

## Investigação do potencial antimicrobiano de extratos de própolis brasileira em biofilmes polimicrobianos e sua influência na performance eletroquímica de superfícies de titânio

**Palavras-Chave:** Própolis, antimicrobiano, comportamento eletroquímico, implantes dentários.

**Autores(as):**

JÚLIA MARIA TEIXEIRA TEODORO, FOP – UNICAMP

MARIA HELENA ROSSY BORGES, FOP – UNICAMP

CÍCERO ANDRADE SIGILIAO CELLES – UNICAMP

ELIDIANE CIPRIANO RANGEL - UNESP

BRUNA EGUMI NAGAY - UNICAMP

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

### 1. Objetivo do estudo

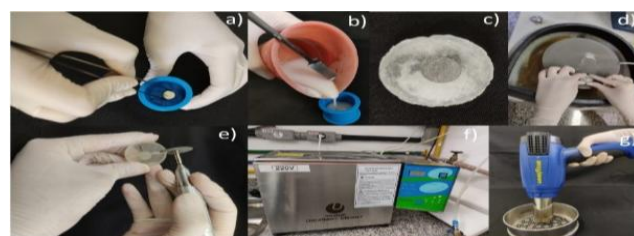
Considerando que as doenças peri-implantares estão associadas ao acúmulo de biofilmes, principalmente em superfícies rugosas, como as tratadas com SLA, e que agentes naturais como a própolis verde e vermelha têm potencial antimicrobiano, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da imersão em extratos de própolis sobre a atividade antimicrobiana, viabilidade celular e desempenho químico-físico de superfícies de titânio, visando seu uso como estratégia complementar no controle de contaminação peri-implantar.

### 2. Metodologias

#### 2.1. Preparo das amostras

Discos de Ti6Al4V foram incluídos e polidos 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).

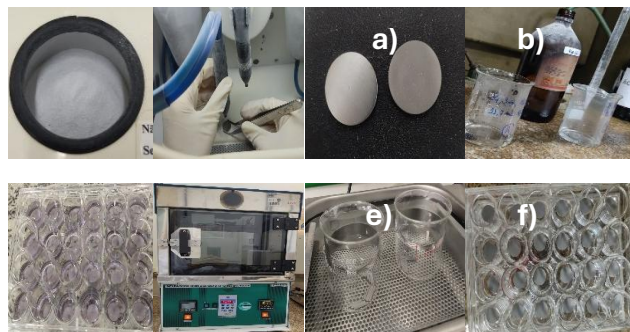


**Figura 1-** Preparo das amostras. (a) posicionamento dos discos em um porta discos; (b) e (c) inclusão das amostras em resina acrílica; (d) polimento em uma politriz automática; (e) desinclusão; (f) e (g) lavagem e secagem dos espécimes, respectivamente. *Fonte:* Arquivo da bolsista e do grupo de pesquisa

#### 2.2. Síntese da superfície tipo SLA

As amostras foram tratadas com jateamento de óxido de alumínio ( $Al_2O_3$ ) e duplo ataque ácido ( $HCl/H_2SO_4$ ), conforme protocolo prévio (Costa et al., 2020). O jateamento foi realizado por 30 segundos a 50 mm da superfície em apenas uma face do espécime. Os discos foram imersos em 1 mL da solução ácida por 1 hora a 60 °C em estufa agitadora. Após o tratamento, as amostras foram limpas em cuba

ultrassônica com água destilada (2 ciclos de 10 minutos) e secas à temperatura ambiente (Marchezinia et al., 2022).



**Figura 2.** Tratamento de superfície do tipo SLA. (a) preenchimento do compartimento do equipamento jateador com  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; (b) procedimento de jateamento sobre a amostra; (c) diferença visual entre o disco maquinado (esquerda) e o disco após o jateamento (direita); (d) preparo da solução ácida de  $\text{HCl}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; (e) imersão dos discos na solução ácida; (f) incubação das amostras em estufa agitadora; (g) lavagem e (h) secagem em temperatura ambiente. Fonte: Arquivo da bolsista e do grupo de pesquisa.

### 2.3. Caracterizações de superfície

**Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e 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  $1 \mu\text{m}^3$  ( $n = 3$ ) (Matos et al., 2017).

