

Universidade Federal de São Carlos- UFSCar
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia- CCET
Departamento de Química- DQ

COMPÓSITO A BASE DE HIDROXIAPATITA COM AÇÃO ANTIMICROBIANA

Gustavo Venancio Bellucci

São Carlos

2022

GUSTAVO VENANCIO BELLUCCI

COMPÓSITO A BASE DE HIDROXIAPATITA COM AÇÃO ANTIMICROBIANA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para
obtenção de título de Bacharel em
Química pela Universidade Federal
de São Carlos - UFSCar.
Orientadora: Prof^a. Dra. Ieda Lucia
Viana Rosa

São Carlos



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ/CCET

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905

Telefone: (16) 33518206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 23/2022/DQ/CCET

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)

FOLHA DE APROVAÇÃO

GUSTAVO VENANCIO BELLUCCI

COMPÓSITO A BASE DE HIDROXIAPATITA COM AÇÃO ANTIMICROBIANA

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos - Campus São Carlos

São Carlos, 19 de setembro de 2022

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientadora	Profa. Dra. Ieda Lucia Viana Rosa
Membro da Banca 1	Dr. Marcelo Assis
Membro da Banca 2	M.Sc. Roberta Yonara Nascimento Reis



Documento assinado eletronicamente por **Caio Marcio Paranhos da Silva, Professor(a)**, em 27/09/2022, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **0829136** e o código CRC **ED4C40BE**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.035469/2022-11

SEI nº 0829136

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais, Alexandre Barboza Bellucci e Luciana Aparecida Ferreira Barbosa Bellucci que possibilitaram a minha entrada na Universidade com muito apoio, compreensão e incentivo.

Agradeço aos amigos que fiz no meu período de graduação Elias André e Gabriel Uechi, pelos momentos vividos, cooperação e dificuldades superadas, sem vocês a graduação seria menos enriquecedora.

Agradeço a minha namorada, Sophia Helena Bonatti, pela compreensão nesta reta final de graduação, por me ouvir, amparar e viver este momento comigo.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Dr^a Ieda Lúcia Viana Rosa por me proporcionar uma grandes oportunidades e vivências na Universidade.

Agradeço a meus co-orientadores, Marcelo Assis e Lara Kelly Ribeiro, pelo conhecimento técnico transmitido e pela postura ética e colaborativa no mundo acadêmico.

Agradeço aos amigos que fiz no LIEC, Matheus Cipriano, Laura Líbero, Josiane Carneiro Souza, Ana Clara Nascimento e André Lopes, pelos momentos de constante aprendizado e colaboração, deixando a rotina no laboratório mais divertida e enriquecedora.

Agradeço ao Prof Dr Elson Longo, por lutar e valorizar a ciência brasileira, fornecendo estrutura e oportunidade para os alunos da UFSCar.

Resumo

Com cada vez mais destaque no meio acadêmico. Nesta via a utilização de hidroxiapatita particulada (HAp) como um suporte para semicondutores e compostos naturais para a aplicação em sistemas biológico tornam-se de extremo interesse pela sua ação antimicrobiana conhecida. Para obter tal material e avaliar suas propriedades estruturais e químicas, foram sintetizadas 8 amostras as quais foram variadas a proporção de α -Ag₂WO₄ e a presença de curcumina, esperando que os materiais obtidos tenham atividade antimicrobiana. Para viabilizar tal composto, a hidroxiapatita foi sintetizada por meio de uma coprecipitação em refluxo com rígidos controles de temperatura e pH, em seguida por uma síntese in situ, tivemos a obtenção da prata suportada em hidroxiapatita por meio do método sonoquímico e por último foi realizada a ancoragem da curcumina, obtendo, portanto, o material final e realizando a caracterização das amostras em DRX, FT-IR e MEV. Os resultados obtidos foram promissores, visto que pelo difratograma foi observado a obtenção de uma fase relacionada ao α -Ag₂WO₄, bem como na espectroscopia de infravermelho foram observadas bandas relacionadas a curcumina, além do mais, o material se mostrou eficiente contra o fungo *C. Albicans*, especialmente as amostras HAp-AWO-30%-Cur que em pequenas concentrações teve 99,0% de eficiência contra espécies fúngicas sendo potencialmente aplicado contra demais patógenos para a utilização em implantes ósseos e odontológicos.

Palavras-chave: material; hidroxiapatita; curcumina; compósito

ABSTRACT

The development of materials that have antimicrobial properties are increasingly highlighted in the academic environment. In this way, the use of hydroxyapatite (HAp) as a support for semiconductors and natural compounds for application in biological systems becomes of extreme interest due to its known antimicrobial action. The proportion of α -Ag₂WO₄ and the presence of curcumin were varied, hoping that the materials obtained would have antimicrobial activity. To make this compound viable, the hydroxyapatite was synthesized by means of a co-precipitation in reflux with strict temperature and pH controls, then by an in situ synthesis, we had to obtain the silver supported on hydroxyapatite by means of the sonochemical method and finally it was performed the anchoring of curcumin, obtaining, therefore, the final material and carrying out the characterization of the samples in XRD, FT-IR and SEM. The results obtained were promising, since by the diffractogram it was observed that a phase related to α -Ag₂WO₄ was obtained, as well as in the infrared spectroscopy bands related to curcumin were observed, in addition, the material proved to be efficient against the fungus *C. albicans*, especially the HAp-AWO-30%-Cur samples, which in small concentrations had 99.0% efficiency against fungal species. Against another types of viruses and bacteria, this material can be effective and usable in bone and odontological implants

Keywords: materials; hydroxyapatite; curcumin; composite

SUMÁRIO

1	Introdução.....	10
1.1	Biomateriais: Importância Histórica, Científica e Econômica	10
1.2	Fosfato de Cálcio-Hidroxiapatita	15
1.3	Tungstato de Prata.....	19
1.4	Atividade Antimicrobiana.....	21
1.5	Curcumina.....	24
1.6	Compósitos de HA com atividade Antimicrobiana.....	25
2	Objetivo.....	27
2.1	Objetivo Geral	27
2.2	Objetivo Específico.....	27
3	Metodologia	28
3.1	Reagentes utilizados	28
3.2	Síntese da Hidroxiapatita	30
3.3	Síntese <i>in situ</i> do α -Ag ₂ WO ₄	29
3.4	Ancoragem da Curcumina.....	30
3.5	Caracterizações	31
3.5.1	Difratometria de Raio-X (DRX).....	31
3.5.2	Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier (FTIR)	32
3.5.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	32
4	Desenvolvimento	Error! Bookmark not defined.
4.1	Difração de Raios X (XRD)	33
4.2	Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier.....	34
4.3	Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
4.4	Atividade Antimicrobiana.....	35
5	Considerações Finais	40
	Referências	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prótese dentária utilizada pelo povo Maia.....	10
Figura 2: Relação entre potencial regenerativo e evolução do tempo dos materiais aplicados em sistemas biológicos.	11
Figura 3: Pirâmide Etária Brasileira	13
Figura 4: Relação do mercado global de biomateriais	14
Figura 5: Perspectiva do Mercado de Biomateriais no Brasil no período 2020-2028	14
Figura 6: Parcela de mercado de cada tipo de biomaterial	Error! Bookmark not defined.
Figura 7: Investimos por país na área de biomateriais.....	14
Figura 8: Estrutura tridimensional dos Cluster que formar Hidroxiapatita Hexagonal	18
Figura 9: Açafrão da terra.....	25
Figura 10: Esquema de montagem da síntese de HAp por coprecipitação em refluxo.	30
Figura 11: Representação de um Ultrassom de Ponta.....	31
Figura 12: Difractogramas das amostras de HAp, HAp-AWO e HAp-AWO-C (A). Ampliação do difratogramas na região de 25 ° a 31 ° (B).....	34
Figura 13: Espectro de Infravermelho das amostras de HAp, HAp-AWO e HAp-AWO-C (A). Imagem aproximada da região de interesse do espectro de infravermelho (B).	36
Figura 14: Imagens de microscópio eletrônico de varredura das amostras de A-HAp	34
Figura 15: Atividade antimicrobiana das amostras contra <i>C. albicans</i> sem luz (A), e com luz (B).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos biomateriais e as reações ocasionadas por eles no Organismo.....	12
Tabela 2: Reagentes utilizados na realização do trabalho	29
Tabela 3: Proporção dos sais precursores	31
Tabela 4: Nomenclatura e siglas das amostras estudadas.	32
Tabela 5: Estiramentos modos de clusters [PO ₄] na HAp.....	35

1 Introdução

1.1 Biomateriais: Importância Histórica, Científica e Econômica

Na sociedade moderna os chamados biomateriais têm grande destaque para a evolução técnico-científica da humanidade para a aplicação em nanotecnologia. A área da saúde é o setor com a maior parcela de utilização destes materiais, dentre elas temos a área de biossensores, dispositivos para a liberação de medicamentos, curativos e em materiais implantáveis. Uma das definições para um biomaterial é este ser um conjunto de materiais que irão entrar contato com sistemas biológicos, independente da sua origem ser natural ou sintética, podendo estar nos mais variados modelos (sólidos, líquidos, pastas, géis, etc.). Sua aplicação pode ser realizada pela composição de um sistema, como a adição em um pino de titânio visando a melhor aceitação do implante pelo organismo (Ratner et al., 2004).

A utilização de biomateriais é datada desde os primórdios da humanidade, como exemplos, temos o uso de implantes dentários compostos a partir de metais França em 200, bem como na América em 600 A.C foram encontrados implantes dentários de calcário provenientes de conchas, que posteriormente foram desenvolvidos na forma das popularmente denominadas dentaduras como explicitado na Figura 1 (Pires et al., 2015). Estes casos evidenciam como a humanidade se reinventa no setor de materiais para solucionar alguns problemas e melhorar a qualidade de vida.

Figura 1: Prótese dentária utilizada pelo povo Maia.

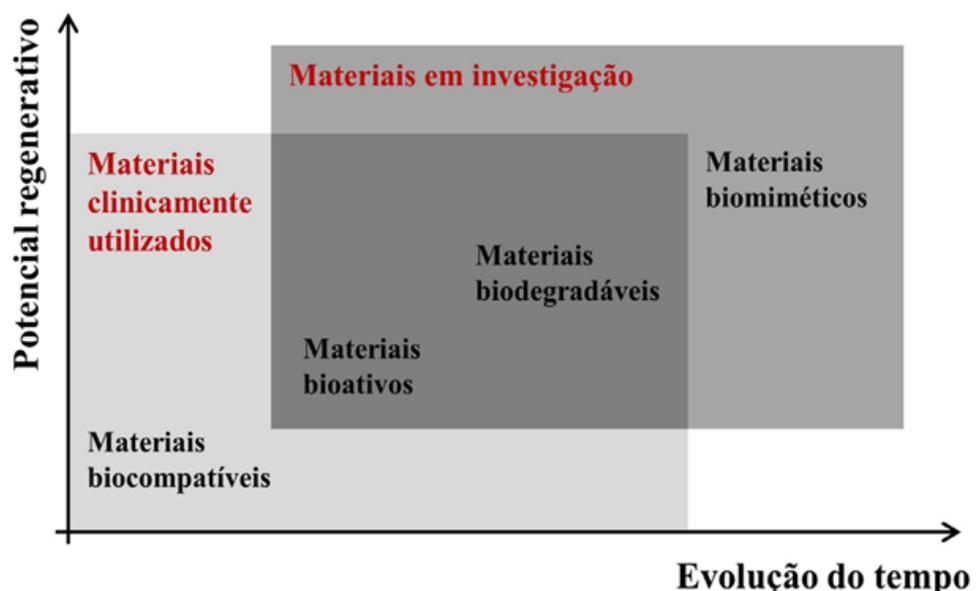


Fonte: megacurioso.com.br

Na metade do século XX, a procura por materiais para aplicações tiveram um novo enfoque, a busca por materiais inertes, esta característica exige que o material não intervenha (ou atrapalhe) a atividade biológica. Todavia a evolução na aplicação destes materiais acabou deixando os materiais inertes em segundo plano, a nova tendência consistia na aplicação de materiais bioativos para otimizar a recuperação de tecidos, com um certo enfoque em tecidos ósseos (Ratner et al., 2004). Como próxima etapa destes desenvolvimentos ocorreu a elaboração de materiais biodegradáveis os quais são implantados, incorporados e bioabsorvíveis. A última etapa do processo de desenvolvimento foi a elaboração de materiais biomiméticos estes atuam de modo distinto a ação destes consiste em uma recuperação ativa do tecido, como por exemplo estimular a produção celular (Holzapfel et al., 2013).

