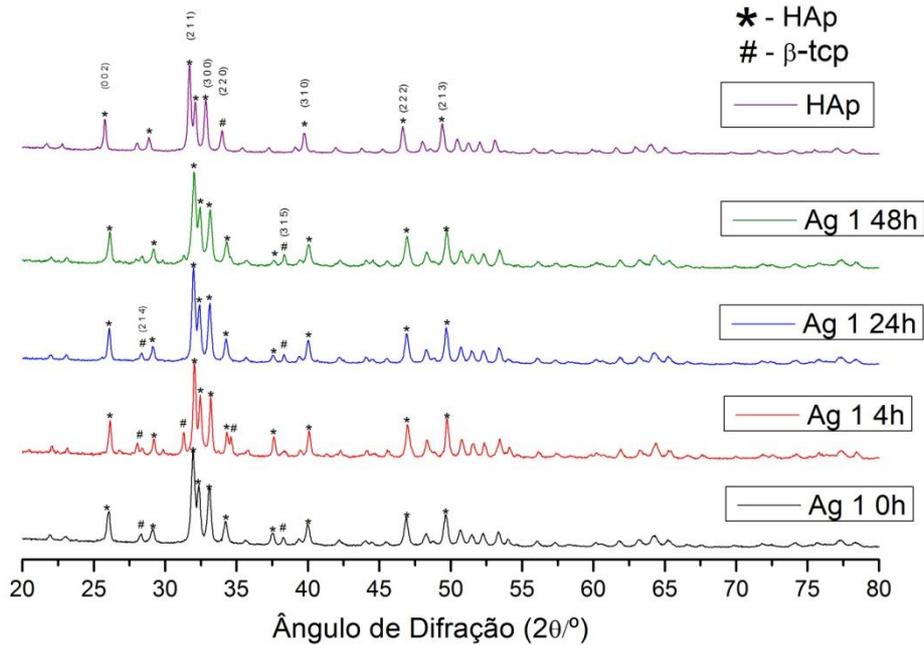


Difratogramas dos pós de HAp dopados com 1.3 mol% Zn (Zn1.3) sinterizados a diferentes temperaturas. Apresenta-se o difratograma da HAp não dopada para comparação

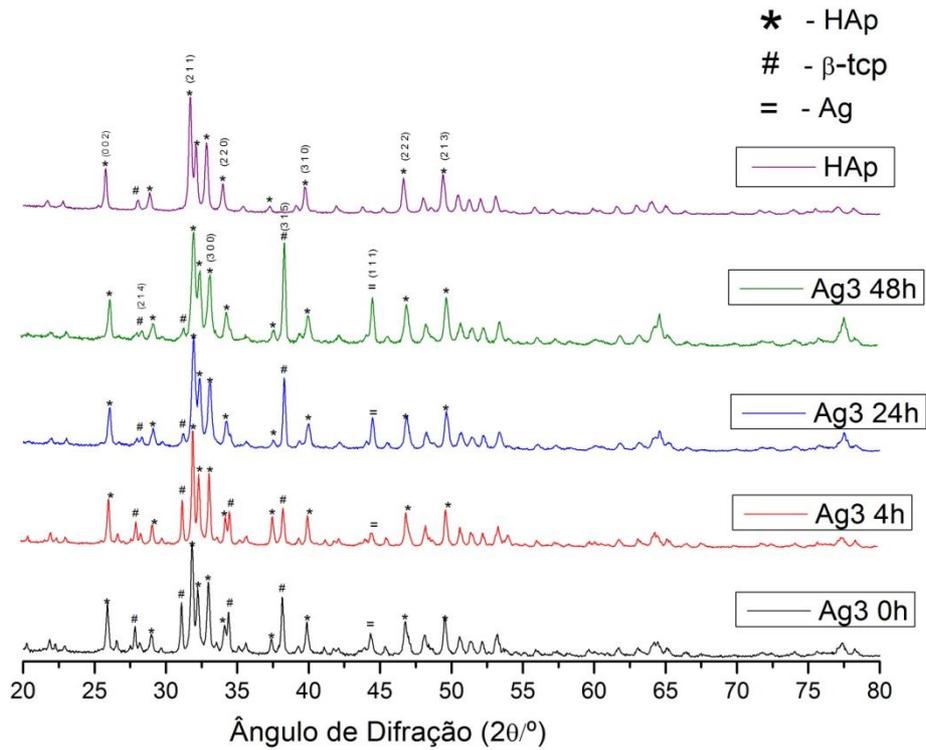
Amostras dopadas com Ag (influência do tempo de envelhecimento)



