



## AValiação DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE REVESTIMENTO DE TiO<sub>2</sub> DOPADO COM NITROGÊNIO E BISMUTO ASSOCIADO À TERAPIA FOTODINÂMICA SOB LUZ VISÍVEL

Ariane Bezerra Santos, Bruna Egumi Nagay, Valentim Adelino Ricardo Barão

Departamento de Prótese e Periodontia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Piracicaba, Brasil

### Introdução e objetivo

Apesar das altas taxas de sucesso de reabilitações com implantes dentários (Vandeweghe et al., 2016), o surgimento de doenças associadas ao biofilme, como a mucosite peri-implantar e a peri-implantite, tornou-se um desafio clínico frequente (Lee et al., 2017; Schwarz et al., 2018). Ao considerar a peri-implantite, vários métodos terapêuticos têm sido preconizados para o controle e descontaminação do biofilme local, entretanto, devido à possibilidade de traumas na superfície do material (ocasionado pela curetagem), à dificuldade da remoção bacteriana no implante (design geométrico) (Györgyey et al., 2016), ao aumento da resistência bacteriana aos antibióticos (Kanwar, Sah e Suresh, 2017), há a necessidade de maior enfoque em terapias mais específicas para o controle do biofilme (Huang et al., 2019; López-Píriz et al., 2019; Nagay et al., 2019). A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do inglês, *antimicrobial photodynamic therapy*) têm se destacado por ser um método não-invasivo capaz de reduzir o biofilme sobre a superfície do implante sem causar danos físicos ao material (Giannelli et al., 2017). Este método terapêutico baseia-se na aplicação de luz visível sobre o local infectado previamente exposto a um fotossensibilizador (Huang et al., 2019). A ativação do fotossensibilizador com um comprimento de onda específico para o mesmo, como o azul de metileno irradiado por luz a aproximadamente 660 nm, resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) capazes de causar danos aos componentes da bactéria com consequente morte celular (Calzavara-Pinton et al., 2012; Huang et al., 2019; Kharkwal et al., 2011). No entanto, estudos recentes demonstraram que ainda não há um consenso sobre a real eficácia desse tratamento sobre os preconizados atualmente (Albaker et al., 2018; Chambrone, Wang e Romanos, 2018).

Dentro do contexto de processos fotoquímicos, o revestimento fotocatalítico sobre a superfície do titânio também é uma opção para a formação de EROs ao ser irradiado sob luz visível. Um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa relatou o efeito bactericida de revestimento de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) dopado com nitrogênio (N) e bismuto (Bi) sintetizado via plasma eletrolítico de oxidação (PEO) sobre a superfície de titânio comercialmente puro (Ticp) contra o biofilme oral de duas espécies (24 h) composto por *Streptococcus sanguinis* e *Actinomyces naeslundii* após irradiação por 30 minutos com luz visível (LED 105 W, 45 mW/cm<sup>2</sup>,  $\lambda = 420 - 690$  nm) (Nagay et al., 2019). Tendo em vista que este revestimento é ativo sob a exposição de luz com comprimento de onda compatível ao do azul de metileno ( $\sim 660$  nm) (Calzavara-Pinton et al., 2011), a associação de ambas as técnicas poderia produzir um efeito sinérgico na formação de EROs, e

consequentemente maior potencial antibacteriano para o controle de infecções peri-implantares, sem causar danos físicos à superfície do material nem aos tecidos orais, pois apresentam boa biocompatibilidade (Giannelli et al., 2017; Nagay et al., 2019).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e o efeito do sinergismo das técnicas supracitadas sobre a superfície de Ticp após irradiação do biofilme com luz visível.

