

14º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2023

ANÁLISE DA SUPERFÍCIE TOPOGRÁFICA EM AMOSTRAS DE HIDROXIAPATITA DOPADAS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

LUCAS H. CONTEL¹, EVELYN G. V. ESPEDILLA², MIRELA C. BARROS², MANUEL T. CALLA³, DIEGO T. GÓMEZ³, JUSTINIANO Q. MARCATOMA³, CARLOS V. LANDAURO³, FLAVIANA B. ANDRADE⁴, ALLAN V. RIBEIRO⁵

¹ Graduando em Engenharia da Computação, Bolsista PIBIFSP, IFSP Câmpus Birigui. l.contel@aluno.ifsp.edu.br

² Pós-graduanda no Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

³ Departamento Acadêmico de Física Del Estado Sólido na Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Peru.

⁴ Docente no Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

⁵ Docente na Licenciatura em Física, Instituto Federal de São Paulo Câmpus Birigui.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 3.13.02.01-7 Biomateriais e Materiais Biocompatíveis

RESUMO: Avanços na nanociência e nanotecnologia mudaram radicalmente a maneira como diagnosticamos, tratamos, e prevenimos várias doenças em vários aspectos da vida humana, surgindo também a necessidade de novos biomateriais para que possa aumentar a qualidade de vida da população. Hidroxiapatita (HAP) trata-se de um biomaterial que por possuir propriedades similares a do tecido ósseo, apresenta boa bioatividade, biocompatibilidade, osteocondução, osteointegração, osteoindução e baixa taxa de degradação, se tornando um material amplamente utilizado devido a sua versatilidade. Dopadas com nanopartículas de prata, a HAP-Ag exibe propriedades antibacterianas inibindo a adesão e proliferação bacteriana neste biomaterial. Neste sentido, o presente trabalho buscou analisar e quantificar por meio da técnica de microscopia de força atômica (MFA) a topografia de amostras de HAP e amostras de HAP dopadas com nanopartículas de prata. As medidas de topografia obtidas por MFA foram realizadas em modo não contato (Dynamic Force) com área escaneada de 5µm x 5µm e 20µm x 20µm. Metodologicamente a caracterização superficial baseou-se na análise de um conjunto de seis parâmetros topográficos. Concluímos que os grupos avaliados apresentaram diferenças topográficas sendo a HAP-Ag o grupo com maior rugosidade, assimetria, curtose e altura máxima comparado com HAP.

PALAVRAS-CHAVE: hidroxiapatita; microscopia de força atômica; adesão bacteriana; nanotecnologia; superfície topográfica; nanopartícula.

TOPOGRAPHIC SURFACE ANALYSIS IN HYDROXYAPATHITE SAMPLES DOPED WITH SILVER NANOPARTICLES

ABSTRACT: Advances in the nanoscience and nanotechnology radically changed the way we diagnose, treat and prevent various diseases in many aspects of human life, arising also the necessity of new biomaterials that can increase the quality of life of the population. Hydroxyapatite (HA) is a biomaterial which by having similar properties to the ones of bone tissues, displays a good bioactivity, biocompatibility, osteoconduction, osteointegration, osteoinduction and slow degradation rate, becoming a material widely used due to its versatility. Doped with silver nanoparticles, the HAP-Ag exhibits antibacterial properties inhibiting bacterial adhesion and proliferation in this biomaterial. In this sense, the current work aimed to analyze and quantify using the atomic force microscopy (AFM) technique, the topography of HAP samples and HAP doped with silver nanoparticles. The topography measurements obtained by AFM were performed in non-contact mode (Dynamic Force) with scanned area of 5µm x 5µm and 20µm x 20µm. Methodologically the surface characterization was based on the

analysis of a set of six topographic parameters. Was concluded that the evaluated groups showed topographic differences with HAP-Ag as the group with bigger roughness, asymmetry, kurtosis and maximum height compared to HAP.

KEYWORDS: hydroxyapatite, atomic force microscopy; bacterial adhesion; nanotechnology; topographic surface; nanoparticle.

INTRODUÇÃO

A hidroxiapatita (HA) trata-se de um constituinte mineral encontrado naturalmente nos ossos e tecidos duros de vertebrados. Devido a sua excelente biocompatibilidade e capacidade de osteointegração, a HA é amplamente utilizada como biomaterial para reparação e substituição de tecidos ósseos em próteses e implantes com destaque no ramo da odontologia.

Entre os desafios encontrados, no entanto, encontra-se que suas propriedades provêm a adesão e proliferação bacteriana pela absorção de moléculas orgânicas, busca-se então uma maneira de evitar ou diminuir casos de infecção deste biomaterial.