A **Figura 2**, mostra as etapas de desenvolvimento de um biomaterial (Pires et al., 2015b).

Figura 2: Relação entre potencial regenerativo e evolução do tempo dos materiais aplicados em sistemas biológicos.



Fonte: Pires et al., 2015b.

Para a elaboração de um biomaterial é inicialmente necessário identificar um potencial de aplicação visando solucionar algum problema recorrente. Em seguida ao definir o material, ele será analisado para que sua aplicação em sistemas biológicos

seja possível, dentre esses testes temos a biocompatibilidade, a toxicidade a biodegradabilidade e a bioabsorção(ou biodegradação).

A biocompatibilidade consiste na aceitação do organismo em relação ao material ,outro fator impactante para a aplicação do material é sua toxicidade em sistemas biológicos. Após estes ensaios também se faz necessária a aplicação de testes regulatórios, estudos, triagem clínica e acompanhamento a longo prazo. Entre os testes mais importantes são os de toxicologia e os de biointeração que são realizados *in vitro* e *in vivo*, para confirmar as características desejadas do material (Pires et al., 2015b).

Porém, diversos fatores influenciam a aplicação do material no organismo, alguns deles são: a proliferação celular, citotoxicidade, hemocompatibilidade, estimulação de adesão e alergenicidade. Estes fatores são relevantes para avaliar a capacidade do material e conseqüentemente para sua classificação e possibilidades de aplicação no organismo para os testes *in vitro* e *in vivo*, bem como para a elaboração de um produto final; Além destes fatores, as características físicas dos materiais também podem afetar a biocompatibilidade (Hubbell et al., 1995). Na Tabela 1, está explicitado a classificação dos biomateriais de acordo com a reação com as células no sistema biológico o qual o material será inserido.

Estes fatores são relevantes para avaliar a capacidade do material e conseqüentemente para sua classificação e possibilidades de aplicação no organismo para os testes *in vitro* e *in vivo*, bem como para a elaboração de um produto final; Além destes fatores, as características físicas dos materiais também podem afetar a biocompatibilidade (Hubbell et al., 1995)

Na Tabela 1, está explicitado a classificação dos biomateriais de acordo com a reação com as células no sistema biológico o qual o material será inserido.

Tabela 1: Classificação dos biomateriais e as reações ocasionadas por eles no organismo.

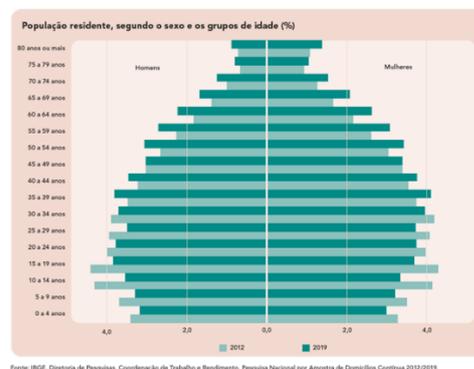
Classificação	Reação no Organismo
Tóxicos	São tóxicos os materiais que ocasionam morte celular ao redor do material implantado

Não Tóxicos/Inertes	São inertes os materiais que ocasionam a formação de um tecido fibroso no entorno do implante.
Não Tóxicos/Bioativos	São bioativos os materiais que são biologicamente reconhecidos e geram o aparecimento de fatores de adesão.
Não Tóxicos/biodegradáveis	São os materiais que ocasionam o crescimento celular de maneira saudável e substituindo a matriz que constitui o material, o qual será absorvido pelo organismo.

Fonte: Própria adaptado de Pires et al., 2015

O interesse crescente na área de biomateriais tem reflexos diretos na economia brasileira, no ano de 2020 a parcela de impacto na economia representada foi de US\$ 3,78 bilhões e o valor previsto no período até 2028 é de US\$ 8,66 bilhões, isto em relação a CAGR (Taxa de crescimento anual composta), a qual gira em torno de 10,7%. Um fator que auxiliou um crescimento na área da saúde deve-se a ocorrência de diversas doenças e a mudança na configuração da pirâmide etária do Brasil devido a melhora na qualidade de vida nos últimos anos, hoje temos o cenário com um envelhecimento da população e um aumento na longevidade sendo visível na pirâmide etária brasileira presente na Figura 3.

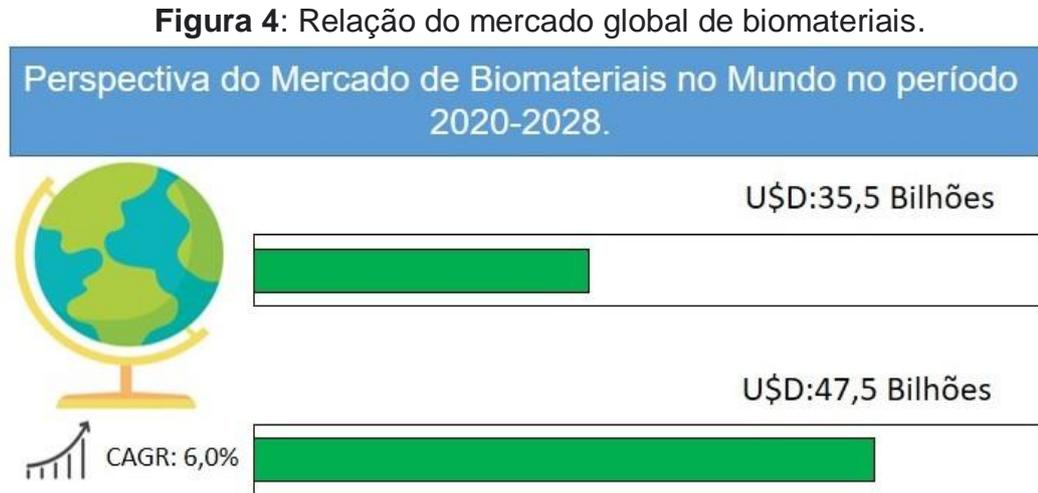
Figura 3: Pirâmide etária brasileira.



Fonte: IBGE-2020

Em relação ao mercado global, o cenário é bem semelhante ao que foi relatado no mercado nacional, o aumento de doenças crônicas e cardiovasculares geram uma

demanda por novas tecnologias para o tratamento dessas doenças, influenciando no aumento de pesquisas na área da medicina regenerativa, consequentemente a procura por locais que valorizem pesquisas neste setor tornam-se atrativos para investimentos, como pode ser visualizado na **Figura 4**.



Fonte: zionmarketresearch.com

Porém, com a reabertura do mercado nacional e Internacional somado ao destaque que os materiais nanométricos tiveram no controle da pandemia geram um otimismo no setor pela demanda crescente e o potencial notável do setor. Na **Figura 55** é dada a tendência do setor no período atual até 2028. Bem como é msotrada a parcela de mercado referente a cada biomaterial.

Figura 5: Perspectiva do Mercado de Biomateriais no Brasil no período 2020-2028



Fonte: marketsandmarkets.com

Vale ressaltar que as relações de investimentos por país na área de biomateriais, desta maneira, biomateriais a base de hidroxiapatita podem auxiliar no desenvolvimento científico do país por intermédio da inovação, portanto as propriedades já conhecidas do material, sendo a mais característica o aumento na propriedade de crescimento ósseo por intermédio da hidroxiapatita, aliando este biomaterial a outros materiais e compostos com propriedades que colaborem e otimizem a osteoindução (Ripamonti et al., 2012), bem como a união da hidroxiapatita com um semicondutor sejam capazes de eliminar patógenos e evitar inflamações, será obtido um material com uma excelente capacidade de regeneração óssea e com propriedades antimicrobianas

1.2 Fosfato de Cálcio-Hidroxiapatita

Os animais vertebrados tem sua matriz óssea constituída por fosfato de cálcio e colágeno, sendo estes dois um de origem orgânica e o outro de origem inorgânica. O fosfato de cálcio é a forma química de uma família de minerais compostos pelo cátion (Ca^{2+}) e o ânion ortofosfato (PO_4^{3-}), ânion metafosfato (PO_3^-) e o ânion pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_4^{7-}$) (Elliott et al., 2002) os compostos constituídos pelos íons anteriormente citados correspondem a praticamente 60% em massa dos ossos. Os minerais com os íons em proporção de 1,5 de Ca:1,67 de P foram denominados como apatitas, com o significado de “enganar”, nomenclatura criada por Abraham Gottlob Werner (Eliaz & Metoki, 2017). As primeiras pesquisas em relação a composição óssea surgiram no século XVII, no ano de 1769 Johan Gottlieb Gahn pela primeira vez descobriu a presença dos elementos CaP nos ossos (Hench & Thompson, 2010) e no ano de 1777 o Carl Wilhelm Scheele foi capaz de produzir fósforo a partir de cinzas de ossos (Dorozhkin, 2013). Neste mesmo século os franceses Antoine François Comte de Fourcroy e Nicolas Louis Vauquelin encontraram a forma ácida CaP a chamada (MCPM)-fosfato monocálcico monohidratado, (MCPA)-fosfato monocálcico anidro, (DCPA, monetita) - fosfato de cálcio anidro e (DCPD, brushite) - dicálcio fosfato dihidratado (Dorozhkin, 2013). No período de 1805-1814, foram desenvolvidos métodos para identificar como ocorre a composição óssea (Dorozhkin, 2013) e 1827 o químico alemão Gustav Rose definiu a composição das apatitas com o termo fosfato tribásico de cálcio, sendo este grupo de compostos dados por: α -fosfato tricálcico (TCP) e β -TCP (Dorozhkin, 2013).

A aplicação destes compostos em sistemas biológicos iniciou-se no final do século XVII, mais especificamente no ano de 1797, com o objetivo de tratar a doença do raquitismo, esta condição consiste em um enfraquecimento dos ossos os deixando propensos a envergar (Dorozhkin, 2010). No Século XIX, os estudos para aplicação destes fosfatos são registrados para aplicação em enxertos ósseos; o médico alemão Philip Franz von Walther iniciou o processo de aplicação de enxertos ósseos substituindo pedaços de crânio (Eliaz & Metoki, 2017). Neste mesmo século, 60 anos mais tarde, foi relatada a reconstrução de um úmero com a utilização de uma tíbia de uma criança com raquitismo com resultados promissores (Dorozhkin, 2010). A partir desses resultados tivemos a elaboração do que seria o primeiro compósito artificial denominado de lacto fosfato de cal, sendo basicamente constituído por pó de CaP com ácido láctico (Eliaz & Metoki, 2017).

Em 1920, o cirurgião Fred Houdlette Albee realizou a primeira tentativa de implantar um CaP artificial para recuperar fraturas em ossos de coelho, utilizando o TCP, uma das formas do CaP, os quais foram capazes de otimizar o crescimento e regeneração do tecido, bem como, deixando-os mais unidos (Dorozhkin, 2013), após a vasta compreensão das propriedades deste material, tivemos um avanço nas áreas de ciência e tecnologia que no início do século XX permitiram estudar a forma estrutural das apatitas (Eliaz & Metoki, 2017). Na década de 30, acontecem as primeiras descrições das estruturas cristalinas das CaP (Eliaz & Metoki, 2017), diferenciando as formas naturais α -TCP e β -TCP (Eliaz & Metoki, 2017). Na década seguinte, o equilíbrio entre sistemas de cálcio e fosfato, como por exemplo o $\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{H}_2\text{O}$, foram estudados.

Nos anos 50, as denominadas apatitas foram distinguidas dos demais fosfatos de cálcio, pela sua capacidade osteoindutiva (Eliaz & Metoki, 2017; Dorozhkin, 2012). Nesta mesma década tivemos o termo osteoindução definido, sendo determinado como a capacidade de um material induzir o processo de gênese deste material, sendo reportado por processos de cicatrização óssea., o material é inserido no tecido ósseo e estimula o crescimento de osteoblastos. A hidroxiapatita fornece os principais minerais constituintes da matriz óssea pela troca de carbonatos presentes no organismo pelos fosfatos presentes na estrutura, tornando o compostos mais solúvel e facilitando a reconstrução óssea. O outro fenômeno definido neste período foi o de osteointegração, que é uma pequena película formada pela construção ou reconstrução do tecido ósseo. O outro fenômeno definido neste período foi o de

osteointegração (Brinemark, 1983). que consiste na criação de uma interface entre o material implantado e o tecido danificado, criando uma região na qual a atividade de cicatrização ocorre junto de uma região ativa do material.