## Materiais e Métodos

O delineamento experimental do estudo está ilustrado na Figura 1. Inicialmente, todos os discos de Ticp (Realum Indústria e Comércio de Metais Puros e Ligas Ltd.) foram polidos (#320 e #400) em uma politriz automática (EcoMet 300 Pro with AutoMet 250; Buehler) (Barão et al., 2011; Barão et al., 2012). Os discos polidos foram utilizados como controle. Como grupo de tratamento via PEO contendo  $\text{TiO}_2$  na superfície, sem o composto bismuto, este foi sintetizado com solução eletrolítica contendo acetato de amônio (Synth). Para a incorporação do bismuto ( $\text{Bi-TiO}_2$ ), foi acrescido à essa solução 0,001M de nitrato de bismuto (Dinâmica Química Contemporânea). Ainda, para dissolver completamente o bismuto, utilizou-se ácido nítrico em ambas as soluções (para padronização) (20 mL de ácido nítrico 65% + 480 mL de água deionizada). Os tratamentos foram realizados com tensão de 250 V, frequência de 1000 Hz e ciclo de trabalho fixado em 10% durante um tempo de tratamento de 7 minutos (Nagay et al., 2019). Depois, as amostras foram lavadas com água deionizada e secas ao ar livre.

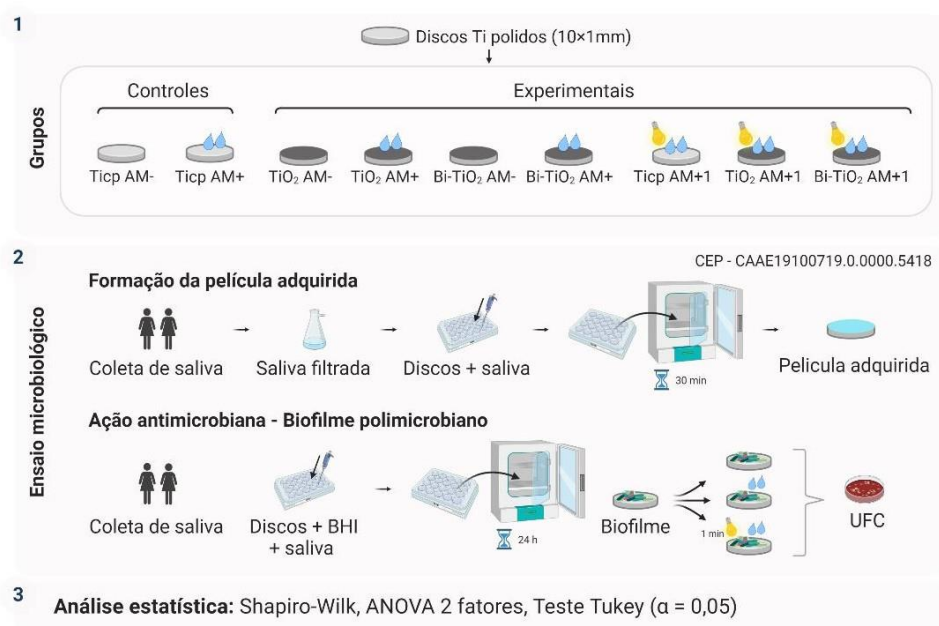


Figura 1. Delineamento experimental. 1) Discos polidos foram distribuídos de acordo com os grupos controle e experimentais; 2) Sequência do ensaio microbiológico em que houve formação da película adquirida sobre os discos para a subsequente formação do biofilme polimicrobiano e tratamentos; 3) Ao final, os dados foram analisados estatisticamente ao nível de significância de 5%. Ti = titânio; Ticp = titânio comercialmente puro; AM = azul de metileno;  $\text{TiO}_2$  = dióxido de titânio; Bi = bismuto; +1 = 1 minuto de irradiação; CEP = comitê de ética em pesquisa; BHI = *brain heart infusion*; UFC = unidades formadoras de colônias. Imagem criada com o software BioRender.

Em seguida, os discos foram distribuídos aleatoriamente de acordo com o tratamento de superfície e a exposição ou não ao corante azul de metileno (AM; 200 µg/mL) (Huang et al., 2019) para serem testados quanto ao efeito antimicrobiano (n = 3): I. Discos de Ticp polidos como controle (Ticp AM-); II. Discos de Ticp polidos + 200 µg/mL de AM (Ticp AM+); III. Discos de Ticp + revestimento de PEO sem bismuto (TiO<sub>2</sub> AM-); IV. Discos de Ticp + revestimento de PEO sem bismuto + 200 µg/mL de AM (TiO<sub>2</sub> AM+); V. Discos de Ticp + revestimento de PEO com bismuto (Bi-TiO<sub>2</sub> AM-); VI. Discos de Ticp + revestimento de PEO com bismuto + 200 µg/mL de AM (Bi-TiO<sub>2</sub> AM+). Além disso, amostras adicionais expostas ao corante foram irradiadas por 1 min (Ticp AM+1, TiO<sub>2</sub> AM+1 e Bi-TiO<sub>2</sub> AM+1) (n = 3) com luz visível.

