



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Laura Santos Carvalho

**SUPERFÍCIES MICRO/NANO-ESTRUTURADAS  
PARA IMPLANTES DENTÁRIOS**

**VOLUME 1**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia dos Materiais orientada pela Professora Doutora Sandra Maria Fernandes Carvalho e apresentada unidade orgânica de Dissertação de Mestrado, ao Departamento de Engenharia Mecânica**

setembro de 2022



1 2



9 0

FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

# **Superfícies nano estruturadas bioativas com propriedades antimicrobianas para implantes dentários**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia dos  
Materiais

## **Bioactive nanostructured surfaces with antimicrobial properties for dental implants**

**Autor**

**Laura Santos Carvalho**

**Orientador[es]**

**Professora Doutora Sandra Maria Fernandes Carvalho**

**Júri**

**Presidente**

Professora Doutora **Ana Paula da Fonseca Piedade**

**Orientador**

Professora Doutora **Sandra Maria Fernandes**

**Vogais**

Doutora **Luísa Isabel Serra da Glória Fialho**

---

**Coimbra, setembro, 2022**













## Agradecimentos

O trabalho que aqui se apresenta só foi possível graças à colaboração e apoio de algumas pessoas, às quais não posso deixar de prestar o meu reconhecimento.

Á minha orientadora, professora Sandra Carvalho, pela orientação e disponibilidade.

Aos colaboradores do DEM, por toda a ajuda e conhecimento que transmitiram-me ao longo dos últimos meses.

Aos colaboradores do IPN, por fornecer-me o espaço e condições para realizar algumas partes experimentais do trabalho.

Ao grupo da Universidade do Minho por ajudarem-me na análise das amostras e por transmitirem-me o conhecimento que precisava.

Aos meus pais e irmã, por toda ajuda e motivação ao longo de todo o meu percurso.

Á minha avó, por ser o meu grande modelo e inspiração todos os dias.

Ao João, por toda a paciência nos últimos tempos e por todo o apoio e carinho diário.

Aos meus amigos por todos os bons e maus momentos que partilhamos juntos e ultrapassamos.

A todos, um grande obrigada.



## Resumo

Os implantes estão sujeitos à entrada de microorganismos que podem originar infecções, que podem culminar na doença peri-implantar.

Com o intuito de minimizar a lenta osteointegração e a doença peri-implantar, esta dissertação baseia-se na deposição de nanopartículas de prata numa superfície bioativa de tântalo com os elementos de cálcio e fósforo incorporados.

Nesta tese, as nanopartículas de óxido de tântalo serão obtidas a partir da técnica de oxidação por plasma eletrolítico a partir de chapas de Ta, com o intuito de obter uma morfologia semelhante ao osso. Nesta técnica, incorporou-se o cálcio e o fósforo com o intuito de facilitar a osteointegração.

As nanopartículas de prata (NP's Ag) serão pulverizadas na superfície porosa a partir da técnica pulverização catódica por magnetron com o objetivo de obter nanopartículas com diversos tamanhos. Desenhou-se quatro aproximações com diferentes deposições, onde introduziu-se uma fina camada de carbono para analisar o impacto na libertação de iões de prata e as suas vantagens.

Analisou-se as amostras através de técnicas de caracterização física e química com o objetivo de avaliar a morfologia, topografia, composição elementar e estrutura cristalina da superfície nano estruturada de Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> com nanopartículas de prata.

Após a aplicação de diversas técnicas de caracterização, concluiu-se que os rearranjos sugeridos permitem que ocorra uma libertação de teor de Ag controlado, num longo período de tempo, no entanto, as amostras não apresentaram atividade antimicrobiana suficiente para empregar a função pretendida.

**Palavras-chave:** [Implantes Dentários], [Nanopartículas de prata], [Tântalo], [Atividade Antimicrobiana]



## Abstract

Implants are subject to the entry of microorganisms that may lead to infections, which may culminate in peri-implant disease.

In order to minimize slow osseointegration and peri-implant disease, this dissertation is based on the deposition of silver nanoparticles on a bioactive tantalum surface with incorporated calcium and phosphorus elements.

In this thesis, the tantalum oxide nanoparticles will be obtained from the electrolytic plasma oxidation technique from Ta sheets, in order to obtain a morphology similar to bone. In this technique, calcium and phosphorus were incorporated in order to facilitate osseointegration.

The silver nanoparticles (NP's Ag) will be sprayed on the porous surface from the magnetron sputtering technique in order to obtain nanoparticles with various sizes. Four approaches with different depositions were designed, where a thin carbon layer was introduced to analyze the impact on silver ion release and its advantages.

The samples were analyzed by physical and chemical characterization techniques in order to evaluate the morphology, topography, elemental composition and crystal structure of the Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nano structured surface with silver nano particles.

After the application of several characterization techniques, it was concluded that the suggested rearrangements allow a controlled Ag content release to occur over a long period of time, however, the samples did not show sufficient antimicrobial activity to employ the intended function.

**Keywords** [Dental implant], [Silver nanoparticules], [Tantalum], [Antimicrobial activity].



## Índice

[Índice de Figuras].....	ix
[Índice de Tabelas] .....	xii
[Simbologia] e [Siglas].....	xiv
[Simbologia] .....	xiv
[Siglas].....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Motivação e Objetivos.....	2
2. Estado de arte.....	3
2.1. Dente.....	3
2.2. Implantes Dentários.....	4
2.3. Falhas dos implantes dentários.....	5
2.4. Materiais utilizados nos implantes dentários.....	5
2.4.1. Tântalo.....	7
2.5. Modificação de superfícies.....	8
2.6. Superfície nano estruturada bioativa.....	9
2.6.1. Mecanismo antimicrobiano da prata.....	9
3. Nano estruturação do Tântalo.....	13
3.1. Anodização.....	13
.....	13
3.2. Oxidação por plasma eletrolítico.....	14
4. Desenvolvimento da superfície antimicrobiana.....	17
4.1. Resultados preliminares.....	17
4.2. Pulverização catódica.....	18
5. Técnicas de caracterização.....	21
5.1. Composição Química.....	21
5.2. Morfologia.....	22
5.3. Topografia.....	23
5.4. Estrutura Cristalina.....	24
5.5. Análises Funcionais.....	25
5.5.1. Liberação de íões de prata.....	25
5.5.2. Análise UFC.....	26
6. Apresentação e discussão dos resultados.....	27
6.1. Composição Química.....	27
6.2. Morfologia.....	28
6.3. Topografia.....	30
6.4. Estrutura Cristalina.....	33
6.5. Resultados Funcionais.....	35
6.5.1. Liberação iónica de íões.....	35

6.5.2. Análise UFC .....	36
7. Conclusão .....	41
[REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS] .....	43
[ANEXO A] .....	46
Cálculos para a preparação do eletrólito .....	46
[ANEXO B].....	48
Espectro de raio-X da amostra recozida.....	48



## [ÍNDICE DE FIGURAS]

Figura 1 - Esquema representativo do dente .....	3
Figura 2 - Esquema da prótese dentária.....	4
Figura 3 - Mecanismos propostos de ação antibacteriana de nano partículas de prata: 1— atração eletrostática, 2—produção de radicais livres, 3—modulação de perfis de fosfotirosina de proteínas, envolvidas na progressão do ciclo celular e na síntese de polissacarídeo capsulares, 4—interação com os grupos SH, 5—interação com moléculas contendo fósforo (DNA), adaptado [16] .....	10
Figura 4 - Esquema do set up de anodização.....	13
Figura 5 - Esquema do mecanismo de formação de poros por anodização, adaptado [1]...	14
Figura 6 - Célula eletroquímica .....	16
Figura 7 - Imagens obtidas pela deposição grelhas TEM, a) teor de 2 nm de prata e b) teor de 15 nm de prata .....	18
Figura 8 - Aproximação das amostras, a) Ta_CaP, b) Ta_CaP_Ag, c) Ta_CaP_Ag_C, d) Ta_CaP_(Ag_C)x3 e e) Ta_CaP_AgC.....	19
Figura 9 -Esquema da técnica ERX.....	22
Figura 10 - Representação esquemática da técnica MEV .....	23
Figura 11 - Esquema de funcionamento da técnica MFA. Adaptado [11] .....	24
Figura 12 - Esquema da válvula de produção.....	25
Figura 13 -Imagens MEV das amostras Ta_CaP e Ta_CaP_Ag.....	28
Figura 14 -Imagens MEV das amostras Ta_CaP_AgC e Ta_CaP_(Ag_C)x3 e Ta_CaP_AgC.....	29
Figura 15 - Imagens MFA das amostras Ta e Ta_CaP e Ta_CaP_Ag .....	31
Figura 16 - Imagens MFA das amostras Ta_CaP_Ag_C, Ta_CaP_(Ag_C)x3 e Ta_CaP_AgC.....	32
Figura 17 - Difractograma DRX das amostras .....	34
Figura 18 - Gráfico da concentração Vs. tempo das amostras em estudo .....	36
Figura 19- Representação da inibição com o fungo C. Albicans das amostras Ta e Ta_CaP .....	37
Figura 20 – Representação da inibição com o fungo C.Albicans das amostras Ta_CaP_Ag, Ta_CaP_Ag .....	38
Figura 21 – Representação da inibição com o fungo C. Albicans das amostras Ta_CaP_(Ag_C)x3 e Ta_CaP_AgC.....	39

Figura 22- Gráfico de barras do número de colónias por mL com a introdução do fundo C.Albicans .....	40
Figura 23 - Espectro Raio-X da amostra recozida .....	48



## [ÍNDICE DE TABELAS]

Tabela 1 - Condições genéricas de deposições das nano partículas.....	19
Tabela 2 – Condições de deposição das amostras.....	20
Tabela 3 -Valores da composição química dos elementos presentes na amostra (% at).....	27
Tabela 4 - Valores da rugosidade das amostras .....	32
Tabela 5 - Molalidade e massa molar dos reagentes .....	46



## **[SIMBOLOGIA] E [SIGLAS]**

### **[Simbologia]**

Ag – Prata

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Óxido de Alumínio

ZrO<sub>2</sub> – Zircónia

TiO<sub>2</sub> - Dióxido de titânio

Ti – Titânio

Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – Pentóxido de tântalo

Ta – Tântalo

CCC – Cúbica de corpo centrado

Ca – Cálcio

P -Fósforo

Cu – Cobre

Zn – Zinco

O – Oxigénio

F – Fluor

HAp – Hidroxiapatite

Sa – rugosidade média

Sq – rugosidade quadrática média

HNO<sub>3</sub> – ácido nítrico

### **[Siglas]**

DNA – Ácido desoxirribonucleico

PEO – Oxidação por plasma eletrolítico

MEV – Microscópia eletrónica de varrimento

ES – Eletrões Secundários

ER – Eletrões retro-difundidos

NP's – Nanopartículas

MFA – Microscopia de força atómica

EDS – Dispersão eletrónica de Raio-X

DRX – Difração de Raio-X

ICDD - Centro Internacional de Dados de Difração

ICP-OES - Espectroscopia De Emissão Óptica De Plasma Acoplado

Indutivamente

UFC - Unidade formadora de colónias





## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, verificou-se um aumento no interesse e no estudo de novos métodos de diagnóstico e procedimentos cirúrgicos. Em específico, na área de odontologia tem-se efetuado diversos estudos para a substituição de dentes por implantes.

No entanto, surgem algumas preocupações associadas ao tipo de materiais utilizados para estes implantes dentários, pois ocorrem diversas falhas e complicações que por vezes obrigam à sua remoção [1].

A lenta osteointegração e a doença peri-implantar são exemplos de falhas na odontologia e por isso, têm-se estudado novos materiais bioativos e técnicas para promover a osteointegração e melhorar a atividade antimicrobiana do implante.

Atualmente, o Titânio (Ti) é o metal mais utilizado para implantes dentários. Embora apresente uma baixa bioatividade e uma lenta osteointegração o que aumenta os riscos, como a entrada de microrganismos o que progredi para o aparecimento de infeções.

O Tântalo (Ta) e os seus óxidos desempenham um papel importante na interface entre o osso e o implante. Estes materiais apresentam boas características, destacando-se a bioatividade *in vivo* e uma elevada energia superficial que favorece o crescimento ósseo e a mineralização óssea. A bioatividade pode ser controlada a partir da composição química da superfície, pois delimita o tipo de iões absorvidos na área do implante dentário [2].

Comercialmente, as estruturas porosas estão associadas a uma forte osteointegração, o que ajuda na fixação entre o implante dentário e o osso [3].

Nos últimos tempos, as micro/nano porosidades têm algum enfâse na investigação. As respostas celulares, em conjunto com as micro/nano estruturas e devido à biomimetização do tecido ósseo, apresentam uma melhor interação superfície-proteína.

A modificação da topografia da superfície do implante à escala micro e nanométrica reverte numa maior interação entre a superfície e as proteínas, os iões, as biomoléculas e as células, permitindo a adesão e a diferenciação osteoblástica, acelerando a osteointegração, fundamental no crescimento do osso [1].

Neste projeto, com o objetivo de diminuir o insucesso dos implantes, serão depositadas nanopartículas antimicrobianas de prata (Ag) nas superfícies bioativas por pulverização catódica de magnetrão em corrente contínua [4].

## **1.1. Motivação e Objetivos**

Neste trabalho, o objetivo principal consiste no desenvolvimento de uma nova superfície, capaz de diminuir as falhas dos materiais, aplicados na construção dos implantes dentários relativamente à lenta osteointegração e a doença peri implantar.

Deste modo, irá incorporar-se nanopartículas de prata em superfície de óxido de tântalo com o intuito de aumentar as propriedades antibacterianas do implante. Este tratamento irá promover a capacidade de osteointegrar a partir da modificação química e morfológica da superfície do tântalo e prevenir o risco de infecção, que leva ao desenvolvimento da doença peri implantar.

Estes objetivos, provêm de estudos efetuados relativos à biocompatibilidade do tântalo, das vantagens das suas propriedades associadas aos implantes dentários e ainda dos estudos efetuados no âmbito das propriedades antibacterianas de prata.

