



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Juan Felipe Dumes Montero

**ANÁLISE QUÍMICA, MICROSCÓPICA E MICROBIOLÓGICA
DE POLI-ÉTER-ÉTER-CETONA (PEEK) FUNCIONALIZADO
PARA INCORPORAÇÃO DE ANTIBIOFILMES ORGÂNICOS.**

Dissertação submetida(a) ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Montero, Juan Felipe Dumes

Análise Química, Microscópica e Microbiológica de Poli-Éter-Éter-Cetona (PEEK) Funcionalizado para Incorporação de Antibiofilmes Orgânico / Juan Felipe Dumes Monteiro ; orientador, Ricardo de Souza Magini – Florianópolis, SC, 2015. 119 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui referência

1. Odontologia. 2. PEEK. 3. SPEEK. 4. Biofilme. 5. Lactama. I. Maini, Ricardo de Souza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Título.

Juan Felipe Dumes Montero

**ANÁLISE QUÍMICA, MICROSCÓPICA E MICROBIOLÓGICA
DE POLI-ÉTER-ÉTER-CETONA (PEEK) FUNCIONALIZADO
PARA INCORPORAÇÃO DE ANTIBIOFILMES ORGÂNICOS.**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Odontologia Área de concentração Implantodontia”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia.

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2015.

Profa. Dra. Isabel Cristina Santos Almeida
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Ricardo de Souza Magini, Dr.
Universidade Federal De Santa Catarina

Profa. Andrea de Lima Pimenta, Dr^a.
Universidade de Cergy Pontoise

Prof. Cesar Benfatti M, Dr.
Universidade Federal De Santa Catarina

Prof. Guilherme Mariz de Oliveira Barra, Dr.
Universidade Federal De Santa Catarina

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a Deus, em nome de Jesus. Eu devo tudo a ele, ensinando-me cada dia que o conhecimento e sabedoria procedem dele.

A meus Pais: André e Irene, por seu amor constante, por seu exemplo que motiva, cada dia, a lutar por meus sonhos, sem importar o sacrifício, sempre lembrando minhas raízes e caminhando na vida com humildade e com amor.

A meus irmãos, por ser minha inspiração.

A Thaise pelo seu amor, apoio, compreensão e ajuda.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de pós-graduação em Odontologia, à coordenadora, aos professores e funcionários, por toda ajuda.

Ao *Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini*, meu orientador, por todo conhecimento transmitido durante o mestrado, pelas oportunidades, pela paciência durante todos os dias. Ensinar, com seu exemplo, que o maior prêmio do estudo é a humildade.

Ao *Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso*, pela sabedoria repassada e por ter aberto minha cabeça e coração para a constante busca de conhecimento crítico e diferente.

Ao *Prof. Júlio César Matias Souza*, por ter me brindado em cada momento com conhecimento, orientação e apoio.

A *Profa. Dra. Andrea Lima Pimenta*, pela oportunidade de adquirir conhecimento, principalmente, por sua confiança e apoio.

Ao *Professor Cesar Benfatti*, ser uma inspiração, e mostrar que ser professor é um presente de Deus que cada momento exige o melhor de mim.

Ao *Professor Guilherme Barra*, por seu apoio e colaboração.

A meus Amigos Gabriella Peñarrieta, Caroline Morsh, Leticia Bins, Abraão Moratelli, Mauricio Pereira, por ser minha família, meus mestres, meus irmãos e irmãs, por ensinar sempre com um sorriso as perguntas de um gringo que cada dia deve aprender mais. Que Deus, em nome de Jesus, guie seus passos e cuide de seus corações que se abriram para mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, pela bolsa de estudos, desta maneira apoiando o sonho de um colombiano com coração brasileiro a aprender e crescer como pessoa e profissional.

As coisas humanas precisam ser conhecidas para
ser amadas; As coisas divinas precisam ser
amadas para ser conhecidas.

(San Pío de Pietrecina)

RESUMO

(Poli-éter-éter-cetona) PEEK representa atualmente uma alternativa para implantes ortopédicos devido à sua biocompatibilidade e baixo módulo de elasticidade quando comparado ao titânio. PEEK tem mostrado ser muito atraente para a incorporação de compostos, graças ao processo de sulfonação que promove um balanço entre as propriedades mecânicas e estabilidade termo-oxidativa com uma alta probabilidade para geração de novos materiais com excelentes propriedades químico-mecânicas. O objetivo deste trabalho foi de funcionalizar o PEEK, a fim de incorporar novos compostos anti-biofilme derivados de lactamas. Grânulos de PEEK foram funcionalizadas por tratamento com ácido sulfúrico e, em seguida, dissolvidos em solução de dimetilsulfóxido. Após a funcionalização, antibiofilme à base de lactama foi adicionado à solução de poli(éter-éter-cetona) sulfonado (SPEEK). Uma técnica de revestimento por imersão foi utilizada para sintetizar um filme fino sobre um substrato à base de vidro. O grau de sulfonação (DS) e a incorporação de lactama no SPEEK foram determinados por espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), análise termogravimétrica (TGA), e microscopia eletrônica de varredura (SEM-EDS). Em seguida, foi avaliada a eficácia do tratamento do antibiofilme incorporado ao polímero através da medida de formação de biofilmes pela bactéria *Streptococcus mutans* sobre os materiais funcionalizados. Foi determinado grau de sulfonação (DS) de 65%, enquanto que as curvas TGA e FTIR confirmaram a presença de SO₃H e lactamas na estrutura de SPEEK. A densidade do biofilme na superfície de SPEEK contendo lactamas foi menor do que no SPEEK livre de lactama, indicando que a atividade desses compostos antibiofilme foi mantida após incorporação no SPEEK.

Palavras-chave: PEEK, SPEEK, Lactamas, *Streptococcus mutans*, Biofilme, Inibição de biofilmes.

ABSTRACT

PEEK is currently presented as an alternative for orthopedic implants due to its biocompatibility and low modulus compared to titanium. PEEK has been shown to be very attractive for incorporating compounds thanks to the sulphonation process, which promotes a balance between the mechanical properties and thermo-oxidative stability. The objective of this study was to functionalize the poly (ether-ether-ketone) (PEEK) in order to incorporate new anti-biofilm compounds, lactam derivatives. PEEK samples were functionalized by treatment with sulfuric acid and then dissolved in dimethylsulfoxide solution resulting in SPEEK. After functionalization, lactam-based antibiofilm compounds were added to the sulphonated poly (ether ether ketone) SPEEK to produce a thin film coating a glass-based substrate. The degree of sulphonation (DS) and the incorporation of anti-biofilm compounds (lactams) in SPEEK were determined by Infrared Fourier Transform Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Electron Microscopy Scanning (SEM-EDS). Then, the effectiveness of the treatment applied to antibiofilm polymer was evaluated biofilm formation capacity of *Streptococcus mutans* on the SPEEK functionalized. The characterization indicated a high DS of 65%, while the TGA curves confirmed the presence of SO₃H in SPEEK and lactam structure. The biofilm density on SPEEK containing lactam was lower than SPEEK without lactam, indicating that the activity of these compounds was maintained antibiofilm after incorporation into SPEEK.

Keywords: PEEK, SPEEK, Lactam, *Streptococcus mutans*, Biofilm, biofilm inhibition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Ilustração representando a formação esquemática de biofilme oral.....	28
Figura 2:	Estrutura química da lactama sintética U27-1, estrutura química da furanona.....	31

Figuras Artigo 1

Figura 1:	(A) Curvas termogravimétricas, (B) espectros de FTIR para PEEK e SPEEK, banda em 1255 cm^{-1} e 1050 cm^{-1} representa os grupos O=S=O (alongamento assimétrico) e S=O (alongamento simétrico), respectivamente.....	41
Figura 2:	Representa a curva de Espectro de H-RMN do SPEEK dissolvido em DMSO-d ₆ , a intensidade da sinal indica a presença do grupo H pertencentes ao SO ₃ H na estrutura química de SPEEK.....	42
Figura 3:	Espectros de FTIR, SPEEK e SPEEK com lactama, bem como o resultado de EDS na superfície de SPEEK identificam a presença de elementos químicos compatíveis com Br e Cl.....	43
Figura 4:	(A) MEV imagen da superfície de SPEEK, mostrando colonias <i>S. mutans</i> biofilms (S.m) sobre a superfície do polímero, (B) MEV imagen de SPEEK+lactam sem presença de colonias evidentes..	44
Figura 5:	Crescimento planctônico de <i>S. mutans</i> sobre superfícies SPEEK e SPEEK/lactama após 48h de crescimento em TSB (37°C, 150 rpm).....	44

Figuras Artigo 2

Figura 1:	(A) As curvas termogravimétricas de PEEK e SPEEK, (B) Os valores de grau de sulfonação (DS) obtidos por TGA e IEC são compatíveis, obtendo máxima sulfonação 2h.....	79
Figura 2:	FTIR de PEEK e SPEEK em tempos diferentes, podemos observar a presença de grupos de ácido sulfônico revelado nas bandas no espectro 3440 , 1252 , 1080 , 1024 , e 709 cm^{-1}	80

Figura 3:	O espectro de RMN de SPEEK dissolvido em DMSO-d6, A intensidade deste sinal de H, produz estimativas da presença, assim como é equivalente ao conteúdo de grupo SO ₃ H.....	81
Figura 4:	(A, B) mostrou imagens MEV de SPEEK antes e após a formação de biofilmes de <i>S. mutans</i> (SM), (C) ângulos de contato de água em superfícies de SPEEK, (D) Análise por perfilometria óptica (DektakXT, Profilometer).....	82
Figura 5A:	Crescimento planctónico SPEEK 1h, 1:30min, 2h, 2:30min, 3h para 48h em TSB (37°C, 150rpm). (B) Unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>S. mutans</i> e <i>E. Faecalis</i> sobre a superfície de SPEEK...	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PEEK	Poli(éter-eter-cetona)
SPEEK	Poli(éter-eter-cetona) sulfonado
DMSO	Dimetilsulfóxido
TGA	Análise termogravimétrica
RNM	Ressonância Magnética Nuclear
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier
CFU	Unidades Formadoras de Colônias
DS	Grau de Sulfonação
MBIC	Concentração Inibitória Mínima
BHI	Brain Heart Infusion
PBS	Solução Tampão de Fosfato
TSB	Caldo Trípico de Soja
QS	Quorum Sensing
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
AI	Auto Indutores
OD	Densidade Óptica

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	21
1.1 INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1 PEEK e suas aplicações.....	25
2.2 Doença periodontal e peri-implantar.....	26
2.3 Biofilme Oral.....	27
2.4 Compostos anti-biofilme.....	29
CAPÍTULO II.....	33
1 ARTIGO 1 EM PORTUGUÊS.....	35
2 Materiais e Métodos.....	38
2.1 Funcionalização de PEEK.....	38
2.2 Caracterização.....	39
2.3 Formação de Biofilme.....	39
2.4 Análise de Superfície.....	40
2.5 Análise Estatística.....	40
3 Resultados.....	40
3.1 Caracterização.....	40
3.2 Análise de superfície.....	43
4 Discussão.....	45
5 Conclusões.....	46
2.2 ARTIGO 1 EM INGLÊS.....	53
2 Materials and Methods.....	56
2.1 Functionalization of PEEK and lactams incorporation.....	56
2.2 Chemical analysis.....	57
2.3 Biofilm quantification.....	57
2.4 Surface Analysis.....	58
2.5 Statistical Analysis.....	58
3 RESULTS.....	59
3.1 Chemical analyses.....	59
3.2 Surface and Biofilm analyses	61
4 DISCUSSION.....	63
5 CONCLUSION.....	65
Acknowledgments.....	65
References.....	65
2,3 ARTIGO 2 EM PORTUGUÊS.....	71
Resumo.....	71
Introdução.....	72

2	Materiais e Métodos.....	74
2.1	Funcionalização de PEEK.....	74
2.2	Caracterização.....	75
2.3	Formação de biofilme.....	75
2.4	Análise da Superfície.....	76
3	Resultados.....	78
3.1	Caracterização.....	78
4	Discussão.....	83
5	Conclusão.....	85
2.4	ARTIGO 2 EM INGLÊS.....	91
2	Materials and Methods.....	94
2.1	Functionalization of PEEK.....	94
2.2	Chemical analyses.....	95
2.3	Biofilm formation.....	95
2.4	Surface Analysis.....	96
3	Results.....	97
3.1	Chemical analyses.....	97
4	Discussion.....	102
5	Conclusion.....	104
3	REFERÊNCIAS.....	115

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade o conhecimento disponível acerca da biologia dos biofilmes bacterianos aumenta em proporção direta ao acúmulo de problemas encontrados no tratamento de infecções bacterianas ocasionado pelo desenvolvimento de resistência às terapias antimicrobianas convencionais. Essa realidade, por sua vez, forçou uma mudança no alvo de estratégias de controle microbiano, favorecendo o uso de terapias dirigidas contra a aderência bacteriana a substratos bióticos e abióticos em detrimento daquelas dirigidas contra a viabilidade dos microrganismos. Tais estratégias, ditas não convencionais, associam a vantagem de tratar infecções em seus estágios iniciais, inibindo às etapas de adesão, colonização/maturação bacteriana de baixo risco de indução de resistência ao tratamento na população-alvo (Subramani, Jung, Molenberg, & Hämmerle, 2009).

Entre compostos de antibiofilme identificados até o momento, o grupo de furanonas naturais halogenados, que foram inicialmente isoladas da alga vermelha *Delisea pulchra*, revela atividade inibitória contra biofilmes compostos por certos patógenos como *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (Ren, Sims, & Wood, 2001, 2002). Estudos recentes têm mostrado que lactamas sintetizadas a partir de análogos de rubrolideos, cuja estrutura se assemelha à das furanonas (Hentzer & Givskov, 2003; Manefield et al., 2002; Pereira et al., 2014b), são ativas contra biofilme de *Enterococcus faecalis*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* (Pereira et al., 2014a, 2014b).

Dentre os polímeros atualmente utilizados em odontologia clínica, o PEEK apresenta-se como uma alternativa em ortopedia e implantodontia devido à sua biocompatibilidade e baixo módulo de elasticidade em comparação com o titânio, importante na transmissão de forças e processos de remodelamento ósseo (Lee et al., 2012), tendo-se mostrado muito atraente para incorporar compostos antibiofilme graças ao processo de sulfonação, este processo de solfonação que promove um equilíbrio entre as propriedades mecânicas e estabilidade termo-oxidativa (Appleby & Twidell, 1996; Zaidi, 2003), sendo a ferramenta para obter um material com propriedades mecânicas e químicas útil para incorporação de composto antibiofilme.

Este trabalho de pesquisa foi desenvolvido nos Departamentos de

Odontologia, Engenharia Mecânica e Física da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Brasil.

O presente trabalho resulta em uma Dissertação de Mestrado dividida em dois Capítulos: o Capítulo I apresenta uma Introdução geral incluindo uma Revisão da Literatura sobre os aspectos relacionados ao PEEK e suas aplicações, doença periodontal e peri-implantar associadas ao biofilme oral, *Quorum Sensing* e compostos anti-biofilme. Os termos aplicados foram pesquisados no período de 2010 a 2015 em artigos publicados na base de dados Pubmed disponíveis na internet e livros. O Capítulo II apresenta dois artigos elaborados para divulgação e publicação em revista internacional, especificando a metodologia de trabalho, resultados, discussão e conclusões obtidas a partir da pesquisa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PEEK e suas aplicações

Desde os anos 1980, polímeros de polietereetercetona (PEEK) têm sido cada vez mais utilizados como biomateriais no tratamento de traumas ortopédicos e implantes medulares, apresentando-se como uma alternativa para ortopedia e implantodontia devido à sua biocompatibilidade e baixo módulo de elasticidade em comparação com o titânio (Lee et al., 2012).

A estrutura química das cetona poliaromáticas presentes no PEEK confere estabilidade a temperaturas elevadas até 300°C, resistência química à radiação e substâncias ácidas, alta compatibilidade e maior resistência mecânica do que muitos metais, tornando-se altamente atraente para aplicações biomédicas (Kurtz & Devine, 2007; Meningaud, Spahn, & Donsimoni, 2012). PEEK e seus compósitos apresentam valores de resistência à tração entre 100 e 215 MPa e baixos valores de módulo de elasticidade, variando entre 4,5 até 19 GPa, dependendo da presença de material de enchimento inorgânico (Kurtz & Devine, 2007). Em comparação, o titânio comercialmente puro revela valores médios de resistência à tração em torno de 400 a 550 MPa e módulo de elasticidade entre 100-140 GPa (Niinomi, 1998). Os valores do módulo de elasticidade do PEEK encontram-se próximos ao do osso cortical e promovem uma melhor distribuição de força e o subsequente processo de remodelação óssea que circunda o biomaterial (Kurtz & Devine, 2007; Lee et al., 2012; Meningaud et al., 2012). Ainda, o PEEK tem se tornado um material interessante para aplicações em próteses dentárias e estruturas de implantes (Broggini et al., 2003; Meningaud et al., 2012; Sarot, Contar, Cruz, & Magini, 2010).

No entanto, como qualquer outro material presente na cavidade oral, o PEEK é vulnerável ao acúmulo de biofilmes orais que podem induzir reações inflamatórias peri-implantares ou periodontais (Jansen, Conrads, & Richter, 1997; Teughels, Van Assche, Sliepen, & Quirynen, 2006). Tais reações inflamatórias em volta dos implantes podem ser restritas aos tecidos moles peri-implantares, caracterizada por uma inflamação reversível (mucosite) ou levando a uma reação inflamatória com subsequente perda óssea irreversível, (perimplantites) (Heitz-Mayfield, 2008; Zitzmann, Abrahamsson, Berglundh, & Lindhe, 2002; Zitzmann & Berglundh, 2008).

2.2. Doença periodontal e peri-implantar

Do ponto de vista da saúde pública, periodontite e cárie dental são doenças infecciosas da cavidade associadas ao biofilme oral. O biofilme bacteriano é amplamente estudado tendo em vista a adesão bacteriana, devido à sua ampla presença, acessibilidade, fornecendo uma visão clara sobre a arquitetura e da distribuição espacial das espécies predominantes (Zijnge et al., 2010).

As doenças periodontais são classificadas em duas formas: gengivite e periodontite. O termo gengivite refere-se a uma inflamação gengival, sem sinais de perda dos tecidos osseos, enquanto a periodontite, além da inflamação gengival, é caracterizada pela perda óssea. Esse processo é bacterio-dependente e a severidade é regulada pela presença de fatores de risco, como o fumo, estresse e alterações sistêmicas, assim como a resposta do hospedeiro (Zijnge et al., 2010).

Uma vez introduzidos na cavidade oral, os implantes de titânio e outros materiais tornam-se tão suscetíveis à colonização por biofilmes quanto a superfície natural dos dentes. Embora titânio e ligas de titânio sejam materiais amplamente utilizados na confecção de implantes dentários, infecções associadas a este tipo de materiais representam ainda um sério problema para a saúde. Estudos demonstraram a capacidade apresentada por bactérias da flora oral de aderir à superfície de implantes de titânio, relacionando-a principalmente à topografia e tratamento da superfície dos implantes dentários (Quirynen, Abarca, Van Assche, Nevins, & van Steenberghe, 2007).

Assim como a formação e composição do biofilme inicial serão afetadas pela microtopografia e hidrofobicidade da superfície do dispositivo, a camada proteica formada na superfície do implante sob condições fisiológicas é responsável pelo aumento da sua susceptibilidade à colonização bacteriana (Zhao, Chu, Zhang, & Wu, 2009). Aproximadamente 24% dos implantes dentários são afeitados através de doenças como a mucosite peri-implantar e peri-implantite, sendo esta última considerada a principal causa de perda de implantes após 5 anos (Zitzmann & Berglundh, 2008).

Os biofilmes orais são comunidades bacterianas tridimensionalmente estruturadas e aderidas a uma superfície sólida, que pode ser o esmalte dos dentes, a superfície da raiz ou implantes dentários, embebidas em

uma matriz exopolissacarídica secretada pelas próprias bactérias. O processo inicial de aderência bacteriana ocorre de forma organizada, com os colonizadores primários aderindo a receptores presentes na película adquirida, que recobre a superfície dentária minutos após a limpeza da mesma, e é composta de moléculas produzidas pelo hospedeiro (Teughels et al., 2006).

A microbiota inicial predominante em dentes humanos é composta de bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus*, tais como *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. mutans* e *S. sobrinus*, que representam 60 a 80% de todos os colonizadores primários, e que apresentam diferentes adesinas, responsáveis pela sua aderência à película adquirida (Nyvad & Kilian, 1987).

2.3. Biofilme Oral

De maneira análoga ao que ocorre com a dentição natural, os implantes dentários são suscetíveis à destruição de suas estruturas de sustentação causada por biofilmes. Este processo destrutivo resulta geralmente de infecções oportunistas, causadas por bactérias patogênicas que colonizam as áreas peri-implantares e a dentição adjacente (Zitzmann & Berglundh, 2008).