Sendo essas bactérias conhecidas por causar infecções em próteses e implantes de HA, onde após infecção e criação do biofilme resistente a maioria dos antibióticos ocorre a proliferação bacteriana sendo esta a principal causa de diversas falhas em tratamentos endodônticos, frequente em infecções pós-tratamento.

Visto que nanopartículas de prata, devido a suas propriedades inerentes únicas, possuem aplicações em diversas áreas, com estudos mostrando que são capazes de servir como potenciais agentes antibacterianos devido principalmente a sua alta razão superfície-volume e sua superfície cristalográfica (Zhang, 2016).

Dopadas com nanopartículas de prata, a HAP-Ag exhibe propriedades antibacterianas inibindo a adesão e proliferação bacteriana neste biomaterial (Jingwen, 2020). Neste sentido, o presente trabalho buscou analisar e quantificar por meio da técnica de microscopia de força atômica (MFA) a topografia de amostras de HAP e amostras de HAP dopadas com nanopartículas de prata.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de HAP foram obtidas em parceria com a Universidade Nacional Maior de São Marcos (UNMSM) Lima/Peru, onde são confeccionados em blocos de 4mm x 2mm, comprimidos e descontaminados em fluxo laminar.

A superfície das amostras foram devidamente preparadas utilizando três diferentes lixas finas de granulometria equivalente a 1500, 2000 e 3000, sendo utilizadas nesta ordem para garantir uma superfície plana e regular, após o processo de lixamento as amostras foram limpas de resíduos ou granulação que possa afetar no processo de análise em MFA. As superfícies das amostras foram avaliadas por microscopia óptica em diferentes resoluções, repetido o processo caso até que a superfície esteja plana e adequada para análise em MFA.

A análise da topográfica das superfícies das diferentes amostras foram realizadas pelo sistema de microscopia de força atômica FlexAFM – NanoSurf. As medidas de topográfica foram realizadas em modo de não contato (Dynamic Force) e utilizando a técnica de Contraste de Fase (Phase contrast). Foram utilizadas ponteiros Tap190Al-G-10 para modo não contato. A área das amostras scaneadas foram de 5µm x 5µm e 20µm x 20 µm com resolução de imagem de 512 x 512 pixels. O cantiléver utilizado possui uma constante de força de 48N/m (28 – 75 N/m) e frequência de ressonância de 190kHz.

As diferenças nas forças entre a amostra e a ponteira movimentam o cantiléver e seus movimentos são captados por um laser e imagens de escala nanométricas são geradas conforme o scanner percorre por meio de movimentos lineares a superfície escolhida da amostra (Eaton, 2010).

O software Gwyddion v2.63 foi utilizado para análise e tratamento de imagens, permitindo corrigir e otimizar imagens, de modo a eliminar possíveis falhas geradas pelos ruídos externos assim como outros fatores para melhor análise da imagem. O Gwyddion também permitiu a quantificação da topografia das amostras realizadas em planos bidimensionais e tridimensionais. A análises das imagens foram realizadas conforme esquema apresentado na Figura 1.