**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 ( $10 \mu\text{L}$ ) 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  $0,05 \text{ mm/s}$  durante 12 s (Costa et al., 2020).

### 2.4. Testes microbiológicos

**Formação da película salivar:** Saliva humana foi coletada e os volumes foram submetidos à centrifugação ( $10.000 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) por 10 min. O sobrenadante foi filtrado com membrana de filtração de  $0,22 \mu\text{m}$  (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  $1 \text{ mL}$  de saliva filtrada e incubadas em uma estufa contendo 10% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  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 (87682625.8.0000.5418).

**Adesão e formação de biofilme:** Após a formação da película salivar, os discos foram submetidos à formação de biofilme em duas fases. Na fase 1, foram incubados por 48 h com  $100 \mu\text{L}$  de saliva humana não filtrada e  $900 \mu\text{L}$  de meio de cultura (90% FUMm + 10% BHI), sendo expostos à sacarose 10% por 3 minutos para estimular a formação da matriz extracelular. Após esse período, parte das amostras foram tratadas e as demais seguiram para a segunda etapa. Na fase 2 os biofilmes foram novamente inoculados com  $100 \mu\text{L}$  de saliva e incubados por mais 48 h em condições de anaerobiose, totalizando 96 h de crescimento. Essa abordagem permitiu o desenvolvimento de biofilmes maduros, simulando condições supra e subgengivais para avaliar o efeito da imersão em soluções de própolis.

## 2.5. Terapia de descontaminação com própolis

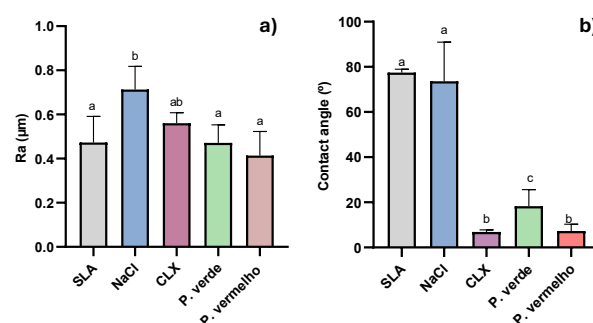
Após a formação dos biofilmes, os discos foram imersos por 5 minutos em 1 mL de soluções controle ou de própolis, conforme dados prévios. A descontaminação e as análises microbiológicas foram conduzidas em biofilmes supragengivais (aeróbios) e subgengivais (anaeróbios). Após, os discos foram lavados, agitados em vortex e sonicados. Para realizar a contagem de unidades formadoras de colônias ( $\log_{10}$  UFC/mL), as suspensões foram diluídas e semeadas em meios de cultura específicos (CBA e FAA), incubadas sob condições adequadas (aerobiose e anaerobiose) e a biomassa do biofilme foi quantificada por peso seco. Além disso, MEV foi realizado para analisar a estrutura do biofilme formado.

## 3. Resultados e discussões

### 3.1. Rugosidade e molhabilidade

Os resultados de rugosidade (Figura 3) demonstram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da rugosidade nos grupos imersos em NaCl, podendo estar relacionado com a formação de cristais de cloreto de sódio na superfície. Já os grupos experimentais não alteraram estatisticamente a rugosidade da superfície SLA, houve apenas uma ligeira redução para o grupo P. vermelho, fator que pode estar relacionado com a formação de uma película semelhante a um verniz sobre o disco devido a presença de emulsificante (lecitina de girassol) em sua composição, sendo possível a visualização após a descontaminação.

O aumento na rugosidade após a imersão em NaCl possivelmente influenciou na molhabilidade. Apesar de não apresentar diferença estatística com o grupo SLA, houve ligeira hidrofobicidade, devido a permanência de sais inorgânicos com efeitos higroscópicos na superfície das amostras (Li et al., 2020). Ademais, as soluções antimicrobianas aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a hidrofobicidade da superfície, sendo justificado devido à própolis ser majoritariamente composta por compostos hidrofóbicos, como resinas, ceras, flavonoides e ácidos fenólicos (Flores et al., 2024). Um aumento na rugosidade de um material tende a intensificar a hidrofobicidade do revestimento. No entanto, é crucial considerar outros fatores na interpretação dos resultados, como a composição química do tratamento (Silva et al., 2023; Costa et al., 2020) e alcançar o equilíbrio entre os dois fatores.