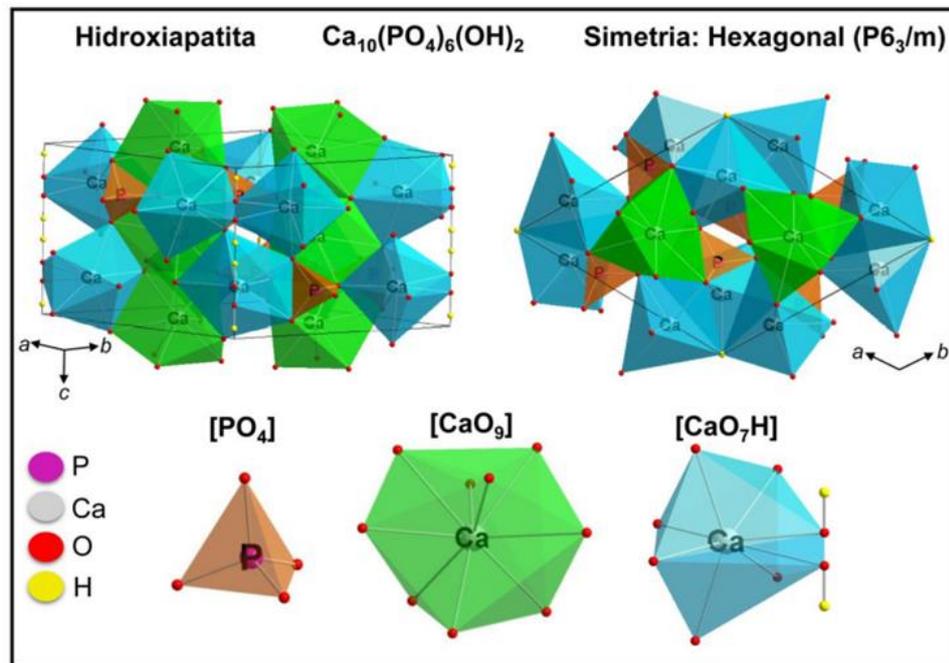
Na década seguinte foi descrita a forma amorfa do fosfato de cálcio, sendo a parte minoritária das estruturas denominadas como “apatitas”, a descrição desta estrutura, permitiu que modelos fossem desenvolvidos para implantes ósseos bem definidos, seguindo o processo de desenvolvimento de biomateriais anteriormente citados (Eliaz & Metoki, 2017). A estrutura com maior nível de utilização foi o β -TCP, como por exemplo no estudo de defeitos periodontais (Eliaz & Metoki, 2017), nas demais aplicações o HAp (Hidroxiapatita nanoparticulada) foi utilizado em uma forma cilíndrica em raízes dentárias para favorecer a osteoindução em situações de rápida reposição (Denissen & de Croot, 1979).

Nos anos 80, com a utilização em implantes dentários sendo difundida, a forma HAp tornou-se fundamental nos estudos e aplicações saindo do nicho ortodôntico e atingindo a área ortopédica pela sua ótima capacidade osteogênica (Eliaz & Metoki, 2017). Até a década de 90, a forma HAp dominou o setor de biomateriais, todavia a descoberta das possíveis aplicações da forma nanométrica desta estrutura no ano de 1994 alteraram a tendência vista até então. Seguindo a linha cronológica, nos dias atuais a HAp-nano tem destaque na área de biomateriais com uma gama de aplicação desde a área de implantes, drug-delivery e bioimageamento, etc (León & Jansen, 2009; Machado et al., 2018).

A forma selecionada para a elaboração do compósito deste estudo é a HAp-nano, a nomenclatura deste material determinada pela IUPAC é Hidróxido de Penta Cálcio Trifosfato, a forma mais estável dos CaP. Pode ser obtido por vias sintéticas ou naturais por alguns métodos de síntese, a forma desta estrutura nanométrica é bem próxima do mineral que compõe a matriz óssea dos seres humanos, o que lhe confere uma capacidade bioativa e osteocondutora (Dorozhkin, 2010).

A estrutura cristalina deste material está em uma estrutura monoclinica com a presença de um grupo espacial P21/b. Ao elevar a temperatura, temos uma mudança da estrutura monoclinica para a hexagonal na faixa de 250 °C, o grupo espacial desta fase é definido como P63/m, a estrutura se ordena quando a faixa de temperatura retorna a 25 °C. Com esta estrutura hexagonal estabilizada é obtida a forma mais amplamente utilizada na área de biomateriais (Machado et al., 2016). Para uma melhor representação, a **Figura 8** ilustra a estrutura cristalina da HAp Hexagonal.

Figura 8: Estrutura tridimensional dos cluster que formar hidroxiapatita hexagonal



Fonte: Machado et al., 2016

Na estrutura estão representadas as menores partes constituintes da HAp, dois íons cálcio ocupando dois sítios em um eixo trigonal, nas posições: $1/4, 3/4, 1/2$ e $3/4, 1/4, 1/2$. Os demais íons cálcio posicionam-se em formato de triângulos no eixo 63 da estrutura nas posições: $z = 1/4$ e $z = 3/4$, sendo estas formas monovalentes da estrutura, os quais são meios mais estreitos enquanto na posição $z=1/2$, temos uma região mais espaçada, as quais os íons PO_3^- são localizados formando uma estrutura na forma de um hexágono distorcido (Gomes et al., 2019).

Para justificar a característica osteocondutora e as demais propriedades, o HAp-nano é capaz de trocar os ânions PO_4^{3-} por CO_3^{2-} , esta alteração de fosfato por carbonatos alteram a solubilidade do material influenciando diretamente na capacidade bioativa no material, sendo mais solúvel e mais propenso a reagir (Gomes et al., 2019; Machado et al., 2016). A estequiometria dos elementos é ponto chave para a estabilidade e atividade do material, dado anteriormente a proporção entre Ca e P deve ser de ($\sim 1,67$), caso seja diferente desta proporção, os parâmetros de rede podem variar e outra estrutura ser obtida (Dorozhkin, 2012; Eliaz & Metoki, 2017; J.C Elliot, 1994).

A forma natural da HAp está num estado nano cristalino enquanto as HAp nanopartículas, são a forma nanométrica das HAp, as quais têm ao menos uma das dimensões menores que 100nm. Este nanomaterial foi estudado e demonstrou ser excelente em aplicações de integração óssea, indicando que a formação de um coating ou um compósito pode de extremo interesse para essa área (Akindoyo et al., 2018; Haider et al., 2014).

A atividade biológica deste nanomaterial é superior se comparada às demais formas, podendo ser justificada pela relação entre o volume da partícula e área superficial, bem como, a uniformidade das nanopartículas também podem ser um fator diferencial que confere uma atividade mecânica otimizada (Machado et al., 2016). Outro fator determinante para a utilização é a reatividade otimizada que auxilia a proliferação de osteoblastos e facilita a deposição dos minerais necessários. (Ferraz & Monteiro., 2004).

Vale ressaltar que as propriedades anteriormente citadas também são observadas para a forma micro-HAp, todavia ocorrem em escala menor e de modo mais lento (Ferraz & Monteiro., 2004). Uma propriedade que vem sendo explorada recentemente são as propriedades fluorescentes da forma nanoparticulada de HAp, as quais podem ser amplificadas com a dopagem por lantanídeos, essa possibilidade permite aplicações que não se restringem a regeneração óssea, mas também a obtenção de bioimagens celulares (Machado et al., 2018). A versatilidade deste material é enorme, podendo atuar em sistemas de entrega de medicamentos por sua não toxicidade (Lara-Ochoa et al., 2021).

Diante do descrito anteriormente, a hidroxiapatita em sua forma nanoparticulada se mostra como um material extremamente versátil para a aplicação em sistemas biológicos, podendo atuar como *coating* em implantes, ser injetado favorecendo a osteogênese e até na obtenção de bioimagens tornam este um material de interesse para a pesquisa e elaboração de um compósito inovador e eficiente com outros materiais cerâmicos que possam otimizar tais propriedades.

1.3 Tungstato de Prata

O Tungstato de prata Ag_2WO_4 tem recebido atenção considerável nos últimos anos devido às suas características atrativas, aplicáveis em uma ampla gama desde a área de sensores, fotocatalisadores e com uma efetiva atividade antimicrobiana de cenários práticos. O Ag_2WO_4 é um material semicondutor multifuncional de banda larga que apresenta polimorfismo estrutural e pode cristalizar em três estruturas diferentes. Dentre elas, a fase α é, termodinamicamente, a mais estável (Lin et al., 2015; van der Berg et al., 1979). Além do α , com estrutura ortorrômbica e grupo espacial ($\text{Pn}2_1$), existem as fases β - e γ - metaestáveis, com estrutura hexagonal e grupo espacial ($\text{P}6_3/\text{m}$) e estrutura cúbica e grupo espacial ($\text{Fd}\bar{3}\text{m}$), respectivamente. O α - Ag_2WO_4 apresenta propriedades estruturais únicas com uma ampla gama de propriedades elétricas e ópticas que podem oferecer amplas aplicações, incluindo fotocatalise, sensores de gás, agentes antibacterianos e antifúngicos e emissão de fotoluminescência, entre outros. (Cavalcante et al., 2012; Silva et al., 2014; Dai et al., 2010a; Chávez et al., 2018; Lin et al., 2015; Roca et al., 2015; Suthanthirara & S.; Tang & Ye, 2005).

Os polimorfos de Ag_2WO_4 foram sintetizados por coprecipitação (Gupta et al., 2016; Ng & Fan., 2016) método hidrotermal convencional (Liu et al., 2015) ,método sonoquímico (Nobre et al., 2019; Zinatloo-Ajabshir et al., 2020), e troca iônica simples (Wang et al., 2019). Recentemente, a coprecipitação controlada foi relatada na preparação de β - Ag_2WO_4 metaestável, onde a adição de íons Eu^{3+} foi utilizada como agente estabilizador da fase β metaestável. (Gupta et al., 2016)

Da mesma forma, por meio de um processo de coprecipitação simples na presença de tensoativos atuando como estabilizador de fase, outros autores também relataram a obtenção desse polimorfo (Dai et al., 2010b; X. Y. Zhang et al., 2015). A preparação de β - Ag_2WO_4 por via convencional de precipitação, sem qualquer procedimento, também foi relatado (Roca et al., 2016; Gupta et al., 2016b; Lemos et al., 2016). No entanto, até o momento, a preparação de γ - Ag_2WO_4 metaestável foi pouco relatada. Por exemplo, este polimorfo foi obtido através de um método simples de precipitação controlada à temperatura ambiente e com auxílio de surfactante (Andrade Neto et al., 2020; Roca et al., 2017). No entanto, esses processos de síntese são frequentemente não seletivos porque envolvem a produção de uma mistura dos diferentes polimorfos e também afetam suas dimensões, morfologia, microestrutura e funcionalidade subsequente significativamente. Diferentes condições de síntese

produzem diferentes polimorfos e destacam a complexidade da paisagem de energia durante o processo de formação do cristal.

Do ponto de vista científico, o interesse é fornecer rotas novas e seletivas para sintetizar polimorfos α -, β - e γ - Ag_2WO_4 separadamente. Assim, alguns estudos apresentam uma investigação experimental e teórica dos polimorfos Ag_2WO_4 , que foram sintetizados seletivamente a partir de dois precursores comuns graças ao controle cuidadoso das condições de síntese, o que revelou uma forma alternativa de controlar o polimorfismo do Ag_2WO_4 (Roca et al., 2021).

