

## COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO DO PLASMA TÉRMICO E NÃO TÉRMICO NA PREVENÇÃO DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA EM SUPERFÍCIES DE TITÂNIO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Guilherme Ramon Vieira da Silva<sup>1</sup>; Gabriel de Moura Martins<sup>1</sup>; Caio Sérgio Santos<sup>1</sup>; Francisco Marlon Carneiro Feijó<sup>1</sup>; Clodomiro Alves Junior<sup>1</sup>; Carlos Eduardo Bezerra de Moura<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

**Área temática:** Biotecnologia e Inovação em Saúde

**Modalidade:** Comunicação Oral

**E-mail do autor:** [guilherme.silva95163@alunos.ufersa.edu.com](mailto:guilherme.silva95163@alunos.ufersa.edu.com)

### RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Uma das limitações ao sucesso dos implantes é a contaminação com adesão de bactérias nas superfícies e formação dos biofilmes. Deste modo, é necessário o desenvolvimento de técnicas para inibir o crescimento das colônias, visando a redução de custos e a diminuição dos riscos para o paciente. O plasma consiste num gás ionizado, formado por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que quando aplicado a implantes é capaz de melhorar a biocompatibilidade de suas superfícies. **OBJETIVO:** Comparar o efeito do plasma atmosférico a frio (CAP) e de uma modalidade de plasma térmico de baixa pressão, a nitretação, na prevenção de contaminação bacteriana. **MÉTODOS:** Foram utilizados três tipos de superfícies de discos de Ti: polida (grupo controle), nitretada e tratada por CAP. Primeiramente, os discos foram lixados de maneira gradual, polidos e limpos por tratamento de ultrassom. Uma parte dos discos foi destinada a realizar o tratamento a CAP, em outra foi realizado o tratamento por nitretação. O CAP foi obtido nas seguintes condições: a aplicação durou 15 minutos com uma distância de  $20 \pm 1$  mm entre a amostra e o aparelho com tensão de 15Kv, frequência de 600Hz e 1 L/min de hélio sobre as amostras. A nitretação foi realizada a uma temperatura de 450°C durante 1h com pressão de 1 mbar em atmosfera nitretante (36N<sub>2</sub> e 24H<sub>2</sub>). As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram cultivadas aerobicamente a 37 °C com meio Brain Heart Infusion Broth (BHI) durante 24 horas para formação das colônias. Para avaliar a adesão das bactérias foram incubadas alíquotas de 1mL de suspensão bacteriana sobre os três tipos de superfície por quatro horas. Após esse tempo de incubação, as amostras foram submetidas ao processamento e análise de microscópio eletrônico de varredura. **RESULTADOS:** As amostras tratadas por CAP apresentaram a menor taxa de unidades formadoras de colônia (UFC), predominando bactérias isoladas, ausência da formação de biofilme e poucos detritos celulares. **CONCLUSÃO:** As superfícies tratadas por CAP apresentaram maior capacidade de prevenção da adesão e proliferação bacteriana, quando comparadas com as superfícies nitretadas. Essa capacidade aliada às vantagens do método, como fácil manuseio e menor custo, tornam uma promissora ferramenta para tratamento de implantes biomédicos.

**Palavras-chave:** Biomateriais, plasma atmosférico não térmico, biofilmes bacterianos.

## 1 INTRODUÇÃO

Biofilmes bacterianos são comunidades aderidas a superfícies envolvidas em uma matriz polimérica extracelular. Em ambientes clínicos, muitas vezes, a contaminação e o combate à formação desses biofilmes são negligenciados. No entanto, mesmo com os cuidados e métodos de esterilização, os materiais e implantes utilizados são propensos a contaminação por bactérias e formação do biofilme (KOO et al., 2017). Os biofilmes possuem uma estrutura complexa e devido a isso possui proteção contra o sistema imunológico e resistência a antibióticos, sendo responsável pela falha precoce do implante causada por inflamações dos tecidos peri-implantares (MATOS et al., 2017).

Dispositivos médicos, geralmente, possuem condições de hidrofília, rugosidade e cargas elétricas ideais aumentando os riscos de infecções hospitalares, representando cerca de 25,6% das infecções quando comparadas a outros tipos (ARCIOLA et al., 2018). Uma das bactérias que aparece com maior frequência associada a contaminação em implantes é a *Pseudomonas aeruginosa*, classificada como gram-negativa (WIJESINGHE et al., 2019). A *P. aeruginosa* possui a maior frequência de infecções por pertencer a microbiota humana (YADAV et al., 2017). Além disso, essa bactéria está comumente relacionada a quadros de resistência a antibióticos (HILTUNEN et al., 2017), portanto se faz ainda mais necessário produzir implantes mais resistentes à colonização bacteriana através de métodos acessíveis e baratos.

