



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOALEN PEREIRA DO MONTE

**DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS BASEADOS EM POLIFOSFATO
DE CÁLCIO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA APLICAÇÃO COMO
CIMENTO ÓSSEO**

Recife
2021

JOALEN PEREIRA DO MONTE

**DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS BASEADOS EM POLIFOSFATO
DE CÁLCIO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA APLICAÇÃO COMO
CIMENTO ÓSSEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração em Química Inorgânica.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Maria Goreti Carvalho Pereira

Coorientador (a): Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos

Recife

2021

Catálogo na fonte
Bibliotecária Monick Raquel Silvestre da S. Portes, CRB4-1217

M772d Monte, Joalen Pereira do
Desenvolvimento de compósitos baseados em polifosfato de cálcio e nanopartículas de prata para aplicação como cimento ósseo / Joalen Pereira do Monte. – 2021.
104 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Goreti Carvalho Pereira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Química, Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Química inorgânica. 2. Biomaterial. 3. Tecido ósseo. I. Pereira, Maria Goreti Carvalho (orientadora). II. Título.

546 CDD (23. ed.) UFPE - CCEN 2022-66

JOALEN PEREIRA DO MONTE

**DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS BASEADOS EM POLIFOSFATO
DE CÁLCIO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA APLICAÇÃO COMO
CIMENTO ÓSSEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração em Química Inorgânica.

Aprovado em: 04/ 08/ 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Goreti Carvalho Pereira (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Severino Alves Júnior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. José Fernando Dagnone Figueiredo (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela possibilidade de contemplar a beleza da vida.

Agradeço ao meu pai, José Antônio do Monte Filho, à minha mãe, Alenize Pereira Barros, e aos demais familiares por sempre terem acreditado em mim e em meu potencial. Agradeço também ao meu irmão, Joseph Pereira do Monte, pelas tantas risadas diárias.

Agradeço às minhas avós, que não encontram-se mais fisicamente comigo. O que sou hoje é fruto do carinho, amor, dedicação e serenidade delas. Obrigado pela proteção. Sinto-as diariamente comigo. Obrigado por tudo, vovó Neném e vovó Nevinha. Espero que estejam orgulhosas.

Agradeço a Cláudio Rodrigues, Débora Nascimento e Dominique Dias pela amizade inigualável de cada um e por sempre me incentivarem a ser melhor na vida pessoal e profissional. Vocês são responsáveis pelas minhas gargalhadas semanais e pela pessoa confiante que sou hoje. Vivemos ainda muitos dias para comemorar grandes passos nossos.

Agradeço aos meus amigos do laboratório, Jailson, Izabel, Mércia e Gabriela, que tornaram-se meus amigos. Saudades dos nossos cafés e das brincadeiras. Realizar um experimento tornava-se ainda mais prazeroso com a presença de vocês.

Agradeço à Goreti Pereira e Beate Saegesser pela contribuição na minha vida profissional. Obrigado por todas as leituras, sugestões, conversas e reuniões. A dedicação de tempo de vocês me fez chegar aqui. Vocês fazem parte disso tanto quanto eu. Obrigado!

Agradeço à dedicação da professora Giovannia Pereira e do professor Alfredo Arnóbio nas disciplinas da graduação. Vocês foram os melhores professores que tive na minha vida acadêmica.

Devido às contribuições a este trabalho, dedico meus agradecimentos ao Laboratório de Análises Microbiológicas (LAM – DCFar /UFPE), à Central Analítica (DQF/UFPE), à Central de Multiusuários (DF/UFPE) e aos técnicos contribuintes.

Por fim, sou grato pela minha força de seguir sempre em frente.

RESUMO

O polifosfato é um polímero inorgânico formado pela condensação de grupos ortofosfato. Devido a algumas propriedades que possui, como biocompatibilidade e baixa toxicidade, o polifosfato apresenta-se como um composto que pode ser utilizado no desenvolvimento de dispositivos que entram em contato com o corpo humano. No tecido ósseo, o polifosfato pode ser aplicado como material cerâmico na forma de polifosfato de cálcio (CPP), devido à semelhança química que apresenta com o principal componente inorgânico do osso, a hidroxiapatita. A construção de dispositivos médicos ósseos também utiliza polímeros e estruturas metálicas para agregarem propriedades mecânicas e antibacterianas, respectivamente. Neste sentido, o presente trabalho visou desenvolver biomateriais compósitos baseados em CPP, alginato e nanopartículas de prata (AgNPs) como candidatos para aplicações ósseas. As AgNPs foram revestidas com polifosfato e alginato. Os resultados revelaram que as AgNPs apresentaram morfologia esférica e potencial antibacteriano contra *E. coli* e *S. aureus*, em concentrações superiores a 100 mg/mL. Além disso, essas nanoestruturas revestidas com polifosfato apresentaram raios hidrodinâmicos entre 14 e 66 nm, enquanto que as AgNPs revestidas com alginato apresentaram raios hidrodinâmicos entre 20 e 45 nm. Os biomateriais baseados em CPP, AgNP e alginato apresentaram bandas de absorção no infravermelho referentes ao CPP e alginato, caracterizando este material como compósito. Ensaios de difratometria ainda revelam que os compósitos apresentam fases cristalinas da hidroxiapatita, fosfato de dicálcio anidro e fosfato de tricálcio.

Palavras-chave: biomaterial; tecido ósseo; polifosfato de cálcio; nanopartículas de prata.

ABSTRACT

Polyphosphate is an inorganic polymer formed by the condensation of orthophosphate groups. Due to some properties it has, such as biocompatibility and low toxicity, polyphosphate presents itself as a compound that can be used in the development of devices that come into contact with the human body. In bone tissue, polyphosphate can be applied as a ceramic material in the form of calcium polyphosphate (CPP), due to its chemical similarity with the main inorganic component of bone, hydroxyapatite. The construction of bone medical devices also uses polymers and metallic structures to add mechanical and antibacterial properties, respectively. In this sense, the present work aimed to develop composite biomaterials based on CPP, alginate and silver nanoparticles (AgNPs) as candidates for bone applications. AgNPs were coated with polyphosphate and alginate. The results revealed that AgNPs showed spherical morphology and antibacterial potential against *E. coli* and *S. aureus*, at concentrations above 100 mg/mL. Furthermore, these polyphosphate-coated nanostructures had hydrodynamic radii between 14 and 66 nm, while the alginate-coated AgNPs had hydrodynamic radii between 20 and 45 nm. Biomaterials based on CPP, AgNP and alginate presented infrared absorption bands related to CPP and alginate, proving that this material is composite. Furthermore, these materials presented as polycrystalline when demonstrating crystalline phases referring to hydroxyapatite, anhydrous dicalcium phosphate and tricalcium phosphate.

Keywords: biomaterial; bone tissue; calcium polyphosphate; silver nanoparticle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação dos biomateriais em função da forma de obtenção.....	14
Figura 2 -	Estrutura de um polifosfato (a) linear, (b) ramificado e (c) cíclico, no qual n indica o número de ortofosfatos ligados.....	19
Figura 3 -	Aplicações do PoliP na indústria e ciência.....	21
Figura 4 -	(a) Microradiografias do defeito ósseo em coelhos. Microradiografias do defeito ósseo enxertado com (b) SSCP e (c) CPP após 16 semanas.....	23
Figura 5 -	Estrutura química do alginato. Os subscritos m e n indicam o grau de polimerização dos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico, respectivamente.....	27
Figura 6 -	Complexo de alginato de cálcio formado através da interação entre o ânion α -L-guluronato e o cátion Ca^{2+}	28
Figura 7 -	Esquema de reação entre AgNO_3 e NaBH_4 , em meio aquoso, para a formação de AgNPs.....	31
Figura 8 -	Esquema de espectro relacionando a morfologia com o intervalo das bandas de extinção de AgNPs.....	32
Figura 9 -	Micrografias de MEV das bactérias normais e tratadas com $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$ de solução de nanocompósitos HAp-Ag para <i>E. coli</i> (a e b), <i>P. aeruginosa</i> (c e d) e <i>S. aureus</i> (e e f).....	35
Figura 10 -	Microesferas de HAp, quitooligossacarídeo (COS), AgNP e alginato.....	40
Figura 11 -	Esquema de distribuição realizada em uma placa de 96 poços. Conforme a ilustração, foram testadas duas AgNPs em concentrações C1, C2 e C3, com cada concentração em triplicata, em linhagens bacterianas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	45
Figura 12 -	Espectros de absorção no UV-Vis das AgNPs produzidas com (a) polifosfato e (b) alginato.....	49
Figura 13 -	Micrografias das AgNP-11-PP em diferentes escalas.....	50
Figura 14 -	Estruturas químicas da resazurina e resorufina. As redutases de células viáveis reduzem a resazurina, resultando na	

	formação de seu produto metabólico altamente fluorescente, a resorufina.....	53
Figura 15 -	Espectro de FT-IR do CPP. As legendas referem-se às sinalizações das bandas características do CPP.....	55
Figura 16 -	Espectros de FT-IR dos materiais C-AgNP-11-PP, C-AgNP-12-PP, C-AgNP-13-PP e C-AgNP-14-PP.....	56
Figura 17 -	Espectros de FT-IR dos materiais C-AgNP-14-Alg, C-AgNP-15-Alg, C-AgNP-16-Alg e C-AgNP-17-Alg.....	56
Figura 18 -	Difratograma de raios x das amostras (a) C-AgNP-PP e (b) C-AgNP-Alg.....	58
Figura 19 -	Micrografias dos materiais compósitos preparados na presença de AgNPs. Escalas em (a) 500 nm, (b) 200 nm e (c) 100 nm.....	59
Figura 20 -	(a) Esquema de distribuição em placas de 96 poços das amostras AgNP-14-Alg, AgNP-15-Alg, AgNP-16-Alg e AgNP-17-Alg nas concentrações C1, C2 e C3. (b) Realização do ensaio antibacteriano.....	99
Figura 21 -	(a) Esquema de distribuição em placas de 96 poços das amostras AgNP-14-Alg, AgNP-15-Alg, AgNP-16-Alg e AgNP-17-Alg nas concentrações C4 e C5. (b) Realização do ensaio antibacteriano.....	100
Figura 22 -	(a) Esquema de distribuição em placas de 96 poços das amostras AgNP-10-PP, AgNP-11-PP, AgNP-12-PP, AgNP-13-PP e AgNP-14-PP nas concentrações C1, C2 e C3. (b) Realização do ensaio antibacteriano.....	101
Figura 23 -	(a) Esquema de distribuição em placas de 96 poços das amostras AgNP-10-PP, AgNP-11-PP, AgNP-12-PP, AgNP-13-PP e AgNP-14-PP nas concentrações C4 e C5. (b) Realização do ensaio antibacteriano.....	102
Figura 24 -	(a) Esquema de distribuição em placas de 96 poços das amostras AgNP-10-PP, AgNP-11-PP, AgNP-12-PP, AgNP-13-PP e AgNP-14-PP nas concentrações C1, C2 e C3. (b) Realização do ensaio antibacteriano.....	103

Figura 25 - (a) Esquema de distribuição em placas de 96 poços das amostras AgNP-10-PP, AgNP-11-PP, AgNP-12-PP, AgNP-13-PP e AgNP-14-PP nas concentrações C4 e C5.(b) Realização do ensaio antibacteriano..... 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características e aplicações de biomateriais de acordo com a sua composição química.....	155
Tabela 2 -	Lista de compostos utilizados para a construção de novos substitutos ósseos.....	18
Tabela 3 -	Polímeros utilizados em biomateriais ósseos.....	
Tabela 4 -	Valores de MIC e MBC das dos nanocompósitos de HAp e AgNP.....	35
Tabela 5 -	Dados sobre os raios hidrodinâmicos das AgNPs obtidos por DLS, onde R_H é o raio hidrodinâmico da triplicata de cada nanoestrutura de prata e DVP é o desvio padrão associado aos valores de R_H	51
Tabela 6 -	Dados dos potenciais zeta das AgNPs, em que r_1 , r_2 e r_3 referem-se as replicatas de cada sistema e DVP é o desvio padrão associado aos valores dos potenciais zeta.....	52
Tabela 7 -	Concentrações de AgNPs eficazes na inativação de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	53
Tabela 8 -	Códigos ICSD das fases cristalinas.....	57

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
1.1	BIOMATERIAIS	13
1.1.1	Biomateriais à base de fosfato de cálcio.....	16
1.2	POLIFOSFATO.....	18
1.2.1	Polifosfato de cálcio e o tecido ósseo.....	21
1.3	POLÍMEROS	26
1.4	NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	29
1.5	APLICAÇÕES DE AgNPs EM SCAFFOLDS ÓSSEOS.....	33
1.5.1	Scaffolds de HAp e AgNPs	33
1.5.2	Scaffolds de HAp, alginato e AgNPs.....	38
1.5.3	Scaffolds de HAp, AgNPs e demais polímeros	40
2	OBJETIVOS	41
2.1	OBJETIVO GERAL.....	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3	METODOLOGIA.....	42
3.1	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	42
3.1.1	Reagentes e solventes	42
3.1.2	Codificação das AgNPs	42
3.1.3	Procedimento experimental.....	42
3.1.4	Caracterização das nanopartículas de prata.....	43
3.2	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS AgNPs	44
3.2.1	Materiais	44
3.2.2	Padronização do inóculo	44
3.2.3	Ensaio antibacteriano	44

3.3	PRODUÇÃO DOS MATERIAIS COMPÓSITOS.....	46
3.3.1	Reagentes e solventes	46
3.3.2	Procedimento experimental.....	46
3.3.3	Caracterização dos materiais compósitos.	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	48
4.2	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS AGNPS	52
4.3	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS	54
5	PERSPECTIVAS	60
6	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO A - ARTIGO DE REVISÃO EM PREPARAÇÃO	73
	ANEXO B - ESQUEMAS DE PLACAS DE 96 POÇOS	99

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 BIOMATERIAIS

Nos últimos 60 anos, o campo dos biomateriais vem apresentando-se como uma área promissora, devido aos avanços no desenvolvimento de materiais com propriedades cada vez mais aperfeiçoadas. A produção de materiais que pudessem servir como dispositivos médicos ocorreu entre as décadas de 60 e 70 do século XX. Nesta época, foram desenvolvidos os biomateriais inertes, que foram chamados assim por reduzirem a chance do organismo gerar alguma resposta biológica inapropriada ao material enxertado. Com o passar do tempo, em meados de 1980, foram desenvolvidos os biomateriais bioativos, os quais geravam ações e reações controladas no meio fisiológico. Atualmente, o foco de pesquisas voltadas a esta área vem concentrando esforços no desenvolvimento de biomateriais com potencial para regeneração de tecidos, suporte celular, engenharia com células-tronco, controle de infecção e outros. (RATNER; BRYANT, 2004; HENCH; THOMPSON, 2010)

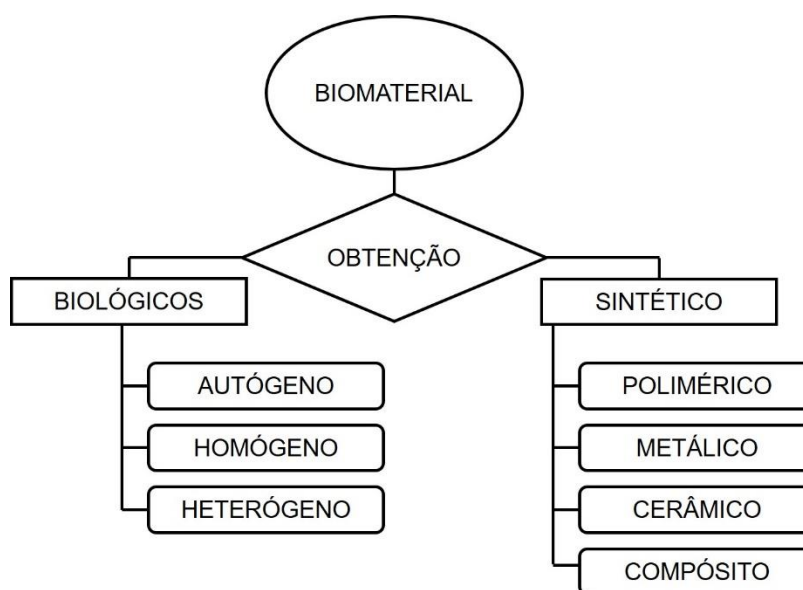
De modo geral, os biomateriais são materiais que possuem propriedades químicas, físicas, mecânicas e biológicas adequadas para aplicações médicas, nos quais podem entrar em contato com o meio fisiológico de forma continuada. (WILLIAMS, 1987) São exemplos de biomateriais: implantes cocleares e dentários, lentes intraoculares, válvulas cardíacas, dialisadores renais, cateteres urinários e implantes mamários. (RATNER; BRYANT, 2004)

Um dos fatores mais importantes que distingue os biomateriais dos materiais é a sua capacidade de entrar em contato com os tecidos humanos e promover o mínimo de dano possível ao corpo. Para Williams (2008), o termo biocompatível é usualmente associado aos biomateriais e o conceito acaba se tornando complexo diante de tantos mecanismos de ação e interação dos biomateriais. (WILLIAMS, 2008) Este mesmo autor, em seu trabalho *“On the mechanisms of biocompatibility”*, publicado em 2008, defende o seguinte conceito:

“Biocompatibilidade refere-se à capacidade de um biomaterial em desempenhar sua função desejada em relação a uma terapia médica, sem provocar quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis no receptor ou beneficiário dessa terapia, mas gerando a resposta celular ou tecidual benéfica mais apropriada naquela situação específica e otimizando o desempenho clinicamente relevante dessa terapia.” (WILLIAMS, 2008)

Os biomateriais podem ser categorizados em função da sua forma de obtenção, sendo chamados de biológicos ou sintéticos. Biomateriais originados de fontes biológicas são classificados como autógeno, homogêneo e heterôgeno. Os autógenos são materiais que são retirados de um indivíduo para aplica-los neste mesmo indivíduo. Enquanto que os homogêneos são materiais que são retirados de um indivíduo para aplica-los em outro indivíduo, ambos pertencentes a mesma espécie. Por fim, os biomateriais heterôgenos são resumidos em materiais que foram retirados de uma espécie para serem utilizados em outra. (KO; SFEIR; KUMTA, 2010; MARTIN; BETTENCOURT, 2018) A classe de biomateriais de origem sintética compreende todos os materiais que são produzidos pelas mãos humanas através de técnicas de extração, síntese, purificação e etc. Esta categoria de materiais pode ser dividida em metálicos (KELLY et al., 2018), poliméricos (BALDWIN; KIICK, 2010), cerâmicos (SU et al., 2019) e compósitos (GARCÍA-LIZARRIBAR et al., 2018). A figura 1 esquematiza as classificações de biomateriais.

Figura 1 - Classificação dos biomateriais em função da forma de obtenção.



Fonte: O autor (2021)

Na tabela 1 são apresentados alguns biomateriais, suas propriedades e aplicações. Comumente, um biomaterial sintético é classificado conforme sua composição química. No entanto, a denominação “compósito” não indica a composição do material de forma clara em comparação com as demais classes de biomateriais sintéticos. Entende-se como biomaterial compósito a combinação de dois

ou mais materiais que apresentam composição, propriedades, natureza química e/ou morfologia diferentes, de modo que o produto dessa combinação reúna as propriedades otimizadas de seus componentes e/ou apresente novas propriedades. (SÁENZ et al., 1999)

Tabela 1 - Características e aplicações de biomateriais de acordo com a sua composição química.

Material	Características	Aplicações
Polimérico: polimetacrilato de metila (PMMA), polietileno, politetrefluoretileno	Fácil produção, baixa densidade	Suturas, artérias, tendões artificiais, válvulas de coração, implantes
Metálico: prata, tântalo cobalto F-75 e ligas de: Ti, Cr+CO, Cr+Co+Mo.	Ductilidade, alta resistência mecânica	Próteses de articulação, implantes dentários, placas de crânio e malha para reconstrução de face
Cerâmico: óxidos de alumínio, aluminatos de cálcio, óxidos de titânio, fosfato de cálcio	Alta biocompatibilidade, resistência à corrosão, alta resistência a compressão e inerte	Peças dentárias, obturações, endoscopia, implantes otológicos
Compósito: metais com revestimentos cerâmicos, materiais revestidos com carbono	Alta biocompatibilidade, resistência à corrosão e inerte	Válvulas cardíacas, implantes de joelho, articulações artificiais
Natural: colágeno, tecidos humanos, ácido hialurônico, enxertos	Disponibilidade no corpo humano, biocompatibilidade	Substituição de tecidos duros e moles, protetores de córnea, enxertos vasculares

Fonte: (SÁENZ et al., 1999)

Apesar de atenderem diversas áreas do conhecimento, os biomateriais encontram aplicações bem fundamentadas na engenharia de tecidos, uma vez que apresenta linhas de pesquisas direcionadas para a área de saúde. Uma das temáticas que cerca a engenharia de tecidos é a recuperação e regeneração de um tecido

defeituoso, no qual pode-se destacar a produção de materiais voltados para o tecido ósseo que vem apresentado resultados satisfatórios ao preparar dispositivos médicos com propriedades químicas, físicas, mecânicas e biológicas adequadas para sua aplicação. Dentre os variados biomateriais para o osso que são abordados na literatura, encontram-se os materiais compósitos baseados em sais de fosfato de cálcio. Esses materiais são conhecidos e utilizados por apresentarem biocompatibilidade com o tecido ósseo e baixa toxicidade no sistema biológico. (SALERNITANO; MIGLIARESI, 2003; GINEBRA; TRAYKOVA; PLANELL, 2006)

1.1.1 Biomateriais à base de fosfato de cálcio

O uso de biomateriais nas áreas das ciências da saúde vem se tornando cada vez mais constante e até mesmo necessário para os tratamentos de traumas, doenças, más-formações congênitas, tumores, e em quadros clínicos de desgastes nos tecidos mole e duro. No caso do osso, os desgastes mais comuns são associados a formação de defeitos na estrutura esquelética do corpo humano. Tais defeitos podem ser tratados com a utilização de enxertos que possuem a finalidade de reparar ou regenerar o local do osso afetado por um trauma, doença e etc. (ROBERTS; ROSENBAUM, 2012; OFFNER; GRADO; MEISELS, 2019)

A busca pela utilização de enxertos ósseos movimenta o mercado especializado e as salas cirúrgicas de todo o mundo. Segundo Amini et al. (2012), até meados de 2012, cerca de 500 mil de pessoas nos Estados Unidos realizaram algum procedimento cirúrgico associado a defeitos ósseos, sendo apontado que esse número ainda poderia dobrar até o ano de 2020. A justificativa por trás da crescente demanda de materiais ósseos é muitas vezes associadas a maior expectativa de vida humana, ao aumento natural das populações, a falta de exercícios físicos, obesidade e má alimentação.(AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012) Em uma outra investigação, Baroli (2009) destaca que o aumento do número de lesões e defeitos musculoesqueléticos e do uso crescente de enxertos são consequência de diversos fatores, como (a) alto índice de doenças crônicas articulares na população idosa; (b) aumento do número de fraturas osteoporóticas. lesões e traumas ósseos resultados de guerra, trânsito e outros; (c) doenças e deformidades que afetam o crescimento saudável de crianças; e (d) por doenças como artrite reumatoide, osteoporose e distúrbios metabólicos.(BAROLI, 2009)

Apesar do uso de enxertos ósseos ser uma prática comum, a literatura relata que tais materiais geralmente não atendem todas as características necessárias para aplica-los no osso. Espera-se que um substituto ósseo apresente necessariamente um conjunto de propriedades, tais como: biocompatibilidade, potencial osteoindutor, osteocondutor, e angiogênico, osteointegração, solubilidade, biodegradabilidade, segurança biológica, baixa morbidade do paciente, porosidade, propriedades mecânicas adequadas, alta estabilidade, fácil disponibilidade de mercado, vida útil longa e custos de produção razoáveis. (POLO-CORRALES; LATORRE-ESTEVEZ; RAMIREZ-VICK, 2014; HAUGEN; 2019)

Os termos osteoindução, osteocondução, osteointegração e potencial angiogênico são comumente utilizados para descrever parâmetros biológicos que cercam a interface biomaterial-tecido ósseo. Entende-se como potencial osteoindutor a capacidade de guiar a formação óssea do leito ósseo do hospedeiro até o material, apoiando e promovendo a diferenciação osteogênica nos sítios porosos sintéticos. (ACCORSI, 2005; PORTER; RUCKH; POPAT, 2009) O potencial osteocondutor favorece a migração, proliferação e maturação celular, sendo responsável também pela condução da união do novo osso com o tecido ósseo pré-existente, e o potencial osteogênico indica a capacidade de estimular os osteoblastos. (YUAN et al., 2002; ACCORSI, 2005) Por fim, o termo osteointegração está associado com o aumento ou inibição da atividade celular em direção à integração do tecido-hospedeiro. (PORTER; RUCKH; POPAT, 2009)

Idealmente, um substituto ósseo deve possuir poros para que seja possível ocorrer a vascularização nos interstícios do material, além de favorecer o crescimento do tecido. Os poros podem ser definidos como macro ou microporos, e desempenham funções específicas. Os macroporos contribuem para o processo de osteogênese celular, enquanto que os poros menores (microporos) aumentam a solubilidade de íons no meio e contribuem na fixação de osteoblastos. (WOODARD et al., 2007)

Visando tais propriedades, a construção de novos enxertos ósseos busca biomimetizar as características gerais do osso. O ponto de partida para o desenvolvimento de novos enxertos vem sendo a utilização sais de derivados dos fosfatos de cálcio. (SALERMITANO; MIGLIARESI, 2003; GINEBRA; TRAYKOVA; PLANELL, 2006) A utilização desses compostos deve-se ao fato do osso humano ser uma matriz inorgânica formada por diversos sais de fosfato de cálcio, no qual a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é o principal componente deste tecido. (PORTER;

RUCKH; POPAT, 2009) A tabela 2 mostra os recentes estudos que utilizam sais derivados de fosfato de cálcio como matriz para a produção de substitutos ósseos cerâmicos.

Tabela 2 - Lista de compostos utilizados para a construção de novos substitutos ósseos.

Composto	Fórmula	Referência
Bruchita (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(SALEH; LING; HUSSAIN, 2016)
Monetita (DCPA)	CaHPO_4	(KRUPPKE et al., 2016)
Fosfato de tricálcio (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	(XIE et al., 2019)
Fosfato de tetracálcio (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	(JAYASREE et al., 2018)
Fosfato de octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	(HEYDARI; MOHEBBI-KALHORI; AFARANI, 2017)
Hidroxiapatita (HAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	(TEOTIA et al., 2017)
Polifosfato de cálcio	-	(GUO et al., 2017)

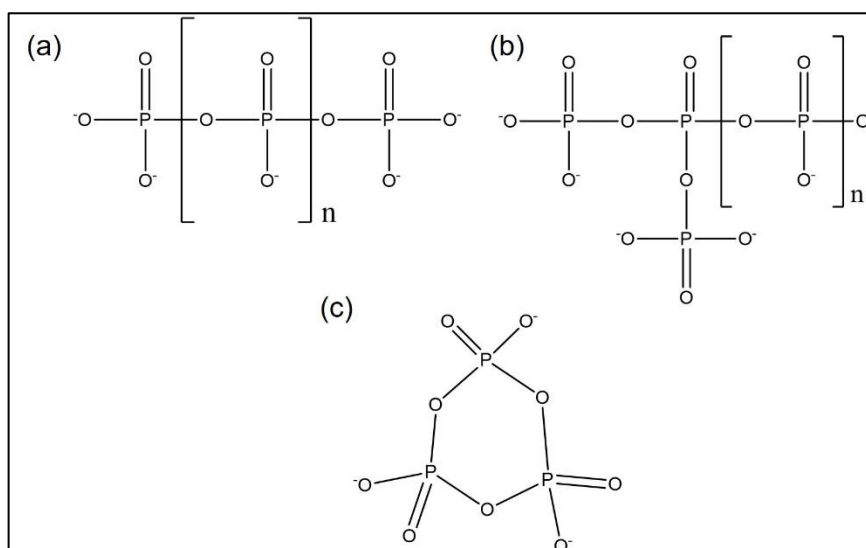
1.2 POLIFOSFATO

O polifosfato (PoliP) de sódio vítreo foi obtido pela primeira vez por Thomas Graham, em 1833, ao fundir NaH_2PO_4 em temperaturas entre 600 – 800 °C por algumas horas, sendo resfriado rapidamente logo em seguida. Este composto é uma mistura de diversas cadeias de fosfato, e é conhecido comercialmente como sal de Graham ou hexametáfosfato de sódio. Apesar da descoberta em 1833, os principais avanços com esses produtos foram feitos nas décadas de 40 e 50 quando sua natureza linear, flexível e polidispersiva começou a ser profundamente estudada e aplicada. (RASHCHI; FINCH, 2000a; KULAEV; VAGABOV; KULAKOVSKAYA, 2003; LIMA et al., 2010)

O polifosfato é um polímero inorgânico formado por uma cadeia linear, ramificada ou cíclica de ortofosfatos (Figura 2), podendo apresentar um grau de polimerização (n) entre 2 e 10^6 . Geralmente, este composto é obtido sinteticamente através de reações de condensação em altas temperaturas. Durante a síntese, a condensação dos ânions ortofosfatos (P_i) pode ser afetada pelas condições de

reação, como pH e concentração dos reagentes. Os polifosfatos cristalinos são obtidos quando a cadeia do polímero apresenta até 5 agrupamentos fosfatos. Com o aumento da cadeia, os sais de polifosfato vão diminuindo a cristalinidade por apresentar traços de outros compostos, como difosfatos e ciclofosfatos, e tornam-se compostos vítreos.(KULAEV; VAGABOV; KULAKOVSKAYA, 2003; KULAKOVSKAYA; VAGABOV; KULAEV, 2012) Além da produção sintética deste composto, a literatura indica a ocorrência natural do PoliP em protozoários, fungos, plantas, animais e bactérias. (KORNBERG; RAO; AULT-RICHÉ, 1999)

Figura 2 - Estrutura de um polifosfato (a) linear, (b) ramificado e (c) cíclico, no qual n indica o número de ortofosfatos ligados.