Estabelecer a estrutura em escala atômica das superfícies é um passo fundamental para a modelagem desse tipo de material. Guiados pelos achados da teoria funcional da densidade (DFT), a morfologia, o controle de defeitos de seus mecanismos antibacterianos e fotocatalíticos para compreender, podem prever e explicar como eles surgem (Álvarez-Roca, 2016). O papel da coordenação local dos cátions Ag e W nos três polimorfos, juntamente com o processo de cristalização em função da química da solução, foram definidos, permitindo se propor um mecanismo para a nucleação e processos de crescimento usando o conceito de clusters, $[\text{AgO}_x]$ e $[\text{WO}_y]$, como blocos de construção das diferentes fases α -, β - e γ . É válido lembrar, que por ser um semicondutor, o Ag_2WO_4 pode amplificar suas propriedades antimicrobianas, catalíticas e sensoras com a iluminação, visto que a limitação da ação deste semicondutor é a recombinação e^-/h^+ , que apesar de ocorrer em menor intensidade no escuro, é extremamente amplificada sob radiação.

1.4 Atividade Antimicrobiana

Os estudos sobre materiais nanoestruturados estão cada vez com um destaque maior, pois as propriedades destes são diferentes e, frequentemente, melhores do que àquelas referentes aos materiais convencionais, que apresentam estruturas em uma escala micrométrica (Baruah & Dutta, 2009). Estas propriedades incluem confinamento quântico em semicondutores, ressonância de plasmons de superfície em metais, e superparamagnetismo em materiais magnéticos, devido a um aumento substancial da fração de átomos ativados na superfície e a otimização dos efeitos superficiais. Nanopartículas podem servir de alicerce para construir materiais sólidos estruturados, desde que haja controle da forma, tamanho e aglomeração das nanopartículas (Subedi, 2014) Desta forma, sólidos nanoestruturados podem ser

sintetizados com um alto controle de morfologia, partindo-se de nanopartículas individuais em dispersão e coloides estabilizados em líquidos (Ichikawa et al., 2003). Dispersões de nanopartículas de óxidos, em particular, podem ser utilizadas para a obtenção sensores (Koh & Josephson, 2009), membranas inorgânicas (Shchukin & Caruso, 2003), eletrólitos para células combustíveis (Vidal-Iglesias et al., 2012), conversão de energia solar (Chen et al., 2018), water splitting (Fominykh et al., 2014), catalisadores (Prieto et al., 2013) e materiais antimicrobianos.

Por se tratar de uma aplicação nova, estudos dos métodos de síntese e aplicações dos materiais nanométricos são necessários, visto que as propriedades destes materiais são diferentes. A região de contorno entre as nanopartículas desempenha papel tão importante quanto à estrutura, tamanho e natureza química. Tal efeito é ocasionado, pois se acumula energia em excesso nas interfaces, que são regiões com alta densidade de defeitos. Isto permite a preparação de uma grande variedade de materiais com diferentes propriedades (Cilek & Karaca, 2015). No entanto, se estes fatores não forem bem controlados, nenhuma aplicação tecnológica é possível, pois a sua reprodutibilidade fica totalmente comprometida. Para o desenvolvimento da nanociência e nanotecnologia, os estudos sobre crescimento de cristal, evolução do processo da morfologia e os correspondentes mecanismos são de extrema importância. Assim, novas estratégias de controle morfológico e tamanho de partícula tem se tornado alvo de grande interesse de pesquisas (Assis et al., 2021).

Dentre suas aplicações, materiais nanoestruturados surgem como potenciais agentes antimicrobianos devido às suas propriedades químicas e físicas únicas (Ghaffari et al., 2021). Por meio destes, torna-se possível a modificação e a maximização das suas propriedades, controlando seu tamanho, área de superfície e forma (Xu et al., 2006).

Diariamente, a nanotecnologia se solidifica em muitos domínios distintos da sociedade e setores industriais, tais como: saúde, alimentos, tecnologias da informação, eletrônica, energia e meio ambiente. Novos produtos derivados dos avanços da nanotecnologia exigem novos materiais, especificamente nanopartículas funcionais. Nanomateriais baseados em metais e óxidos semicondutores são de particular interesse industrial devido às suas propriedades e aplicações exclusivas, tanto em tecnologia quanto em biomedicina.

Uma vez definida a melhor morfologia e método de síntese, é necessária a formação da interface metal/semicondutor, para potencializar a atividade biocida do

material. O desenvolvimento e o uso de heterojunções, compostos por um metal e semicondutor, neste caso, NPs (Nanopartículas) metálicas depositadas na superfície de um semicondutor, levam a características vantajosas relacionadas aos efeitos de ressonância plasmônica superficial e ao contato Schottky que cria sítios ativos locais adicionais juntamente com a presença de armadilhas eletrônicas, (Zhang et al., 2018) que são usadas para aprimorar a geração dos pares elétron/buraco (e^-/h^+) no semicondutor. Este efeito resulta no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio através da interface metal/semicondutor, que são as responsáveis pelo stress oxidativo dos microrganismos.

Recentemente foi observado que o α - Ag_2WO_4 modificado com laser em femtossegundo e feixe de elétrons, aumenta em 32 vezes da sua atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), que é uma das bactérias responsáveis pelas infecções hospitalares mais comuns (Assis et al., 2018) Além disso, em outro trabalho do grupo de pesquisa, foi constatado que estas modificações maximizam a atividade fungicida contra *Candida albicans* e aumentam a seletividade deste material contra carcinomas de bexiga, utilizando células de camundongos (Assis et al., 2019). Estes estudos iniciais provam que compósitos que utilizam este material podem ser exploradas em diversos campos biotecnológicos distintos, devido a suas propriedades físico-químicas únicas.

Devido a pandemia do vírus COVID-19, nosso grupo de pesquisa estabeleceu uma linha de trabalho utilizando nossas tecnologias antimicrobianas incorporadas em diversas matrizes poliméricas para a eliminação deste vírus. Primeiramente, incorporamos, de forma eficaz, Ag NPs em polycotton (Tremiliosi, 2020). Observamos que em apenas 2 minutos, foi possível reduzir 99.60% das cópias virais, quando em contato com este tecido. Além disso, foi observado que ele é eficaz contra outras bactérias e fungos, e não causa nenhum tipo de dermatite ao seu usuário. Em outro trabalho, fomos capazes de imobilizar partículas de SiO_2 -Ag em EVA (Assis, et al., 2021) Com isto, conseguimos projetar uma máscara deformável e reutilizável

No caso deste trabalho a hidroxiapatita atua como um suporte com alta biocompatibilidade, visando a obtenção de um outro nanomaterial em sua superfície com elevada atividade antimicrobiana.

1.5 Curcumina

A curcumina é um composto natural proveniente da cúrcuma longa (**Figura 9**), a estrutura deste tem como nomenclatura (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona), também chamado de diferuloilmetano, é o principal polifenol natural e já se demonstrou eficaz em condições inflamatórias, síndrome metabólica, dores e no controle de doenças degenerativas (Hewlings & Kalman, 2017; Noorafshan & Ashkani-Esfahani, 2013)

Figura 9: Açafão da terra.



Fonte:medium.com.

As ações antioxidantes estão relatadas em alguns artigos (Menon & Sudheer, 2007), dentre elas temos a ação na superóxido dismutase (SOD), além de descrições sobre curcuminóides purificados utilizados em suplementação em situações de estresse oxidativo o, incluindo atividades plasmáticas de SOD (Li et al., 2018), atuando também em concentrações séricas de glutathiona peroxidase (GSH) e peróxidos lipídicos (Ghasemi et al., 2021) distintos de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (Hewling&Kalman, 2017). Os curcuminóides inibem enzimas geradoras de ROS como lipoxigenase/ciclooxigenase e xantina hydrogenase/oxidase e atuando como compostos com caráter lipofílico, ou seja, um sequestrador de peroxilas, tornando os curcuminóides um antioxidante que quebra a cadeia (Ghasemi et al., 2021).

As propriedades anti-inflamatórias da curcumina estão relacionadas com a capacidade de inibir a produção de proteínas que ocasionam o processo inflamatório no organismo (Akram et al.,2010). A propriedade anti-inflamatória atua no organismo

por intermédio da sua intervenção na via do ácido araquidônico e interrupção da atividade do fator nuclear κ B (NF)- κ B a qual está intimamente envolvida na regulação das enzimas pró-inflamatórias, sendo elas as: COX-2, mieloperoxidase (MPO), isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto (iNOS) e 5-lipoxigenase (LOX). Na doença inflamatória intestinal (DII) a inibição de (NF)- κ B tornando-se alvo principal para o tratamento da patologia. Logo, a cúrcuma demonstra-se um composto promissor no tratamento de algumas doenças (Menon & Sudheer, 2007).

A curcumina mostra-se um composto promissor no tratamento terapêutico de diversos tipos de câncer, devido a suas diversas aplicabilidades, modulando alguns fatores desta doença, dentre elas temos de direcionar diferentes vias de sinalização celular, incluindo fatores de crescimento, citocinas, transcrição fatores e genes moduladores da proliferação e apoptose celular (Noorafshan & Ashkani-Esfahani, 2013) Alguns impedimentos da ampla utilização deste composto devem-se a sua baixíssima absorção no organismo, ocasionando sua rápida eliminação sendo, portanto, um fator limitante na sua utilização direta no organismo.

A curcumina é um composto praticamente insolúvel em água e com uma configuração enólica em sua estrutura, tornando-a um grupo altamente cromóforo, desta maneira, temos uma alta fotoatividade visto sua configuração eletrônica com um sistema de elétrons-pi, permitindo que esta molécula seja oxidada na presença de luz, gerando radicais (Chignell et al., 1994).

1.6 Compósitos de HAp com atividade Antimicrobiana

Na literatura já foram reportados alguns compósitos de HAp com materiais cerâmicos visando uma atividade antimicrobiana otimizada, nesta via, temos o HA/ α -AgVO₃ um compósito que mostrou boa atividade antifúngica *Fusarium guttiforme* e *Colletotrichum horii*, esta atividade deve-se a capacidade deste material em gerar h⁺, O₂⁻ e [•]OH, levando os micro-organismo a sofrerem um estresse oxidativo, ocasionando a inibição na proliferação das espécies supracitadas (Silva et al., 2020). O α -AgVO₃ decorado com hidroxiapatita, mostrou uma atividade antibactericida em diferentes concentrações e com boa biocompatibilidade, atuando em testes contra *S. aureus*. O material mostrou-se altamente eficiente pelas espécies de ROS geradas pelo material, de modo semelhante ao explicado acima (Silva et al., 2019).

Saindo um pouco dos sistemas de HAp com vanadatos de prata, temos a HAp substituída na sua estrutura com metais (Zn, Au e Ag) foram misturadas com nanopartículas de prata. Estas estruturas com variadas proporções entre os metais mostraram atividades eficientes contra culturas de *S. aureus* e *E. coli*, a variação no tamanho de partícula, bem como a atividade antimicrobiana variavam de acordo com a presença das NP de prata, os quais foram altamente combatentes e efetivos nos meios de cultura (Mocanu et al., 2014).

A dopagem com prata na HAp também se demonstra como uma opção para a elaboração de materiais com uma boa atividade contra bactérias *gram* positivas e *gram* negativas, todavia, estes compostos mostraram-se tóxicos para células de mamíferos (J. Wang et al., 2018). A utilização de cobre substituído em HAp, mostrou-se eficiente em relação a atividade de *S. aureus*, *C. albicans* e *E. coli*, com uma atividade 98% eficiente, contra a primeira citada, e com possibilidade de aplicação em sistemas biológicos (Shanmugam & Gopal, 2014). Dadas tais propriedades, a versatilidade da hidroxiapatita evidencia o objetivo deste trabalho em desenvolver um novo material com a utilização do α - Ag_2WO_4 , que apresenta propriedades semelhantes ao supracitado e aliado a HAp e curcumina, podendo elevar ainda a qualidade dos resultados.

2 Objetivo

2.1 Objetivo Geral

A compreensão de como elaborar novos materiais com características antimicrobianas em sistemas biológicos tem grande destaque na história recente dado contexto da pandemia do COVID-19, atraindo o interesse do meio acadêmico para a elaboração de semicondutores que contribuam no combate a patógenos, nesta via, o desenvolvimento de matérias com propriedades bioativas e com compatibilidade em organismo são de extrema relevância. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho é sintetizar um compósito de α -Ag₂WO₄ suportado em hidroxiapatita e realizar a ancoragem de curcumina, um composto natural com propriedades antibióticas, antiinflamatórias e antioxidantes, e, estudar as propriedades estruturais e antimicrobianas, com o intuito de obter um material com capacidade de aplicação em sistemas biológicos com atividade antimicrobiana.