Após higiene oral, uma película composta de glicoproteínas condicionado, água e com íons de 0,1-15 µm de espessura forma-se sobre tecidos duros e moles (Marsh P, 2009). Ao longo deste filme condicionado, forma-se o biofilme, é um co-agregado bem organizado de microorganismos, embebido numa matriz formada por polissacarídeos extracelulares, glicoproteínas, ácidos nucleicos e água (Listgarten & Lai, 1999; Marsh P, 2009). Formado seguindo as seguintes etapas: (1) transporte de colonizadores iniciais para a superfície; (2) adesão inicial fraca e reversível, resultante de interações fracas entre microorganismos e a superfície; (3) uma forte adesão de microorganismos à superfície, estabelecida por interações específicas (ligações covalentes, iônicos ou hidrogênio); (4) maturação, crescimento e estruturação do biofilmes (Figura 1) (Costerton, 1999; Teughels et al., 2006).

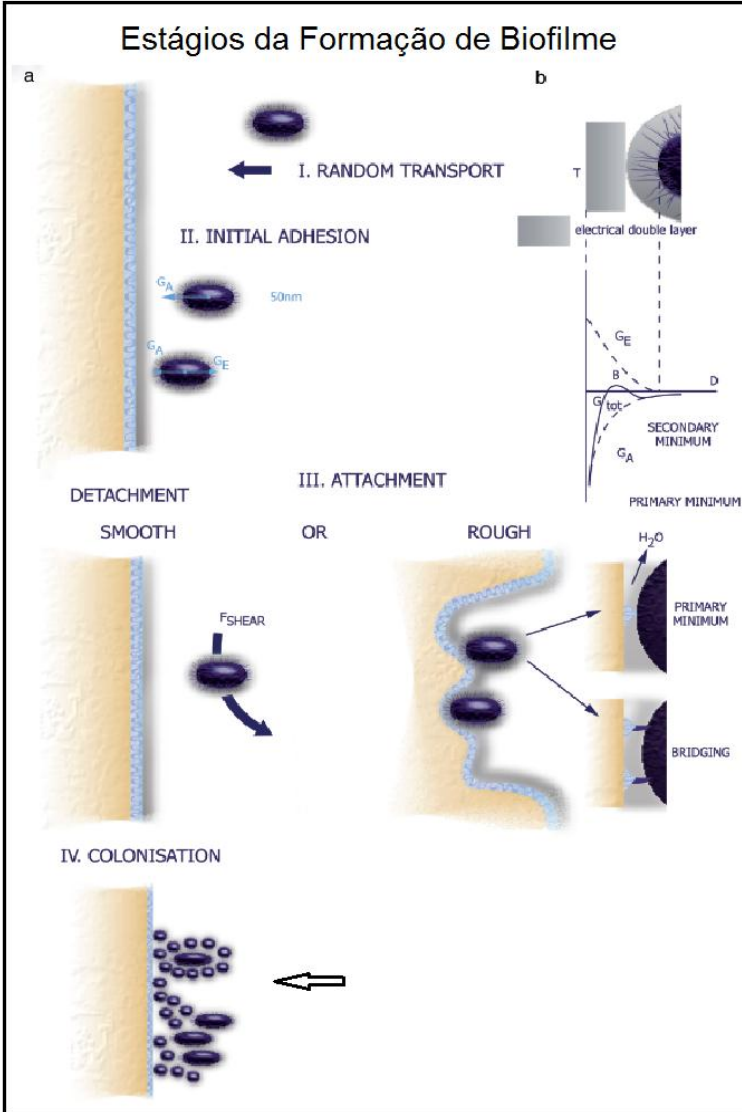


Figura 1. Ilustração representando a formação esquemática de Biofilme oral Adaptada de (Teughels et al., 2006).

As bactérias dentro do biofilme não existem como entidades independentes, mas sim como uma comunidade que age de forma coordenada e metabolicamente integrada (Teughels et al., 2006). As bactérias apresentam um metabolismo diferente quando organizadas na matriz do biofilme. A fim de viabilizar este modo de organização, as bactérias fazem uso de um mecanismo químico de comunicação intercelular realizado através de pequenas moléculas de sinalização, chamado Quorum Sensing (QS). Utilizando o QS as bactérias coordenam comportamentos comunitários através da ativação e inativação da expressão simultânea de genes, controlando diversas atividades como a bioluminescência, formação de biofilme e secreção de exoenzimas, resultando no controle da sobrevivência e patogenicidade de inúmeras linhagens bacterianas (Schuster, Joseph Sexton, Diggle, & Peter Greenberg, 2013).

O tratamento de infecções bacterianas depende ainda da utilização de antibióticos tradicionais atualmente. No entanto, o uso indiscriminado e contínuo de antibióticos para o controle e profilaxia de patógenos bacterianos, levou ao aparecimento de numerosas linhagens resistentes à maioria dos antimicrobianos disponíveis no mercado. A consequência disto é a maior problemática em sintetizar novos compostos antibacterianos de largo espectro que combatam patógenos multirresistentes (Barrett & Barrett, 2003).

Estudos têm mostrado que a exploração da complexidade das relações hospedeiro-patógeno representa uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novas drogas, passando a considerar cada vez menos o crescimento bacteriano como alvo, em favor dos mecanismos de patogenicidade, de interação patógeno-hospedeiro e da otimização da resposta imune dirigida contra patógenos específicos (Hentzer & Givskov, 2003; Natrah et al., 2011). Um enfoque mais eficaz para o tratamento de infecções causadas por biofilmes, seria basear-se na inibição do processo de aderência bacteriana propriamente dito, atuando através de inibidores de *quorum sensing* (Natrah et al., 2011).

2.4 Compostos anti-biofilme

As terapias antimicrobianas convencionais podem diminuir um processo infeccioso por erradicar bactérias planctônicas surgidas a partir da maturação do biofilme, mas são ineficazes contra aqueles microrganismos presentes no interior dos biofilmes. Dentro do biofilme, os microrganismos estão também protegidos contra a desidratação,

substâncias ácidas, salinidade e fagocitose (Rasmussen & Givskov, 2006; Romero, Traxler, López, & Kolter, 2011).

Quando bem organizada em biofilmes, as bactérias são capazes de sobreviver a tratamentos com antibióticos em concentrações de até um milhão de vezes maiores que a concentração mínima inibitória determinada para culturas das mesmas bactérias em suspensão (Ceri et al., 1999).

A identificação de compostos capazes de inibir a formação de biofilme surge como a melhor estratégia para o controle de infecções microbianas (de Lima Pimenta et al., 2013; Hentzer & Givskov, 2003; Natrah et al., 2011). Uma vez que tais compostos não destroem os patógenos diretamente, mas sim reduzem a população de bactérias resistentes por perturbar a organização do biofilme, evitando e/ou revertendo o desenvolvimento de resistência bacteriana à droga (Pereira et al., 2014b).

Uma classe de compostos que desempenha este papel são o grupo das furanonas halogenadas naturais. Estes compostos foram inicialmente isolados da alga vermelha *Delisea pulchra* e apresentaram atividade inibitória contra a formação de biofilme em *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, entre outros patógenos (Ren et al., 2001, 2002).

Estudos revelaram resultados satisfatórios quando furanonas são adicionados às resinas e cimentos ionômero de vidro. Todas as fórmulas de cimentos contendo furanona apresentaram atividade antibacteriana significativa, contra *S. mutans* e *Lactobacillus sp* (Weng et al., 2012).

Devido à dificuldade na obtenção de furanonas naturais, e ao seu índice de citotoxicidade, estimulou-se o desenvolvimento de compostos semelhantes de origem sintético, com resultados promissores (He et al., 2012). Dentre esses compostos e com composição química semelhante à furanonas sintéticas, estão as lactamas. A composição química desses compostos difere pelo fato de as lactamas apresentarem um átomo de oxigênio próximo à carbonila (Figura 2). Enquanto que as furanonas, apresentam o átomo de nitrogênio próximo ao anel central (Hentzer & Givskov, 2003; Manefield et al., 2002). Estudos recentes têm mostrado que a lactamas apresentam uma atividade ativa contra biofilme de *Enterococcus faecalis*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* (Pereira et al., 2014a, 2014b).

Estudos comparando a atividade das lactamas e as nanoparticulas de prata demonstram que as lactamas apresentam grande potencial de ação

antimicrobiano, alto índice de viabilidade celular, tendo as lactamas atividade reconhecida contra o biofilme bacteriano (Neto, 2013).

Pelas razões discutidas acima, foi escolhida uma lactama a ser utilizada no presente estudo como compostos anti-biofilme sintetizada pelo grupo de pesquisa do Departamento de Agroquímica, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

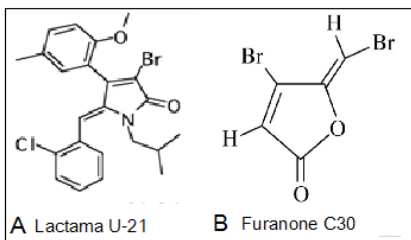


Figura 2. – Estrutura química da lactama sintética U21-1 (A), estrutura química da Furanona C 30 (B).

CAPÍTULO II

1 ARTIGO 1 EM PORTUGUÊS

ANÁLISE QUÍMICA, MICROSCÓPICA E MICROBIOLÓGICA DE POLI-ÉTER-ÉTER-CETONA (PEEK) FUNCIONALIZADO PARA INCORPORAÇÃO DE COMPOSTO ANTIBIOFILME ORGÂNICO.

Montero JFD¹, Ulisses AP⁵, Barbosa LC^{5,6}, Barra G², Fredel MC², Souza JCM¹, Magini RS¹, Pimenta AL^{3,4}

¹ Centro de Pesquisa sobre Implantes Dentários (CEPID) da Faculdade de Odontologia (ODT), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis / SC, 88040-900, Brasil.

² Departamento de Engenharia Mecânica (EMC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis / SC, 88040-900, Brasil.

³ Integrated Laboratories Technologies (InteLAB), Departamento de Engenharia Química (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis / SC, 88040-970, Brasil.

⁴ Departamento de Biologia, Université de Cergy Pontoise, 2, Av. Adolphe Chauvin 95302 Cergy Pontoise – France (permanent address).

⁵ Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

⁶ Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Endereço para correspondência:

Prof. Ricardo de Souza Magini, DMD, MSc

E-mail: ricardo.magini@gmail.com

Centro de Pesquisa sobre Implantes Dentários (CEPID)

Faculdade de Odontologia (ODT)

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Florianópolis / SC

88040-900, Brasil

Telefone: +55 48 96551776

Resumo

O objetivo deste trabalho foi funcionalizar o poli(éter-éter-cetona) (PEEK), a fim de incorporar novo composto anti-biofilme base de lactama. Grânulos de PEEK foram funcionalizadas por tratamento com ácido sulfúrico e, em seguida, dissolvidos em solução de dimetilsulfóxido. Após a funcionalização, antibiofilme à base de lactama foi adicionada à solução de poli(éter-éter-cetona) sulfonado (SPEEK). Uma técnica de revestimento por imersão foi utilizada para sintetizar um filme fino sobre um substrato à base de vidro. O grau de sulfonação (DS) e a incorporação de lactama no SPEEK foram determinados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Análise Termogravimétrica (TGA), e Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM-EDS). Além disso, a formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* sobre os materiais funcionalizados foi avaliada. Foi determinado grau de sulfonação (DS) de 65%, enquanto que as curvas TGA e FTIR confirmaram a presença de SO₃H e/ lactamas na estrutura de SPEEK. A densidade de biofilme na superfície de SPEEK contendo lactamas foi menor do que no SPEEK livre de lactama, indicando que a atividade desses compostos antibiofilme foi mantida após incorporação no SPEEK.

Palavras-chave: PEEK, SPEEK, lactama, *Streptococcus mutans*, biofilme, inibição do biofilme.

10 entre 100-140 GPa [3]. Os valores do módulo de elasticidade são importantes na distribuição de forças oriundas da oclusão que pode resultar em um processo de remodelação óssea ao redor do biomaterial [1,2,4]. Desta forma, o PEEK torna-se um material interessante para aplicações em próteses dentárias e estruturas de implantes [2,5,6]. No entanto, como qualquer outro material presente na cavidade oral, PEEK é vulnerável ao acúmulo de biofilmes orais que podem induzir reações inflamatórias peri-implantares ou periodontais [7,8]. Tais reações inflamatórias peri-implantares podem ser restritas aos tecidos moles, caracterizada por uma inflamação reversível (mucosite) ou levar a uma reação inflamatória com subsequente perda óssea irreversível, nomeada perimplantite [9-11].

O processo de formação de biofilme inicia-se logo após a higiene oral, com uma película de 0,1-1,5 μ m de espessura composta de glicoproteínas, água e íons sobre os tecidos duros e moles da cavidade oral [12]. Posteriormente, um co-agregado bem organizado de microorganismos embebido numa matriz com base em polissacarídeos extracelulares, glicoproteínas, ácidos nucleicos e água sobre superfície [12], [13]. O biofilme oral desenvolve-se através dos seguintes mecanismos: (1) a migração de colonizadores iniciais para a superfície; (2) adesão inicial reversível resultante de interações fracas entre microorganismos e superfície; (3) uma forte adesão de microorganismos na superfície estabelecida por interações específicas (ligações covalentes, iônicas ou hidrogênio); (4) maturação e crescimento. A formação e arquitetura do biofilme são dependentes do comportamento bacteriano de agregação e da organização estrutural da comunidade, conseguida através de um sistema de comunicação célula-a-célula conhecido como *quorum sensing* (QS). *Quorum sensing* é um mecanismo de comunicação utilizado pelas bactérias através de sinais químicos chamados de Auto Indutores (AI), que controlam o comportamento social através da ativação e desativação de genes em resposta a estímulos ambientais.

As terapias antibióticas convencionais podem diminuir um processo infeccioso por erradicar bactérias planctônicas que surgem a partir de populações aderentes; no entanto, são ineficazes contra aqueles microrganismos embebidos nos biofilmes. Quando organizada em biofilmes, as bactérias são capazes de sobreviver a tratamentos com antibióticos em concentrações até um milhão de vezes mais elevadas do que as utilizadas para matar suas homólogas planctônicas [14]. No interior do biofilme, as bactérias estão protegidas contra a desidratação, substâncias ácidas, salinidade e fagocitose [15,16]. A identificação de compostos capazes de inibir a formação de biofilme surge como a melhor estratégia para o controle de infecções microbianas [17,18]. Tais compostos não destroem os patógenos diretamente, mas reduzem a população de bactérias resistentes perturbando a organização do biofilme e evitando o desenvolvimento de resistência bacteriana à droga [19].

Entre os compostos antibiofilme identificados até o momento, o grupo de furanonas naturais halogenadas, que foram inicialmente isoladas da alga vermelha *Delisea pulchra*, revela boa atividade inibitória contra biofilme composto por patógenos, como *Escherichia coli* e *Bacillus*

subtilis [20,21]. Estudos recentes têm mostrado que lactamas sintetizadas a partir de análogos de rubrolidos, cuja estrutura se assemelha à de furanonas [18,19,22], são ativos contra biofilme de *Enterococcus faecalis*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* [19,23].

O objetivo deste trabalho foi sintetizar, funcionalizar e caracterizar o poli(éter-éter-cetona) sulfonado PEEK, visando a incorporação de novo composto antibiofilmes orgânicos à base de lactama.

2. Materiais e Métodos

2.1. Funcionalização de PEEK

PEEK (OPTIMA 450P, Victrex; Inglaterra) foi funcionalizado por processo de sulfonação, usando ácido sulfúrico a 98 % (Synth®, Brasil) e misturado com composto anti-biofilme orgânico. A sulfonação do PEEK foi realizada de acordo com os procedimentos anteriormente descritos na literatura [24-26].

Num balão volumétrico, 2,0 g PEEK foi solubilizado em 50 ml de ácido sulfúrico a 98 %. A mistura foi aquecida a 50°C e mantida sob agitação mecânica em atmosfera durante 1h. Em seguida, a mistura reacional foi gradualmente adicionada a 500 mL de água destilada gelada, resultando na precipitação de um poli(éter-éter-cetona) sulfonado (SPEEK). O produto foi então filtrado, lavado com água até à remoção completa do ácido sulfúrico e desidratado a 80°C durante 48h. Após a funcionalização, o polímero foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Synth®, Brasil) para adição da lactama.

A concentração inibitória mínima (MBIC) da lactama contra biofilmes de *Streptococcus mutans* foi previamente definida em 0,0875 mg/mL e utilizado neste estudo [19].

A técnica de revestimento por imersão foi utilizada para sintetizar finas películas SPEEK/lactama sobre as superfícies de vidro. Substratos à base de vidro foram imersos na solução de SPEEK contendo lactama solubilizada durante 30 s. Após o revestimento por imersão, as amostras foram colocadas num forno a 50°C durante 24h para remover o solvente e secagem da película fina SPEEK.

2.2. Caracterização

A análise termogravimétrica (TGA) dos polímeros foi realizada sob atmosfera de $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ de nitrogênio utilizando um equipamento TGA-50 (Shimadzu, Japão ®). Experiências não-isotérmicas foram realizadas a partir de 25 até 900°C a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ para cada amostra. O grau de nitração (ND) do PEEK e SPEEK com lactama foi calculada utilizando as curvas TGA.

O SPEEK nitrado contendo lactama foi dissolvido em DMSO- d_6 (ca. solução a 3%) para a análise por ressonância magnética nuclear (RMN) usando um espectrômetro Varian AS-400, Oxford. SPEEK-OH foi analisado por RMN de estado sólido.

Espectroscopia no infravermelho (FTIR) foi aplicada para análise de PEEK, SPEEK e SPEEK/lactama em 20 varreduras com resolução de 4 cm usando um espectrômetro FTL-2000 (Bomem, Canadá). Todas as amostras foram secas e purificadas antes da análise.

2.3. Formação de Biofilme

Streptococcus mutans ATCC 25175 foram cultivados em condições microaerófia durante 48h a 37°C em placas de ágar com 32 g/L do meio *Brain Heart Infusion* (BHI) (Bacto, DIFCO®, EUA) suplementado com 3 g/L de extrato de levedura e 200 g/L de sacarose (Bacto, Difco, EUA). Antes da formação do biofilme, células de *S. mutans* foram inoculadas em caldo triptico de soja (TSB - Bacto, DIFCO®, EUA) suplementado com 3 g/L de extrato de levedura e 200 g/L de sacarose durante 18h a 37°C . Após a incubação, peletes de *S. mutans* foram colhidos por centrifugação a 5000 rpm durante 10 min a 4°C , e lavados duas vezes com uma solução tampão de fosfato (PBS). O precipitado bacteriano foi então resuspenso em TSB suplementado com mucina (2,5 g/L), peptona (5 g/L), ureia (1 g/L), extrato de levedura (2 g/L) e sacarose (200 g/L) para obter uma suspensão com uma densidade óptica (OD) de 0,6 a 630 nm. Esta densidade óptica correspondeu a 1×10^8 unidades formadoras de colônias por mL (CFU/mL). A OD foram realizadas utilizando um espectrofotômetro (BioTek®, EUA). Esta suspensão de células foi utilizada como inóculo para ensaios de formação de biofilme [27,28].

Amostras de SPEEK foram colocadas em placas de 24 poços, em que cada poço continha 2 mL de inóculo de *S. mutans* (1×10^8 CFU/mL) e

incubadas a 37°C. Após 48h de incubação, a OD das células planctônicas foi medida a 630 nm.

2.4. Análise de Superfície

Para análise microscópica antes da formação de biofilmes, as amostras SPEEK foram revestidas com uma fina camada de ouro, e em seguida analisadas por microscopia eletrônica de varredura nos modos elétrons secundários (SE) e retroespalhados (BSE) (JEOL JSM-6390LV, Japão) a 10 kV.

A hidrofobicidade da superfície das amostras foi avaliada por medidas de ângulo de contato formado entre gota de água e superfície usando um goniômetro com câmera digital (OCA 20, Física Data, Alemanha). Um volume de 5 mL de água tipo 1 foi colocada em diferentes áreas das superfícies das amostras para medidas hidrofobicidade à temperatura e umidade ambiente.

Após a formação do biofilme, as superfícies recobertas com biofilmes foram lavadas duas vezes em PBS e fixadas em glutaraldeído a 2 % durante 5 min. Em seguida, as superfícies foram lavadas três vezes em PBS e desidratadas sob uma série de soluções de etanol graduadas (50, 70, 80, 90, e 100%). As amostras cobertas com biofilmes *S. mutans* foram metalizados com ouro, e analisadas por MEV em 10 kV.

2.5. Análise Estatística

Os resultados de crescimento planctônicos em SPEEK contendo ou não lactama foram analisados estatisticamente por meio de uma análise de variância (ANOVA), com nível de significância de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Caracterização

Considerando as curvas TGA, SPEEK foi termicamente estável até 350°C e exibiu duas fases distintas de perda de peso conforme observado na Figura 1. Já, o PEEK apresenta apenas uma perda de massa de 550°C (Fig. 1A). A perda de massa de SPEEK a 100°C ocorreu devido à eliminação das moléculas de água incorporadas pelo material. O primeiro estágio da degradação térmica de SPEEK variou de

300 a 400°C é caracterizado pela eliminação de grupos sulfônicos. A segunda fase de degradação térmica que varia de 500-1600°C é atribuída à decomposição da cadeia principal do polímero. A análise da área da curva TG indicou um elevado grau de sulfonação (DS) a 60% - 65%.