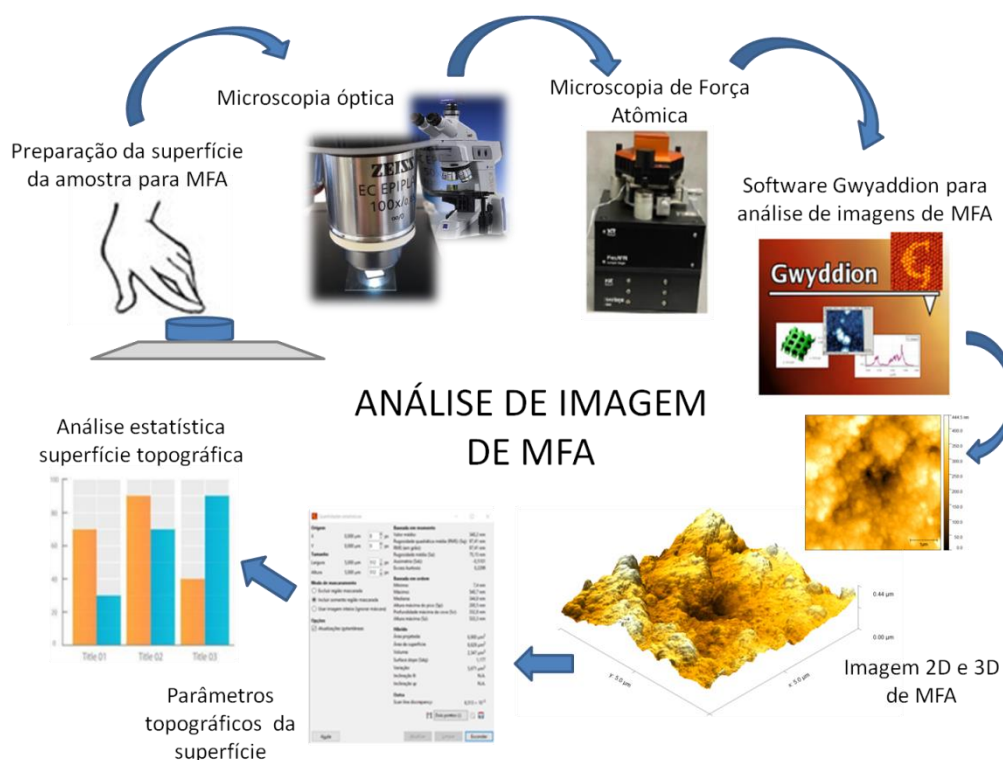


FIGURA 1. Esquema de preparação e análise das amostras por MFA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as análises topográficas das amostras $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ e $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ de HAP e HAP-Ag foi utilizado $N=12$ para cada um dos materiais e tamanhos, com 4 amostras de cada material. Todas as imagens foram tratadas utilizando o software Gwyddion usando metodologias similares, para remoção de possíveis erros ou ruídos na imagem.

Conseguimos observar analisando os resultados apresentados que a topografia das amostras dopadas com nanopartículas de prata possui uma rugosidade superior as amostras de hidroxiapatita sem a prata como observado no Gráfico 1. Os resultados encontrados são dispostos em forma de gráfico no Gráfico 1, e as Figuras 2 e 3 mostram as imagens após tratamento no software em forma bidimensional e tridimensional.

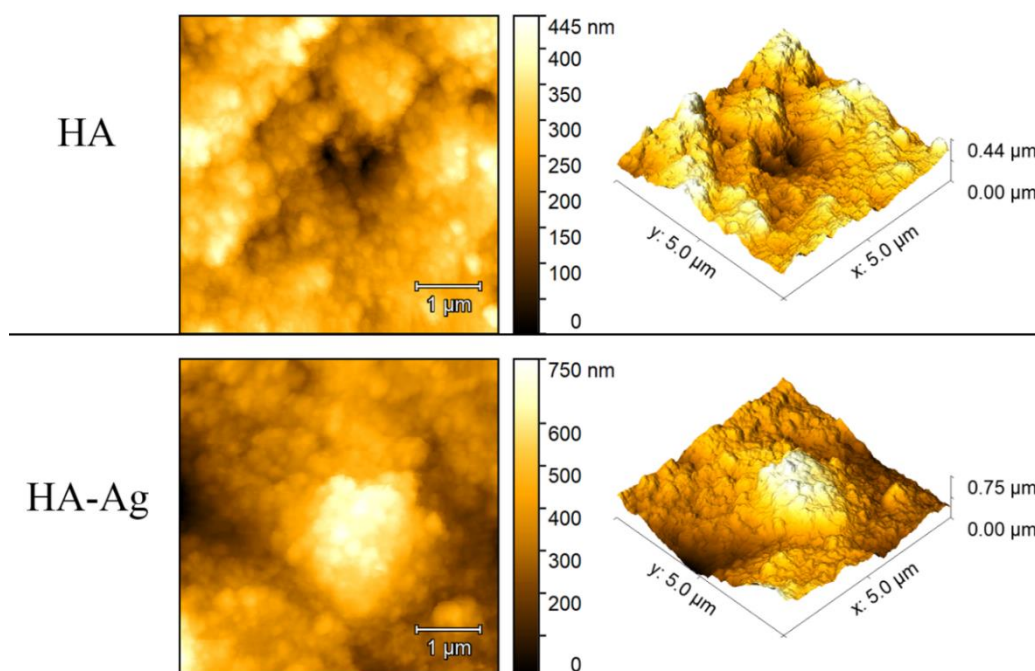


FIGURA 2. Imagem de MFA (5 μ m x 5 μ m) apresentando a topografia de duas amostras diferentes de HAP e HAP-Ag.