2.2 Objetivo Específico

- ✓ Sintetizar o material de HAp-nano;
- ✓ Sintetizar os compósitos de HAp-nano com α -Ag₂WO₄;
- ✓ Ancorar a curcumina na superfície do compósito de HAp-nano com α -Ag₂WO₄;
- ✓ Caracterizar estes materiais por difração de raios X (DRX), infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- ✓ Realizar os testes antimicrobianos com e sem irradiação de luz visível, utilizando o fungo *C. albicans*.

3 Metodologia

3.1 Reagentes utilizados

Na **Tabela 2** temos os reagentes de partida utilizados para as sínteses relatadas nos tópicos a seguir, com um detalhamento em relação a fórmula molecular, pureza e fornecedor.

Tabela 2: Reagentes utilizados na realização do trabalho.

Reagente	Fórmula Molecular	Pureza	Fornecedor
Nitrato de Cálcio Tetrahidratado	$(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$	99,9%	ALDRICH
Fosfato de Amônio	$((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$	99,0%	NEON
Tungstato de Sódio DiHidratado	$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	99,0%	ALDRICH
Nitrato de Prata	AgNO_3	98,0%	ALDRICH
Curcumina	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$	99,0%	ALDRICH
Polietileno Glicol	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$	99,0%	SYNTH
Acetona	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	99,0%	SYNTH
Hidróxido de Amônio	NH_4OH	99,0%	SYNTH

Fonte: Próprio Autor, 2022.

3.2 Síntese da HAp

O método utilizado foi o de coprecipitação química com auxílio de bomba peristáltica. A Primeira etapa consiste na pesagem do material em uma balança, os quais devem ser pesados nas proporções presentes na **Tabela 3**:

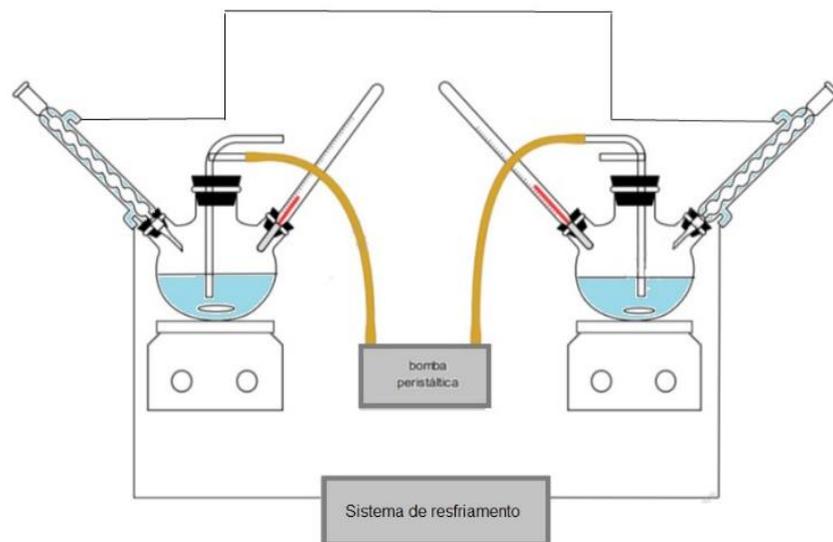
Tabela 3: Proporção dos sais precursores da síntese de HA

Solução	Molaridade	Volume
Cálcio	10 mmol	50 mL
Fosfato	6 mmol	100 mL

Fonte: Próprio Autor, 2022.

As massas foram coletadas e então adiciona-se os volumes de água miliQ necessários. As soluções foram preparadas em béqueres e após sua dissolução foram transferidos para dois balões de fundo achatado com volume igual a 250 mL. Em seguida o pH da solução foi controlado, dessa forma, adiciona-se 1 gota de NH_4OH na solução de cálcio e 3 mL na solução do fosfato. Na próxima etapa os balões foram aquecidos até a faixa de temperatura entre 90-95°C. Após atingir estes adiciona-se a solução de fosfato na solução de cálcio a uma taxa de 7 mL/min com auxílio de vidrarias adaptadas (**Figura 10**).

Figura 10: Esquema de montagem da síntese de HAp por coprecipitação em refluxo.



Fonte: Próprio Autor, 2022.

3.3 Síntese *in situ* do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$

Após a secagem das amostras iremos realizar a síntese *in situ* do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ utilizando a HAp como suporte, para isso iremos utilizar o método sonoquímico. Deste modo, foram definidas as proporções de 10, 20 e 30% (mol) de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na HAp. Em um béquer foi colocado a HAp com o formador de rede, nesse caso o tungstato de sódio, com 50 mL de água e em seguida foi colocado em um ultrassom de ponta

(Figura 11) até que sua temperatura atingiu 40 °C. Em outro béquer, teremos o precursor de nitrato de prata, juntamente do ácido do cítrico e repete-se o procedimento anterior de aquecimento até 40 °C.

Ao atingir as temperaturas as soluções são misturadas e levadas a um ultrassom de ponta, por 3 h a 75% de potência. No término deste tempo, temos o material obtido, sendo possível observar uma mudança na coloração sendo inicialmente branca e alterando-se para um tom acinzentado. Em seguida o material foi transferido para tubos Falcon e foi lavado com água destilada 5 vezes em uma centrífuga por 5 minutos a 8000 rpm. Após as lavagens, tubos foram inseridos no suporte adequado e levados a estufa por 24 h a 60 °C. Por fim, as soluções foram maceradas em almofariz.

Figura 11: Representação de um ultrassom de ponta.



Fonte: biovera.com.br

3.4 Ancoragem da Curcumina

Os materiais obtidos foram incorporados com curcumina, segundo testes prévios antes deste trabalho, foi definido que a concentração ideal de curcumina de em 10% massa/massa com o material a ser ancorado. Deste modo, utilizou-se 100 mg de cada uma das amostras obtidas. Para isso cada uma delas teve que utilizar 30% em relação massa/massa de PEG 6000. Em outro béquer, foram colocadas as massas correspondentes de HAp pura ou HAp+ α -Ag₂WO₄, e adicionar 10 mL de

acetona. Em seguida foi inserido no ultrassom de ponta para que ocorra uma dispersão do material. Posteriormente, a mistura entre as soluções de curcumina e HAp- α -Ag₂WO₄, foram levados a um agitador magnético e deixados sob agitação por 1 h. Após a agitação, a solução final será transferida para um tubo Falcon e foi realizada as lavagens, 5 vezes com acetona. Após as lavagens, tubos foram inseridos no suporte adequado e levados a estufa por 24 h a 60 °C. Por fim, as soluções foram maceradas. As amostras sintetizadas foram nomeadas de acordo com a **Tabela 4**.

Tabela 4: Nomenclatura e siglas das amostras estudadas.

Amostra	Sigla
Hidroxiapatita pura	HAp
Hidroxiapatita ancorada com Curcumina	HAp-C
Hidroxiapatita com α -Ag ₂ WO ₄ 10% em massa	HAp-AWO-10
Hidroxiapatita com α -Ag ₂ WO ₄ 20% em massa	HAp-AWO-20
Hidroxiapatita com α -Ag ₂ WO ₄ 30% em massa	HAp-AWO-30
Hidroxiapatita com α -Ag ₂ WO ₄ 10% em massa e ancorada com curcumina	HAp-AWO-10-C
Hidroxiapatita com α -Ag ₂ WO ₄ 20% em massa e ancorada com curcumina	HAp-AWO-20-C
Hidroxiapatita com α -Ag ₂ WO ₄ 30% em massa e ancorada com curcumina	HAp-AWO-30-C

Fonte: Próprio Autor, 2022.

3.5 Caracterizações

3.5.1 Difractometria de Raio-X (DRX)

As análises de DRX das amostras foram realizadas em um difratômetro de raios-X da marca Rigaku, modelo DMax2500PC. Para essas análises, o equipamento operou a 40 kV e 150 mA usando radiação α Cu-K ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). Utilizou-se de uma taxa de varredura de 2° /min no intervalo de 10 a 80°. Os difratogramas de pó foram comparados com os padrões de difração de acordo com as folhas cristalográficas

JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) e ICSD (Inorganic Crystal Structure Database).

3.5.2 Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR foram obtidos fazendo uso do espectrofotômetro Jasco FT/IR-6200 (Japão) operando no modo de absorbância realizado em temperatura ambiente.

3.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens MEV foram coletadas em um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo frio (FE-SEM; JEOL modelo 7500F) com as seguintes condições operacionais: tensão de aceleração de 5 kV, corrente de emissão de 10 μ A, modo de imagem de elétrons secundários (SE) e ampliação de até 150.000 X.

3.6 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana contra *C. albicans* (ATCC 90028) foi determinada através da mínima concentração inibitória (MIC) utilizando o método de microdiluição em caldo com placa de 96 poços, conforme aos protocolos padrão. As amostras foram dispersas em Mueller Hinton (MH) Broth (Oxoid) para bactérias e RPMI 1640 para fungos com concentração inicial de 2000 μ g/mL, seguido da adição de cada cepa bacteriana em seus respectivos poços a 5×10^5 UFC/mL. Cada placa foi suplementada com veículo (DMSO a 1%), controles positivos e negativos. A MIC foi determinada após incubação por 24 h a 37°C através da concentração mais baixa do composto que inibe o crescimento bacteriano. Os resultados foram realizados em triplicata. Após a determinação da MIC, alíquotas de 50 μ l de todos os poços que não apresentaram crescimento bacteriano visível foram semeadas em placas de ágar MH e incubadas por 24h a 37°C. Quando 99,9% da população bacteriana é morta na concentração mais baixa de um agente antimicrobiano, é denominado como ponto final de mínima concentração inibitória bacteriana (MBC). Isso foi feito observando placas de ágar pré e pós-incubadas quanto à presença ou ausência de bactérias. Para os testes com luz,

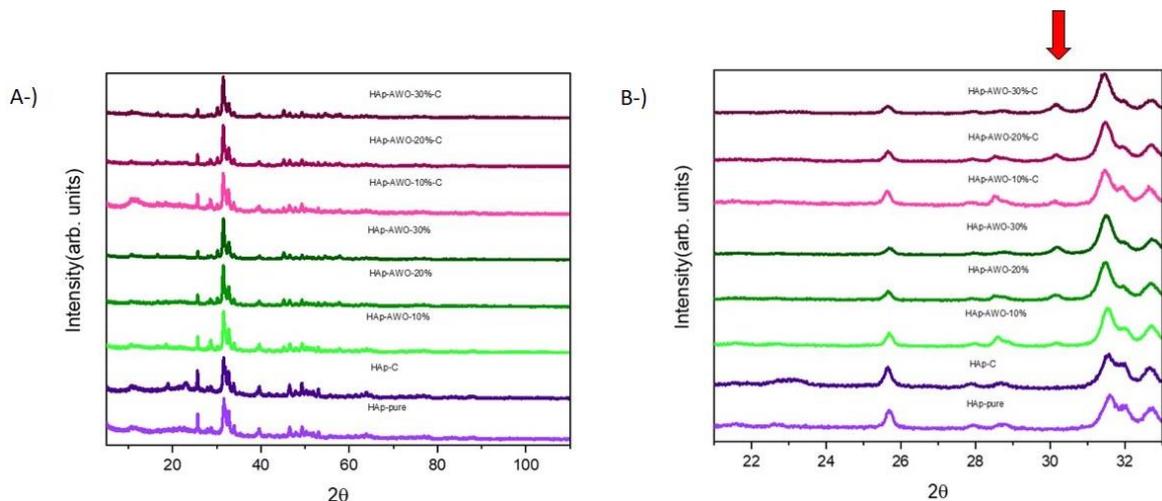
foi realizada a fotoativação do material em contato com as bactérias por 2h utilizando 3 lâmpadas visíveis com potencia de 8W.