Em suma, os principais objetivos da dissertação consistem em relacionar as propriedades bioativas do substrato nano poroso de tântalo, com as propriedades antibacterianas das nanopartículas de prata e ainda, a libertação controlada de nanopartículas de prata com introdução do carbono e diferentes rearranjos.

## 2. ESTADO DE ARTE

### 2.1. Dente

Os dentes são importantes estruturas com a funcionalidade de mastigar e triturar os alimentos e por isso estão integrados no sistema gastrointestinal, localizados no maxilar inferior e superior. Estes também têm uma elevada importância na fonética e estética do indivíduo.

A constituição do dente é dividida em duas partes, a coroa (parte externa, visível a “olho nu”) e a raiz (parte interna) [1].

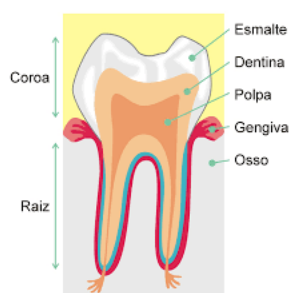


Figura 1 - Esquema representativo do dente

Na coroa, o revestimento da dentina é constituído pelo esmalte, sendo a substância nomeada de alguma importância no organismo, a raiz é revestida pelo ligamento periodontal exercendo a função do ligamento da dentina ao osso.

Como indicado anteriormente, o dente exerce a função de mastigar os alimentos, realizando vários ciclos de mastigação o que leva a um desgaste do material dentário e por isso, surge o bruxismo (ranger dos dentes).

A perda precoce de dentes surge por fatores internos e externos, assim como a má higiene oral e cáries e por isso, ao longo dos tempos têm-se desenvolvido novas próteses dentárias [4].

## 2.2. Implantes Dentários

Os implantes dentários são dispositivos introduzidos no osso maxilar, através de uma cirurgia que substituem os dentes. Estes dispositivos, ao estarem em contacto direto com osso, promovem a osteointegração. Os implantes são compostos por três componentes principais, o parafuso cilíndrico denominado de implante, o pilar que liga o implante à prótese dentária e a coroa que é feita à medida de cada paciente [5].



Figura 2 - Esquema da prótese dentária

Error! Reference source not found.

Um implante ideal deve apresentar os seguintes requisitos:

- I. Biocompatibilidade – boa interação entre o material e o tecido hospedeiro.
- II. Resistência mecânica – o implante necessita de apresentar propriedades mecânicas capazes de suportar as funções do dente.
- III. Resistência à corrosão – a boca é considerada um ambiente altamente agressivo e por isso, os componentes do implante necessitam de apresentar uma boa resistência à corrosão pois não podem libertar partículas nocivas para o organismo.
- IV. Resistência à esterilização – o implante necessita de ser esterilizado para que se possa aplicar no organismo. Desta forma é crucial que o biomaterial não se degrade com a esterilização.

### **2.3. Falhas dos implantes dentários**

Os implantes dentários são inseridos diariamente nos pacientes, embora a longo prazo apresente algumas complicações [6]

A osteointegração consiste na união do osso com a superfície do implante, onde ocorre a migração das células ósseas para a superfície do metal.

A lenta osteointegração leva a uma cicatrização longa, conseqüentemente ocorre num período de tempo mais longo onde poderá ocorrer movimentações e acaba por levar a um implante sem sucesso [7].

A infecção bacteriana é uma condição patológica e infecciosa, que abrange os implantes dentários e tem como consequência a perda progressiva do tecido ósseo de suporte. A infecção inicia-se por um biofilme bacteriano que progride para a inflamação dos tecidos moles e a perda do osso. Caso a doença peri-implantar não seja detetada a tempo e tratada, poderá levar à rejeição do implante [6].

### **2.4. Materiais utilizados nos implantes dentários**

Atualmente, há uma vasta gama de materiais para implantes dentários, assim como, a zircônica ou o titânio. Os materiais bioativos apresentam várias características interessantes para este trabalho. A interação com as células do tecido hospedeiro é uma particularidade e permite adquirir a resposta adequada, assim como a presença de reações químicas específicas.

O biomaterial exerce funções, como o auxílio na formação do osso, a possibilidade da interconectividade de poros e ainda apresenta propriedades mecânicas semelhantes aos tecidos a regenerar. Há três tipos de biomateriais utilizados em implantes dentários, os materiais cerâmicos, os materiais poliméricos e os materiais metálicos.

Os implantes cerâmicos conseguem suportar apenas uma tensão baixa de tração, no entanto, suportam níveis elevados de tensão compressiva. Os cerâmicos podem ser utilizados em implantes dentários, pois apresentam inércia à biodegradação, sendo uma vantagem. A sua baixa ductilidade e a fraca resistência à fratura levam a algumas limitações.

Alguns exemplos destes materiais são o óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), utilizado como um biomaterial standard para implantes cerâmicos pois apresenta uma boa bio estabilidade, assim como a zircônica ( $\text{ZrO}_2$ ) que também apresenta um elevado grau de inércia. Estes tipos de implantes cerâmicos não desenvolvem a formação do osso [8].

Enquanto, os polímeros apresentam propriedades de baixa resistência mecânica, baixo valor do módulo de elasticidade, a quando comparados com outras classes de biomateriais. Os materiais poliméricos são caracterizados como isolantes térmicos, isolantes elétricos e resistentes à biodegradação. No entanto, quando se analisa as propriedades do osso, os polímeros apresentam módulos de elasticidade inferiores, aproximando-se dos valores correspondentes aos tecidos moles [9].

Por fim, os biomateriais metálicos apresentam melhores propriedades mecânicas e por isso os mais utilizados em aplicações de implantes dentários. O aço inoxidável apresenta boas propriedades mecânicas, contudo, tem fraca resistência à corrosão e superfícies inertes.

O titânio é dos materiais mais utilizados, apresenta valores de baixa densidade e elevada resistência à flexão, em comparação com o cobalto e outras ligas metálicas. Uma outra propriedade é a sua elevada resistência à corrosão. O titânio puro tem a facilidade de formar vários óxidos, assim como o  $\text{TiO}_3$ ,  $\text{TiO}_2$  e  $\text{Ti}_2\text{O}_3$  embora o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) seja considerado o mais estável, com boas propriedades de resistência à corrosão e biocompatibilidade. Apesar das semelhanças com o osso, os implantes à base de titânio apresentam falhas, tais como, a falta de bioatividade, o que torna complicado a formação de uma ligação química direta com o osso e por consequência, uma rejeição aquando da fixação óssea.

O Ti, aquando utilizado em aplicações dentárias, têm-se em consideração a molhabilidade e a energia superficial pois são fatores importantes relativamente à adesão e ao crescimento da matriz óssea. Relativamente à superfície, as características químicas associam-se à energia de superfície e à sua carga. Quando há uma elevada energia de superfície, consequentemente há uma maior molhabilidade o que leva a um aumento da afinidade para a adsorção de iões. No caso dos cerâmicos,  $\text{TiO}_2$  e  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ , as interações descritas ocorrem devido às forças eletrostáticas entre os grupos aminoácidos de carga positiva com a superfície dos implantes carregada negativamente, ou entre os grupos

aminoácidos negativos do fluido com os iões, absorvidos anteriormente pela superfície do implante.

Uma alternativa promissora em relação ao Ti, tem sido o tântalo (Ta) pois apresenta uma boa bioatividade e com respostas biológicas positivas.

### **2.4.1. Tântalo**

O tântalo (Ta) é um elemento metálico de transição rara e pertence ao grupo dos metais refratários que tem a sua principal aplicação em componentes de ligas, altamente resistente à corrosão.

A obtenção de Ta é feita a partir da tantalita natural onde inicialmente, com a ação da gravidade, permite a separação dos componentes da mistura com base nas diferenças dos pesos específicos e de seguida ocorre a separação química. Neste processo, ocorre a extração dos óxidos de Ta. Por fim, ocorre a purificação a partir da extração líquida dos fluoretos.

Os fluoretos de Ta são extraídos pelos solventes orgânicos e de seguida precipitados com fluoretos de potássio e de sódio. A criação do pó de Ta dá-se devido ao sódio ser derretido [10].

O tântalo e as ligas correspondentes têm a capacidade de reter as propriedades mecânicas até 1000°C mas sofrem degradação pelo crescimento de cristais a temperaturas mais elevadas.

Com base nos estudos anteriores o Ta é utilizado em aplicações industriais e aeroespaciais onde há uma congregação de elevada temperatura, corrosão e/ou resistência ao desgaste, pois é necessária para algumas aplicações que atingem os 2480°C [11].

Além das propriedades descritas anteriormente, o Ta apresenta uma estrutura cristalina cúbica de corpo centrado (CCC) e por isso, apresenta uma boa resistência mecânica, ductilidade e uma baixa resistência elétrica. A forma que apresenta maior estabilidade, embora não seja a forma que apresenta maior equilíbrio, é a tetragonal e é utilizada em filmes depositados por pulverização. No entanto, o Ta apresenta pontos negativos, tais como, o módulo de Young elevado e por isso, uma elevada rigidez.

O pentóxido de tântalo (Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) é o óxido de equilíbrio termodinâmico e por isso caracterizado como o mais estável dentro dos vários óxidos, apresentando uma estrutura

crystalina ortorrômbica e elevado índice de reflexão. Este elemento é utilizado no processo de difusão, condensadores, aplicações biomédicas, em concreto na área das próteses [1].

## 2.5. Modificação de superfícies

A modificação de superfície pode ajudar na interação entre a superfície e os tecidos adjacentes, o que leva à diminuição das respostas inflamatórias que o recetor manifesta. O tratamento de superfície de implantes permite a alteração topográfica e química da superfície, consequentemente altera a sua energia superficial, com o intuito de promover a proliferação e a diferenciação das células ósseas, acelerando assim a osteointegração [16].

A topografia da superfície tem uma grande importância no sucesso do implante, pois melhora a osteointegração ao longo do tempo e reduz o tempo de cicatrização. Ao longo dos tempos, estudou-se as dimensões dos poros e concluiu-se que as dimensões nanométricas resultam numa maior interação entre proteínas, iões e biomoléculas, o que permite uma proliferação de osteoblastos.

A topografia da superfície e as propriedades químicas podem ser manipuladas através de processos como a anodização e a oxidação por plasma eletrolítico. A oxidação por plasma eletrolítico promove o desenvolvimento de uma camada com uma topografia porosa.

Este processo eletroquímico pode ser alterado a partir de uma solução composta por elementos bioativos, o cálcio (Ca) e fósforo (P), o que permite mimetizar quimicamente o osso. Assim, obtêm-se uma composição semelhante à hidroxiapatite, mineral presente na composição óssea.[12] .

A adesão bacteriana ao implante têm-se revelado um problema nos implantes dentários. Com o objetivo de solucionar, desenvolveu-se superfícies bacterianas capazes de reduzir a colonização bacteriana e consequente inibição de formação de biofilme. As nanopartículas Ag, Cu e Zn e os seus óxidos, ajudam a prevenir a adesão bacteriana inicial [12].



## 2.6. Superfície nano-estruturada bioativa

As nanopartículas têm diversas características relevantes, assim como a sua composição e a morfologia. A classificação é feita de acordo com o tamanho de diâmetro, sendo que este varia de 1 nanômetro a 100 nanômetros. Este diâmetro poderá corresponder a moléculas individuais ou aglomerados de nanopartículas[13].

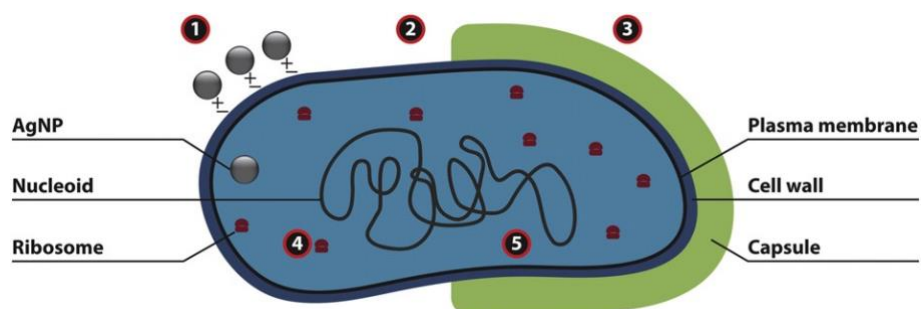
Tendo em conta que o tamanho das NP's permite distinguir as interações biológicas com os materiais não nano-estruturados devido à sua relação de superfície e volume, é possível criar nano-estruturas com a possibilidade de detetar várias patologias[14].

Estudou-se a relação dos metais em formato de nanopartículas, especificamente as propriedades antimicrobianas da prata, incorporando em diversos substratos de teste. No entanto, concluiu-se que o tamanho das nanopartículas está inversamente proporcional com a atividade antimicrobiana, isto é, as partículas com um tamanho a variar entre 1 nanômetro e 10 nanômetros demonstraram maior eficácia para combater as bactérias. As nanopartículas de prata, em concreto, os iões de  $Ag^+$  presentes na superfície exercem função de um agente antibacteriano [15]

### 2.6.1. Mecanismo antimicrobiano da prata

A atividade antibacteriana é definida como a capacidade de destruição e supressão do crescimento ou da reprodução bacteriana. Há diversos mecanismos antimicrobianos associados às nanopartículas de prata. Estes mecanismos podem ser, a libertação de  $Ag^+$  que reage com o grupo de proteínas e intervêm na replicação do DNA, um outro mecanismo é a formação de radicais livres que prejudicam a membrana bacteriana e por fim, o contacto físico direto entre nanopartículas e células bacterianas que levam a danos estruturais à parede[16]

Na figura seguinte está esquematizado os mecanismos da ação antibacteriana das nanopartículas de prata.