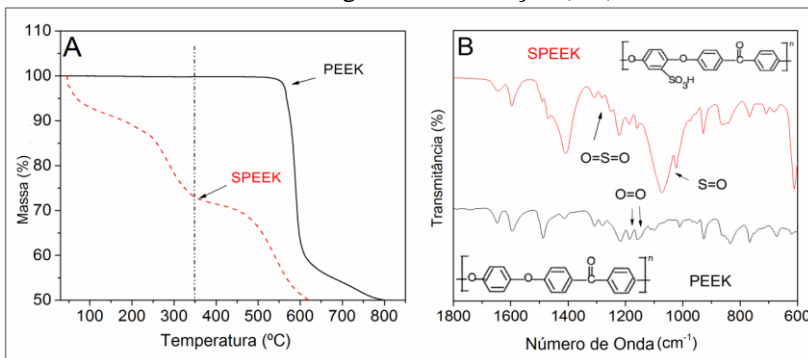


Figura 1. Curvas termogravimétricas (A) e espectros de FTIR (B) para PEEK e SPEEK. Banda em 1255 cm^{-1} e 1050 cm^{-1} representa os grupos $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ (alongamento assimétrico) e $\text{S}=\text{O}$ (alongamento simétrico), respectivamente.

Foram encontradas diferenças significativas no espectro de FTIR de SPEEK quando comparado com PEEK. Isso pode ser determinado pela presença de grupos sulfônicos, como indicado pelas bandas 3440 , 1252 , 1080 , 1024 e 709 cm^{-1} no espectro de FTIR (Figura 1B).

As intensidades das bandas aumentaram com aqueles do nível de sulfonação associada com o esqueleto (de $\text{C}=\text{O}$ a 1653 cm^{-1}). A banda na faixa de $3450\text{--}3430\text{ cm}^{-1}$ no espectro FTIR pode ser atribuída a vibração O-H. As outras bandas indicam várias vibrações de enxofre-oxigênio: $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ assimétrico (1252 cm^{-1}); $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ simétrica (1080 cm^{-1}); $\text{S}=\text{O}$ (1024 cm^{-1}); e $\text{S}-\text{O}$ (709 cm^{-1}). A banda a 1490 cm^{-1} corresponde aos grupos C-C.

A presença de cada grupo SO_3H resulta em um sinal distinto para prótons na posição H. A intensidade deste sinal é equivalente ao conteúdo de grupo SO_3H . A Hc e HD das unidades de repetição anel hidroquinona de PEEK aparecem como uma característica em 7.25 ppm [25]. SPEEK com baixo grau de sulfonação foi detectado pela baixa proporção de unidades de repetição que não foram sulfonado (Figura 2).

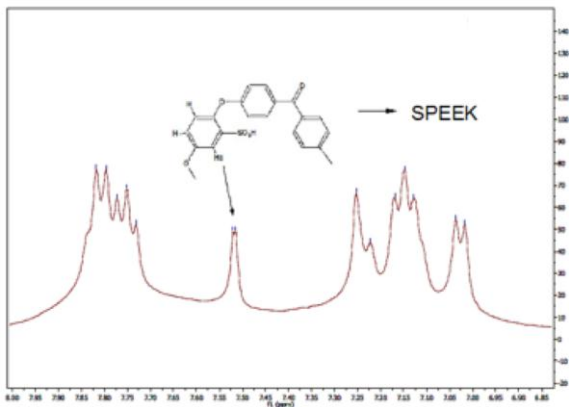


Figura 2. Representa a curva de Espectro de H-RMN do SPEEK dissolvido em DMSO-d₆, a intensidade da sinal indica a presença do grupo H pertencentes ao SO₃H na estrutura química de SPEEK.

Além disso, foram observadas diferenças significativas no espectro de FTIR para SPEEK contendo lactama foram quando comparado com SPEEK livre de lactama. A identificação de Br ou Cl indicou a presença da lactama U27-2 na composição SPEEK, como mostrado na Figura 3. A presença de grupos Br correspondeu as bandas 690-515 cm⁻¹ (Fig. 3). Além disso, os elementos Br e Cl foram detectados por EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy).

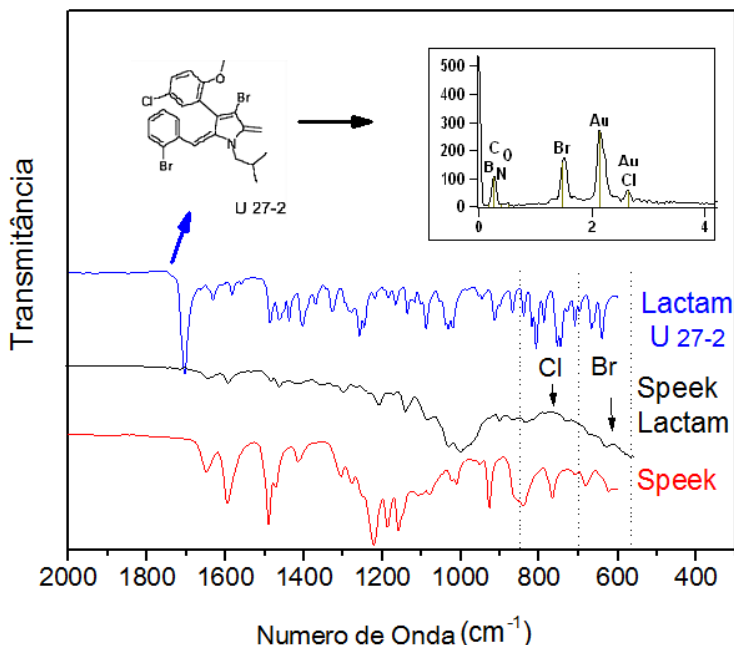


Figura 3. Espectros de FTIR, SPEEK e SPEEK com lactama, bem como o resultado de EDS na superfície de SPEEK identificam a presença de elementos químicos compatíveis com Br e Cl.

3.2. Análise de superfície

A análise das micrografias obtidas no MEV das superfícies após a imersão em meio com biofilme (Fig. 4A-B) revelou, crescimento de colônias de *S. mutans* amplamente separados como aglomerados sobre SPEEK. Os biofilmes de *S. mutans* não foram detectados em SPEEK contendo lactamas. No entanto, uma camada de mucina delgada foi detectada em todas as superfícies SPEEK.

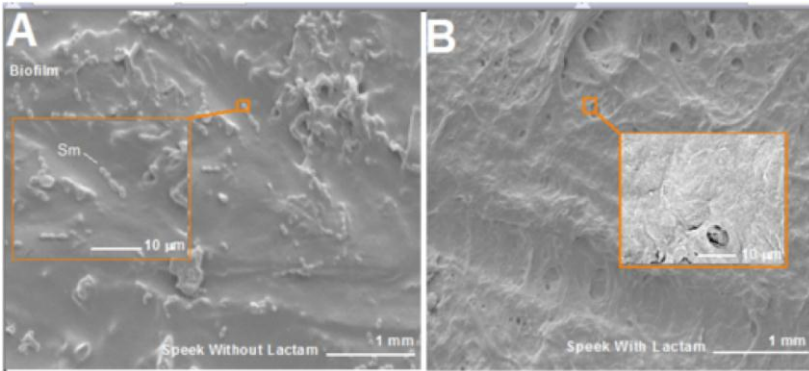


Figure 4. (A) MEV imagen da superfície de SPEEK, mostrando colonias *S. mutans* biofilms (S.m) sobre a superfície do polímero, (B) MEV imagen de SPEEK+lactam sem presença de colonias evidentes.

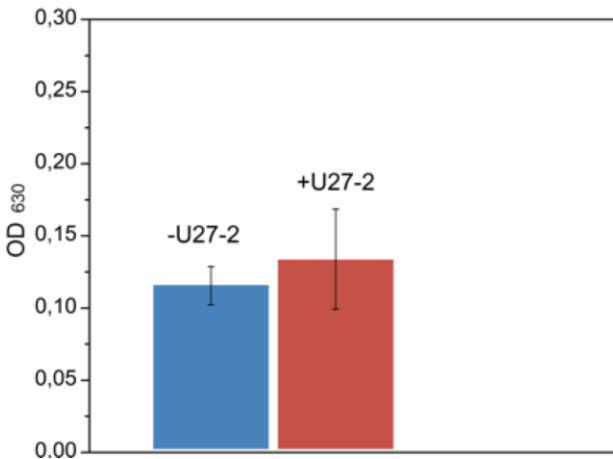


Figura 5. Crescimento planctônico de *S. mutans* sobre superfícies SPEEK e SPEEK/lactama após 48h de crescimento em TSB (37°C, 150 rpm).

As medidas de absorvância do crescimento planctônico no meio circundante as amostras SPEEK para 48h de crescimento não mostraram diferenças significativas entre o SPEEK contendo ou não lactama. No entanto, a densidade de biofilme foi menor sobre SPEEK contendo lactama do que em SPEEK livre de lactama (figura 5). Pode-se observar ainda a diminuição do pH de 7 (pH neutro) para 4 (meio ácido) após 48h de crescimento.

4. Discussão

Neste estudo, PEEK foi funcionalizado para incorporação de novos compostos anti-biofilmes à base de lactama. A presença de SO_3H ou lactamas na estrutura PEEK funcionalizado (SPEEK) foi determinada por análises TGA, RMN e FTIR. O grau de sulfonação (DS) de SPEEK em cerca de 60-65% encontrada em nosso estudo está de acordo com estudos anteriores, que usou métodos semelhantes de sulfonação e caracterização [24]–[26], [29].

Uma menor densidade de biofilme de *S. mutans* foi notada no SPEEK contendo lactama, quando comparada com a de SPEEK livre lactama indicando uma atividade antibiofilme potencial de SPEEK/lactama contra *S. mutans* biofilme.

Em estudos anteriores, furanona e lactamas revelaram uma atividade inibitória sobre diferentes biofilmes bacterianos sem estimular a resistência bacteriana [30].

Considerando tal efeito antibiofilme, a incorporação de furanonas ou lactamas em biomateriais poliméricos torna-se uma estratégia clinicamente atraente para evitar infecções. Por exemplo, furanonas têm sido incorporados em cimentos de restaurações dentárias que foram subsequentemente avaliadas por meio de ensaios microbiológicos, em um meio contendo *Streptococcus mutans* ou *Lactobacillus sp* ao longo de um período de 30 dias. Os resultados mostraram que todos os cimentos contendo furanona apresentaram atividade antibacteriana contra *S. mutans* e *Lactobacillus sp* durante 30 dias [31]. Em um estudo anterior a lactama em solução inibiu a formação de biofilme em superfície de polistereno de um conjunto de bactérias que inclui *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus mutans* [19]. Além disso, a presença de lactamas em solu© ao foi igualmente capaz de inibir a formação de biofilme sobre membransa de PLGA, revelando um efeito antibiofilme contra *Enterococcus faecalis* [23].

Em nosso estudo, o SPEEK contendo lactamas não afetou a taxa de crescimento da população planctônica circundante, o que indica que a diminuição na formação de biofilme causada por lactama não está relacionada com a taxa de crescimento bacteriano. Essa característica é importante para manutenção do comportamento natural da microbiota

oral. Esses resultados estão de acordo com estudo que avaliou efeitos de furanona sobre a estrutura de biofilme de *S. mutans* e sensor de quórum em diferentes tempos [32]. Os resultados demonstram que a densidade da formação de biofilme foi diminuída na presença de furanona embora não houvesse diferença significativa na taxa de crescimento planctônicas de *S. mutans* em presença e ausência de furanone [32].

No que diz respeito aos polímeros utilizados em implantodontia, PEEK tem mostrado ser muito atraente para incorporar compostos antibiofilme graças ao processo de sulfonação que promove um equilíbrio entre as propriedades mecânicas e estabilidade termo-oxidativa, permitindo a manipulação do polímero em vários estados físicos obtendo condições propícias para união com outros compostos sem modificar suas propriedades drasticamente [25], [33]. Além disso, a estrutura física e reatividade química do PEEK sulfonado (SPEEK) contribuem para a migração celular na superfície. Um estudo anterior comparou a citotoxicidade de um SPEEK hidratado (SPEEK-W) e SPEEK contendo acetona (SPEEK-WA). Ambos SPEEK-W e SPEEK-WA mostraram uma morfologia de superfície e composição química semelhantes, embora SPEEK-W tem revelado uma biocompatibilidade inferior, também foi avaliada a função de pré-osteoblastos, concluindo que o crescimento do osso e a formação de apatita nas superfícies de SPEEK pode ser afetada pela presença de ácido sulfúrico residual que é resultante do processo de sulfonação, sendo ser um fator importante na reação para com o ambiente [34].

5. Conclusões

A funcionalização de SPEEK para incorporar compostos antibiofilme foi realizada neste estudo. Dentro da limitação do presente estudo, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

- A funcionalização de PEEK foi realizada por tratamento sulfonação resultando em um PEEK sulfonado a 65% classificado por análises de ressonância magnética nuclear e análise termogravimétrica. A incorporação do novo composto antibiofilme orgânicos à base de lactama foi efetuada durante a solubilização de SPEEK e também detectada por espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier e espectroscopia de energia dispersiva.

- O crescimento planctônico *S. mutans* mostrou um comportamento semelhante em torno SPEEK contendo ou não lactama. No entanto, não foi detectado a formação de biofilme em superfícies SPEEK contendo lactamas de acordo com as imagens de microscopia eletrônica de varredura. Indicando frente a esses resultados, SPEEK/lactama parece ser um material clinicamente atraente devido às suas propriedades mecânicas e antibiofilme. Não obstante, estudos adicionais envolvendo biofilmes multi-espécies são necessários.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro concedido pela CAPES e CNPq (Brasil).

Referências

- [1] S. M. Kurtz and J. N. Devine, “PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants.,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 32, pp. 4845–69, Nov. 2007.
- [2] J.-P. Meningaud, F. Spahn, and J.-M. Donsimoni, “After titanium, peek ?,” *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*, vol. 113, no. 5, pp. 407–10, Nov. 2012.
- [3] M. Niinomi, “Mechanical properties of biomedical titanium alloys,” *Mater. Sci. Eng. A 243*, vol. 243, pp. 231–236, 1998.
- [4] W.-T. Lee, J.-Y. Koak, Y.-J. Lim, S.-K. Kim, H.-B. Kwon, and M.-J. Kim, “Stress shielding and fatigue limits of poly-ether-ether-ketone dental implants.,” *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 100, no. 4, pp. 1044–52, May 2012.
- [5] N. Broggini, L. M. Mcmanus, J. S. Hermann, R. U. Medina, T. W. Oates, R. K. Schenk, D. Buser, J. T. Mellonig, and D. L. Cochran, “at the Implant-Abutment Interface,” *J. Dent. Res.*, vol. 82, no. 3, pp. 232–238, 2003.
- [6] J. R. Sarot, C. M. M. Contar, A. C. C. Da Cruz, and R. de S. Magini, “Evaluation of the stress distribution in CFR-PEEK dental

- implants by the three-dimensional finite element method.," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 7, pp. 2079–85, Jul. 2010.
- [7] V. K. Jansen, G. Conrads, and E. J. Richter, "Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface.," *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 12, no. 4, pp. 527–40, 1997.
- [8] W. Teughels, N. Van Assche, I. Sliepen, and M. Quirynen, "Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development.," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 17 Suppl 2, pp. 68–81, Oct. 2006.
- [9] L. J. a Heitz-Mayfield, "Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators.," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 35, no. 8 Suppl, pp. 292–304, Sep. 2008.
- [10] N. U. Zitzmann and T. Berglundh, "Definition and prevalence of peri-implant diseases.," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 35, no. 8 Suppl, pp. 286–91, Sep. 2008.
- [11] N. U. Zitzmann, I. Abrahamsson, T. Berglundh, and J. Lindhe, "Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs.," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 29, no. 5, pp. 456–61, May 2002.
- [12] M. M. Marsh P, *Oral microbiology.*, 5th ed. Edinburgh, 2009.
- [13] M. a Listgarten and C. H. Lai, "Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth.," *J. Periodontol.*, vol. 70, no. 4, pp. 431–7, Apr. 1999.
- [14] H. Ceri, M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, and a Buret, "The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, no. 6, pp. 1771–6, Jun. 1999.
- [15] T. B. Rasmussen and M. Givskov, "Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs.," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 296, no. 2–3, pp. 149–61, Apr. 2006.

- [16] D. Romero, M. F. Traxler, D. López, and R. Kolter, "Antibiotics as Signal Molecules," *Chem. Rev.*, vol. 111, no. 9, pp. 5492–5505, 2011.
- [17] F. M. I. Natrah, M. M. Kenmegne, W. Wiyoto, P. Sorgeloos, P. Bossier, and T. Defoirdt, "Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum sensing," *Aquaculture*, vol. 317, no. 1–4, pp. 53–57, Jul. 2011.
- [18] M. Hentzer and M. Givskov, "Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections," *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 9, pp. 1300–1307, 2003.
- [19] U. a Pereira, L. C. a Barbosa, C. R. a Maltha, A. J. Demuner, M. a Masood, and A. L. Pimenta, " γ -Alkylidene- γ -lactones and isobutylpyrrol-2(5H)-ones analogues to rubrolides as inhibitors of biofilm formation by gram-positive and gram-negative bacteria.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 24, no. 4, pp. 1052–6, Mar. 2014.
- [20] D. Ren, J. J. Sims, and T. K. Wood, "Brief report Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z) -4-bromo-5- (bromomethylene) -3- butyl-2 (5H) -furanone.," *Environ. Microbiol.*, vol. 3, pp. 731–736, 2001.
- [21] D. Ren, J. J. Sims, and T. K. Wood, "Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone.," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 34, no. 4, pp. 293–9, Jan. 2002.
- [22] M. Manefield, T. B. Rasmussen, M. Hentzer, J. B. Andersen, P. Steinberg, S. Kjelleberg, and M. Givskov, "Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover.," *Microbiology*, vol. 148, no. Pt 4, pp. 1119–27, Apr. 2002.
- [23] U. a Pereira, L. C. a Barbosa, C. R. a Maltha, A. J. Demuner, M. a Masood, and A. L. Pimenta, "Inhibition of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by highly active lactones and lactams analogues of rubrolides.," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 82, pp. 127–38, Jul. 2014.

- [24] J. Xu, Z. Zhang, X. Xiong, and H. Zeng, "A new solvent for poly(ether ether ketone) Jiarui," *Polymer (Guildf)*., vol. 33, no. 20, pp. 4432–4434, 1992.
- [25] S. M. J. Zaidi, "Polymer Sulfonation – A versatile Route to prepare proton -conducting membrane material for advanced technologies: $\text{أ} - \text{صلاخلا}$," *Arab. J. Sci. Eng.*, vol. 28, no. 2B, pp. 183–194, 2003.
- [26] T. F. Conceição, J. R. Bertolino, G. M. O. Barra, S. L. Mireski, A. C. Joussef, and A. T. N. Pires, "Preparation and Characterization of Poly (Ether Ether Ketone) Derivatives," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 19, no. 1, pp. 111–116, 2008.
- [27] J. C. M. Souza, M. Henriques, R. Oliveira, W. Teughels, J.-P. Celis, and L. a Rocha, "Biofilms inducing ultra-low friction on titanium.," *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 12, pp. 1470–5, Dec. 2010.
- [28] J. C. M. Souza, P. Ponthiaux, M. Henriques, R. Oliveira, W. Teughels, J.-P. Celis, and L. a Rocha, "Corrosion behaviour of titanium in the presence of *Streptococcus mutans*.,," *J. Dent.*, vol. 41, no. 6, pp. 528–34, Jun. 2013.
- [29] P. Xing, G. P. Robertson, M. D. Guiver, S. D. Mikhailenko, K. Wang, and S. Kaliaguine, "Synthesis and characterization of sulfonated poly(ether ether ketone) for proton exchange membranes," *J. Memb. Sci.*, vol. 229, no. 1–2, pp. 95–106, Feb. 2004.
- [30] M. Manefield, M. Welch, M. Givskov, G. P. C. Salmond, and S. Kjelleberg, "Halogenated furanones from the red alga , *Delisea pulchra* , inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 205, pp. 131–138, 2001.
- [31] Y. Weng, L. Howard, V. J. Chong, J. Sun, R. L. Gregory, and D. Xie, "A novel furanone-modified antibacterial dental glass ionomer cement.," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 8, pp. 3153–60, Aug. 2012.
- [32] Z. He, Q. Wang, Y. Hu, J. Liang, Y. Jiang, R. Ma, and Z. Tang, "Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere

with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its luxS mutant strain,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 40, pp. 30–35, 2012.