Fonte: O autor (2021)

A variedade de tamanho de cadeias do polifosfato comumente implica na necessidade de elucidar a estrutura do composto, assim como identificar e separar as frações de PoliP com graus de polimerização diferentes. Por sua vez, a obtenção dessas informações é útil em estudos que envolvem ensaios químicos (como no preparo de materiais e em reações químicas) e biológicos (elucidação de mecanismos de amostra biológicas).(RASHCHI; FINCH, 2000b; MAJED; LI; GU, 2012) Os primeiros ensaios de identificação e separação dos polímeros de fosfato foram realizados na década de 50, utilizando as técnicas de cromatografia em papel e cromatografia em coluna. No entanto, o uso dessas técnicas foi substituído por metodologias mais sofisticadas. Até o início do XXI, a cromatografia líquida em coluna

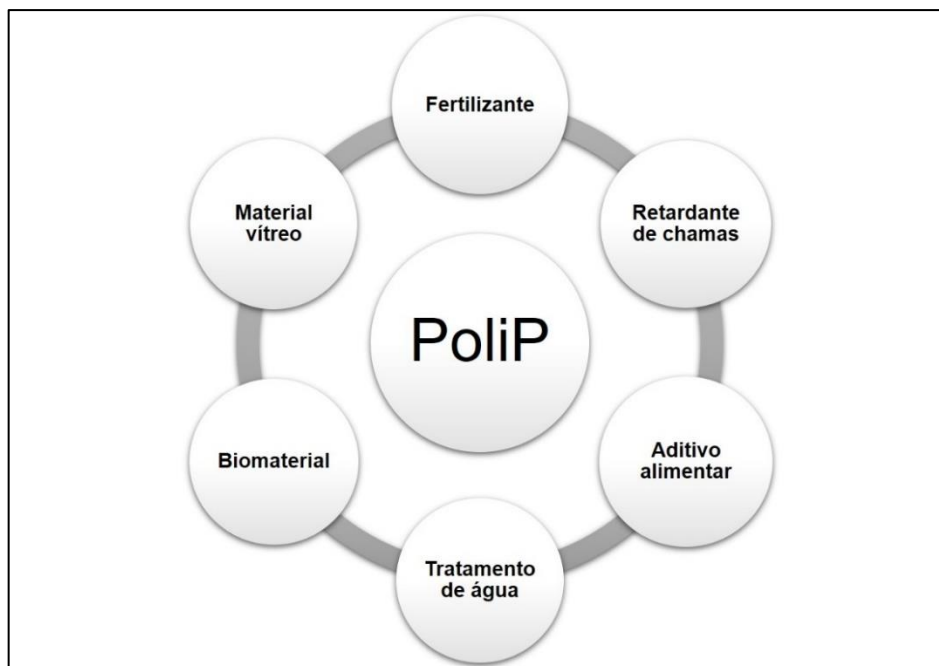
de alta eficiência (HPLC) era apontada como uma técnica preferencial para separar e quantificar os componentes de uma mistura de polifosfatos. (RASHCHI; FINCH, 2000) Técnicas de espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR) e de ressonância magnética nuclear de ^{31}P (RMN ^{31}P) são aplicadas satisfatoriamente na elucidação das cadeias de fosfato. (KORNBERG; RAO; AULT-RICHÉ, 1999; RULLIERE et al., 2013)

Outras formas de caracterizar o polifosfato são reportadas na literatura. Um levantamento realizado por Majed et al. (2012) aponta para o uso de diversos métodos na análise de polifosfato em fontes biológicas, tendo como exemplos: métodos enzimáticos, RMN ^{31}P , espectromicroscopia Raman, espectrometria de energia dispersiva (EDS), espectrometria de fluorescência de raios X (XRF), tomografia e espectroscopia de crioeletrons (CTSI), espectrometria de massa com ionização de elétrons (EI-MS) e marcação de afinidade de proteínas *in vivo*. (MAJED; LI; GU, 2012)

O PoliP é um composto de uso rotineiro nos setores da indústria e ciência (Figura 3). Segundo Kulakovskaya et al. (2012), o que determina a aplicação comercial do PoliP é seu conjunto de propriedades básicas, tais como: capacidade de formar complexos com cátions metálicos, alto potencial para reter quantidades consideráveis de água, por serem atóxicos e biodegradáveis, além de ser um produto de baixo custo. (KULAKOVSKAYA; VAGABOV; KULAEV, 2012; (FAF) et al., 2019)

Na agricultura, o polifosfato de amônio é utilizado como um fertilizante fosfórico. A decomposição deste composto fornece a longo prazo ânions ortofosfatos, que são absorvidos pelas plantas. (MCBEATH et al., 2007; RULLIERE et al., 2012) Uma outra aplicação do polifosfato de amônio é vista no desenvolvimento de retardantes de chamas. A escolha deste composto deve-se por possuir baixo custo, fácil manipulação, alta eficiência e não ser constituído por halogênios. (LIM et al., 2016) O PoliP também está presente nas indústrias alimentícias. Este composto possui uma alta capacidade de tamponamento, propriedades sequestrantes e de retenção de água, sendo citado também por apresentar propriedades antibacterianas. Este conjunto de características torna o PoliP um ingrediente eficaz como aditivo alimentar, auxiliando em manter o pH e a vida útil dos alimentos. (KULAKOVSKAYA; VAGABOV; KULAEV, 2012; (FAF) et al., 2019) Os PoliP também são encontrados em processos de tratamento de água e desenvolvimento de materiais vítreos. No campo das ciências da saúde e engenharia de tecidos, o PoliP é utilizado normalmente em biomateriais para o tecido ósseo, sendo comumente utilizada como polifosfato de cálcio.

Figura 3 - Aplicações do PoliP na indústria e ciência.



Fonte: O autor (2021)

1.2.1 Polifosfato de cálcio e o tecido ósseo

O polifosfato de cálcio, ou CPP, é um composto que pode apresentar-se na forma amorfa ou cristalina, e pode sofrer degradação hidrolítica das ligações P-O-P para formar grupos ortofosfatos ou cadeias de PoliP com M_w menores. No corpo humano, os produtos da degradação do CPP são metabolizados e absorvidos, desde que as taxas de degradação sejam adequadas, sendo geralmente fomentados como matéria-prima para os processos de remodelação óssea. Comumente, o CPP está associado ao desenvolvimento de biomateriais para aplicações ósseas como compósito, cerâmica, prótese e cimento. (PILLIAR et al., 2013)

O osso é uma matriz calcificada que atua como principal depósito de fósforo e cálcio do corpo. Esse tecido é responsável pela sustentação corporal, suporte aos tecidos moles, proteção dos órgãos vitais, formação de elementos figurados do sangue e por diversas funções relacionadas à fisiologia humana. (PORTER; RUCKH; POPAT, 2009) A composição do osso consiste em aproximadamente 70% de material inorgânico e 30% de material orgânico, sendo o colágeno do tipo I o principal componente orgânico, enquanto que a HAp é o principal composto inorgânico. Além desses componentes, o osso é constituído por outros compostos de fósforo, como $Ca_2P_2O_7$, $CaHPO_4$ e $Ca_3(PO_4)_2$; citrato; carbonatos e fluoretos. (SÁENZ et al., 1999)

Como qualquer tecido do corpo humano, o osso contém uma organização celular que compõem sua matriz biológica. Neste tecido são encontrados predominantemente três tipos de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, sendo associado a cada tipo celular uma função no processo de remodelação do esqueleto. Resumidamente, os osteoblastos são responsáveis pela arquitetura óssea, depositam a matriz do osso e regulam a atividade dos osteoclastos. Além disso, os osteoblastos possuem dois destinos: tornam-se osteócitos ou sofrem apoptose celular. Os osteócitos são células que ficam embutidas na matriz, não produzem elementos da matriz óssea e desempenham um papel fundamental na mecanotransdução. E por fim, os osteoclastos são responsáveis por secretar ácidos e enzimas proteolíticas que corroem a matriz extracelular descelularizada sob a influência de estímulos químicos.(PORTER; RUCKH; POPAT, 2009)

Como foi mencionado, a fase inorgânica do osso é formada majoritariamente por derivados de fosfatos de cálcio. A familiaridade de diversos compostos de fosfato de cálcio com o tecido ósseo deve-se pela semelhança química existente com a HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, biocompatibilidade e baixa toxicidade.(PORTER; RUCKH; POPAT, 2009) Apesar da variedade de fosfatos de cálcio existentes, diversos estudos vêm apresentando resultados que apontam para o uso do CPP como um composto ideal para a construção de substitutos ósseos. Um estudo realizado por Tian et al. (2009) produziu *scaffolds* de CPP dopados com estrôncio (SCPP), e investigou a biocompatibilidade e osteogênese *in vivo* desses materiais. Para o estudo foram utilizados modelos de coelho e foram infligidos defeitos ósseos de 15 mm, que foram recobertos com CPP e SCPP. Os resultados mostraram que o SCPP participou da formação óssea ao serem encontradas uma grande quantidade de osteoblastos e osteócitos nas regiões vizinhas ao implante. Além disso, o CPP e o SCPP possibilitaram a recuperação dos ossos com defeito ao longo de 16 semanas, como é mostrado nas micrografias de raios X da figura 4. (TIAN et al., 2009)

Figura 4 - (a) Microradiografias do defeito ósseo em coelhos. Microradiografias do defeito ósseo enxertado com (b) SCPP e (c) CPP após 16 semanas.



Fonte: Adaptado de (TIAN et al., 2009)

Outros estudos foram reportados acerca do uso de CPP como biomaterial ósseo e suas propriedades. Xie et al. (2012) desenvolveu biocerâmicas de CPP dopadas com K e Sr e realizou ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios de citotoxicidade utilizando células semelhantes a osteoblastos humanos (MG63) mostraram que as biocerâmicas não apresentaram efeitos negativos na proliferação do MG63, indicando que esses materiais são biocompatíveis e não tóxicos para as células *in vitro*. Além disso, foram enxertados as biocerâmicas em modelos de coelhos. Os resultados deste ensaio, ao longo de 12 semanas, mostraram que o material não foi rejeitado pelo organismo do animal e que a densidade óssea do tecido reconstituído pela biocerâmica foi semelhante à densidade do osso hospedeiro. (XIE et al., 2012)

Os resultados apresentados por Xie et al. (2012) e Tian et al. (2009) corroboram com a ideia de utilizar o CPP como um precursor para o desenvolvimento de novos biomateriais baseados em polifosfato de cálcio para aplicações ósseas. Tais estudos mostraram que o CPP apresenta biocompatibilidade, baixa toxicidade frente a linhagens celulares semelhantes a células humanas, potencial osteoindutor, osteocondutor e osteointegração.

A busca por melhorias nos biomateriais voltados ao tecido ósseo vem atraindo a atenção para compostos, como o CPP, que apresentam porosidade e interconectividade entre os poros. Conforme a literatura, a porosidade e a interconectividade entre poros são parâmetros que podem auxiliar a migração celular nos interstícios do material, influenciando os processos de vascularização, crescimento celular e a taxa de crescimento ósseo. (SOPYAN et al., 2007; TRIPATHI; BASU, 2012) Os tamanhos dos poros também são fatores avaliados em estudos que desenvolvem materiais para o osso. Os macroporos contribuem para o processo de osteogênese celular, enquanto que os poros menores (microporos) aumentam a solubilidade de íons no meio e contribuem na fixação de osteoblastos. (WOODARD et al., 2007)

A porosidade é um parâmetro que afeta tanto a matriz biológica quanto a estrutura do material. O efeito da porosidade na estrutura e nas propriedades das biocerâmicas de CPP foram investigadas por Wang et al. (2011). A produção dos poros nos CPPs utilizou um agente espumante, o ácido esteárico, em diferentes quantidades para fornecer 5 sistemas: CPP0, CPP15, CPP30, CPP45 e CPP60, em conformidade com o efeito da porosidade (0%, 15%, 30%, 45% e 60%). Os resultados deste estudo mostraram que o aumento da porosidade influenciou na interconectividade entre os poros, ou seja, quanto maior a porosidade maior é a conexão entre os poros. Além disso, foi mostrado que a taxa de dissolução desses materiais aumenta com o crescimento da porosidade. (WANG; WANG; WAN, 2011)

A literatura apresenta uma diversidade de meios para a síntese de HAp e outros derivados de PoliP. São citadas técnicas de emulsão, hidrólise, co-precipitação, reações em estado sólido, técnicas de plasma, método sonoquímico, crescimento de cristal sob condições hidrotérmicas, hidrólise de camada de outros sais de fosfato de cálcio e cristalização sol-gel. (KOUTSOPOULOS, 2002; FIHRI et al., 2017) De forma a melhorar as propriedades dos materiais à base de polifosfato de cálcio, vêm sendo acrescentados cátions (SONG et al., 2009), polímeros (SWETHA et al., 2010), e nanopartículas metálicas (NI et al., 2018a) ao CPP. O acréscimo desses componentes resulta em mudanças na bioreabsorvibilidade, bioatividade, solubilidade, propriedades físicas e biológicas desses materiais. Estudos recentes vêm empenhando-se em desenvolver biomateriais ósseos ao adicionar substitutos catiônicos do Ca^{2+} , visando melhorias nas taxas de biodegradação, bioatividade e solubilidade de materiais à base de derivados de fosfato de cálcio. Por exemplo, Ren et al. (2010) desenvolveu

nanocristais de HAp substituídas com magnésio através do método de precipitação química por via úmida. O autor aponta que a substituição de Mg^{2+} na HAp promove alterações na cristalinidade, morfologia, estrutura e estabilidade térmica. Ao realizar adições de Mg^{2+} na HAp são observadas mudanças nos cristalitos, que apresentam-se menores e mais irregulares, modificando a cristalinidade e desestabilizando a estrutura da HAp. Conforme o estudo, a presença de Mg^{2+} promove a formação de grãos amorfos ou de baixa cristalinidade, influenciando a dissolução de apatita. (REN et al., 2010)

Os substitutos catiônicos utilizados mais comuns são Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} . O íon magnésio é uma espécie química que ocorre naturalmente no corpo em baixas concentrações, e está associado a processos de mineralização e crescimento ósseo ao influenciar a proliferação de osteoblastos na etapa de osteogênese. (LAURENCIN et al., 2011) Além disso, a insuficiência deste elemento afeta o metabolismo ósseo, aumentando a fragilidade óssea e diminuindo a atividade de osteoblastos e osteoclastos. (LANDI et al., 2006) Assim como o Mg^{2+} , o íon zinco (Zn^{2+}) é um oligoelemento envolvido no metabolismo ósseo, participando de processos de proliferação osteoblástica e de inibição de atividade osteoclástica, (OTSUKA et al., 2000; LI et al., 2009), sendo apontado também que sua deficiência no corpo humano pode apresentar-se como um risco para o desenvolvimento de osteoporose. (ILICH et al., 2000; LI et al., 2009) Um outro íon utilizado na construção de *scaffolds* baseados em HAp é o Sr^{2+} . É apontando que este elemento participa na renovação óssea, aumenta o número de osteoblastos e diminui o número e a atividade dos osteoclastos, estando associado a formação e a reabsorção óssea. (CANALIS et al., 1996; DAHL et al., 2001; PEMMER et al., 2013) Dessa forma, a incorporação de íons, como Mg^{2+} , Sr^{2+} e Zn^{2+} , em CPP vem se tornando sugestivo na construção de materiais biomiméticos voltados ao tecido ósseo, uma vez que estes íons participam de processos metabólicos e de reconstrução do osso humano.

Uma preocupação relativa a aplicação dos substitutos ósseos envolve a possibilidade do surgimento de infecções que os implantes podem provocar no organismo. Buscando minimizar ou inibir a atividade de microrganismos que atenuam processos infecciosos, alguns estudos visam dopar os *scaffolds* de HAp com nanopartículas metálicas que apresentam potencial antimicrobiano. (CIOBANU; ILISEI; LUCA, 2014) As nanopartículas mais conhecidas na literatura para esta aplicação são as nanopartículas de ouro (AuNP) e de prata (AgNP). As AuNPs são

conhecidas por apresentarem menor resposta imunológica e por interagir com cargas úteis de drogas. Enquanto que as AgNPs são conhecidas pelo alto potencial antimicrobiano que possuem frente a um amplo espectro de cepas bacterianas. (KIM et al., 2018)

1.3 POLÍMEROS

Os derivados de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ são comumente utilizados no tecido ósseo por apresentarem biocompatibilidade, osteocondutividade, bioatividade e afinidade química e biológica com o tecido ósseo. No entanto, esses compostos, incluindo o CPP, não apresentam propriedades mecânicas úteis para sua aplicação isolada no osso. (SAINI; BAGRI; BAJPAI, 2019) Levando em consideração as limitações do CPP, comumente são utilizados polímeros que agregam propriedades mecânicas e estrutural ao biomaterial. (SHANJANI et al., 2011; HE et al., 2012) A associação de polímeros com materiais cerâmicos é realizada através de técnicas de co-precipitação, mistura direta dos cristais minerais com a matriz polimérica e mineralização biomimética por imersão de matrizes poliméricas. (HE et al., 2012)

A escolha do polímero dependerá de alguns fatores, como biocompatibilidade, baixa toxicidade, estabilidade, propriedades mecânicas e de adesão que sustentem o material. (LIU; MA, 2004; SAINI; BAGRI; BAJPAI, 2019)

De modo geral, os polímeros são classificados em naturais e sintéticos. A literatura revela uma lista extensa de polímeros aplicados na construção de biomateriais ósseos. A tabela 3 lista alguns polímeros associados a publicações científicas que envolvem a construção desses biomateriais.

Tabela 3 - Polímeros utilizados em biomateriais ósseos.

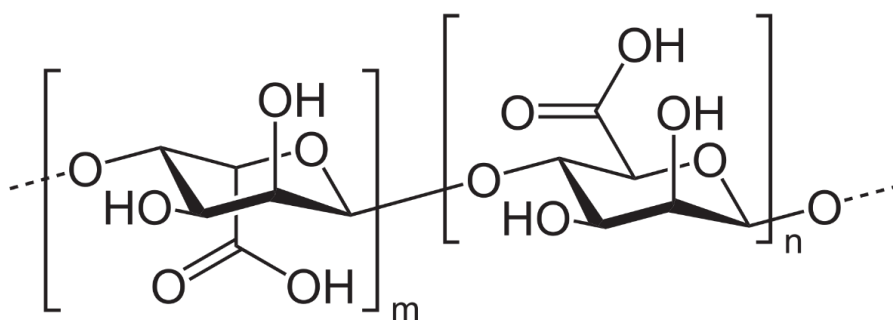
Polímero	Referência
Colágeno	(LEE et al., 2018; ZHANG et al., 2018)
Ácido polilático	(GRÉMARE et al., 2018; HASSANAJILI et al., 2019)
Álcool polivinílico	(CHAHAL et al., 2016; XU et al., 2020)
Celulose	(TORGBO; SUKYAI, 2018; MAHARJAN et al., 2021)
Alginato	(DIAZ-RODRIGUEZ et al., 2018; LUO et al., 2018)

Fonte: O autor (2021)

Comumente, os polímeros naturais são mais vantajosos que os polímeros sintéticos por serem biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos e existirem em abundância na natureza.(COVIELLO et al., 2007) Muitos polímeros naturais são responsáveis por prover estrutura a um dado sistema, como o caso do colágeno que atua como um suporte mecânico para os tecidos conjuntivos; ou como a seda, que implica na resistência das teias de aranha; e até mesmo a quitina que está presente no exoesqueleto de moluscos.(BARBOSA et al., 2005)

O alginato é um dos polímeros mais utilizados como biomaterial. Como os demais exemplos, este composto é um polímero natural e polissacarídeo formado por dois monômeros: os ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico, como mostra a figura 5. Na forma desprotonada, o poliânion alginato pode formar soluções aquosas quando está associado a íons de metais monovalentes, como Na^+ e K^+ . (BARBOSA et al., 2005; SUN; TAN, 2013)

Figura 5 - Estrutura química do alginato. Os subscritos m e n indicam o grau de polimerização dos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico, respectivamente.

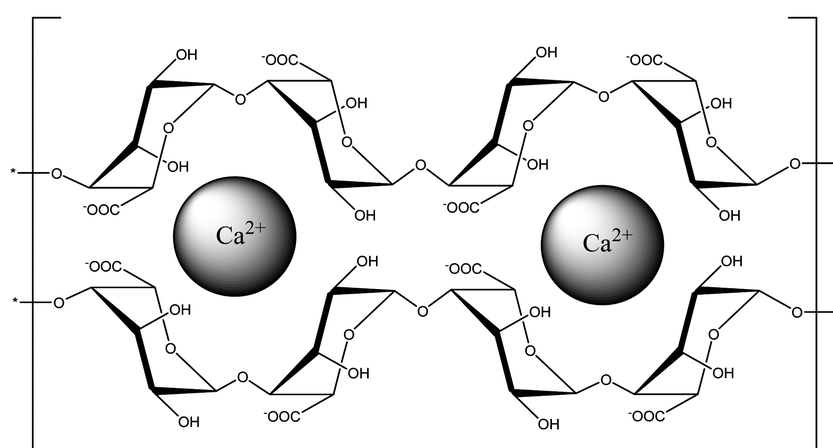


Fonte: O autor (2021)

A literatura relata que o alginato é um polímero biocompatível, atóxico, bioestável, hidrofílico e não imunogênico. Além disso, esse composto tem uma abundância de fontes de obtenção e baixos preços, tendo aplicações industriais (como espessante e agente emulsificante) e biomédicas (como matriz orgânica para substitutos ósseos).(VENKATESAN et al., 2015; VARAPRASAD et al., 2020) Além disso, o alginato interage com uma variedade de íons metálicos através de interações eletrostáticas, ligações covalentes, reações redox e de coordenação. (VARAPRASAD et al., 2020)

Uma abordagem bastante utilizada na literatura é o preparo de hidrogéis de alginato. Comumente são aproveitadas as habilidades do alginato em quelar metais bivalentes (figura 6), como aborda Voo et al. (2016) ao preparar hidrogéis de cálcio com alta rigidez e comportamento de dissolução prolongado. (VOO et al., 2016) A associação de alginato com Ca^{2+} pode fornecer sistemas com propriedades mecânicas úteis para aplicações ósseas, podendo ser agregadas a matrizes inorgânicas, como as formadas por CPP, para constituir um biomaterial ósseo.

Figura 6 - Complexo de alginato de cálcio formado através da interação entre o ânion α -L-gurulonato e o cátion Ca^{2+} .



Fonte: Adaptado de (MARRIOTT et al., 2014)

Em um trabalho envolvendo HAp e Alg, Dubnika et al. (2016) desenvolveu um sistema para liberação controlada de lidocaína e íons prata a partir de *scaffolds* dopados com Ag. Para este estudo, foram produzidos os *scaffolds* densos de HAp/Ag por meio de duas rotas de precursores. Na rota A, o preparo do *scaffold* HAp/Ag-A utilizou óxido de cálcio, ácido fosfórico e nitrato de prata. Enquanto que na rota B, o *scaffold* HAp/Ag-B utilizou nitrato de cálcio tetra-hidratado, fosfato de amônio dibásico, nitrato de prata e solução de hidróxido de amônio. Ambos os *scaffolds* foram produzidos por sinterização. Além disso, foram preparados *scaffolds* porosos (HAp/Ag-A poroso e HAp/Ag-B poroso) também por sinterização e utilizando os mesmos conjuntos de precursores citados nas rotas A e B, havendo a adição de glicerol, água deionizada e NH_4HCO_3 em ambos. Após o preparo desses materiais, os *scaffolds* porosos HAp/Ag (A e B) foram impregnados e revestidos diferentemente com soluções de lidocaína, alginato e quitosana para obter os sistemas

HAp/Ag/polímero/droga. Dubnika utilizou os scaffolds densos e porosos HAp/Ag-A e HAp/Ag-B para avaliar a taxa de liberação de íons Ag^+ *in vitro*. Neste ensaio foi utilizado um fluido corporal simulado (SBF), no qual 3 replicatas de cada *scaffold* foram mantidas em 15 mL de SBF. As medidas de liberação de Ag^+ foram feitas tomando 2 mL dos sistemas em SBF em 1, 6, 24 e 48h, e 15, 34, 111, 184 e 360 dias. Conforme as curvas de cinética, foi observado que desde os primeiros dias de análise os *scaffolds* HAp/Ag-B poroso e HAp/Ag-B denso apresentaram taxas de liberação de Ag^+ mais acentuadas, enquanto que os HAp/Ag-A poroso e HAp/Ag-A denso apresentaram taxas menores. Após 360 dias, as taxas de liberação de Ag^+ seguiam a seguinte ordem decrescente: HAp/Ag-B poroso > HAp/Ag-B denso > HAp/Ag-A poroso > HAp/Ag-A denso. Foi realizado também um estudo sobre a liberação *in vitro* de lidocaína em SBF. O estudo foi acompanhado em 0,5; 1; 2; 4; 8 e 24 h, e em intervalos de 24 h por 14 dias. A medição de lidocaína foi feita com alíquotas colhidas dos sistemas em SBF, que eram levadas para análise em HPLC para detectar o conteúdo da droga. Conforme os ensaios, os scaffolds HAp/Ag-A/alginate/lidocaína/alginate, HAp/Ag-B/alginate/lidocaína/alginate, HAp/Ag-A/lidocaína/quitosana/alginate e HAp/Ag-B/lidocaína/quitosana/alginate mostraram que a droga foi totalmente liberada entre 10 e 36 h. Foi visto que a liberação de lidocaína pode ser controlada ao revestir 2 vezes os *scaffolds* com alginate de sódio, aumentando a taxa de liberação para 25 a 360 h. Conforme este estudo, o uso de revestimentos poliméricos pode afetar as taxas de liberação, podendo ser útil clinicamente para um rápido efeito analgésico e uma lenta liberação do agente antibacteriano. (DUBNIKA et al., 2017)

1.4 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A nanociência é um campo de pesquisa que vem crescendo ao longo das últimas décadas. São reportados o desenvolvimento de materiais com dimensões cada vez menores e que apresentam mudanças em suas propriedades em função da redução do seu tamanho. Convencionalmente, o termo nanomaterial é aplicado para descrever um material que apresenta pelo menos uma dimensão entre 1 e 100 nm. (PERALTA-VIDEA et al., 2011)

As nanopartículas metálicas (NPs) são um dos nanomateriais mais estudados e reportados na literatura, sendo comumente associadas a metais como Ag, Au e Cu. Dentre elas, destacam-se as nanopartículas de prata (AgNP) que apresentam uma variedade de morfologia, tamanho e revestimento. O conjunto de características

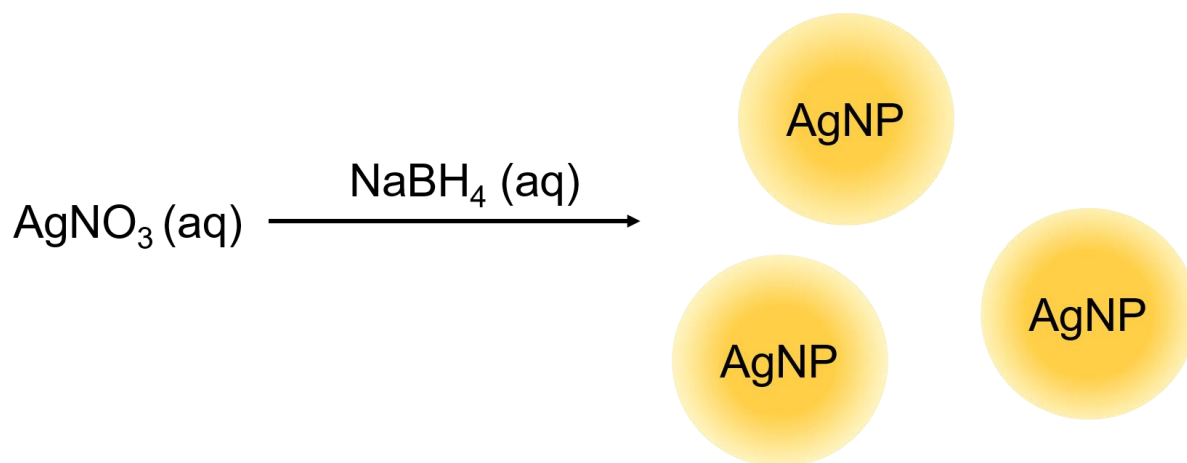
físicas e químicas das AgNPs são responsáveis pelas propriedades ópticas, magnéticas, eletrônicas, catalíticas e antibacterianas que possuem. Dessa forma, as AgNPs estão associadas em processos de desenvolvimento e produção de sensores (PANDEY; GOSWAMI; NANDA, 2012), células fotovoltaicas (NEOPHYTOU et al., 2012) e catálise (PRADHAN; PAL; PAL, 2002).

A versatilidade das aplicações é proporcional a variedade de metodologias de síntese que as AgNPs apresentam na literatura. São reportados trabalhos que utilizam métodos físicos, químicos e biológicos para a síntese dessas nanoestruturas.(BEYENE et al., 2017) Entre os métodos físicos, a ablação a laser é uma das técnicas mais utilizadas para síntese de NPs, como mostra Pyatenko et al. (2004) ao sintetizar AgNPs em água por ablação a laser utilizando um laser de 532 nm, e produzindo AgNPs com um tamanho entre 2-5 nm.(PYATENKO et al., 2004) Os métodos químicos são bastante abordados na síntese de nanoestruturas de prata, nos quais são encontrados em trabalhos metodologias que envolvem redução química, técnicas de microemulsão e síntese assistida por micro-ondas. E apesar dessa variedade de técnicas, a redução química é uma das mais conhecidas devido a sua simplicidade e pela utilização de equipamentos básicos de laboratório. (BEYENE et al., 2017)

A síntese de AgNP por redução química comumente utiliza precursores do metal, agentes redutores e estabilizadores. Em geral, diferentes agentes redutores são utilizados neste método, tais como citrato de sódio, ascorbato, boro-hidreto de sódio (NaBH_4) e glicose.(SYAFIUDDIN et al., 2017) Compostos poliméricos têm sido reportados como agentes estabilizadores, nos quais pode-se citar o álcool polivinílico (PVA), polietileno glicol (PEG) e o polimetilmetacrilato. (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015; DÍAZ-CRUZ et al., 2016)

Durante a síntese das AgNPs por redução química, os agentes redutores são responsáveis pela redução dos íons Ag^+ em Ag^0 , seguida da nucleação das AgNPs promovendo a formação de um sistema coloidal, como ilustra a figura 7. Subsequente a isso, ocorre a estabilização da carga superficial das NPs por meio da ligação ou interação dos agentes estabilizadores com a superfície da NP. Os agentes estabilizadores são responsáveis por manter as nanoestruturas afastadas, impedindo assim sua agregação e precipitação. (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015)

Figura 7 - Esquema de reação entre AgNO_3 e NaBH_4 , em meio aquoso, para a formação de AgNPs.