**Figura 3 - Mecanismos propostos de ação antibacteriana de nanopartículas de prata: 1—atração eletrostática, 2—produção de radicais livres, 3—modulação de perfis de fosfotirosina de proteínas, envolvidas na progressão do ciclo celular e na síntese de polissacarídeo capsulares, 4—interação com os grupos SH, 5—interação com moléculas contendo fósforo (DNA), adaptado [16]**

As nanopartículas de prata têm elevadas relações de superfície/volume com várias características morfológicas, o que permite que penetrem facilmente na membrana da célula bacteriana e exerçam funções como catalisadores, para destruir a célula bacteriana [17]

Nesta perspectiva, *Agostinho et al.* [5], [9] desenvolveu superfícies porosas de Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> com Ca e P incorporados e nanopartículas de Ag, depositadas, a fim de estudar o efeito destas NP's na atividade antimicrobiana das superfícies desenvolvidas. Assim, incorporou prata com espessura de 1 nm e 2 nm e ambas foram encapsuladas com uma camada fina de carbono. Com o seu estudo, verificou-se por SEM que as amostras cobertas com Ag confirmam a presença de nanopartículas.

Aquando da adição de uma fina camada de carbono resultou na mesma morfologia e com semelhanças relativas ao osso, no entanto foram cobertas com tamanho de nanopartículas superiores e mais espaçadas aquando comparadas com as primeiras amostras (espessura de 1 e 2 nm de Ag).

*Agostinho et al.* [9] concluiu que esta alteração no tamanho e na distribuição das NP's pode ser associada à baixa afinidade entre as partículas de carbono e prata.

Aquando da análise da libertação de iões de prata, *Agostinho et al.* [9], concluiu que as amostras estudadas, mostraram taxas de ionização mais elevadas quando as NP's de prata estavam cobertas com uma camada de carbono, uma vez que a prata e o carbono formam um par nano-galvânico que promove a corrosão galvânica de prata. As amostras que

continham carbono, quando analisadas, não estabilizaram e continuaram a libertar iões de prata. No entanto, os valores mostram que há uma libertação mínima de prata das amostras o que não é suficiente para apresentar atividade antimicrobiana.

Assim, com base neste estudo, será necessário aumentar a deposição de nanopartículas de prata e adicionar várias camadas de carbono com diferentes espessuras para promover um controlo da cinética de libertação de iões de prata.



### 3. NANO ESTRUTURAÇÃO DO TÂNTALO

#### 3.1. Anodização

A anodização é uma técnica que permite o fabrico de camadas de óxido estáveis. Este processo baseia-se nas reações químicas que ocorrem em simultâneo com a oxidação de metais e a redução no cátodo, o que origina um campo elétrico na interface metal/eletrólito. Esta técnica permite fabricar nano características com diversas morfologias e tamanhos [18]. O set up utilizado para aplicação da técnica de anodização está exemplificado na figura 4.

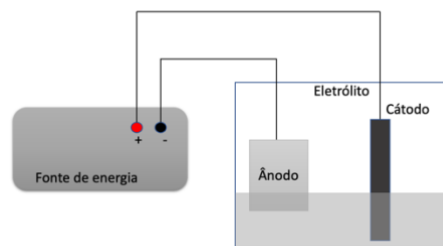


Figura 4 - Esquema do set up de anodização

O processo de formação de poros a partir da anodização confere dois mecanismos principais: a dissolução assistida por campo elétrico e o processo de breakdown.

O primeiro mecanismo baseia-se na competição entre o crescimento do óxido anódico e a dissolução deste. Isto é, ocorre um crescimento de uma camada compacta de óxido na superfície do metal. A camada de óxido resultante é controlada pelo campo elétrico aplicado no sistema. O campo elétrico tem como função, ajudar os iões de fluor ( $F^-$ ) a dissolver o óxido, resultando a formação de poros em zonas específicas [19].

No entanto, este mecanismo divide-se em 3 fases. Na fase inicial (fase a) ocorre a formação de uma camada compacta de óxido metálico sobre a superfície do metal. Na fase seguinte (fase b), surge pequenos poros irregulares (“pits”) pois ocorre dissolução localizada do óxido. Por fim, na última fase (fase c), o campo elétrico é intensificado nos poros o que leva a uma maior dissolução do óxido e por isso, forma-se nano poros [19]. O esquema das 3 fases está representado na figura 5.

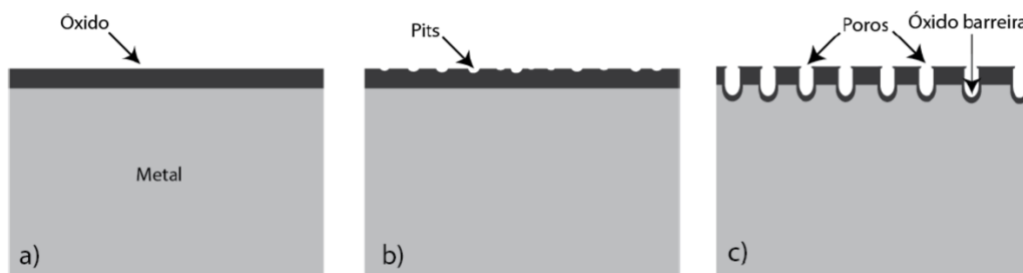


Figura 5 - Esquema do mecanismo de formação de poros por anodização, adaptado [1].

O segundo mecanismo de formação de poros tem como base a anodização e designa-se de oxidação por plasma eletrolítico (do inglês plasma electrolytic oxidation, PEO), com um potencial acima limite de colapso do óxido (dielectric breakdown). A camada anodizada começa a colapsar devido ao potencial limite do campo elétrico ser suficientemente elevado e por isso, tem a capacidade de romper o óxido. Os primeiros poros formados são ocupados pelo eletrólito e por isso, ocorre a passagem de corrente no interior dos mesmo o que leva à rutura do dielétrico [1].

### 3.2. Oxidação por plasma eletrolítico

Os biomateriais com a aplicação final de implantes dentários necessitam de apresentar as funções do tecido ausente. Tendo em conta que as principais características da superfície, assim como a topografia, rugosidade e a composição química, influenciam na adesão celular.

Neste trabalho, o tântalo foi o biomaterial selecionado pois apresenta boa resistência ao ataque químico. Apesar das suas vantagens, o tântalo não é bioativo, no entanto, a energia superficial promove a adesão celular. Em solução e com o objetivo de estimular a adesão e proliferação, utilizou-se a técnica de oxidação por plasma eletrolítico para formar óxidos porosos na superfície do substrato e incorporar elementos bioativos como o cálcio (Ca) e o fósforo (P) com o objetivo final de facilitar o processo de osteointegração [20].

A chapa de tântalo altamente pura (Ta Sheet T1-9000-D70, 99,95% de pureza, Testbourn Ltd) foi cortada em placas das dimensões de  $3 \times 1 \times 0,5 \text{ mm}^3$ .

De seguida, conforme os resultados de *Fialho et al* [4] com o objetivo de obter uma relação de Ca/P adequada, preparou-se o eletrólito com um volume total de 150 mL e adicionou-se 0,0525 mol de acetato de cálcio e 0,018 mol de sal dissódico de ácido  $\beta$ -glicerofosfato penta-hidratado, as contas estão indicadas no anexo 1 e preencheu-se o volume restante com água destilada.

Antes de aplicar a técnica, a amostra é limpa com o auxílio da máquina de ultrassom em etanol por 5 minutos e de seguida, por 5 minutos em água destilada. O processo de limpeza por ultrassom tem como objetivo, evitar a presença de impurezas na amostra. Cada placa de Ta limpa é colocada na célula eletroquímica onde também é colocado o cátodo (grafite) a 30 mm de distância da amostra e um agitador com o objetivo de misturar o eletrólito, para aumentar a interação iônica entre a amostra e o eletrólito.

De seguida, os componentes são colocados e cobertos com 50 mL de eletrólito dentro da célula eletroquímica para cobrir uma área de  $1 \times 1,2 \text{ mm}^2$  de substrato.

Segundo trabalhos efetuados anteriormente, indicam que, para alcançar uma camada porosa de óxido de tântalo através da técnica PEO, é necessária uma tensão potencioestática de 200V, aplicada no período de 30 minutos com uma corrente elétrica de 3 A, à temperatura ambiente [4].

Com o objetivo de reproduzir os mesmos parâmetros experimentais, utilizou-se uma fonte de alimentação EA-EL 9000 B.



**Figura 6 - Célula eletroquímica**



## **4. DESENVOLVIMENTO DA SUPERFÍCIE ANTIMICROBIANA**

### **4.1. Resultados preliminares**

A alteração do tamanho e a distribuição das nanopartículas pode ser responsável pela afinidade entre as partículas de carbono e de prata. Além disso, as nanopartículas de prata possuem alta afinidade umas com as outras. Estas duas características promovem a mobilidade das nanopartículas de prata que leva a agregação e aumento de tamanho.

Com o intuito de comprovar esta hipótese, depositou-se nanopartículas de prata com uma espessura de 2 nm e outras com uma espessura de 15 nm sobre grelhas TEM.

Ao analisar as imagens obtidas, verificou-se que na deposição com um teor de 2 nm é possível identificar nanopartículas enquanto que, na deposição de 15 nm assemelha-se a deposição de um filme, o que leva à diminuição da área superficial e por isso há uma menor possibilidade de ser ionizada. A figura 7 demonstra as conclusões obtidas.

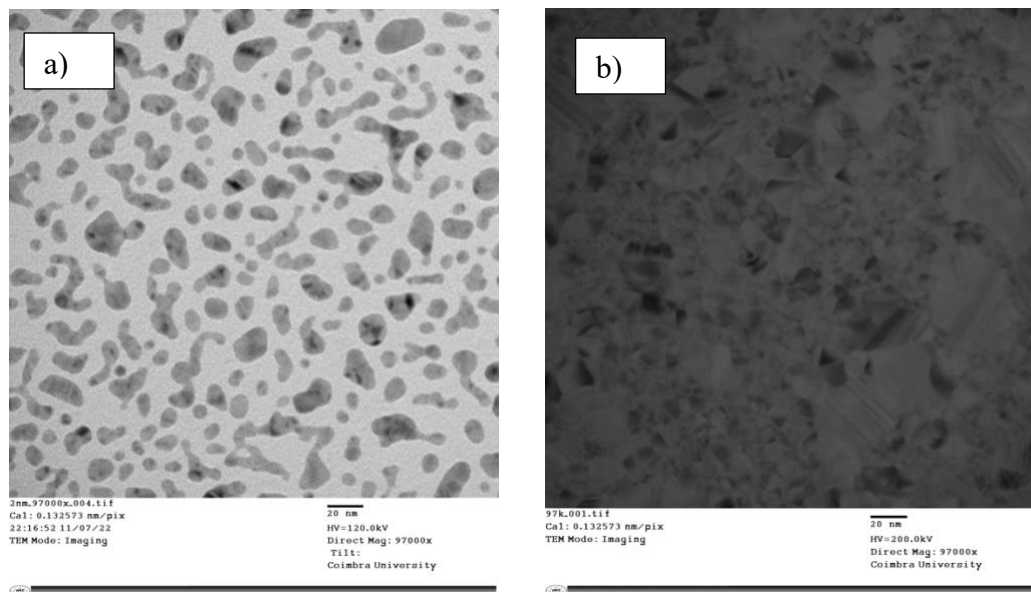


Figura 7 - Imagens obtidas pela deposição grelhas TEM, a) teor de 2 nm de prata e b) teor de 15 nm de prata

## 4.2. Pulverização catódica

A pulverização catódica por magnetron (do inglês *magnetron sputtering*) é uma técnica que permite a deposição de uma ampla gama de revestimentos industrialmente importantes [21].

A aplicação desta técnica consiste em depositar Np's com o objetivo de melhorar a atividade antimicrobiana.

De forma sucinta, a técnica consiste na aplicação de um campo magnético, perpendicular ao campo elétrico e paralelamente ao alvo. O campo magnético exerce a função de limitar a localização do plasma pois os eletrões percorrem trajetórias helicoidais o que aumenta a probabilidade de ionização [1].

Na figura seguinte está representado a cinco aproximações da anodização e das deposições de prata e do carbono.

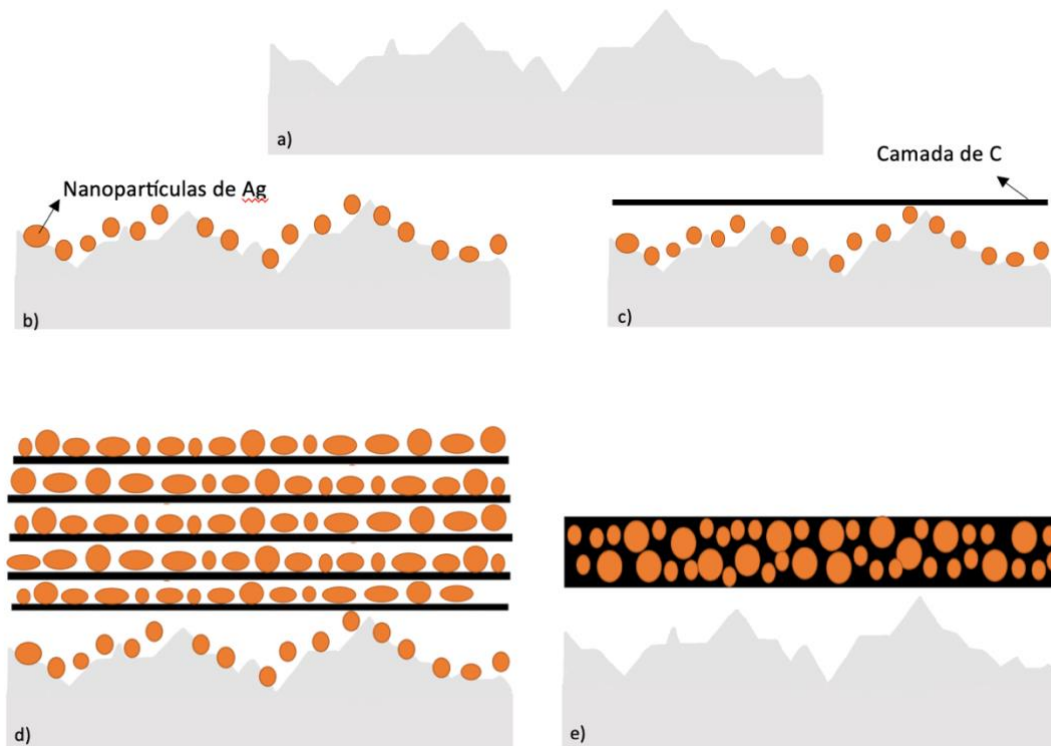


Figura 8 - Aproximação das amostras, a) Ta\_CaP, b) Ta\_CaP\_Ag, c) Ta\_CaP\_Ag\_C, d) Ta\_CaP\_(Ag\_C)x3 e e) Ta\_CaP\_AgC

A deposição de nanopartículas cumpriu diversos parâmetros genéricos como exemplificados na tabela 1

Tabela 1 - Condições genéricas de deposições das nanopartículas

Condições deposição
Pressão base abaixo de $5 \times 10^{-6}$ mBar
30 sccm de Ar
Velocidade de rotação do porta substratos de 23 rpm

Conforme desenhado na figura 8 os quatro tipos de arranjos exigiram condições diferentes.

