

Análise do potencial antimicrobiano e desempenho eletroquímico de superfícies de titânio tratadas por plasma eletrolítico de oxidação e revestidas com filme de Polipirrol e Zinco

Palavras-Chave: Titânio, polipirrol, antimicrobiano, eletroquímica, implantes dentais.

Autores(as):

JÚLIA MARIA TEIXEIRA TEODORO, FOP – UNICAMP

MARIA HELENA ROSSY BORGES, FOP – UNICAMP

BRUNA EGUMI NAGAY - UNICAMP

Prof. Dr. VALENTIM ADELINO RICARDO BARÃO (orientador), FOP – UNICAMP

1. Objetivo do estudo

Considerando que a concentração de Zn incorporada na superfície e os parâmetros de eletrodeposição (corrente aplicada durante o método galvanostático) influenciam diretamente no potencial antibacteriano, desempenho eletroquímico e características morfológicas do substrato (Borges et al., 2023), este estudo objetivou investigar a influência e a relação desses aspectos no desempenho final da superfície.

2. Metodologias

2.1. Preparo das amostras

Discos de Tícp foram incluídos e polidas sequencialmente em uma politriz automática por lixas metalográficas com granulações #320 sob irrigação constante na velocidade de 250 rpm para padronizar as superfícies (Costa et al., 2020; Dini et al., 2020). Posteriormente, as amostras foram desincluídas e limpas em cuba ultrassônica com 3 ciclos de 10 minutos, em solução com detergente enzimático e água deionizada, água deionizada e propanol 70% (v/v), respectivamente. Por fim, as amostras foram secas com jatos de ar quente a 250°C (Souza et al., 2020) (Figura 1).

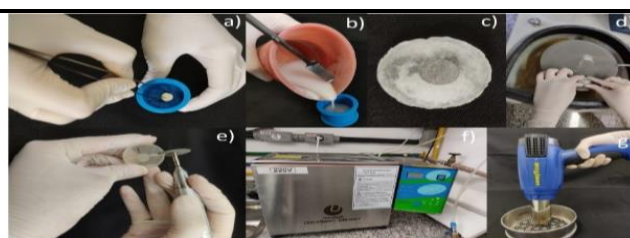


Figura 1. Preparo das amostras. (a) posicionamento dos discos em um porta discos; (b) e (c) inclusão das amostras em resina acrílica; (d) polimento em uma politriz automática; (e) desinclusão; (f) e (g) lavagem e secagem dos espécimes, respectivamente. **Fonte:** Arquivo da bolsista e do grupo de pesquisa

2.2. Deposição do Plasma Eletrolítico de Oxidação (PEO - CaP)

A deposição do PEO (Figura 2) foi realizada nos grupos experimentais correspondentes por meio de uma fonte de alimentação de corrente contínua. A solução eletrolítica é composta de acetato de cálcio e glicerofosfato dissódico e 2 amostras por vez foram tratadas em um ciclo de 10 minutos, seguindo os parâmetros: 290 V, 60% (+), 20% (-) e 250 Hz (Nagay et al., 2020). Após isso, os espécimes foram lavados com água destilada e secos ao ar.

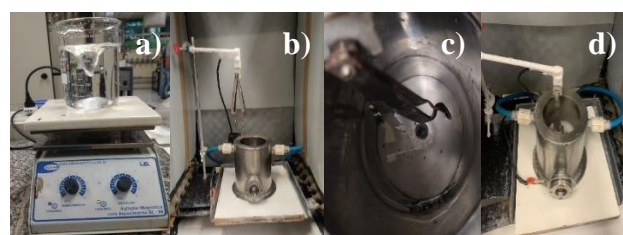


Figura 2. Deposição do Plasma Eletrolítico de Oxidação. (a) Preparo da solução eletrolítica; (b) cuba eletrolítica e (c) posicionamento dos discos na pinça e da

solução na cuba eletrolítica e imersão das amostras, respectivamente. Fonte: Arquivo da bolsista e do grupo de pesquisa.