Para a condução do ensaio microbiológico, este estudo foi inicialmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (CAAE19100719.0.0000.5418). Os discos previamente esterilizados em luz UV foram inseridos em placas de 24 poços e submetidos à formação da película adquirida com 1 mL de saliva estimulada filtrada coletada de 2 voluntários saudáveis por 30 minutos (37 °C; 10% CO<sub>2</sub>) (Nagay et al., 2019). Em seguida, para formação do biofilme foi utilizando um modelo de microcosmo (saliva como inóculo) (Souza et al., 2020). Para isso, após a formação da película adquirida sobre os discos, estes foram transferidos para novas placas contendo 100 µL de inóculo de saliva e 900 µL de meio *Brain Heart Infusion* (BHI) caldo e incubadas por 24 horas (37 °C; 10% CO<sub>2</sub>) para a formação de biofilme. Posteriormente, os discos foram lavados 1× em NaCl 0,9% e transferidos para novas placas de 24 poços contendo 1 mL de PBS para os grupos sem corante, e 100 µL de corante azul de metileno (200 µg/mL) para os grupos com corante.

Os grupos Ticp AM+, TiO<sub>2</sub> AM+, Bi-TiO<sub>2</sub> AM+, Ticp AM+1, TiO<sub>2</sub> AM+1 e Bi-TiO<sub>2</sub> AM+1 ficaram mantidos em contato com o corante durante 1 minuto no escuro (placa embrulhada com papel alumínio) para permitir a adsorção do AM ao interior das bactérias (Ghasemi *et al.*, 2019). Posteriormente, a placa contendo os discos a serem irradiados, sofreram irradiação por luz visível a uma distância de 6,5 cm no interior de uma caixa customizada (LED 105W, 45 mW/cm<sup>2</sup>, λ = 420 – 690 nm) (Huang et al., 2019; Nagay et al., 2019) por 1 min. Após a irradiação, os discos foram lavados, sonicados (7 W, 30 segundos) e a suspensão celular foi diluída serialmente para 20 µL de cada diluição seres semeadas em placas de Columbia Blood Ágar (CBA). As placas foram incubadas por 24 horas (37 °C; 10% CO<sub>2</sub>) para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Os dados foram expressos em UFC por mL (UFC/mL).

Os dados quantitativos de número de unidades formadoras de colônia foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, ANOVA 2-fatores e teste Tukey com nível de significância de 5%.

## Resultados

Além de investigar o efeito antibacteriano do revestimento sob a ação do azul de metileno e da luz, é necessário analisar a viabilidade bacteriana em função apenas do corante (sem luz). Para isso, considera-se apenas os discos de Ticp polidos (Nagay et al., 2019). De acordo com os resultados sem a presença de luz (Figura 2A), não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos de Ticp polido com e sem corante (p = 0,390), indicando que o corante propriamente dito não tem ação antimicrobiana. Quando

avaliados os tratamentos de superfícies com e sempre a presença de AM, a única diferença estatística observada foi para o grupo Bi-TiO<sub>2</sub> AM+, que apresentou contagem de células bacterianas viáveis significativamente menor quando comparado ao grupo TiO<sub>2</sub> AM- ( $p = 0,0284$ ). Com a possibilidade da área superficial estar relacionada com a adesão bacteriana à superfície do Ti (Han et al., 2016), e sabendo que o revestimento catalítico apresenta efeito antibacteriano na condição de exposição ao corante (Nagay et al., 2019), pode-se sugerir que este resultado deve-se à menor área superficial do Bi-TiO<sub>2</sub> comparado ao TiO<sub>2</sub> (1,97 cm<sup>2</sup> vs 2,45 cm<sup>2</sup>) e à presença de atividade catalítica para o mesmo (Nagay et al., 2019).

