

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BACTERICIDAS DE HIDROXIAPATITA PARCIALMENTE SUBSTITUÍDA COM ÍONS DE PRATA¹

SYNTHESIS AND EVALUATION OF BACTERICIDAL PROPERTIES OF HYDROXYAPATITE PARTIALLY SUBSTITUTED BY SILVER IONS

Jéssica Helisa Hautrive Rossato², Rubens Camaratta³ e Tiago Moreno Volkmer⁴

RESUMO

A hidroxiapatita (HA) é uma biocerâmica que pode sofrer substituições iônicas na sua estrutura, dando a este material propriedades físico-químicas e características biológicas específicas. Quando combinada a íons de prata transforma-se em um biomaterial com propriedades bactericidas. O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar hidroxiapatita parcialmente substituída por íons de prata, visando obter um material com propriedades bactericidas. As amostras foram obtidas pelo método de precipitação via úmida com o uso de defloculante, o que permitiu o aumento do rendimento da reação. A análise do pó obtido por espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformação de Fourier e difração de raios X confirmaram a presença da fase cristalina hidroxiapatita. A incorporação dos íons Ag^+ na rede cristalina ocorreu nas amostras tratadas termicamente a $800^{\circ}C$, que foi confirmada por difração de raios X. A adição dos íons Ag^+ influenciou nas cargas superficiais da HA, e modificou o potencial zeta. Os ensaios bactericidas mostraram que a adição de íons de prata a HA aumentou a atividade bactericida diante da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: biocerâmica, síntese, atividade bactericida.

ABSTRACT

*Hydroxyapatite (HA) is a bioceramic that can undergo ionic substitutions in its structure. This process gives this material specific physical-chemical properties and some biological characteristics. When it is combined with silver ions, HA becomes a biomaterial with bactericidal properties. The objective of this work is to synthesize and characterize silver incorporated hydroxyapatite in order to obtain a material with bactericidal properties. The samples were obtained by the wet precipitation method, with the usage of deflocculant. This procedure resulted in the rise of reaction outcome. The analysis of the powder obtained by vibration spectroscopy in the infrared region by Fourier transformation and X-ray diffraction confirmed the presence of the hydroxyapatite crystalline phase. The incorporation of the Ag^+ ion to the crystalline net occurred in the sample that received heating treatment at $800^{\circ}C$. The confirmation of this result occurred by X-ray diffraction. The addition of Ag^+ ions influenced the surface charge of HA, and modified the Zeta Potential. The bactericidal tests showed that the incorporation of silver ions to the HA structure increased its bactericidal activity against the *Pseudomonas aeruginosa* bacteria.*

Keywords: *bioceramic, synthesis, bactericidal activity.*

¹ Trabalho Final de Graduação - TFG.

² Acadêmica do Curso de Engenharia de Materiais - Centro Universitário Franciscano.

³ Coorientador - Centro Universitário Franciscano. E-mail: rubenscamaratta@yahoo.com.br

⁴ Orientador - Centro Universitário Franciscano. E-mail: tiagovolkmer@gmail.com

INTRODUÇÃO

A hidroxiapatita (HA) é o principal componente mineral dos ossos e dos dentes humanos, sendo que cerca de 95% da fase mineral é constituída pela hidroxiapatita. Sob a forma sintética, vem sendo bastante utilizada por ser um material bioativo, o que a torna um excelente biomaterial para implantes de longa permanência (AOKI, 1991). Essa biocerâmica, além de ser biocompatível e bioativa, exerce o papel de osteocondução, graças a sua similaridade com a composição mineral óssea fazendo com que ocorra o crescimento ósseo quando em contato com esses tecidos, o que faz dela um excelente material para o recobrimento de próteses. A regeneração do tecido também é induzida na superfície da hidroxiapatita, a qual permite interações do tipo dipolo, fazendo com que moléculas de água, proteínas e colágeno sejam absorvidas na sua superfície. Isto possibilita a ocorrência de uma forte ligação entre a superfície da hidroxiapatita e o tecido ósseo sob condições *in vivo* (MANSUR et al., 2004). Devido a não distinção, pelas células do organismo, entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo, a proliferação de osteoblastos e outras células ósseas são permitidas, visto que a hidroxiapatita estabelece ligações de natureza química com o tecido (ISHIDA, 2004).