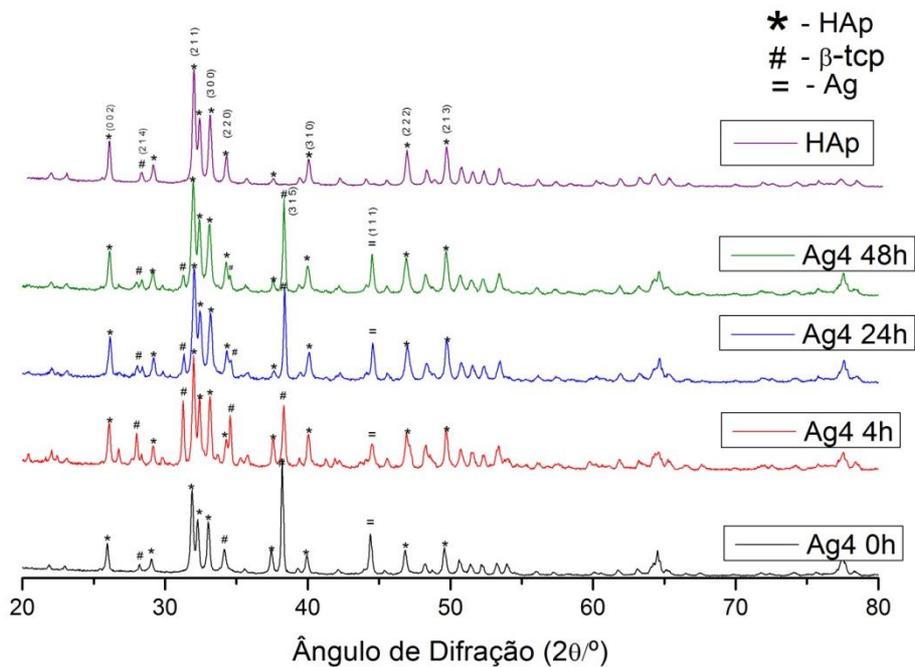
Difratogramas da amostra Ag0.5 com diferentes tempos de envelhecimento. Todas as amostras foram sinterizadas a  $700^\circ\text{C}$



Difratogramas da amostra Ag1 com diferentes tempos de envelhecimento. Todas as amostras foram sinterizadas a  $700^\circ\text{C}$