- [33] a. J. Appleby and J. Twidell, “Recent Developments and Applications of the Polymer Fuel Cell [and Discussion],” *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 354, no. 1712, pp. 1681–1693, Jul. 1996.
- [34] Y. Zhao, H. M. Wong, W. Wang, P. Li, Z. Xu, E. Y. W. Chong, C. H. Yan, K. W. K. Yeung, and P. K. Chu, “Cytocompatibility, osseointegration, and bioactivity of three-dimensional porous and nanostructured network on polyetheretherketone,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 37, pp. 9264–77, Dec. 2013.

2.2. ARTIGO 1 EM INGLÊS

Chemical, microscopic and microbiological analysis of a functionalized poly-ether-ether-ketone (PEEK) embedding antibiofilm compounds

Montero JFD¹, Ulisses AP⁵, Barbosa LC^{5,6}, Barra G², Fredel MC², Souza JCM¹, Magini RS¹, Pimenta AL^{3,4}

¹Center for Research on Dental Implants (CEPID), School of Dentistry (ODT), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, 88040-900, Brazil.

² Department of Mechanical Engineering (EMC), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, 88040-900, Brazil

³Integrated Laboratories Technologies (InteLAB), Dept. Chemical Engineering (EQA), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, 88040-970, Brazil (present address).

⁴Department of Biologie, Université de Cergy Pontoise, 2, Av. Adolphe Chauvin 95302 Cergy Pontoise – France (permanent address).

⁵Department of Chemistry, Federal University of Viçosa, Viçosa/MG 36570-000, Brazil.

⁶Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Corresponding author:

Prof. Ricardo de Souza Magini, DMD, MSc

Email: ricardo.magini@gmail.com,

Center for Research on Dental Implants (CEPID)

School of Dentistry (ODT)

Federal University of Santa Catarina (UFSC)

Florianópolis/SC

88040-900, Brazil

Phone: +55 48 96551776

Abstract

PEEK is currently presented as an alternative for orthopedic implants due to its biocompatibility and low modulus compared to titanium. PEEK has been shown to be very attractive for incorporating

compounds thanks to the sulphonation process, which promotes a balance between the mechanical properties and thermo-oxidative stability. The objective of this work was to functionalize a poly-ether-ether-ketone (PEEK) film in order to incorporate novel lactam-based anti-biofilms compounds. PEEK samples were functionalized by sulphuric acid treatment and then dissolved in dimethylsulfoxide where lactam-based antibiofilm compounds were added to be incorporated into the polymer. A dip coating technique was used to synthesize a thin film on a glass-based substrate. The sulfonation degree (DS) and the incorporation of anti-biofilm compounds (lactams) into SPEEK were analysed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (HNMR), Thermogravimetric Analysis (TGA), and Scanning Electron Microscopy (SEM-EDS). The characterization indicated a degree of sulfonation (DS) of 65% and TGA curves confirmed the presence of SO_3H and lactams in the SPEEK structure. Biofilm formation over the functionalized materials was determined using *Streptococcus mutans* as tester strain. Effects of the incorporated lactams on the surrounding media were also assessed, by measuring bacterial planktonic growth. Biofilm densities over SPEEK surface containing lactams were lower than those observed over SPEEK free of lactams, indicating that the antibiofilm activity of those compounds were maintained after incorporation into SPEEK. Planktonic growth analysis showed no long distant effects of PEEK-incorporated lactams, indicating that no systemic effects should be expected upon clinical uses of medical devices produced with lactam-treated SPEEK. Results presented here indicate that inclusion of lactams into SPEEK represents a good alternative for the production of biomaterials resistant to bacterial contamination.

Key Words: PEEK, SPEEK, lactam, *Streptococcus mutans*, biofilm, biofilm inhibition.

1.Introduction

Since the 1980s, the polymer poly-ether-ether-ketone (PEEK) has been increasingly used as biomaterial for the treatment of orthopaedic trauma and spinal implants, presenting itself as an alternative to titanium for orthopaedic and dental implants (Kurtz & Devine, 2007). Applications of PEEK in the biomedical field result from its properties, such as stability at high temperature ($\sim 300^\circ\text{C}$); resistance to chemical degradation; high mechanical strength and high biocompatibility (Kurtz

& Devine, 2007; Meningaud, Spahn, & Donsimoni, 2012). PEEK and its composites show high values of tensile strength (100-215 MPa) and low values of elastic modulus, ranging from 4.5 up to 19 GPa, depending on the presence of inorganic filler (Kurtz & Devine, 2007). As a comparison, commercially pure titanium reveals mean values of tensile strength ranging from 400 up to 550 MPa and elastic modulus from 100 to 140 GPa (Niinomi, 1998). Since elastic modulus values close to that of trabecular bone (12 -20 GPa) are important for force distribution and the subsequent remodelling process of the bone surrounding the biomaterial [1,2,4], PEEK becomes an interesting material for applications in dental prostheses and implant structures [2,5,6].

However, like any other material present in the oral cavity, PEEK is vulnerable to the accumulation of oral biofilms that can induce peri-implant or periodontal inflammatory reactions [7,8]. Such inflammatory reactions surrounding implants may be restricted to soft tissues, characterized by a reversible inflammation (mucositis), or lead to an inflammatory reaction with subsequent irreversible bone loss, named periimplantitis [9-11]. Biofilm consists of a well-organized co-aggregation of microorganisms, embedded in an extracellular matrix formed by polysaccharides, glycoproteins and nucleic acids secreted by the microorganisms themselves [12,13]. In the environment of the oral cavity, after oral hygiene, a conditioning film composed of glycoproteins, water and ions with 0.1-15 μm thickness is formed over hard and soft tissues (Marsh P, 2009). Over this conditioning film, a biofilm is formed through the following mechanisms: (1) transport of initial colonizers to the surface; (2) weak and reversible initial adhesion resulting from weak interactions between microorganisms and surface; (3) strong adhesion of microorganisms to the surface, established by specific interactions (covalent, ionic or hydrogen bonds); (4) maturation, resulting in the growth and structuration of the biofilm. Biofilm formation and architecture are dependent on bacteria co-aggregation and community behaviour, achieved through a cell-to-cell communication system known as *quorum sensing* (QS). *Quorum sensing* is a mechanism used by bacteria to communicate with each other through chemical signals called Auto Inducteurs (AI), thus controlling social behaviour, and turning genes on and off in response to environmental cues.

Conventional antibiotic therapies may decrease an infectious process by eradicating planktonic bacteria arisen from adhered populations, but are

ineffective against those buried in biofilms. When organized in biofilms, bacteria are able to survive antibiotic treatments at concentrations up to a thousand times higher than those used to kill their planktonic counterparts (Ceri et al., 1999). Inside the biofilm, bacteria are also protected against dehydration, acids, salinity, and phagocytosis [15,16]. Therefore, the identification of compounds capable of inhibiting biofilm formation emerges as a better strategy to control microbial infections [17,18], since such compounds do not kill the pathogens directly, but instead reduce the population of resistant bacteria by disrupting the biofilm organization thus avoiding and/or reversing the development of bacterial resistance to the drug (Pereira et al., 2014b). Amongst antibiofilm compounds identified so far, the group of halogenated natural furanones, which were initially isolated from the red algae *Delisea pulchra*, display inhibitory activity against biofilm composed of important pathogens such as *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [20,21]. Recent studies have shown that some synthetic lactams, analogues to rubrolides whose structure resembles those of furanones [18,19,22], are active against biofilm of *Enterococcus faecalis*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* [19,23].

The purpose of this study was to synthesize, functionalize and characterize a sulphonated poly (ether-ether-ketone) (PEEK), embedding novel lactam-based antibiofilms compounds, in view of its applications on dental implants.

2. Materials and Methods

2.1. Functionalization of PEEK and lactams incorporation

PEEK (OPTIMA 450P, Victrex; England) was functionalized by sulphonation treatment, using 98% sulphuric acid (Synth®, Brazil). PEEK sulphonation was carried out according to the procedures previously described in literature [24-26]. In brief, 2.0 g PEEK was solubilized in 50 ml of 98% sulphuric acid. The mixture was heated to 50°C and kept under mechanical stirring at nitrogen atmosphere for 1h. Then, the reaction mixture was gradually added to 500 ml of ice-cold distilled water resulting in the precipitation of a sulphonated poly (ether ether ketone - SPEEK). This product was filtered, washed with water until complete removal of sulphuric acid and dried at 80°C for 48h. After functionalization, the polymer was dissolved into dimethyl sulphoxide (DMSO, Synth®; Brazil) and mixed with the appropriate

lactam. The dip coating technique was used to synthesize thin SPEEK/lactam films on glass surfaces. Glass-based substrates were immersed for 30 s. into the solubilized SPEEK containing lactams. The minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) of lactams against *S. mutans* biofilms (0.0875 mg / mL) had been previously defined and used in this study (Pereira et al., 2014b). After dip coating, samples were placed in an oven at 50°C for 24h to remove the solvent and a dry thin SPEEK film was thus obtained.

2.2. Chemical analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) of the polymers was carried out under $50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ nitrogen atmosphere using a TGA-50 equipment (Shimadzu, ® Japan). The nitration degree (ND) of NO -1-PEEK and SPEEK+ lactams was calculated using the TG curves. Non-isothermal experiments were performed from 25 up to 900°C at a heating rate of $10^\circ\text{C min}^{-1}$ for each sample.

The nitrated SPEEK containing lactam was dissolved in DMSO-d₆ (ca. 3% solution) for Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis using a Varian AS-400 spectrometer, oxford. SPEEK-OH was analysed by solid state NMR.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis of PEEK, SPEEK and SPEEK+ lactams was performed at 20 scan with 4 cm resolution using a FTL 2000 spectrometer (Bomem, Canada). All samples were dried and purified before analysis.

2.3. Biofilm quantification

S. mutans ATCC 25175 was routinely grown under microaerophilic conditions for 48 h at 37°C, in agar plates with 32 g/L of Brain Heart Infusion (BHI - Bacto, Difco®, USA), supplemented with 3 g/L of yeast extract and 200 g/L of sucrose (Bacto, Difco, USA). For biofilm experiments, *S. mutans* cells were inoculated in Tryptic Soy Broth (TSB-Bacto, Difco®, USA) supplemented with 3 g/L of yeast extract and 200 g/L of sucrose, and cultivated for 18 h at 37°C, under microaerophilic conditions. After incubation, cells were harvested by centrifugation at 5,000 rpm for 10 min at 4 °C, and washed twice with a phosphate buffer solution (PBS). The bacterial pellet was then resuspended in TSB supplemented with mucin (2.5 g/L), peptone (5

g/L), urea (1 g/L), yeast extract (2 g/L) and sucrose (200 g/L), to obtain a suspension with an optical density (OD_{630}) of 0.6, corresponding to 1×10^8 CFU/mL. OD_{630} readings were performed using a BioTek® spectrophotometer (USA). This cell suspension was used as the inoculum for biofilm formation assays [27,28]. SPEEK samples were placed into 24 well culture plates, where each well contained 2 mL of *S. mutans* inoculum (1×10^8 CFU/mL), and incubated at 37°C. After 48 h, the planktonic growth was determined by OD_{630} readings, as described above.

2.4. Surface Analysis

For microscopic analysis before biofilm formation, SPEEK samples were sputter-coated with a thin gold layer, and analysed by secondary (SE) and backscattered (BSE) electrons using scanning electron microscope (JEOL JSM-6390LV, Japan) at 10 kV.

Surface hydrophobicity of the specimens was assessed by water contact angle measurements performed using a goniometer digital (OCA 20, Data Physics, Germany) A volume of 5 μ L type 1 water was placed on different areas of the sample surfaces for hydrophobicity measurements at room temperature and humidity.

After biofilm formation, surfaces covered with biofilms were washed twice in PBS and fixed in 2% glutaraldehyde for 5 min. Then, surfaces were washed three times in PBS and dehydrated through a series of graded ethanol solutions (50, 70, 80, 90, and 100%). Samples covered with *S. mutans* biofilms were sputter-coated with gold, and analysed by Scanning Electron Microscopy at 5-10 kV.

2.5. Statistical Analysis

Results of planktonic growth on SPEEK were statistically analysed by one-way analysis of variance test (ANOVA), at significance level of $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Chemical analyses

Analysis of the TGA curves shows that SPEEK was thermally stable up to 350 °C and exhibited two distinct weight loss stages, in contrast to PEEK, which showed only one weight loss at 550 °C, as shown in Fig. 1. The mass loss of SPEEK at 100 °C occurred due to the elimination of water molecules absorbed by the material. The first stage of thermal degradation of SPEEK, ranging from 300 up to 400 °C, is characterized by the elimination of sulfonic acid groups. The second stage of thermal degradation ranging from 500-1600 °C is attributed to the decomposition of the polymer main chain. The analysis area of the TGA curve showed a high degree of sulphonation (DS) a 60% - 65.

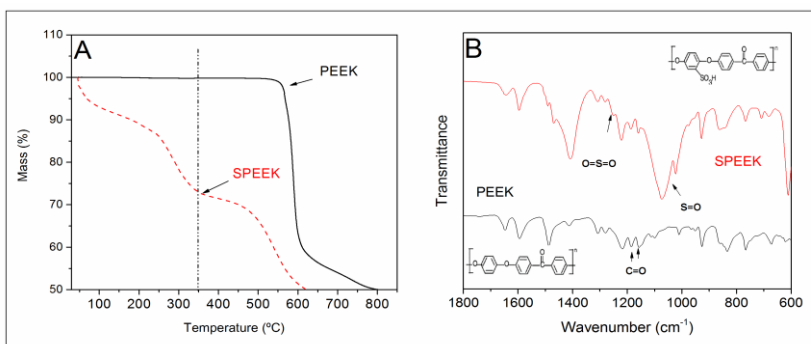


Figure 1.(A) Thermogravimetric curves recorded on PEEK and SPEEK. (B) FTIR spectra recorded on PEEK and SPEEK. The appearance of the signal at 1255 cm^{-1} and 1050 cm^{-1} represents O=S=O dissymmetric stretching and S=O symmetric stretching, respectively.

Significant differences in the FTIR spectrum of SPEEK were noticed when compared to PEEK. This can be imputed to the presence of sulfonic acid groups as revealed at bands 3440, 1252, 1080, 1024, and 709 cm^{-1} in the FTIR spectra (Fig 1B). The intensities of those bands increased with the sulfonation level associated with the backbone (e.g. C=O stretch at 1653 cm^{-1}). The broad band at 3450–3430 cm^{-1} can be assigned as the O–H vibration. The other bands can be assigned to several sulfur-oxygen vibrations: asymmetric O=S=O stretch (1252); symmetric O=S=O stretch (1080); S=O stretch (10, 24); and S–O stretch

(709). The aromatic C–C band at 1490 cm^{-1} was observed to split upon sulfonation.

The presence of each SO_3H group results in a distinct signal for protons at the H position. The intensity of this signal is equivalent to the SO_3H group content. The Hc and HD of the hydroquinone ring repeat units of PEEK appear as a characteristic singlet at 7.25 ppm (Zaidi, 2003). SPEEK at low DS revealed a significant proportion of repeated units which are non-sulfonated (Fig 2).

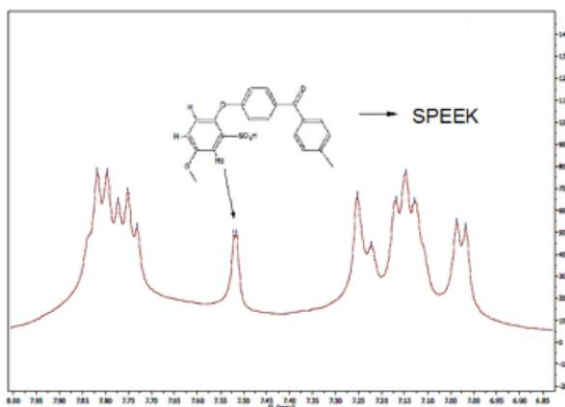


Figure 2: H-NMR spectrum curve of SPEEK, dissolved in DMSO Deuterated, the intensity of the signal indicates the presence of the SO_3H group belonging to the chemical structure of SPEEK.

In the same way, differences in the FTIR spectrum recorded on SPEEK containing lactam were noticed when compared to SPEEK free of lactam, specifically a small change in the intensity of the bands $690\text{-}515\text{ cm}^{-1}$, which is compatible with the presence of Br and Cl groups. These results are indicative of the presence of Br and Cl, from the U27-2 lactam, in the SPEEK composition chemical. Confirming these results, the EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) identified the presence of chemical groups compatible with Br and Cl on the surface of SPEEK+ lactams, as shown in Fig. 3.

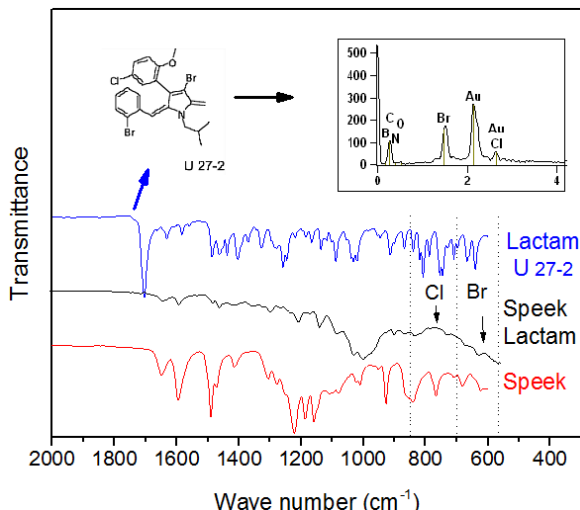


Figure 3. FTIR spectra comparing SPEEK and SPEEK+lactam, and EDS of SPEEK+lactam identifying the presence of chemical elements compatible with Br and Cl.

3.2. Surface and Biofilm analyses

Measurements of the planktonic growth in the supernatant of SPEEK samples after 48 h of incubation with *S. mutants* showed no significant difference whether the biomaterial contained lactams or not (fig 4.). The pH of the growth medium shifted from 7 down to approximately 4 in 48h, compatible with the reported results on the *in vivo* and *in vitro* acidification properties of *S. mutans*. (Nyvad & Kilian, 1990; Souza et al., 2013)

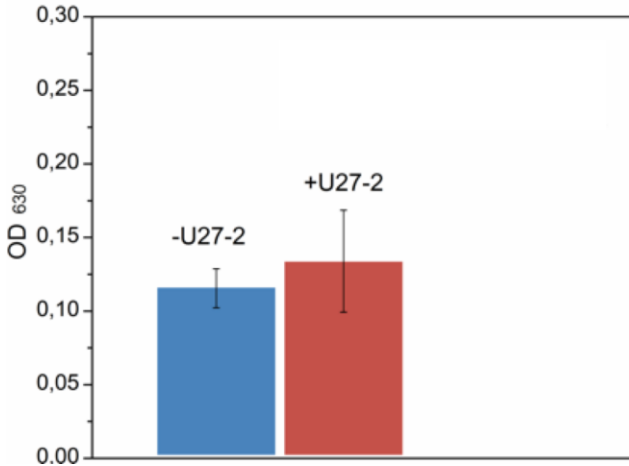


Figure 4. Planktonic *S. mutans* grown on SPEEK and SPEEK/lactam surfaces for 48 h in TSB (37°C, 150 rpm).

SEM images of the surfaces after exposure to bacterial cultures revealed that *S. mutans* colonies grew widely separated as agglomerates on SPEEK (Fig. 5A-B). *S. mutans* biofilms could not be detected on SPEEK containing lactams. A thin layer of mucin was noticed on all SPEEK surfaces.

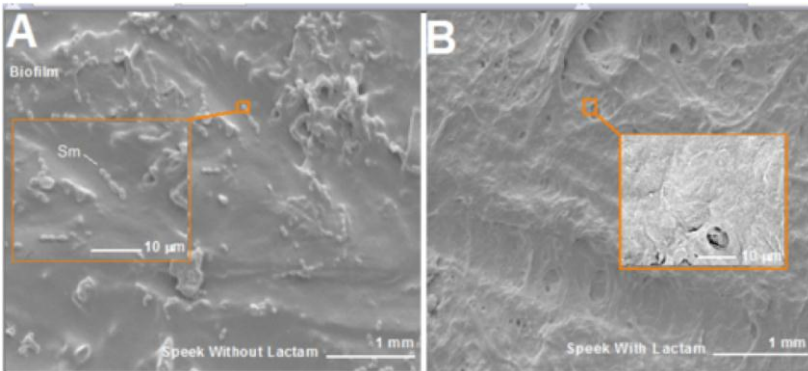


Figure 5. (A) SEM images of surfaces of SPEEK, showing *S. mutans* biofilms (S.m) grown on the surface, morphology of colonies of *S. mutans* (B) SEM images of SPEEK+lactam without the presence of biofilm on surface.

4. DISCUSSION

PEEK has shown to be very attractive to incorporate antibiofilm compounds thanks to sulphonation process which promotes a balance between the mechanical properties and thermo-oxidative stability (Appleby & Twidell, 1996; Zaidi, 2003).

In this study, PEEK was functionalized by sulphonation to embed novel lactam-based anti-biofilms compounds. The presence of SO_3H or lactams into the functionalized PEEK (SPEEK) structure was confirmed by TGA, RMN and FTIR analyses. The degree of sulfonation (DS) of SPEEK at about 60-65% found in our study is in agreement with previous studies that used similar sulphonation and characterization methods (Conceição et al., 2008; Xing et al., 2004; Xu et al., 1992; Zaidi, 2003).