A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67 sendo o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos. A hidroxiapatita possui uma célula unitária hexagonal formada por 10 íons de Ca^{2+} , 6 grupos fosfatos (PO_4^{3-}) e 2 íons de hidroxila (OH^-). Sua estrutura permite que ocorram substituições iônicas, o que possibilita que a HA tenha propriedades físico-químicas e características biológicas específicas, as quais variam em função do efeito biológico dos íons. Os grupos que podem ser substituídos são os fosfatos (PO_4^{3-}), as hidroxilas (OH^-) e os íons de cálcio (Ca^{2+}), sendo substituídos por cátodos e ânodos com grande facilidade. Entre os íons que podem ser adicionados a hidroxiapatita, destacam-se os íons de prata (Ag^+), que uma vez incorporados à estrutura da HA possibilitam a melhoria das propriedades e funcionalidade ao biomaterial. Em relação à atividade bactericida, os íons de Ag^+ inibem a formação e adesão de biofilmes sobre as superfícies contendo apatita sem que comprometa a bioatividade da biocerâmica. Estes íons podem contribuir de forma significativa para a diminuição da cristalinidade, aumentando a instabilidade térmica do material (BOANINI; GAZZANO; BIGI, 2010). A incorporação dos íons de prata (Ag^+) na rede da hidroxiapatita pode provocar alterações nos valores dos parâmetros de rede da célula unitária e, conseqüentemente, no seu volume (NATH; KALMODIA; BASU, 2010; STANIC et al., 2011).

Dentre os métodos existentes para a síntese da hidroxiapatita, destaca-se o método de precipitação via úmida, que é o mais popularmente conhecido (ISHIDA, 2004). Tal método consiste em uma reação de neutralização ácido-base, que tem como produto final hidroxiapatita amorfa. O controle dos parâmetros de reação, como velocidade de adição, natureza e concentração dos reagentes, *pH*, temperatura e tempo de envelhecimento influenciam diretamente as características finais do pó (com-

posição, morfologia e granulometria) e o rendimento desses (AOKI, 1991). A escolha deu-se devido à simplicidade do método, porém optou-se pela temperatura ambiente para a obtenção do pó a fim de obter melhores parâmetros de trabalho.

O objetivo deste trabalho foi obter hidroxiapatita por meio do método de síntese via úmida, a uma temperatura ambiente e caracterizar a hidroxiapatita pura e a HA contendo íons de prata em baixas concentrações visando obter propriedades bactericidas.

METODOLOGIA

SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita foi obtida por meio do método de precipitação via úmida, que basicamente consiste em uma reação ácido-base e foi escolhida para a síntese da HA por se tratar de uma técnica relativamente simples. A obtenção da HA pura deu-se pela adição lenta de uma solução de ácido fosfórico (Vetec, 85%) (H_3PO_4), com concentração de 1 Molar a uma solução de hidróxido de cálcio (Nuclear, 95%) ($Ca(OH)_2$) com concentração de 1 Molar contendo 4% de defloculante Disperlan sob agitação magnética constante e temperatura ambiente. Ao término da reação, a suspensão foi envelhecida por 24 horas com agitação mecânica constante, sendo então submetida à secagem em estufa a $100^\circ C$ por 48 horas. Posteriormente, a amostra foi desaglomerada com auxílio de um almofariz e dividida em quatro partes que foram tratadas termicamente nas temperaturas de $600^\circ C$, $800^\circ C$ e $1000^\circ C$ com patamar de 2 horas. A razão cálcio/fósforo foi calculada para ser de 1,67, equivalente ao valor estequiométrico da hidroxiapatita.

SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA COM A INCORPORAÇÃO DE ÍONS

Para a obtenção da hidroxiapatita com adição de íons de prata, utilizou-se a metodologia anterior. Entretanto, para a preparação da HA incorporada com Ag^+ , substituiu-se 1% da solução de hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) por 1% de uma solução de 1 Molar de nitrato de prata (Vetec, 96%) ($Ag(NO_3)$). A suspensão obtida foi envelhecida por 24 horas com agitação mecânica constante e, após foi seca em estufa a $100^\circ C$ por 48 horas. Então a amostra foi desaglomerada com auxílio de um almofariz e dividida em 4 partes que foram tratadas termicamente nas temperaturas de $600^\circ C$, $800^\circ C$ e $1000^\circ C$ por 2 horas.

CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES

As fases cristalinas dos materiais obtidos foram identificadas por meio da técnica de difração de raios X (DRX), antes e após os tratamentos térmicos, utilizando um difratômetro Bruker D2 Advance

com tubo de cobre (radiação $K_{\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$), sendo a tensão e a corrente de 30 kV e 30 mA, respectivamente. O difratômetro utilizado possui geometria $\theta - \theta$. A velocidade de varredura do goniômetro foi de $0,02^{\circ}/s$, sendo o intervalo de varredura de 20° a 45° . Por meio dos difratogramas de raios X foi possível determinar o tamanho de partícula fazendo uma varredura em um intervalo de 25° a $26,5^{\circ}$, com um passo de $0,002^{\circ}$ e tempo de 1 segundo. Então, empregando-se a Equação de Scherrer (1) foi possível a determinação do tamanho de cristalito.

$$d_{Scherrer} = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (1)$$

em que $d_{scherrer}$ é o diâmetro médio de cristalito; k é a constante de proporcionalidade que depende da forma das partículas, assumida como sendo esférica (0,9); λ é o comprimento de onda da radiação do Cu ($1,5406 \text{ \AA}$) e β é a largura a meia altura do pico.

A partir dos difratogramas foi possível calcular os parâmetros de rede a e c da estrutura cristalina da hidroxiapatita em relação aos planos perpendiculares (002) e (300). Para tal, foi utilizada a relação padrão entre as distâncias interplanares para uma célula unitária de um sistema hexagonal, de acordo com a equação (2) (WEBSTER et al., 2004).

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (2)$$

em que d é a distância entre planos adjacentes definidos pelos índices de Miller ($h k l$) e os termos a e c representam os parâmetros de rede da célula unitária.

A técnica de espectroscopia de infravermelho por transformação de Fourier (FTIR) foi utilizada como técnica auxiliar, sendo que detecta as frequências de vibração das ligações químicas no sólido. Nesta técnica, as amostras foram caracterizadas no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando um espectrômetro - Perkin Elmer (modelo Spectrum 1000) - Para esta análise, as amostras foram preparadas em uma pastilha de KBr de grau espectroscópico na proporção de 0,3 mg de pó para 300 mg de KBr.

A morfologia das partículas foi observada com o auxílio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando um equipamento JEOL (modelo JSM-6060).

Com o intuito de avaliar as propriedades superficiais da HA devido à incorporação dos íons de Ag^+ , utilizou-se um equipamento Zetasizer nano-ZS (modelo ZEN 3600) para determinar o Potencial Zeta. Para tal, foram pesadas 20 mg de cada amostra, diluídas em 1 ml de NaCl e agitadas por 5 min em um banho de ultrassom. Após isto, colocou-se a amostra líquida em uma cubeta para a execução das análises.

A atividade bactericida foi determinada pelo Método de Difusão, utilizando para tal uma placa de 96 poços com Ágar Mueller-Hinton contendo várias concentrações dos compostos em diluições

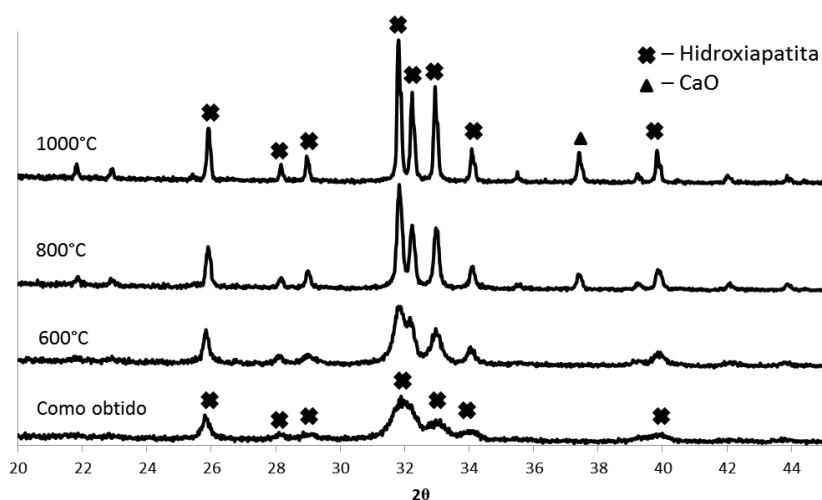
sequenciais múltiplas de 2. Posteriormente, foi inoculada a suspensão bacteriana preparada e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura foi realizada pela observação da turbidez ou não no meio, indicando crescimento ou inibição do crescimento dos microorganismos testados. Será considerada como Concentração Mínima Inibitória (MIC) a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tipicamente a síntese da hidroxiapatita por precipitação via úmida é realizada com concentrações molares abaixo de 0.5M, visando evitar a precipitação de β fosfato tricalcico (ISHIDA, 2004). Entretanto, o uso de um defloculante aniônico, Disperlan, leva à diminuição da viscosidade do sistema, permitindo o aumento da concentração da solução de hidróxido de cálcio para 1M, valor duas vezes mais alto do que os normalmente utilizados na literatura, levando a um aumento no rendimento da reação.