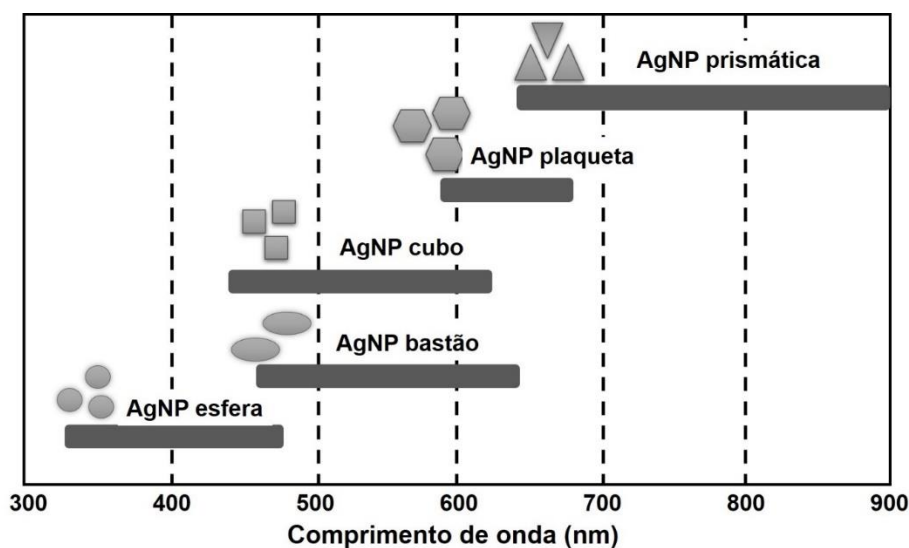


Fonte: O autor (2021)

A forma e o tamanho das AgNPs são dependentes fortemente dos estágios iniciais de nucleação e crescimento, que por sua vez dependem das condições de reação, como temperatura, pH, concentração, tipo de precursores e vários outros parâmetros de reação. A uniformidade dos parâmetros físico-químicos é determinante para a síntese de AgNPs monodispersas. (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015; LEE; JUN, 2019)

As AgNPs são nanoestruturas que podem apresentar morfologias esféricas, cúbicas, prismáticas e outras. Conforme Pileni (2011), mudanças na morfologia e no tamanho das AgNPs são responsáveis por variações nas bandas de extinção desses materiais, como mostra a figura 8. (PILENI, 2011).

Figura 8 - Esquema de espectro relacionando a morfologia com o intervalo das bandas de extinção de AgNPs.



Fonte: (SILVA, 2020)

Os estudos que envolvem as AgNPs caracterizam esses sistemas em termos de sua forma, distribuição de partículas, solubilidade, área superficial, cristalinidade e agregação. Usualmente, são utilizadas as seguintes técnicas de caracterização: espectroscopia de absorção no UV-Vis, microscopia eletrônica de transmissão (TEM), difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta. (MUKHERJI et al., 2019)

No campo das ciências da saúde, as AgNPs são destacadas pelo potencial antimicrobiano que possuem, podendo ser incorporadas em dispositivos médicos, dentre eles os enxertos ósseos (*scaffolds*, cerâmicas, compósitos). Diversos estudos revelam a eficácia da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata em: (a) bactérias, como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (JUBY et al., 2012; TAHERI et al., 2014; SHAO et al., 2015), (b) fungos, como *Candida albicans* e *Rhizoctonia solani* (ELGORBAN et al., 2016; MERAN et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2019) e (c) vírus como o HIV-1 (ELECHIGUERRA et al., 2005).

A toxicidade apresentada pelas AgNPs está associada às suas propriedades físico-químicas, que são influenciadas pela morfologia, tamanho, química de superfície, distribuição das partículas e efeito da dose. (SALLEH et al., 2020) Um

estudo desenvolvido por Liu et al. (2010) avaliou o efeito do tamanho das AgNPs em linhagens celulares humanas e sua correlação com a toxicidade. A avaliação utilizou três nanopartículas comerciais (5, 20 e 50 nm), e quatro linhagens celulares: células epiteliais de adenocarcinoma (A549), células de câncer de estômago humano (HepG2), células de carcinoma hepatocelular humano (SGC7901) e células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). Estes autores verificaram que todas as AgNPs com tamanho de 5 nm apresentaram um efeito tóxico maior, em comparação com as AgNPs de 20 e 50 nm, sendo concluído que há uma relação entre a toxicidade e o tamanho dessas NPs (LIU et al., 2010). Comumente, entende-se que a toxicidade das AgNPs pode ser afetada pelo tamanho da partícula, pois quanto menor for a nanopartícula maior será a sua penetração celular, assim como terá uma maior área superficial em contato com a célula.

A morfologia das nanopartículas também surge como um fator para a toxicidade. Por exemplo, AgNPs prismáticas apresentam atividade antibacteriana maior em comparação com as AgNPs de forma de bastão e esférica. Isso ocorre devido a maior densidade de Ag que as AgNPs prismáticas possuem no seu plano de rede (111). (MORONES et al., 2005; SUKDEB; KYUNG; MYONG, 2007; TAK et al., 2015)

Os mecanismos que envolvem a propriedade bactericida das nanopartículas de prata ainda não são totalmente compreendidos pelo meio científico. Segundo Marambio-Jones (2010), os principais argumentos propostos envolvem (a) a ausência da síntese de ATP e replicação de DNA após a absorção de prata iônica; (b) a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) causada pela presença de Ag^+ e AgNP; e (c) danos à membrana celular. (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010)

1.5 APLICAÇÕES DE AgNPs EM SCAFFOLDS ÓSSEOS

1.5.1 *Scaffolds* de HAp e AgNPs

Diante das propriedades antibacterianas que as nanopartículas metálicas apresentam, em especial a AgNP, somando com as propriedades biocompatíveis e bioativas da HAp e demais derivados de fosfato de cálcio, pesquisas recentes vem investigando a combinação desses dois materiais para o desenvolvimento de dispositivos médicos voltados para o tecido ósseo.

Ni e coautores desenvolveram nanocompósitos porosos de HAp decorados com nanopartículas de prata. Resumidamente, para produzir a HAp foram utilizadas soluções de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e P_2O_5 - preparadas em uma mistura de água e etanol. Aplicando condições específicas, a solução de P_2O_5 foi gotejada na solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e mantida em pH 10 por meio da adição de $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. A solução foi resfriada, centrifugada e lavada. Os nanocompósitos HAp-AgNPs foram preparados misturando os pós de HAp e o reagente de Tollens, seguida da adição de ácido tânico, em condições específicas de reação. Através das imagens de TEM, os autores relataram a formação *in situ* de AgNP na superfície de HAp, sendo possível visualizar uma maior quantidade de AgNP no nanocompósito de razão molar 10:3 em comparação com os demais materiais. Além disso, os nanocompósitos com a proporção 10:3 apresentaram AgNP menores diâmetros (5,8 nm), o que pode indicar um maior potencial de atividade antimicrobiana. Sendo assim, o nanocompósito HAp:Ag 10:3 foi usado como uma amostra representativa para as análises seguintes. Este material apresentou poros com um tamanho médio em torno de 19 nm.

Os autores realizaram testes de atividade antibacteriana pelo método de diluição em caldo e pelo método de difusão em papel de filtro, utilizando cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. No método de diluição em caldo, foram utilizados 3 sistemas, as AgNPs de 400 nm, HAp e HAp-AgNPs 10:3, nos quais foram obtidos os valores da concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC). O parâmetro MIC indica a menor concentração da amostra com potencial de inibir o crescimento de bactéria, enquanto que MBC indica a menor concentração da amostra útil para eliminar 99,9% das bactérias em um intervalo de incubação. Os dados referentes ao MIC e MBC estão apresentados na tabela 4. Estes autores observaram que os nanocompósitos HAp-AgNPs apresentaram menores valores de MIC em comparação com as AgNPs de 400 nm e a HAp pura. Além disso, os valores de MBC mostraram que os nanocompósitos contendo prata apresentaram os menores valores de concentração. Tais resultados sugerem que os nanocompósitos HAp-AgNPs apresentam potencial antimicrobiano. Ainda assim, o método de difusão em papel filtro foi aplicado, e neste ensaio, foram utilizadas 4 concentrações de HAp (1000, 500, 250 e 125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e de HAp-AgNPs 10:3 (125, 62.5, 15,6 e 7,8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Os resultados deste ensaio revelaram que a HAp apresentou halos de inibição de atividade microbiana de baixo diâmetro, apenas nas concentrações acima de 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Enquanto que o material HAp-AgNPs apresentou sinais de inibição de

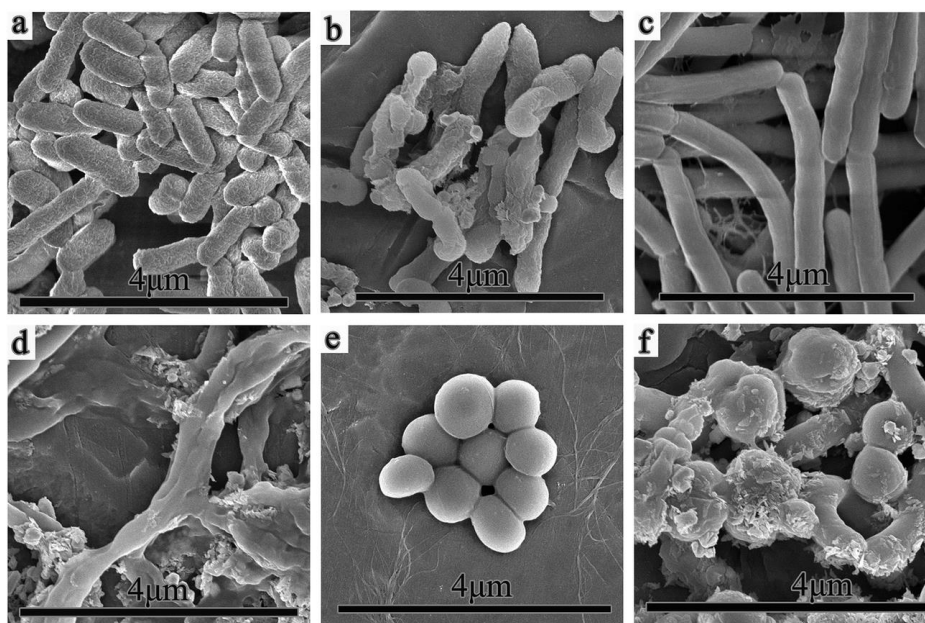
atividade microbiana a partir da concentração $15,6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, indicando que mesmo em baixas concentrações os nanocompósitos são um potencial inibidor de atividade microbiana. Ni e coautores também avaliaram o potencial desses nanocompósitos em deformar a morfologia por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias revelaram deformações nas 3 cepas bacterianas (figura 9). No geral após o tratamento com HAp-AgNPs, as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* apresentaram deformações nas morfologias das células bacterianas e maior grau de aspereza na superfície. Foi observado também que as cepas de *E. coli* apresentaram fragmentação das células bacterianas. (NI et al., 2018)

Tabela 4 - Valores de MIC e MBC das dos nanocompósitos de HAp e AgNP.

Bactéria	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. coli</i>	7,8	15,6
<i>P. aeruginosa</i>	15,6	32,5
<i>S. aureus</i>	3,9	7,8

Fonte: (NI et al., 2018)

Figura 9 - Micrografias de MEV das bactérias normais e tratadas com $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$ de solução de nanocompósitos HAp-Ag para *E. coli* (a e b), *P. aeruginosa* (c e d) e *S. aureus* (e e f).



Fonte: (NI et al., 2018)

Um estudo realizado por Silva-Houguín (2020) visou avaliar o potencial antibacteriano de compósitos baseados em HAp e AgNP em culturas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *K. oxytoca*, *S. aureus* e *S. mutans*. O autor sintetizou as AgNP utilizando ácido gálico como agente redutor da espécie Ag^+ , enquanto que os pós de HAp foram sintetizados pelo método sol-gel. O compósito HAp-AgNP foi preparado misturando os pós de HAp e as soluções de AgNP para obter 4 sistemas com diferentes concentrações de AgNP adsorvidas (0,5; 1; 2,5 e 5 mM). A atividade antibacteriana pelo método de difusão de disco revelou uma dependência do halo de inibição em função da concentração de AgNP. Os compósitos HAp-AgNP 5 mM apresentaram maior halo de inibição em comparação com os demais compósitos com concentração de AgNP de 0,5; 1 e 2,5. No entanto, não foram observadas mudanças nos halos de inibição das bactérias *E. coli* e *S. mutans* em função do aumento da concentração de AgNP dos compósitos. Neste mesmo estudo, a atividade antibacteriana foi avaliada também por turbidimetria, no qual observou-se percentagens de inibição variáveis entre cada bactéria, tendo a *P. aeruginosa* a maior inibição de atividade entre as demais. (SILVA-HOLGUÍN; REYES-LÓPEZ, 2020)

Paterson et al. (2020) também avaliaram o potencial antimicrobiano de *scaffolds* contendo AgNP, dessa vez produzidos por eletrofiação. Os *scaffolds* foram preparados com 0, 2, 5 e 10% molar de Ag. Conforme os testes de difusão em ágar, os *scaffolds* contendo AgNP inibiram a atividade das bactérias *E. coli* e *S. aureus* nos ensaios, ao apresentar halos de inibição em torno dos discos contendo os materiais eletrofiados. O efeito tóxico dessas nanopartículas contra bactérias torna-se ainda mais evidenciado quando os resultados dos *scaffolds* HAp-AgNP são comparados com materiais contendo apenas HAp, que não apresentaram evidências de inibição de atividade microbiana. Além disso, foi avaliada a citotoxicidade dos *scaffolds* em células-tronco mesenquimais (MSCs) de ratos primários e linhagens celulares 3T3 de fibroblastos. Os resultados desse teste apresentam indícios de toxicidade de compósitos com maior concentração de AgNP (10% molar de Ag), indicando que em altas concentrações os *scaffolds* HAp-AgNP podem apresentar um potencial tóxico para células saudáveis. Ao realizar um estudo de diferenciação osteogênica de MSCs primários em um período de 21 dias, Paterson et al. observaram que os compósitos de HAp associada com AgNP promoveram o desenvolvimento das populações de células viáveis. Além disso, os resultados apontam que a combinação de HAp com AgNP 5% molar teve um aumento acentuado na atividade metabólica das MSCs, mas

a atividade celular decai quando são aplicados os *scaffolds* com AgNP 10% molar.(PATERSON et al., 2020)

Em uma outra abordagem, Calabrese e coautores (2021) sintetizaram fotoquimicamente AgNPs na superfície de *scaffolds* de HAp e magnésio (Mg-HAp). Para produzir os *scaffolds* contendo Ag (Ag-Mg-HAp), os autores obtiveram Mg-HAp comercialmente. A metodologia consiste em mergulhar o Mg-HAp numa solução acetilacetato de prata (Ag(acac)), seguida da adição de acetona. O meio reacional foi desgaseificado com Ar e irradiado por 4 fontes de iluminação UV de 254 nm. Ao caracterizar as amostras de Ag-Mg-HAp por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX) foi confirmada a presença de Ag nos *scaffolds*. Para complementar esses resultados, foram realizadas análises de MET e UV-Vis que mostraram AgNPs com diâmetro de 20 nm e uma banda em 420 nm, respectivamente, confirmando a presença de nanopartículas de prata nos *scaffolds* Ag-Mg-HAp. Os autores também avaliaram as morfologias de Mg-HAp e Ag-Mg-HAp por meio de imagens de MEV, no entanto, não foram observadas mudanças morfológicas ao adicionar AgNP nos *scaffolds* Mg-HAp. Calabrese também realizou um estudo *in vitro* sobre a propriedade antibacteriana dos *scaffolds* de Mg-HAp decorados com AgNP. Neste estudo foram utilizadas cepas de *E. coli* e *S. aureus* suspensas e aderidas, e os Mg-HAp e Ag-Mg-HAp. As suspensões foram distribuídas em placas de 24 poços por um período de incubação de 24 e 48 h, no qual um poço foi separado como controle positivo (CTR+). Na incubação de 24 h, o número de colônias de bactérias testadas na presença de Ag-Mg-HAp foi reduzido em aproximadamente 6 logaritmos, em comparação com os *scaffolds* sem AgNP. Enquanto que as suspensões incubadas por 48 h não apresentaram valores de CFU/mL. Esses resultados são compatíveis com os testes de adesão, no qual apresentaram uma diminuição do valor de CFU/mL para a incubação em 24 h e ausência de CFU/mL para a incubação em 48 h. Calabrese também estudou o potencial citotóxico dos *scaffolds* Ag-Mg-HAp ao avaliar a proliferação e diferenciação celular de células tronco humanas (hADSCs) cultivadas nesses materiais. A avaliação dos resultados foi realizada em 0, 7 14 e 24 dias. Os resultados dos ensaios revelaram um efeito citotóxico dos *scaffolds* nanofuncionalizados com Ag, no qual foi observado que com o passar do tempo o número de células na superfície do material decrescia significativamente. Tais resultados indicam um potencial tóxico do Ag-Mg-HAp ao entrar em contato com hADSCs. Para Calabrese, as principais causas do decréscimo do número de hADSC

está associado com: (a) os íons Ag^+ em meio intracelular que podem causar a produção de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), provocando o estresse oxidativo em células saudáveis e (b) as propriedades físico-químicas das AgNP, como tamanho, forma, concentração e etc. (CALABRESE et al., 2021)

1.5.2 *Scaffolds* de HAp, alginato e AgNPs

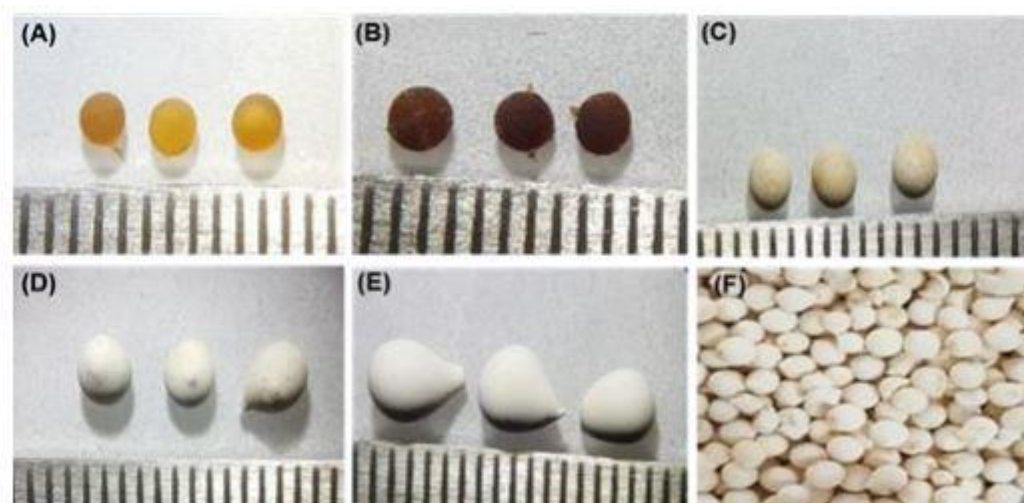
As propriedades mecânicas são um fator importante para o desenvolvimento de materiais aplicáveis para o tecido ósseo. Diante disso, uma alternativa é a utilização de polímeros que forneçam tal conjunto de propriedades. Entre os biopolímeros mais utilizados está o alginato (Alg) que apresenta propriedades biocompatíveis e físico-químicas

Porreli et al. (2017) prepararam microesferas de HAp/alginato/AgNPs. Os AgNPs foram preparados previamente, utilizando ácido ascórbico para reduzir os íons prata na presença de quitosana modificada com lactose (chitlac). Esses AgNPs-chitlac foram misturados com alginato e HAp para obter micropérolas de hidrogel de HAp/Alg/AgNPs-chitlac, com um tamanho médio de 990 μm . E, para comparação, os autores também prepararam microesferas sem os AgNPs (HAp/Alg/chitlac) com o mesmo diâmetro. Após a secagem, as microesferas reduziram significativamente seu tamanho, originando microesferas em torno de 250-270 μm . Para estudar a estabilidade dos materiais, as microesferas secas foram imersas em um fluido de condições fisiológicas conhecido como fluido corporal simulado (SBF), e foi observado o inchaço dos compósitos sem sinais de degradação. A atividade antibacteriana HAp/Alg/AgNPs-chitlac foi estudada incubando bactérias *S. aureus*, *P. aurigenosa* ou *S. epidermis* com as microesferas secas. Após 4 h, foi observada uma redução significativa nas unidades formadoras de colônias de bactérias (UFC) para *S. aureus*, *P. aurigenosa* ou *S. epidermis*. Sendo necessário 24 h para o HAp/Alg/AgNPs-chitlac mostrar um efeito antibacteriano significativo. Esses autores também estudaram o efeito citotóxico das microesferas na linhagem de osteoblastos (MG-63), por 24 e 72 h, observando que as células mantinham sua viabilidade na presença desses materiais. Os resultados indicam que esses compósitos podem ter potencial para serem utilizados em estudos de regeneração óssea. (PORRELLI et al., 2018)

Dalavi et al. (2020) desenvolveram microesferas a partir de quitooligossacarídeo (COS), AgNP, alginato e HAp (figura 10) e avaliaram suas

potenciais aplicações no tecido ósseo. Neste trabalho, os autores prepararam AgNPs revestidas com o agente estabilizador COS (COS-AgNP) por meio do método de irradiação assistida por micro-ondas. Para preparar as microesferas, foi adicionado alginato a uma solução contendo COS-AgNP, e em seguida foi adicionado 1, 2 ou 3 g de HAp, para formar 3 sistemas diferentes: COS-Ag-Alg-HAp1, COS-Ag-Alg-HAp2 e COS-Ag-Alg-HAp3. Por fim, com o auxílio de uma seringa este sistema foi gotejado em uma solução de CaCl_2 para formar as microesferas. Outros sistemas também foram preparados sem o acréscimo de hidroxiapatita, como microesferas COS-Alg e COS-Ag-Alg. Os materiais preparados foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM), que revelou que as microesferas possuíam um tamanho de 1,5 a 4,0 μm . Ensaio mecânicos também foram feitos, a fim de avaliar a resistência a compressão dessas microesferas para serem utilizadas como suportes mecânicos para o osso. Conforme os ensaios de resistência mecânica, os *scaffolds* COS-Ag-Alg-HAp1, COS-Ag-Alg-HAp2 e COS-Ag-Alg-HAp3 mostraram valores de resistência a compressão iguais a 22,14, 54,27 e 76,89 MPa, respectivamente. No entanto, esses resultados estão abaixo do valor de resistência a compressão que o osso possui, cerca de 170 MPa. Estes autores avaliaram a atividade antibacteriana por meio do método de microdiluição em caldo, para determinar a MIC contra cepas de *S. aureus*. Os ensaios utilizaram as seguintes concentrações de amostras: 100, 500, 1000, 3000 e 5000 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados apontaram que o *scaffold* COS-Ag-Alg-HAp1 apresentou concentrações inibitórias mínimas entre 16,3 – 77,25%, no intervalo de 100 a 3000 $\mu\text{g/mL}$. O *scaffold* COS-Ag-Alg-HAp2 apresentou MIC igual a 10,5 – 58,7%, no intervalo de concentração de 100 a 3000 $\mu\text{g/mL}$. Por fim, o COS-Ag-Alg-HAp3 apresentou uma MIC entre 18,5 e 69,8%, conforme o intervalo de concentração correspondente a 100 – 3000 $\mu\text{g/mL}$. Todos os ensaios de atividade bacteriana apresentaram uma queda do valor de MIC. Os autores também estudaram a proliferação e biocompatibilidade celular *in vitro* usando células MG-63 semelhantes a osteoblastos humanos. Os resultados revelaram que as microesferas apresentaram viabilidade celular próxima de 100%, o que indica que *scaffolds* desse tipo são biocompatíveis e não tóxicos para a linhagem celular MG-63. O dano à membrana celular dessas células foi investigada usando o corante laranja de acridina e brometo de etídio (AO/EB), que revelou a ausência de células mortas.(DALAVI et al., 2020)

Figura 10 - Microesferas de HAp, quitooligossacarídeo (COS), AgNP e alginato.



Fonte: (DALAVI et al., 2020)

1.5.3 Scaffolds de HAp, AgNPs e demais polímeros

No Anexo A pode ser encontrado um artigo de revisão, que está em fase de preparação, onde o autor apresenta os compósitos baseados em HAp, polímeros diversos e AgNPs preparados nos últimos 5 anos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este projeto visa desenvolver materiais compósitos baseados em polifosfato de cálcio, alginato e nanopartículas de prata, no qual apresentem propriedades químicas, físicas, mecânicas e biológicas adequadas para sua aplicação como substituto ósseo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Síntese e avaliação das condições experimentais de AgNPs.
- 2) Caracterização das AgNPs por meio de espectroscopia vibracional no UV-Vis, potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz e microscopia eletrônica de transmissão.
- 3) Realização de ensaios *in vitro* de inibição de atividade bacteriana das AgNPs.
- 4) Produção dos materiais compósitos à base de polifosfato de cálcio, alginato e nanopartículas de prata.
- 5) Caracterização dos materiais compósitos utilizando espectroscopia vibracional no infravermelho e Raman, microscopia de eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva, e difratometria de raios x.
- 6) Realização de ensaios *in vitro* de inibição de atividade antibacteriana dos materiais compósitos.

3 METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho divide-se em (a) síntese das nanopartículas de prata, (b) atividade antibacteriana das AgNPs, (c) produção dos materiais compósitos e (d) equipamentos e técnicas de caracterização.

3.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

3.1.1 Reagentes e solventes

A síntese das AgNPs utilizou água ultrapura, nitrato de prata (AgNO_3 , Sigma Aldrich), citrato de sódio tribásico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Dinâmica), boro-hidreto de sódio (NaBH_4 , Sigma, $M_w = 89000 - 98000$, 99%), hexametáfosfato de sódio (Sigma Aldrich), e alginato de sódio (Química Contemporânea).

3.1.2 Codificação das AgNPs

As nanopartículas de prata foram codificadas com a finalidade de facilitar a identificação dos sistemas sintetizados em laboratório. Os códigos são formados pela seguinte estrutura: AgNP - volume de solução de AgNO_3 - polímero- reprodução. Ao adotar um exemplo, tem-se que a amostra AgNP-11-PP-2 foi sintetizada utilizando 11 mL de AgNO_3 , uma solução aquosa de hexametáfosfato de sódio e que esta amostra é a segunda reprodução de uma triplicata.

3.1.3 Procedimento experimental

Foram preparadas as soluções aquosas de AgNO_3 $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, PP 500 mg.L^{-1} e alginato 500 mg.L^{-1} e NaBH_4 10 mmol.L^{-1} . O preparo da solução de NaBH_4 foi antecedida de uma fase de aquecimento do reagente a 60°C durante 2 horas na estufa.

(a) Síntese das AgNP contendo PP

A síntese foi iniciada com as adições de 25 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; 1,250 mL da solução PP 500 mg.L^{-1} e 1,500 mL de NaBH_4 10 mmol.L^{-1} , realizando as adições com intervalo de 1 minuto. O sistema foi homogeneizado a 700 rpm sob temperatura ambiente. Após 1 minuto, foi realizada a adição por gotejamento lento da solução de AgNO_3 $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ao meio reacional. Os volumes de AgNO_3 utilizados foram 10, 11, 12, 13 e 14 mL de modo que foram obtidos 5 sistemas

diferentes. As sínteses foram realizadas em triplicata para cada valor de volume de AgNO_3 .

(b) Síntese das AgNP contendo alginato

A síntese foi iniciada com as adições de 25 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,5 mmol.L⁻¹; 1,250 mL da solução PP 500 mg.L⁻¹ e 1,500 mL de NaBH_4 10 mmol.L⁻¹, realizando as adições com intervalo de 1 minuto. O sistema foi homogeneizado a 700 rpm sob temperatura ambiente. Após 1 minuto, foi realizada a adição por gotejamento lento da solução de AgNO_3 0,5 mmol.L⁻¹. Os volumes de AgNO_3 utilizados foram 14, 15, 16 e 17 mL de modo que foram obtidos 4 sistemas diferentes. As sínteses foram realizadas em triplicata para cada valor de volume de AgNO_3 .

3.1.4 Caracterização das nanopartículas de prata

As AgNPs foram caracterizadas utilizando espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível, compreendendo uma faixa entre 300-500 nm, através do espectrofotômetro modelo Evolution 600s (Thermo Scientific®).

Foram determinados os potenciais zeta de superfície e a distribuição de tamanho por espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês: *dynamic light scattering*) das AgNPs por meio do equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Analítica). Para realizar as análises, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 30 min numa microcentrífuga (MiniSpin®, fabricante: Eppendorf) para separar e concentrar as nanopartículas do meio. Em seguida, cerca de 100 µL das AgNPs foram dissolvidas em 1 mL de água ultrapura e levadas para análise do potencial zeta e DLS.

Para determinar a morfologia das nanopartículas, foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para obter as micrografias foi operado o microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin com resolução de 0,34 nm e sob tensão de 20kV a 120kV. O microscópio foi equipado com câmeras CCD MegaView Olympus 2K e Eagle 4K, bem como software para captura de imagens Tecnai Imaging & Analysis (TIA) da FEI. Habilitado para análise da ultra-estrutura de amostras em 2D.

3.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS AgNPs

3.2.1 Materiais

As vidrarias e meios de culturas foram esterilizados em autoclave vertical modelo AV-50, capacidade 50 litros, fabricante Phoenix Luterco. As condições utilizadas para esterilização no equipamento foram: 1,2 kgf/cm² e 121°C.

3.2.2 Padronização do inóculo

As cepas utilizadas foram obtidas do Laboratório de Análises Microbiológicas da UFPE (LAM-UFPE). As bactérias utilizadas foram *Escherichia coli* ATCC 8759 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6536.