O plasma consiste em um gás ionizado por fótons UV, elétrons, íons, neutros e radicais livres que são gerados pela aplicação de descargas elétricas sob condições de temperatura ambiente ou em altas temperaturas a vácuo (ALVES JUNIOR et al., 2019). O plasma pode inativar eficientemente bactérias e a formação de biofilmes (AIRES et al., 2017). Contudo esses mecanismos ainda não são completamente compreendidos, mas pesquisas mostram que o plasma além de descontaminar pode ser utilizado para funcionalizar simultaneamente a superfície do implante in vivo, removendo a infecção, e ao mesmo tempo melhorando a biocompatibilidade do implante com o tecido (FLYNN & GILMORE, 2018). Dentre os métodos de plasma, o plasma atmosférico a frio (CAP) vem mostrando ser um método promissor por possuir um baixo custo, dispensar sistemas de vácuo e utilizar baixas temperaturas (MODIC et al., 2019).

## 2 MÉTODO

Foram utilizados discos de titânio com as dimensões pré-definidas de 13 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. Primeiramente, os discos foram lixados de maneira gradual, com lixas de carvão de silício (SiC) com diferentes granulometrias, 220, 440, 600, 1500 e 2000 MESH e polidas em solução coloidal 40% Sílica ( $0,03 \mu$ ) e 60% de peróxido de hidrogênio a 30% durante 30 minutos. Após esse procedimento todas as amostras foram limpas onde os discos foram imersos em solução de 0,5% de detergente enzimático (DEIV) em água bidestilada em tratamento de ultrassom durante 10 minutos. Após duas lavagens, essas amostras foram lavadas em etanol absoluto, seguida da lavagem com água bidestilada e submetidas a ultrassom por 10 minutos.

Quando todos os discos estavam lavados e secos uma parte dos discos foi destinada a realizar o tratamento a CAP durante 15 minutos com uma distância de  $20 \pm 1$  mm entre a amostra e o aparelho com tensão de 15Kv, frequência de 600Hz e 1 L/min de hélio, como gás de trabalho. A nitretação foi realizada a  $450^{\circ}\text{C}$  durante 1h com pressão de 1 mbar em câmara de vácuo hermeticamente fechada com atmosfera nitretante ( $36\text{N}_2$  e  $24\text{H}_2$ ). Após os tratamentos, as superfícies foram caracterizadas quanto à molhabilidade, rugosidade e composição química.

A cultura bacteriana foi preparada utilizando cepas de *Pseudomonas Aeruginosa* (ATCC 25923). As cepas foram cultivadas aerobiamente a  $37^{\circ}\text{C}$  com meio Brain Heart Infusion Broth (BHI) durante 24 horas para formação das colônias. Após a formação das colônias, foi realizado a coleta de 4 colônias que foram diluídas em solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril para atingir uma densidade óptica de  $0,150 \pm 0,003$  a 600 nm (Leitora de Microplacas Multimodo Spectramax M2e, Molecular Devices, EUA). Com as diluições prontas, foi realizado o plaqueamento com meio Plate Count Agar (PCA) utilizando 100  $\mu\text{L}$  das respectivas diluições para ser feito a contagem das colônias.

Para avaliar a adesão das bactérias foi adicionado 1mL de suspensão bacteriana  $10^8$  células/mL sobre as amostras, que em seguida foram incubadas durante 4 horas a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . Após o tempo de incubação, as amostras serão lavadas com PBS para remoção das bactérias não aderidas. A fixação foi realizada com glutaraldeído 2,5% em temperatura ambiente durante 12 horas, seguida de uma pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% por 2h. Por conseguinte, realizou-se uma lavagem com água destilada e desidratação em uma série de etanol em concentrações crescentes (25, 50 e 75%) durante 20 minutos cada e em etanol absoluto durante 60min. Após a desidratação, as

amostras foram metalizadas com um filme de ouro 9 nm para permitir a visualização no microscópio eletrônico de varredura.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A molhabilidade e composição química são fatores que influenciam a adesão e proliferação de bactérias na superfície. Na análise de DRX foi possível observar a incorporação do nitrogênio na forma de nitretos de titânio nas superfícies nitretadas. A análise de XPS mostrou a formação de grupos -OH nas amostras tratadas por CAP. Grupos -OH permitem que as superfícies tenham uma maior interação com a água, sendo um fator chave para interações proteínas/superfícies (SÁNCHEZ-BODÓN et al., 2022; JEONG et al., 2017).

Na análise de molhabilidade verificou-se que as superfícies tratadas por CAP foram altamente hidrofílicas quando comparadas às polidas ( $13^\circ \pm 1.8$  vs.  $65^\circ \pm 4.3$ ), respectivamente. As amostras tratadas por nitretação apresentaram nitretos de titânio (TiN) indicados na estrutura cristalina da superfície. Essa característica evidencia o melhoramento de aspectos, como a alta dureza, resistência ao desgaste e à corrosão, o que possibilita um aumento da biocompatibilidade da amostra (SUCIU et al., 2021). As amostras nitretadas apresentaram maior rugosidade quando comparadas com as que foram tratadas com o CAP, característica essa que permitiria a maior adesão de proteínas celulares nas superfícies com o tratamento não térmico (WOJTAS et al., 2021).