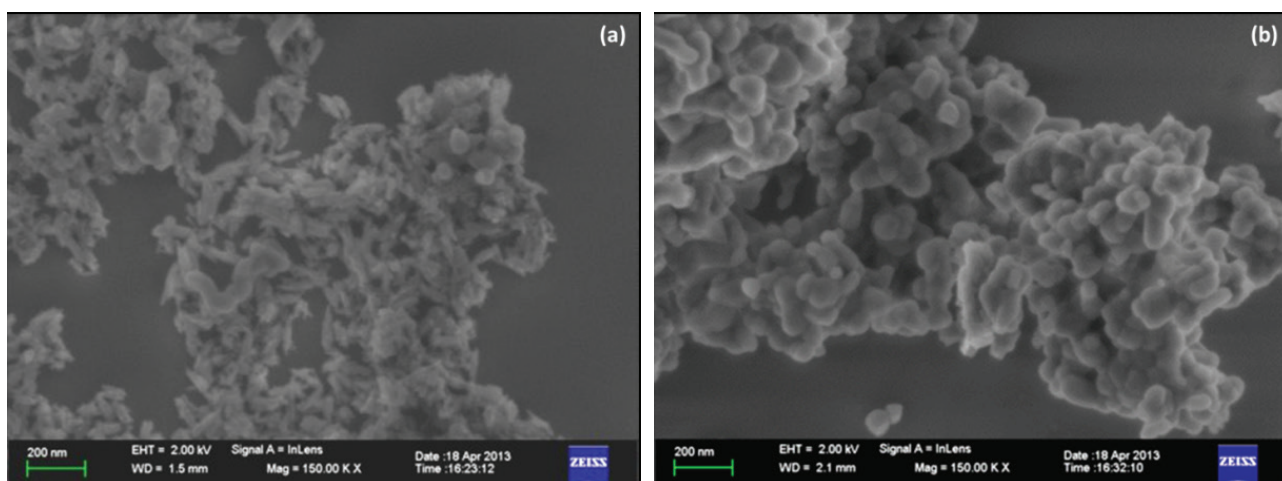
A figura 1 apresenta os padrões de difração de raios X das amostras tratadas termicamente a 600, 800 e 1000°C. Analisando-se o padrão de difração de raios X da amostra como obtida na figura 1, identificou-se a presença de picos largos e com baixa intensidade quando não é realizado o tratamento térmico, resultando em um produto de reação que consiste em um fosfato de cálcio com baixa cristalinidade. À medida que a temperatura do tratamento térmico foi elevada, houve a formação da fase de hidroxiapatita cristalina cada vez mais bem definida. Entretanto, acima de 600°C houve a formação de uma fase de óxido de cálcio (CaO) caracterizada pelo aparecimento de um pico em 37,7°, caracterizando a biocerâmica como uma hidroxiapatita carbonada, ou seja, com deficiência de cálcio. Essa incorporação não chega a ser indesejada, visto que a hidroxiapatita biológica contém o mesmo e este não modificara a biocompatibilidade do material (ISHIDA, 2004). Contudo, a presença de grupos carbonato na estrutura da HA, pode aumentar a solubilidade da hidroxiapatita (PAN; DARVELL, 2007).

Figura 1 - Padrões de difração de raios X identificando a fase cristalina da hidroxiapatita após tratamentos térmicos em diferentes temperaturas.