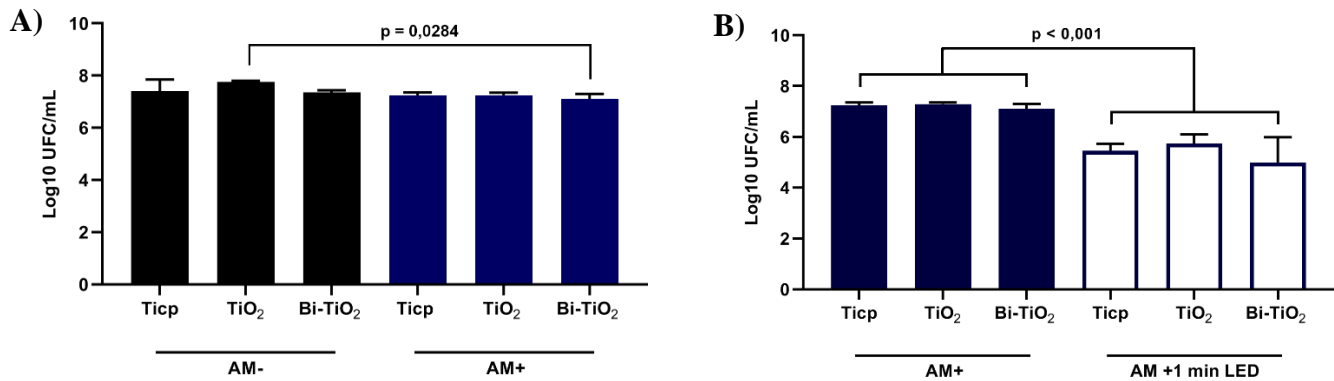


Figura 2. Contagem de UFC (Log<sub>10</sub> UFC/mL) de biofilme (24 h; saliva como inóculo) formado sobre as superfícies de Ticp, TiO<sub>2</sub> e Bi-TiO<sub>2</sub> A) sem (AM-) e com exposição ao corante AM (AM+) sem irradiação; e B) com exposição AM no escuro (AM+) e após 1 minuto de irradiação por luz visível (AM +1).

Com relação à atividade antimicrobiana pela ação da terapia fotodinâmica, pode-se observar na Figura 2B que os grupos com AM submetidos à irradiação por 1 minuto de luz visível apresentaram redução significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado aos grupos não irradiados. Esse resultado comprova a ação da terapia fotodinâmica do corante azul de metileno 200 µg/mL associado à luz visível LED utilizada neste estudo. Apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significante entre o grupo Ticp AM+1 e o grupo Bi-TiO<sub>2</sub> AM+1, é possível notar uma tendência de redução na contagem microbiana (~0,5 log). Ao considerar que os resultados tendem a ser favoráveis para o revestimento fotocatalítico de Bi-TiO<sub>2</sub> associado à terapia fotodinâmica, sugere-se análises futuras da resposta do tratamento frente a um tempo maior de luz visível.

## Conclusão

A associação do corante AM à luz visível LED apresentou redução polimicrobiana para todas as superfícies (Ti polido, TiO<sub>2</sub> e Bi-TiO<sub>2</sub>) comparado aos grupos não irradiados, o que sugere que o mesmo pode ser utilizado como terapia fotodinâmica antimicrobiana. Além disso, o revestimento fotocatalítico de TiO<sub>2</sub> dopado com Bi via PEO com AM apresentou redução polimicrobiana comparado ao TiO<sub>2</sub> sem corante no escuro, e tendência de redução na contagem microbiana (~0,5 log) quando associado à terapia fotodinâmica após 1 minuto de irradiação do biofilme com luz visível.