4 Resultados e Discussão

4.1 Difração de Raios X (XRD)

A **Figura 12** mostra a difração de raios X das amostras de HAp, HAp-AWO e HAp-AWO-C. O resultado indica que as amostras de HAp foram obtidas com sucesso pelo método de coprecipitação em fluxo de acordo com o padrão ICSD N° 26204, com uma provável fase secundária na região de 30° para as amostras de HAp-AWO e HAp-AWO-C. Esta fase relacionada ao padrão ICSD N° 26204 cristaliza em um sistema cristalino hexagonal com aglomerados tetraédricos $[PO_4]$, e com aglomerados de Ca em dois sítios diferentes, um com aglomerados $[CaO_9]$ que formam colunas nos eixos ternários da estrutura, e outro com aglomerados $[CaO_7H]$ formando canais hexagonais na estrutura. Deste modo, a fase hexagonal da HAp, determinada pelo grupo pontual $P63/m$ é comprovada (Jagannathan & Kottasaimy, 1995).

Figura 12: Difratogramas das amostras de HAp, HAp-AWO e HAp-AWO-C (A).
Ampliação do difratogramas na região de 25° a 31° (B).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

Em relação a fase do α - Ag_2WO_4 , ele tem grupo $\text{Pn}2\text{n}$, (ICSD nº 4156) reportado em Assis et al., correspondente a fase alpha do material com pico mais intenso em torno de 30° . De acordo com os difratogramas, podemos sugerir que a fase de α - Ag_2WO_4 foi formada, sendo um indicativo que o produto desejado tenha sido obtido (Roca et al., 2021). À medida que a proporção de α - Ag_2WO_4 foi aumentada, temos um aumento correspondente na intensidade do pico o que indica a presença do material na estrutura da HAp. Os difratogramas não revelam informações exatas sobre a incorporação da curcumina na estrutura, uma vez que esta quantidade é muito pequena, porém, observa-se a mudança da coloração das amostras de brancas para amarelas intensas quando o material é funcionalizado.

4.2 Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier

Os espectros FT-IR foram obtidos com o uso do espectrofotômetro Jasco FT/IR-6200 (Japão) operando no modo de absorbância realizado em temperatura ambiente. Em relação aos espectros de FT-IR, na **Tabela 5** temos a presença para as bandas esperadas da hidroxiapatita, que são as seguintes: as bandas em 472, 563, 605, 962, 1033, 1062 e 1098 cm^{-1} estão relacionadas a modos de clusters $[\text{PO}_4]$ na estrutura HAp (MACHADO 2018, SOARES 2020); a banda em 3570 cm^{-1} está relacionada aos grupos OH na estrutura HAp. Após a ancoragem da curcumina, observam-se trechos entre 1100 e 1600 cm^{-1} , que estão relacionados aos trechos C=O e C=C na estrutura da curcumina, presente na **Figura 13**, estas pequenas distorções indicam que o material foi ancorado com sucesso.

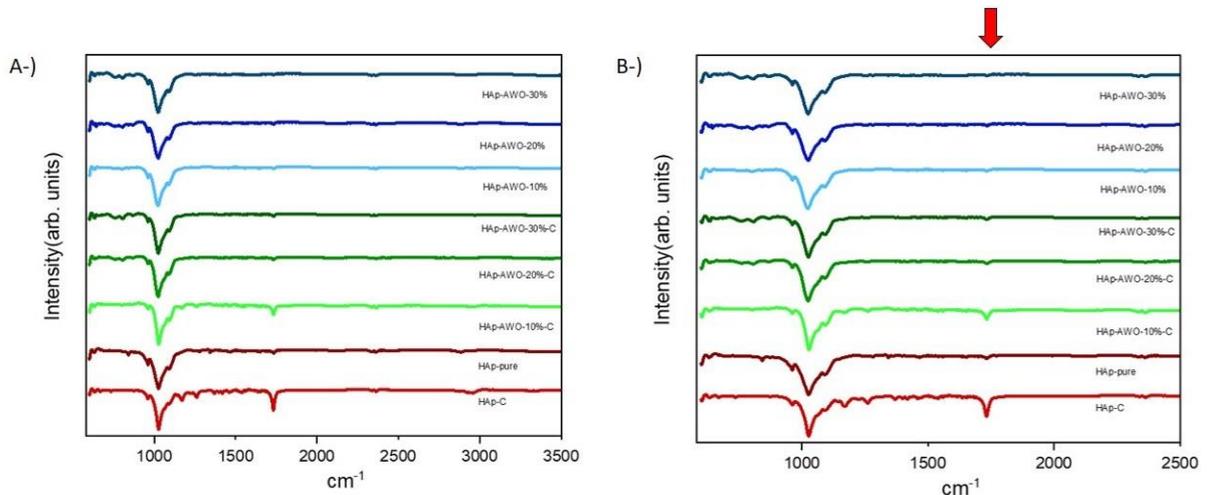
Tabela 5: Estiramentos modos de clusters $[\text{PO}_4]$ na HAp.

Modo Vibracional	Estiramento (cm^{-1})
$\nu_2 \text{PO}_4$	472
$\nu_4 \text{PO}_4$	563,605
$\nu_1 \text{PO}_4$	962
$\nu_3 \text{PO}_4$	1033,1062,1098

Fonte: Próprio Autor, 2022.

Figura 13: Espectro de Infravermelho das amostras de HAp, HAp-AWO e HAp-

AWO-C (A). Imagem aproximada da região de interesse do espectro de infravermelho (B).



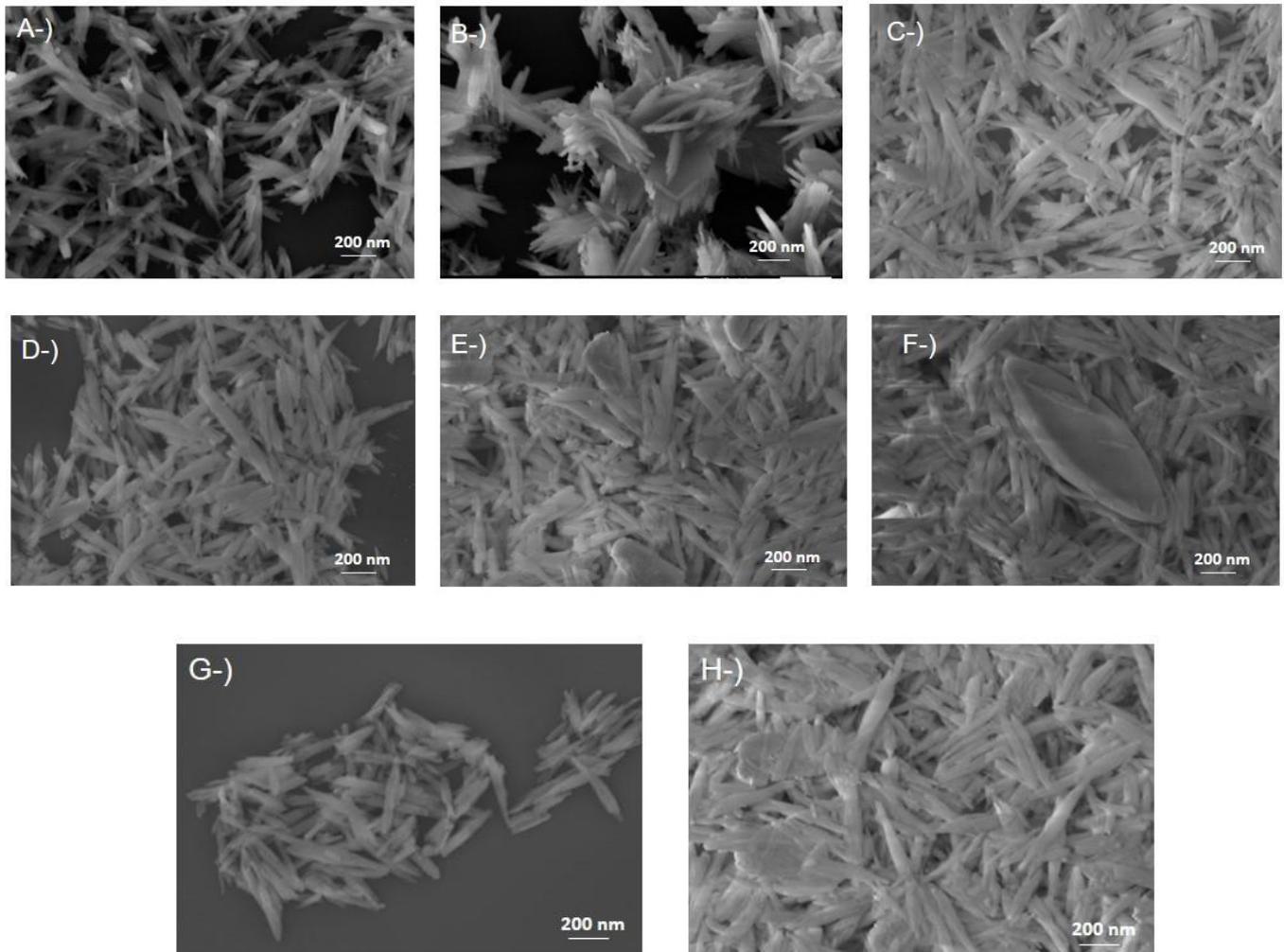
Fonte: Próprio Autor, 2022.

4.3 Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens MEV, todas as amostras foram colocadas diretamente em fita condutora de carbono e depois revestidas com ouro antes da análise MEV.

Para a amostra de HAp (**Figura 4(A)**), observa-se adensamento e aglomeração de partículas, além de sua espessura equivalente a aproximadamente 30 nm, esse resultado corrobora com os tamanhos estudados por Machado et al. As amostras de HAp possuem morfologia semelhante ao formato de pequenos bastonetes. Ao adicionar-se curcumina, não se observa diferenças morfológicas entre as amostras (**Figura 4(B)**). Ao formar os compósitos HAp-AWO, observa-se a formação de estruturas maiores, provavelmente provenientes das partículas de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, a ocorrência destas partículas aumenta conforme adiciona-se mais $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ (**Figura 4(C-E)**). Desta maneira a ocorrência para as amostras HAp-AWO-30% e HAp-AWO-30%-Cur é maior. Estes resultados corroboram diretamente com os observados por DRX. Para uma maior precisão do resultado é necessário que sejam realizadas análises de mapeamento de espectroscopia de energia dispersiva (EDX), para que se confirme se de fato estas partículas maiores são de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. Como observado anteriormente, ao adiciona-se curcumina, não são observadas mudanças morfológicas na amostra (**Figura 4(F-H)**).

Figura 14: Imagens de microscópio eletrônico de varredura das amostras de HAp (A), HAp-Cur (B), HAp-AWO-10% (C), HAp-AWO-20% (D), HAp-AWO-30% (E), HAp-AWO-10%-Cur (F), HAp-AWO-20%-Cur (G) e HAp-AWO-30%-Cur (H).



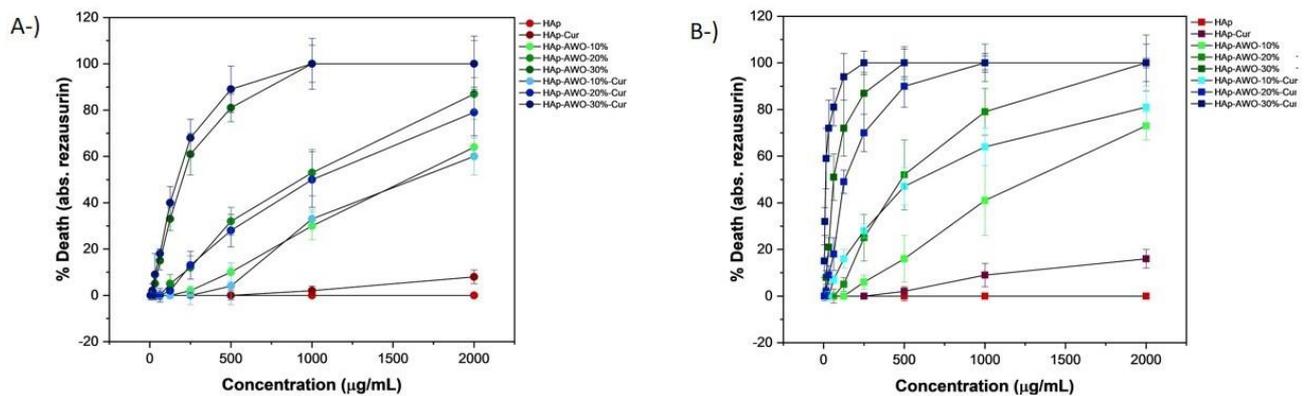
Fonte: Próprio Autor, 2022.