A primeira aproximação é o meu substrato considerado de grupo de controle, TaCaP, consiste apenas na chapa de tântalo anodizada.

Na segunda aproximação, Ta\_CaP\_Ag, onde consiste em apenas depositar nanopartículas de prata, monocamada de 15 nm de Ag.

Na terceira aproximação, Ta\_CaP\_Ag\_C, onde é depositado uma camada de Ag e de segunda uma camada de C, depositou-se nanopartículas de Ag com 15 nm .

Na quarta aproximação, Ta\_CaP\_(Ag\_C)x3 , onde ocorre a deposição de 5 camadas alternadas de 3 nm de Ag,e de 17 nm de C .

Por fim, a quinta aproximação, Ta\_CaP\_AgC, consiste na co-deposição de Ag/C e por isso, depositou-se simultaneamente Ag e C.

Na tabela seguinte está descrito as condições de deposição.

**Tabela 2 – Condições de deposição das amostras.**

Amostra	Potência (W)	Corrente (V)	Intensidade (Å)	Tempo de deposição (min)
Ta_CaP_Ag	100	425	0,23	1,16
Ta_CaP_Ag_C	1200	790	1,5	3,5
Ta_CaP_(Ag_C)x3	1200	790	1,5	Ag - 0,25
				C - 1,02
Ta_CaP_AgC	Ag -25	Ag - 315	Ag - 0,08	
	C - 1200	C - 790	C - 1,4	

## 5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Neste capítulo está descrito as técnicas que foram utilizadas para caracterizar as amostras. Analisou-se as amostras através de técnicas de caracterização física e química com o objetivo de avaliar a morfologia, topografia, composição elementar e estrutura cristalina da superfície nano estruturada de Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> com nanopartículas de prata.

### 5.1. Composição Química

A composição química foi analisada nas amostras através da técnica de Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raios-X (ERX) que permite identificar a percentagem atômica de cada elemento químico num volume de amostra. A área analisada da amostra em ERX é selecionada a partir da técnica MEV.

Esta técnica consiste na detecção do raio-X reproduzidos pelos eletrões primários. Isto é, o feixe de eletrões incide na superfície da amostra, ocorre uma interação de ambas as partes e ocorre a emissão de eletrões/fotões que permite a impetração da composição química da superfície em análise. A técnica ERX permite identificar todos os elementos da tabela periódica com número atômico superior a 4, no entanto, esta técnica não apresente muita precisão[22]. O equipamento utilizado para efetuar esta técnica foi Zeiss Merlin Gemini 2 equipment.

Na figura 9 está representado o esquema da técnica ERX.

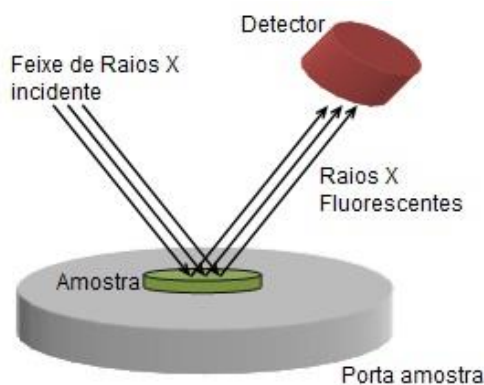


Figura 9 -Esquema da técnica ERX

## 5.2. Morfologia

A caracterização morfológica das amostras foi executada com o auxílio da técnica de microscopia eletrônica de varrimento (MEV) permite a observação das características superficiais dos materiais, como a forma e o tamanho [23].

Esta técnica consiste na incidência de um feixe eletrões de alta energia num ponto da superfície da amostra em estudo e de seguida, a recolha dos sinais eletrónicos emitidos pelo material-alvo. A interação do feixe eletrónico com a amostra deriva uma emissão de diversas radiações e eletrões. A interação do feixe eletrónico com a amostra reverte na emissão de diversos tipos de radiação e eletrões, assim como eletrões secundários (ES) e eletrões retrodifundidos (ER).

Os eletrões secundários são utilizados na formulação da imagem da amostra e sofrem excitação, enquanto os eletrões retrodifundidos permitem diferenciar regiões de átomos leves e pesados.

Quando os eletrões varrem a superfície da amostra, acabam por diminuir a velocidade e são absorvidos pelo detetor de eletrões. Após esta etapa, os eletrões desenvolvem uma imagem ampliada da superfície que foi varrida anteriormente, ilustrando a morfologia da superfície.

Normalmente, a informação recolhida descreve apenas uma área selecionada da superfície da amostra e assim, uma imagem bidimensional podendo assim observar variações espaciais nas propriedades [24].

A análise das amostras em estudo foi realizada num microscópio eletrónico de varrimento por eletrões secundários a uma distância de trabalho de 5 mm com o auxílio do equipamento Zeiss Merlin Gemini 2 equipment.

Na figura seguinte está descrito o esquema da técnica de MEV.

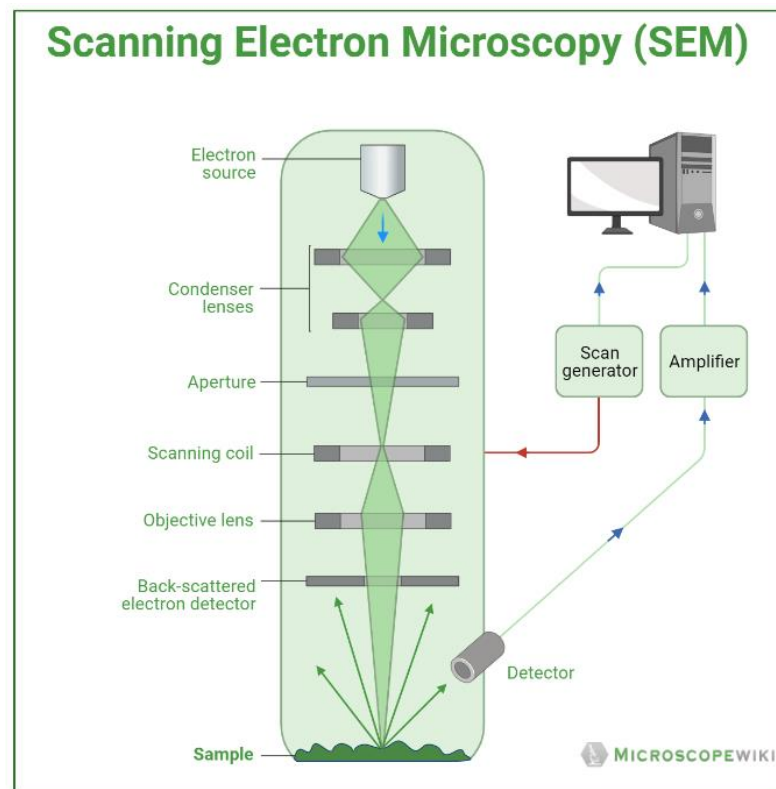


Figura 10 - Representação esquemática da técnica MEV

### 5.3. Topografia

A caracterização topográfica das amostras foi executada com o auxílio da técnica de microscopia de força atômica (MFA) pois permite obter uma imagem topográfica com resolução atômica e permite identificar algumas propriedades mecânicas e físico-químicas dos materiais.

O procedimento da técnica MFA consiste no varrimento da superfície em análise a partir de uma ponta fina com dimensões de raio de 5 a 10 nm. Esta técnica pode operar de três modos, contacto, toque ou não-contacto. Neste estudo, utilizou-se o modo contacto que consiste em gerar uma imagem a partir das forças de repulsão entre a ponta e a amostra. A ponte tem como função varrer toda a amostra formando uma imagem topográfica da mesma.

Nesta tese, a topografia e a rugosidade da superfície foram avaliadas por microscopia de força atômica (AFM) (Bruker di Innova) com um cantilever Si condutor no modo de batida, a sonda RTESP-300 de Bruker, (8nm de raio de curvatura).

A figura 11 mostra o princípio de funcionamento.

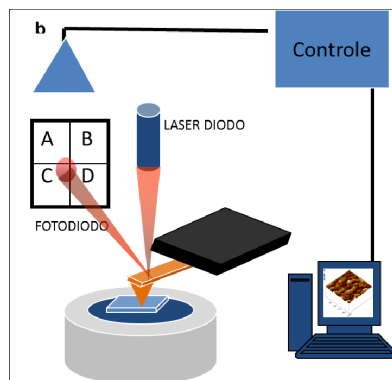


Figura 11 - Esquema de funcionamento da técnica MFA. Adaptado [11]

## 5.4. Estrutura Cristalina

A estrutura cristalina da amostra é analisada a partir da técnica de difração de raio-X (DRX). Esta técnica é utilizada numa ampla gama de materiais, desde pós e sólidos até filmes finos e nano materiais, sendo ainda definida como não destrutiva.

A figura 12 mostra o esquema de uma válvula para produção de raio-X. O filamento é aquecido a partir de uma corrente emissora de elétrons acelerados por uma diferença de potencial de 20 a 30 kV entre o filamento (cátodo) e um eletrodo de cobre (ânodo). Quando o ânodo é atingido, os elétrons travados bruscamente e emitem radiação e o espectro de raio-X é então produzido. Os picos de difração de raio-X são desenvolvidos por interferência construtiva de um feixe monocromático de raio-X difratados em ângulos específicos de cada conjunto de planos de rede da amostra.



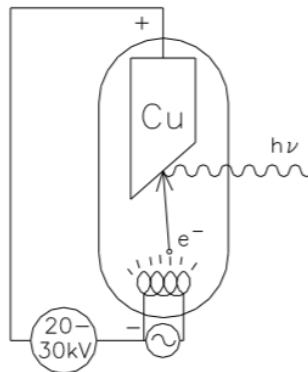


Figura 12 - Esquema da válvula de produção

A identificação de fase é essencialmente um exercício de comparação de padrões, ou seja, os padrões não identificados são comparados com padrões de referência de uma fase única conhecida, que estão recolhidos numa base de dados especializada.

A análise dos resultados obtidos foi realizada a partir dos Arquivos de Difração ICDD onde utilizou-se a ficha  $\alpha$ -Ta (ICDD no 00-004-0788) correspondente ao substrato Ta.

## 5.5. Análises Funcionais

### 5.5.1. Libertação de iões de prata

Um dos objetivos principais deste trabalho é combater a doença peri implantar, ou seja, aumentar a capacidade antibacteriana do implante. A solução atribuída foi a adição de nanopartículas de prata nos substratos de óxido de tântalo nano estruturados, responsáveis pela libertação de iões de prata. A técnica ICP-OES (espectrometria de emissão ótica de plasma indutivamente acoplado) permite analisar a libertação de iões de prata.

O procedimento da técnica ICP-OES consiste na introdução de uma amostra líquida num nebulizador que tem como função, a transformação da amostra líquida em gotículas com um tamanho inferior. As gotículas resultantes são posteriormente pulverizadas com um plasma que irá excitar os eletrões da amostra com o objetivo de quando voltarem ao seu estado fundamental, emitirem fótons específicos e característicos do elemento.

Neste procedimento, a amostra controle foi apenas as amostras que sofreram a técnica PEO, as amostras com nanopartículas foram analisadas.

Ao iniciar a análise, as amostras são colocadas num recipiente com uma capacidade de 50mL de tampão fosfato salino (PBS). De seguida, remove-se 2 mL da solução em diferentes intervalos de tempo: 2h, 24h, 48h, 7 dias, 14 dias e 1 mês. Aquando é retirado os 2 mL das amostras, estes são diluídos em 4 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub> (2%)), com o fator de dissolução de 3x. Após esta etapa, a amostra é analisada a partir da técnica ICP pelo modelo de espectrómetro ICP PerkinElmer Optima 8000. Efetuou-se uma reta de calibração do ião a detetar.

### **5.5.2. Análise UFC**

A análise dos resultados funcionais realizou-se ainda a partir da unidade formadora de colónias (UFC) que consiste numa técnica com o objetivo de estimar o número de bactérias viáveis. A contagem de colónias é realizada numa placa de Petri com ágar.

A aplicação da técnica UFC nas amostras foi feita a partir da colocação das amostras em placas de Petri e adicionou-se ágar e inoculou-se os microrganismos. Utilizou-se a cultura do fungo *Candida Albicans* (SC5314).

## 6. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 6.1. Composição Química

A composição química foi analisada nas amostras através da técnica de Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raios-X (ERX) que permite identificar os elementos presentes na amostras e a percentagem atómica num volume de amostra. A área analisada da amostra em ERX é selecionada a partir da técnica MEV.

A tabela 2 representa os resultados medidos em relação à percentagem atómica dos elementos químicos.

**Tabela 3 -Valores da composição química dos elementos presentes na amostra (% at)**

	C	O	P	Ca	Ag	Ta	Ta/O	Ca/P
Ta_CaP	16,3	62,3	2,0	2,6		16,7	0,3	1,3
Ta_CaP_Ag	21,0	55,5	2,0	2,7	1,3	17,6	0,3	1,4
Ta_CaP_Ag_C	29,1	48,5	1,6	2,8	1,4	16,7	0,3	1,8
Ta_CaP_(Ag_C)x3	35,2	45,2	1,6	2,5	1,1	14,3	0,3	1,6
Ta_CaP_AgC	36,3	43,4	1,6	2,6	1,4	14,8	0,3	1,6

Ao analisar a tabela 3, confirma-se a incorporação dos elementos bioativos (Ca e P), assemelhando-se assim ao osso, tanto na morfologia como também na sua composição. Acresce que a relação Ca/P das amostras analisadas é semelhante ao valor ideal para a criação de hidroxiapatite (1,67).