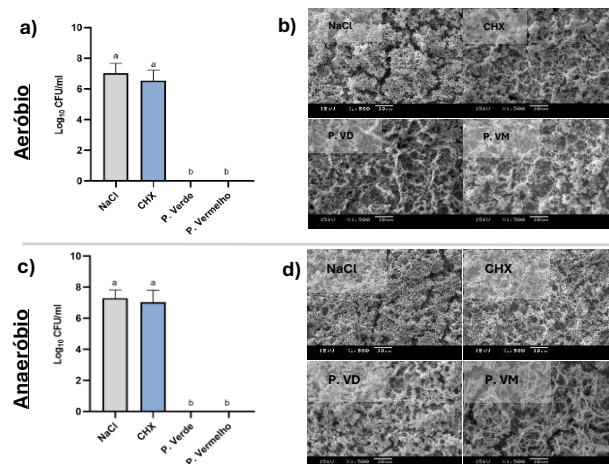
**Figura 3.** caracterização superficial dos filmes e propriedade mecânica. a) rugosidade aritmética. b) . ângulo de contato com a água. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).

### 3.2. Testes microbiológicos

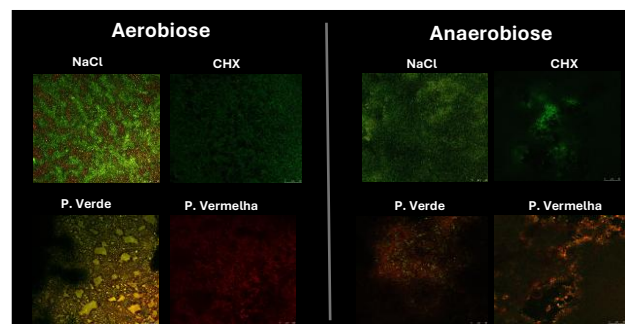
Os achados microbiológicos demonstraram redução quase total de unidades formadoras de colônias (Figura 4a,c), tanto em aerobiose quanto em

anaerobiose, após imersão em ambas as própolis em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). As imagens de MEV (Figura 4b,d) e CLSM (Figura 5) corroboram com esse achado, uma vez que, apesar de ser possível observar a presença de biofilme nos grupos experimentais, essa é menor que os demais grupos e, possivelmente, as bactérias observadas foram inviabilizadas pelos extratos. Sendo assim, mesmo que sobre uma superfície rugosa, que tendência ao aumento de adesão microbiana, essas soluções foram capazes de reduzir a formação de biofilme. As propriedades antimicrobianas da própolis são atribuídas principalmente aos flavonoides e outros compostos bioativos, como fenóis, terpenos e flavanonas, que atuam causando danos à membrana bacteriana, inibindo enzimas, aumentando o estresse oxidativo e modulando a virulência (Florez et al., 2024). A própolis também inibe a enzima glicosiltransferase (GTF), dificultando a formação inicial do biofilme (Koo et al., 2002). Vale ressaltar que os dados não apresentaram diferença estatística entre o NaCl e a clorexidina. Considerando que a clorexidina 0,2% utilizada neste estudo não apresentou os efeitos antimicrobianos esperados, conforme amplamente relatado na literatura científica, levantamos a hipótese de que possa ter ocorrido alguma interferência relacionada à sua formulação ou possível contaminação durante o processo de manipulação, mesmo tratando-se de uma solução recentemente preparada. Em função dessa inconsistência, optamos por repetir os testes utilizando uma nova solução de clorexidina, proveniente de outro fabricante e com controle de qualidade industrial, a fim de garantir maior

reprodutibilidade, confiabilidade metodológica e alinhamento com os dados disponíveis na literatura.



**Figura 4.** Ensaios microbiológicos. a) Contagem de Unidades Formadoras de Colônia ( $\log_{10}$  UFC/mL) e b) MEV de biofilme polimicrobiano após 48 horas de formação do biofilme (fase aeróbia); c) Contagem de Unidades Formadoras de Colônia ( $\log_{10}$  UFC/mL) e d) MEV de biofilme polimicrobiano após 72 horas de formação do biofilme (fase anaeróbia). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).