Foi preparado o caldo Mueller Hinton em água deionizada (KASVI, lote 052219506, referência K25-610034). Ao dissolver o pó, o sistema foi esterilizado em autoclave a 121 °C e 1.2 kgf/cm² por 15 min para evitar qualquer contaminação. Em seguida, em uma capela de fluxo laminar, 10 mL do caldo Mueller Hinton estéril foram transferidos para tubos Falcon. Nesses tubos, as bactérias foram inoculadas separadamente e foram mantidas numa estufa de cultura bacteriológica sob (37 ± 2,5)°C durante 24 horas para promover a incubação das bactérias.

Ao decorrer as 24 horas, os inóculos foram retirados da estufa e cerca de 2 mL foram recolhidos para análise por espectroscopia no UV-Vis. As suspensões foram analisadas até que se obtivesse uma densidade óptica de 0,08 a 0,1 no comprimento de onda de 600 nm, no qual indica uma concentração de 10⁸ UFC/mL. As amostras que apresentaram valores de absorbância fora da faixa de 0,08 e 0,1 u.a. foram corrigidas com caldo Mueller Hinton e analisadas novamente.

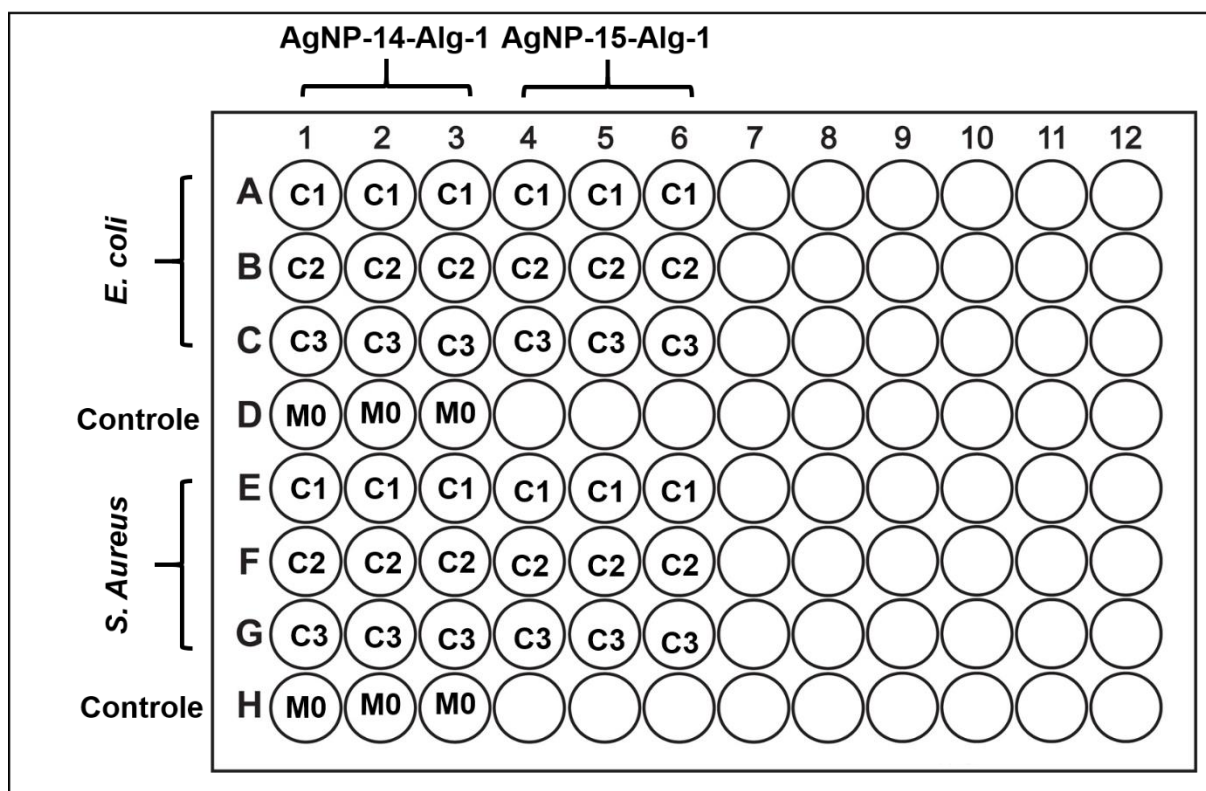
3.2.3 Ensaio antibacteriano

Foram preparadas as placas de 96 poços com as suspensões bacterianas e as AgNPs. Nos poços foram depositados 100 µL de suspensão bacteriana, 100 µL de caldo Muller Hinton e 100 µL de soluções de AgNP.

A manipulação dos meios de cultura, das suspensões bacterianas e das cepas bacterianas foram realizadas em ambiente estéril, na capela de fluxo laminar, referência FL2764, fabricante VECO.

Neste estudo, foram utilizadas 5 concentrações de cada AgNP (200, 100, 20, 15 e 10 mg/mL), em que cada concentração foi aplicada em triplicata. Além disso, para cada bactéria foi mantido um controle em triplicata e sem a adição de AgNP. A figura 11 esquematiza a distribuição realizada na placa de 96 poços. Ao finalizar a montagem das placas, esses sistemas foram incubados na estufa bacteriológica sob $(37 \pm 2,5)^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

Figura 11 - Esquema de distribuição realizada em uma placa de 96 poços. Conforme a ilustração, foram testadas duas AgNPs em concentrações C1, C2 e C3, com cada concentração em triplicata, em linhagens bacterianas de *E. coli* e *S. aureus*.



Fonte: O autor (2021)

Após a incubação de 24 h, as placas foram retiradas da estufa bacteriológica e levadas para a capela de fluxo laminar. Nos poços contendo as suspensões bacterianas com AgNP foram adicionados 20 µL de solução aquosa de resazurina 0,1%, um indicador de viabilidade celular. Após a adição do indicador, as placas foram incubadas novamente por 2 h.

Após a contagem de 2 h, as placas foram retiradas da estufa bacteriológica e levadas para ambiente estéril. A análise do efeito bacteriológico das AgNPs foi realizada visualmente pela mudança ou não da cor das suspensões.

Os ensaios de atividade bacteriana utilizaram estufa bacteriológica de modelo Q-136M4, fabricante Quimis. O equipamento foi operado constantemente a temperatura 37°C.

3.3 PRODUÇÃO DOS MATERIAIS COMPÓSITOS

3.3.1 Reagentes e solventes

A produção dos compósitos utilizou água deionizada, alginato de sódio (Dinâmica Química Contemporânea, P.A.), cloreto de cálcio anidro (Aldrich, 99%), e hexametáfosfato de sódio (Aldrich, 96%).

3.3.2 Procedimento experimental

Inicialmente, foi realizada a dissolução de 0,5000 g de alginato de sódio em água sob temperatura ambiente e homogeneização constante. Após a completa dissolução do alginato, foi adicionado 1,07 mmol de hexametáfosfato de sódio ao meio contendo alginato e o sistema foi mantido em homogeneização por 15 min. Em seguida, foram realizadas as adições das AgNPs (AgNP-PP ou AgNP-Alg) e de uma alíquota de CaCl_2 1,0 mol.L⁻¹. O sistema foi mantido em homogeneização por 10 min. Por fim, o produto formado foi filtrado e mantido na estufa a 40°C por 48 h.

3.3.3 Caracterização dos materiais compósitos.

Os materiais compósitos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho com reflectância total atenuada (ATR-FTIR). Para esta análise, os materiais foram pulverizados em almofariz e pistilo de ágata, sendo mantidos em temperatura ambiente. A análise correspondeu a leitura das amostras numa faixa de 550 a 4000 cm⁻¹, através do espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier, fabricante Shimadzu, modelo IRTracer-100, resolução 4, número de *scans* 16 e cristal do ATR de diamante e seleneto de zinco.

Foi realizada a difratometria de raios X dos materiais em um equipamento XRD-7000, Shimadzu, aplicando radiações $\text{CuK}\alpha$ (1.548 Å) e voltagem de 40 kV. Para

realizar esta análise os materiais foram pulverizados em almofariz e pistilo de ágata, e mantidos em temperatura ambiente até o momento da análise.

Os materiais foram submetidos à MET a fim de visualizar as AgNPs no corpo dos materiais. Para tal, foi operado um microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin com resolução de 0,34 nm e sob tensão de 20kV a 120kV. O microscópio foi equipado com câmeras CCD MegaView Olympus 2K e Eagle 4K, bem como software para captura de imagens Tecnai Imaging & Analysis (TIA) da FEI. Habilitado para análise da ultra-estrutura de amostras em 2D.

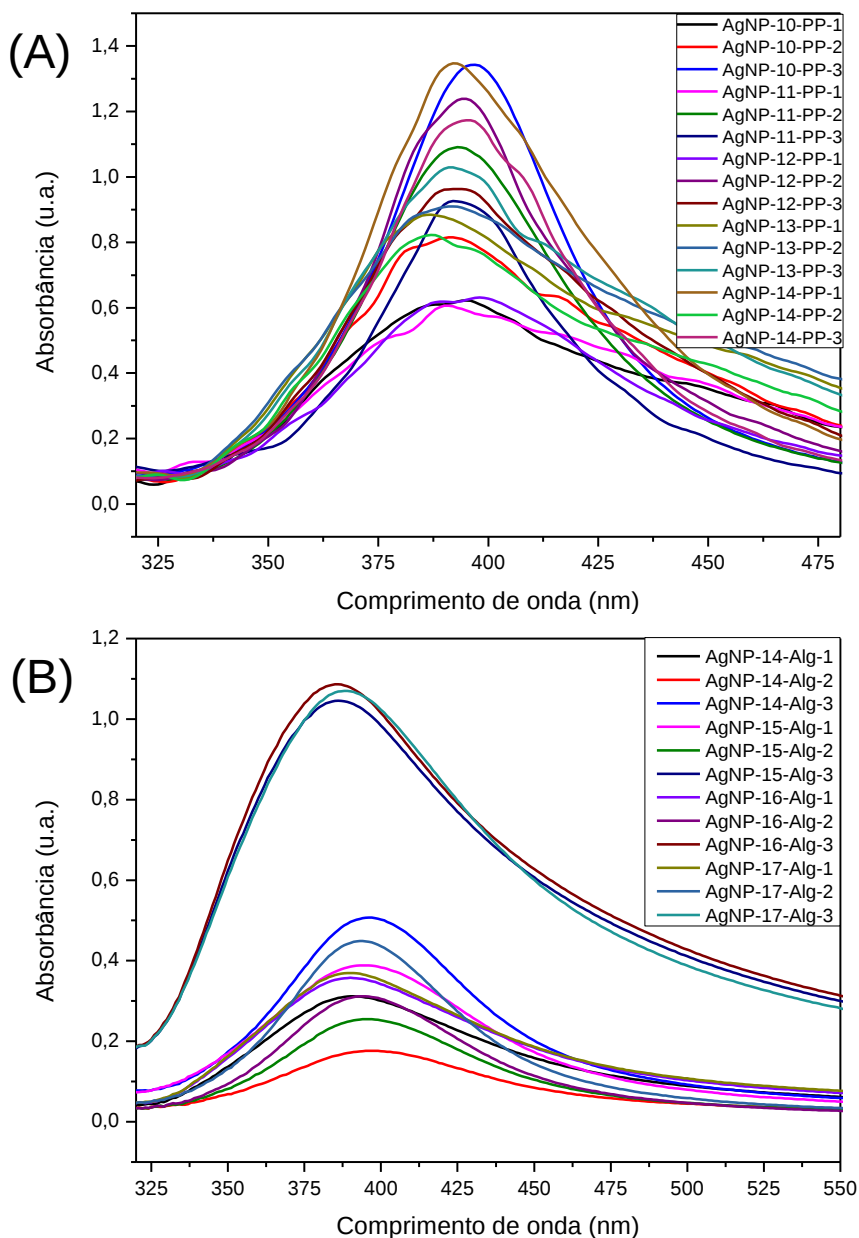
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese das AgNPs baseia-se em uma metodologia que aplica a redução química dos íons Ag^+ em Ag^0 . Nesta metodologia, é utilizado um precursor de prata, AgNO_3 , e um agente redutor, NaBH_4 . Após a nucleação das AgNPs, a carga superficial foi estabilizada utilizando um surfactante, responsável por impedir a agregação das AgNPs. Neste trabalho, foram utilizados dois polímeros como agentes estabilizadores: o polifosfato e o alginato.

As AgNPs são nanoestruturas que possuem potencial para apresentar diversas morfologias que dependerá das condições de síntese. A identificação dessas morfologias pode ser feita pela identificação do valor de λ associado a banda de absorção máxima que uma AgNP pode apresentar. Um estudo realizado por Pyatenko et al. (2007) investigou o controle dos tamanhos de AgNPs esféricas ao sintetizá-las em meio aquoso. Nesta investigação, os autores apontam que as nanopartículas de prata esféricas apresentam uma banda de absorção característica no UV-Vis em regiões próximas a 400 nm. (PYATENKO; YAMAGUCHI; SUZUKI, 2007) Ao comparar os dados da literatura com os espectros de absorção no UV-Vis das AgNPs produzidas nesse trabalho, nota-se que as nanoestruturas apresentam picos de absorção em regiões próximas a 400 nm, como mostra a figura 12. Por meio dos espectros de absorção pode-se concluir que houve a formação de nanoestruturas de prata em meio aquoso. Além disso, tais resultados indicam que as AgNPs sintetizadas com PoliP e Alg (AgNP-PP e AgNP-Alg, respectivamente) podem apresentar uma morfologia esférica.

Figura 12 - Espectros de absorção no UV-Vis das AgNPs produzidas com (A) polifosfato e (B) alginato.



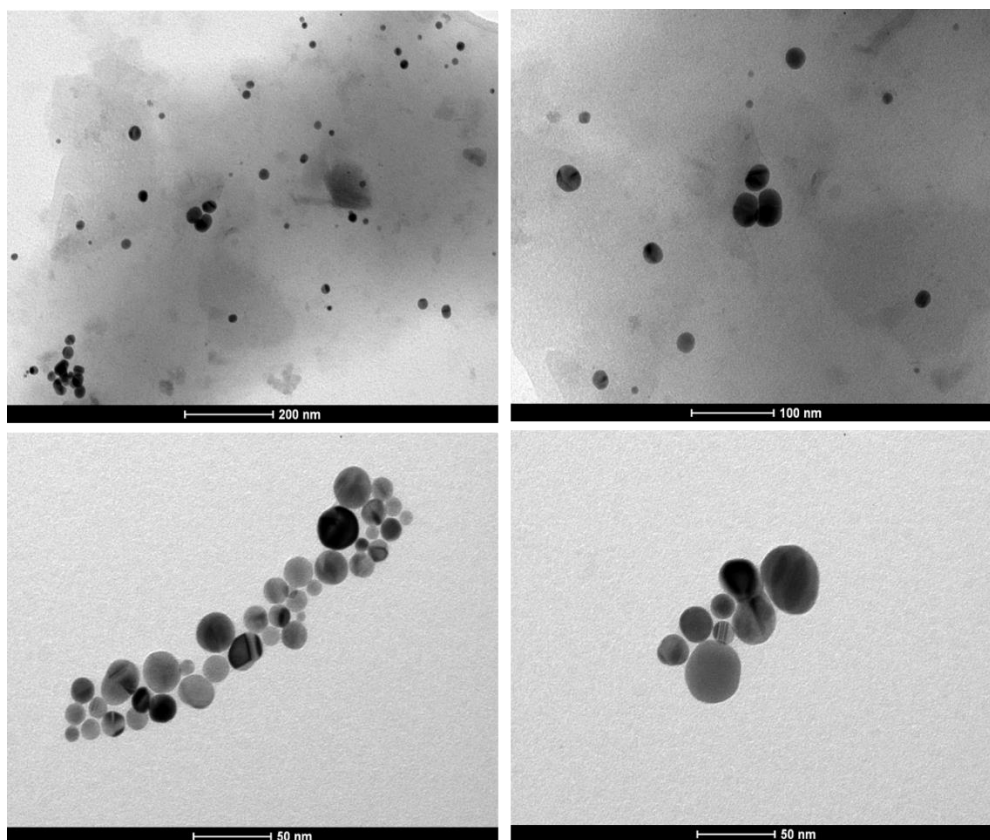
Fonte: O autor (2021)

As AgNPs-PP apresentaram picos de absorção com valores de λ entre 386 e 398 nm, enquanto que as AgNPs-Alg apresentaram picos de absorção entre 385 e 396 nm. Os desvios nos valores de λ esperados para uma AgNP esférica podem ser associados a variações nos tamanhos, pesos moleculares (M_w) e concentrações dos

polímeros utilizados, que afetam o diâmetro dessas nanoestruturas. Díaz-Cruz et al. (2016) avaliou o efeito do M_w de dois polímeros, PEG e PVA, na estabilidade de AgNPs. Conforme seus resultados, polímeros com diferentes valores de M_w provocam pequenos deslocamentos no pico de absorção máximo de espectros de UV-Vis. (DÍAZ-CRUZ et al., 2016) Dessa maneira, pode-se associar os desvios de λ das AgNPs-PP e AgNPs-Alg com as variações nos tamanhos e M_w dos polímeros.

Os dados da espectroscopia no UV-Vis corroboram com os dados obtidos através do MET para avaliação da morfologia dessas nanopartículas. Conforme a microscopia eletrônica de transmissão, as AgNPs apresentaram forma esférica e com tamanhos variando entre 5 e 50 nm, Figura 13.

Figura 13 - Micrografias das AgNP-11-PP em diferentes escalas.



Fonte: O autor (2021)

Os raios hidrodinâmicos (R_H) dos sistemas AgNP-PP e AgNP-Alg foram investigados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). No geral, o parâmetro R_H é uma medida hipotética que aproxima o raio do sistema ao de uma esfera que se difunde, com uma velocidade igual a velocidade das NPs que foram

testadas no DLS. No entanto, as AgNPs não são nanoestruturas perfeitamente esféricas, pois encontram-se solvatadas ou hidratadas, distanciando-se do padrão estipulado pela técnica. Apesar disso, o DLS provém uma informação indicativa do tamanho do sistema estudado.(BHATTACHARJEE, 2016; KIM et al., 2017)

As AgNPs mostraram valores variados de R_H . Os dados obtidos estão dispostos na tabela 5 que mostra as flutuações entre os valores de R_H das AgNPs. Para as AgNPs com PP foram observados valores médios de R_H entre 14 e 66 nm, não havendo uma correspondência entre o tamanho das NPs e a quantidade de polímero utilizada.

Para as AgNPs preparadas com Alg, foram obtidos valores médios de R_H entre 45 e 22 nm, sendo que a NP que apresentou um maior tamanho, em média, foi a AgNP-14-Alg com 44,5 nm e a menor foi a AgNP-15-Alg com 20,1 nm

Tabela 5 - Dados sobre os raios hidrodinâmicos das AgNPs obtidos por DLS, onde R_H é o raio hidrodinâmico da triplicata de cada nanoestrutura de prata e DVP é o desvio padrão associado aos valores de R_H .

Amostra	R_{H1} (nm)	R_{H2} (nm)	R_{H3} (nm)	Média (nm)	DVP (nm)
AgNP-10-PP	49,0	47,2	47,2	47,8	1,0
AgNP-11-PP	17,8	17,8	18,1	17,9	0,2
AgNP-12-PP	65,8	65,1	66,8	65,9	0,9
AgNP-13-PP	14,2	14,4	14,2	14,3	0,1
AgNP-14-PP	18,3	17,9	18,4	18,3	0,3
AgNP-14-Alg	43,7	45,2	44,6	44,5	0,8
AgNP-15-Alg	19,7	20,8	19,9	20,1	0,6
AgNP-16-Alg	22,90	22,92	22,94	22,92	0,02
AgNP-17-Alg	21,7	22,0	19,7	21,2	1,2

Fonte: O autor (2021)

As AgNPs são estruturas que tendem a aglomerar ou agregar entre si para otimizar ou aumentar sua estabilidade.(KAMAN; DUTTA, 2019) No entanto, os efeitos de agregação são geralmente indesejáveis por promoverem a precipitação do sistema. Uma maneira de avaliar a estabilidade das suspensões coloidais é através

do potencial zeta (ZP). Valores de ZP iguais a $\pm 30\text{mV}$, maiores que $+30\text{mV}$ e menores que -30mV correspondem a sistemas coloidais estáveis. (PATEL; AGRAWAL, 2011) A tabela 6 mostra os valores de potencial zeta para os sistemas AgNP-PP e AgNP-Alg. Os resultados indicam que todos os sistemas apresentaram estabilidade ao mostrar valores de ZP menores que -30mV . A carga superficial negativa deve-se aos grupos funcionais presentes nos estabilizantes utilizados.

Tabela 6 - Dados dos potenciais zeta das AgNPs, em que r1, r2 e r3 referem-se as replicatas de cada sistema e DVP é o desvio padrão associado aos valores dos potenciais zeta.

Amostra	r1 (mV)	r2 (mV)	r3 (mV)	Média (mV)	DVP (mV)
AgNP-10-PP	-35,9	-44,0	-38,4	-39,4	4,2
AgNP-11-PP	-43,6	-40,3	-42,6	-42,2	1,7
AgNP-12-PP	-42,3	-42,1	-44,5	-43,0	1,3
AgNP-13-PP	-38,8	-40,3	-43,0	-40,7	2,1
AgNP-14-PP	-43,8	-42,0	-42,0	-42,6	1,0
AgNP-14-Alg	-32,4	-33,2	-44,8	-36,8	6,9
AgNP-15-Alg	-60,4	-45,9	-49,5	-51,9	7,6
AgNP-16-Alg	-34,3	-33,7	-33,2	-33,7	0,6
AgNP-17-Alg	-36,2	-44,5	-60,2	-47,0	12,2

Fonte: O autor (2021)

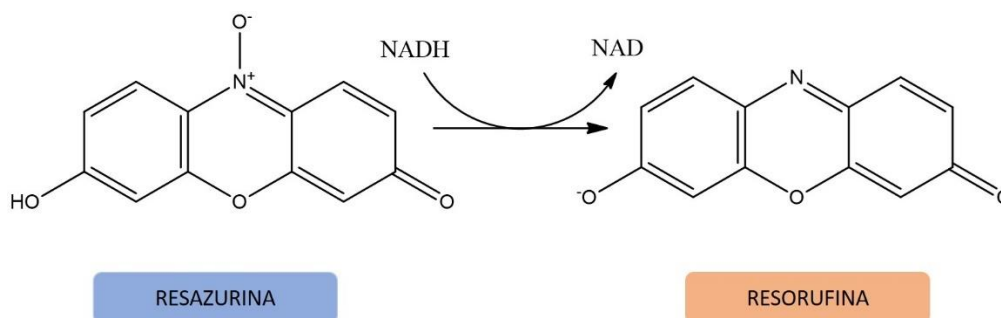
4.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS AgNPs

Em caráter qualitativo, foi avaliado o potencial antibacteriano das AgNPs contra *Escherichia coli* ATCC 8759 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6536. Os ensaios foram realizados utilizando 5 concentrações de suspensão de AgNPs (200, 100, 20, 15 e 10 mg/mL) e em triplicata.

A avaliação qualitativa dos ensaios de inibição bacteriana baseou-se na mudança de cor das suspensões promovida pela redução do indicador resazurina. Este fenômeno decorre da presença de células bacterianas viáveis no meio, na qual são responsáveis pela redução da resazurina em resorufina, alterando a cor do sistema de azul para rosa (figura 14) (BUENO et al., 2002) Os poços que

apresentaram inatividade bacteriana sinalizaram cor azul, enquanto que a presença de células viáveis reduz quimicamente a resazurina tornando o sistema rosa.

Figura 14 - Estruturas químicas da resazurina e resorufina. As redutases de células viáveis reduzem a resazurina, resultando na formação de seu produto metabólico altamente fluorescente, a resorufina.



Fonte: (HALL; SIMEONOV; DAVIS, 2016)

Conforme os ensaios, as AgNPs de PP ou Alg nas concentrações 10, 15 e 20 mg/mL não apresentaram efeito sobre a atividade bacteriana. No entanto, as AgNPs com maiores concentrações (200 e 100 mg/mL) apresentaram eficácia variada contra *E. coli* e *S. aureus*. A tabela 7 detalha as concentrações de que apresentaram potencial antibacteriano.

Tabela 7 - Concentrações de AgNPs eficazes na inativação de *E. coli* e *S. aureus*.

Sistemas	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
AgNP-10-PP	Ineficaz	Ineficaz
AgNP-11-PP	200 mg/mL	200 mg/mL 100 mg/mL
AgNP-12-PP	Ineficaz	Ineficaz
AgNP-13-PP	200 mg/mL 100 mg/mL	200 mg/mL 100 mg/mL
AgNP-14-Alg	200 mg/mL	200 mg/mL 100 mg/mL
AgNP-14-Alg	Ineficaz	200 mg/mL 100 mg/mL

Sistemas	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
AgNP-15-Alg	200 mg/mL	200 mg/mL 100 mg/mL
AgNP-16-Alg	200 mg/mL 100 mg/mL	200 mg/mL 100 mg/mL
AgNP-17-Alg	200 mg/mL	200 mg/mL 100 mg/mL

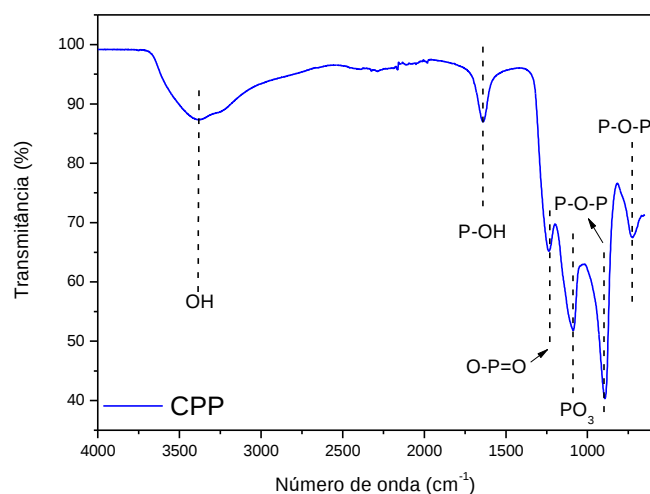
Fonte: O autor (2021)

De acordo com os resultados obtidos, a maioria das AgNPs estudadas apresenta potencial como agente antibacteriano numa concentração superior a 100 mg/mL. No entanto, estudos adicionais precisam ser efetuados para compreender as diferenças observadas. Além disso, o cálculo da concentração da Ag foi efetuado considerando a quantidade de AgNO₃ utilizado na preparação das NPs. Assim, é também essencial a determinação da concentração real de Ag nos sistemas estudados.

4.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS

A figura 15 apresenta o espectro de infravermelho do polifosfato de cálcio. O espectro mostra um conjunto de bandas características do ânion polifosfato, que ocorrem em: (a) 727 cm⁻¹ e 900 cm⁻¹ devido ao estiramento simétrico em P-O-P, (b) 1075 cm⁻¹ assinala para os modos de estiramento simétrico ou assimétrico dos grupos PO₃ terminais da cadeia, (c) 1224 cm⁻¹ associada ao alongamento assimétrico dos átomos de oxigênio ligados ao grupo O-P=O e (d) 1635 cm⁻¹ atribuída ao P-OH. (CHEN et al., 2009; PICKUP et al., 2013)

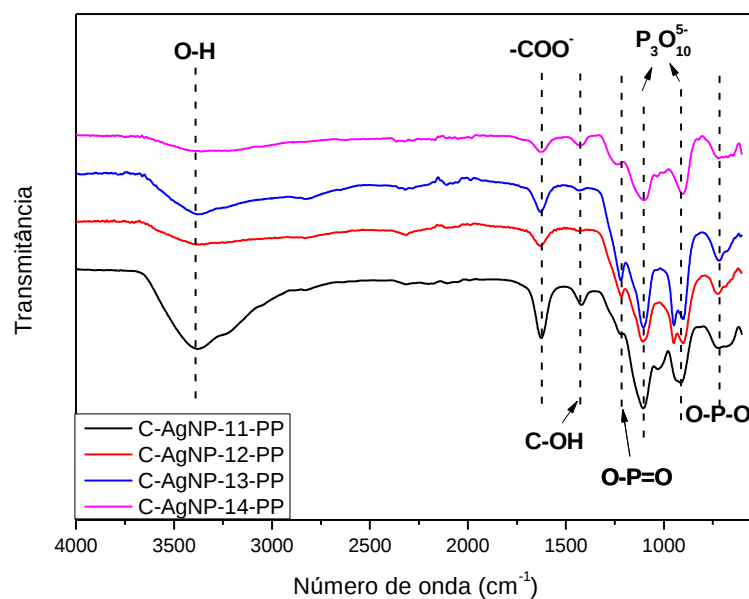
Figura 15 - Espectro de FT-IR do CPP. As legendas referem-se às sinalizações das bandas características do CPP.



Fonte: O autor (2021)

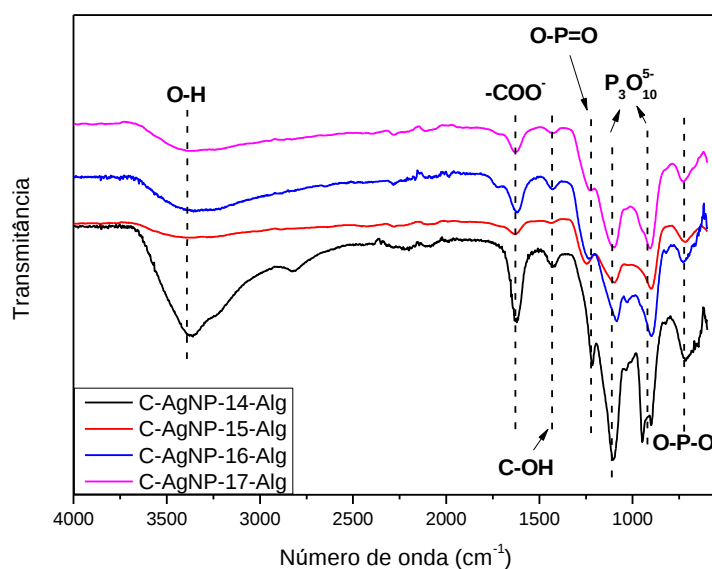
As figuras 16 e 17 mostram os espectros de FT-IR dos materiais C-AgNP-PP e C-AgNP-Alg, sendo observável bandas características de CPP em ambos os materiais. Além disso, foram assinaladas bandas que indicam a presença de alginato na composição destes materiais. As bandas de alginato assinaladas foram: (a) C-O em aproximadamente 1420 cm^{-1} e (b) COO^- em regiões próximas a 1620 cm^{-1} . No entanto, a banda de COO^- pode estar sobreposta com a banda P-OH devido por apresentarem-se em regiões próximas entre si (1620 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} , respectivamente). Os espectros apresentados pelos materiais C-AgNP-PP e C-AgNP-Alg corroboram com resultados da literatura. Zhou et al. (2016) fabricaram e avaliaram compósitos de CPP e Alg. Os autores evidenciam um padrão de bandas de FT-IR semelhantes a este trabalho, com bandas características de CPP em 560 e 1120 cm^{-1} , além da sobreposição de bandas entre COO^- e P-OH em aproximadamente 1610 cm^{-1} . (ZHOU et al., 2016) A presença de bandas correspondentes a uma matriz inorgânica e a outra orgânica configura este material como compósito.