A incorporação de Ag é notável nos valores da tabela e que os valores são aproximados, tal como se pretendia.

Nota-se um crescente aumento do teor de carbono para as amostras com as camadas de carbono.

## 6.2. Morfologia

A figura 13 e 14 mostra as micrografias obtidas a partir de MEV, com uma escala de 5 $\mu$ m e 1 $\mu$ m para uma amostra de Ta anodizada com elementos bioativos Ca e P (Ta\_CaP) e as restantes 4 amostras com as aproximações do capítulo 4.2.

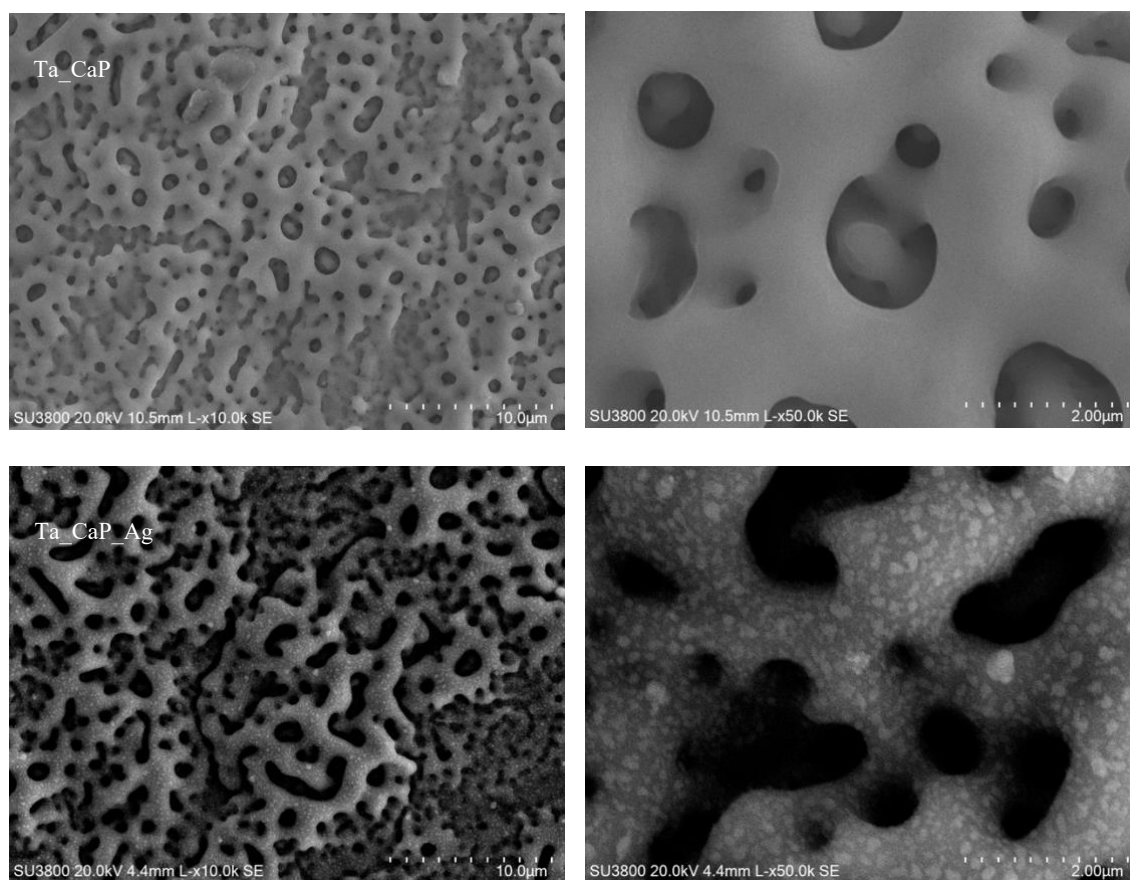


Figura 13 -Imagens MEV das amostras Ta\_CaP e Ta\_CaP\_Ag

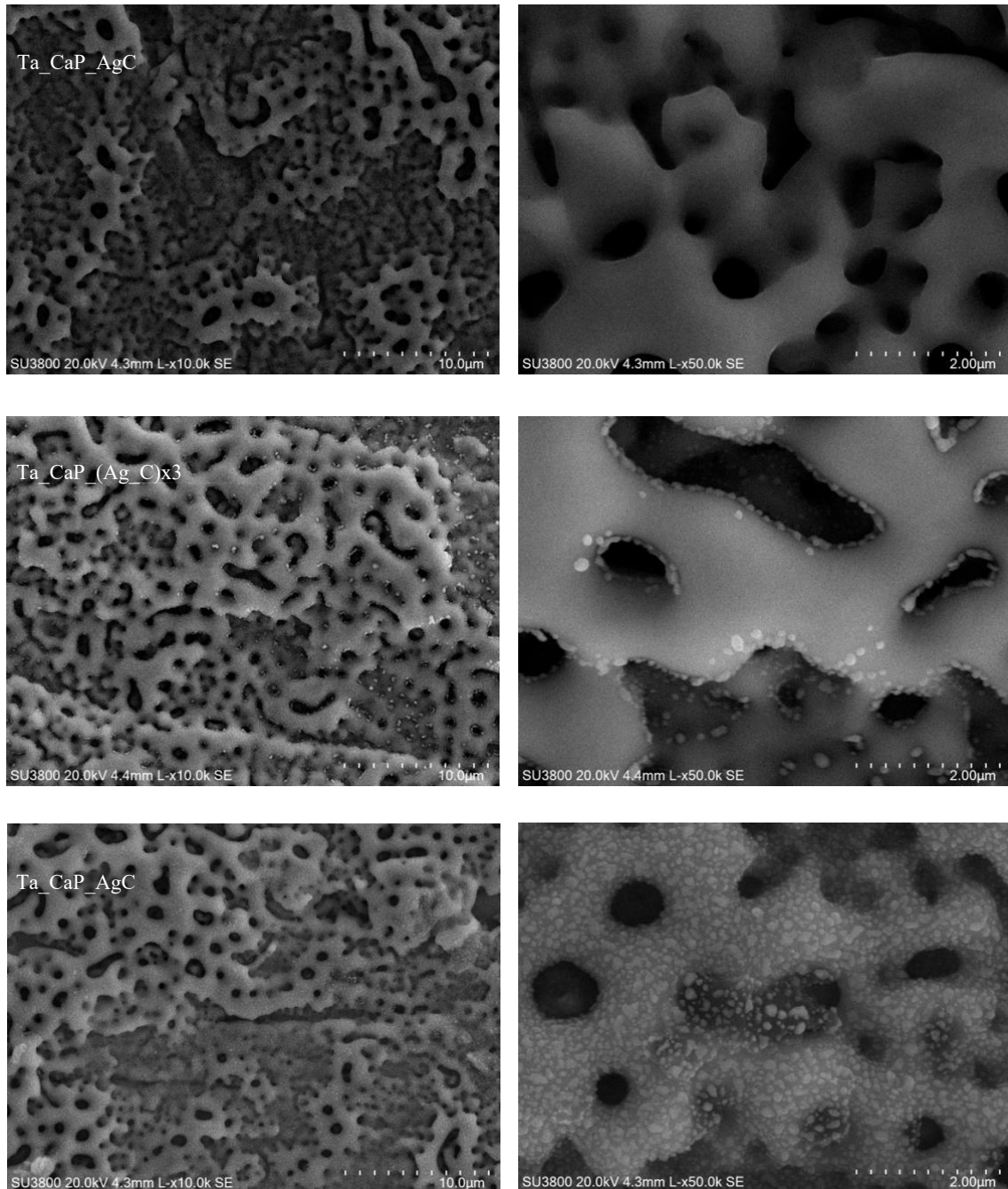


Figura 14 -Imagens MEV das amostras Ta\_CaP\_AgC e Ta\_CaP\_(Ag\_C)x3 e Ta\_CaP\_AgC

Em primeira análise, a amostra Ta\_CaP confirma a formação de uma superfície (micro e nano) estruturada, por PEO. A aplicação desta técnica promoveu a mimetização da

morfologia do osso com sucesso, pois a superfície contém micro e nano poros o que deverá promover assim o processo de osteointegração.

De seguida, a amostra Ta\_CaP\_Ag demonstra a pulverização de Ag e confirma-se a presença de nanopartículas com uma forma irregular. Verifica-se ainda que as nanopartículas estão na superfície da amostra e dentro dos poros.

Aquando a pulverização de uma camada de C de 40-50 nm, verificou-se que deixou de ser visível a partir de micrografias as NP's de Ag, embora seja justificável pela deposição de camada de C.

As micrografias relacionadas com a deposição alternada de Ag e C, em comparação com a amostra anterior (Ta\_CaP\_Ag\_C) permite identificar algumas NP's de Ag o que na amostra anterior deixou de ser visível. Na amostra Ta\_CaP\_(Ag\_C) x3, é possível verificar que as NP's também encontram-se dentro dos poros e aglomeradas o que por um lado mostra que morfologia mantém-se semelhante ao osso mas cobertas com nanopartículas mais espaçadas quando comparadas com a amostra Ta\_CaP\_Ag. A mudança de tamanho e da distribuição das nanopartículas poderá estar relacionada com o facto de haver baixa afinidade entre partículas de Ag e C. Por outro lado, as nanopartículas de prata apresentam uma alta afinidade umas com as outras. Estas duas características manifestadas levam a que as nanopartículas de Ag tenham possibilidade de moverem-se e agregarem-se.

Por fim, o par de micrografias que foram pulverizadas em co deposição, mostra que houve uma mudança de tamanho e distribuição, em comparação com a amostra TaCaP\_(Ag\_C) x3. Verifica-se que houve uma diminuição do tamanho e um aumento das nanopartículas e uma grande distribuição.

### 6.3. Topografia

A técnica de AFM, em conjunto com o uso do Software *Gwyddion* possibilitou a análise da amostra e o cálculo de vários parâmetros, assim como, a rugosidade média (Sa) que provêm da média aritmética da rugosidade da amostra e a rugosidade quadrática média (Sq). As imagens obtidas após a utilização do software e os valores obtidos estão representados na figura 15 e 16 e na tabela 3, respetivamente.