In previous studies, furanones and lactams have revealed inhibitory effects over different bacterial biofilms with no concomitant stimulation of bacterial resistance (Manefield, Welch, Givskov, Salmond, & Kjelleberg, 2001). Considering such specific antibiofilm effect, the incorporation of furanones or lactams into polymeric biomaterials becomes a clinically attractive strategy to avoid infections. Furanones have been embedded into dental restorative cements and when these cements were exposed to a medium containing *S. mutans* or *Lactobacillus sp* over a period of 30 days (Weng et al., 2012), the results showed that all the formulated furanone-containing cements displayed antibacterial activity against both *S. mutans* and *Lactobacillus sp* for 30 days (Weng et al., 2012).

A previous study demonstrated that lactams in solution are able to inhibit biofilm formation of panel of bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus mutans*, over polystyrene surfaces (Pereira et al., 2014b). Furthermore, the presence of lactams in solution also inhibited biofilm formation over PLGA membrane, revealing an antibiofilm effect against *E. faecalis* (Pereira et al., 2014a).

In the present study, SPEEK containing lactams did not affect the planktonic growth surrounding the biomaterial containing lactams, confirming previous results obtained for this lactams in water-based

solutions (Pereira et al., 2014b). More importantly, inhibition of *S. mutans* biofilm was noticed on SPEEK containing lactams when compared to that on SPEEK free of lactams. Taken together, these results indicate that the activity of the lactams embedded into the polymer is specific against *S. mutans* biofilm, and was not related to an eventual interference in the bacterial growth. This specificity against biofilm formation is important at both clinical and pharmaceutical levels, since compounds displaying conventional antimicrobial activity (such as antibiotics) are prone to induce development of resistance in the targeted bacterial population, while those specific active against bacterial biofilm formation (and not bacterial survival) are more likely to display pharmaceutical and clinical applications for longer periods of time, being, therefore, also more commercially relevant.

Also important, the fact that planktonic growth remained unaffected in our study indicates that the lactams embedded into the SPEEK did not dissipate into the surrounding media, which is clinically relevant for the future development of lactam-containing devices, in view of the maintainance of the natural behaviour of oral microbiota and tissues surrounding such materials.

5. CONCLUSION

The functionalization of SPEEK to embed antibiofilm compounds was successfully performed in this study, resulting in a 65% sulfonated PEEK, as determined by thermogravimetric and nuclear resonance analysis. The incorporation of novel organic antibiofilm compounds based on lactams was successfully carried out during solubilization of SPEEK, as also demonstrated by thermal gravimetric and chemical analyses.

Planktonic growth of *S. mutans* around SPEEK was not affected by the presence of lactams embedded into the polymer, and a consistent biofilms inhibition effect was detected on SPEEK surfaces containing lactams, as shown on scanning electron microscopy images. These results indicate that SPEEK/lactmas could be a clinically attractive material due to its mechanical and specific antibiofilm properties.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support provided by CAPES and CNPq (Brazil).

References

- Appleby, a. J., & Twidell, J. (1996). Recent Developments and Applications of the Polymer Fuel Cell [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 354(1712), 1681–1693. <http://doi.org/10.1098/rsta.1996.0073>
- Broggini, N., Mcmanus, L. M., Hermann, J. S., Medina, R. U., Oates, T. W., Schenk, R. K., ... Cochran, D. L. (2003). at the Implant-Abutment Interface. *Journal of Dental Research*, 82(3), 232–238.
- Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, a. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1771–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Conceição, T. F., Bertolino, J. R., Barra, G. M. O., Mireski, S. L., Joussef, A. C., & Pires, A. T. N. (2008). Preparation and Characterization of Poly (Ether Ether Ketone) Derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(1), 111–116.
- Heitz-Mayfield, L. J. a. (2008). Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8 Suppl), 292–304. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01275.x>
- Hentzer, M., & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(9), 1300–1307. <http://doi.org/10.1172/JCI200320074>.One
- Jansen, V. K., Conrads, G., & Richter, E. J. (1997). Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 12(4), 527–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9274082>
- Kurtz, S. M., & Devine, J. N. (2007). PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. *Biomaterials*, 28(32), 4845–69. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.013>
- Lee, W.-T., Koak, J.-Y., Lim, Y.-J., Kim, S.-K., Kwon, H.-B., & Kim, M.-J. (2012). Stress shielding and fatigue limits of poly-ether-ether-ketone dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 100(4), 1044–52. <http://doi.org/10.1002/jbm.b.32669>
- Listgarten, M. a, & Lai, C. H. (1999). Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *Journal of Periodontology*, 70(4), 431–7. <http://doi.org/10.1902/jop.1999.70.4.431>
- Manefield, M., Rasmussen, T. B., Hentzer, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., & Givskov, M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR

turnover. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 4), 1119–27.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932456>

- Manefield, M., Welch, M., Givskov, M., Salmond, G. P. C., & Kjelleberg, S. (2001). Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 131–138.
- Marsh P, M. M. (2009). *Oral microbiology*. (C. L. Elsevier, Ed.) (5th ed.). Edinburgh.
- Meningaud, J.-P., Spahn, F., & Donsimoni, J.-M. (2012). After titanium, peek ? *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale*, 113(5), 407–10. <http://doi.org/10.1016/j.stomax.2011.12.016>
- Natrah, F. M. I., Kenmegne, M. M., Wiyoto, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2011). Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Aquaculture*, 317(1-4), 53–57.
<http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.038>
- Niinomi, M. (1998). Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Materials Science and Engineering A* 243, 243, 231–236.
- Nyvad, B., & Kilian, M. (1990). Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Research*, 24(4), 267–72.
- Pereira, U. a, Barbosa, L. C. a, Maltha, C. R. a, Demuner, A. J., Masood, M. a, & Pimenta, A. L. (2014a). Inhibition of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by highly active lactones and lactams analogues of rubrolides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 82, 127–38.
<http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.035>
- Pereira, U. a, Barbosa, L. C. a, Maltha, C. R. a, Demuner, A. J., Masood, M. a, & Pimenta, A. L. (2014b). γ -Alkylidene- γ -lactones and isobutylpyrrol-2(5H)-ones analogues to rubrolides as inhibitors of

biofilm formation by gram-positive and gram-negative bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(4), 1052–6.
<http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.01.023>

Rasmussen, T. B., & Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 296(2-3), 149–61.
<http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.005>

Ren, D., Sims, J. J., & Wood, T. K. (2001). Brief report Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environmental Microbiology*, 3, 731–736.

Ren, D., Sims, J. J., & Wood, T. K. (2002). Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Letters in Applied Microbiology*, 34(4), 293–9. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940163>

Romero, D., Traxler, M. F., López, D., & Kolter, R. (2011). Antibiotics as Signal Molecules. *Chemical Reviews*, 111(9), 5492–5505.
<http://doi.org/10.1021/cr2000509>.Antibiotics

Sarot, J. R., Contar, C. M. M., Cruz, A. C. C. Da, & Magini, R. de S. (2010). Evaluation of the stress distribution in CFR-PEEK dental implants by the three-dimensional finite element method. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 21(7), 2079–85.
<http://doi.org/10.1007/s10856-010-4084-7>

Souza, J. C. M., Henriques, M., Oliveira, R., Teughels, W., Celis, J.-P., & Rocha, L. a. (2010). Biofilms inducing ultra-low friction on titanium. *Journal of Dental Research*, 89(12), 1470–5.
<http://doi.org/10.1177/0022034510378428>

Souza, J. C. M., Ponthiaux, P., Henriques, M., Oliveira, R., Teughels, W., Celis, J.-P., & Rocha, L. a. (2013). Corrosion behaviour of titanium in the presence of *Streptococcus mutans*. *Journal of*

- Dentistry*, 41(6), 528–34.
<http://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.03.008>
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., & Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 17 Suppl 2, 68–81. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>
- Weng, Y., Howard, L., Chong, V. J., Sun, J., Gregory, R. L., & Xie, D. (2012). A novel furanone-modified antibacterial dental glass ionomer cement. *Acta Biomaterialia*, 8(8), 3153–60.
<http://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.038>
- Xing, P., Robertson, G. P., Guiver, M. D., Mikhailenko, S. D., Wang, K., & Kaliaguine, S. (2004). Synthesis and characterization of sulfonated poly(ether ether ketone) for proton exchange membranes. *Journal of Membrane Science*, 229(1-2), 95–106.
<http://doi.org/10.1016/j.memsci.2003.09.019>
- Xu, J., Zhang, Z., Xiong, X., & Zeng, H. (1992). A new solvent for poly(ether ether ketone) Jiarui. *Polymer*, 33(20), 4432–4434.
- Zaidi, S. M. J. (2003). Polymer Sulfonation – A versatile Route to prepare proton -conducting membrane material for advanced technologies: صلاحة. *The Arabian Journal for Science and Engineering*, 28(2B), 183–194.
- Zitzmann, N. U., Abrahamsson, I., Berglundh, T., & Lindhe, J. (2002). Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(5), 456–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060429>
- Zitzmann, N. U., & Berglundh, T. (2008). Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8 Suppl), 286–91. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x>

2.3. ARTIGO 2 EM PORTUGUÊS

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS EFEITOS DE DIFERENTES TEMPOS DE SULFONAÇÃO SOBRE A ADERÊNCIA BACTERIANA AO POLI-ÉTER-ÉTER-CETONA SULFONADO (SPEEK).

Montero JFD¹, Tajiri HA², Barra G², Fredel MC², Benfatti CA¹, Souza JCM¹, Magini R S¹, Pimenta A^{3,4}

¹Centro de Pesquisa sobre Implantes Dentários (CEPID) da Faculdade de Odontologia (ODT), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis / SC, 88040-900, Brasil.

² Departamento de Engenharia Mecânica (EMC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis / SC, 88040-900, Brasil.

³Integrated Laboratories Technologies (InteLAB), Departamento de Engenharia Química (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis / SC, 88040-970, Brasil.

⁴Departamento de Biologia, Université de Cergy Pontoise, 2, Av. Adolphe Chauvin 95302 Cergy Pontoise – France (permanent address)

Endereço para correspondência:

Prof. Ricardo de Souza Magini, DMD, MSc.
E-mail: magini@ccs.ufsc.br, jfdum@hotmail.com
Centro de Pesquisa sobre Implantes Dentários (CEPID)
Faculdade de Odontologia. (ODT)
Universidade Federal de Santa Catarina. (UFSC)
Florianópolis / SC.
88040-900, Brasil.
Telefone: +55 48 96551776

Resumo

O Poli-éter-éter-cetona (PEEK) atualmente apresenta-se como uma alternativa para implantes ortopédicos devido a sua biocompatibilidade e baixo módulo de elasticidade em relação ao titânio. PEEK tem mostrado ser muito atraente graças ao processo de sulfonação que promove um

balanço entre as propriedades mecânicas e estabilidade termo-oxidativas, gerando uma nanoestrutura em 3D com possíveis aplicações no campo biomédico. Porém, a quantidade de grupos sulfônicos na cadeia de Poli-éter-éter-cetona sulfonado (SPEEK) pode ser um fator crítico na resposta ao ambiente. Desta forma, é importante conhecer seu efeito antimicrobiano assim como a formação de biofilme sobre a superfície do polímero. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tempos de sulfonação de SPEEK sobre a formação de biofilme bacteriano. As amostras de PEEK foram funcionalizadas por meio de ácido sulfúrico (98%) e dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO®, Synth, Brasil). Uma técnica de revestimento por imersão foi utilizada para sintetizar uma fina película de SPEEK sobre um substrato à base de acrílico. O grau de sulfonação (DS) de SPEEK foi obtido pelas técnicas de análise termogravimétrica (TGA), capacidade de troca iônica (IEC), espectroscopia de infravermelho (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN de H). A caracterização e análise da superfície foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDS), perfilometria e ângulo de contato. Subsequentemente, o crescimento planctônico como a formação de biofilme produzido por *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis* após 48h foi avaliado através de espectrofotometria, quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC ml⁻¹) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme sobre SPEEK. Os resultados do crescimento e formação de biofilme foram analisados estatisticamente por meio de uma análise de variância (ANOVA), com nível de significância de $p < 0,05$. A análise de TGA, IEC, FTIR E RMN de H confirmaram a presença de SO₃H em diferentes tempos de sulfonação na estrutura de SPEEK, influenciando a formação de biofilme sobre a superfície, resultando em uma menor formação de biofilme nos tempo de sulfonação de 2h e 2:30min. Esses resultados apresentam o SPEEK como uma alternativa com propriedades antimicrobianas e nanoestrutura em 3D.

Palavras-chave: Biofilme, PEEK, SPEEK, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*.

1. Introdução

O titânio e as suas ligas são amplamente utilizadas em dispositivos biomédicos e componentes, em particular como substituto para o tecido duro graças a sua biocompatibilidade, também devido suas excelentes propriedades, tais como resistência à corrosão, elevada resistência à

fadiga mecânica (Liu, Chu, and Ding 2004), no entanto, biomateriais metálicos não pode satisfazer todos os requisitos clínicos, existem preocupações sobre a importância de partículas geradas pelo desgaste e à corrosão, especialmente no contexto de complicações pós-operatórias graves, como osteolysis, alergenicidade (Sagomyants et al. 2008; Urban et al. 2000).

Para extrapolar estas limitações e reduzir reações biológicas negativas pós-implantação, um dos materiais alternativos utilizados como uma escolha de titânio para ortopedia e implantologia é o poli(éter-éter-cetona) (PEEK) (Kurtz and Devine 2007), com características como a estabilidade a temperaturas elevadas (~300°C), resistência à degradação química, alta resistência mecânica e elevada biocompatibilidade (Kurtz and Devine 2007; Meningaud, Spahn, and Donsimoni 2012). Além disso, pode ser repetidamente esterilizado e maquinagem por calor e moldada para se ajustar ao contorno e forma dos ossos (Barton, Sagers, and Pitt 1996). Assim, PEEK representa um material interessante em odontologia, considerando que é empregado na realização de prótese dentais e em sistemas de implantes dentais (Broggini et al. 2003; Meningaud et al. 2012; Sarot et al. 2010).

Mesmo com essas características excelentes, PEEK tende a limitar a fixação óssea e, conseqüentemente, tem havido esforços para aumentar a sua capacidade de interação com osso através da introdução de porosidade, uma vez que a superfície porosa pode promover o crescimento de tecidos duros e moles para ao redor do material, criando assim ancoragem biológica para melhorar a estabilidade (Bobynt et al. 1999), algumas técnicas têm sido utilizadas para a fabricação de estruturas porosas em superfícies metálicas, incluindo usinagem, jateamento, oxidação anódica, tratamento alcalino e ácido; a porosidade e o tamanho dos poros do biomaterial desempenham um papel crítico na formação e regeneração do tecido (Karageorgiou and Kaplan 2005), servindo como uma barreira para a migração apical fisiológica de tecidos com melhorias significativas (Nevins et al. 2010). no entanto, os trabalhos relevantes em conformação de porosidade em PEEK são relativamente escassos, devido às suas propriedades, especialmente sua resistência química inerente.

O tratamento de sulfonação do PEEK, é uma ferramenta que produz uma redução no grupo hidroxilo com o grupo carbonilo exibindo uma excelente condutividade de protões, e que tem sido usado

principalmente em células de combustível (Conceição et al. 2008; Huang et al. 2001; Xu et al. 1992; Zhao et al. 2014), dentro das vantagens observadas no processo de interação do PEEK e ácido sulfúrico, encontramos a formação de uma rede porosa e nanoestrutura em 3D de grupos bio-funcionais, que contribui melhorando funções biológicas necessárias na engenharia de tecidos (Zhao et al. 2013).

Entretanto, todo biomaterial em contato com cavidade oral, esta sujeito a acúmulo e formação de biofilme e estabelecimento de comunidades bacterianas (Barton et al. 1996; Costerton 1999), o biofilme é de um co-agregado bem organizado de microorganismos, embebido numa matriz composta de polissacarídeos, glicoproteínas, ácidos nucleicos extracelulares e água (Listgarten and Lai 1999; Marsh P 2009), formado posterior estabelecimento da película adquirida condicionada de 0,1-15 mm de espessura, composta de glicoproteínas, água e íões, formada sobre os tecidos duros e moles da cavidade oral depois da higiene oral (Marsh P 2009). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tempos de sulfonação (1h, 1:30 min, 2h, 2:30 min e 3h) de SPEEK sobre a formação de biofilme bacteriano.

2. Materiais e Métodos

2.1. Funcionalização de PEEK

PEEK (Invivio®, Batch, D0602, grau NI1) foi funcionalizado pelo processamento de sulfonação usando ácido sulfúrico a 98% (Synth®, Brasil) solúvel em compostos orgânicos. A sulfonação PEEK foi feita de acordo com os procedimentos anteriormente descritos na literatura (Conceição et al. 2008; Xu et al. 1992; Zaidi 2003). Num balão volumétrico, 2,0g PEEK são solubilizados em 50 mL de ácido sulfúrico a 98%. A mistura foi aquecida à temperatura de 50°C e mantida sob agitação mecânica durante 1h, 1:30 min, 2h, 2:30 min e 3h. Em seguida, a mistura reacional foi gradualmente adicionada a 500 mL de água destilada gelada a precipitação resultando na formação de poli(éter-éter-cetona) sulfonado (SPEEK). O produto foi então filtrado, lavado com água até à remoção completa do ácido sulfúrico e secou-se a 80°C num forno durante 48h. Devido às dimensões do PEEK 381L (forma de grãos) solubilização em ácido sulfúrico foi preparada por um processo de inchamento de 18h sob agitação à temperatura ambiente. Após a funcionalização, o polímero foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO®, Synth, Brasil).

Amostras quadradas a base de acrílico com dimensões de 1cm x 2cm x 1mm, foram metalograficamente preparadas com lixas de SiC até 1200 mesh, posteriormente foram limpas com álcool isopropílico durante 10 minutos e em água destilada durante 5 minutos em banho ultrassônico, em seguida, imersas na solução, utilizando a técnica de revestimento por imersão durante 30s para sintetizar uma película fina de SPEEK sobre o substrato acrílico, mantidas num dessecador durante 24 horas e depois esterilizados numa câmara de fluxo, BIOSEG-12, marca Veco, através da utilização de luz ultravioleta com uma distancia de 100 cm.

2.2. Caracterização

Análise de Termogravimetria (TGA) dos polímeros foi realizada sob $50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ utilizando um equipamento TGA-50 (Shimadzu, Japão ®). O grau de nitrção (ND) de -PEEK foi calculada pelas curvas TGA. Experiências não-isotérmicas foram realizadas a partir de 25 até 900°C a uma taxa de aquecimento de 10°C min para cada amostra de 1h, 1:30 min, 2h, 2:30 min, 3h.

Por outra parte, a capacidade de troca iónica (IEC) de PEEK sulfonados foi medido pelo método da titulação. SPEEK foi embebido numa solução aquosa saturada de NaCl com volume excessivo por 12h, a solução foi, em seguida, titulada para um ponto final de pH de 7 com 0,01 mol padrão, NaOH^{-1} , utilizando fenolftaleína como indicador.

Para a análise de ressonância magnética nuclear (RMN) foi usando um espectrómetro Varian AS-400. O PEEK nitrado foi dissolvido em DMSO- d_6 , ca. Solução a 3% e tetramethylsiloxane (TMS) sendo utilizado como padrão interno. PEEK-OH e PEEK foram analisados por RMN de estado sólido.

A análise espectroscopia de infravermelho (FTIR) foi realizada em 20 de digitalização com resolução de 4 cm usando um espectrômetro FTL 2000 (Bomem, Canadá), todas as amostras foram secas e purificadas antes da análise.

2.3 Formação de biofilme

Condições de crescimento bacteriano

Streptococcus mutans ATCC 25175 e *Enterococcus faecalis* ATT29212 foram cultivadas em condições microaerófilas durante 48h a 37°C em placas de ágar com 32 g/L de Brain Heart Infusion (BHI) ágar (Bacto, ® Disco) suplementado com 3 g/L de extrato de levedura (Bacto, ® Difco) e 200 g/L de sacarose (Bacto, Difco, EUA). Antes de formação de biofilmes, as células de *S. mutans* e *E. faecalis* foram inoculadas em caldo tríptico de soja (TSB) (Bacto, ® Disco) suplementado com 3 g/L de extrato de levedura e 200 g/L de sacarose durante 18 horas a 37°C e 150 rpm. Após a incubação, as células foram colhidas por centrifugação durante 10 min a 48°C e 5000 rpm, e lavou-se duas vezes com uma solução tampão de fosfato (PBS).

Formação de biofilme e análise

S. mutans e *E. faecalis*, foram re-suspensas separadamente em meio TSB suplementado com mucina (2,5 g/L), peptona (5 g/L), ureia (1 g/L), extrato de levedura (2 g/L), e sacarose (200 g/L) para se obter uma densidade óptica (OD) de cerca de 0,6 a 630nm medida utilizando um espectrofotômetro (BioTek®, EUA), que corresponde a aproximadamente 1×10^8 UFC/mL para cepas de *S. mutans* e *E. faecalis* respectivamente, para ensaios de formação de biofilme (Souza et al. 2010, 2013).