4.4 Atividade antimicrobiana

Foram realizados os testes de mínima concentração inibitória (MIC) para todos os materiais sem luz, e fotoativados por 2h, utilizando o fungo *C. albicans*. A **Figura 15(A)** mostra os testes antimicrobianos sem a fotoativação dos materiais. Observa-se que a HAp não possui nenhuma atividade antimicrobiana, tão pouco a HAp-Cur. Ao

se formar os compósitos utilizando $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, observa-se um aumento da morte dos microorganismos, e que a efetividade do material está diretamente relacionada com a quantidade de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. As amostras sintetizadas com 10 e 20% de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ não apresentaram valores de MIC, uma vez que não ocorreu a eliminação total do fungo em nenhuma concentração. Já as amostras sintetizadas com 30% apresentaram valores de MIC de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Não se observou diferenças significativas no teste no escuro, entre as amostras com e sem curcumina.

Figura 15: Atividade antimicrobiana das amostras contra *C. albicans* sem luz (A), e com luz (B).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

Os testes com luz são mostrados na **Figura 15 (B)**. Observa-se que a HAp, mesmo fotoativada, não possui atividade antimicrobiana. Para a amostra HAp-Cur, observa-se uma eliminação de ~20%, relacionada a sua funcionalização com a curcumina. Este efeito ocorre, pois, ao ser fotoativada, a curcumina pode produzir espécies reativas de oxigênio, que são altamente tóxicas para microorganismos patogênicos, como bactérias, e fungos (Dias et al., 2020). As amostras sintetizadas com 10% de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ ainda não apresentaram eliminações microbianas totais, porém observa-se que em relação aos testes no escuro, elas foram muito mais efetivas. Além disso, a amostra funcionalizada com curcumina foi mais efetiva do que a sem curcumina. Para as amostras com 20% de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, os valores de MIC encontrados foram de 2000 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, para as amostras HAp-AWO-20% e HAp-AWO-20%-Cur, respectivamente. Para as amostras com 30% de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, os valores de MIC encontrados foram ainda menores, sendo de 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$, para as amostras HAp-AWO-30% e HAp-AWO-30%-Cur, respectivamente. Desta maneira,

contata-se que a ação bacteriana vem principalmente do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, e pode ser potencializada sob a ação da luz e funcionalização com curcumina.

Espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), hidroperoxila ($\bullet\text{OOH}$) e superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) podem ser geradas por semicondutores através dos processos de excitação de eletrônica e geração dos pares elétron-buraco. Estes processos podem ocorrer espontaneamente no escuro e ainda ser amplificados pela luz, devido ao aumento da concentração dos pares elétron-buraco (Assis et al., 2022). Quando EROs é produzido por semicondutores, a molécula de H_2O perde um elétron para formar um $\bullet\text{OH}$ e um próton (H^+). Simultaneamente, um e^- é transferido para a molécula de O_2 , formando um $\bullet\text{O}_2^-$. Por sua vez, para manter o equilíbrio de carga e massa, esse íon interage com o H^+ , formando um radical hidroperoxila ($\bullet\text{OOH}$) (de Oliveira et al., 2017).

Os EROs podem então entrar nas membranas do microrganismo e reagir com os grupos fosfato e sulfato existentes, levando à morte celular ou impedindo sua replicação, interrompendo a produção de proteínas essenciais (Assis, Simoes, et al., 2021). Em quantidades limitadas, os EROs são necessário para a homeostase celular e sinalização redox. O ataque sustentado de EROs endógenos e exógenos resulta em mudanças conformacionais e oxidativas em biomoléculas-chave, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas, formação de adutos de carbonila (aldeído/cetona), nitração, sulfoxidação, dano ao DNA e oxidação de nucleobases. Devido ao seu curto tempo de vida.

A maior parte dos danos causados pelas EROs ocorre na parede celular, interrompendo os componentes da cadeia respiratória e o potencial eletroquímico celular, impossibilitando a célula de gerar energia e levando à morte (Alsamhary, 2020). O destino das células, principalmente sua sobrevivência ou morte, é determinado pelas respostas celulares às condições fisiológicas. Se a concentração de EROs for grande o suficiente para gerar danos irreparáveis aos microrganismos, ele é levado a morte. Em nosso caso, foi observado que além da luz amplificar a ação antimicrobiana do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, ela também fotoativa a curcumina, que funciona como um amplificados de geração de EROs (Dias et al., 2020).

5 Considerações Finais

O objetivo deste trabalho consistiu em obter um novo material baseado em um material não tóxico conhecido, a HAp atuando como suporte para $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e realizando uma ancoragem com curcumina, obtendo-se um compósito com (foto)atividade antimicrobiana podendo ser aplicado em sistemas biológicos. A síntese escolhida para a HAp mostrou-se um sucesso, confirmando sua estrutura cristalina pelas técnicas de DRX e FT-IR e a sua morfologia nano pelo MEV. A incorporação de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ pelo método sonoquímico, foi efetiva, sendo evidenciado pela técnica de DRX. Além disso, observou-se modificações no tamanho de partícula por MEV, mostrando indícios de modificação nos compósitos. A ancoragem da curcumina foi difícil de se verificar, porém a técnica de FT-IR nos mostrou pequenas bandas de vibração entre 1100 e 1600 cm^{-1} , possivelmente referente a curcumina. Além disso a incorporação da curcumina pode ser constatada visualmente devido a alteração da cor das amostras, de brancas e amarelas intensas.

A atividade antimicrobiana das amostras foi testada frente ao fungo *C. albicans*, utilizando testes de MIC. Quando realizados no escuro, os testes mostram que a curcumina não afeta a eficiência antimicrobiana, sendo está totalmente relacionada a quantidade de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ presente na amostra. Porém, quando os testes foram realizados com o material fotoativado por 2h, observou-se que as propriedades antimicrobianas foram amplificadas, principalmente nas amostras com curcumina, conseguindo-se um MIC de 250 $\mu\text{g/mL}$ para a amostra HAp-AWO-30%-Cur. A atividade antimicrobiana está diretamente a capacidade do semicondutor gerar EROs a partir dos pares eletron/buraco gerados que são amplificados com luz, e a fotoativação da curcumina que pode gerar EROs. Desta maneira observou-se que o compósito sintetizado pode ser utilizado como agente antimicrobiano fotoativado.

Referências

- Akindoyo, J. O., Beg, M. D. H., Ghazali, S., Heim, H. P., & Feldmann, M. (2018). Impact modified PLA-hydroxyapatite composites – Thermo-mechanical properties. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, *107*, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2018.01.017>
- Akram, M., Mohiuddin, E., & Asif, M. (2019). *Curcuma longa and Curcumin: A review article HIGH ACADEMIA of SCIENCE-open membership View project Mathematical Modeling View project*. <https://www.researchgate.net/publication/284415430>
- Alsamhary, K. I. (2020). Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus subtilis* and their antibacterial activity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(8), 2185–2191. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.026>
- Alvarez Roca, R., Lemos, P. S., Andrés, J., & Longo, E. (2016). Formation of Ag nanoparticles on metastable β -Ag₂WO₄ microcrystals induced by electron irradiation. *Chemical Physics Letters*, *644*, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2015.11.048>
- Alvarez-Roca, R., Gouveia, A. F., de Foggi, C. C., Lemos, P. S., Gracia, L., da Silva, L. F., Vergani, C. E., San-Miguel, M., Longo, E., & Andrés, J. (2021). Selective Synthesis of α -, β -, and γ -Ag₂WO₄ Polymorphs: Promising Platforms for Photocatalytic and Antibacterial Materials. *Inorganic Chemistry*, *60*(2), 1062–1079. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c03186>
- Andrade Neto, N. F., Silva, J. M. P., Tranquilin, R. L., Longo, E., Bomio, M. R. D., & Motta, F. V. (2020). Stabilization of the γ -Ag₂WO₄ metastable pure phase by coprecipitation method using polyvinylpyrrolidone as surfactant: Photocatalytic property. *Ceramics International*, *46*(10), 14864–14871. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.03.012>
- Arden, R. L., & Burgio, D. L. (1992). *Bone Autografting of the Craniofacial Skeleton: Clinical and Biological Considerations*.
- Assis, M., Cordoncillo, E., Torres-Mendieta, R., Beltrán-Mir, H., Mínguez-Vega, G., Oliveira, R., Leite, E. R., Foggi, C. C., Vergani, C. E., Longo, E., & Andrés, J. (2018). Towards the scale-up of the formation of nanoparticles on α -Ag₂WO₄ with bactericidal properties by femtosecond laser irradiation. *Scientific Reports*, *8*(1), 1884. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19270-9>
- Assis, M., da Silva, J. S., Gonçalves, M. O., de Almeida Rodolpho, J. M., de Lima Fragelli, B. D., Corte, A. B. P., Ribeiro, L. K., Teodoro, M. D., de Freitas Anibal, F., de Sousa, C. P., Oliveira, O. N., Andrés, J., & Longo, E. (2022). Bactericidal activity of Ag₄V₂O₇/ β -AgVO₃ heterostructures against antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Biomaterials Advances*, *141*, 213097. <https://doi.org/10.1016/J.BIOADV.2022.213097>
- Assis, M., de Foggi, C. C., Teodoro, V., de Campos da Costa, J. P., Silva, C. E., Robeldo, T., Caperucci, P. F., Vergani, C. E., Borra, R. C., Sorribes, I., Gouveia, A. F., San-Miguel, M. A., Andrés, J., & Longo, E. (2021). Surface-dependent photocatalytic and biological activities of Ag₂CrO₄: Integration of experiment and simulation. *Applied Surface Science*, *545*, 148964. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.148964>
- Assis, M., Robeldo, T., Foggi, C. C., Kubo, A. M., Mínguez-Vega, G., Condoncillo, E., Beltrán-Mir, H., Torres-Mendieta, R., Andrés, J., Oliva, M., Vergani, C. E., Barbugli, P. A., Camargo, E. R., Borra, R. C., & Longo, E. (2019). Ag

- Nanoparticles/ α -Ag₂WO₄ Composite Formed by Electron Beam and Femtosecond Irradiation as Potent Antifungal and Antitumor Agents. *Scientific Reports*, 9(1), 9927. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46159-y>
- Assis, M., Simoes, L. G. P., Tremiliosi, G. C., Coelho, D., Minozzi, D. T., Santos, R. I., Vilela, D. C. B., Santos, J. R. do, Ribeiro, L. K., Rosa, I. L. V., Mascaro, L. H., Andrés, J., & Longo, E. (2021). SiO₂-Ag Composite as a Highly Virucidal Material: A Roadmap that Rapidly Eliminates SARS-CoV-2. *Nanomaterials*, 11(3), 638. <https://doi.org/10.3390/nano11030638>
- Baruah, S., & Dutta, J. (2009). Nanotechnology applications in pollution sensing and degradation in agriculture: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 7(3), 191–204. <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0228-8>
- Brinemark, P.-I. (1983). *Osseointegration and its experimental background*.
- Chen, M., He, Y., Wang, X., & Hu, Y. (2018). Complementary enhanced solar thermal conversion performance of core-shell nanoparticles. *Applied Energy*, 211, 735–742. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.11.087>
- Chignell, C. F., Reszka, K. J., Motten, A. G., Sik, R. H., & D A H L, T. A. (1994). SPECTRAL AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF CURCUMIN. In *Photochemistry and Photobiology* (Vol. 59, Issue 3).
- Cilek, E. C., & Karaca, S. (2015). Effect of nanoparticles on froth stability and bubble size distribution in flotation. *International Journal of Mineral Processing*, 138, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2015.03.004>
- da Silva, J. S., Machado, T. R., Trench, A. B., Silva, A. D., Teodoro, V., Vieira, P. C., Martins, T. A., & Longo, E. (2020). Enhanced photocatalytic and antifungal activity of hydroxyapatite/ α -AgVO₃ composites. *Materials Chemistry and Physics*, 252, 123294. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.123294>
- Dai, X.-J., Luo, Y.-S., Zhang, W.-D., & Fu, S.-Y. (2010). Facile hydrothermal synthesis and photocatalytic activity of bismuth tungstate hierarchical hollow spheres with an ultrahigh surface area. *Dalton Transactions*, 39(14), 3426. <https://doi.org/10.1039/b923443h>
- de Oliveira, R. C., de Foggi, C. C., Teixeira, M. M., da Silva, M. D. P., Assis, M., Francisco, E. M., Pimentel, B. N. A. D. S., Pereira, P. F. D. S., Vergani, C. E., Machado, A. L., Andres, J., Gracia, L., & Longo, E. (2017). Mechanism of Antibacterial Activity via Morphology Change of α -AgVO₃: Theoretical and Experimental Insights. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(13), 11472–11481. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b00920>
- Denissen, H. W., & de Croot, K. (1979). *Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hydroxylapatite*.
- Dias, L. D., Blanco, K. C., Mfouo-Tynga, I. S., Inada, N. M., & Bagnato, V. S. (2020). Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. In *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* (Vol. 45). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2020.100384>
- Dorozhkin, S. v. (2012). Nanodimensional and Nanocrystalline Calcium Orthophosphates. In *American Journal of Biomedical Engineering* (Vol. 2012, Issue 3). <http://journal.sapub.org/ajbe>
- Dorozhkin, S. v. (2013). A detailed history of calcium orthophosphates from 1770s till 1950. *Materials Science and Engineering: C*, 33(6), 3085–3110. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.002>