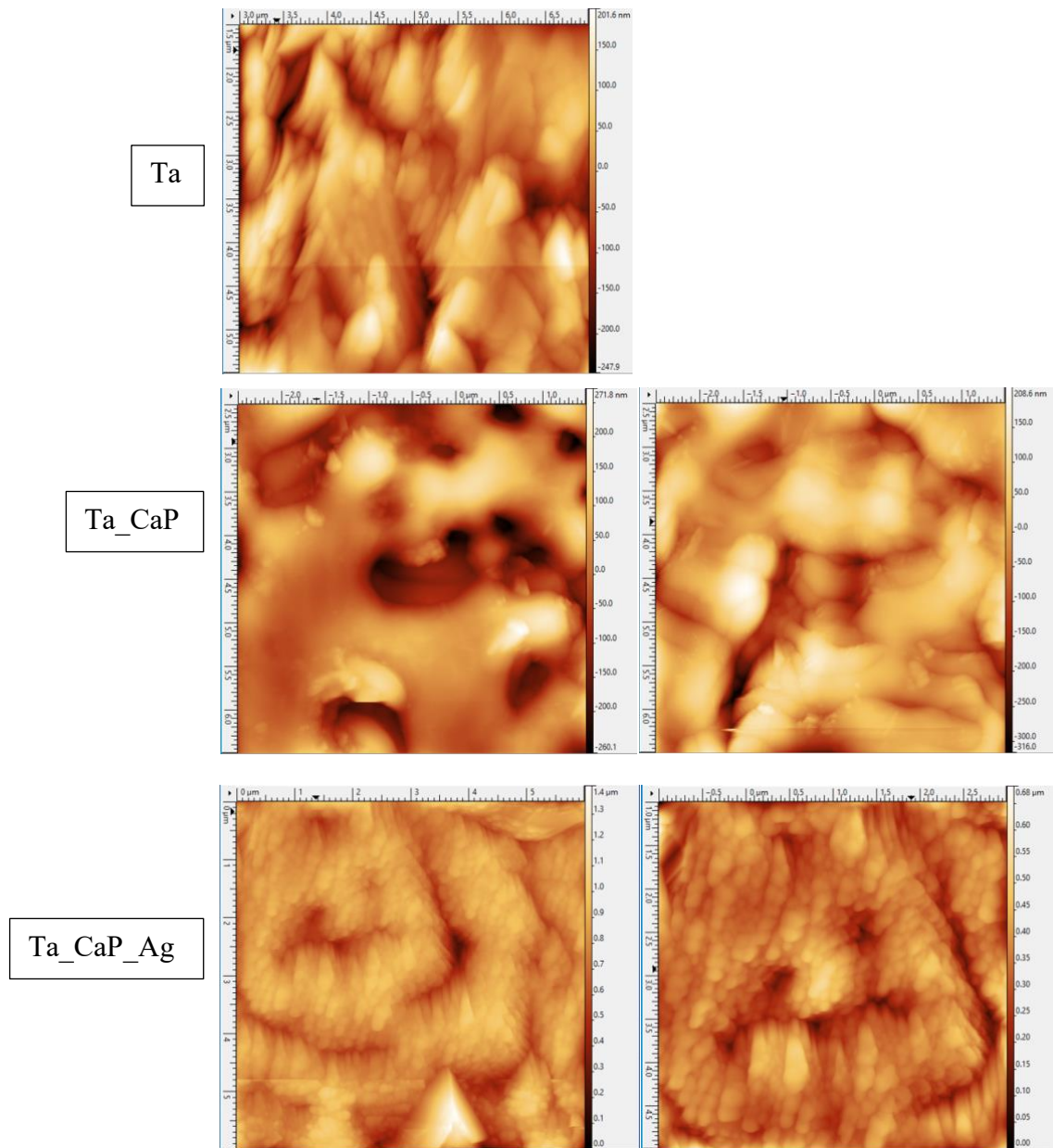


Figura 15 - Imagens MFA das amostras Ta e Ta\_CaP e Ta\_CaP\_Ag

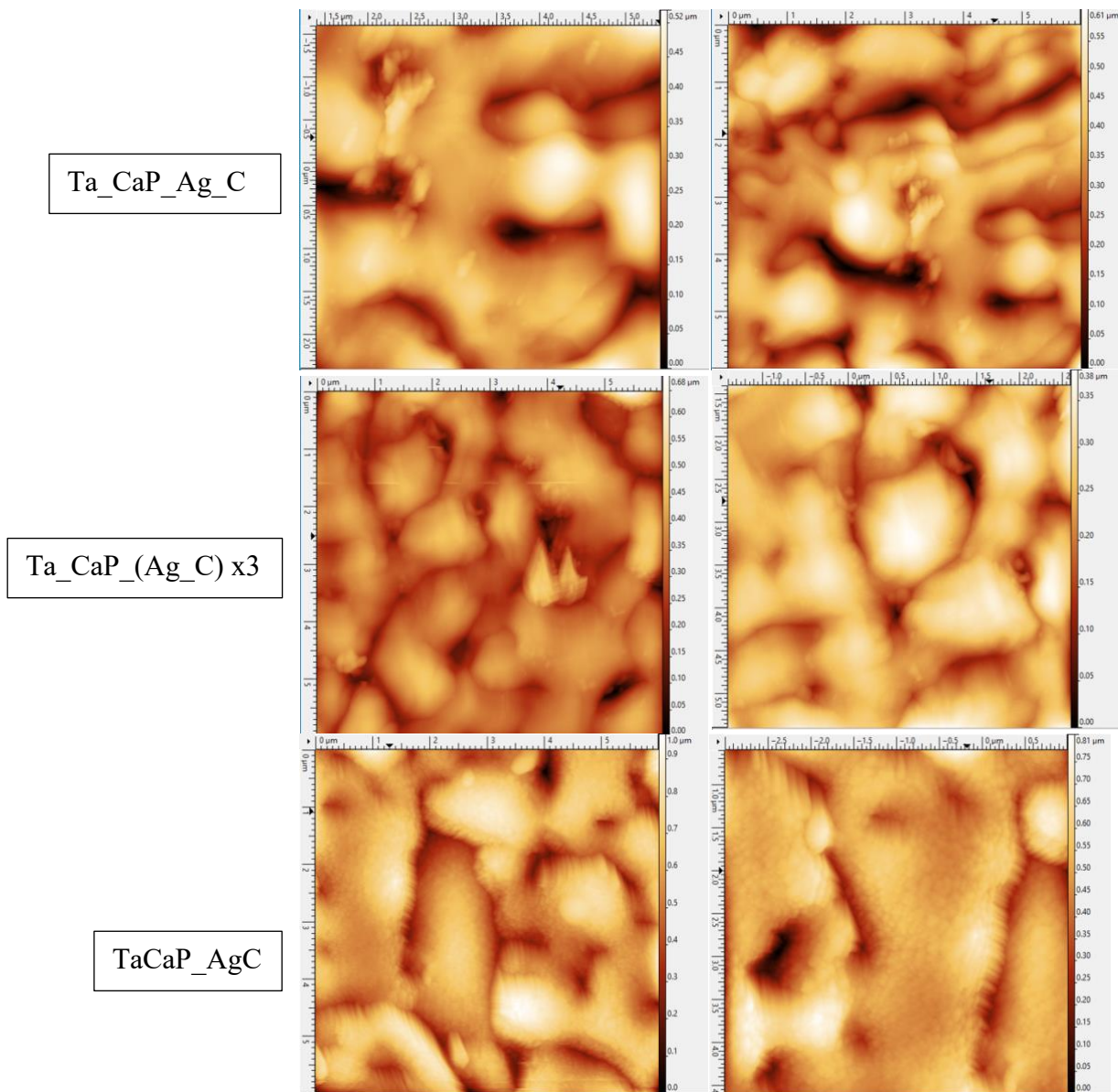


Figura 16 - Imagens MFA das amostras Ta\_CaP\_Ag\_C, Ta\_CaP\_(Ag\_C)x3 e Ta\_CaP\_AgC

Tabela 4 - Valores da rugosidade das amostras

	Sq (nm)	Sa (nm)
Amostra Ta	63	49
Amostra Ta_CaP	83	65
Amostra Ta_CaP_Ag	111	86
Amostra Ta_CaP_Ag_C	98	78
Amostra Ta_CaP_(Ag_C)x3	74	60
Amostra Ta_CaP_AgC	135	108



A partir das imagens obtidas, é possível verificar os poros formados pela técnica PEO, certificando que o objetivo de mimetizar a estrutura óssea foi atingido, visualizando os poros na amostra Ta\_CaP.

A rugosidade de uma superfície é definida como as saliências e reentrâncias da peça em estudo. Ao analisar a tabela 3 podemos verificar que há uma oscilação dos valores de rugosidade. No entanto, verifica-se que o valor mais alto é correspondente à amostra Ta\_CaP\_AgC devido as nanopartículas depositadas na superfície.

## 6.4. Estrutura Cristalina

Analisando os difractogramas, figura 17 das amostras com os Arquivos de Difração ICDD, verifica-se que a única estrutura cristalina presente nas amostras é a fase  $\alpha$ -Ta (ICDD no 00-004-0788) correspondente ao substrato Ta.

No entanto, nenhuma das amostras submetidas à técnica PEO manifestou picos correspondentes à fase cristalina de Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> pois esta fase está presente nas amostras apenas como fase amorfa, assim como o fosfato de cálcio. Isto porque, a amostra não formou a hidroxiapatite.

A prata e o carbono são dois elementos presentes nas amostras, embora não se manifestem na análise de raio-X. O carbono é um elemento amorfo e por isso não seria possível ser detetado pois esta técnica, enquanto a prata é um elemento cristalino com uma estrutura cúbica de faces centradas mas apresenta teores muito baixos e por isso, também não é possível a sua identificação.

Por fim, no intervalo de 20-40 do difratograma é possível identificar uma “boça” apenas nas amostras em que a técnica PEO foi aplicada. Tendo em conta que a técnica DRX apenas indica planos cristalinos, a boça identificada no espectro poderá manifestar a presença de hidroxiapatite (HAp). Efetuou-se um recozimento da amostra e repetiu-se a técnica DRX para confirmar os elementos ali presentes e concluiu-se que não irá ocorrer formação de HAp.

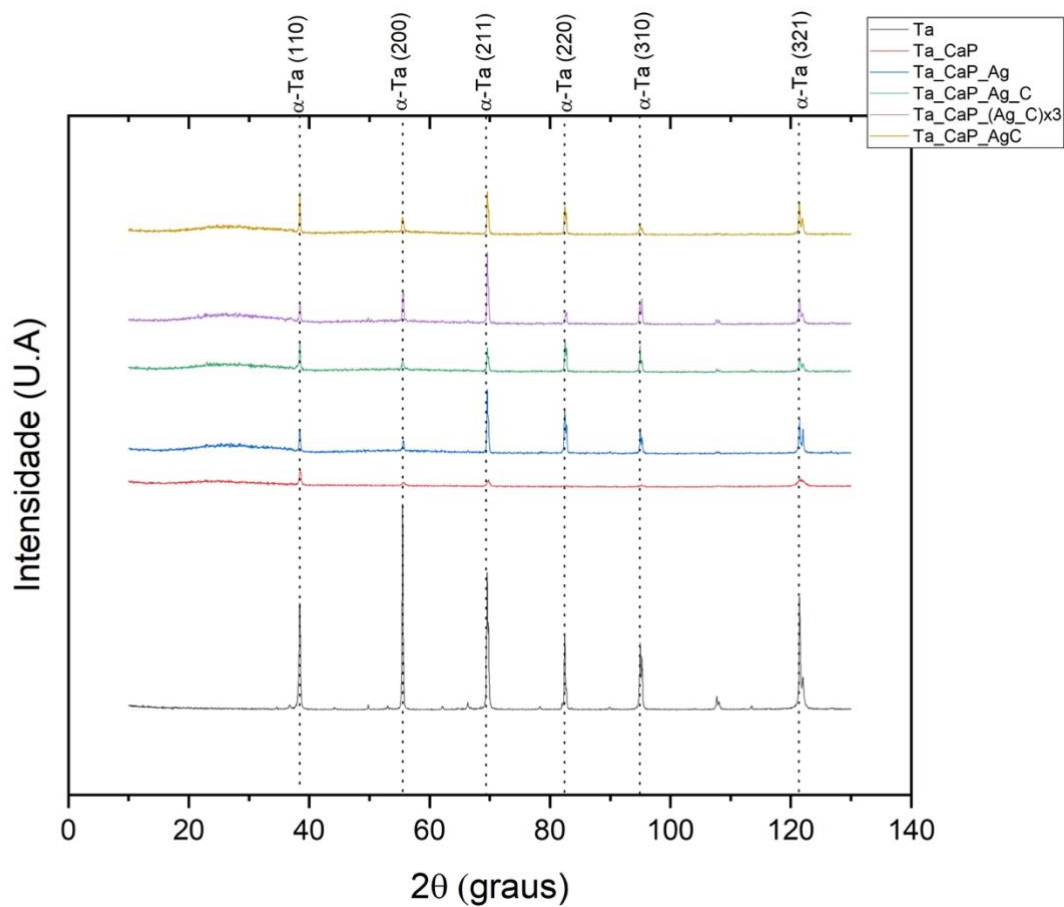


Figura 17 - Difractograma DRX das amostras

## 6.5. Resultados Funcionais

### 6.5.1. Liberação iónica de iões

Na figura 18 está representado os resultados a partir da técnica de ICP-OES. Adicionou-se uma taxa de libertação controle baseada em estudos anteriores.

Ao analisar o gráfico obtido, verificou-se que a amostra Ta\_CaP\_Ag, com um teor de 15 nm teve uma libertação semelhante ao caso de estudo [9]. Estes valores confirmam os resultados preliminares.

As amostras com deposição de carbono destacam-se positivamente pois este elemento têm a função de aplicar o efeito galvânico, isto é, o carbono reveste a superfície e permite que haja um maior controlo na libertação ao longo do tempo.

Concluiu-se assim que apenas a amostra Ta\_CaP\_(Ag\_C)x3 e a amostra Ta\_CaP\_AgC apresentam uma taxa de libertação superior aquando comparado com a taxa de libertação do caso de estudo [9] assim como revelam que a sua libertação ainda não estabilizou e continua a ocorrer libertação de iões de prata durante todo o mês, ao contrário da amostra sem carbono. Assim, conclui-se que os rearanjos correspondem aos objetivos, isto é, uma libertação controlada ao longo do tempo de prata.

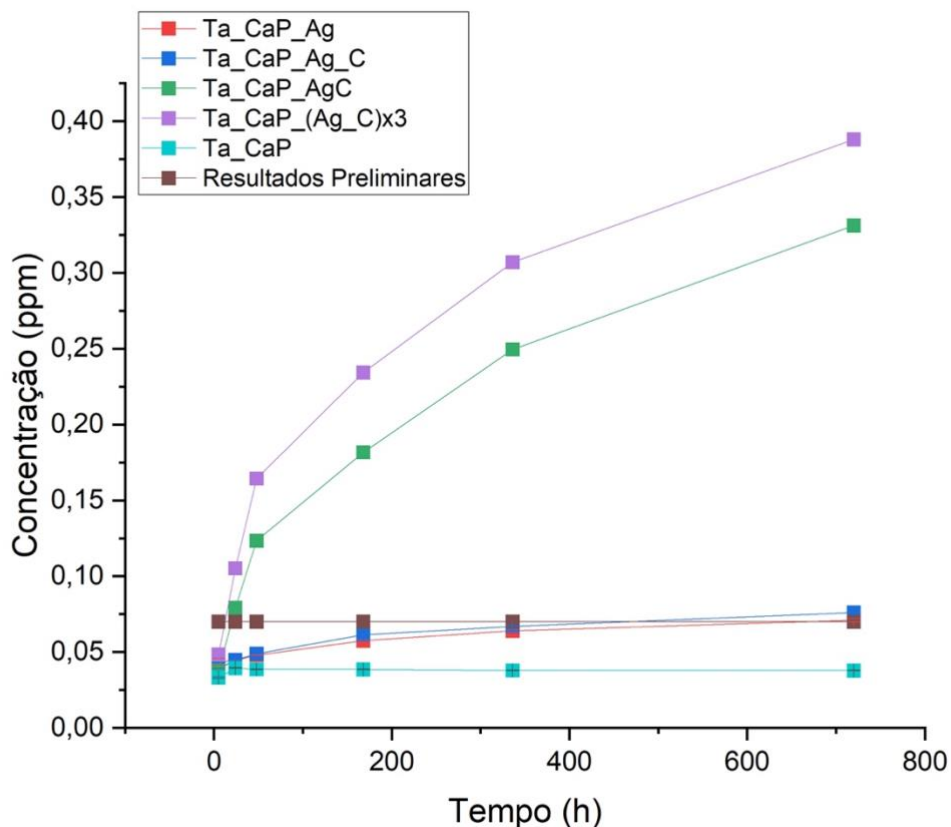


Figura 18 - Gráfico da concentração Vs. tempo das amostras em estudo

### 6.5.2. Análise UFC

Após a realização da contagem de colónias, confirmou-se que as amostras não possuem atividade antimicrobiana, como se verifica na figura 19, 20 e 21 onde não se identifica nenhuma zona de inibição após a adição do fungo *Candida albicans*.

Ao analisar o gráfico de barras, figura 22, concluiu-se que passado as primeiras 5h, a amostra que mostra menor número de colónias por mL é a amostra com uma camada de Ag e outra de C alternada, assim como passado 24h. O valor de UFC/mL demonstra o número de colónias desenvolvidas por mL. Tendo em conta que o nosso objetivo é incorporar agentes antimicrobianos, com a função de inibir o desenvolvimento de colónias, a amostra que satisfaz as condições mais próximas das necessárias é a amostra com menor

valor. Assim, concluiu-se que a amostra mais indicada é de Ta\_CaP\_(Ag\_C)x3, como era de esperar, tendo em conta os resultados da análise ICP, onde apenas as amostras Ta\_CaP\_AgC e Ta\_CaP\_(Ag\_C)x3 demonstraram uma maior taxa de libertação de Ag<sup>+</sup>.