As amostras de SPEEK foram colocadas em placas de 24 poços contendo 2 mL de meio TSB com cada suspensão de células (0,6 OD), e incubadas durante 48h a 37°C. Posteriormente a suspensão dos poços foi aspirada (200 mL) e colocadas em placas de 96 poços para determinar a absorvância de crescimento planctônico com um DO a 630 nm medida feita utilizando um espectrofotômetro.

Outro grupo de amostras com SPEEK recobertas de biofilmes foram usadas para determinar o número de unidades formadoras de colônias viáveis (CFU) de *S. mutans* e *E. faecalis*. Para esta análise, os biofilmes cultivados durante 48h foram descolados da superfície de SPEEK por tratamento químico e mecânico, as amostras foram colocadas em placas de 24 poços contendo 1 mL de PBS e 1% de proteinase K (Sigma-Aldrich), e foram incubadas a 37°C durante 60 minutos (Beg et al. 2002), após o tratamento com proteinase K, raspagem mecânica constante durante 1 min através do vortex, a fim de aumentar a descolação de biofilme e interromper aglomeração microbiana. A suspensão inicial foi diluída em PBS e 50 mL foram colocados em

placas de ágar de BHI por 24h para avaliar o crescimento total colônias viáveis. Os experimentos foram realizados em triplicata e em ensaios independentes.

2.4 Análise da Superfície

foi avaliada a superfície dos polímeros através da análise microscópica antes da formação de biofilmes, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro, e em seguida analisadas por íons retroespalhamento (SE) e secundários (BSE), utilizando microscópio electrónico de varredura (JEOL JSM-6390LV, Japão) a 10 kV.

Por outra parte a rugosidade das amostras com diferentes tempos de sulfonação foi examinada por perfilometria óptica (DektakXT, Profilometer), o comprimento da análise foi de 2 mm, de corte 0,25 mm e uma velocidade de 30s, os valores de rugosidade foram obtidos considerando os parâmetros Ra: que é a média aritmética entre as alturas dos picos e vales do perfil de superfície real.

A hidrofobicidade da superfície das amostras foi avaliada por medidas de ângulo de contato formado entre gota de água e superfície usando um goniômetro com câmera digital (OCA 20, Física Data, Alemanha). Um volume de 5 mL de água tipo 1 foi colocada em diferentes áreas das superfícies das amostras para medidas hidrofobicidade à temperatura e umidade ambiente.

Após a formação do biofilme, as amostras cobertas com biofilme de *S. mutans* foram lavadas duas vezes em PBS e fixada em glutaraldeído a 2% durante 5 min. Em seguida, as superfícies foram lavadas três vezes em PBS e desidratadas através de uma série de soluções de etanol graduadas (50, 70, 80, 90, 100%), posteriormente foram metalizadas com ouro, e analisadas por microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM-6390LV, Japão) a 10 kV.

Análise Estatística

Os resultados da formação de biofilme foram analisados estatisticamente por meio de uma análise de variância (ANOVA), com nível de significância de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Caracterização

Poli(éter-éter-cetona) (PEEK) é um termoplástico de engenharia de alta performance com excelente estabilidade mecânica e térmica, que pode ser submetido a modificações químicas por ligação de grupos funcionais com os seus anéis aromáticos, e por reações no seu grupo carbonilo. A nitração de PEEK é uma reação de substituição electrófila em que o grupo nitro é introduzido preferencialmente na hidroquinona.

Considerando as curvas TGA, SPEEK era termicamente estável até 350°C e exibiu duas fases distintas de perda de peso como mostrado na Fig. 1, em contraste com o PEEK, que tem apenas uma perda de peso de 550°C (Fig 1A). A perda de massa de SPEEK a 100°C ocorreu devido à eliminação das moléculas de água absorvida pelo material. O primeiro estágio da degradação térmica de SPEEK variou de 300 até 400°C, a análise deu um DS é caracterizado pela eliminação de grupos de ácido sulfônico, a segunda fase de degradação térmica que varia de 500-1600°C é atribuída à decomposição da cadeia principal do polímero.

A análise térmica foi utilizada para estimar o grau de sulfonação do SPEEK através do pressuposto de que o primeiro estágio da degradação térmica é totalmente causada por eliminação dos grupos de ácido sulfônico. Os resultados da Figura 1B mostra que os valores do grau de sulfonação (DS) obtida por TGA é comparável com os valores calculados pelo teste de IEC e a estabilidade térmica do SPEEK é independente da massa molar (Zaidi et al. 2000).

A capacidade de troca iónica (IEC) do polímero SPEEK, que é uma medida do número de contadores de iões permutáveis em SPEEK, foi medida a temperatura ambiente e é apresentada na figura 1B. Como uma função do tempo de reação de sulfonação. Pode ser visto que a IEC aumenta continuamente com o tempo de reação até 2h atingindo incorporação máxima de SO₃H (91%) em SPEEK subsequentemente diminuiu gradualmente.

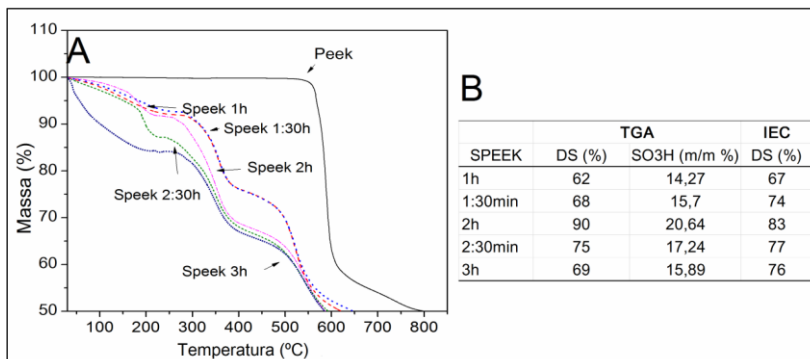


Figura 1. (A) As curvas termogravimétricas de PEEK e SPEEK, (B) Os valores de grau de sulfonação (DS) obtidos por TGA e IEC são compatíveis, obtendo máxima sulfonação 2h.

Diferenças significativas no espectro de FTIR do SPEEK é observado quando comparado com PEEK livre de sulfonação pode ser determinada pela presença de grupos de ácido sulfônico, como é revelado nas bandas 3440, 1252, 1080, 1024, e 709 cm^{-1} no espectro de FTIR (Fig 2).

As intensidades destas bandas aumentou com o aumento do nível de sulfonação em relação ao intensidades de bandas associadas com a estrutura (por exemplo, de C = O a 1653 cm^{-1}). A banda larga na 3450-3430 cm^{-1} pode ser atribuído como a vibração O-H. As outras bandas pode ser atribuídas a várias vibrações de enxofre-oxigênio assimétrica: O=S=O estiramento (1252); simétrica O=S=O (1080); S=O estiramento (1024); e S-O banda (709). A banda aromático C-C a 1490 cm^{-1} foi observada para dividir mediante sulfonação.

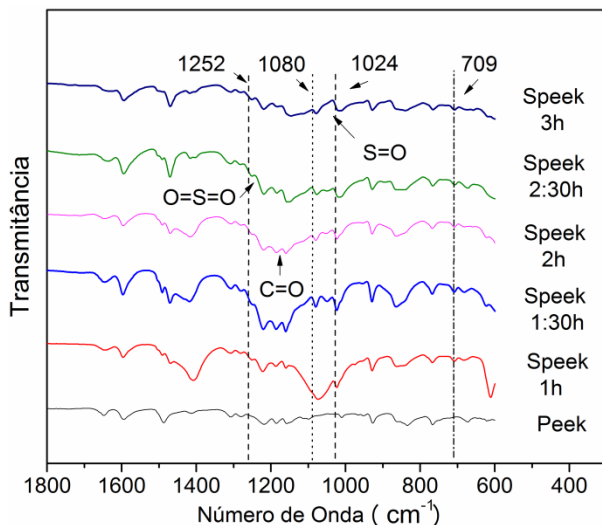


Figura 2. FTIR de PEEK e SPEEK em tempos diferentes, podemos observar a presença de grupos de ácido sulfónico revelado nas bandas no espectro 3440, 1252, 1080, 1024, e 709 cm^{-1} .

A presença espectros de ^1H em NMR de cada resultados do grupo SO_3H em um sinal distinto de prótons na posição. A intensidade deste sinal de H, produz estimativas da presença, assim como é equivalente ao conteúdo de grupo SO_3H .

Os diferente tempos de sulfonação revelaram uma diferencia significativa de unidades de repetição não-sulfonada e a H do anel hidroquinona, as unidades de repetição em SPEEK aparecem como um singuleto a 7,5 ppm característico. A intensidade desta singuleto diminui à medida que aumenta DS (1h, 1:30 minutos, 2h) até alcançar o valor máximo e, em seguida, descer em tempos de 2:30 min, 3h.

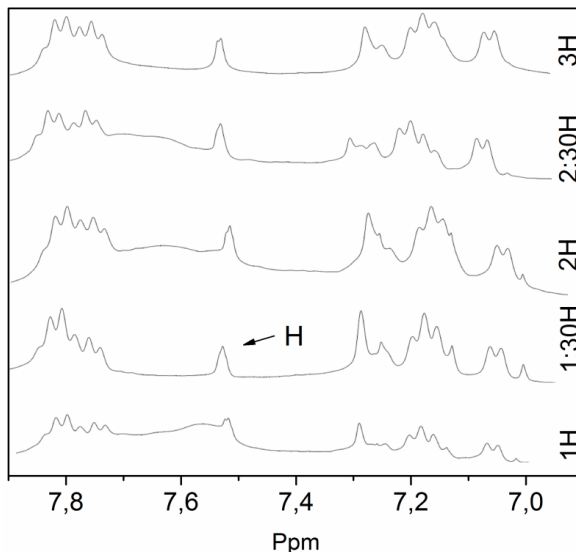


Figura 3. O espectro de RMN de SPEEK dissolvido em DMSO-d₆, A intensidade deste sinal de H, produz estimativas da presença, assim como é equivalente ao conteúdo de grupo SO₃H.

As micrografias mostraram a topografia do SPEEK antes e após a formação de biofilme por *S. mutans*, evidenciou colônias amplamente separadas como aglomerações sobre SPEEK (Fig 4A, 3B). Assim como a hidrofiliicidade das amostras foi avaliada através do método da gota séssil estática e os resultados foram apresentados no canto inferior esquerdo da Fig. 4C, Os ângulos de contato da água medidos (Speek 1h) 55°, (Speek 1: 30min) 62°, (Speek 2h) 53°, (Speek 2: 30min) 57° e (Speek 3h) 54°, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), como resultado dos diferentes tempos de sulfonação do PEEK.

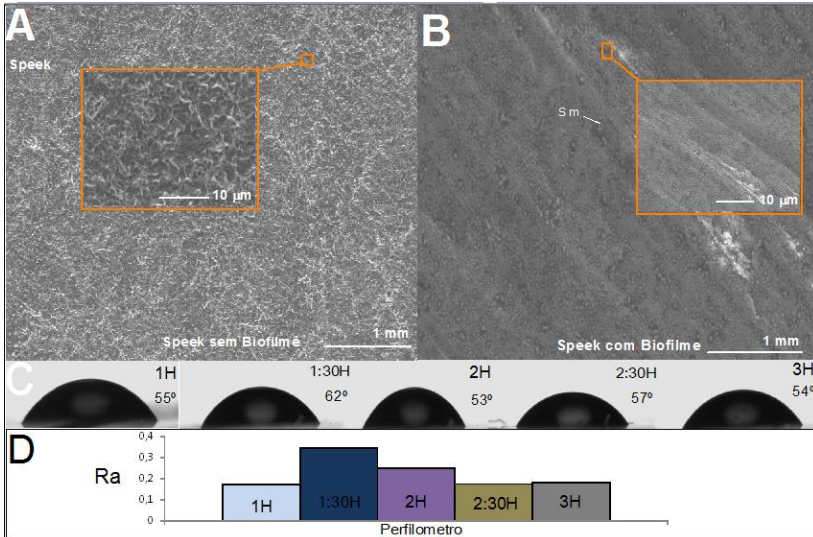


Figura 4 (A, B) mostrou imagens MEV de SPEEK antes e após a formação de biofilmes de *S. mutans* (SM), (C) ângulos de contato de água em superfícies de SPEEK, (D) Análise por perfilometria óptica (DektakXT, Profilometer).

A rugosidade média (Ra) das amostras apresentaram valores semelhantes de filmes SPEEK, o Ra de (1h) $0,17\mu\text{m}$, (1: 30min) $0,34\mu\text{m}$, (2h) $0,25\mu\text{m}$, (2:30 min) $0,17\mu\text{m}$ e (3h) $0,18\mu\text{m}$ apresentando-se resultados semelhantes em diferentes graus de sulfonação, no entanto, mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Fig 4D). Por outra parte, ressaltando que a hidrofiliidade e rugosidade da superfície dos polímeros aparentemente não foi um fator relevante na formação de biofilme.

Além disso, o crescimento planctônico com as amostras de SPEEK foi avaliado por absorbância por espectrofotometria após 48h não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o crescimento em diferentes tempos de sulfonação com *S. mutans* e *E. faecalis*. Pode-se observar ainda a diminuição do pH de 7 (pH neutro) para 4 (meio ácido) após 48h de crescimento (Figura 5A).

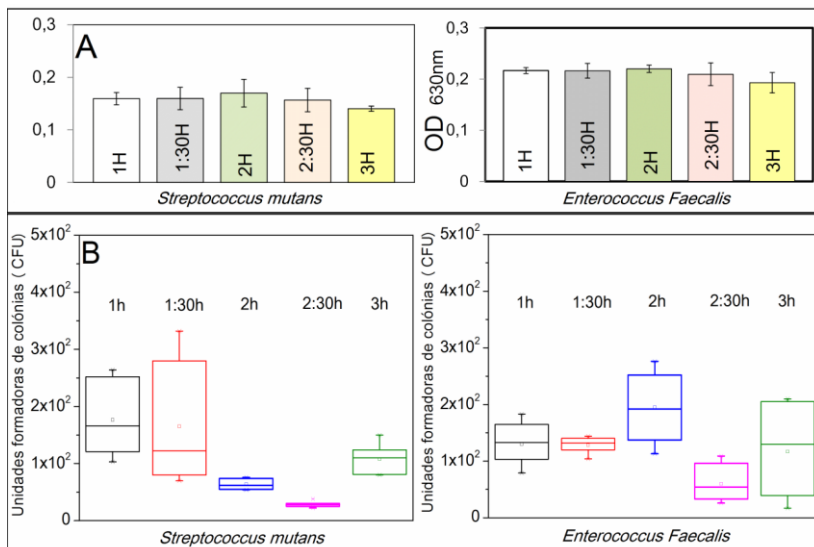


Figura 5A. Crescimento planctônico SPEEK 1h, 1:30min, 2h, 2:30min, 3h para 48h em TSB (37°C, 150rpm). (B) Unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. mutans* e *E. Faecalis* sobre a superfície de SPEEK.

A biomassa de biofilmes formados sobre as amostras de SPEEK foram determinadas após 48h de incubação por CFU indicou-se uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) da biomassa de *S. mutans* sobre superfície de SPEEK de 2h e 2:30min de sulfonação. No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) das CFU da biomassa formada por *E. faecalis*, como é representado na Fig. 5B.

4 Discussão

PEEK tem mostrado ser um material muito atraente, aumentando propriedades biológicas desejáveis com aplicação biomédica que permite um balanço entre as propriedades mecânicas e estabilidade termo-oxidativa através do processo de sulfonação (Appleby and Twidell 1996; Zaidi 2003). Além disso, a estrutura física e reatividade química do PEEK sulfonado (SPEEK) contribuem para a migração celular na superfície, através da formação de uma nanoestrutura porosa de rede tridimensional, com grupos biofuncionais, permitindo o ajuste das regiões hidrofílicas e hidrofóbicas.

Neste estudo, PEEK foi funcionalizado em diferentes tempos de sulfonação (1h, 1:30 min, 2h, 2:30 min, 3h). A presença de SO_3H na PEEK funcionalizado estrutura (SPEEK) foi determinada por TGA, IEC, RMN e FTIR, o grau de sulfonação (DS) de SPEEK encontrado em nosso estudo está de acordo com estudos anteriores, que usaram um sulfonação e caracterização semelhantes métodos (Conceição et al. 2008; Xing et al. 2004; Xu et al. 1992; Zaidi 2003).

Em 2013, foi realizado o processo de solfunação de SPEEK e posterior imersão e enxague em água (SPEEK-W) e acetone (SPEEK-WA), avaliando a morfologia da superfície e composição química, apresentando o SPEEK-W uma biocompatibilidade inferior, por outra parte foi determinado que as funções de pré-osteoblastos, crescimento ósseo e formação de apatite nas superfícies SPEEK são afectados por muitos factores, incluindo os efeitos positivos introduzidas pela estrutura porosa em 3D, assim como os efeitos negativos devido aos grupos SO_3H ao ambiente com pH baixo. Este estudo concluiu que a funcionalização pode aumentar o uso de PEEK em implantes ortopédicos (Zhao et al. 2013).

A fim de avaliar o impacto do aumento de volume da membrana no espectro de SAXS (Small Angle X-Ray Scattering-) Mendil-Jakani et al (2014), elaborou membranas de SPEEK com diferentes graus de sulfonação (115, 61, 52, 43 e 38%), em seguida foi aplicado tratamento térmico a diferentes temperaturas (20, 35, 60, 80, 100 e 120°C) e imersas em água durante 96 horas. O controle dessa nanoestrutura parece ser de extrema importância para otimizar as propriedades mecânicas, como química das membranas de SPEEK para células combustível (Mendil-Jakani et al. 2014).

Alem disso, estudo relata que a abordagem bioquímica destaca a adesão microbiana esta potencialmente mediada por interações físicas ligante-receptor, assim como o crescimento e sobrevivência da comunidade microbiana ou biofilme depende de adaptação a uma série de mudanças ambiental milieux. No âmbito da interacção célula-célula, avanços recentes sugerem que os flagelos, fimbrias e outros receptores de proteínas são essenciais para a fixação bacteriana às superfícies (Dalton and Marcht 1998).

Por outro lado, em nosso estudo, revelou uma menor densidade de biofilme produzido por *S. mutans* sobre a superfície de SPEEK com 2h e

2:30min de sulfonação quando comparada com a SPEEK 1h, 1:30min e 3h de sulfonação, o que indicou a atividade de formação de biofilme produzido por *S. mutans* apresentou diferença em tempos de sulfonação de SPEEK. Em Segundo lugar se evidenciu que não foi afetada a taxa de crescimento planctônico de *S. mutans* e *E. faecalis* circundante ao SPEEK. Apontando que a diminuição na formação de biofilme causada por o processo de adesão bacteriana pode ser considerada a partir de um processo bioquímico, físico-químico, que indica que as superfícies com uma maior rugosidade da superfície/energia livre de superfície facilitar a formação de biofilme (Teughels et al. 2006), embora adaptação a uma série de mudanças ambientais como superfícies dos materiais são fatores essenciais.

5. Conclusão

PEEK tem uma natureza básica, o que o torna adequado para ser submetido a modificações como a incorporação de ácido sulfúrico (98%) resultante em SPEEK através do processo de sulfonação. O crescimento planctônico de *S. mutans* e *E. Faecalis* nos diferentes tempos de sulfonação de SPEEK mostraram um crescimento sem diferença estatística, por outro lado, a formação de biofilme produzido por *S. mutans* nas superfícies de SPEEK evidenciaram diferenças nas unidades formadoras de colônias nos tempos de sulfonação, ressaltando uma maior inibição da formação de biofilme em tempo de 2h e 2:30min, por conseguinte, o SPEEK pode ser considerado como um material clinicamente atraente devido às propriedades mecânicas do PEEK, conformação em 3D e função antimicrobiana.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro concedido pela CAPES e CNPq (Brasil), ao laboratório Vitrocer, UFSC.

Referências

Appleby, a. J. and J. Twidell. 1996. "Recent Developments and Applications of the Polymer Fuel Cell [and Discussion]." *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 354(1712):1681–93. Retrieved May 24, 2014

(<http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.1996.0073>).