## Referências

- Albaker AM, ArRejaie AS, Alrabiah M, Abduljabbar T. Effect of photodynamic and laser therapy in the treatment of peri-implant mucositis: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;21:147–152.
- Barão VA, Mathew MT, Assunção WG, Yuan JC, Wimmer MA, Sukotjo C. The role of lipopolysaccharide on the electrochemical behavior of titanium. *J Dent Res.* 2011;90(5):613–618.
- Barão VA, Mathew MT, Assunção WG, Yuan JC, Wimmer MA, Sukotjo C. Stability of cp-Ti and Ti-6Al4V alloy for dental implants as a function of saliva pH - an electrochemical study. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(9):1055–1062.
- Calzavara-Pinton P, Rossi M, Sala R, Venturini M. Photoprotection and abnormal cutaneous photosensitivity. *Expert Rev Dermatol* 2011;6(3):455–464.
- Calzavara-Pinton P, Rossi MT, Sala R, Venturini M. Photodynamic Antifungal Chemotherapy†. *Photochem Photobiol.* 2012;88(5):512–522.
- Chambrone L, Wang H, Romanos GE. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of periodontitis and peri-implantitis: An American Academy of Periodontology best evidence review. *J Periodontol.* 2018;89(7):783–803.
- Cordeiro JM, Pantaroto HN, Paschoaleto EM, Rangel EC, Cruz NC da, Sukotjo C, Barão VAR. Synthesis of biofunctional coating for a TiZr alloy: Surface, electrochemical, and biological characterizations. *Appl Surf Sci.* 2018;452:268–278.
- Ghasemi M, Etemadi A, Nedaei M, Chiniforush N, Pourhajibagher M. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy using two different light sources on the titanium-adherent biofilms of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:85–89.
- Giannelli M, Landini G, Materassi F, Chellini F, Antonelli A, Tani A, Nosi D, Zecchi-Orlandini S, Rossolini GM, Bani D. Effects of photodynamic laser and violet-blue led irradiation on *Staphylococcus aureus* biofilm and *Escherichia coli* lipopolysaccharide attached to moderately rough titanium surface: in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2017;32(4):857–864.
- Györgyey Á, Janovák L, Ádám A, Kopniczky J, Tóth KL, Deák Á, Panayotov I, Cuisinier F, Dékány I, Turzó K. Investigation of the in vitro photocatalytic antibacterial activity of nanocrystalline TiO<sub>2</sub> and coupled TiO<sub>2</sub> /Ag containing copolymer on the surface of medical grade titanium. *J Biomater Appl.* 2016;31(1):55–67.
- Han A, Li X, Huang B, Tsoi JKH, Matinlinna JP, Chen Z, Deng DM. The Effect of Titanium Implant Surface Modification on the Dynamic Process of Initial Microbial Adhesion and Biofilm Formation. *Int. J. Adhes. Adhes.* 2016, 69, 125–132.
- Huang TC, Chen CJ, Ding SJ, Chen CC. Antimicrobial efficacy of methylene blue-mediated photodynamic therapy on titanium alloy surfaces in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;25:7–16.
- Kanwar I, Sah AK, Suresh PK. Biofilm-mediated Antibiotic-resistant Oral Bacterial Infections: Mechanism and Combat Strategies. *Curr Pharm Des.* 2017;23(14):2084-2095.
- Kharkwal GB, Sharma SK, Huang Y, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med.* 2011;43(7):755–67.
- Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017;62:1–12.
- López-Pérez R, Cabal B, Goyos-Ball L, Fernández A, Bartolomé JF, Moya JS, Torrecillas R. Current state-of-the-art and future perspectives of the three main modern implant-dentistry concerns: Aesthetic requirements, mechanical properties, and peri-implantitis prevention. *J Biomed Mater Res A.* 2019 Jul;107(7):1466-1475.
- Nagay BE, Dini C, Cordeiro JM, et al. Visible-Light-Induced Photocatalytic and Antibacterial Activity of TiO<sub>2</sub> Codoped with Nitrogen and Bismuth: New Perspectives to Control Implant-Biofilm-Related Diseases. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(20):18186–18202.
- Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2018 Jun;45 Suppl 20:S246-S266.
- Souza JGS, Bertolini M, Costa RC, Cordeiro JM, Nagay BE, de Almeida AB, Retamal-Valdes B, Nociti FH, Feres M, Rangel EC, Barão VAR. Targeting Pathogenic Biofilms: Newly Developed Superhydrophobic Coating Favors a Host-Compatible Microbial Profile on the Titanium Surface. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020;12(9):10118-10129.
- Vandeweghe S, Ferreira D, Vermeersch L, Mariën M, De Bruyn H. Long-term retrospective follow-up of turned and moderately rough implants in the edentulous jaw. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(4):421–426.