2.3. Deposição do filme de PPy e filme de PPy+Zn

Uma célula eletroquímica associada a um potenciostato foi utilizada para deposição dos filmes sobre as superfícies previamente tratadas por PEO. O monômero Pirrol foi previamente destilado antes do uso. O método de deposição utilizado para a deposição do filme de PPy e PPy+Zn é o galvanostático, onde uma corrente fixa de 0,5 mA/cm² é aplicada por 600 segundos. A composição da solução eletroquímica consiste em 0,2 M de Pirrol (Py), 0,2 M de ácido oxálico e 0,15 M de Nitrato de Zn. Ao final da deposição, os discos foram lavados com água deionizada e secos ao ar (Borges et al., 2020).

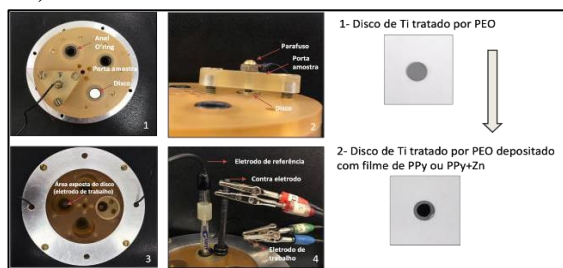


Figura 3. Célula Eletroquímica. Etapas de montagem e especificação dos componentes e eletrodos.

2.4. Caracterizações de superfície

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) espectroscopia de energia dispersiva (EDS): MEV (JEOL JSM-6010LA) foi utilizado para caracterizar a morfologia das superfícies das amostras. Para a identificação dos elementos químicos presentes na superfície dos discos, EDS será realizada em pequenos volumes, na ordem de 1 μm^3 (n = 3) (Matos et al., 2017).

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR): a técnica de FTIR (Jasco FTIR 410 spectrometer) foi utilizada para

identificação dos grupos funcionais (n=3) seguindo a faixa de frequência de 4,000 a 400 cm^{-1} (dos Reis et al., 2018).

Molhabilidade e rugosidade: as medições do ângulo de contato com água deionizada foram realizadas com um goniômetro automatizado (Ramé-Hart 100-00; Ramé-Hart Instrument Co, Succasunna) pelo método da gota séssil (10 μL) e medido com software (DROP image Standard, Ramé-Hart Instrument Co, Succasunna). A rugosidade da superfície foi analisada por meio de um perfilômetro (Dektak 150-d; Veeco). Os valores foram obtidos utilizando o cut-off de 0,25 mm a uma velocidade de 0,05 mm/s durante 12 s (Costa et al., 2020).

2.5. Testes mecânicos

Microdureza Vickers: foi mensurada por meio de um indentador (Shimadzu, HMV-2 Micro Hardness Tester, Shimadzu Corporation) com uma carga aplicada de 0,5 kgf por 15 s (Cordeiro et al., 2017). O teste foi realizado em quatro pontos distribuídos aleatoriamente em cada disco.

2.6. Testes microbiológicos

Formação da película salivar: Saliva humana foi coletada e os volumes foram submetidos à centrifugação (10.000 g, 4°C) por 10 min. O sobrenadante foi filtrado com membrana de filtração de 0,22 μm (Souza et al., 2019) e a saliva usada imediatamente. Discos esterilizados por UV (Costa et al., 2020) foram posicionados em placas de poliestireno de 24 poços com 1 mL de saliva filtrada e incubadas em uma estufa contendo 10% de CO_2 a 37 °C por 1 h para a formação da película adquirida (Nagay et al., 2019). O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba Univ. de

Campinas (UNICAMP) aprovou este estudo (74638923.1.0000.5418).

Adesão e formação de biofilme monoespécie:

bactérias Gram-positiva *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) e Gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) foram reativadas e incubadas a 37°C e 10% CO₂ por período overnight. O crescimento exponencial foi observado até a obtenção de suspensões contendo 10⁷ células microbianas/mL. Após o ajuste das suspensões bacterianas e imediatamente após a formação da película adquirida, os discos foram transferidos para nova placa de 24 poços contendo 100 µL da suspensão bacteriana ajustada + 900 µL de meio de cultura (Brain heart infusion para *S. sanguinis* e Mueller Hinton para *E. coli*) em cada poço. Então, as placas foram incubadas por 24h a 37°C com 10% CO₂. Após esse período, os discos foram agitados, diluídos e plaqueados pela técnica de contagem de gotas para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) e MEV foi realizado para analisar a estrutura do biofilme formado.