- Barton, a J., R. D. Sagers, and W. G. Pitt. 1996. "Bacterial Adhesion to Orthopedic Implant Polymers." *Journal of biomedical materials research* 30(3):403–10. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8698704>).
- Beg, Anjum M., Micheala N. Jones, Tracey Miller-Torbert, and Robert G. Holt. 2002. "Binding of Streptococcus Mutans to Extracellular Matrix Molecules and Fibrinogen." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298(1):75–79. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X02023902>).
- Bobyn, J. D., G. J. Stackpool, S. A. Hacking, M. Tanzer, and J. J. Krygier. 1999. "Characteristics of Bone Ingrowth and Interface Mechanics of a New Porous." *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 81(B):907–14.
- Broggini, N. et al. 2003. "At the Implant-Abutment Interface." *Journal of Dental Research* 82(3):232–38.
- Conceição, Thiago F. et al. 2008. "Preparation and Characterization of Poly (Ether Ether Ketone) Derivatives." *Journal of the Brazilian Chemical Society* 19(1):111–16.
- Costerton, J. W. 1999. "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections." *Science* 284(5418):1318–22. Retrieved July 10, 2014 (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5418.1318>).
- Dalton, Helen M. and Paul E. Marcht. 1998. "Molecular Genetics of Bacterial Attachment and Biofouling." *Current Opinion in Biotechnology* jun 9(3):252–55.
- Huang, R. Y. M., Pinghai Shao, C. M. Burns, and X. Feng. 2001. "Sulfonation of Poly(ether Ether ketone)(PEEK): Kinetic Study and Characterization." *Journal of Applied Polymer Science*

- 82(11):2651–60. Retrieved November 04, 2014 (<http://doi.wiley.com/10.1002/app.2118>).
- Karageorgiou, Vassilis and David Kaplan. 2005. “Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis.” *Biomaterials* 26(27):5474–91. Retrieved July 09, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15860204>).
- Kurtz, Steven M. and John N. Devine. 2007. “PEEK Biomaterials in Trauma, Orthopedic, and Spinal Implants.” *Biomaterials* 28(32):4845–69. Retrieved October 19, 2013 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2040108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Listgarten, M. a and C. H. Lai. 1999. “Comparative Microbiological Characteristics of Failing Implants and Periodontally Diseased Teeth.” *Journal of periodontology* 70(4):431–37. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10328655>).
- Liu, X., P. Chu, and C. Ding. 2004. “Surface Modification of Titanium, Titanium Alloys, and Related Materials for Biomedical Applications.” *Materials Science and Engineering: R: Reports* 47(3-4):49–121. Retrieved July 11, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927796X0400124X>)
- Marsh P, Martin M. 2009. *Oral Microbiology*. 5th ed. edited by Churchill Livingstone Elsevier. Edinburgh.
- Mendil-Jakani, H., I. Zamanillo Lopez, P. M. Legrand, V. H. Mareau, and L. Gonon. 2014. “A New Interpretation of SAXS Peaks in Sulfonated Poly(ether Ether Ketone) (sPEEK) Membranes for Fuel Cells.” *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 16(23):11228–35. Retrieved November 17, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24777279>).
- Meningaud, J. P., F. Spahn, and J. M. Donsimoni. 2012. “After Titanium, Peek ?” *Revue de stomatologie et de chirurgie maxillo-*

faciale 113(5):407–10. Retrieved October 19, 2013
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940377>).

Nevins, Myron et al. 2010. “Histologic Evidence of a Connective Tissue Attachment to Laser Microgrooved Abutments: A Canine Study.” *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 30(3):245–55. Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20386781>).

Sagomonyants, Karen B., Marcus L. Jarman-Smith, John N. Devine, Michael S. Aronow, and Gloria a Gronowicz. 2008. “The in Vitro Response of Human Osteoblasts to Polyetheretherketone (PEEK) Substrates Compared to Commercially Pure Titanium.” *Biomaterials* 29(11):1563–72. Retrieved November 04, 2014
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18199478>).

Sarot, João Rodrigo, Cintia Mussi Milani Contar, Ariadne Cristiane Cabral Da Cruz, and Ricardo de Souza Magini. 2010. “Evaluation of the Stress Distribution in CFR-PEEK Dental Implants by the Three-Dimensional Finite Element Method.” *Journal of materials science. Materials in medicine* 21(7):2079–85. Retrieved September 17, 2014
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20464460>).

Souza, Júlio C. M. et al. 2010. “Biofilms Inducing Ultra-Low Friction on Titanium.” *Journal of dental research* 89(12):1470–75. Retrieved July 20, 2014
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20924068>).

Souza, Júlio C. M. et al. 2013. “Corrosion Behaviour of Titanium in the Presence of *Streptococcus Mutans*.” *Journal of dentistry* 41(6):528–34. Retrieved July 20, 2014
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23578470>).

Teughels, Wim, Nele Van Assche, Isabelle Sliepen, and Marc Quirynen. 2006. “Effect of Material Characteristics And/or Surface Topography on Biofilm Development.” *Clinical oral implants research* 17 Suppl 2:68–81. Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968383>).

- Urban, Robert m, Joshua j Jacobs, michael j Tomlinson, John Gavrilovic, and Michel Peoc'h. 2000. "Dissemination of Wear Particles to the Liver , Spleen , and Abdominal Lymph Nodes of Patients with Hip or Knee Replacement *." *The Journal of Bone and Joint Surgery, Incorporated* 82-A(4, A):april.
- Xing, Peixiang et al. 2004. "Synthesis and Characterization of Sulfonated Poly(ether Ether Ketone) for Proton Exchange Membranes." *Journal of Membrane Science* 229(1-2):95–106. Retrieved July 14, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738803005052>).
- Xu, Jiarui, Zhiyi Zhang, Xiaodong Xiong, and Hanmin Zeng. 1992. "A New Solvent for Poly(ether Ether Ketone) Jiarui." *Polymer* 33(20):4432–34.
- Zaidi, S. M. J., S. .. Mikhailenko, G. .. Robertson, M. .. Guiver, and S. Kaliaguine. 2000. "Proton Conducting Composite Membranes from Polyether Ether Ketone and Heteropolyacids for Fuel Cell Applications." *Journal of Membrane Science* 173(1):17–34. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738800003458>).
- Zaidi, S. M. Javaid. 2003. "Polymer Sulfonation – A Versatile Route to Prepare Proton -Conducting Membrane Material for Advanced Technologies: صلاحة - ة." *The Arabian Journal for Science and Engineering* 28(2B):183–94.
- Zhao, Ying et al. 2013. "Cytocompatibility, Osseointegration, and Bioactivity of Three-Dimensional Porous and Nanostructured Network on Polyetheretherketone." *Biomaterials* 34(37):9264–77. Retrieved November 10, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24041423>).
- Zhao, Yuan-yuan et al. 2014. "Ab Initio Studies on the Proton Dissociation and Infrared Spectra of Sulfonated Poly(ether Ether Ketone) (SPEEK) Membranes." *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 16(3):1041–49. Retrieved November 04, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24285742>).

2.4. ARTIGO 2 EM INGLÊS

Propriedades antibiofilme da funcionalização de Poli-Éter-Éter-cetona (PEEK)

Montero JFD¹, Tajiri HA², Barra G², Fredel MC³, Benfatti CA¹, Souza JCM¹, Magini R S¹, Pimenta A^{3,4}

¹Center for Research on Dental Implants (CEPID), School of Dentistry (ODT), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, 88040-900, Brazil.

²Department of Mechanical Engineering (EMC), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, 88040-900, Brazil.

³Integrated Laboratories Technologies (Intelab), Dept. Chemical Engineering (EQA), Federal University of Santa Catarina (UFSC), CTC/EQA, Campus University, Trindade- Florianópolis/SC, 88040-970, Brazil.

⁴Department of Biologie, Université de Cergy Pontoise, 2, Av. Adolphe Chauvin 95302 Cergy Pontoise – France.

Corresponding author:

Prof. Ricardo de Souza Magini, DMD, MSc.
Email: magini@ccs.ufsc.br, jfdum@hotmail.com
Center for Research on Dental Implants (CEPID)
School of Dentistry. (ODT)
Federal University of Santa Catarina. (UFSC)
Florianópolis/SC.
88040-900, Brazil.
Phone: +55 48 96551776

Abstract

PEEK currently presented as an alternative to orthopaedic implant and due to its biocompatibility and low modulus compared to titanium. PEEK has shown to be very attractive for incorporating compounds thanks to the sulphonation process which promotes a balance between the mechanical properties and thermo-oxidative stability, Although the amount of sulfonic groups in SPEEK chain can be a critical factor in response to the environment, it is important to determine their

antimicrobial effect, biocompatibility and development of new materials with novel properties. The objective of this work was to functionalize poly-ether-ether-ketone (PEEK) and evaluate the antimicrobial effect on different times of sulfonated. Samples were functionalized by using sulphuric acid (98%) and dissolved into dimethyl sulfoxide (DMSO®, Synth, Brazil). A dip coating technique was used to synthesize a thin film of sulfonated poly (ether ether ketone) (SPEEK) on a substrate the acrylic base. The sulfonation degree (DS) of SPEEK analyzed by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), nuclear magnetic resonance (HNMR), thermogravimetric analysis (TGA), Ion-exchange capacity (IEC). The Surface Analysis and characterization by scanning electron microscopy (SEM-EDS), profilometry and contact angle. Subsequently, the growth and biofilm formation produced by *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* was measured by spectrophotometry, quantification of colony forming units (CFU ml⁻¹) and scanning electron microscopy (SEM) on SPEEK after of 48 h. The results were statistically analyzed *via* one-way analysis of variance (ANOVA), with a significance level of $p < 0.05$. Our results showed that in general the degree of sulfonation influenced the formation of biofilm on the surface of polymers with a higher tendency of inhibition sulfonation time of 2 hours and 2: 30min, presenting itself as an alternative to antimicrobial and affordable properties in the incorporation of active substances.

Key Words: PEEK, SPEEK, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, biofilm.

1. Introduction

Titanium and its alloys are widely used in biomedical devices and components, particularly as a substitute for hard tissue, due to their excellent properties such as corrosion resistance, high mechanical fatigue resistance as well as biocompatibility. (Liu et al., 2004). However, metallic biomaterials can not satisfy all clinical requirements, concerns exist regarding the importance of particles generated by wear and corrosion especially in the context of severe postoperative complications such as osteolysis, allergenicity (Robert m. urban, Joshua j. jacobs, michael j. tomlinson, john gavrivic, 2000; Sagomyants et al., 2008).

To overcome these limitations and reduce post-deployment negative biological reactions, one of the alternative materials used as a choice of

titanium for orthopedics and implant dentistry is the poly-ether-ether-ketone (PEEK) (Kurtz & Devine, 2007), with characteristics such as stability at elevated temperatures ($\sim 300^{\circ}\text{C}$), resistance to chemical degradation, high mechanical strength and high biocompatibility (Kurtz & Devine, 2007; Meningaud et al., 2012), chemical and biological inertness. Moreover, it can be repeatedly sterilized and machining by heat and molded to fit the contour and shape of the bones (Barton et al., 1996). Thus, PEEK represents an interesting material in dentistry considering it has already been used in prosthetic as implant systems (Broggini et al., 2003; Meningaud et al., 2012; Sarot et al., 2010).

Even with these excellent characteristics, PEEK tends to limit bone fixation and consequently there have been efforts to enhance its bone-interaction capacity by introducing porosity, since a porous surface can promote growth of hard and soft tissue into the material, thus creating more biological anchorage to improve the stability of the implant (Bobyne et al., 1999). Many techniques have been used for the manufacturing of porous structures over metal surfaces, including machining, shot blasting, anodic oxidation, alkaline treatment and acid etching, the porosity and the pore size of biomaterial scaffolds plays a critical role in the formation and regeneration tissue (Karageorgiou & Kaplan, 2005). Serving as a physiological barrier to apical migration of tissues with significant improvements (Nevins et al., 2010), however, relevant work in PEEK is relatively scarce, due to its properties such as its inherent chemical resistance.

Treatment of sulfonation produces a reduction in the hydroxyl group with the carbonyl in a proton exchange membrane that exhibits excellent proton conductivity, and it has been mainly used in fuel cells (Conceição et al., 2008; Huang et al., 2001; Xu et al., 1992; Yuan-yuan Zhao et al., 2014). Noting another advantage from the action of corrosion during PEEK sulfonation in concentrated sulphuric acid, a porous network is produced a 3D porous and nanostructured network with bio-functional groups is produced on PEEK by sulfonation, can enhance biological functionalities especially in tissue engineering (Ying Zhao et al., 2013). However, as a biomaterial in contact with tissue, is subject to the accumulation of biofilms and formation of these sessile communities and their inherent resistance to antimicrobial agents are at the root of many persistent and chronic bacterial infections (Barton et al., 1996; Costerton, 1999).

Biofilm consists of a well-organized co-aggregate of microorganisms, embedded in a matrix composed of extracellular polysaccharides, glycoproteins, nucleic acids and water (Listgarten & Lai, 1999; Marsh P, 2009). Shortly after oral hygiene, a conditioning film of 0.1-15 μm thickness, composed of glycoproteins, water and ions, is formed on hard and soft tissues in the oral cavity, over which the biofilm may form (Marsh P, 2009). Thus, the aim of this study was the synthesis and characterization chemical of PEEK after sulfonation at different times (1h, 1: 30min, 2h, 2: 30min, 3h) and evaluate the antimicrobial effect and formation of oral biofilm on surface of SPEEK.

2. Materials and Methods

2.1. Functionalization of PEEK

PEEK (Invibio®, Batch, D0602, grade, NII) was functionalized by sulfonation processing using 98% sulphuric acid (Synth®, Brazil) to be soluble in organic compounds. The PEEK sulfonation was done according to the procedures previously described in the literature (Conceição et al., 2008; Xu et al., 1992; S M Javaid Zaidi, 2003). In a volumetric balloon flask, 2.0 g PEEK is solubilized in 50 ml of 98% sulfuric acid. The mixture was heated to 50°C and kept under mechanical stirring and nitrogen atmosphere for 1h, 1:30min, 2h, 2:30min and 3h hour. Then the reaction mixture was gradually added to 500 ml of ice-cold distilled water resulting, and the precipitation resulted in the formation of sulfonated poly-ether-ether-ketone (SPEEK). The product was then filtered, washed with water until complete removal of sulfuric acid and dried at 80°C in an oven for 48 h. Due to the dimensions of PEEK 381 G (grain shape) solubilization in sulfuric acid was prepared by a swelling process of 18h under stirring at room temperature. After functionalization, the polymer was dissolved into dimethyl sulfoxide (DMSO®, Synth, Brazil).

Square samples of acrylic-base with dimensions of 1cm x 2cm x 1mm were metallographically ground onto SiC abrasive papers down to 1200 mesh. After grinding, the samples were cleaned in isopropyl alcohol for 10 min and for 5 min in distilled water in an ultrasonic bath. Acrylic-base substrates were immersed into the solution, using the dip coating technique to synthesise thin film of SPEEK on the substrate. They were kept in a desiccator for 24 h and then sterilized prior to use in a light ultraviolet.

2.2. Chemical analyses

Thermal stability analysis (TGA) of the polymers was carried out under $50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ nitrogen atmosphere using a TGA-50 (Shimadzu,® Japan) equipment. The nitration degree (ND) of -PEEK was calculated by the TG curves. Non-isothermal experiments were performed from 25 up to 900 °C at a heating rate of 10 °C min^{-1} for each sample of 1h, 1:30 min, 2h, 2:30 min, 3h.

The ion-exchange capacity (IEC) of sulfonated PEEK polymers was measured by titration method. SPEEK was soaked in saturated NaCl aqueous solution with excessive volume for 12 h. The solution was then titrated toward an end point of pH 7 with a standard 0.01 mol. L-1 NaOH using phenolphthalein as an indicator aqueous solution based on the following equation

$$\text{IEC (mequiv g}^{-1}\text{)} = \frac{VM}{m_{\text{dry}}}$$

Where V, M, and m_{dry} are the volume of the titrant, the molar concentration of the titrant, and the mass of the sample, respectively (Oh et al., 2014).

The nitrated PEEK was dissolved in DMSO- d_6 , ca. 3% solution and tetramethylsiloxane (TMS) was used as the internal standard. For Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis using a Varian AS-400 spectrometer. PEEK-OH and PEEK were analyzed by solid state NMR. The fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis was performed at 20 scan with 4 cm resolution using a FTL 2000 spectrometer (Bomem, Canada), All samples were dried and purified before analysis.

2.3 Biofilm formation

Bacterial strains and growth conditions

Streptococcus mutans ATCC 25175 and *Enterococcus faecalis* ATT29212 were grown under microaerophilic conditions for 48 h at 37°C in agar plates with 32 g/L of Brain Heart Infusion (BHI) agar (Bacto,® Difco) supplemented with 3g/L of yeast extract (Bacto,® Difco) and 200 g/L of sucrose (Bacto, Difco, Usa). Before biofilm formation, *S. mutans* cells and *E. faecalis* were inoculated in Tryptic

Soy Broth (TSB) (Bacto,[®] Difco) supplemented with 3 g/L of yeast extract and 200 g/L of sucrose for 18 h at 37°C and 150 rpm. After incubation, cells were harvested by centrifugation for 10 min at 48C and 5,000 rpm, and washed twice with a phosphate buffer solution (PBS).

Biofilm formation and analysis

Streptococcus mutans and *Enterococcus faecalis* were re-suspended separately in TSB medium supplemented with mucin (2.5 g/L), peptone (5 g/L), urea (1 g/L), yeast extract (2 g/L), and sucrose (200 g/L) to obtain an optical density (OD) of about 0.6 at A 630, corresponding to approximately 1×10^8 CFU/mL. The OD at 630 nm was measured using a spectro-photometer (BioTek[®], USA). A concentration by *S. mutans* and *E. faecalis* respectively for biofilm formation assays (Souza et al., 2010, 2013).

SPEEK samples were placed into 24 well plates containing 2 ml of TSB medium with each cell suspension (OD 0.6), and incubated for 48 h at 37°C. Posteriorly well plates the suspension was aspirated (200 ml) and placed in 96-well plates to determine the absorbance of grow planktonic were the OD at 630 nm was measured using a spectrophotometer.

Another group of SPEEK samples with biofilms were used to determine the number of viable colony-forming units (CFU) of *S. mutans* and *E. faecalis*. For this analysis, the biofilms grown for 48 h were detached from the SPEEK surfaces by proteinase K treatment. The samples were placed on 24-well plates containing 1 ml of PBS and 1% proteinase (Sigma-Aldrich[®]), and were incubated at 37°C for 60 min (Beg, Jones, Miller-Torbert, & Holt, 2002).

After proteinase K treatment, physical scraping was used in order to increase biofilm detachment. After that, the cell suspensions were removed and vortex for 1 min to disrupt microbial agglomeration. The initial suspension was diluted in PBS and 50 ml were placed on BHI agar plates to count the total viable CFUs. The experiments were run in triplicate and carried out in three independent assays.

2.4 Surface Analysis

For microscopic analyses before biofilm formation, the samples were sputter-coated with a thin gold layer, and then analyzed by secondary

(SE) and backscattered (BSE) electrons using scanning electron microscope (JEOL JSM-6390LV, Japan) at 10 kV.

The roughness of the samples with different times of sulphonation was examined by optical profilometry (DektakXT, Profilometer). The length of analysis was 2 mm, cut-off 0.25 mm and a speed of 30 seconds. The roughness values were obtained considering the parameters: Ra which is the arithmetic average between the heights of the peaks and valleys of the actual surface profile.

The surface hydrophilicity of the specimens was assessed by water contact angle measurements performed in goniometer digital (OCA 20, data physics). The volume 5 μ L type 1 water was placed on different areas of the sample surfaces for measurements with ambient temperature and humidity.

After biofilm formation, surfaces covered with biofilms were washed two times in PBS and fixed in glutaraldehyde 2% for 5 min. Then surfaces were washed three times in PBS, and dehydrated through a series of graded ethanol solutions (50, 70, 80, 90, 100%). Samples covered with *S. mutans* biofilms were sputter-coated with gold, and analyzed by scanning electron microscope (JEOL JSM-6390LV, Japan) at 10 kV.

Statistical Analysis

The results were statistically analyzed *via* one-way analysis of variance (ANOVA), with a significance level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Chemical analyses

Polyether ether ketone (PEEK) is a high-performance engineering thermoplastic with excellent mechanical and thermal stability, which can undergo chemical modifications by attachment of functional groups to its aromatic rings, and by reactions in its carbonyl group. The nitration of PEEK is an electrophilic substitution reaction where the nitro group is introduced preferentially in the hydroquinone.

Considering the TGA curves, SPEEK was thermally stable up to 350° C and exhibited two distinct weight loss stages as shown in Fig. 1, in contrast to PEEK, which has only one weight loss at 550° C (fig 1A).

The mass loss of SPEEK at 100° C occurred due to the elimination of water molecules absorbed by the material. The first stage of thermal degradation of SPEEK ranged from 300 up to 400° C, the elemental analysis gave an DS is characterized by the elimination of sulfonic acid groups. The second stage of thermal degradation ranging from 500-1600° C is attributed to the decomposition of the polymer main chain.

TGA analysis has been used to estimate the degree of sulphonation of the SPEEK through the assumption that the first stage of thermal degradation is entirely caused by elimination of sulfonic acid groups. The results of Figure 1B show that the values of the degree of sulfonation (DS) obtained by TGA is comparable to values calculated by testing IEC and the thermal stability of the SPEEK is independent of the molar mass (S.M.J. Zaidi, Mikhailenko, Robertson, Guiver, & Kaliaguine, 2000).