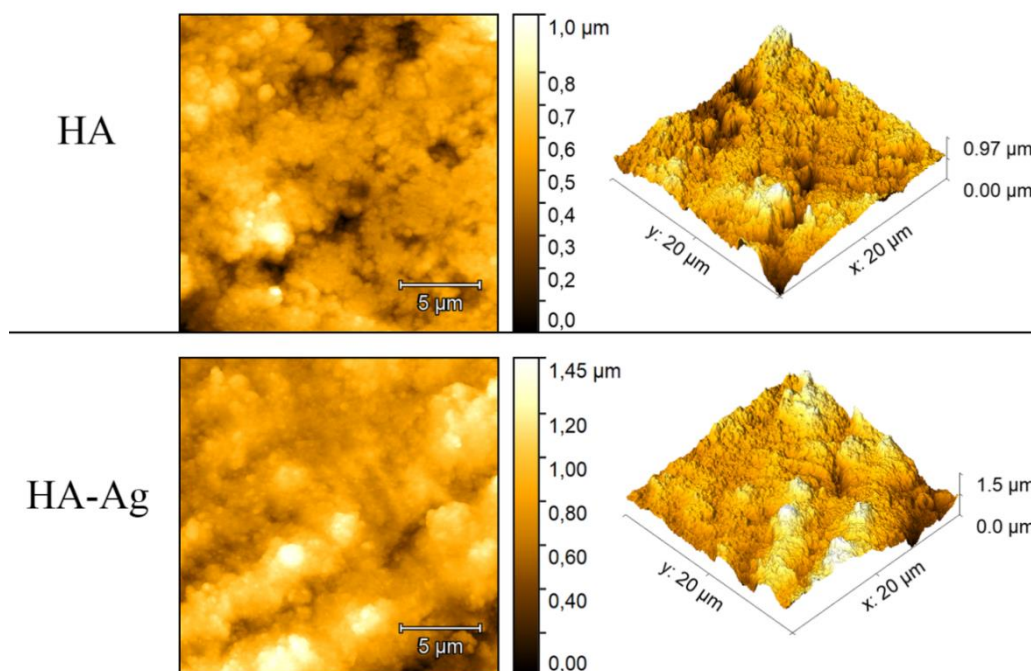


FIGURA 3. Imagem de MFA (20 μ m x 20 μ m) apresentando a topografia de duas amostras diferentes de HAP e HAP-Ag.

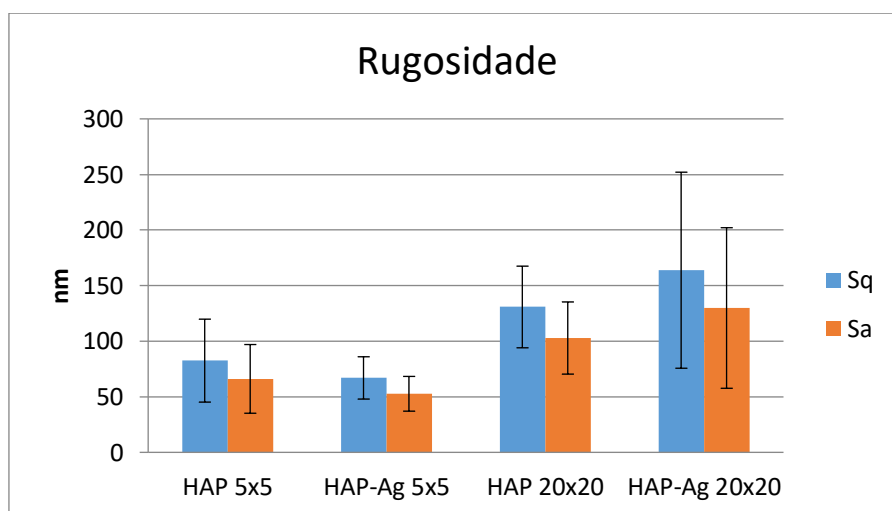


GRÁFICO 1. Comparação entre os valores de rugosidade média (Sa) e RMS (Sq) dos grupos avaliados.

Na Tabela 1 são apresentados os valores para os parâmetros topográficos de superfície representados pela letra “S” e dados por Sa, Sq, Sz, Ssk, Sku e Sdr sendo obtidos por meio da análise das imagens de MFA. Onde, Sa representa a rugosidade média, Sq é a rugosidade média quadrática (RMS - Root Mean Square), Sz é a altura máxima da superfície, Ssk é o grau de simetria das alturas da superfície sobre o plano médio (assimetria), Sku é a medida da nitidez do perfil de rugosidade (curtose) e por fim, Sdr (developed area ratio) representa a proporção da área de superfície pela área de superfície projetada. Sendo considerado um parâmetro híbrido, Sdr é afetado pela amplitude da textura (altura dos picos) e espaçamento entre os picos

Verificamos por meio da análise dos Gráficos 1 e Tabela 1, que dentre os grupos avaliados observou-se que a HAP-Ag (20 μ m x 20 μ m) possui os maiores globais de rugosidade Sq e Sa, bem como

o maior valor de altura máxima (Sz) e assimetria (Ssk). A alteração topográfica pode ser observada também pela análise da assimetria, curtose e altura máxima. Assimetria é dada em Ssk, sendo o grau de simetria das alturas da superfície sobre o plano médio, curtose é dada em Sku sendo uma medida da nitidez do perfil da rugosidade.