Figura 16 - Espectros de FT-IR dos materiais C-AgNP-11-PP, C-AgNP-12-PP, C-AgNP-13-PP e C-AgNP-14-PP.



Fonte: O autor (2021)

Figura 17 - Espectros de FT-IR dos materiais C-AgNP-14-Alg, C-AgNP-15-Alg, C-AgNP-16-Alg e C-AgNP-17-Alg.



Fonte: O autor (2021)

Foi realizada a difratometria de raios X a fim de identificar as fases cristalinas presentes nos materiais produzidos. A identificação dessas fases foi realizada cruzando informações do *software* "X'Pert HighScore Plus" e do banco de dados

Inorganic Crystal Structure Database (ICSD). A tabela 8 apresenta o código ICSD das fichas cristalográficas utilizadas neste trabalho.

Tabela 8 - Códigos ICSD das fases cristalinas.

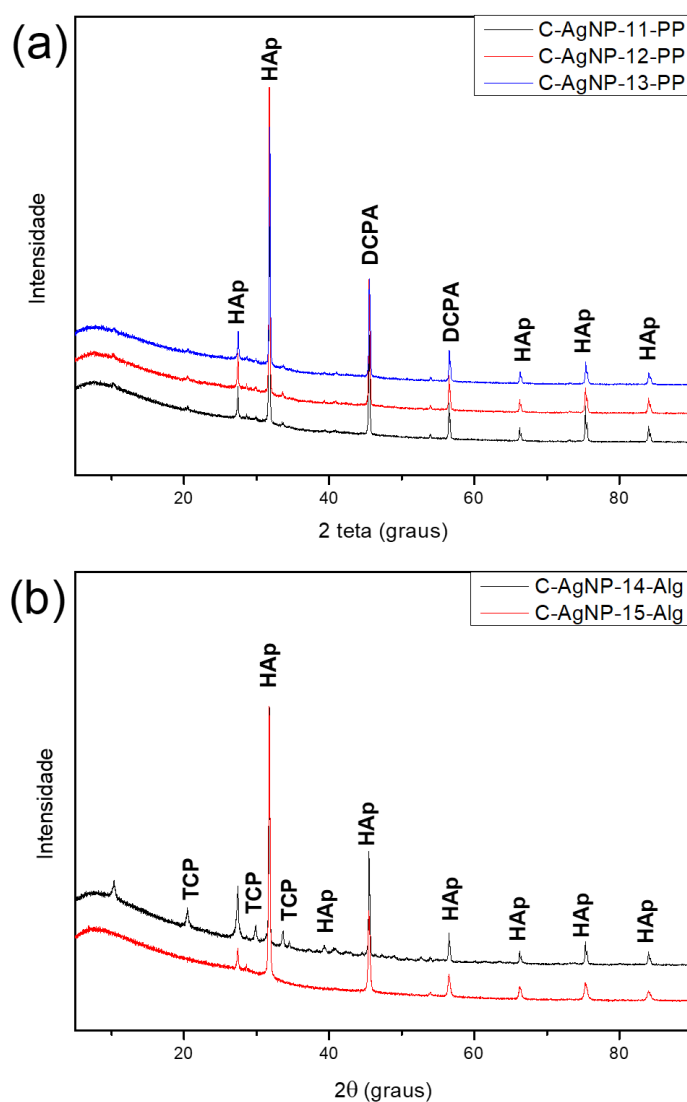
Material	Composto	Código ICSD
C-AgNP-PP	HAp	016742
	HAp	081442
	TCP	000923
C-AgNP-Alg	DCPA	010503
	DCPA	010504
	HAp	034457
	HAp	022059

Fonte: Banco de dados *Inorganic Crystal Structure Database*

A figura 18 apresenta os difratogramas dos materiais compósitos produzidos com AgNP-PP e com AgNP-Alg. A figura 18(a) mostra que os materiais C-AgNP-PP apresentaram fases cristalinas semelhantes a HAp e do fosfato de dicálcio anidro (DCPA), conhecido como monetita. Além disso, a figura 18(b) refere-se aos difratogramas dos materiais C-AgNP-14-Alg e C-AlgNP-15-Alg, nos quais revelam fases cristalinas de fosfato de tricálcio (TCP) e HAp. Em ambos os materiais foi observado a predominância de fases cristalinas da HAp. A presença de fases cristalinas de DCPA, TCP e HAp em materiais contendo CPP é amplamente demonstrada na literatura. (ZHOU et al., 2015)

A ausência de largos picos de difração indica uma estrutura ordenada, mesmo contendo o alginato. Tal fenômeno pode ser explicado pela associação da cadeia de alginato aos íons Ca^{2+} , conhecido como modelo de caixa de ovo. O efeito decorre de uma reação de complexação estes reagentes e que acontece em toda extensão da cadeia polimérica do alginato, originando estruturas compactadas. (TENG et al., 2006; LI et al., 2007)

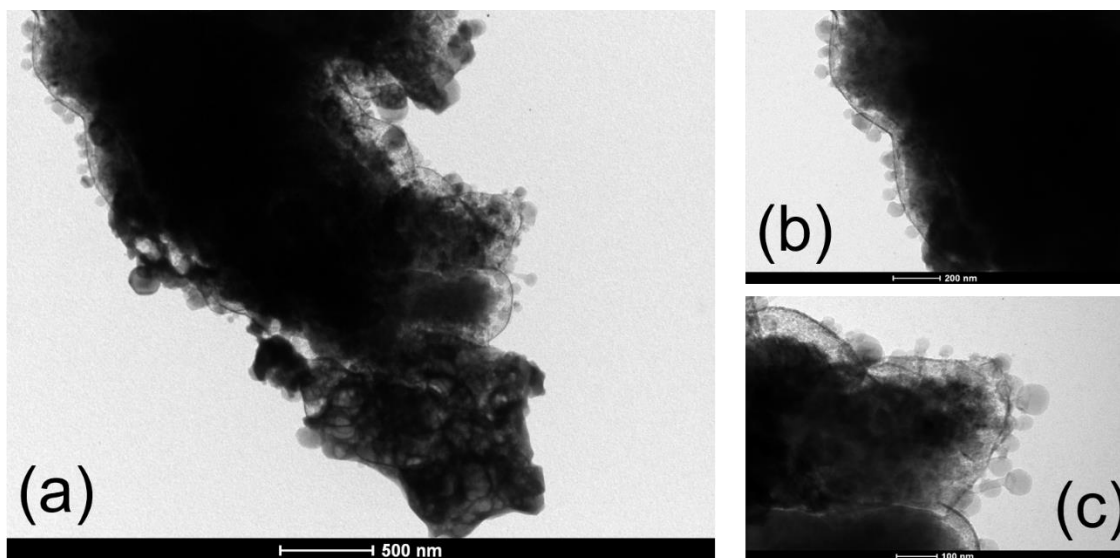
Figura 18 - Difratoograma de raios x das amostras (a) C-AgNP-PP e (b) C-AgNP-Alg.



Fonte: O autor (2021)

Os materiais compósitos foram levados para análise em microscópio eletrônico de transmissão para que fossem identificadas as AgNPs. No entanto, não foi possível confirmar a presença de AgNPs no corpo do material devido a alguns fatores. Como mostra a figura 19, as imagens apresentaram alto contraste, impedindo a visualização das nanoestruturas de prata. Além disso, os materiais foram decompostos com a incidência do laser, levando à impossibilidade de realizar aproximações nas regiões menos contrastadas do compósito.

Figura 19 - Micrografias dos materiais compósitos preparados na presença de AgNPs. Escalas em (a) 500 nm, (b) 200 nm e (c) 100 nm.



Fonte: O autor (2021)

Conforme indicam os resultados, a preparação dos materiais produziu um sólido caracterizado como compósito. Além disso, foi observado qualitativamente que as AgNPs apresentam propriedades antibacterianas, como foi revisado na literatura. A fim de complementar a caracterização destes materiais tem-se como perspectiva a realização de estudos posteriores.

5 PERSPECTIVAS

- (a) Caracterizar as nanopartículas de prata por MET, para confirmar a sua morfologia e tamanho.
- (b) Determinar a quantidade de Ag nas suspensões de AgNPs (usadas nos ensaios anti-bacterianos) e nos compósitos.
- (c) Caracterizar os compósitos por MEV e EDS, e determinar as suas propriedades mecânicas.
- (d) Realizar ensaios antimicrobianos com os compósitos preparados.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram preparadas com sucesso AgNPs revestidas com polifosfato e alginato. As caracterizações das AgNPs indicam a formação de nanoestruturas esféricas, estáveis e com carga superficial negativa. As AgNPs revestidas com polifosfato apresentaram raio hidrodinâmico entre 14 e 66 nm, enquanto que as AgNPs revestidas com alginato apresentaram raios hidrodinâmicos entre 20 e 45 nm. Estes dados parecem indicar que a quantidade de polímero utilizada influencia o tamanho das NPs produzidas.

Os ensaios antibacterianos mostraram que AgNPs preparadas, possuem potencial inibidor de *E. coli* e *S. aureus*, em concentrações superiores a 100 mg/mL.

Neste trabalho foram preparados oito compósitos de polifosfato de cálcio, alginato e AgNPs. Os espectros de IV indicam a presença do CPP e do alginato. Sendo necessário ainda a comprovação da presença das AgNPs nos compósitos. Além disso, a difratometria de raios mostrou que os materiais produzidos com AgNPs revestidas com polifosfato apresentaram fases cristalinas referentes a HAp e ao fosfato de dicálcio anidro. Enquanto que os materiais produzidos com AgNPs revestidas com alginato apresentaram fases cristalinas da HAp e do fosfato de tricálcio. Apesar de tais resultados, ainda são necessárias realizar mais investigações para confirmar o potencial deste material para aplicações ósseas.

REFERÊNCIAS

(FAF), E. P. on F. A. and F. et al. Re-evaluation of phosphoric acid-phosphates – di-, tri- and polyphosphates (E 338–341, E 343, E 450–452) as food additives and the safety of proposed extension of use. **EFSA Journal**, v. 17, n. 6, p. e05674, 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5674>>.

ACCORSI, T. **Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (*Rattus norvegicus*)**. 2005. Universidade de São Paulo, 2005.

AMINI, A.; LAURENCIN, C.; NUKAVARAPU, S. NIH Public Access. **Crit Rev Biomed Eng**, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.

BALDWIN, A. D.; KIICK, K. L. Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials. **Peptide Science**, v. 94, n. 1, p. 128–140, 1 jan. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/bip.21334>>.

BARBOSA, M. A. et al. Polysaccharides as scaffolds for bone regeneration. **ITBM-RBM**, v. 26, n. 3, p. 212–217, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297956205000318>>.

BAROLI, B. From Natural Bone Grafts to Tissue Engineering Therapeutics : Brainstorming on Pharmaceutical Formulative Requirements and Challenges. **Journal of Pharmaceutical sciences**, v. 98, n. 4, p. 1317–1375, 2009.

BEYENE, H. D. et al. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 13, p. 18–23, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214993717300106>>.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916303832>>.

BUENO, C. et al. The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with Amines in Aqueous Solutions. Photophysics and Photochemical Reaction¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 4, p. 385–390, 1 out. 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0760385TESIOR2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760385TESIOR2.0.CO2)>.

CALABRESE, G. et al. A new Ag-nanostructured hydroxyapatite porous scaffold: Antibacterial effect and cytotoxicity study. **Materials Science and Engineering: C**, v. 118, p. 111394, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493120333129>>.

CANALIS, E. et al. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. **Bone**, v. 18, n. 6, p. 517–523, 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/8756328296000804>>.

CHAHAL, S. et al. Fabrication, characterization and in vitro biocompatibility of electrospun hydroxyethyl cellulose/poly (vinyl) alcohol nanofibrous composite biomaterial for bone tissue engineering. **Chemical Engineering Science**, v. 144, p. 17–29, 2016. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250916000269>>.

CHEN, G. et al. A Novel Biphasic Bone Scaffold: β -Calcium Phosphate and Amorphous Calcium Polyphosphate. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 92, n. 4, p. 945–948, 1 abr. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2009.02971.x>>.

CIOBANU, G.; ILISEI, S.; LUCA, C. Hydroxyapatite-silver nanoparticles coatings on porous polyurethane scaffold. **Materials Science and Engineering: C**, v. 35, p. 36–42, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493113005924>>.

COVIELLO, T. et al. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119, n. 1, p. 5–24, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365907000399>>.

DAHL, S. G. et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. **Bone**, v. 28, n. 4, p. 446–453, 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328201004197>>.

DALAVI, P. A. et al. Microspheres containing biosynthesized silver nanoparticles with alginate-nano hydroxyapatite for biomedical applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 31, n. 16, p. 2025–2043, 1 nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1793464>>.

DÍAZ-CRUZ, C. et al. Effect of molecular weight of PEG or PVA as reducing-stabilizing agent in the green synthesis of silver-nanoparticles. **European Polymer Journal**, v. 83, p. 265–277, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305716304438>>.

DIAZ-RODRIGUEZ, P. et al. Mineralized alginate hydrogels using marine carbonates for bone tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p. 235–242, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861718304958>>.

DUBNIKA, A. et al. Functionalized silver doped hydroxyapatite scaffolds for controlled simultaneous silver ion and drug delivery. **Ceramics International**, v. 43, n. 4, p. 3698–3705, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884216322210>>.

ELECHIGUERRA, J. L. et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, n. 1, p. 6, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-6>>.

ELGORBAN, A. M. et al. Antifungal silver nanoparticles: synthesis, characterization and biological evaluation. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 1, p. 56–62, 2 jan. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1106339>>.

FIHRI, A. et al. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 347, p. 48–76, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854517301601>>.

GARCÍA-LIZARRIBAR, A. et al. Composite Biomaterials as Long-Lasting

Scaffolds for 3D Bioprinting of Highly Aligned Muscle Tissue. **Macromolecular Bioscience**, v. 18, n. 10, p. 1800167, 1 out. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mabi.201800167>>.

GINEBRA, M. P.; TRAYKOVA, T.; PLANELL, J. A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 2, p. 102–110, 2006.

GRÉMARE, A. et al. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 4, p. 887–894, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36289>>.

GUO, C. et al. Preparation, characterization, bioactivity and degradation behavior in vitro of copper-doped calcium polyphosphate as a candidate material for bone tissue engineering. **RSC Advances**, v. 7, n. 67, p. 42614–42626, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C7RA06159E>>.

HALL, M. D.; SIMEONOV, A.; DAVIS, M. I. Avoiding Fluorescence Assay Interference—The Case for Diaphorase. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 14, n. 3, p. 175–179, 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/adt.2016.707>>.

HASSANAJILI, S. et al. Preparation and characterization of PLA/PCL/HA composite scaffolds using indirect 3D printing for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 109960, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493119308756>>.

HAUGEN, V.; ID, O.; ARTICLE, S. Corresponding author mail id:-. **J Clin Periodontol**, v. 46, n. 21, p. 92–102, 2019.

HE, C. et al. Rapid mineralization of porous gelatin scaffolds by electrodeposition for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 2111–2119, 2012.

HENCH, L. L.; THOMPSON, I. Twenty-first century challenges for biomaterials. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 7, n. suppl_4, p. S379–S391, 6 ago. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0151.focus>>.

HEYDARI, Z.; MOHEBBI-KALHORI, D.; AFARANI, M. S. Engineered electrospun polycaprolactone (PCL)/octacalcium phosphate (OCP) scaffold for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 81, p. 127–132, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117319781>>.

ILICH, J. Z. et al. Journal of the American College of Nutrition Nutrition in Bone Health Revisited : A Story Beyond Calcium Nutrition in Bone Health Revisited : A Story. **Journal of the American College of Nutrition Publication**, v. 19, n. 6, p. 715–737, 2000.

JAYASREE, R. et al. Drug and ion releasing tetracalcium phosphate based dual action cement for regenerative treatment of infected bone defects. **Ceramics International**, v. 44, n. 8, p. 9227–9235, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884218304255>>.

JUBY, K. A. et al. Silver nanoparticle-loaded PVA/gum acacia hydrogel:

Synthesis, characterization and antibacterial study. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 3, p. 906–913, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712003736>>.

KAMAN, P. K.; DUTTA, P. Synthesis, characterization and antifungal activity of biosynthesized silver nanoparticle. **Indian Phytopathology**, v. 72, n. 1, p. 79–88, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42360-018-0081-4>>.

KELLY, C. N. et al. Design and Structure–Function Characterization of 3D Printed Synthetic Porous Biomaterials for Tissue Engineering. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 7, p. 1701095, 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/adhm.201701095>>.

KIM, H.-A. et al. Characterization of silver nanoparticle aggregates using single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry (spICP-MS). **Chemosphere**, v. 171, p. 468–475, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653516317957>>.

KIM, H. et al. Biomimetic synthesis of metal–hydroxyapatite (Au-HAp, Ag-HAp, Au-Ag-HAp): Structural analysis, spectroscopic characterization and biomedical application. **Ceramics International**, v. 44, n. 16, p. 20490–20500, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884218321047>>.

KO, H.-F.; SFEIR, C.; KUMTA, P. N. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 368, n. 1917, p. 1981–1997, 28 abr. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0009>>.

KORNBERG, A.; RAO, N. N.; AULT-RICHÉ, D. Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 89–125, 1 jun. 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.89>>.

KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals : A review study on the analytical methods. **J. Biomed. Mater. Res.**, p. 31–34, 2002.

KRUPPKE, B. et al. Gelatine modified monetite as a bone substitute material: An in vitro assessment of bone biocompatibility. **Acta Biomaterialia**, v. 32, p. 275–285, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706115302725>>.

KULAEV, I. S.; VAGABOV, V. M.; KULAKOVSKAYA, T. V. **The biochemistry of inorganic polyphosphates**. [s.l: s.n.].v. 9

KULAKOVSKAYA, T. V.; VAGABOV, V. M.; KULAEV, I. S. Inorganic polyphosphate in industry, agriculture and medicine: Modern state and outlook. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 1–10, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511311003850>>.

LANDI, E. et al. Biomimetic Mg- and Mg,CO₃-substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 26, n. 13, p. 2593–2601, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955221905006680>>.

LAURENCIN, D. et al. Magnesium incorporation into hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 32, n. 7, p. 1826–1837, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961210014560>>.

LEE, H. et al. Fabrication of micro/nanoporous collagen/dECM/silk-fibroin biocomposite scaffolds using a low temperature 3D printing process for bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 84, p. 140–147, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117313309>>.

LEE, S. H.; JUN, B.-H. **Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine** *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. .

LI, X. et al. The optimum zinc content in set calcium phosphate cement for promoting bone formation in vivo. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 3, p. 969–975, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.021>>.

LIM, K.-S. et al. A review of application of ammonium polyphosphate as intumescent flame retardant in thermoplastic composites. **Composites Part B: Engineering**, v. 84, p. 155–174, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359836815005065>>.

LIMA, E. C. de O. et al. Fracionamento de polifosfato de sódio e caracterização por RMN de ³¹P: Um experimento para aulas de físico- química. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1991–1995, 2010.

LIU, W. et al. Impact of Silver Nanoparticles on Human Cells: Effect of Particle Size. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 3, p. 319–330, set. 2010.

LIU, X.; MA, P. X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Annals of biomedical engineering**, v. 32, n. 3, p. 477–486, mar. 2004.

LUO, Y. et al. 3D printing of concentrated alginate/gelatin scaffolds with homogeneous nano apatite coating for bone tissue engineering. **Materials & Design**, v. 146, p. 12–19, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264127518301680>>.

MAHARJAN, B. et al. Regenerated cellulose nanofiber reinforced chitosan hydrogel scaffolds for bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117023, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720311966>>.

MAJED, N.; LI, Y.; GU, A. Z. Advances in techniques for phosphorus analysis in biological sources. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 852–859, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095816691200095X>>.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1531–1551, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>>.

MARRIOTT, A. S. et al. A natural template approach to mesoporous carbon spheres for use as green chromatographic stationary phases. **RSC Advances**, v. 4, n. 1, p. 222–228, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C3RA44428G>>.

MARTIN, V.; BETTENCOURT, A. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 82, p. 363–371, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117303636>>.

MCBEATH, T. M. et al. Polyphosphate-fertilizer solution stability with time, temperature, and pH. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 170, n. 3, p. 387–391, 1 jun. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jpln.200625166>>.

MERAN, Z. et al. Antifungal properties and biocompatibility of silver nanoparticle coatings on silicone maxillofacial prostheses in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 3, p. 1038–1051, 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jbm.b.33917>>.

MORONES, J. R. et al. The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, out. 2005.

MUKHERJI, S. et al. Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles. **Physical Sciences Reviews**, v. 4, n. 1, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/psr-2017-0082>>.

NATSUKI, J.; NATSUKI, T.; HASHIMOTO, Y. A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications. **International Journal of Materials Science and Applications**, v. 4, n. 5, p. 325–332, 2015.

NEOPHYTOU, M. et al. Highly efficient indium tin oxide-free organic photovoltaics using inkjet-printed silver nanoparticle current collecting grids. **Applied Physics Letters**, v. 101, n. 19, p. 193302, 5 nov. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.4765343>>.

NI, Z. et al. Synthesis of silver nanoparticle-decorated nanocomposites and the study of their antibacterial. **RSC Advances**, v. 8, p. 41722–41730, 2018a.

NI, Z. et al. Synthesis of silver nanoparticle-decorated hydroxyapatite (HA@Ag) porous nanocomposites and the study of their antibacterial activities. **RSC Advances**, v. 8, n. 73, p. 41722–41730, 2018b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C8RA08148D>>.

NOGUEIRA, S. S. et al. Silver nanoparticle stabilized by hydrolyzed collagen and natural polymers: Synthesis, characterization and antibacterial-antifungal evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 808–814, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019317738>>.

OFFNER, D.; GRADO, G. F. De; MEISELS, I. Bone Grafts, Bone Substitutes and Regenerative Medicine Acceptance for the Management of Bone Defects Among French Population: Issues about Ethics, Religion or Fear? **Cell Medicine**, v. 11, p. 1–10, 2019.

OTSUKA, M. et al. Calcium level-responsive in-vitro zinc release from zinc containing phosphate (ZnTCP). **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 4, p. 819–824, 2000.

PANDEY, S.; GOSWAMI, G. K.; NANDA, K. K. Green synthesis of biopolymer–silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia

detection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 583–589, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813012002498>>.

PATEL, V.; AGRAWAL, Y. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 2, p. 81–87, 1 abr. 2011. Disponível em: <<https://www.japtr.org/article.asp?issn=2231-4040>>.

PATERSON, T. E. et al. **Electrospun Scaffolds Containing Silver-Doped Hydroxyapatite with Antimicrobial Properties for Applications in Orthopedic and Dental Bone Surgery** **Journal of Functional Biomaterials**, 2020. .

PEMMER, B. et al. Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue. **Bone**, v. 57, n. 1, p. 184–193, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328213003001>>.

PERALTA-VIDEA, J. R. et al. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 1–15, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389410014305>>.

PICKUP, D. M. et al. Characterisation of phosphate coacervates for potential biomedical applications. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 28, n. 8, p. 1226–1234, 16 set. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0885328213502586>>.

PILENI, M. P. Supra- and nanocrystallinities: a new scientific adventure. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 23, n. 50, p. 503102, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1088/0953-8984/23/50/503102>>.

PILLIAR, R. M. et al. Porous calcium polyphosphate as load-bearing bone substitutes: In vivo study. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 101B, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jbm.b.32832>>.

POLO-CORRALES, L.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; RAMIREZ-VICK, J. E. Scaffold Design for Bone Regeneration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 15–56, 2014.

PORRELLI, D. et al. Antibacterial-nanocomposite bone filler based on silver nanoparticles and polysaccharides. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 2, p. e747–e759, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/term.2365>>.

PORTER, J. R.; RUCKH, T. T.; POPAT, K. C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 6, p. 1539–1560, 2009.

PRADHAN, N.; PAL, A.; PAL, T. Silver nanoparticle catalyzed reduction of aromatic nitro compounds. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 196, n. 2, p. 247–257, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775701010408>>.

PYATENKO, A. et al. Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in pure

water. **Applied Physics A**, v. 79, n. 4, p. 803–806, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00339-004-2841-5>>.

PYATENKO, A.; YAMAGUCHI, M.; SUZUKI, M. Synthesis of Spherical Silver Nanoparticles with Controllable Sizes in Aqueous Solutions. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 22, p. 7910–7917, 1 jun. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp071080x>>.

RASHCHI, F.; FINCH, J. A. Polyphosphates: A review. Their chemistry and application with particular reference to mineral processing. **Minerals Engineering**, v. 13, n. 10, p. 1019–1035, 2000a.

RASHCHI, F.; FINCH, J. A. Polyphosphates: A review their chemistry and application with particular reference to mineral processing. **Minerals Engineering**, v. 13, n. 10, p. 1019–1035, 2000b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089268750000087X>>.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 41–75, 16 jul. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027>>.

REN, F. et al. Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2787–2796, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706109005856>>.

ROBERTS, T. T.; ROSENBAUM, A. J. Bone grafts , bone substitutes and orthobiologics The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. **Organogenesis**, v. 8, n. 4, p. 114–124, 2012.

RULLIERE, C. et al. Heat treatment effect on polyphosphate chain length in aqueous and calcium solutions. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 712–716, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612003792>>.

RULLIERE, C. et al. Studies of polyphosphate composition and their interaction with dairy matrices by ion chromatography and ³¹P NMR spectroscopy. **International Dairy Journal**, v. 28, n. 2, p. 102–108, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694612002002>>.

SÁENZ, A. et al. Ceramic biomaterials: An introductory overview. **Journal of Materials Education**, v. 21, n. 5–6, p. 297–306, 1999.

SAINI, R. K.; BAGRI, L. P.; BAJPAI, A. K. Nano-silver hydroxyapatite based antibacterial 3D scaffolds of gelatin/alginate/poly (vinyl alcohol) for bone tissue engineering applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, p. 211–218, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.064>>.

SALEH, A. T.; LING, L. S.; HUSSAIN, R. Injectable magnesium-doped brushite cement for controlled drug release application. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 16, p. 7427–7439, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10853-016-0017-2>>.

SALERNITANO, E.; MIGLIARESI, C. Composite materials for biomedical

applications: a review. **Journal of applied biomaterials & biomechanics : JABB**, v. 1, n. 1, p. 3–18, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20803468>>.

SALLEH, A. et al. **The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action** **Nanomaterials**, 2020. .

SHANJANI, Y. et al. Mechanical characteristics of solid-freeform-fabricated porous calcium polyphosphate structures with oriented stacked layers. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1788–1796, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706110005775>>.

SHAO, W. et al. Preparation, Characterization, and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticle-Decorated Graphene Oxide Nanocomposite. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 12, p. 6966–6973, 1 abr. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsami.5b00937>>.

SILVA-HOLGUÍN, P. N.; REYES-LÓPEZ, S. Y. Synthesis of Hydroxyapatite-Ag Composite as Antimicrobial Agent. **Dose-Response**, v. 18, n. 3, p. 1559325820951342, 1 jul. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1559325820951342>>.

SONG, W. et al. The study on the degradation and mineralization mechanism of ion-doped calcium polyphosphate in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 89B, n. 2, p. 430–438, 1 maio 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jbm.b.31230>>.

SOPYAN, I. et al. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 8, n. 1–2, p. 116–123, 1 jan. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.stam.2006.11.017>>.

SU, Y. et al. Zinc-Based Biomaterials for Regeneration and Therapy. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 428–441, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.009>>.

SUKDEB, P.; KYUNG, T. Y.; MYONG, S. J. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712–1720, 15 mar. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>>.

SUN, J.; TAN, H. **Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications** **Materials**, 2013. .

SWETHA, M. et al. International Journal of Biological Macromolecules Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 1, p. 1–4, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.03.015>>.

SYAFIUDDIN, A. et al. A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 64, n. 7, p. 732–756, 1 jul. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jccs.201700067>>.

TAHERI, S. et al. Substrate independent silver nanoparticle based

antibacterial coatings. **Biomaterials**, v. 35, n. 16, p. 4601–4609, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961214001896>>.

TAK, Y. K. et al. Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 16908, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep16908>>.

TEOTIA, A. K. et al. Nano-Hydroxyapatite Bone Substitute Functionalized with Bone Active Molecules for Enhanced Cranial Bone Regeneration. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 8, p. 6816–6828, 1 mar. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsami.6b14782>>.

TIAN, M. et al. In vivo study of porous strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 7, p. 1505–1512, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10856-009-3713-5>>.

TORGBO, S.; SUKYAI, P. Bacterial cellulose-based scaffold materials for bone tissue engineering. **Applied Materials Today**, v. 11, p. 34–49, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352940717304705>>.

TRIPATHI, G.; BASU, B. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. **Ceramics International**, v. 38, n. 1, p. 341–349, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884211006481>>.

VARAPRASAD, K. et al. Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, p. 116025, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720301995>>.

VENKATESAN, J. et al. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 269–281, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813014004735>>.

VOO, W.-P. et al. Calcium alginate hydrogel beads with high stiffness and extended dissolution behaviour. **European Polymer Journal**, v. 75, p. 343–353, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305715301087>>.

WANG, Q.; WANG, Q.; WAN, C. The effect of porosity on the structure and properties of calcium polyphosphate bioceramics. **Ceramics-Silikáty**, v. 55, n. 1, p. 43–48, 2011.

WILLIAMS, D. F. Tissue-biomaterial interactions. **Journal of Materials Science**, v. 22, n. 10, p. 3421–3445, 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF01161439>>.