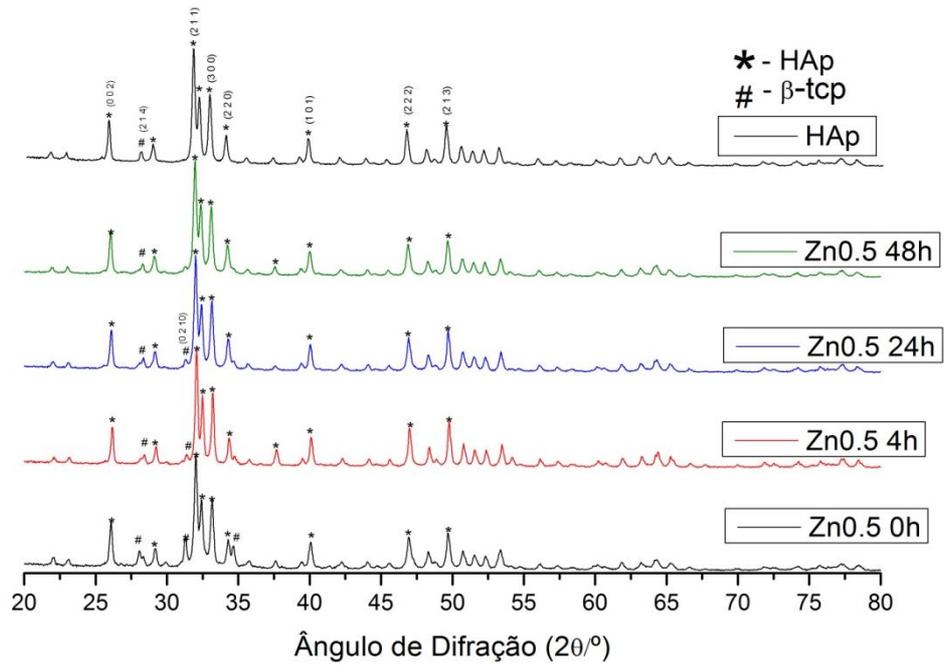


Difratogramas da amostra Ag3 com diferentes tempos de envelhecimento. Todas as amostras foram sinterizadas a 700°C

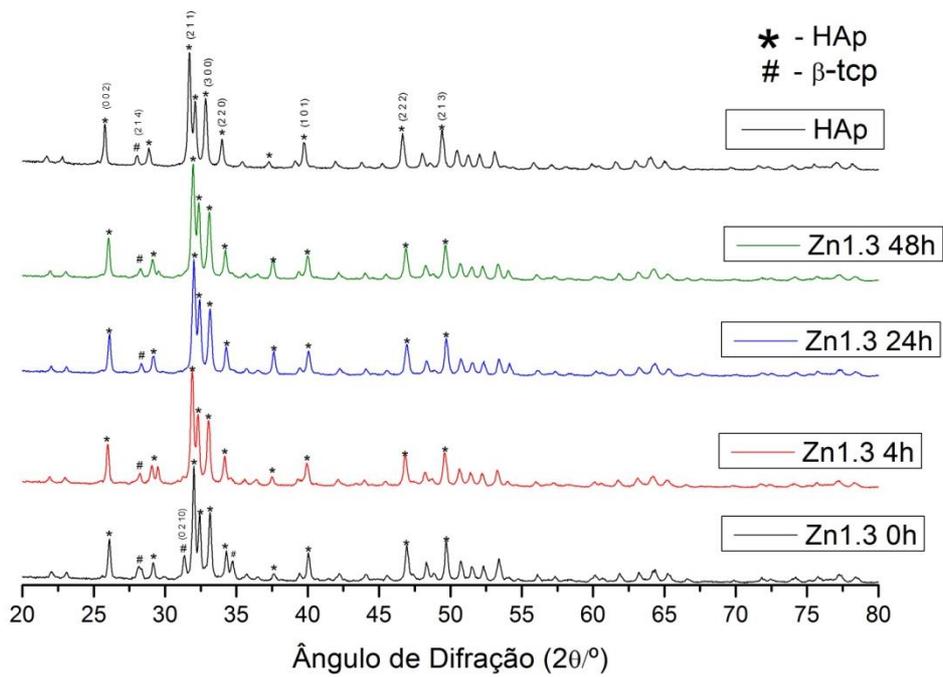


Difratogramas da amostra Ag4 com diferentes tempos de envelhecimento. Todas as amostras foram sinterizadas a 700°C

Amostras dopadas com Zn (influência do tempo de envelhecimento)



Difratogramas da amostra Zn0.5 com diferentes tempos de envelhecimento. Todas as amostras foram sinterizadas a 700°C



Difratogramas da amostra Zn1.3 com diferentes tempos de envelhecimento. Todas as amostras foram sinterizadas a 700°C