TABELA 1. Parâmetros topográficos de superfície para os grupos avaliados.

	RMS roughness (Sq) nm	Mean roughness (Sa) nm	Maximum height Sz (nm)	Developed area ratio (Sdr)	skewness (Ssk)	kurtosis (Sku)
HAP 5x5	82,54±37,30	66,10±30,89	514,09±196,18	1,11±0,04	-0,08±0,42	-0,16±1,11
HAP-Ag 5x5	66,98±19,01	52,70±15,62	479,23±189,69	1,10±0,03	0,36±0,46	0,76±0,94
HAP 20x20	130,80±36,74	102,84±32,44	1030,93±258,38	1,08±0,03	0,35±0,44	0,75±1,02
HAP-Ag 20x20	163,87±88,18	129,86±72,21	1192,78±433,40	1,09±0,03	0,39±0,31	0,68±1,02

Na comparação entre os grupos de mesma área verificamos que a HAP (5µm x5µm) apresentou valores de rugosidade superiores á das amostras de HAP-Ag (5µm x5µm). Cabe ressaltar que os parâmetros topográficos são extremamente sensíveis as regiões em que foram realizadas as medidas. A topografia superficial aliada a outras características da superfície, impactam na adesão bacteriana nos biomateriais, sendo nosso foco a HAP com interesse endodôntico, a adesão se dá por um processo complexo e influenciado por vários fatores relacionados ao tipo de bactéria, superfície e microambiente (Moraes, 2013).

CONCLUSÕES

Através das análises quantitativas conclui-se que quando dopadas por nanopartículas de prata, a topografia superficial das amostras é alterada significativamente, como mostrado pela diferença em rugosidade, assimetria e curtose entre as diferentes amostras de HAP e HAP-Ag. Observou-se diferenças na distribuição espacial dos picos na amostra com picos mais altos e vales mais fundos nas amostras de HAP-Ag (assimetria), assim como na forma de distribuição das alturas na superfície, com picos mais acentuados (curtose) também nas amostras de HAP-Ag, o que pode influenciar no processo de adesão bacteriana e formação do biofilme, sendo este o responsável por garantir a alta resistência das bactérias.

Os resultados encontrados mostram a diferença na topografia das diferentes amostras e o que implica em diversas consequências que as diferenças topográficas podem trazer para as diferentes amostras.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

L.H.C e A.V.R medidas de MFA, análise da superfície topográfica das amostras e elaboração do artigo; M.T.C, D.T.G., J.Q.M. e C.V.L contribuíram na síntese das amostras de HAP e HAP-Ag. E.G.V.E., M.C.B e F.B.A ensaios de adesão bacteriana; A.V.R contribuiu na revisão final do trabalho e ajustes no texto.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao projeto PIBIFSP a oportunidade que fazem possível através do incentivo que proporcionam, gerando um maior crescimento de pesquisas relevantes nacionais e que certamente possuem um papel fundamental para o crescimento no interesse em pesquisas científicas e a busca por maior conhecimento.

Agradeço também a Universidade Maior de São Marcos (UNMSM) Lima/Peru, pela parceria para obtenção das amostras para que fosse possível o desenvolvimento deste projeto, fornecendo tanto amostras de Hidroxiapatita quanto de Hidroxiapatita dopadas com nanopartículas de prata.

REFERÊNCIAS

EATON, Peter. WEST, Paul. **ATOMIC FORCE MICROSCOPY**, 2010. p 9-11.

JINGWEN, H. et al. Silver-hydroxyapatite nanocomposites prepared by three sequential reaction steps in one pot and their bioactivities in vitro. In: **Elsevier**, 2020. p 7-9

MORAES, M.N.; W. C. SILVEIRA; TEIXEIRA, L. E. M.; ARAÚJO, I. D.. Mecanismos de adesão bacteriana aos biomateriais, Revista de Medicina de Minas Gerais, v. 23, n. 3, p. 99-10, 2013.

ZHANG, Xi-Feng et al. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. In: **International Journal of Molecular Science**, 2016. p 1-8