WILLIAMS, D. F. On the Mechanisms of Biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, jul. 2008.

WOODARD, J. R. et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. **Biomaterials**, v. 28, n. 1, p. 45–54, 2007. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296120600723X>>.

XIE, H. et al. Application of K/Sr Co-Doped Calcium Polyphosphate Bioceramic as Scaffolds for Bone Substitutes. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 23, n. 4, p. 1033–1044, abr. 2012.

XIE, L. et al. Fe/Zn-modified tricalcium phosphate (TCP) biomaterials: preparation and biological properties. **RSC Advances**, v. 9, n. 2, p. 781–789, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C8RA08453J>>.

XU, M. et al. Porous PVA/SA/HA hydrogels fabricated by dual-crosslinking method for bone tissue engineering. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 31, n. 6, p. 816–831, 12 abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1720155>>.

YUAN, H. et al. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, n. 12, p. 1271–1275, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/A:1021191432366>>.

ZHANG, D. et al. The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 1, p. 129–138, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X17300506>>.

ZHOU, H. et al. Fabrication and evaluation of calcium alginate / calcium polyphosphate composite. **Materials Letters**, v. 180, p. 184–187, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2016.05.143>>.

ANEXO A - ARTIGO DE REVISÃO EM PREPARAÇÃO

Recent advances in hydroxyapatite/silver nanoparticles-based composites with antimicrobial activity for bone regeneration

Joalen P. Monte^a, Adriana Fontes^b, Beate S. Santos^c, Giovannia A. L. Pereira^a, Goreti Pereira^{a*}

^aDepartamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^bDepartamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^cDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

Abstract

The development of materials for bone tissue repair or regeneration has been desperting the researchers' interests. Thus, several classes of materials have been studied and optimized for this aim, such as implants based on metals, ceramic, glasses and composites. Among these materials, hydroxyapatite (HAp) is a popular bone scaffold, being used as the main constituent of several biomaterials. The use of HAp has been associated with its biocompatibility, osteoconduction, non-toxicity, porosity and mechanical properties. Nevertheless, to improve its properties or to add novel features, HAp has been associated with other components, such as polymers, ions and nanoparticles. The implant-related infections has been a concern of several research groups. Thus, to deal with this issue several approaches have been reported, like the use of silver nanoparticles (AgNPs). The production of HAp-based scaffolds doped with AgNPs has been growing, and the reports showed promising antibacterial properties together with good biocompatibility. In this context, this review aims to present the HAp-AgNPs structures that have been reported recently (from 2015-2021), highlighting their results regarding the antibacterial properties.

Keywords: Polyphosphate; Hydroxyapatite; Silver nanoparticles; Polymers; Bone regeneration

1. Introduction

Nowadays the interest for the development of biomaterials with improved medical functionality, and that bring together knowledge from different areas of science, has been growing. In the field of tissue engineering, biomaterials have been extensively applied in the research aimed at the recovery and regeneration of tissues. Such as the production of metal parts, composite materials formed by inorganic and organic phases, and scaffolds based on calcium phosphate derivatives. In particular, much of this research is focused on bone tissue substitutes, developing and improving materials with properties increasingly suitable for grafting into this tissue.[1-3]

The development of bone substitutes has been majorly based on inorganic compounds derived from $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, which biomimetic the natural bone composition, mainly formed by hydroxyapatite [HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$].[4] Between these inorganic materials we can find the tricalcium phosphate (TCP)[5], calcium pyrophosphate (CPP)[6], calcium polyphosphate[7], and others.

HAp-based scaffolds are materials widely used in medicine as grafts for bone tissue. In general, scaffolds are recommended when a fraction of the bone has suffered some type of damage due to trauma, infection or tumor, with the need to rebuild the bone in the fractured region. These materials possess properties that make them good candidates as scaffolds for bone recovery, such as biocompatibility, non-toxicity, osteoconductivity, osteoinductivity, porosity, and adequate mechanical properties. Briefly, they are bioactive agents that can induce cell proliferation.[8]

Ideally, the construction of a scaffold should follow the idea of biomimeting the physicochemical properties of the environment, in which it will be implanted, and having pores, to allow the vascularization and tissue growth. In addition, the scaffold must degrade in a controlled manner, without generating toxic products from decomposition, and should not generate inflammation in the tissue area.[1, 9-11]

Furthermore, studies have been combining HAp with other constituents in order to produce a material with optimized biological, chemical and physical properties to meet the quality and functionality requirements that a bone substitute requires. A concern, surrounding the application of bone grafts, is the possibility of infections that implants can cause in the body. To minimize this issue, recently HAp scaffolds have been associated with antimicrobial agents, such as the silver nanoparticles (AgNPs).[12, 13]

This review aims to highlight advances in bone engineering, presenting recent studies (from 2015-2021) regarding the development of HAp-based scaffolds functionalized with silver nanoparticles (AgNP). Firstly, we present a brief introduction to the physico-chemical and structural properties of HAp and AgNPs. Finally, works from the literature on the performance of scaffolds formed by HAp/AgNP and HAp/AgNP/Polymer are presented.

2. Hydroxyapatite

Bone tissue is a calcified matrix responsible for supporting the body and soft tissues, and protecting vital organs. Its composition is based on compounds derived from calcium phosphate, type I collagen, lipids and cells. Despite the occurrence of several calcium phosphate derivatives in bone, hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) is the main component of this tissue, making it an appealing structure for the production of biomaterials for bone tissue repair.[14] According to the literature, synthetic HAp is a ceramic with osteogenic potential, osteoconductive, biocompatible and with a crystalline phase similar to natural HAp.[4, 15] Thus, studies are carried out aiming to produce HAp through various methods, such as emulsion, hydrolysis, co-precipitation, solid state reactions, plasma techniques, sonochemical method, crystal growth under hydrothermal conditions, layer hydrolysis of other calcium phosphate salts and sol-gel crystallization.[16, 17]

In recent years, the preparation of HAp-based ceramics and scaffolds with porosity has received a lot of attention. According to the literature, porosity and interconnectivity between pores are parameters that can assist cell migration in the interstices of the material, influencing the processes of vascularization, cell growth and the rate of bone growth.[18, 19] In addition, pore sizes are also factors evaluated regarding the development of these materials. The macropores contribute to the process of cellular osteogenesis, while the smaller pores (micropores) increase the solubility of ions in the medium, and contribute to the fixation of osteoblasts.[15]

HAp has been used as an alternative source of phosphate and calcium in bone substitutes. Furthermore, changes in bioreabsorbability, bioactivity, solubility, physical and biological properties of these materials, can be achieved by the association of HAp with cations,[20] polymers,[21] other calcium phosphate salts,[22] and metallic nanoparticles.[23] For example, Ren et al. developed HAp nanocrystals doped with magnesium, showing that the insertion of Mg^{2+} in HAp promotes changes in

crystallinity, morphology, structure and thermal stability. These authors observed that the crystallites were smaller and more irregular, when the Mg^{2+} ions were presented, forming amorphous or low crystalline grains, influencing the dissolution of the apatite.[24]

The most common cationic substitutes used are Mg^{2+} , Sr^{2+} and Zn^{2+} , which are oligoelements. Magnesium ion is a chemical species that occurs naturally in the body in low concentrations, which is associated with processes of mineralization and bone growth by influencing the proliferation of osteoblasts, in the osteogenesis stage.[25] In addition, the insufficiency of this element affects bone metabolism, increasing bone fragility and decreasing the activity of osteoblasts and osteoclasts.[26] Like Mg^{2+} , the zinc ion (Zn^{2+}) is an trace element involved in bone metabolism, participating in processes of osteoblastic proliferation and inhibition of osteoclastic activity.[27, 28] And its deficiency in the human body can present a risk in the development of osteoporosis.[27, 29] Another ion used in the construction of HAp-based scaffolds is Sr^{2+} , which, according to *in vitro* tests, increases the number of osteoblasts and decreases the number and activity of osteoclasts, being associated with bone formation and resorption.[30, 31] Thus, the incorporation of ions, such as Mg^{2+} , Sr^{2+} and Zn^{2+} , in HAp has become suggestive in the construction of biomimetic materials aimed at bone tissue, since these ions participate in the metabolic processes of human bone.

The production of bone materials based on HAp seeks to biomimetic human bone by applying strategies for the construction of a cohesive matrix, which presents the functional properties of bone tissue and induces cellular support in its structure. Commonly, studies report the development of HAp scaffolds associated with polymers that have biocompatibility, such as alginate, chitosan, collagen, and others. [21, 32]

3. Silver nanoparticles

Nanoscience is a field of research that has been growing over the past few decades. The development of materials with increasingly smaller dimensions, and changes in their properties due to the reduction of their size are reported. Usually, the term nanomaterial is applied to describe a material that has at least one dimension between 1 and 100 nm.[33]

Metallic nanoparticles (NPs) are one of the most studied and reported nanomaterials in the literature, being commonly associated with metals such as Ag,

Au, and Cu. Among them, silver nanoparticles (AgNPs) that have a variety of morphologies, size and coatings stand out. The physical and chemical characteristics of AgNPs are responsible for their optical, magnetic, electronic, catalytic and antibacterial properties. Thus, the AgNPs have been used in the development and production of sensors,[34] photovoltaic cells,[35] catalysis,[36] and others. In the field of health sciences, AgNPs are highlighted for their antimicrobial potential and can be incorporated into biomedical devices, including bone grafts (scaffolds, ceramics, and composites). Several studies reveal the effectiveness of the antimicrobial activity of silver nanoparticles in: (a) bacteria, such as *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*;^[37-39] (b) fungi, like *Candida albicans* and *Rhizoctonia solani*;^[40-42] and (c) viruses, such as HIV-1.^[43]

The toxicity presented by AgNPs is associated with their physical and chemical properties, which are influenced by morphology, size, surface chemistry, particle distribution and dose effect.^[44] The literature presents several studies that associate the physical and chemical properties of AgNPs with toxic effects. For example, Liu et al. studied the effect of the size of AgNPs on human cell lines. They used three commercial nanoparticles (5, 20 and 50 nm), and four cell lines (A549, HepG2, SGC7901 and MCF-7). The authors found that the AgNPs with a size of 5 nm showed a greater toxic effect, when compared to the ones with 20 and 50 nm. Commonly, this toxic effect of the smaller AgNPs has been explained due to the greater the cell penetration, and the higher surface area in contact with the cell.^[45] The morphology of nanoparticles also seems to influence their toxicity. For example, prismatic AgNPs have greater antibacterial activity compared to spherical and rod-shaped AgNPs. This is due to the higher density of Ag that prismatic AgNPs have in their network plan (111).^[46-48] Despite this, the antimicrobial effect of this nanomaterial is associated with more than one physical-chemical parameter, that is, the antimicrobial potential is determined by a set of parameters that must be idealized in the planning of AgNPs.^[47]

The mechanisms that involve the bactericidal property of silver nanoparticles are not yet fully understood by the scientific community. According to Marambio-Jones, the main arguments proposed involve (a) the absence of ATP synthesis and DNA replication after the absorption of ionic silver, (b) the generation of reactive oxygen species (ROS) caused by the presence of Ag⁺ and AgNP and (c) damage to the cell

membrane.[49] Nevertheless, AgNPs has been extremely explored as antibacterial agents for several medical applications.

4. Development of HAp/Polymer/AgNPs composites

In this section we will present the reports found in the literature, since 2015, regarding the strategies used to prepare composites containing HAp, organic polymers, and AgNPs. The works were separated accordingly with the polymer used (natural or synthetic), and for comparison, we also included some works that report the preparation of HAp/AgNPs scaffolds, without the presence of the polymer.

4.1. Development of HA/AgNPs scaffolds

Ni and co-authors (2018)[23] developed porous HAp nanocomposites decorated with AgNPs. The HAp was formed by a hydrothermal method, and AgNPs were prepared *in situ*. The nanocomposites HAp/AgNPs were prepared by mixing the as-prepared HAp and Tollens' reagent, followed by the addition of tannic acid. The X-ray diffraction studies (XRD) confirmed the formation of HAp and indicate the incorporation of AgNPs in the composites. Using transmission electron microscopy (TEM), the authors confirmed the formation of AgNPs on the HAp surface, and it was observed that the nanocomposites with less AgNPs agglomeration, were obtained using 10:3 HAp:Ag molar ratio (Fig. 1A). Using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method, the HAp/AgNPs 10:3 material showed an average pore size around 19 nm, which was similar to the ones of HAp. The authors performed tests for antibacterial activity using strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. For this, 3 systems were used, the AgNPs, HAp, and HAp/AgNPs 10:3, and the results obtained showed that the HAp/AgNPs nanocomposites presented higher potential to inhibit the growth of bacteria. These authors also evaluated the potential of these nanocomposites in changing the bacteria morphology (Fig. 1B and C) through scanning electron microscopy (SEM). The micrographs revealed modification in the morphology of the 3 bacterial strains. In general, after treatment with the composites, the bacteria presented morphological changes, indicating that these HAp/AgNPs have influence on the microorganism's survival.

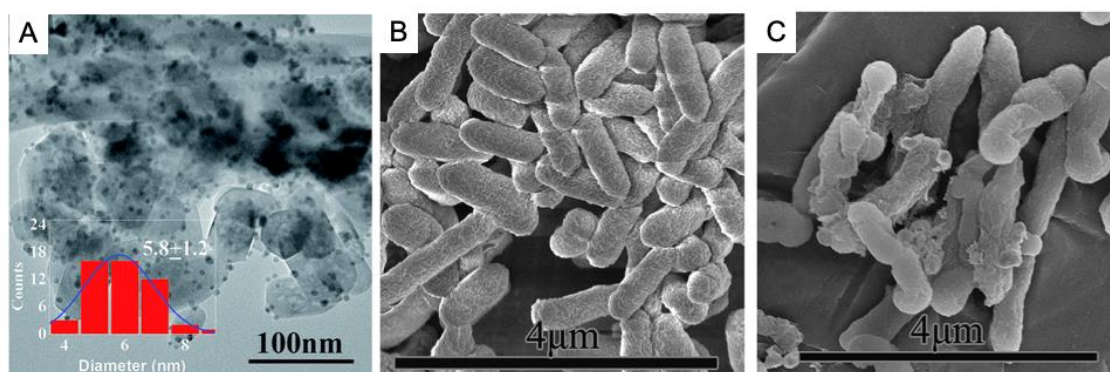


Fig. 1 – (A) TEM images of HAp/AgNPs with HAp:Ag ratio of 10:3. SEM images of *E. coli* bacteria: non-treated (B) and treated with the composites (C). Adapted with permission of RSC Advances (2018).[23]

Using a different strategy, Silva-Holguín et al. (2020)[50] prepared HAp/AgNPs promoting the physical interaction between HAp and AgNPs. HAp powders were synthesized in ethanol by the sol-gel method, and AgNPs were synthesized by the chemical method, using sodium hydroxide and gallic acid. The HAp/AgNP composite was prepared mixing HAp powders and AgNPs, obtaining four systems with different concentrations of adsorbed AgNPs (0.5, 1, 2.5 and 5 mM of Ag^+). The antibacterial activity studies revealed a dependence on the inhibition as a function of the AgNP concentration. The 5 mM HAp/AgNP composites showed a greater inhibition halo compared to the other composites. *P. aeruginosa*, *E. coli* and *Klebsiella oxytoca* were the most susceptible to the HAp/AgNPs. While *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, and *Streptococcus mutans* were less affected by the composites.

In another approach, Calabrese and co-authors (2021) [51] synthesized AgNPs on the surface of HAp scaffolds doped with magnesium (HAp/Mg), using a photochemical method. To produce the HAp/Mg/AgNPs scaffolds, commercial HAp/Mg matrix was immersed in an aqueous solution of silver acetylacetonate ($\text{Ag}(\text{acac})$) and acetone, followed by irradiation with UV light (254 nm). The presence of AgNPs in the composites was confirmed by energy-dispersive X-rays (EDX). And to complement these results, TEM and UV-vis analyzes were performed, which indicated the formation of spherical AgNPs with a diameter of 20 nm. The scaffold's morphology was evaluated using SEM images, and no morphological changes were observed between HAp/Mg and HAp/Mg/Ag. The antibacterial properties of HAp/Mg/Ag were studied using strains of *E. coli* and *S. aureus*. After incubating the bacterial strains with the HAp/Mg/Ag for 24 h, the number of bacterial colonies was reduced significantly,

compared to scaffolds without AgNPs. While suspensions incubated for 48 h showed a complete inactivation of the bacteria. These authors also studied the cytotoxic potential of HAp/Mg/Ag scaffolds, evaluating the cell proliferation and differentiation of human adipose derived stem cells (hADSCs) in these materials. The results revealed a cytotoxic effect of HAp/Mg/Ag scaffolds, since it was observed a significant reduction of the number of cells on the surface of the material, during the 24 days of experiment. The authors concluded that the main causes for the cytotoxicity of the scaffolds was associated with the physical and chemical properties of AgNPs, such as size, shape, and interaction with the cells. And with the presence of Ag⁺ ions in the intracellular medium, that can cause the production reactive oxygen species (ROS), causing oxidative stress in healthy cells.

4.2. Development of HAp/polymer/AgNPs composites

4.2.1. Natural polymers

Alginate (Alg) is a polysaccharide formed by the monomers β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid (Fig. 1). It has been widely used in biomedical sciences, since it is biocompatible and non-toxic. Some studies use this polymer in the development of new materials for bone tissue engineering.[52] Such as the work of Porrelli et al. (2017), [53] in which the authors prepared microbeads of HAp/alginate/AgNPs. The AgNPs were prepared previously, using ascorbic acid to reduce the silver ions in the presence of lactose-modified chitosan (chitlac). These AgNPs-chitlac were mixed with alginate and HAp to achieve the hydrogel microbeads of HAp/Alg/AgNPs-chitlac, with an average size of 990 μ m. And, for comparison, the authors also prepared microbeads without the AgNPs (HAp/Alg/chitlac) with the same diameter. After drying, the microbeads significantly reduced their size, originating microbeads around 250-270 μ m. To study the materials stability, the dried microbeads were immersed in physiological-like conditions, known as Simulated Body Fluid (SBF), and it was observed the composites swelling without signs of degradation. The HAp/Alg/AgNPs-chitlac antibacterial activity was studied incubating *S. aureus*, *P. aeruginosa* or *Staphylococcus epidermidis* bacteria with dried microbeads. After 4 h, it was observed a significant reduction in the bacteria colony forming units (CFU) for *S. aureus*, *P. aeruginosa*. While with *S. epidermidis*, the HAp/Alg/AgNPs-chitlac needed 24 h to show a significant antibacterial effect. These authors also studied the cytotoxic effect of the microbeads in osteoblasts cell line (MG63), for 24 and 72 h, observing that

the cells maintained their viability in the presence of these materials. The results indicate that these composites could have potential to be used in bone regeneration studies.

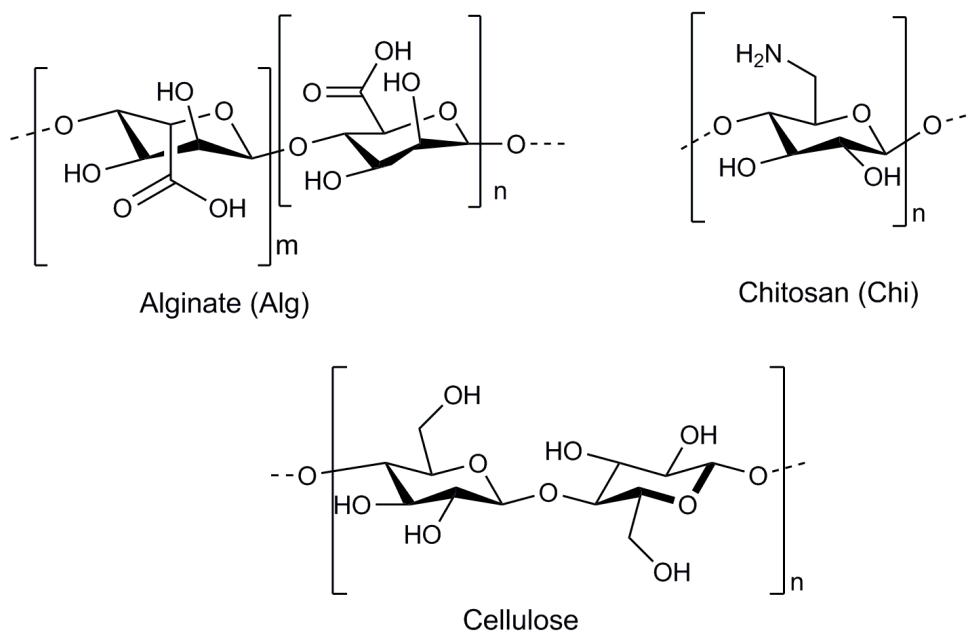


Fig. 2 – Chemical structure of alginate, chitosan, and cellulose.

In another work using alginate, Dalavi et. al (2020)[54] developed microspheres from chitooligosaccharide (COS), AgNPs, alginate, and HAp, and evaluated their potential applications in bone tissue. These authors prepared AgNPs using the chitooligosaccharide as stabilizing agent (AgNPs-COS), by the microwave assisted irradiation method. To prepare the microspheres, alginate was added to the solution containing AgNPs-COS, then different quantities of HAp were added, originating the composites HAp/Alg/AgNPs-COS. Other systems were also prepared, without the addition of hydroxyapatite, such as microspheres of Alg-COS and AgNPs-COS-Alg. The prepared materials were characterized by scanning electron microscopy by field emission (FE-SEM), which revealed that the microspheres had 1.5 to 4.0 μm in size. Mechanical tests were also carried out, in order to evaluate the compressive strength of these microspheres. According to the mechanical resistance tests, the HAp/Alg/AgNPs-COS scaffolds showed compressive strength from 22.14 to 76.89 MPa, and these values improved with the increase of the HAp content. However, these results are lower than the compressive strength values for natural bone (170 MPa). The authors evaluated the antibacterial activity against strains of *S. aureus*, and the results showed that HAp/Alg/AgNPs-COS scaffolds showed antimicrobial activity that

was enhanced increasing the microspheres concentration. Cell proliferation and biocompatibility were studied *in vitro* using human osteoblast-like MG-63 cells, and it was observed that the microspheres showed cell viability close to 100%, which indicates that they are biocompatible and non-toxic.

A biopolymer that has aroused the researchers' interest for biomedical applications is silk fibroin (SF). SF is a polypeptide isolated from Silk worms, which as demonstrated good biocompatibility, great oxygen permeability and high mechanical toughness.[55] Associating SF with chitosan (Chi), another polymer obtained from natural sources, Abdel-Fattah et al. (2015) prepared a HAp-based scaffold with antibacterial properties. For this, AgNPs were prepared using Chi as the stabilizing agent. And the HAp/SF-Chi/AgNPs composites were obtained precipitating the HAp in a mixture of SF, Chi and AgNPs. Modifying the Ca and P molar ratios, the authors also prepared a composite containing octa calcium phosphate (OCP) as the inorganic matrix, obtaining OCP/SF-Chi/AgNPs scaffolds. XRD results confirmed the formation of HAp or OCP in the composites accordingly with the experimental parameters used, as expected, and also showed the presence of the AgNPs characteristic peaks. The TEM images showed the formation of HAp/SF-Chi/AgNPs crystals with dimensions between 8 and 17 nm, and OCP/SF-Chi/AgNPs particles with sizes from 15-22 nm. The composites containing OCP presented a lower porosity than the ones composed by HAp. And, OCP/SF-Chi/AgNPs composites presented a higher degradation ratio than the HAp-based ones, releasing more Ca and P to the medium, indicating that these composites could promote *in situ* more osteoinduction for the formation of apatite.

Ribeiro et al. (2017)[56] reported the preparation of HAp/silk fibroin/AgNPs hydrogels with antibacterial activity. The hydrogel was obtained by mixing the silver nitrate, silk fibroin aqueous solution, and HAp dispersed in methanol. The AgNPs were prepared *in situ* by exposing the system to light, and the reaction was accompanied by a gradual color change to yellow. The authors stated that the reduction of Ag^+ to Ag was possible due to the amino acids presented in the silk fibroin structure, mainly the tyrosine residues. The AgNPs formation was confirmed by UV-vis spectroscopy, where it was observed an absorption band around 400 nm, characteristic of spherical AgNPs. TEM images showed the presence of spherical NPs uniformly distributed, with a diameter from 12.7 to 69.1 nm, depending on the quantity of silver nitrate used. The rheology measurements showed that the incorporation of the AgNPs on the hydrogels

enhanced its stiffness, which was improved with increasing the AgNP concentration. The antibacterial activity of these hydrogels was assessed *in vitro* using gram-positive (multi-resistant *S. aureus* and *S. epidermidis*) and gram-negative (*E. coli* and *P. aeruginosa*) bacteria. The results obtained showed that the hydrogels showed a significant inhibition of all bacteria, especially the hydrogels with higher quantity of AgNPs. The cytotoxicity was also evaluated, using osteoblast cells, and it was observed a decrease in cell viability with the increase of the AgNPs concentration. Nevertheless, the authors concluded that the hydrogel with 0.5% of AgNPs showed a good compromise between the antibacterial activity and cell viability.

Li et al. (2019)[57] deposited a layer of polydopamine (PDA) in the SF fibers, and then added the AgNO₃, to prepare the SF loaded with AgNPs. To prepare the HAp/SF/AgNPs, the authors mixed the SF/AgNPs with HAp. The SEM images showed the AgNPs on the SF surface, and the formation of a composite material with microporous and agglomerates of HAp. XRD analysis confirmed the presence of the HAp crystalline phase, and the AgNPs. The HAp/SF/AgNPs presented a compressive strength of 4 to 10 MPa, increasing with the increase of HAp content, and the formation of a more compact structure. After immersing in SBF for 14 days, the concentration of calcium and phosphorus increased in the composites, indicating their bioactivity. The biocompatibility assays showed that these composites did not affect the MC3T3-E1 osteoblast cell line morphology, however the HAp/SF/AgNPs promoted a slight decrease in the cell growth. The studies with *E. coli* and *S. aureus* strains showed that these materials presented good antibacterial properties.

Another naturally abundant polymer that has been used for several biomedical applications is chitosan (Chi). Chi is a linear polysaccharide (Fig. 1) that has presented biocompatibility, biodegradability and good adsorption properties.[52, 58] With this in mind, Ali and collaborators (2018)[58] prepared a HAp/Chi/AgNPs composite. The AgNPs were prepared by the chemical reduction method using extracts of *BlackBerry* fruit as the stabilizing agent. The inorganic matrix was prepared by the precipitation method, adjusting the Ca/P ratio to 1.67 and 1.33 to obtain the HAp or β TCP crystalline phase. The composites were obtained as a hydrogel, mixing Chi, AgNPs, and the inorganic matrix (HAp or β TCP). The Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) showed the presence of the polymer, and XRD diffractograms confirmed the formation of the face-centered cubic and rhombohedral crystallographic structure, for the HAp or β TCP composites respectively. Using EDX, the authors also confirmed the presence

of Ag, indicating the incorporation of AgNPs in the materials. The HAp/Chi/AgNPs presented a slightly higher antibacterial activity than the β TCP/Chi/AgNPs composites, against *P. aeruginosa* and *S. aureus*. The cytotoxicity of these composites was assessed with skin fibroblast normal cells (BJ1), and hepatocellular carcinoma (HEPG2) and breast cancer (MCF7) cells. The cells' viability decreased when the composites were added, however a survival rate higher than 80% was observed, leading the authors to state that these composites are promising scaffolds, but the AgNPs concentration needs to be carefully assessed.

Cellulose has been described as a versatile polymer, composed by glucose subunits (Fig. 1), presenting good cell adhesion and fixation properties, is biocompatible, bioactive, and has mechanical properties that depend on the crystalline structure and the degree of polymerization of this polymer. This polymer is used in the manufacture of clinical devices and in tissue engineering.[59] Using this polymer, Nicoara et al. (2020)[60] developed materials based on HAp, cellulose and AgNPs, and evaluated them as antibacterial agents. These authors used two strategies to prepare the composites. In the first methodology, HAp was prepared *in situ*, precipitated directly in the cellulose, and AgNPs were then added, yielding the HAp/cellulose/AgNPs-1. In the second procedure, HAp was first synthesized by precipitation, and then cellulose was added, followed by the addition of AgNPs, obtaining the HAp/cellulose/AgNPs-2. In all the strategies the AgNPs were prepared previously, reducing the Ag^+ in the presence of NaBH_4 and polyvinylpyrrolidone (PVP). XRD showed that these composites were mainly composed of hydroxyapatite crystalline phase. SEM images revealed that the materials had a structure formed by fibers decorated with AgNPs. In general, the materials in which HAp was prepared *in situ* (HAp/cellulose/AgNPs-1) showed greater homogeneity and a higher porosity, than the HAp/cellulose/AgNPs-2 composites. The results also showed that the pore size is inversely proportional to the Ag concentration, with increasing the number of AgNPs the scaffolds presented smaller pores. Moreover, the materials prepared by the first methodology also showed a lower degradation, when immersed in SBF. The antibacterial potential of these scaffolds was evaluated against *S. aureus*, *E. coli* bacterial strains and the fungus *Candida albicans*. The results showed that as the concentration of AgNPs increases, the toxic effect to these microorganisms was enhanced. Also in these assays, the HAp/cellulose/AgNPs-1 scaffolds presented

better results, which the authors correlated with their greater porosity, which facilitated the release of the AgNPs to the environment.

In another work using cellulose as the organic matrix, Sofi et. al. (2021)[61] produced deacetylated cellulose nanofibers impregnated with HAp and AgNP. The nanofibers were prepared by electrospinning, using a mixture of cellulose acetate and HAp. The fibers underwent alkaline deacetylation, and were treated with AgNO_3 and NaBH_4 to produce the AgNPs *in situ*. The SEM analysis showed the formation of nanofibers (Fig. 2A) of HAp/cellulose/AgNP, with a diameter from 512 to 1000 nm. In addition, the presence of HAp was verified by FT-IR, while AgNPs were confirmed by TEM (Fig. 2B), which revealed NPs with sizes between 10 – 30 nm. The HAp/cellulose/AgNP fibers were immersed in SBF, to evaluate the potential of these materials to induce mineralization of apatite layers in their surface. And, after 15 days, it was observed the formation of Ca and P-containing crystals (Fig. 2C). The antimicrobial studies were carried out with *E. coli* and *S. aureus* strains. According to the results, the materials containing AgNPs showed activity against these bacteria (Fig. 2D). A more expressive result was observed in the composites that contained the greater amount of HAp and AgNPs, 1.5% and 7%, respectively. The biocompatibility of the nanofibers was evaluated using chicken embryo fibroblasts. The results showed that the nanofibers produced with 7% of AgNPs showed toxicity against the cell growth and proliferation. Nevertheless, the HAp/cellulose/AgNP nanofibers containing lower content of AgNPs (< 5%) enhanced the cell growth and proliferation of fibroblasts.