2.7. Testes biológicos

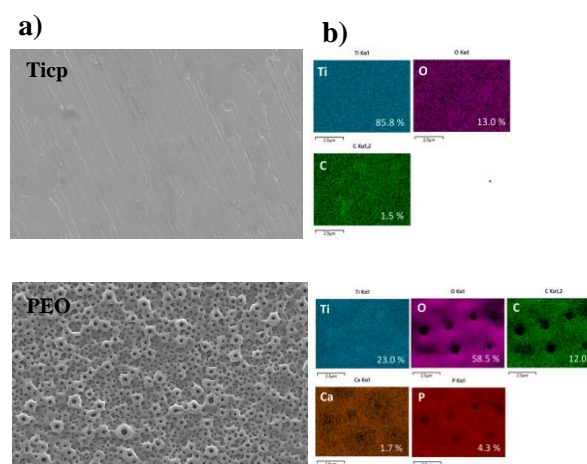
Cultura celular e Ensaio MTT: Para investigar a citocompatibilidade das superfícies, foram utilizadas células da linhagem pré-osteoblástica MC3T3-E1. As amostras foram colocadas em uma placa de poliestireno de 48 poços, e as células foram semeadas em uma concentração de 1 x 10⁴ células/poço. A atividade metabólica celular em superfícies experimentais e controle foi determinada após 1 dia de incubação pela análise de MTT. Após os períodos experimentais, o meio de cultura foi substituído por α-MEM com MTT (5 mg/mL) (Gibco) a 37 °C e condições atmosféricas de CO₂ a 5% por 4 h, seguindo a recomendação do fabricante. Subsequentemente, foi utilizado dimetilsulfóxido

para dissolver os cristais de formazan. Em seguida, a densidade óptica foi verificada no comprimento de onda de 570 nm.

3. Resultados e discussões

3.1. Microestrutura e dureza

O grupo Ticp (Figura 4) apresentou ranhuras longitudinais e superfície homogênea devido ao polimento. O tratamento de superfície com PEO caracterizou-se pela formação de microporos homogêneos em toda a superfície. Esta estrutura porosa do PEO ocorre devido as microdescargas ocasionadas durante o tratamento com plasma, que ocasiona na fusão do material e, consequentemente, na formação de óxidos complexos e incorporação de Ca e P na superfície (Costa et al., 2020). Quanto aos grupos PPy e PPy+Zn, uma morfologia com “partículas semelhantes a couve-flor” penetrando os poros do PEO foi encontrada, o que determina sucesso na deposição e maior adesão do filme ao substrato (Borges et al., 2022). A única diferença entre os dois grupos é a presença de cristais de Zn no grupo PPy+Zn. Nos espectros dos grupos com filme de PPy, os picos característicos em 3630 cm⁻¹ e 1074 cm⁻¹ indicaram as vibrações de estiramento de N - H e C - H no anel pirrol, confirmando sua deposição.



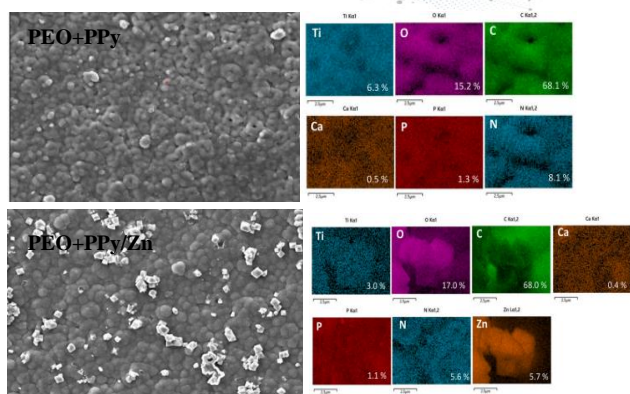


Figura 4. Morfologia superficial e composição química dos grupos. (a) Vista superior dos grupos usando análise SEM (1000×, 3.000× e 10.000× ampliação) (n = 1/ grupo). (b) Mapas EDS de composição química com concentrações de elementos atômicos (%) em superfícies (n = 1/grupo).