Os padrões de difração de raios X para as amostras sintetizadas exibiram picos alargados, o que pode ser associado ao baixo grau de cristalinidade tipicamente exibido pela hidroxiapatita obtida por precipitação (COX et al., 2014). O aumento da temperatura, entretanto, levou ao aumento da cristalinidade da HA, e ao surgimento de um pico em $37,7^\circ$, correspondente à fase óxido de cálcio (CaO). O que indica que há um desbalanço estequiométrico na hidroxiapatita obtida, levando a formação de uma hidroxiapatita deficiente em cálcio. Tipicamente, a hidroxiapatita deficiente em cálcio tende a sofrer transformações de fase a partir de 800°C gerando β -TCP (MOREIRA, 2010), entretanto, esta fase não foi encontrada nos difratogramas. Os resultados mostram que se obteve uma hidroxiapatita com deficiência de cálcio quando calcinadas acima de 600°C o que pode ter influenciado na incorporação dos íons na estrutura, como mostram os resultados obtidos na caracterização das amostras. Com isso, a temperatura de calcinação de 800°C foi definida para os tratamentos térmicos, uma vez que a partir desta temperatura a HA já começou a demonstrar picos mais definidos e apresentou um maior grau de cristalinidade. Na figura 2 são apresentadas as análises realizadas por MEV da hidroxiapatita antes e após o tratamento térmico.

Figura 2 - Imagem obtida por MEV da hidroxiapatita pura (a) como obtida e (b) tratada termicamente a 800°C .



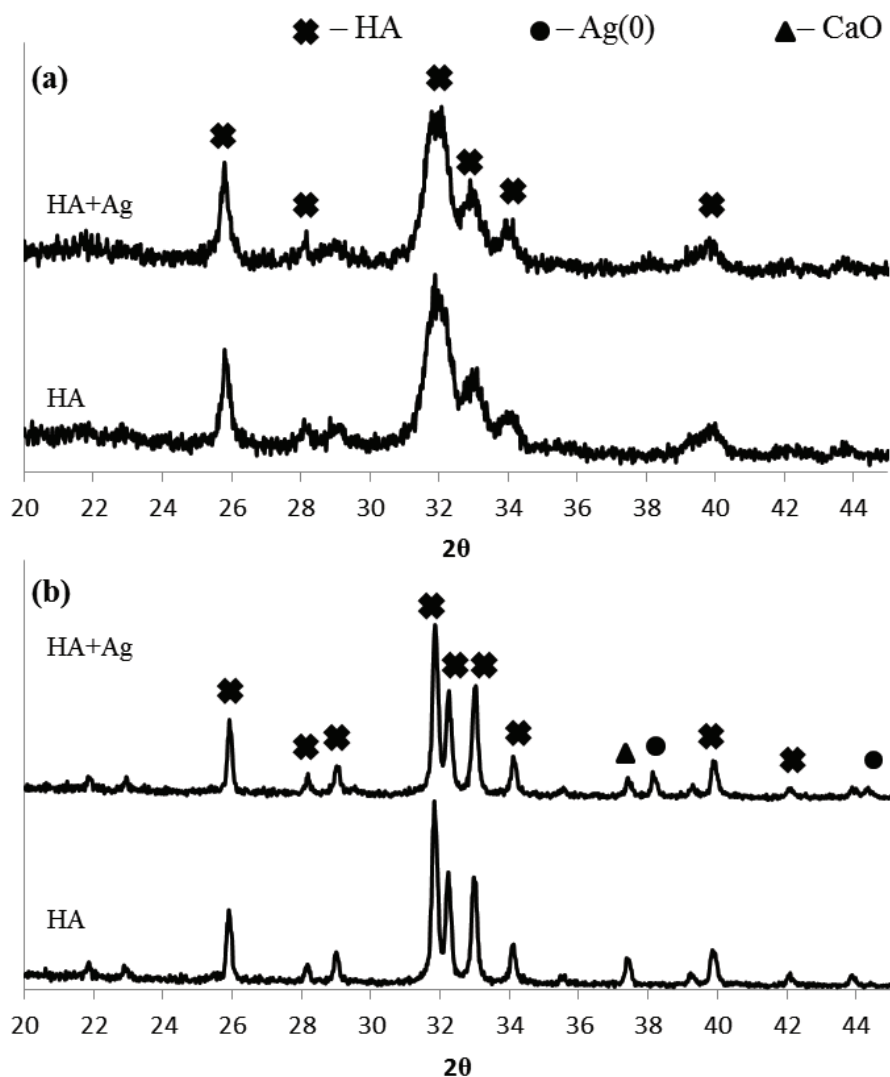
A morfologia das partículas da biocerâmica é importante para prever o comportamento em meio fisiológico. Devido ao pequeno tamanho de partícula alcançado, que é intrínseco ao método de obtenção dos pós por precipitação, não se pode observar a morfologia individual das partículas pela técnica de microscopia utilizada, visto que estas se aglomeram devido a sua grande área superficial (ISHIDA, 2004). Analisando as imagens obtidas por MEV, percebe-se que foi obtido uma HA em formato de agulhas, e que após tratamento térmico estas agulhas formaram pequenos aglomerados com formato esférico.