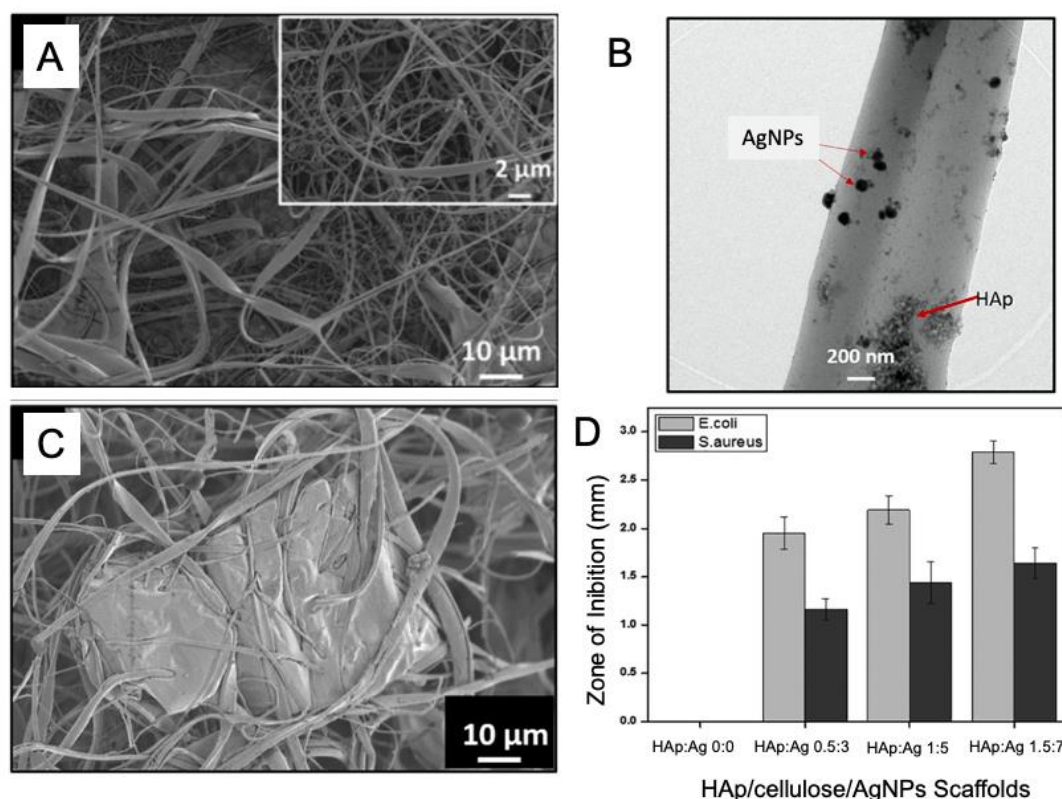


Fig. 3 – (A) SEM and (B) TEM images of HAp/cellulose/AgNPs composites after preparation. (C) SEM images of HAp/cellulose/AgNPs composites after immersion in simulated body fluid for 15 days. (D) Bacterial studies with HAp/cellulose/AgNPs composites, varying the HAp and Ag ratio. Adapted with permission of Elsevier (2021).[61]

4.2.2. Synthetic polymers

One of the synthetic polymers that most attracted the researchers' interest for biomedical applications is the polyethylene glycol (PEG, Fig. 3). PEG can be obtained from ethylene glycol, and present excellent biocompatibility and good interaction with biological systems.[52] Using this polymer, Jegatheeswaran and Sundrarajan (2015)[62] prepared a nanocomposite containing HAp and AgNPs, to be evaluated as antibacterial agents against *E. coli*. The HAp was prepared using a sol-gel approach, mixing the polymer with calcium and phosphate precursors. The AgNPs were prepared *in situ*, adding Ag^+ and NaBH_4 to the gel-like HAp/PEG, originating the HAp/PEG/AgNPs. XRD analysis showed the presence of HAp and AgNPs characteristic peaks, and from SEM images it was possible to observe the formation of crystalline particles without agglomeration, with an average size of 50-70 nm. In the antibacterial assays, HAp/PEG/AgNPs composites reduced the *E. coli* growth. The

authors also observed that the presence of AgNPs was crucial for the antibacterial activity of the nanocomposites.

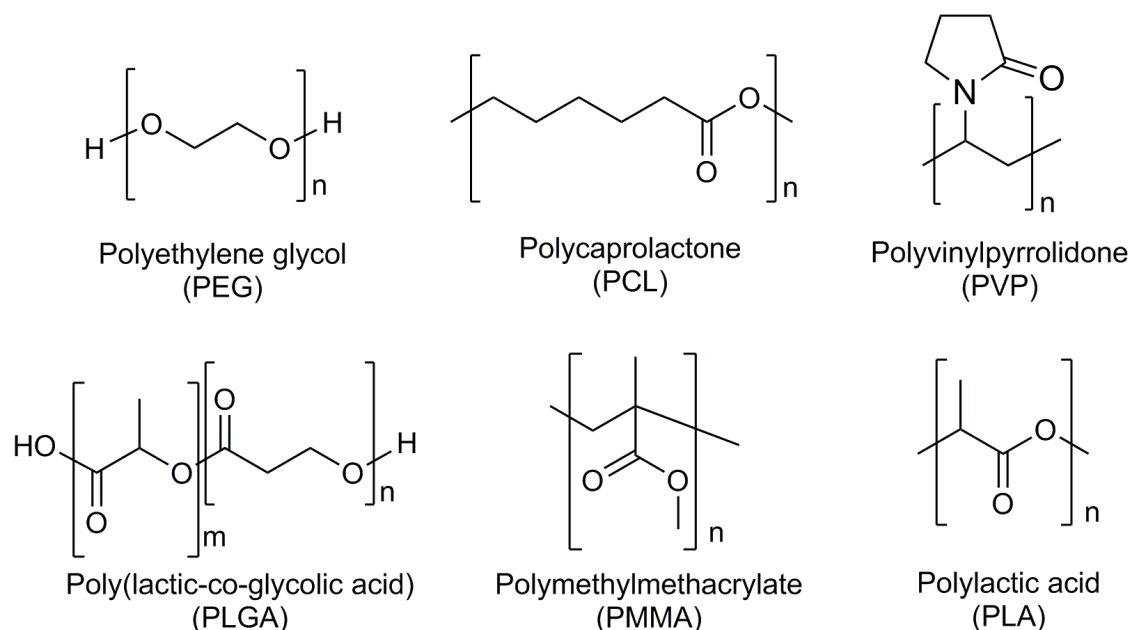


Fig. 4 – Chemical structure synthetic polymers: polyethylene glycol (PEG), polycaprolactone (PCL), polyvinylpyrrolidone (PVP), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), polymethylmethacrylate (PMMA), and polylactic acid (PLA).

With the aim of obtaining an organic matrix with improved mechanical properties and slower degradation, Tian et al. (2020)[63] prepared a block polymer from PEG, polyurethane (PU), and polycaprolactone (PCL, Fig. 3). The authors started with the deposition of the AgNPs in the HAp surface, using commercial HAp, tannic acid (TA) and silver nitrate. Then the HAp/AgNPs were added to the polymer mixture, to obtain the final composites. The HAp/PEG-PU-PCL/AgNPs were used *in vivo* for calvarial regeneration in rats. The bone mineral density of the rats after the scaffold implant was studied by micro-computed tomography (μ -CT), and it was observed that the presence of TA was important to promote bone regeneration. Staining assays showed that the presence of TA in the composites enhanced the osteogenesis, however, the incorporation of AgNPs affected the angiogenesis and its quantity needs to be controlled.

Another synthetic polymer that has been extensively used in biomedical sciences is polyvinylpyrrolidone (PVP). PVP is a polymer prepared from *N*-vinylpyrrolidone (Fig. 3), which has presented biocompatibility, chemical stability, and good solubility in water.[52] Using this polymer, Jegatheeswaran et al. (2016)[64]

prepared a composite incorporating fluor-substituted hydroxyapatite (f-HAp) and AgNPs. Firstly, these authors prepared the HAp/PVP composite in water, followed by the addition of [BMIM]PF₆, to promote the replacement of hydroxyl groups from HAp for fluoride. The AgNPs were prepared *in situ* adding AgNO₃ and NaBH₄ to the f-HAp/PVP composite, obtaining the f-HAp/PVP/AgNPs scaffolds. The XRD diffractogram indicated the presence of f-HA and AgNPs, and the FT-IR confirmed the PVP in the composite. SEM images showed that the nanocomposites containing the f-HA were more crystalline, than the ones composed by HA/PVP/AgNPs. And from the EDS analysis, it was estimated a Ca/P ratio of 1.69, which is similar to the standard value for apatite. The antibacterial activity of these materials was studied against gram positive (*Bacillus subtilis* and *S. aureus*) and gram negative (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, and *P. aeruginosa*) bacteria. The f-HAp/PVP/AgNPs showed significant antibacterial activity for all the pathogens tested. The cytotoxicity studies were performed using human osteosarcoma cell line (MG-63), incubating the f-HAp/PVP/AgNPs for 48 h, and the results showed that these composites presented low toxicity in the concentrations used.

The copolymer poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA, Fig. 3) presents good biocompatibility and biodegradability. PLGA can be decomposed by hydrolysis, releasing its monomers, lactic acid and glycolic acid, which are byproducts of metabolic processes of the human body, therefore presenting minimal toxicity. Mao et al. (2018)[65] prepared microspheres of PLGA, to encapsulate strontium ions, pre-formed HAp, and AgNPs prepared previously, forming the composite HAp/PLGA/AgNPs/Sr (Fig. 4A). The SEM images showed the formation of microspheres (Fig. 4B), and atomic absorption spectroscopy confirmed the presence of P, Ca, Ag, and Sr. The cytotoxicity of the composites was evaluated in MC3T3-E1 osteoblast cells, and no significant toxicity was observed. The composites were also efficient in preventing the bacteria adhesion and biofilm formation of *S. epidermidis* and *S. aureus* (Fig. 4C). Thus, the authors concluded that HAp/PLGA/AgNPs/Sr promoted the osteogenic differentiation and proliferation of the cells, and had good drug release performance, inactivating bacteria strains.

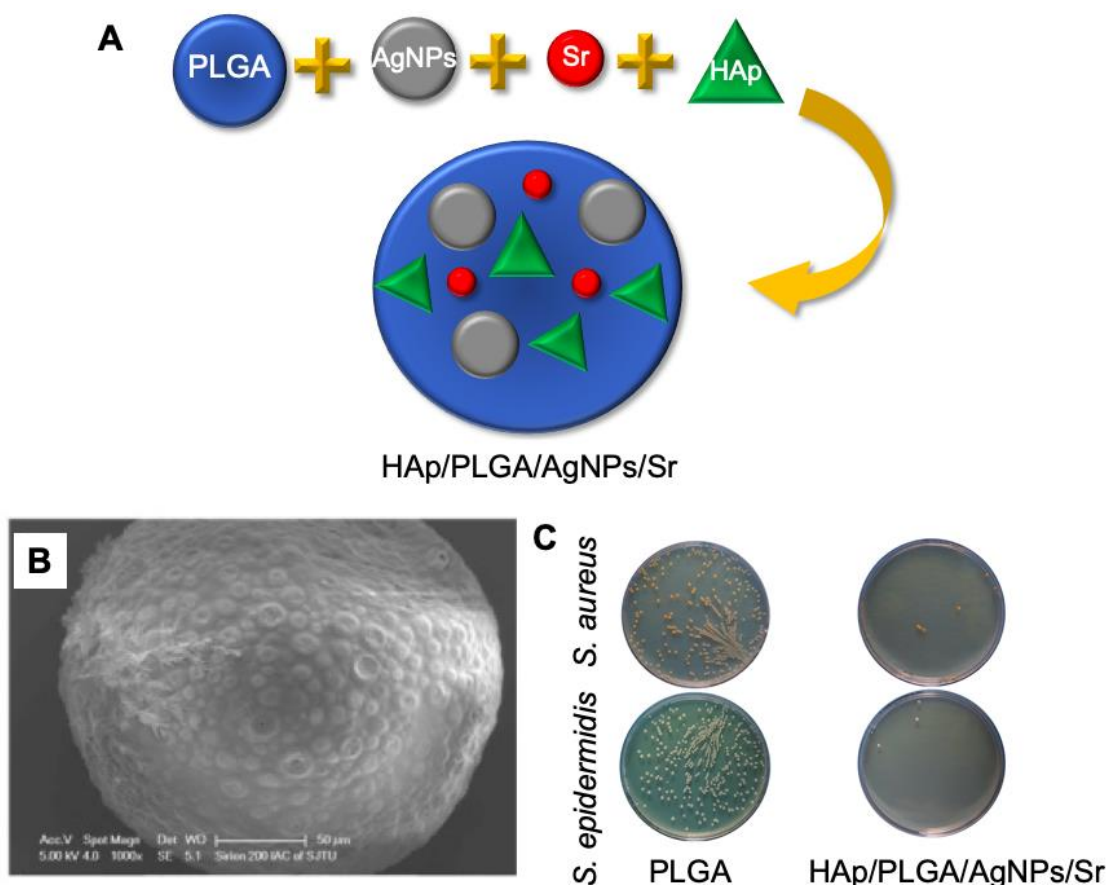


Fig. 5 – Schematic representation (A), SEM images (B) and antibacterial activity (C) of HAp/PLGA/AgNPs/Sr composites. Adapted with permission of Frontiers in pharmacology (2018).[65]

Polymethylmethacrylate (PMMA), a synthetic polymer that contains ester residues (Fig. 3), which has been used for several biomedical applications, namely for manufacture of hard contact lenses and for bone cement. This polymer presents good impact strength and good biocompatibility.[52] Having this in mind, Riau et al. (2019)[66] prepared a composite based on HAp/PMMA/AgNPs and tested its antibacterial ability against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The composites were prepared by dip coating the PMMA sheets in a solution containing commercial HAp and AgNPs. SEM images showed that the composite surface presents higher roughness than the PMMA surface, indicating that the deposition of HAp occurred as planned. The presence of Ag in the composites was confirmed by EDX and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). The HAp/PMMA/AgNPs biocompatibility was assessed in human corneal stromal fibroblasts, and it was observed that composites with lower AgNPs content (less than 5% relatively to HAp) did not reduce the cell viability, over 7 days. Furthermore, these composites were more efficient in preventing the formation of *P. aeruginosa* biofilms, than the *S. aureus*

biofilms. However, when the bacteria were cultivated in artificial tear fluid, the composites with 95:5 HAp:Ag ratio, did not prevent the *S. aureus* growth. The authors concluded that this decrease in the antibacterial efficiency was associated with the decrease of the Ag^+ release in this medium.

Poly(lactic acid) (PLA) is a polyester (Fig. 3) that can be prepared from natural sources, using lactic acid as the monomer. PLA has good biocompatibility and its degradation produces lactic acid, which does not have toxicity, enhancing the use of this polymer in biomedical applications.[52, 67] Aiming a material for bone implants, Liu et al. (2020)[67] prepared HAp/PLA fibers by electrospinning, and then deposited polydopamine (PDA) and AgNPs in their surface. The AgNPs-Py were prepared *in situ* by electrochemical deposition, using a solution containing Ag^+ and pyrrole (Py). SEM images confirmed the formation of nanofibers with AgNPs uniformly distributed in their surface. The ion release studies were carried out in phosphate buffered saline (PBS, pH = 7.4), and it was observed that the presence of Py and PDA in the composites decreased the releasing rate of Ag^+ , showing that these composites presented good physiological stability. The HAp/PLA/PDA/AgNPs-Py composites were able to completely inactivate *E. coli* and *S. aureus* strains, showing their antibacterial activity. The composites bioactivity was studied in SBF, and the results showed a significant deposition of apatite after 10 days. Studies with osteoblasts (from the calvarial bone of newborn rats) showed that HAp/PLA/PDA/AgNPs-Py composites are favorable for cell proliferation, indicating the composites biocompatibility.

Abdelaziz et al. (2021)[68] used a combination of PLA and CA or PCL as the organic matrix, to prepare HAp/polymer/AgNPs composites (Fig. 5A) with potential to be used in periodontal tissue regeneration. Firstly, nanosized HAp was prepared using the chemical precipitation strategy. AgNPs were prepared using extracts from the plant *Callistemon viminalis*. Then the nanofibers were prepared by electrospinning, mixing the HAp, AgNPs, and the polymer (PLA-CA or PCL). The formation of HAp was confirmed by XRD and FT-IR, and the presence of AgNPs was indicated by UV-vis spectroscopy and XRD. SEM images showed that fibers with NPs uniformly dispersed in their network were obtained by the authors (Fig. 5B). Mechanical assays showed that the tensile strength, for HAp/PLA-CA/AgNPs and HAp/PCL/AgNPs composites, was enhanced with the addition of the lower quantity of HAp tested. And, the increase in the AgNPs concentration also resulted in a decrease in the tensile strength, indicating the formation of brittle composites. The immersion of the fibers in SBF for 8

weeks, and it was observed the precipitation of calcium phosphate in these composites (Fig. 5C). Furthermore, the authors observed that the composites had a good Ag release rate, reaching 2.82 to 7.38 ppm after 35 days, which can be optimal for antibacterial activity. All the fibers were able to inhibit the growth of *E. coli* and *Enterococcus faecalis* bacteria strains, showing their antimicrobial activity. Besides, the composites showed good cytocompatibility with bone marrow stromal cells (BMSCs), supporting their proliferation, predicting that these composites will enhance the bone tissue growth *in vivo*.

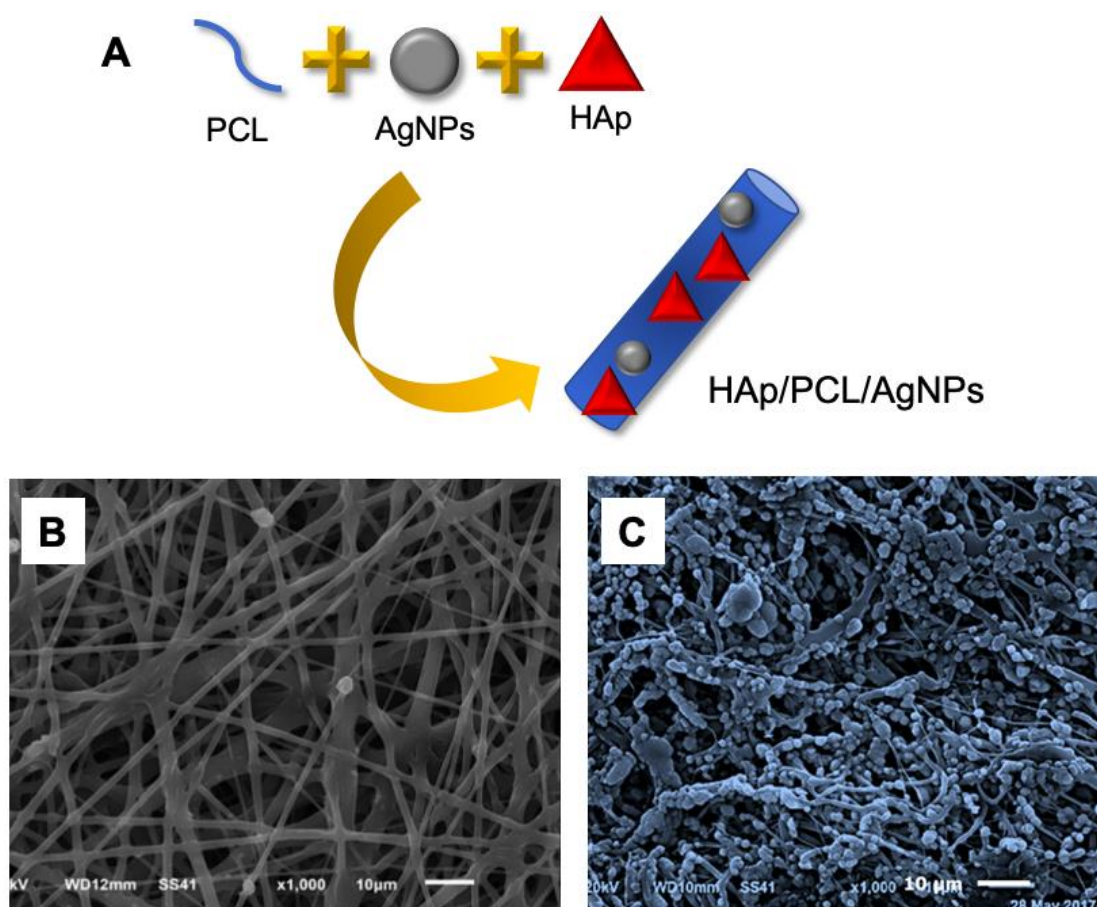


Fig. 6 – (A) Schematic representation of the formation of HAp/PCL/AgNPs fibers. SEM images of HAp/PCL/AgNPs (B) after preparation and (C) after immersion in SBF for 8 weeks. Adapted with permission of Elsevier (2021).[68]

Acknowledgments

The authors acknowledge the Brazilian agencies: Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support. And Fundação de Amparo à Ciência e a

Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for J. Monte scholarship. This work is also linked to the National Institute of Photonics (INCT-INFO).

References

- [1] P. Habibovic, J.E. Barralet, Bioinorganics and biomaterials: Bone repair, *Acta Biomater*, 7 (2011) 3013-3026.
- [2] S. Mitragotri, J. Lahann, Physical approaches to biomaterial design, *Nature Materials*, 8 (2009) 15-23.
- [3] M.M. Stevens, Biomaterials for bone tissue engineering, *Materials Today*, 11 (2008) 18-25.
- [4] S. Mondal, U. Pal, A. Dey, Natural origin hydroxyapatite scaffold as potential bone tissue engineering substitute, *Ceramics International*, 42 (2016) 18338-18346.
- [5] H. Cao, N. Kuboyama, A biodegradable porous composite scaffold of PGA/ β -TCP for bone tissue engineering, *Bone*, 46 (2010) 386-395.
- [6] S.M. Naga, M. Awaad, H.F. El-Maghraby, A.M. El-Kady, Biological Performance of Calcium Pyrophosphate-coated Porous Alumina Scaffolds, *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 11 (2014) 1-11.
- [7] H. Xie, Q. Wang, Q. Ye, C. Wan, L. Li, Application of K/Sr co-doped calcium polyphosphate bioceramic as scaffolds for bone substitutes, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23 (2012) 1033-1044.
- [8] L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, J.E. Ramirez-Vick, Scaffold design for bone regeneration, *J Nanosci Nanotechnol*, 14 (2014) 15-56.
- [9] P. Habibovic, K. de Groot, Osteoinductive biomaterials—properties and relevance in bone repair, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1 (2007) 25-32.
- [10] A.S. Brydone, D. Meek, S. Maclaine, Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 224 (2010) 1329-1343.
- [11] F.J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, 14 (2011) 88-95.
- [12] G. Ciobanu, S. Ilisei, C. Luca, Hydroxyapatite-silver nanoparticles coatings on porous polyurethane scaffold, *Materials Science and Engineering: C*, 35 (2014) 36-42.
- [13] H. Kim, S. Mondal, B. Jang, P. Manivasagan, M.S. Moorthy, J. Oh, Biomimetic synthesis of metal–hydroxyapatite (Au-HAp, Ag-HAp, Au-Ag-HAp): Structural analysis,

spectroscopic characterization and biomedical application, *Ceramics International*, 44 (2018) 20490-20500.

[14] J.R. Porter, T.T. Ruckh, K.C. Popat, Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies, *Biotechnology Progress*, 25 (2009) 1539-1560.

[15] J.R. Woodard, A.J. Hildore, S.K. Lan, C.J. Park, A.W. Morgan, J.A.C. Eurell, S.G. Clark, M.B. Wheeler, R.D. Jamison, A.J. Wagoner Johnson, The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity, *Biomaterials*, 28 (2007) 45-54.

[16] S. Koutsopoulos, Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods, *J Biomed Mater Res*, 62 (2002) 600-612.

[17] A. Fihri, C. Len, R.S. Varma, A. Solhy, Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis, *Coordin Chem Rev*, 347 (2017) 48-76.

[18] G. Tripathi, B. Basu, A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations, *Ceramics International*, 38 (2012) 341-349.

[19] I. Sopyan, M. Mel, S. Ramesh, K.A. Khalid, Porous hydroxyapatite for artificial bone applications, *Science and Technology of Advanced Materials*, 8 (2007) 116-123.

[20] W. Song, M. Tian, F. Chen, Y. Tian, C. Wan, X. Yu, The study on the degradation and mineralization mechanism of ion-doped calcium polyphosphate in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 89B (2009) 430-438.

[21] M. Swetha, K. Sahithi, A. Moorthi, N. Srinivasan, K. Ramasamy, N. Selvamurugan, Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 47 (2010) 1-4.

[22] X. Hu, W. Zhang, D. Hou, Synthesis, microstructure and mechanical properties of tricalcium phosphate–hydroxyapatite (TCP/HA) composite ceramic, *Ceramics International*, 46 (2020) 9810-9816.

[23] Z. Ni, X. Gu, Y. He, Z. Wang, X. Zou, Y. Zhao, L. Sun, Synthesis of silver nanoparticle-decorated hydroxyapatite (HA@Ag) poriferous nanocomposites and the study of their antibacterial activities, *RSC Advances*, 8 (2018) 41722-41730.

[24] F. Ren, Y. Leng, R. Xin, X. Ge, Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite, *Acta Biomater*, 6 (2010) 2787-2796.

- [25] D. Laurencin, N. Almora-Barrios, N.H. de Leeuw, C. Gervais, C. Bonhomme, F. Mauri, W. Chrzanowski, J.C. Knowles, R.J. Newport, A. Wong, Z. Gan, M.E. Smith, Magnesium incorporation into hydroxyapatite, *Biomaterials*, 32 (2011) 1826-1837.
- [26] E. Landi, A. Tampieri, M. Mattioli-Belmonte, G. Celotti, M. Sandri, A. Gigante, P. Fava, G. Biagini, Biomimetic Mg- and Mg₂(CO₃)₂-substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour, *Journal of the European Ceramic Society*, 26 (2006) 2593-2601.
- [27] X. Li, Y. Sogo, A. Ito, H. Mutsuzaki, N. Ochiai, T. Kobayashi, S. Nakamura, K. Yamashita, R.Z. Legeros, The optimum zinc content in set calcium phosphate cement for promoting bone formation in vivo, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 29 (2009) 969-975.
- [28] M. Otsuka, S. Marunaka, Y. Matsuda, A. Ito, P. Layrolle, H. Naito, N. Ichinose, Calcium level-responsive in-vitro zinc release from zinc containing tricalcium phosphate (ZnTCP), *J Biomed Mater Res*, 52 (2000) 819-824.
- [29] J.Z. Ilich, J.E. Kerstetter, Nutrition in Bone Health Revisited: A Story Beyond Calcium, *Journal of the American College of Nutrition*, 19 (2000) 715-737.
- [30] E. Canalis, M. Hott, P. Deloffre, Y. Tsouderos, P.J. Marie, The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro, *Bone*, 18 (1996) 517-523.
- [31] S.G. Dahl, P. Allain, P.J. Marie, Y. Murras, G. Boivin, P. Ammann, Y. Tsouderos, P.D. Delmas, C. Christiansen, Incorporation and distribution of strontium in bone, *Bone*, 28 (2001) 446-453.
- [32] R.J. Kane, G.L. Converse, R.K. Roeder, Effects of the reinforcement morphology on the fatigue properties of hydroxyapatite reinforced polymers, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1 (2008) 261-268.
- [33] J.R. Peralta-Videa, L. Zhao, M.L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong, J.L. Gardea-Torresdey, Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010, *J Hazard Mater*, 186 (2011) 1-15.
- [34] S. Pandey, G.K. Goswami, K.K. Nanda, Green synthesis of biopolymer–silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia detection, *International Journal of Biological Macromolecules*, 51 (2012) 583-589.
- [35] M. Neophytou, F. Hermerschmidt, A. Savva, E. Georgiou, S.A. Choulis, Highly efficient indium tin oxide-free organic photovoltaics using inkjet-printed silver nanoparticle current collecting grids, *Appl Phys Lett*, 101 (2012) 193302.

- [36] N. Pradhan, A. Pal, T. Pal, Silver nanoparticle catalyzed reduction of aromatic nitro compounds, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 196 (2002) 247-257.
- [37] W. Shao, X. Liu, H. Min, G. Dong, Q. Feng, S. Zuo, Preparation, Characterization, and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticle-Decorated Graphene Oxide Nanocomposite, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7 (2015) 6966-6973.
- [38] K.A. Juby, C. Dwivedi, M. Kumar, S. Kota, H.S. Misra, P.N. Bajaj, Silver nanoparticle-loaded PVA/gum acacia hydrogel: Synthesis, characterization and antibacterial study, *Carbohydrate Polymers*, 89 (2012) 906-913.
- [39] S. Taheri, A. Cavallaro, S.N. Christo, L.E. Smith, P. Majewski, M. Barton, J.D. Hayball, K. Vasilev, Substrate independent silver nanoparticle based antibacterial coatings, *Biomaterials*, 35 (2014) 4601-4609.
- [40] Z. Meran, A. Besinis, T. De Peralta, R.D. Handy, Antifungal properties and biocompatibility of silver nanoparticle coatings on silicone maxillofacial prostheses in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 106 (2018) 1038-1051.
- [41] A.M. Elgorban, A.E.-R.M. El-Samawaty, M.A. Yassin, S.R. Sayed, S.F. Adil, K.M. Elhindi, M. Bakri, M. Khan, Antifungal silver nanoparticles: synthesis, characterization and biological evaluation, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30 (2016) 56-62.
- [42] S.S. Nogueira, A.R. de Araujo-Nobre, A.C. Mafud, M.A. Guimarães, M.M.M. Alves, A. Plácido, F.A.A. Carvalho, D.D.R. Arcanjo, Y. Mascarenhas, F.G. Costa, P. Albuquerque, P. Eaton, J.R. de Souza de Almeida Leite, D.A. da Silva, V.S. Cardoso, Silver nanoparticle stabilized by hydrolyzed collagen and natural polymers: Synthesis, characterization and antibacterial-antifungal evaluation, *International Journal of Biological Macromolecules*, 135 (2019) 808-814.
- [43] J.L. Elechiguerra, J.L. Burt, J.R. Morones, A. Camacho-Bragado, X. Gao, H.H. Lara, M.J. Yacaman, Interaction of silver nanoparticles with HIV-1, *Journal of Nanobiotechnology*, 3 (2005) 6.
- [44] A. Salleh, R. Naomi, N.D. Utami, A.W. Mohammad, E. Mahmoudi, N. Mustafa, M.B. Fauzi, The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action, *Nanomaterials*, 10 (2020) 1566.