As superfícies tratadas com PEO apresentaram ligeiro aumento na molhabilidade (Figura 5a) em comparação com as superfícies usinadas de cpTi, possivelmente devido às diferenças na rugosidade (Borges et al., 2022). Os grupos PEO+PPy e PEO+PPy/Zn apresentaram ângulos de contato maiores que os demais grupos, com diferenças estatisticamente significativas, indicando uma maior hidrofobicidade dos filmes. Esse aumento nos ângulos de contato pode estar relacionado aos maiores valores de rugosidade observados para os filmes PPy.

Quanto à rugosidade das superfícies analisadas (Figura 5b), os grupos dopados com Zn tiveram os maiores valores de rugosidade. O processo de eletrodeposição fez com que o filme PPy acompanhasse a estrutura do substrato, resultando em uma rugosidade dos filmes poliméricos superior à do substrato (Borges et al., 2022).

Em relação a dureza Vickers (Figura 5c), os substratos revestidos com o filme de PPy mostraram uma dureza superior. Esse resultado pode ser explicado pela presença de uma camada de óxido composta por Ca e P, além da fase cristalina rutílica de Ti no PEO (Costa et al., 2020) e pelos grãos

compactos e pequenos na morfologia do filme de PPy, que formam um filme de dupla camada (Rikhari et al., 2018).

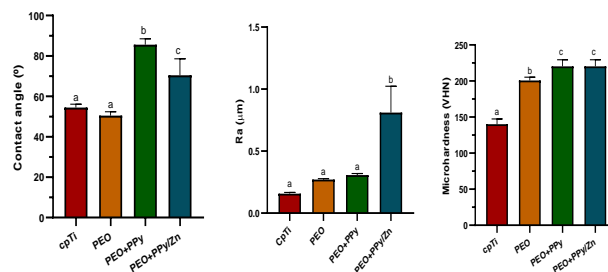


Figura 5. caracterização superficial dos filmes e propriedade mecânica. a) ângulo de contato com a água. b) rugosidade aritmética. c) dureza Vickers. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (p < 0,05, teste de Tukey).

3.2. Testes microbiológicos e celulares

No que diz respeito à atividade antimicrobiana associada ao Zn, observou-se que a presença do elemento no filme de PPy impactou positivamente os resultados microbiológicos contra a bactéria *S. Sanguinis* (Figura 6a). Além disso, para a bactéria gram-negativa *E. Coli* (Figura 6b), a concentração de Zn desempenha um papel essencial na inibição da adesão e crescimento dessa bactéria (Wang et al., 2012). A liberação de íons zinco, resultante da presença de ZnO e, conseqüentemente, da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), são os mecanismos propostos que explicam a atividade antibacteriana das partículas de ZnO (Wang et al., 2007; Jiang et al., 2020). Portanto, com a incorporação eficaz do íon, alcançou-se uma concentração adequada que proporciona um efeito antimicrobiano. Quanto a viabilidade celular, todas as superfícies apresentaram viabilidade.

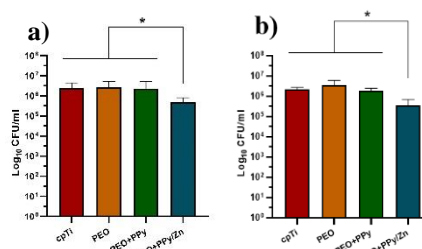


Figura 6. Ensaios microbiológicos. a) Contagens de biofilme de *S. sanguini* (UFC/mL) e b) Contagens de biofilme de *E.coli* (UFC/mL). Asteriscos diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$, teste ANOVA unidirecional)

4. CONCLUSÃO

O filme PEO+PPy é promissor por possuir adequadas propriedades biológicas e mecânicas. Além disso, a adição de Zn proporcionou efeito antimicrobiano e demonstrou citocompatibilidade, evidenciando ser um revestimento promissor para melhorar a longevidade de implantes dentários e reduzir os índices de doenças peri-implantares.