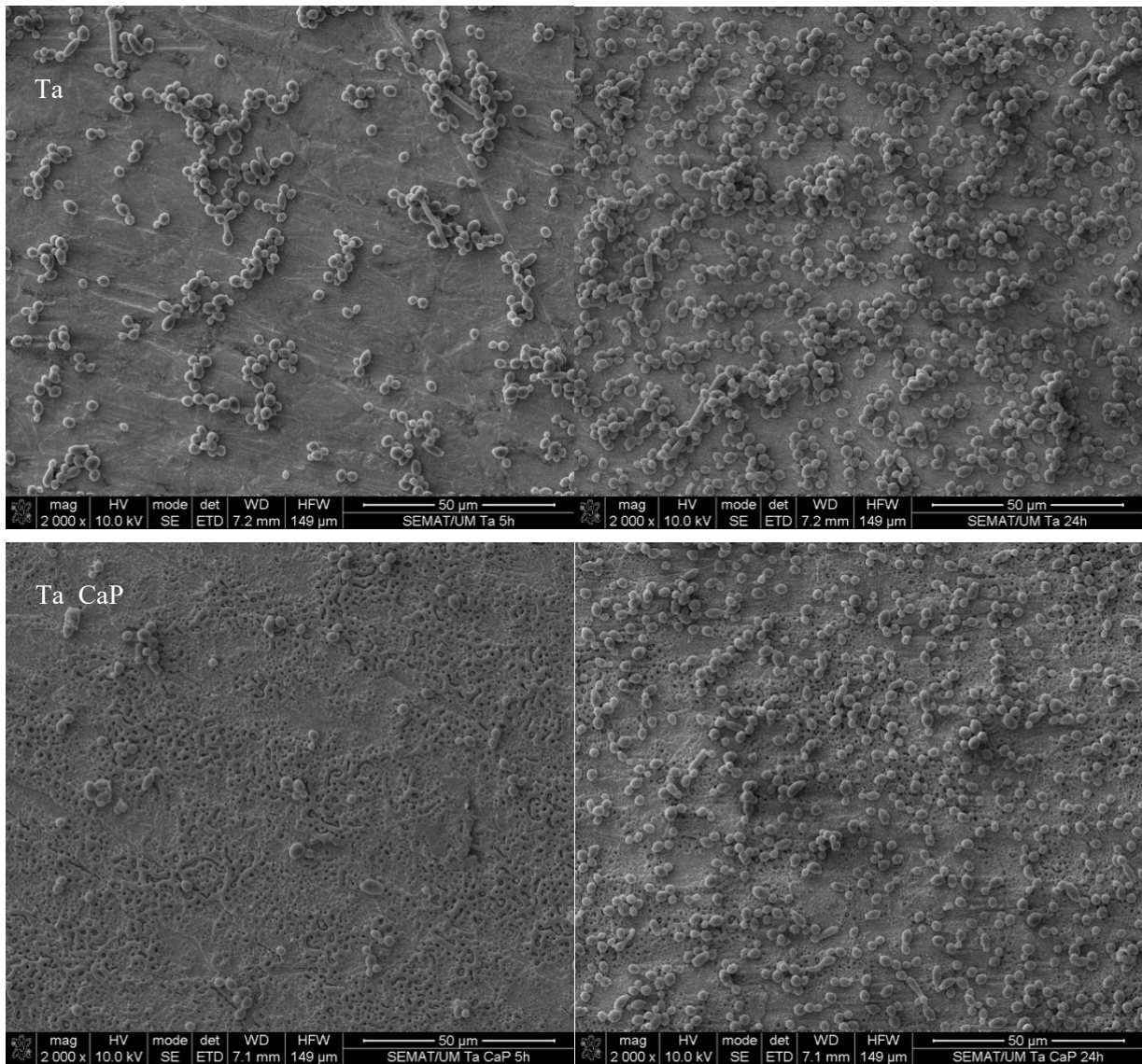


Figura 19- Representação da inibição com o fungo *C. Albicans* das amostras Ta e Ta\_CaP

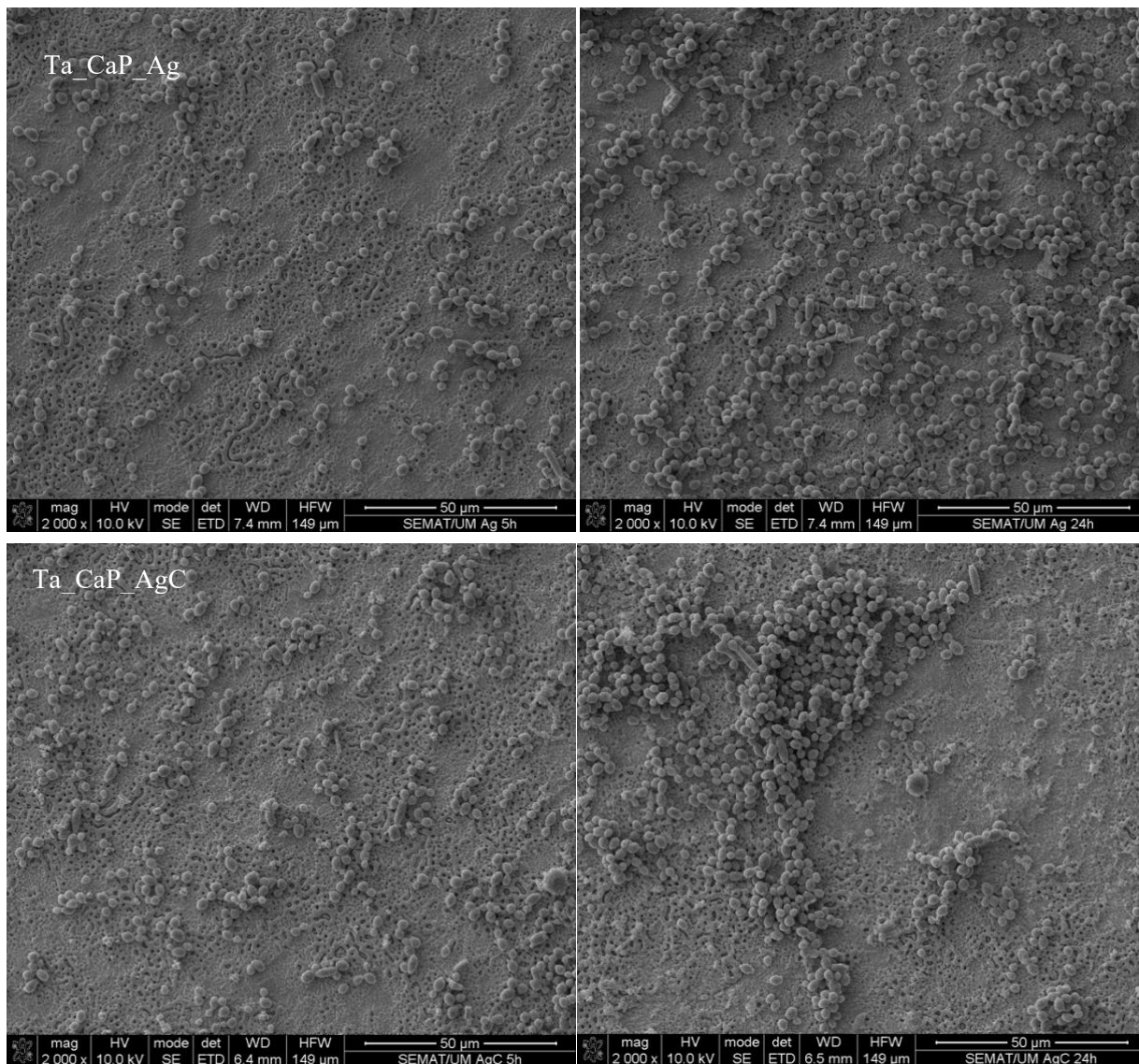


Figura 20 – Representação da inibição com o fungo *C. Albicans* das amostras Ta\_CaP\_Ag, Ta\_CaP\_Ag

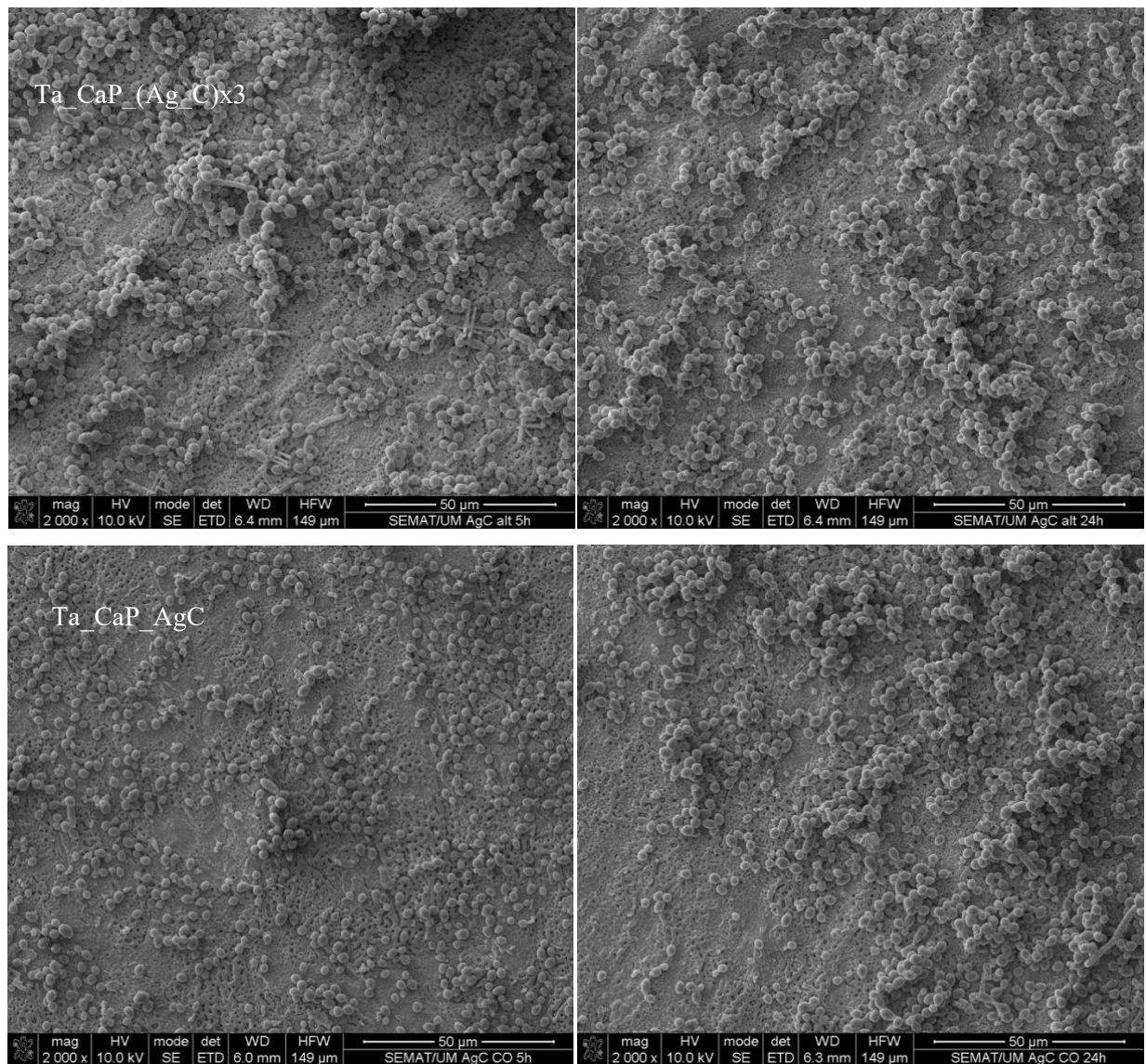


Figura 21 – Representação da inibição com o fungo *C. Albicans* das amostras Ta\_CaP\_(Ag\_C)x3 e Ta\_CaP\_AgC

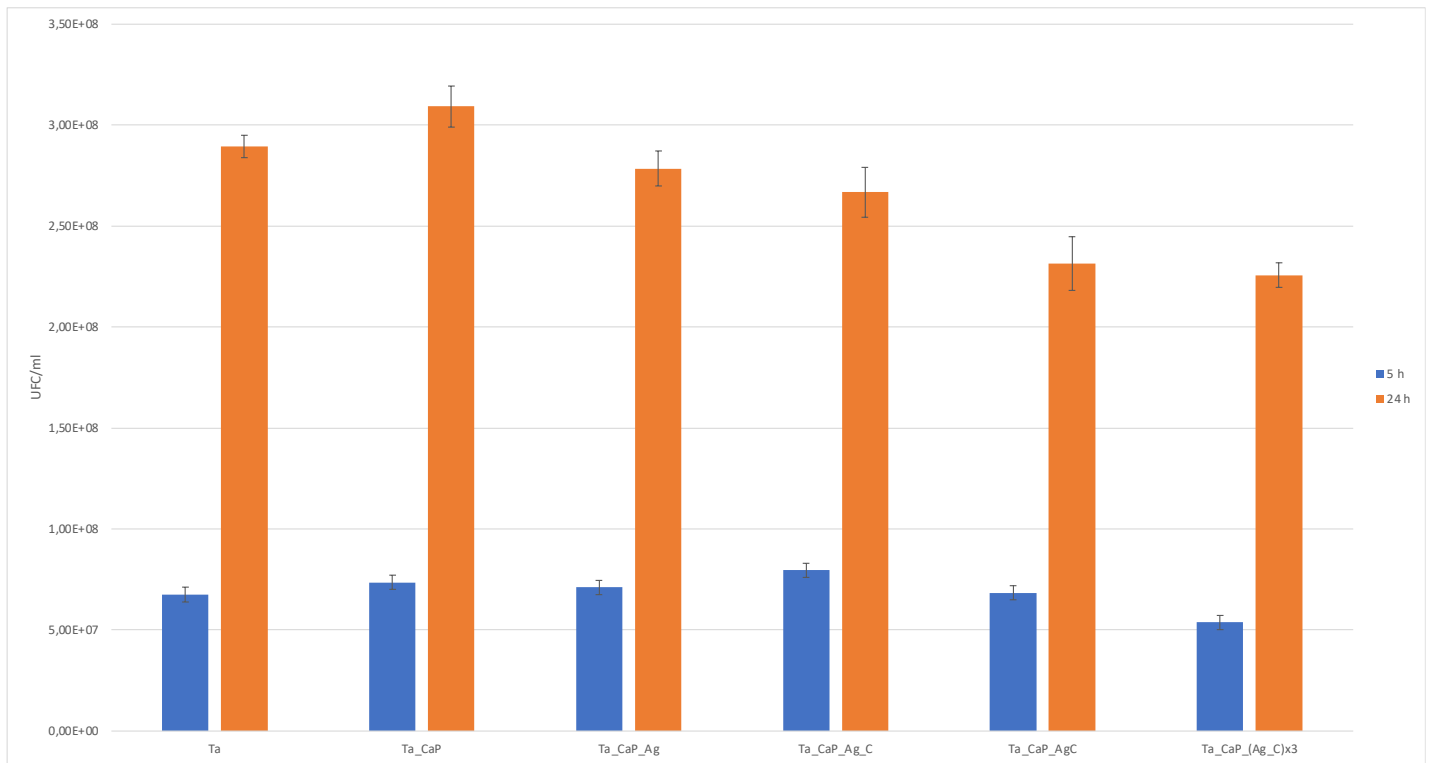


Figura 22- Gráfico de barras do número de colônias por mL com a introdução do fundo C.Albicans



## 7. CONCLUSÃO

Os implantes dentários apresentam dois grandes falhas e por isso, este trabalho tem como objetivo solucioná-las. A lenta osteointegração tem sido um problema apresentado no processo da aplicação, assim como a doença peri implantar. O projeto consistiu assim em obter uma morfologia porosa que mimetize o osso assim como, uma química semelhante a este. A doença peri implantar pode ser solucionada com a incorporação de novos agentes antimicrobianos.