- [45] W. Liu, Y. Wu, C. Wang, H.C. Li, T. Wang, C.Y. Liao, L. Cui, Q.F. Zhou, B. Yan, G.B. Jiang, Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size, *Nanotoxicology*, 4 (2010) 319-330.
- [46] Y.K. Tak, S. Pal, P.K. Naoghare, S. Rangasamy, J.M. Song, Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter?, *Scientific Reports*, 5 (2015) 16908.
- [47] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez, M.J. Yacaman, The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 16 (2005) 2346-2353.
- [48] S. Pal, K. Tak Yu, M. Song Joon, Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*, *Appl Environ Microb*, 73 (2007) 1712-1720.
- [49] C. Marambio-Jones, E.M.V. Hoek, A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *J Nanopart Res*, 12 (2010) 1531-1551.
- [50] P.N. Silva-Holguín, S.Y. Reyes-López, Synthesis of Hydroxyapatite-Ag Composite as Antimicrobial Agent, Dose-Response, 18 (2020) 1559325820951342.
- [51] G. Calabrese, S. Petralia, D. Franco, G. Nocito, C. Fabbi, L. Forte, S. Guglielmino, S. Squarzone, F. Traina, S. Conoci, A new Ag-nanostructured hydroxyapatite porous scaffold: Antibacterial effect and cytotoxicity study, *Materials Science and Engineering: C*, 118 (2021) 111394.
- [52] M.Y. Kariduraganavar, A.A. Kittur, R.R. Kamble, Chapter 1 - Polymer Synthesis and Processing, in: S.G. Kumbar, C.T. Laurencin, M. Deng (Eds.) *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, Elsevier, Oxford, 2014, pp. 1-31.
- [53] D. Porrelli, A. Travan, G. Turco, M. Crosera, M. Borgogna, I. Donati, S. Paoletti, G. Adami, E. Marsich, Antibacterial-nanocomposite bone filler based on silver nanoparticles and polysaccharides, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12 (2018) e747-e759.
- [54] P.A. Dalavi, A. Prabhu, R.P. Shastri, J. Venkatesan, Microspheres containing biosynthesized silver nanoparticles with alginate-nano hydroxyapatite for biomedical applications, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 31 (2020) 2025-2043.
- [55] Y. Qi, H. Wang, K. Wei, Y. Yang, R.-Y. Zheng, I.S. Kim, K.-Q. Zhang, A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures, *International journal of molecular sciences*, 18 (2017) 237.

- [56] M. Ribeiro, M.P. Ferraz, F.J. Monteiro, M.H. Fernandes, M.M. Beppu, D. Mantione, H. Sardon, Antibacterial silk fibroin/nanohydroxyapatite hydrogels with silver and gold nanoparticles for bone regeneration, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13 (2017) 231-239.
- [57] G. Li, S. Qin, D. Zhang, X. Liu, Preparation of antibacterial degummed silk fiber/nano-hydroxyapatite/polylactic acid composite scaffold by degummed silk fiber loaded silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 30 (2019) 295101.
- [58] G.W. Ali, W. El-Hotaby, B. Hemdan, W.I. Abdel-Fattah, Thermosensitive chitosan/phosphate hydrogel-composites fortified with Ag versus Ag@Pd for biomedical applications, *Life Sci*, 194 (2018) 185-195.
- [59] R.J. Hickey, A.E. Pelling, Cellulose Biomaterials for Tissue Engineering, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7 (2019).
- [60] A.I. Nicoara, A.E. Stoica, D.-I. Ene, B.S. Vasile, A.M. Holban, I.A. Neacsu, In Situ and Ex Situ Designed Hydroxyapatite: Bacterial Cellulose Materials with Biomedical Applications, *Materials*, 13 (2020) 4793.
- [61] H.S. Sofi, T. Akram, N. Shabir, R. Vasita, A.H. Jadhav, F.A. Sheikh, Regenerated cellulose nanofibers from cellulose acetate: Incorporating hydroxyapatite (HAp) and silver (Ag) nanoparticles (NPs), as a scaffold for tissue engineering applications, *Materials Science and Engineering: C*, 118 (2021) 111547.
- [62] S. Jegatheeswaran, M. Sundrarajan, PEGylation of novel hydroxyapatite/PEG/Ag nanocomposite particles to improve its antibacterial efficacy, *Materials Science and Engineering: C*, 51 (2015) 174-181.
- [63] X. Tian, X. Yuan, D. Feng, M. Wu, Y. Yuan, C. Ma, D. Xie, J. Guo, C. Liu, Z. Lu, In vivo study of polyurethane and tannin-modified hydroxyapatite composites for calvarial regeneration, *Journal of Tissue Engineering*, 11 (2020) 2041731420968030.
- [64] S. Jegatheeswaran, S. Selvam, V. Sri Ramkumar, M. Sundrarajan, Novel strategy for f-HAp/PVP/Ag nanocomposite synthesis from fluoro based ionic liquid assistance: Systematic investigations on its antibacterial and cytotoxicity behaviors, *Materials Science and Engineering: C*, 67 (2016) 8-19.
- [65] Z. Mao, Y. Li, Y. Yang, Z. Fang, X. Chen, Y. Wang, J. Kang, X. Qu, W. Yuan, K. Dai, B. Yue, Osteoinductivity and Antibacterial Properties of Strontium Ranelate-Loaded Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microspheres With Assembled Silver and Hydroxyapatite Nanoparticles, *Front Pharmacol*, 9 (2018) 368-368.

- [66] A.K. Riau, T.T. Aung, M. Setiawan, L. Yang, G. H. F. Yam, R. W. Beuerman, S. S. Venkatraman, J. S. Mehta, Surface Immobilization of Nano-Silver on Polymeric Medical Devices to Prevent Bacterial Biofilm Formation, *Pathogens*, 8 (2019) 93.
- [67] F. Liu, X. Wang, T. Chen, N. Zhang, Q. Wei, J. Tian, Y. Wang, C. Ma, Y. Lu, Hydroxyapatite/silver electrospun fibers for anti-infection and osteoinduction, *Journal of Advanced Research*, 21 (2020) 91-102.
- [68] D. Abdelaziz, A. Hefnawy, E. Al-Wakeel, A. El-Fallal, I.M. El-Sherbiny, New biodegradable nanoparticles-in-nanofibers based membranes for guided periodontal tissue and bone regeneration with enhanced antibacterial activity, *Journal of Advanced Research*, 28 (2021) 51-62.

ANEXO B - ESQUEMAS DE PLACAS DE 96 POÇOS

Neste anexo está descrita a organização das placas de 96 poços e os resultados associados aos ensaios bacteriológicos. As placas foram esquematizadas em função das concentrações de cada AgNP sintetizada neste trabalho. As iniciais C1, C2, C3, C4 e C5 referem as concentrações 10, 15, 20, 100 e 200 mg/mL, respectivamente. A legenda M0 refere-se ao controle, contendo o meio de cultura, o inóculo e resazurina.

Figura 20 - (a) Esquema de distribuição em placas de 96 poços das amostras AgNP-14-Alg, AgNP-15-Alg, AgNP-16-Alg e AgNP-17-Alg nas concentrações C1, C2 e C3. (b) Realização do ensaio antibacteriano.

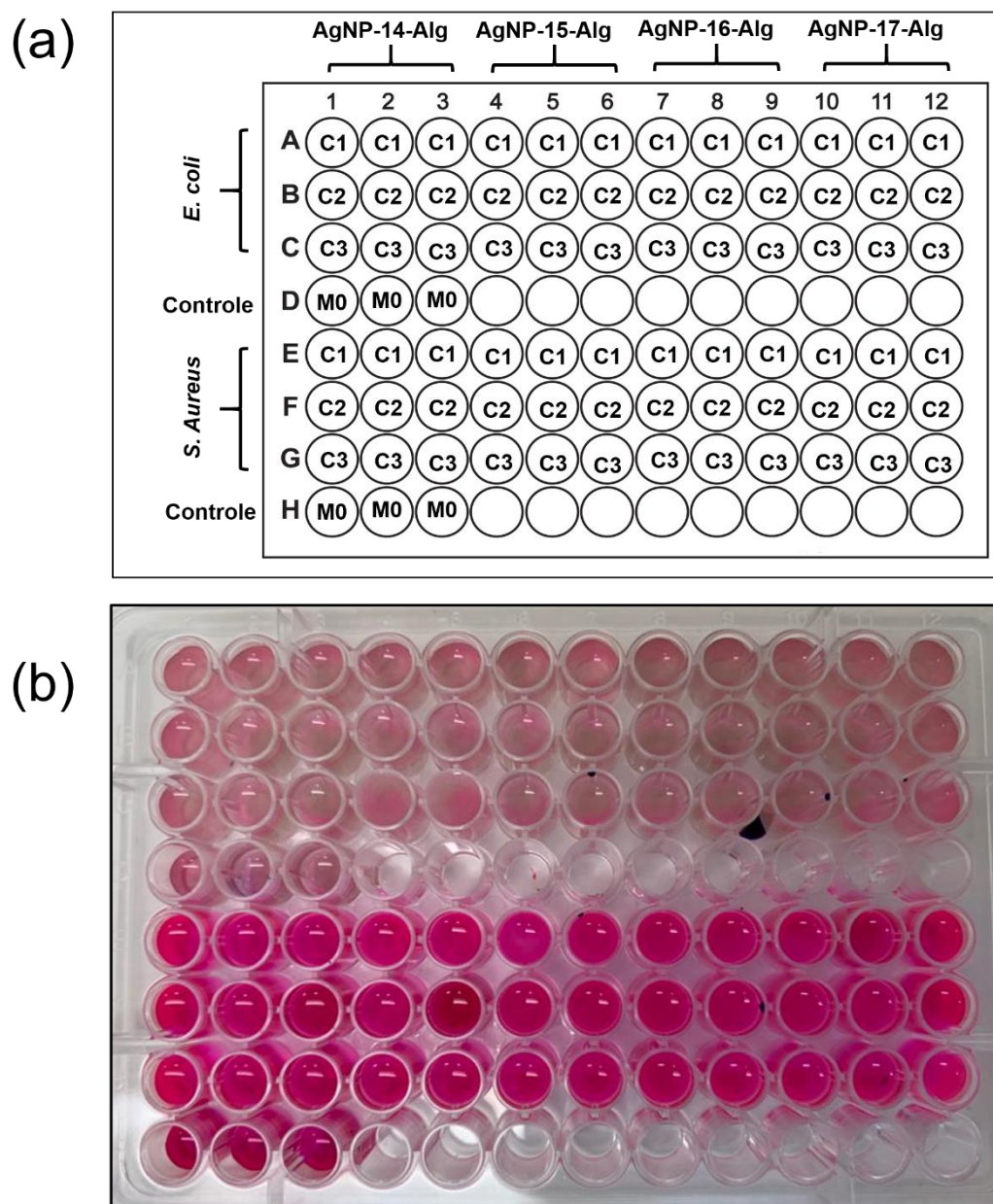
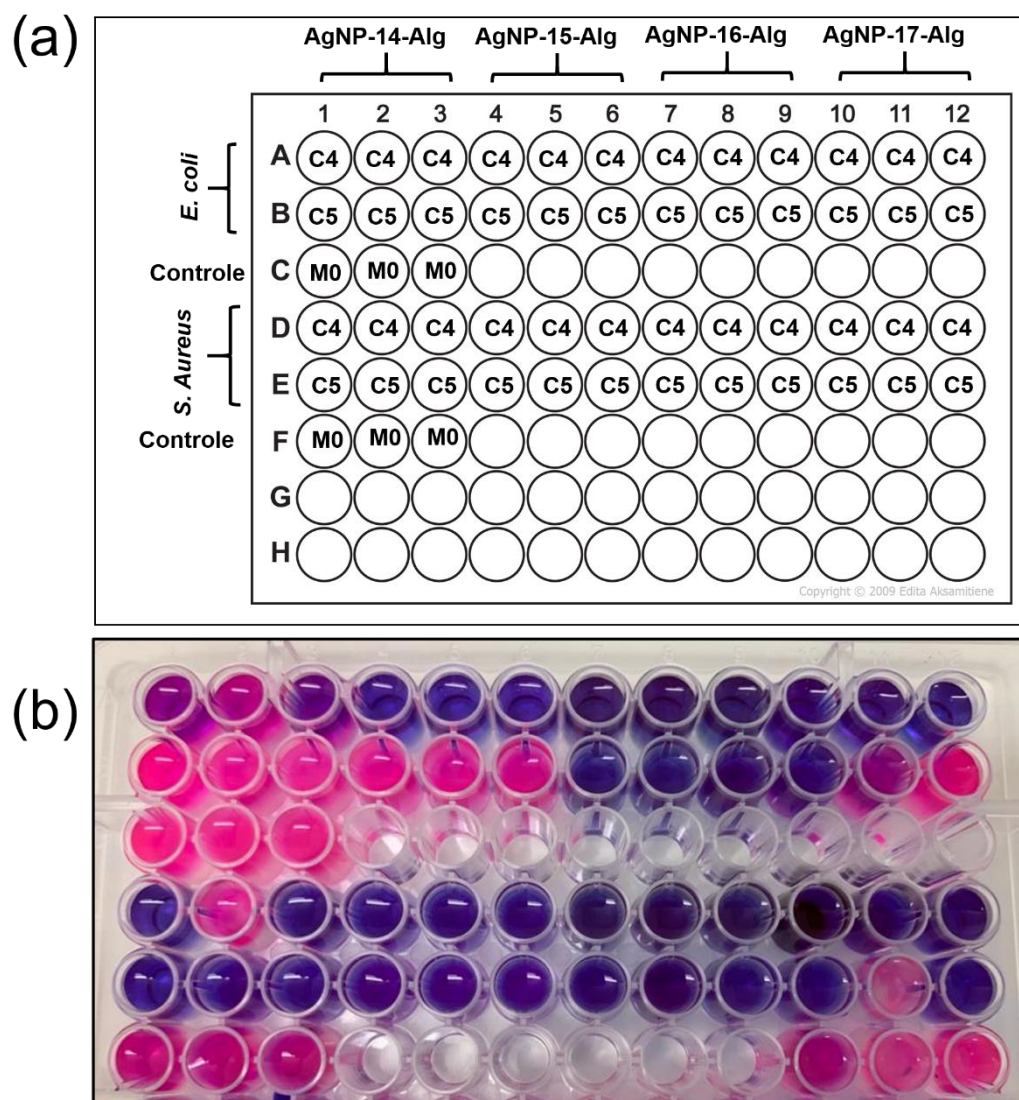
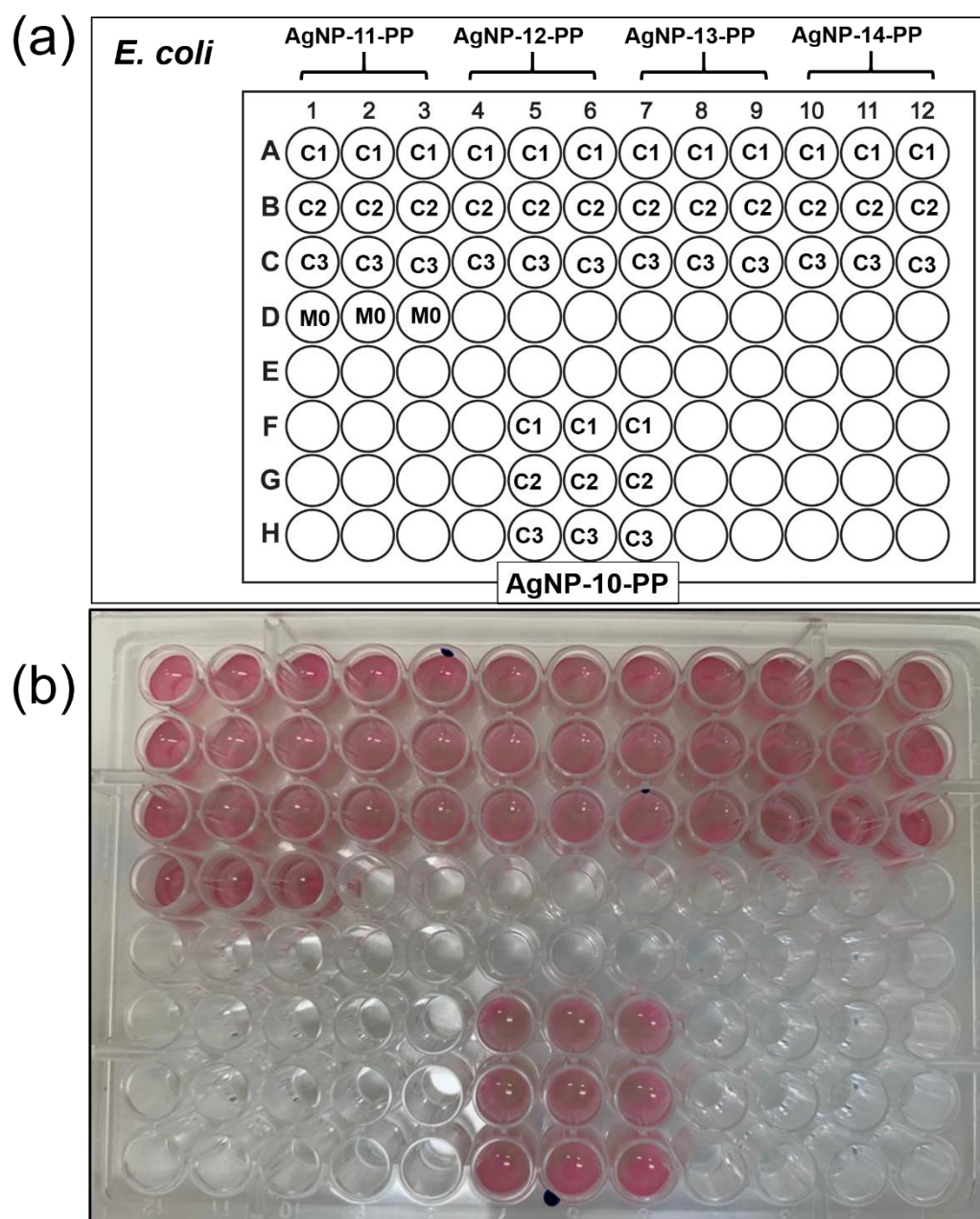


Figura 21 - (a) Esquema de distribuição em placas de 96 poços das amostras AgNP-14-Alg, AgNP-15-Alg, AgNP-16-Alg e AgNP-17-Alg nas concentrações C4 e C5. (b) Realização do ensaio antibacteriano.



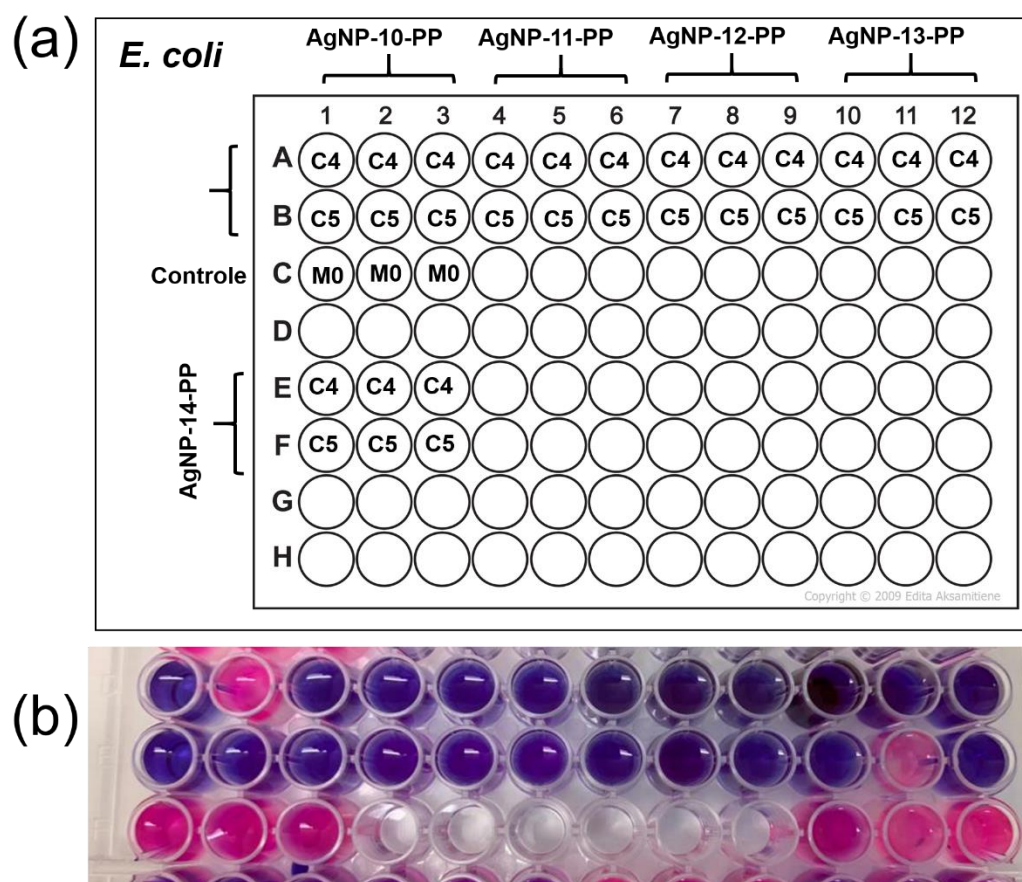
Fonte: O autor (2021)

Figura 22 - (a) Esquema de distribuição em placas de 96 poços das amostras AgNP-10-PP, AgNP-11-PP, AgNP-12-PP, AgNP-13-PP e AgNP-14-PP nas concentrações C1, C2 e C3. (b) Realização do ensaio antibacteriano.



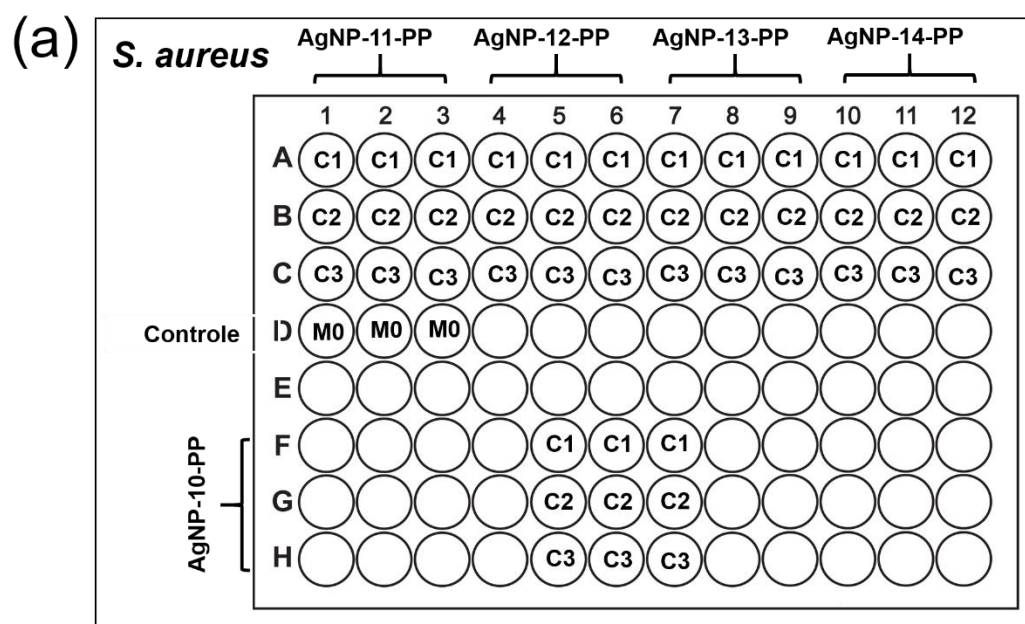
Fonte: O autor (2021)

Figura 23 - (a) Esquema de distribuição em placas de 96 poços das amostras AgNP-10-PP, AgNP-11-PP, AgNP-12-PP, AgNP-13-PP e AgNP-14-PP nas concentrações C4 e C5. (b) Realização do ensaio antibacteriano.

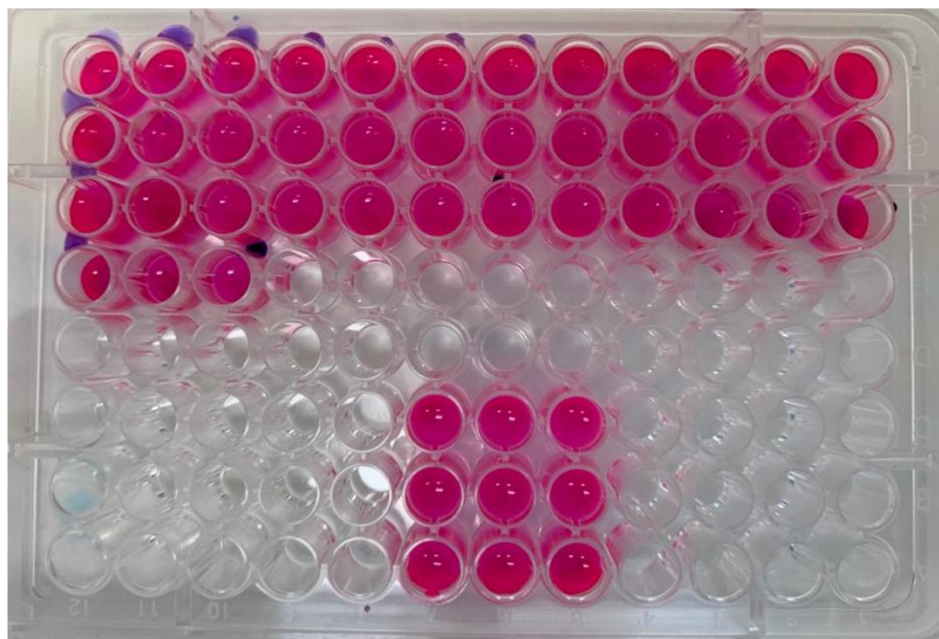


Fonte: O autor (2021)

Figura 24 - (a) Esquema de distribuição em placas de 96 poços das amostras AgNP-10-PP, AgNP-11-PP, AgNP-12-PP, AgNP-13-PP e AgNP-14-PP nas concentrações C1, C2 e C3. (b) Realização do ensaio antibacteriano.

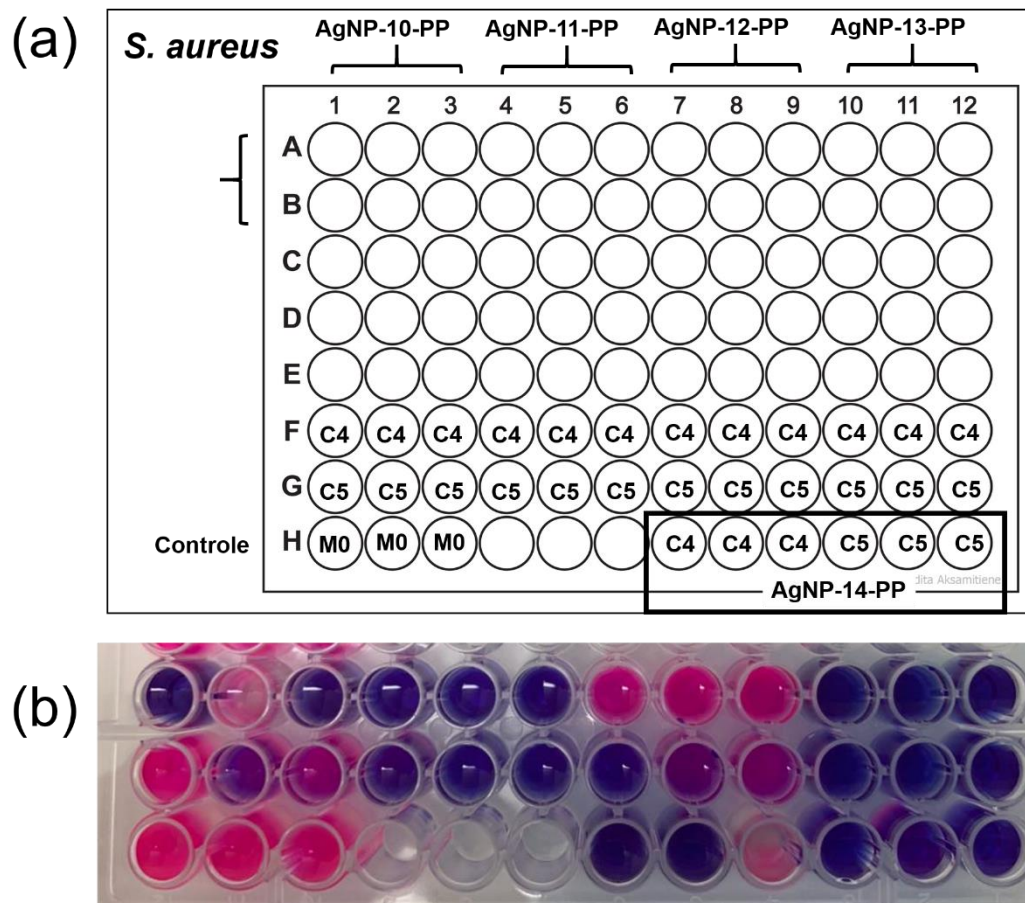


(b)



Fonte: O autor (2021)

Figura 25 - (a) Esquema de distribuição em placas de 96 poços das amostras AgNP-10-PP, AgNP-11-PP, AgNP-12-PP, AgNP-13-PP e AgNP-14-PP nas concentrações C4 e C5. (b) Realização do ensaio antibacteriano.



Fonte: O autor (2021)