Anexo 7. Grau de cristalinidade das amostras estudadas

<b>Amostra</b>	<b>Grau Cristalinidade (%)</b>
<b>HAp</b>	82
<b>Ag05 600</b>	63
<b>Ag05 700</b>	77
<b>Ag05 800</b>	78
<b>Ag05 4h</b>	83
<b>Ag05 24h</b>	78
<b>Ag05 48h</b>	77
<b>Ag1 600</b>	54
<b>Ag1 700</b>	71
<b>Ag1 800</b>	77
<b>Ag1 4h</b>	76
<b>Ag1 24h</b>	79
<b>Ag1 48h</b>	68
<b>Ag2 600</b>	69
<b>Ag2 700</b>	80
<b>Ag2 800</b>	84
<b>Ag2 4h</b>	74
<b>Ag2 24h</b>	70
<b>Ag2 48h</b>	72
<b>Ag3 600</b>	56
<b>Ag3 700</b>	79
<b>Ag3 800</b>	76
<b>Ag3 4h</b>	83
<b>Ag3 24h</b>	71
<b>Ag3 48h</b>	68
<b>Ag4 600</b>	61
<b>Ag4 700</b>	82
<b>Ag4 800</b>	67
<b>Ag4 4h</b>	75
<b>Ag4 24h</b>	70
<b>Ag4 48h</b>	70

<b>Amostra</b>	<b>Grau Cristalinidade (%)</b>
<b>Zn05 600</b>	<b>55</b>
<b>Zn05 700</b>	<b>59</b>
<b>Zn05800</b>	<b>61</b>
<b>Zn05 4h</b>	<b>82</b>
<b>Zn05 24h</b>	<b>80</b>
<b>Zn05 48h</b>	<b>79</b>
<b>Zn1 600</b>	<b>68</b>
<b>Zn1 700</b>	<b>75</b>
<b>Zn1 800</b>	<b>78</b>
<b>Zn1 4h</b>	<b>82</b>
<b>Zn1 24h</b>	<b>72</b>
<b>Zn1 48h</b>	<b>77</b>
<b>Zn13 600</b>	<b>72</b>
<b>Zn13 700</b>	<b>77</b>
<b>Zn13 800</b>	<b>62</b>
<b>Zn13 4h</b>	<b>78</b>
<b>Zn13 24h</b>	<b>79</b>

<b>Amostra</b>	<b>Grau Cristalinidade (%)</b>
<b>M1</b>	<b>70</b>
<b>M2</b>	<b>73</b>
<b>M3</b>	<b>70</b>

Anexo 8. Tamanho de cristalito para todas as amostras sintetizadas

Amostra	D	
	(2 2 0)	(0 0 2)
<b>HAp</b>	37,152	44,530
<b>Ag05 600</b>	23,594	24,380
<b>Ag05 700</b>	28,661	34,862
<b>Ag05 800</b>	32,190	34,838
<b>Ag05 4h</b>	38,748	42,925
<b>Ag05 24h</b>	34,244	40,775
<b>Ag05 48h</b>	35,536	36,113
<b>Ag1 600</b>	31,965	30,540
<b>Ag1 700</b>	29,364	34,847
<b>Ag1 800</b>	28,450	30,474
<b>Ag1 4h</b>	35,548	39,785
<b>Ag1 24h</b>	31,136	40,370
<b>Ag1 48h</b>	30,795	35,458
<b>Ag2 600</b>	23,818	34,729
<b>Ag2 700</b>	26,800	36,880
<b>Ag2 800</b>	30,340	37,386
<b>Ag2 4h</b>	30,787	37,065
<b>Ag2 24h</b>	28,370	37,065
<b>Ag2 48h</b>	32,901	38,835
<b>Ag3 600</b>	21,702	25,479
<b>Ag3 700</b>	31,667	43,362
<b>Ag3 800</b>	29,519	35,437
<b>Ag3 4h</b>	31,980	47,976
<b>Ag3 24h</b>	33,794	33,978
<b>Ag3 48h</b>	31,103	37,077
<b>Ag4 600</b>	33,778	30,193
<b>Ag4 700</b>	33,244	47,957
<b>Ag4 800</b>	22,818	27,164
<b>Ag4 4h</b>	28,570	33,978
<b>Ag4 24h</b>	33,259	38,838
<b>Ag4 48h</b>	31,374	32,622