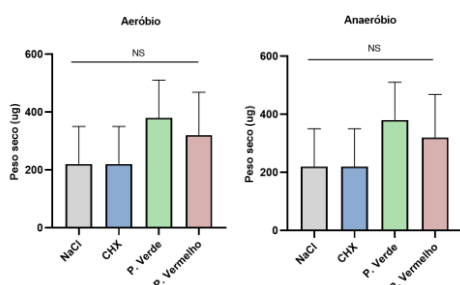
**Figura 5.** isosuperfícies de imagens CLSM representativas.

Um achado curioso é a redução quase total na contagem de UFC. Dessa forma, testes de diluições indicaram que, mesmo em concentrações menores, a própolis manteve efeito antimicrobiano, o que favorece seu uso terapêutico. Os extratos utilizados apresentaram cerca de 30% de compostos fenólicos, bem acima do mínimo exigido (5%), o que pode justificar sua alta eficácia (Pinto et al., 2011).

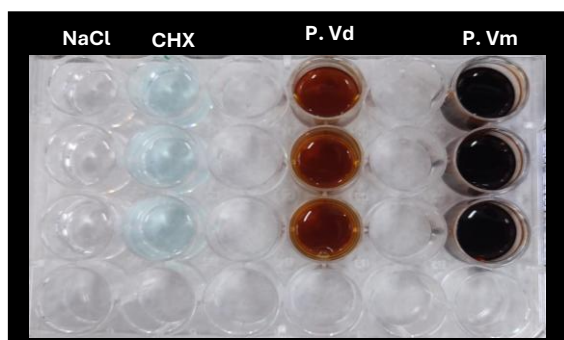
Quanto ao peso seco (Figura 6), foi possível observar ligeiro aumento para os grupos experimentais. Apesar desses achados não



corroborarem com o observado nas análises UFC, MEV E CLSM, acreditamos que esse aumento pode estar diretamente relacionado com a presença de emulsificante, corantes naturais e componentes insolúveis oriundos das ceras das abelhas na composição da própolis. Como consequência, o biofilme remanescente apresentou maior viscosidade em relação aos demais, influenciando no peso final na biomassa bacteriana remanescente



**Figura 6.** Peso seco após protocolos de desinfecção sobre biofilmes aeróbio e anaeróbio.



**Figura 7.** Diferença de coloração e viscosidade das substâncias de desinfecção.

#### 4. Conclusão

As própolis verde e vermelha, apesar de diferenças em sua composição química, demonstraram eficácia antimicrobiana e propriedades físico-químicas favoráveis, revelando-se uma alternativa natural promissora para aplicação clínica em contextos peri-implantares.

#### REFERÊNCIAS

- 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.
- Dini C, Nagay BE, Cordeiro JM, da Cruz NC, Rangel EC, Ricomini-Filho AP, and Barão VAR (2020). UV-photofunctionalization of a biomimetic coating for dental implants application. *Materials Science and Engineering: C*, 110: 110657.
- Flores A.I.M., Malagon S., Ocampo S., Leal-Marin S., Gonzales J.H.G., Diaz-Cano A., Lopera A., Paucar C., Ossa A. Propriedades antibacterianas e osteoindutoras de scaffolds de wollastonita impregnados com própolis produzidos por manufatura aditiva. *Heliyon* 10 (2024) e23955.
- Kopralos V., Rukke H.V., Orstavik D., Koutroulis A., Camilleri J., Sunde P.T. Antimicrobial and physicochemical characterization of endodontic sealers after exposure to chlorhexidine digluconate. *The Academy of Dental Materials*, 2021; 37:249-263.
- Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017 Jul;62:1-12. doi: 10.1016/j.jdent.2017.04.011.
- Matos AO, Ricomini-Filho AP, Beline T, Ogawa ES, Costa-Oliveira BE, Almeida AB, Nociti Junior FJ, et al. (2017). Three-Species Biofilm Model onto Plasma-Treated Titanium Implant Surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 152, 354–66.
- 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 TiO<sub>2</sub> Codoped with Nitrogen and Bismuth: New Perspective to Control Implant-biofilm-related Disease. *ACS Applied Materials & Interfaces* 11 (20): 18186-202.
- Noronha Oliveira M, Schunemann W, Mathew MT, Henriques B, Magini RS, Teughels W, Souza J (2018) Can degradation products released from dental implants affect peri-implant tissues? *J Periodontal Res* 1:1–11. <https://doi.org/10.1111/jre.12479>
- 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.