INCORPORAÇÃO DE ÍONS DE PRATA NA ESTRUTURA CRISTALINA DA HA

A figura 3 apresenta o padrão de difração de raios X das amostras com adição de prata e da hidroxiapatita como obtida, sem tratamento térmico e com tratamento térmico a 800°C . Analisando

o difratograma da amostra HA+Ag, percebe-se que com o tratamento térmico houve o aparecimento de um pico em $38,1^\circ$ e outro em $44,3^\circ$ correspondente a fase da prata metálica ($Ag_{(0)}$) (DIAZ et al., 2009). Esta fase ocorre devido a redução dos íons de prata Ag^+ em prata metálica ($Ag_{(0)}$) com o tratamento térmico (OGATA et al., 2009). De acordo com a literatura, não há um consenso quanto ao sítio ocupado pelos íons de Ag^+ na estrutura cristalina da HA. Para alguns autores, a incorporação do Ag^+ ocorre, preferencialmente, no sítio em que os íons de Ca^{2+} se encontram confinados no interior de tetraedros rígidos do grupo PO_4^{3-} (BADROUR et al., 1998). O tamanho de cristalito e parâmetros de rede das estruturas cristalinas, foram calculados a partir dos difratogramas de raio X, utilizando-se as equações 1 e 2, respectivamente, e são mostrados na tabela 2. Os resultados mostram que não houve a expansão da rede devido à presença dos íons Ag^+ , pelo contrário ocorreu a contração da rede quando adicionado 1% em peso de íons Ag^+ o que possibilita que tenha ocorrido a substituição parcial do Ca^{2+} pela Ag^+ , sendo que a e c contraíram.

Figura 3 - DRX das amostras contendo os íons incorporados sem tratamento térmico (a) e com tratamento térmico (b).



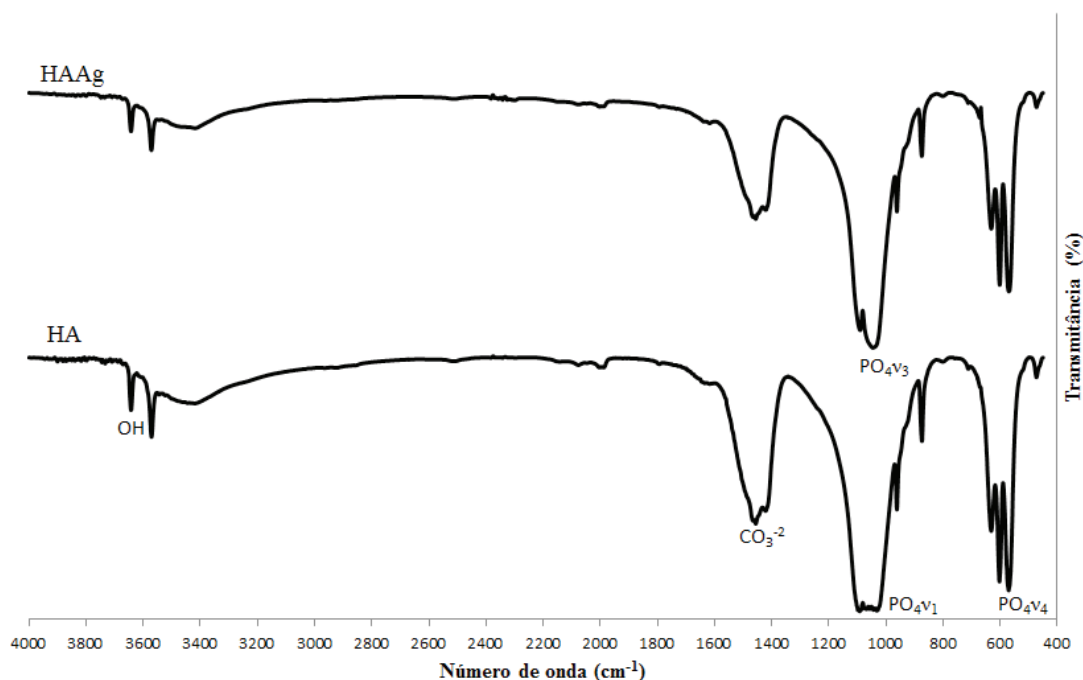
Geralmente a inserção de metais à estrutura da HA pode afetar diretamente o crescimento dos cristais de apatita formados (BOANINI; GAZZANO; BIGI, 2010). O tamanho de cristalito, observado na tabela 1, mostrou que os valores diminuíram após o tratamento térmico das amostras, o que pode ter acontecido devido às condições do processo de calcinação e aos valores de concentrações dos íons.