Amostra	D	
	(2 2 0)	(0 0 2)
<b>Zn05 600</b>	<b>23,594</b>	<b>24,38</b>
<b>Zn05 700</b>	28,661	34,862
<b>Zn05800</b>	32,19	34,838
<b>Zn05 4h</b>	38,748	42,925
<b>Zn05 24h</b>	34,244	40,775
<b>Zn05 48h</b>	35,536	36,113
<b>Zn1 600</b>	31,965	30,54
<b>Zn1 700</b>	29,364	34,847
<b>Zn1 800</b>	28,45	30,474
<b>Zn1 4h</b>	35,548	39,785
<b>Zn1 24h</b>	31,136	40,37
<b>Zn1 48h</b>	30,795	35,458
<b>Zn13 600</b>	23,818	34,729
<b>Zn13 700</b>	26,8	36,88
<b>Zn13 800</b>	30,34	37,386
<b>Zn13 4h</b>	30,787	37,065
<b>Zn13 24h</b>	28,37	37,065
<b>Zn13 48h</b>	32,901	38,835

Anexo 9. Valores de parâmetros de rede e volume celular das amostras estudadas

<b>Amostra</b>	<b>a</b>	<b>c</b>	<b>Volume celular (Å<sup>3</sup>)</b>
<b>HAp</b>	9,339	6,810	514,511
<b>Ag05 700</b>	9,367	6,835	519,380
<b>Ag05 4h</b>	9,332	6,847	516,436
<b>Ag05 24h</b>	9,354	6,824	517,146
<b>Ag05 48h</b>	9,373	6,856	521,724
<b>Ag1 700</b>	9,374	6,825	519,427
<b>Ag1 4h</b>	9,335	6,835	515,890
<b>Ag1 24h</b>	9,354	6,839	518,276
<b>Ag1 48h</b>	9,348	6,804	514,904
<b>Ag2 700</b>	9,436	6,881	530,581
<b>Ag2 4h</b>	9,357	6,841	518,770
<b>Ag2 24h</b>	9,370	6,852	521,086
<b>Ag2 48h</b>	9,348	6,832	517,056
<b>Ag3 700</b>	9,427	6,925	533,050
<b>Ag3 4h</b>	9,338	6,839	516,521
<b>Ag3 24h</b>	9,367	6,864	521,637
<b>Ag3 48h</b>	9,322	6,824	513,606
<b>Ag4 700</b>	9,384	6,850	522,441
<b>Ag4 4h</b>	9,341	6,856	518,149
<b>Ag4 24h</b>	9,338	6,854	517,656
<b>Ag4 48h</b>	9,354	6,868	520,462
<b>Zn05 0h</b>	9,348	6,850	518,460
<b>Zn05 4h</b>	9,332	6,804	513,159
<b>Zn05 24h</b>	9,345	6,859	518,738
<b>Zn05 48h</b>	9,364	6,818	517,733
<b>Zn1 0h</b>	9,366	6,846	520,162
<b>Zn1 4h</b>	9,370	6,867	522,231
<b>Zn1 24h</b>	9,344	6,830	516,563
<b>Zn1 48h</b>	9,316	6,804	511,424
<b>Zn13 0h</b>	9,348	6,850	518,459
<b>Zn13 4h</b>	9,377	6,888	524,530
<b>Zn13 24h</b>	9,348	6,832	517,056
<b>Zn13 48h</b>	9,364	6,847	519,996