- Eliaz, N., & Metoki, N. (2017). Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials*, 10(4), 334. <https://doi.org/10.3390/ma10040334>
- Elliott, J. C., Wilson, R. M., & Dowker, S. (2002). *APATITE STRUCTURES*. Ferraz&Monteiro, 2004). (2004). *NANOPHASE HA PREPARATION METHODS*. Fominykh, K., Feckl, J. M., Sicklinger, J., Döblinger, M., Böcklein, S., Ziegler, J., Peter, L., Rathousky, J., Scheidt, E.-W., Bein, T., & Fattakhova-Rohlfing, D. (2014). Ultrasmall Dispersible Crystalline Nickel Oxide Nanoparticles as High-Performance Catalysts for Electrochemical Water Splitting. *Advanced Functional Materials*, 24(21), 3123–3129. <https://doi.org/10.1002/adfm.201303600>
- Ghaffari, M., Mollazadeh-Bajestani, M., Fathollah Moztarzadeh, & Uludağ, H., Hardy, J. G., & Mozafari, M. (2021). An overview of the use of biomaterials, nanotechnology, and stem cells for detection and treatment of COVID-19: towards a framework to address future global pandemics. *Emergente Materials*, 20–34. <https://doi.org/10.1007/s42247-020-00143-9/Published>
- Ghasemi, M., Khorsandi, K., & Kianmehr, Z. (2021). Photodynamic inactivation with curcumin and silver nanoparticles hinders *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm formation: evaluation of glutathione peroxidase activity and ROS production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(9), 149. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03104-4>
- Gomes, D. S., Santos, A. M. C., Neves, G. A., & Menezes, R. R. (2019). A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine. *Cerâmica*, 65(374), 282–302. <https://doi.org/10.1590/0366-69132019653742706>
- Gupta, S. K., Sudarshan, K., Ghosh, P. S., Mukherjee, S., & Kadam, R. M. (2016). Doping-Induced Room Temperature Stabilization of Metastable β -Ag₂WO₄ and Origin of Visible Emission in α - and β -Ag₂WO₄: Low Temperature Photoluminescence Studies. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(13), 7265–7276. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b00078>
- Haider, A., Gupta, K. C., & Kang, I.-K. (2014). PLGA/nHA hybrid nanofiber scaffold as a nanocargo carrier of insulin for accelerating bone tissue regeneration. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 314. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-314>
- Hench, L. L., & Thompson, I. (2010). Twenty-first century challenges for biomaterials. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(suppl_4). <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0151.focus>
- Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: A review of its effects on human health. In *Foods* (Vol. 6, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods6100092>
- Holzapfel, B. M., Reichert, J. C., Schantz, J. T., Gbureck, U., Rackwitz, L., Nöth, U., Jakob, F., Rudert, M., Groll, J., & Hutmacher, D. W. (2013). How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 65, Issue 4, pp. 581–603). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.009>
- Hubbell, J. A. (1995). Biomaterial in Tissue Engineering. *Nature*, Vol 13(Biotechnology), 565–575.
- Ichikawa, K., Shimomura, N., Yamada, M., & Ohkubo, N. (2003). Control of Calcium Carbonate Polymorphism and Morphology through Biomimetic Mineralization by means of Nanotechnology. *Chemistry - A European Journal*, 9(14), 3235–3241. <https://doi.org/10.1002/chem.200204534>
- J.C Elliot. (1994). *Studies in Inorganic Chemistry Other titles in this series*.

- Kanta Subedi, S. (2014). *An introduction to nanotechnology and its implications*.
- Koh, I., & Josephson, L. (2009). Magnetic Nanoparticle Sensors. *Sensors*, 9(10), 8130–8145. <https://doi.org/10.3390/s91008130>
- Lara-Ochoa, S., Ortega-Lara, W., & Guerrero-Beltrán, C. E. (2021). Hydroxyapatite Nanoparticles in Drug Delivery: Physicochemistry and Applications. *Pharmaceutics*, 13(10), 1642. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101642>
- Lemos, P. S., Altomare, A., Gouveia, A. F., Nogueira, I. C., Gracia, L., Llusar, R., Andrés, J., Longo, E., & Cavalcante, L. S. (2016). Synthesis and characterization of metastable β -Ag₂WO₄: an experimental and theoretical approach. *Dalton Transactions*, 45(3), 1185–1191. <https://doi.org/10.1039/C5DT03754A>
- León, B., & Jansen, J. A. (2009). Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants. In B. León & J. Jansen (Eds.), *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants: Vol. VOL 2*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77718-4>
- Li, W., Jiang, Z., Xiao, X., Wang, Z., Wu, Z., Ma, Q., & Cao, L. (2018). Curcumin inhibits superoxide dismutase-induced epithelial-to-mesenchymal transition via the PI3K/Akt/NF- κ B pathway in pancreatic cancer cells. *International Journal of Oncology*, 52(5), 1593–1602. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4295>
- Lin, Z., Li, J., Zheng, Z., Yan, J., Liu, P., Wang, C., & Yang, G. (2015). Electronic Reconstruction of α -Ag₂WO₄ Nanorods for Visible-Light Photocatalysis. *ACS Nano*, 9(7), 7256–7265. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b02077>
- Machado, T. R., Sczancoski, J. C., Beltrán-Mir, H., Li, M. S., Andrés, J., Cordoncillo, E., Leite, E., & Longo, E. (2018). Structural properties and self-activated photoluminescence emissions in hydroxyapatite with distinct particle shapes. *Ceramics International*, 44(1), 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.09.164>
- Menon, V. P., & Sudheer, A. R. (2007). *ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF CURCUMIN*.
- Mocanu, A., Furtos, G., Rapuntean, S., Horovitz, O., Flore, C., Garbo, C., Danisteanu, A., Rapuntean, G., Prejmerean, C., & Tomoiaia-Cotisel, M. (2014). Synthesis; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles. *Applied Surface Science*, 298, 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.166>
- Ng, C. H. B., & Fan, W. Y. (2016). Preparation of highly uniform 1-dimensional α -Ag₂WO₄ nanostructures with controllable aspect ratio and study of the growth mechanism. *CrystEngComm*, 18(41), 8010–8019. <https://doi.org/10.1039/C6CE01298A>
- Nobre, F. X., Bastos, I. S., dos Santos Fontenelle, R. O., Júnior, E. A. A., Takeno, M. L., Manzato, L., de Matos, J. M. E., Orlandi, P. P., de Fátima Souza Mendes, J., Brito, W. R., & da Costa Couceiro, P. R. (2019). Antimicrobial properties of α -Ag₂WO₄ rod-like microcrystals synthesized by sonochemistry and sonochemistry followed by hydrothermal conventional method. *Ultrasonics Sonochemistry*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104620>
- Noorafshan, A., & Ashkani-Esfahani, S. (2013). Send Orders of Reprints at reprints@benthamscience.net A Review of Therapeutic Effects of Curcumin. In *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 19).
- Pires, A. L. R., Bierhalz, A. C. K., & Moraes, Â. M. (2015). Biomaterials: Types, applications, and market. In *Quimica Nova* (Vol. 38, Issue 7, pp. 957–971). Sociedade Brasileira de Química. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>

- Ratner, B. (2004). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. North West Cancer Intelligence Service.
- Ripamonti, U., Roden, L. C., & Renton, L. F. (2012). Osteoinductive hydroxyapatite-coated titanium implants. *Biomaterials*, 33(15), 3813–3823. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.050>
- Roca, R. A., Lemos, P. S., Gracia, L., Andrés, J., & Longo, E. (2017). Uncovering the metastable γ - Ag_2WO_4 phase: a joint experimental and theoretical study. *RSC Advances*, 7(10), 5610–5620. <https://doi.org/10.1039/C6RA24692C>
- Shanmugam, S., & Gopal, B. (2014). Copper substituted hydroxyapatite and fluorapatite: Synthesis, characterization and antimicrobial properties. *Ceramics International*, 40(10), 15655–15662. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.07.086>
- Shchukin, D. G., & Caruso, R. A. (2003). Inorganic Macroporous Films from Preformed Nanoparticles and Membrane Templates: Synthesis and Investigation of Photocatalytic and Photoelectrochemical Properties. *Advanced Functional Materials*, 13(10), 789–794. <https://doi.org/10.1002/adfm.200304415>
- Soares da Silva, J., Machado, T. R., Martins, T. A., Assis, M., Foggi, C. C., Macedo, N. G., Beltrán-Mir, H., Cordoncillo, E., Andrés, J., & Longo, E. (2019). α - AgVO_3 Decorated by Hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$): Tuning Its Photoluminescence Emissions and Bactericidal Activity. *Inorganic Chemistry*, 58(9), 5900–5913. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b00249>
- Thales Rafael Machado. (2016). *Estudo, caracterização e propriedades de ortofosfatos multifuncionais*.
- Tremiliosi G, C. S. L. F. P. (2020). *Engineering polycotton fiber surfaces, with antimicrobial activity against S. aureus, E. Coli, C. albicans and SARS-CoV-2*.
- van den Berg AJ. (1979). The polymorphism of silver tungstate Ag_2WO_4 . In *J. Appl. Cryst* (Vol. 15, Issue 3).
- Vidal-Iglesias, F. J., Arán-Ais, R. M., Solla-Gullón, J., Herrero, E., & Feliu, J. M. (2012). Electrochemical Characterization of Shape-Controlled Pt Nanoparticles in Different Supporting Electrolytes. *ACS Catalysis*, 2(5), 901–910. <https://doi.org/10.1021/cs200681x>
- Wang, B.-Y., Zhang, G.-Y., Cui, G.-W., Xu, Y.-Y., Liu, Y., & Xing, C.-Y. (2019). Controllable fabrication of α - Ag_2WO_4 nanorod-clusters with superior simulated sunlight photocatalytic performance. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 6(1), 209–219. <https://doi.org/10.1039/C8QI01025K>
- Wang, J., Gong, X., Hai, J., & Li, T. (2018). Synthesis of silver–hydroxyapatite composite with improved antibacterial properties. *Vacuum*, 152, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2018.03.015>
- Xu, Z. P., Stevenson, G., Lu, C.-Q., & Lu, G. Q. (Max). (2006). Dispersion and Size Control of Layered Double Hydroxide Nanoparticles in Aqueous Solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(34), 16923–16929. <https://doi.org/10.1021/jp062281o>
- Zhang, X.-Y., Wang, J.-D., Liu, J.-K., Yang, X.-H., & Lu, Y. (2015). Construction of silver tungstate multilevel sphere clusters by controlling the energy distribution on the crystal surface. *CrystEngComm*, 17(5), 1129–1138. <https://doi.org/10.1039/C4CE02089H>
- Zhang, Y., He, S., Guo, W., Hu, Y., Huang, J., Mulcahy, J. R., & Wei, W. D. (2018). Surface-Plasmon-Driven Hot Electron Photochemistry. *Chemical Reviews*, 118(6), 2927–2954. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00430>

Zinatloo-Ajabshir, S., Baladi, M., Amiri, O., & Salavati-Niasari, M. (2020). Sonochemical synthesis and characterization of silver tungstate nanostructures as visible-light-driven photocatalyst for waste-water treatment. *Separation and Purification Technology*, 248, 117062.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117062>