Tabela 1 - Parâmetros de rede e tamanho de cristalito das amostras.

<i>Tratamento Térmico</i>	<i>Amostra</i>	<i>Parâmetros de Rede</i>			<i>Tamanho do Cristalito (nm)</i>
		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	
Como foi obtida	HA	9,389	9,389	6,892	81,96
	HAAg	9,111	9,111	6,879	92,98
800°C	HA	9,101	9,101	6,872	63,65
	HAAg	9,095	9,095	6,867	62,29

A caracterização por Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é demonstrado na figura 4. A análise do gráfico mostra a presença de grupos fosfato e hidroxila em todas as amostras após o processo de calcinação a 800°C. A presença do pico largo entre 1600 e 1700 cm^{-1} , correspondendo à vibração do grupo O-H, demonstra a presença de água estrutural absorvida no produto da síntese. Há um pico em torno de 634 cm^{-1} que corresponde ao modo vibracional do grupo OH estrutural da HA, o que confirma os resultados obtidos pela difração de raios X. As bandas características da estrutura tetraedral da hidroxiapatita são claramente observadas em 473 cm^{-1} , 563 cm^{-1} , 603 cm^{-1} , 960 cm^{-1} e 1095–1033 cm^{-1} . O pico em 473 cm^{-1} é atribuído ao modo de vibracional do grupo PO_4v_2 . Os picos em 563 cm^{-1} e 603 cm^{-1} pertencem ao modo vibracional PO_4v_4 . O pico em 960 cm^{-1} é atribuído ao modo vibracional PO_4v_1 e os picos entre 1095–1033 cm^{-1} , são atribuídos ao modo vibracional PO_4v_3 . Uma banda em 1452 e 1408 cm^{-1} , corresponde ao grupo carbonato (CO_2) que foi incorporado na estrutura da hidroxiapatita durante a síntese, o que é comum na síntese via precipitação úmida, pois ocorre a difusão do CO_2 da atmosfera para a hidroxiapatita, caracterizando a biocerâmica como carbonatada. Já a banda em 875 cm^{-1} corresponde aos íons do grupo HPO_4^{2-} . O método de precipitação em meio aquoso, quando realizado sem o controle da atmosfera da síntese, favorece a incorporação do CO_3^{2-} à estrutura da biocerâmica (BOANINI; GAZZANO; BIGI, 2010). Porém, essa incorporação não chega a ser indesejada, visto que a hidroxiapatita biológica contém o mesmo e não modifica a biocompatibilidade do material (ISHIDA, 2004). Contudo, a presença de grupos carbonato na estrutura da HA, pode aumentar a solubilidade da hidroxiapatita (PAN; DARVELL, 2007).

Figura 4 - FTIR das amostras calcinadas a 800°C.



Na tabela 2, referente ao Potencial Zeta, observa-se que houve mudança das cargas superficiais devido à adição dos íons na HA. A mudança das cargas superficiais da HA pode influenciar na aderência de bactérias na biocerâmica devido ao efeito eletroquímico entre a HA, o organismo e as bactérias (REYNOLDS; WRONG, 1982). Dessa forma, pode-se avaliar a capacidade de um material em impedir a formação de um biofilme e conseqüentemente a sua atividade bactericida.