O tratamento de CAP ( $324 \pm 2.19$  CFU) apresentou maior capacidade de prevenção da adesão e crescimento bacteriano quando comparado às superfícies polidas ( $548 \pm 2.19$  CFU) e nitretadas ( $609 \pm 1.38$  CFU). A baixa proliferação bacteriana nas amostras tratadas por CAP pode ser devido à inibição da proteína de adesão WspA ou choque osmótico causado pela alta hidrofiliabilidade (CONNOR et al., 2013; INOUE-SAKAMOTO et al., 2018; SOCHOCKA & BORATYŃSKI, 2011). Apesar da incidência de bactérias, na análise de microscopia eletrônica de varredura, o tratamento não térmico demonstrou pouca aglomeração bacteriana, ausência da formação de biofilme, baixa adesão de bactérias e presença de poucos detritos celulares, enquanto que no tratamento por nitretação e no grupo controle foi possível identificar a formação do biofilme e agregados significativos de bactérias.

### 4 CONCLUSÃO

As superfícies de titânio tratadas pelo plasma atmosférico a frio demonstraram significativa redução da adesão bacteriana, demonstrando o potencial desse tratamento na prevenção de contaminação bacteriana de implantes. Essa característica aponta um grande avanço para a área de biomateriais e o sucesso de suas aplicações biomédicas, oferecendo não somente uma alternativa viável economicamente, como também poderia reduzir os índices epidemiológicos de contaminações hospitalares e o uso exacerbado de antibióticos.

## REFERÊNCIAS

ALVES JUNIOR, C. Plasma frio atmosférico – novas oportunidades de pesquisa numa plataforma versátil e portadora de futuro. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 25, n. 4, 2020.

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. **Nature reviews. Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 397–409, 2018.

CASSINI, A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 56–66, 2019.

DE MEDEIROS AIRES, M. et al. Minimizing *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to titanium surfaces by a plasma nitriding process. **AIMS biophysics**, v. 4, n. 1, p. 19–32, 2016.

FLYNN, P. B.; GILMORE, B. F. Understanding plasma biofilm interactions for controlling infection and virulence. **Journal of physics D: Applied physics**, v. 51, n. 26, p. 263001, 2018.

HILTUNEN, T.; VIRTÄ, M.; LAINE, A.-L. Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 372, n. 1712, 2017.

HOJNIK, N. et al. Mycotoxin decontamination efficacy of Atmospheric pressure air Plasma. **Toxins**, v. 11, n. 4, p. 219, 2019.

INOUE-SAKAMOTO, K. et al. Characterization of extracellular matrix components from the desiccation-tolerant cyanobacterium *Nostoc commune*. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 64, n. 1, p. 15–25, 2018.

JEONG, W.-S. et al. Bacterial attachment on titanium surfaces is dependent on topography and chemical changes induced by nonthermal atmospheric pressure plasma. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 12, n. 4, p. 045015, 2017.

KOO, H. et al. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature reviews. Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 740–755, 2017.

MATOS, A. O. et al. Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 152, p. 354–366, 2017.

O'CONNOR, J. R. et al. Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production: WspA functional domains. **Molecular microbiology**, v. 86, n. 3, p. 720–729, 2012.

SÁNCHEZ-BODÓN, J. et al. Bioactive coatings on titanium: A review on hydroxylation, self-assembled monolayers (SAMs) and surface modification strategies. **Polymers**, v. 14, n. 1, p. 165, 2021.

SOCHOCKA, M.; BORATYŃSKI, J. Osmoregulacja - ważny parametr rozwoju bakterii. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 65, p. 714–724, 2011.

SUCIU, V. et al. Structural, mechanical, and decorative properties of sputtered TiN and Ti (N, C) films for orthodontic applications; An in vitro study. **Materials**, v. 14, n. 18, p. 5175, 2021.

WANG, Z. et al. Hierarchically hybrid biocoatings on Ti implants for enhanced antibacterial activity and osteogenesis. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 204, n. 111802, p. 111802, 2021.

WIJESINGHE, G. et al. Influence of Laboratory Culture Media on in vitro Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre**, v. 28, n. 1, p. 28–35, 2019.

WOJTAS, D. et al. Texture-governed cell response to severely deformed titanium. **ACS biomaterials science & engineering**, v. 7, n. 1, p. 114–121, 2021.

YADAV, L. et al. Antibacterial Activity of Cu Nanoparticles against *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Nano biomedicine and engineering**, v. 9, n. 1, 2017.