Inicialmente, aplicou-se duas técnicas, a oxidação por plasma eletrolítico onde se obteve uma superfície porosa de Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> com elementos bioativos e utilizou-se a pulverização catódica por magnetron para depositar as nanopartículas de prata como agente antimicrobiano. Com o intuito de determinar a melhor deposição com as características pretendidas, desenhou-se quatro tipo de deposições o que formou quatro tipos de amostras diferentes. A primeira amostra consistiu em apenas depositar nanopartículas de prata na superfície com uma espessura de 15nm. Na segunda aproximação depositou-se uma camada de Ag de 15 nm e de seguida, uma camada de filme de carbono com 40-50 nm de espessura. A terceira amostra foi efetuada com a deposição alternada de 5 camadas com 3nm de Ag e 17 nm de DLC. Por fim, a quarta amostra depositou-se em co deposição de prata e DLC. As amostras foram de seguida submetidas a técnicas de caracterização para analisar as propriedades tanto físicas, como químicas, funcionais e mecânicas.

A análise morfológica permitiu visualizar micro e nano poros em todas as amostras, o que leva a concluir que a técnica PEO foi bem executada. Nesta análise, foi possível ainda visualizar nanopartículas de prata na superfície, como era esperado.

De seguida, realizou-se a análise topográfica a partir da técnica AFM e confirmou-se que a técnica PEO criou porosidade pois estudou-se a rugosidade média e, a quando comparada com a rugosidade da chapa de Ta, há um aumento desta.

Uma outra análise efetuada foi relativamente à composição química das amostras e relatou a incorporação dos elementos bioativos, Ca e P a partir da técnica PEO, confirmou-se ainda a presença de prata e carbono como era de esperar pelas aproximações feitas.

A análise ICP-OES mostrou que as amostras cobertas com prata e carbono, com o rearranjo de deposição alternada (Ta\_CaP\_(Ag\_C)x3) e co deposição (Ta\_CaP\_AgC) revelaram uma taxa de ionização mais elevada e controlada, como era pretendido pois o carbono tem o papel de promover o efeito galvânico, com o intuito de promover a liberação. Contudo, a taxa de liberação do resultado base, com um teor de 2 nm é semelhante com a liberação de prata com um teor de 15 nm devido à área superficial.

Por fim, realizou-se os testes de halo onde confirmou-se a ausência de atividade antibacteriana nas amostras.

Em síntese, verifica-se que apesar de ter sido aumentado o teor da prata para 15 nm, não ocorreu um aumento significativo na liberação desta. Todavia, os rearranjos de co deposição e deposição alternada, demonstraram uma grande liberação controlada ao longo do tempo.

A camada de carbono tinha como intuito encapsular as nanopartículas de prata, pois confirmou-se a robustez mecânica das amostras embora seja necessária mais pesquisa para ser possível desenvolver um implante dentário com características suficientes para sofrer o procedimento cirúrgico.

Em futuros trabalhos, seria interessante o desenvolvimento de um protótipo funcional para ser possível efetuar testes mecânicos.

Além disso, embora o aumento de prata não tenha sofrido um aumento na liberação de prata na amostra Ta\_CaP\_Ag, efetuar o aumento de prata nos rearranjos de co deposição e deposição alternada.

---

## [REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS]

- [1] C. Filipa and A. Alves, “Desenvolvimento de revestimentos nanoestruturados para implantes osteointegrados Universidade do Minho Escola de Engenharia.”
- [2] T. Miyazaki, H.-M. Kim, T. Kokubo, C. Ohtsuki, H. Kato, and T. Nakamura, “Mechanism of bonelike apatite formation on bioactive tantalum metal in a simulated body fluid,” 2002.
- [3] T. Albrektsson and A. Wennerberg, “Oral implant surfaces- Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them,” *Int J Prosthodont*, vol. 17, p. 536, 2004.
- [4] L. fialho, “Design of new biocompatible osseointegrated and antimicrobial dental implant,” Minho, Jul. 2021.
- [5] P. Teixeira, “Implantes dentários de uma só peça—Uma revisão do estado da arte,” Porto, 2020.
- [6] Y. Zhao, R. Pu, Y. Qian, J. Shi, and M. Si, “Antimicrobial photodynamic therapy versus antibiotics as an adjunct in the treatment of periodontitis and peri-implantitis: A systematic review and meta-analysis,” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 34. Elsevier B.V., Jun. 01, 2021. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102231.
- [7] K. Liaw, R. H. Delfini, and J. J. Abrahams, “Dental Implant Complications,” *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, vol. 36, no. 5, pp. 427–433, Oct. 2015, doi: 10.1053/j.sult.2015.09.007.
- [8] U. Oza Post graduate student, U. Oza, H. Parikh, S. Duseja, and C. Agrawal, “Dental Implant Biomaterials: A Comprehensive Review,” *International Journal of Dentistry Research*, vol. 5, no. 2, pp. 87–92, 2020, [Online]. Available: [www.dentistryscience.com](http://www.dentistryscience.com)
- [9] P. Agostinho, “Desenvolvimento de Implantes Dentários,” Coimbra, Oct. 2021.
- [10] S. Bencharit *et al.*, “Development and applications of porous tantalum trabecular metal-enhanced titanium dental implants,” *Clin Implant Dent Relat Res*, pp. 817–826, 2014, doi: 10.1111/cid.12059.
- [11] B. R. Levine, S. Sporer, R. A. Poggie, C. J. della Valle, and J. J. Jacobs, “Experimental and clinical performance of porous tantalum in orthopedic surgery,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 27, pp. 4671–4681, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.041.
- [12] S. Spriano, S. Yamaguchi, F. Baino, and S. Ferraris, “A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination,” *Acta Biomaterialia*, vol. 79. Acta Materialia Inc, pp. 1–22, Oct. 01, 2018. doi: 10.1016/j.actbio.2018.08.013.
- [13] L. Leon, E. J. Chung, and C. Rinaldi, “A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications,” in *Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications*, Elsevier, 2019, pp. 1–4. doi: 10.1016/B978-0-12-816662-8.00001-1.

- [14] J. L. Paris and M. Vallet-Regí, “Nanostructures for imaging, medical diagnostics and therapy,” in *Fundamentals of Nanoparticles: Classifications, Synthesis Methods, Properties and Characterization*, Elsevier, 2018, pp. 1–28. doi: 10.1016/B978-0-323-51255-8.00001-X.
- [15] R. P. Allaker and K. Memarzadeh, “Nanoparticles and the control of oral infections,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 43, no. 2. Elsevier B.V., pp. 95–104, 2014. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.11.002.
- [16] N. Durán, M. Durán, M. B. de Jesus, A. B. Seabra, W. J. Fávaro, and G. Nakazato, “Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 12, no. 3. Elsevier Inc., pp. 789–799, Apr. 01, 2016. doi: 10.1016/j.nano.2015.11.016.
- [17] R. K. Kunkalekar, “Role of Oxides (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, MnO<sub>2</sub>) in the Antibacterial Action of Ag-Metal Oxide Hybrid Nanoparticles,” in *Noble Metal-Metal Oxide Hybrid Nanoparticles: Fundamentals and Applications*, Elsevier, 2018, pp. 303–312. doi: 10.1016/B978-0-12-814134-2.00010-3.
- [18] M. İzmir and B. Ercan, “Anodization of titanium alloys for orthopedic applications,” *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, vol. 13, no. 1. Higher Education Press, pp. 28–45, Mar. 01, 2019. doi: 10.1007/s11705-018-1759-y.
- [19] R. V. Gonçalves, “UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA Tese de Doutorado SÍNTESE E APLICAÇÃO DE NANOTUBOS DE ÓXIDO DE TÂNTALO FABRICADOS POR ANODIZAÇÃO: UM PROMISSOR FOTOCATALISADOR PARA FOTOGERAÇÃO DE HIDROGÊNIO.”
- [20] T. W. Clyne and S. C. Troughton, “A review of recent work on discharge characteristics during plasma electrolytic oxidation of various metals,” *International Materials Reviews*, vol. 64, no. 3, pp. 127–162, Apr. 2019, doi: 10.1080/09506608.2018.1466492.
- [21] P. J. Kelly and R. D. Arnell, “Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications.”
- [22] M. Omid *et al.*, “Characterization of biomaterials,” in *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*, Elsevier Inc., 2017, pp. 97–115. doi: 10.1016/B978-0-08-100961-1.00007-4.
- [23] K. Akhtar, S. A. Khan, S. B. Khan, and A. M. Asiri, “Scanning electron microscopy: Principle and applications in nanomaterials characterization,” in *Handbook of Materials Characterization*, Springer International Publishing, 2018, pp. 113–145. doi: 10.1007/978-3-319-92955-2\_4.
- [24] “Capítulo 4-Técnicas de Caracterização de Revestimentos CAPÍTULO 4- TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE REVESTIMENTOS FINOS 4.1 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) 4.1.1 Introdução.”



**[ANEXO A]****CÁLCULOS PARA A PREPARAÇÃO DO ELETRÓLITO**

Na preparação do eletrólito, calculou-se a massa necessária de acetato de cálcio (99% de pureza, Biochem Chemopharma) e Sal Dissódico de Ácido  $\beta$ -glicerofosfato Penta-hidratado (98% de pureza, Acros Organics).

**Tabela 5 - Molaridade e massa molar dos reagentes**

	Molaridade	Massa Molar (g/mol)
Acetato de cálcio	0,35	158,17
B-glicerofosfato	0,12	306,11

Cálculo da massa para volume de 150 mL

Acetato de cálcio:

$$0,35 = \frac{m}{\frac{158,17}{150}} \quad m = 8,3g$$

$\beta$ -glicerofosfato:

$$0,12 = \frac{m}{\frac{306,11}{150}} \quad m = 5,5g$$



## [ANEXO B]

### ESPECTRO DE RAIOS-X DA AMOSTRA RECOZIDA

O gráfico seguinte representa o espectro de raios-X da amostra recozida. Os picos apresentados coincidem com a fase  $\alpha$ -Ta (ICDD no 00-004-0788) correspondente ao substrato Ta.

Concluiu-se assim que a amostra não contém hidroxiapatite

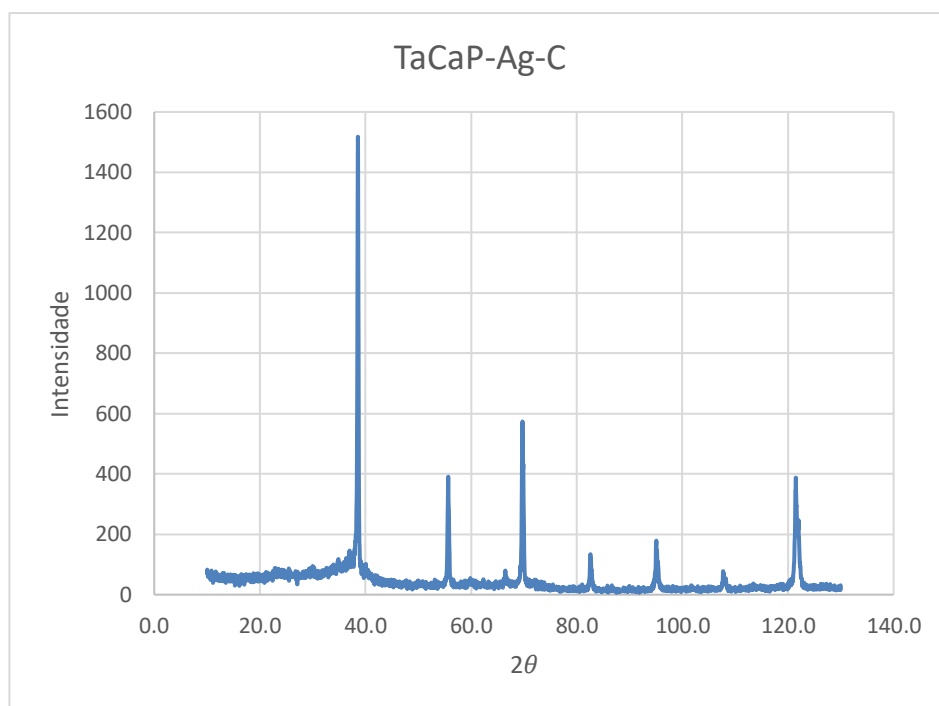


Figura 23 - Espectro Raio-X da amostra recozida