Tabela 2 - Potencial Zeta das amostras calcinadas a 800°C.

Tratamento térmico	Amostra	Potencial Zeta (mV)	Desvio Padrão
Calcinação a 800°C	HA	-16,857	1,19
	HA-Ag	7,195	0,36

Na tabela 3 são apresentados os resultados dos ensaios de atividade bactericida, indicando que houve atividade bactericida em relação à bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, tanto na hidroxiapatita pura quanto na contendo prata quando calcinadas a 800°C.

Tabela 3 - Ensaios bactericidas da amostra de HA pura e HA-Ag calcinadas à 800°C.

Amostra	Bactéria	HALO (mm)	Concentração Inibitória Mínima (mg/ml)
HA	<i>Pseudomonas</i>	12 mm	0,125 mg/ml
HA-Ag	<i>aeruginosa</i>	9 mm	0,0625 mg/ml

A adição de prata na hidroxiapatita fez a concentração mínima necessária para inibição de bactérias diminuir pela metade, comprovando que a adição de prata na estrutura da HA causou um aumento na atividade bactericida.

CONCLUSÕES

O método de precipitação via úmida, quando feito à temperatura ambiente, permitiu a obtenção de hidroxiapatita carbonatada, que foi comprovada pelas análises de FTIR e DRX. O uso de um defloculante aniônico permitiu o aumento do rendimento da reação. As análises dos padrões de difração juntamente com os cálculos dos parâmetros de rede confirmaram a incorporação dos íons de prata na estrutura da hidroxiapatita. Análises por FTIR indicaram a presença de carbonato nos materiais sintetizados. Por fim, os ensaios bactericidas demonstraram que a incorporação dos íons de prata é eficaz no aumento da atividade bactericida o que é um indicio de que a hidroxiapatita com a incorporação de íons pode ser uma alternativa como recobrimento em próteses, visto que além de uma biocompatibilidade e osteointegração, a biocerâmica com íons de prata poderá impedir a formação de infecções por bactérias.

REFERÊNCIAS

- AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. 1. ed. Tokyo: JAAS, 1991.
- BADROUR, L. et al. Synthesis and physical and chemical characterization of $\text{Ca}_{10-x}\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}$ apatite. **Annals of Chemistry Science Material**, v. 23, p. 61-64, 1998.
- BOANINI, E.; GAZZANO, M.; BIGI, A. Ionic substitutions on calcium phosphates synthesized at low temperature. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 1882-1894, 2010.
- COX, S. et al. Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 35, p. 106–114, 2014.
- DIAZ, M. et al. Synthesis and Antimicrobial Activity of a Silver-Hydroxyapatite Nanocomposite. **Journal of Nanomaterials**, v. 2009, p. 1-6, 2009.
- ISHIDA, M. A. **Síntese de Biomaterial Hidroxiapatita**. 2004. 78 p. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Materiais - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2004.
- MANSUR, H. S. et al. Synthesis control and characterization of hydroxyapatite prepared by wet precipitation process. **Materials Research**, v. 7, p. 625-630, 2004.
- MOREIRA, M. P. **Hidroxiapatita enriquecida em metais biofuncionais para aplicação em engenharia tecidual**. 2010. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, 2010.

NATH, S.; KALMODIA, S.; BASU, B. Densification, phase stability and *in vitro* biocompatibility property of hydroxyapatite - 10 wt% silver composites. **Journal Materials Medical**, v. 21, p. 1273-1287, 2010.

OGATA, S. et al. Hybridization of silver nanoparticles on hydroxyapatite in an aqueous solution. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 117, p. 294-298, 2009.

PAN, H. B.; DARVELL, B. W. Solubility of hydroxyapatite by solid titration at pH 3-4. **Arch Oral Biology**, v. 52, p. 618-624, 2007.

REYNOLDS, E. C.; WRONG, A. Effect of adsorbed protein on hydroxyapatite Zeta Potential. **Infection and immunity**, p. 1285-1290, 1982.

STANIC, V. et al. Synthesis of antimicrobial monophasic silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 4510-4518, 2011.

WEBSTER, T. et al. **Osteoblastic response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations**. *Biomaterials*, v. 25, p. 2111-2121, 2004.