REFERÊNCIAS

- B. Rikhari, S. Pugal Mani, N. Rajendran, Comportamento eletroquímico do revestimento composto de polipirrol/quitosana em metal Ti para aplicações biomédicas, *Carbohydr. Polim.* 189 (2018) 126e137, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.042>.
- Borges MHR, Nagay BE, Costa RC, Sacramento CM, Ruiz KG, Lander R, Van den Beucken JJJP, Fortulan CA, Rangel EC, da Cruz NC, Barão VAR. A tattoo-inspired electrosynthesized polypyrrole film: crossing the line toward a highly adherent film for biomedical implant applications. *Materials Today Chemistry.* 2022, 26: 101095. doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.101095.
- Borges MHR, Nagay BE, Costa RC, Souza JGS, Mathew MT, Barão VAR. Recent advances of polypyrrole conducting polymer film for biomedical application: Toward a viable platform for cell-microbial interactions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2023 Apr;314:102860. doi: 10.1016/j.cis.2023.102860. Epub 2023 Feb 16. PMID: 36931199.
- C. Dini, RC Costa, C. Sukotjo, CG Takoudis, MT Mathew, VAR Barão, Progressão da biotribocorrosão em implantodontia, *Front. Mecânico. Eng.* 6 (2020) 1, <https://doi.org/10.3389/fmech.2020.00001>.
- Cordeiro JM, Beline T, Ribeiro ALR, Rangel EC, da Cruz NC, Landers R, Faverani LP, et al. (2017). Development of binary and ternary titanium alloys for dental implants. *Dental Materials* 33 (11): 1244-57.
- Cordeiro, J. M. Et al. Development Of Binary And Ternary Titanium Alloys For Dental Implants. *Dental Materials: Official Publication Of The Academy Of Dental Materials*, V. 33, N. 11, P. 1244–1257, 2017.
- Costa RC, Nagay BE, Bertolini M, Costa-Oliveira BE, Sampaio AA, Retamal-Valdes B, Shibli JA, Feres M, Barão VAR, Souza JGS. Fitting pieces into the puzzle: The impact of titanium-based dental implant surface modifications on bacterial accumulation and polymicrobial infections. *Adv Colloid Interface Sci.* 2021 Dec;298:102551. doi: 10.1016/j.cis.2021.102551.
- Costa RC, Souza JGS, Bertolini M, Retamal-Valdes B, Feres M, Barão VAR. Extracellular biofilm matrix leads to microbial dysbiosis and reduces biofilm susceptibility to antimicrobials on titanium biomaterial: An in vitro and in situ study. *Clin Oral Implants Res.* 2020b Dec;31(12):1173-1186. doi: 10.1111/clr.13663.
- Costa RC, Souza JGS, Cordeiro JM, Bertolini M, de Avila ED, Landers R, Rangel EC, Fortulan CA, Retamal-Valdes B, da Cruz NC, Feres M, Barão VAR. Synthesis of bioactive glass-based coating by plasma electrolytic oxidation: Untangling a new deposition pathway toward titanium implant surfaces. *J Colloid Interface Sci.* 2020 Nov 1;579:680-698. doi: 10.1016/j.jcis.2020.06.102.
- Nagay BE, Dini C, Cordeiro JM, Ricomini-Filho AP, de Avila ED, Rangel EC, da Cruz NC, et al. (2019). Visible-light-induced Photocatalytic and Antibacterial Activity of TiO₂ Codoped with Nitrogen and Bismuth: New Perspective to Control Implant-biofilm-related Disease. *ACS Applied Materials & Interfaces* 11 (20): 18186-202
- Souza JGS, Lima CV, Costa Oliveira BE, Ricomini-Filho AP, Faveri M, Sukotjo C, Feres M, Del Bel Cury AA, Barão VAR. Dose-response effect of chlorhexidine on a multispecies oral biofilm formed on pure titanium and on a titanium-zirconium alloy. *Biofouling.* 2018 Nov;34(10):1175-1184. doi: 10.1080/08927014.2018.1557151.
- Souza JGS, Oliveira BEC, Bertolini M, Lima CV, Retamal-Valdes B, de Faveri M, Feres M, et al. (2019). Titanium particles and ions favor dysbiosis in oral biofilms. *Journal of Periodontal Research* 55 (2): 258-266.
- Y. Wang, T. Lei, B. Jiang, L. Guo, Crescimento, microestrutura e propriedades mecânicas de revestimentos de oxidação de microarco em liga de titânio em solução contendo fosfato, *Appl. Surf. Ciênc.* 233 (2004) 258e267, <https://doi.org/10.1016/j.assusc.2004.03>.