Anexo 10. Valores ds Viabilidade celulares relativos, desvio padrão e incerteza

<b>Amostra</b>	<b>Concentrações(m/v)</b>	<b>Viabilidade Relativa (%)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Incerteza</b>
<b>Ag0,5</b>	<b>C0</b>	100	0,020	0,023
	<b>C0/2</b>	100	0,040	0,041
	<b>C0/4</b>	97	0,017	0,020
	<b>C0/8</b>	99	0,014	0,018
	<b>C0/16</b>	-	-	-
<b>Ag1</b>	<b>C0</b>	100	0,016	0,019
	<b>C0/2</b>	100	0,016	0,019
	<b>C0/4</b>	100	0,012	0,016
	<b>C0/8</b>	98	0,030	0,032
	<b>C0/16</b>	-	-	-
<b>Ag2</b>	<b>C0</b>	100	0,011	0,035
	<b>C0/2</b>	97,4502	0,020	0,044
	<b>C0/4</b>	95,5941	0,016	0,039
	<b>C0/8</b>	96,9681	0,018	0,041
	<b>C0/16</b>	97,2252	0,024	0,049
<b>Ag3</b>	<b>C0</b>	100	0,010	0,036
	<b>C0/2</b>	98,3501	0,023	0,047
	<b>C0/4</b>	98,9286	0,006	0,032
	<b>C0/8</b>	97,7716	0,015	0,038
	<b>C0/16</b>	95,361	0,020	0,044
<b>Ag4</b>	<b>C0</b>	100	0,036	0,139
	<b>C0/2</b>	100	0,012	0,124
	<b>C0/4</b>	100	0,030	0,138
	<b>C0/8</b>	100	0,011	0,122
	<b>C0/16</b>	100	0,055	0,160
<b>Ag6</b>	<b>C0</b>	73,64033	0,012	0,085
	<b>C0/2</b>	86,28211	0,009	0,098
	<b>C0/4</b>	93,02957	0,038	0,127
	<b>C0/8</b>	98,9239	0,031	0,126
	<b>C0/16</b>	98,18711	0,060	0,160
<b>Ag8</b>	<b>C0</b>	99,62032	0,024	0,055
	<b>C0/2</b>	100	0,008	0,044
	<b>C0/4</b>	97,92714	0,075	0,123
	<b>C0/8</b>	89,39969	0,201	0,311
	<b>C0/16</b>	100	0,010	0,046

<b>Amostra</b>	<b>Concentrações(m/v)</b>	<b>Viabilidade Relativa (%)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Incerteza</b>
<b>Zn0.5</b>	<b>C0</b>	<b>84</b>	<b>0,026</b>	<b>0,047</b>
	<b>C0/2</b>	100	0,047	0,071
	<b>C0/4</b>	100	0,041	0,064
	<b>C0/8</b>	100	0,031	0,054
	<b>C0/16</b>	99	0,039	0,061
<b>Zn1</b>	<b>C0</b>	73	0,027	0,046
	<b>C0/2</b>	93	0,057	0,082
	<b>C0/4</b>	100	0,021	0,045
	<b>C0/8</b>	97	0,043	0,066
	<b>C0/16</b>	96	0,049	0,072
<b>Zn1.3</b>	<b>C0</b>	80	0,031	0,061
	<b>C0/2</b>	96	0,016	0,051
	<b>C0/4</b>	98	0,045	0,083
	<b>C0/8</b>	96	0,049	0,088
	<b>C0/16</b>	98	0,032	0,067
<b>Zn2</b>	<b>C0</b>	3	0,019	0,032
	<b>C0/2</b>	31	0,137	0,216
	<b>C0/4</b>	96	0,016	0,032
	<b>C0/8</b>	93	0,024	0,043
	<b>C0/16</b>	80	0,16	0,253
<b>Zn4</b>	<b>C0</b>	4	0,009	0,017
	<b>C0/2</b>	16	0,067	0,106
	<b>C0/4</b>	93	0,01	0,025
	<b>C0/8</b>	89	0,019	0,035
	<b>C0/16</b>	89	0,039	0,065
<b>Zn6</b>	<b>C0</b>	3	0,008	0,021
	<b>C0/2</b>	3	0,002	0,016
	<b>C0/4</b>	100	0,026	0,059
	<b>C0/8</b>	100	0,015	0,049
	<b>C0/16</b>	100	0,031	0,062
<b>Zn8</b>	<b>C0</b>	1	0,004	0,018
	<b>C0/2</b>	1	0,006	0,018
	<b>C0/4</b>	100	0,019	0,052
	<b>C0/8</b>	100	0,025	0,057
	<b>C0/16</b>	100	0,026	0,058