The ion-exchange capacity (IEC) of SPEEK polymers, which is a measure of the number of counter ions exchangeable in SPEEK, was measured at room temperature and is presented in Fig 1B. As a function of sulfonation reaction time. It can be seen that IEC increases continuously with reaction time until 2 hours reaching maximum incorporation of SO₃H (91%) in SPEEK thereafter gradually declined.

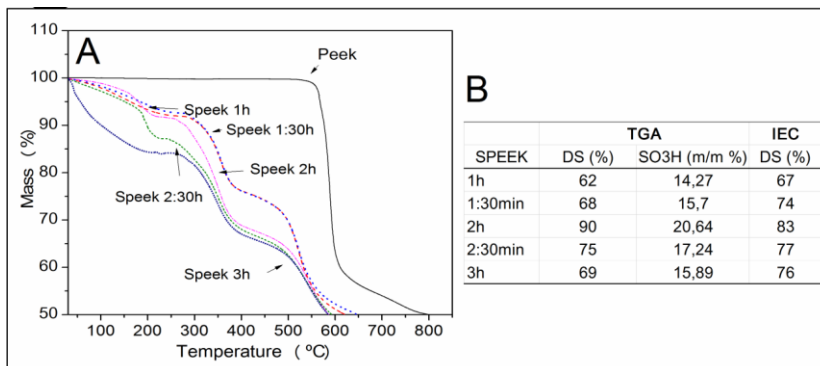


Figure 1.(A) The thermogravimetric curves, PEEK and SPEEK, (B) Values of degree of sulfonation (DS) obtained by TGA and IEC.

Significant differences in the IR spectrum of SPEEK are observed when compared to PEEK free of Sulfonation can be determined by the presence of sulfonic acid groups as revealed at bands 3440, 1252, 1080, 1024, and 709 cm^{-1} in the FTIR spectra (Fig 2).

The intensities of these bands increased with increased level of sulfonation relative to intensities of bands associated with the backbone (e.g. C=O stretch at 1653 cm^{-1}). The broad band at 3450–3430 cm^{-1} can be assigned as the O–H vibration. The other bands can be assigned to several sulfur-oxygen vibrations: asymmetric O=S=O stretch (1252); symmetric O=S=O stretch (1080); S=O stretch (10, 24); and S–O stretch (709). The aromatic C–C band at 1490 cm^{-1} was observed to split upon sulfonation.

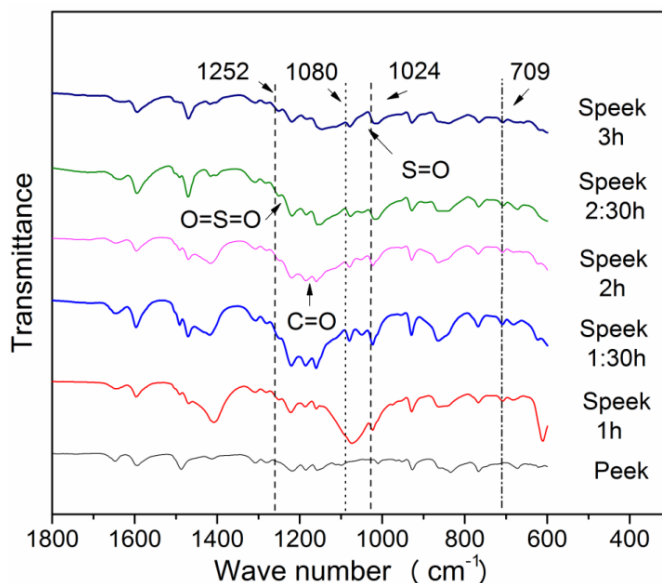


Figure 2. FTIR spectra of PEEK and SPEEK in times different.

The ^1H NMR spectra presence of each SO_3H group results in a distinct signal for protons at the E position. The intensity of this HE signal, yields estimates of the HE content which is equivalent to the SO_3H group content.

SPEEK at low DS revealed a significant proportion of repeat units are non-sulfonated and the Hc and HD of the unsubstituted hydroquinone ring of PEEK repeat units in the SPEEK polymer appear as a

characteristic singlet at 7.5 ppm. The intensity of this singlet decreases as the DS increases (1h, 1:30min, 2h) until reaching maximum value and then descend in times of 2: 30min, 3h Showed this characteristic of the hydroquinone Appear as a singlet at 7.5 and 7:25 ppm (Fig 3).

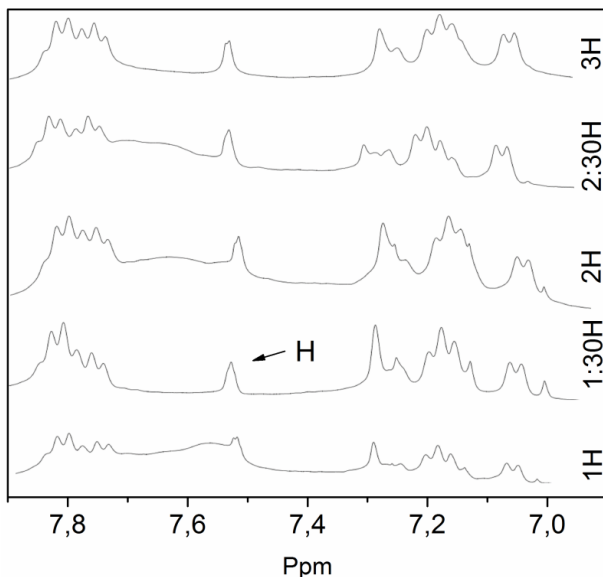


Figure 3. The NMR spectra of SPEEK dissolved in DMSO-d6

The topography of the SPEEK before and after biofilm formation by *S. mutans*, colonies grew widely separated as agglomerates on SPEEK showed in The Fig. 4A, 3B. As well as the hydrophilicity of the samples is evaluated by the static sessile drop method and the images of the water droplets on the samples are presented in the bottom left of the Fig. 4C, The measured water contact angles (Speek 1h) are 55°, (Speek 1:30min) are 62°, (Speek 2h) are 53°, (Speek 2:30min) are 57° and (Speek 3h) are 54° presenting statistically significant differences ($p < 0.05$).

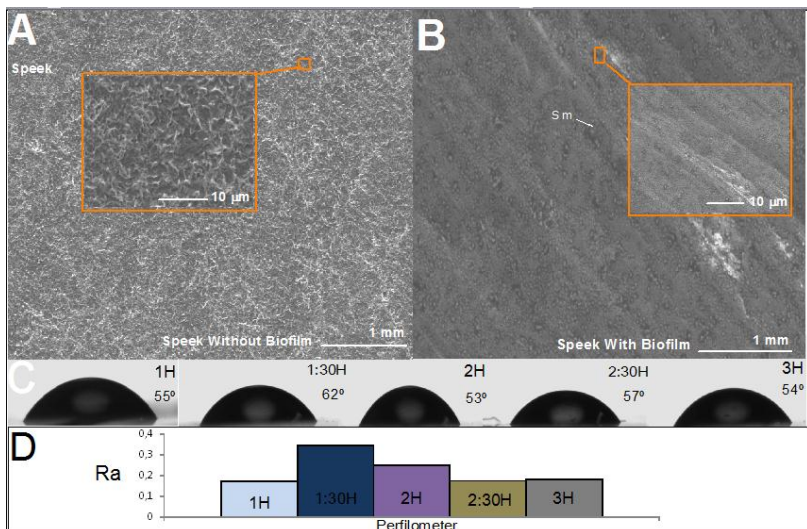


Figure 4 (A, B) Showed SEM images SPEEK before and after the formation of biofilms of *S. mutans* (S.m), (4C) water contact angles on surfaces of SPEEK, (D) analysis by optical profilometry (DektakXT, Profilometer).

As well as the evaluation of the mean roughness (Ra) the samples showed similar values of films speak, The Measured Ra (1h) are $0,17\mu\text{m}$ (1: 30min) are $0,34\mu\text{m}$ (2h) are $0,25\mu\text{m}$ (2 : 30min) and are $0,17\mu\text{m}$ (3h) are $0.18\mu\text{m}$ presenting similar results in different degrees of sulfonation, however, showed statistically significant differences ($p < 0.05$) (Fig 4D).

Furthermore the planktonic grew with SPEEK samples absorbance, measurements by spectrophotometry after 48h showed no statistically significant differences ($p < 0.05$) between the growth in different times of sulphonation with *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. The pH of the growth culture medium shifted from 7 down to approximately 4 during the growth of the biofilm (Fig 5A).

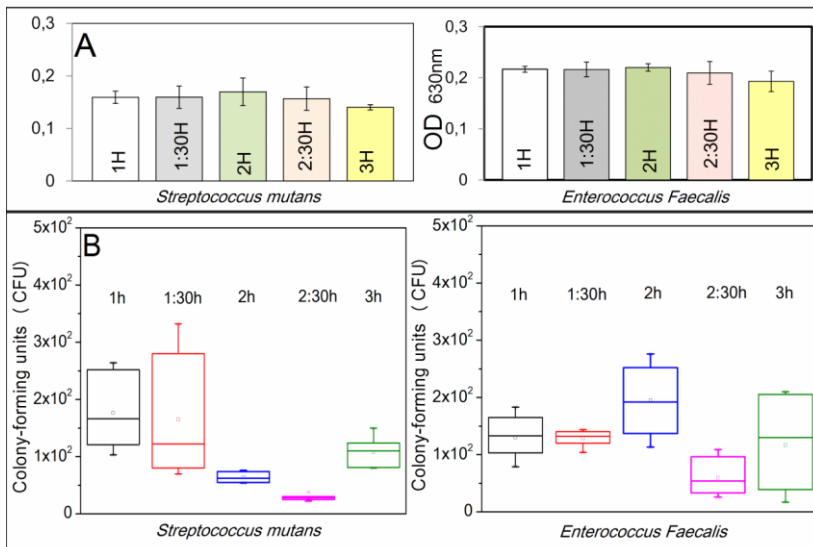


Figure 5A planktonic growth in SPEEK 1h, 1:30min, 2h, 2:30min, 3h for 48 h in TSB (37°C, 150 rpm). (B) Colony forming units (CFU) by *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*.

The biomass of biofilms formed on SPEEK samples was determined after 48h by CFU indicated a microbial cell density, A significant increase ($p < 0.05$) of biomass occurs after 48 h of incubation with *S. mutans* by SPEEK with 2h and 2:30min. However, no statistically significant differences ($p < 0.05$) were found between the biomass present by *E. faecalis* after 48h of incubation. Also, as shown in Fig. 5B.

4 Discussion

Currently in the industry application Speek plays a role in the biochemical oxygen demand and is evaluated through the time of consumption, Ayyaru and Dharmalingam (2014) used SPEEK membranes and Nafion membranes in single chamber microbial fuel cell (SCMFC) in order to detect the variety of biochemical oxygen demand and response time. Also, the effect of a double-electrode membrane (MEA), demonstrated that the single chamber microbial fuel cell with electrode SPEEK and the double membrane (MEA) has the potential to be used as a biosensor to measure the biochemical oxygen demand (Ayyaru & Dharmalingam, 2014). In order to increase desirable biological properties, by sulfonation of PEEK incorporating sulfuric

acid allowing adjustment of the hydrophilic and hydrophobic regions, reaching a balance between the mechanical properties and ion exchange capacity by forming a three-dimensional, porous, nanostructured network, with biofunctional groups (Appleby & Twidell, 1996; S M Javaid Zaidi, 2003).

In fact, PEEK has shown to be very attractive to incorporate compounds thanks to sulfonation process which promotes a balance between the mechanical properties and thermo-oxidative stability (Appleby & Twidell, 1996; S M Javaid Zaidi, 2003). Additionally, physical structure and chemical reactivity of the sulfonated PEEK (SPEEK) contribute to cell migration on the surface. Study in 2013, a 3D porous and nanostructured network with bio-functional groups is produced on PEEK by sulfonation and subsequent water immersion. Two kinds of sulfonation-treated PEEK (SPEEK) samples, SPEEK-W (water immersion and rinsing after sulfonation) and SPEEK-WA (SPEEK-W with further acetone rinsing) are prepared, Both showed a similar surface morphology and chemical composition, although SPEEK-W revealed a lower biocompatibility. The results reveal that the pre-osteoblast functions, bone growth, and apatite formation on the SPEEK surfaces are affected by many factors, including positive effects introduced by the 3D porous structure and SO_3H groups as well as negative ones due to the low pH environment. This study found that the surface functionalization via sulfonation can increase the use of PEEK in orthopedic implants. (Ying Zhao et al., 2013).

In this study, PEEK was functionalized in different times of sulfonation (1h, 1:30 min, 2h, 2:30 min, 3h.). The presence of SO_3H into the functionalized PEEK (SPEEK) structure was determined by TGA, RMN and FTIR analyses, The degree of sulfonation (DS) of SPEEK found in our study is in agreement with previous studies that used a similar sulfonation and characterization methods (Xing et al., 2004).

Biochemical approach highlights the specific interaction between complementary surface components (the specific ligand receptor interactions, mediated by nonspecific physical or specific ligand-receptor interactions. Growth and survival of the microbial community or biofilm then depends on adaptation to a series of changing environmental milieux necessary for bacterial attachment to surfaces and subsequent biofilm formation (Dalton & Marcht, 1998).

Subsequently in order to seek better mechanical stability for the polymer electrolyte membrane SPEEK, in 2014 nanoflakes added boron nitride (BNF) as nanoparticulate polymer electrolyte, which has been functionalized with 1-pyrenesulfonic acid (Oh et al., 2014). In order to assess the impact of the swelling of the membrane in the spectrum SAXS (Small-Angle X-Ray Scattering) Mendil-Jakani et al (2014) obtained SPEEK membranes with different degrees of sulfonation (115, 61, 52, 43 and 38%) these then received heat treatment being immersed in water for 96 hours at different temperatures (20, 35, 60, 80, 100 and 120 ° C), for ion exchange. Control of this nanostructuring seems to be of utmost importance for optimizing the properties of SPEEK membranes for fuel cells (Mendil-Jakani, Zamanillo Lopez, Legrand, Mareau, & Gonon, 2014).

On other hand in our study, a lower *S. mutans* biofilm density was noticed on SPEEK with 2h and 2:30min of sulfonation when compared to that SPEEK 1h, 1:30min and 3h of sulfonation, that indicated a potential antibiofilm activity of SPEEK front *S. mutans* biofilm. The different times of sulfonation of SPEEK did not affect the planktonic biofilm growth rate surrounding, indicating that the decrease in biofilm formation caused by The adhesion process can be regarded either from a biochemical or from a physicochemical point of view, indicating that surfaces with a higher surface roughness/surface free energy facilitate biofilm formation (Teughels et al., 2006a).

5. Conclusion

PEEK has a basic nature, which makes it suitable to undergo further modifications as the incorporation of sulfuric acid (98%) resulting SPEEK. The SPEEK showed a planktonic growth without statistical difference, the other hand, modified SPEEK performed different times showed antimicrobial activity in formation of biofilm, accompanied by a greater inhibition of biofilm formation in time of 2h and 2:30min against both *S. mutans*. Within the limitations of this study it appears that this experimental antibacterial SPEEK could be a clinically attractive material due to its high mechanical strength and antimicrobial function.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support provided by CAPES and CNPq (Brazil).

References

- Appleby, a. J., & Twidell, J. (1996). Recent Developments and Applications of the Polymer Fuel Cell [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 354(1712), 1681–1693. doi:10.1098/rsta.1996.0073
- Ayyaru, S., & Dharmalingam, S. (2014). Enhanced response of microbial fuel cell using sulfonated poly ether ether ketone membrane as a biochemical oxygen demand sensor. *Analytica Chimica Acta*, 818, 15–22. doi:10.1016/j.aca.2014.01.059
- Barrett, C. T., & Barrett, J. F. (2003). Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? *Current Opinion in Biotechnology*, 14(6), 621–626. doi:10.1016/j.copbio.2003.10.003
- Barton, a J., Sagers, R. D., & Pitt, W. G. (1996). Bacterial adhesion to orthopedic implant polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30(3), 403–10. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199603)30:3<403::AID-JBM15>3.0.CO;2-K
- Beg, A. M., Jones, M. N., Miller-Torbert, T., & Holt, R. G. (2002). Binding of Streptococcus mutans to extracellular matrix molecules and fibrinogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(1), 75–79. doi:10.1016/S0006-291X(02)02390-2
- Bobyn, J. D., Stackpool, G. J., Hacking, S. A., Tanzer, M., & Krygier, J. J. (1999). Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 81(B), 907–914.
- Broggini, N., Mcmanus, L. M., Hermann, J. S., Medina, R. U., Oates, T. W., Schenk, R. K., ... Cochran, D. L. (2003). at the Implant-Abutment Interface. *Journal of Dental Research*, 82(3), 232–238.

- Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, a. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1771–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Conceição, T. F., Bertolino, J. R., Barra, G. M. O., Mireski, S. L., Joussef, A. C., & Pires, A. T. N. (2008). Preparation and Characterization of Poly (Ether Ether Ketone) Derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(1), 111–116.
- Costerton, J. W. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318
- Dalton, H. M., & Marcht, P. E. (1998). Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Current Opinion in Biotechnology*, jun 9(3), 252–255.
- De Lima Pimenta, A., Chiaradia-Delatorre, L. D., Mascarello, A., de Oliveira, K. A., Leal, P. C., Yunes, R. A., ... Smânia, A. (2013). Synthetic organic compounds with potential for bacterial biofilm inhibition, a path for the identification of compounds interfering with quorum sensing. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(6), 519–23. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.07.006
- He, Z., Wang, Q., Hu, Y., Liang, J., Jiang, Y., Ma, R., & Tang, Z. (2012). Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its luxS mutant strain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40, 30–35.
- Heitz-Mayfield, L. J. a. (2008). Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8 Suppl), 292–304. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01275.x
- Hentzer, M., & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections.

The Journal of Clinical Investigation, 112(9), 1300–1307.
doi:10.1172/JCI200320074.One

- Huang, R. Y. M., Shao, P., Burns, C. M., & Feng, X. (2001). Sulfonation of poly(ether ether ketone)(PEEK): Kinetic study and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 82(11), 2651–2660. doi:10.1002/app.2118
- Jansen, V. K., Conrads, G., & Richter, E. J. (1997). Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 12(4), 527–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9274082>
- Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474–91. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002
- Kurtz, S. M., & Devine, J. N. (2007). PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. *Biomaterials*, 28(32), 4845–69. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.013
- Lee, W.-T., Koak, J.-Y., Lim, Y.-J., Kim, S.-K., Kwon, H.-B., & Kim, M.-J. (2012). Stress shielding and fatigue limits of poly-ether-ether-ketone dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 100(4), 1044–52. doi:10.1002/jbm.b.32669
- Listgarten, M. a, & Lai, C. H. (1999). Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *Journal of Periodontology*, 70(4), 431–7. doi:10.1902/jop.1999.70.4.431
- Liu, X., Chu, P., & Ding, C. (2004). Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 47(3-4), 49–121. doi:10.1016/j.mser.2004.11.001

- Manefield, M., Rasmussen, T. B., Henzter, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., & Givskov, M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology (Reading, England)*, *148*(Pt 4), 1119–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932456>
- Manefield, M., Welch, M., Givskov, M., Salmond, G. P. C., & Kjelleberg, S. (2001). Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiology Letters*, *205*, 131–138.
- Marsh P, M. M. (2009). *Oral microbiology*. (C. L. Elsevier, Ed.) (5th ed.). Edinburgh.
- Mendil-Jakani, H., Zamanillo Lopez, I., Legrand, P. M., Mareau, V. H., & Gonon, L. (2014). A new interpretation of SAXS peaks in sulfonated poly(ether ether ketone) (sPEEK) membranes for fuel cells. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, *16*(23), 11228–35. doi:10.1039/c4cp00710g
- Meningaud, J.-P., Spahn, F., & Donsimoni, J.-M. (2012). [After titanium, peek ?]. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale*, *113*(5), 407–10. doi:10.1016/j.stomax.2011.12.016
- Natrah, F. M. I., Kenmegne, M. M., Wiyoto, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2011). Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Aquaculture*, *317*(1-4), 53–57. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.04.038
- Neto, A. R. L. P. (Universidade F. D. S. C. (2013). “Estudo do comportamento celular e bacteriano sobre polímeros tratados com agentes antibiofilmes visando a funcionalização de dispositivos implantáveis”. tese (Doutorado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Florianópolis, Santa Catarina.
- Nevens, M., Kim, D. M., Jun, S.-H., Guze, K., Schupbach, P., & Nevins, M. L. (2010). Histologic evidence of a connective tissue

- attachment to laser microgrooved abutments: a canine study. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 30(3), 245–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20386781>
- Niinomi, M. (1998). Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Materials Science and Engineering A* 243, 243, 231–236.
- Nyvad, B., & Kilian, M. (1987). Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 95(5), 369–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3477852>
- Oh, K., Lee, D., Choo, M., Park, K. H., Jeon, S., Hong, S. H., ... Choi, J. W. (2014). Enhanced Durability of Polymer Electrolyte Membrane Fuel Cells by Functionalized 2D Boron Nitride Nanoflakes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6, 7751–7758.
- Oss, C. J. V. A. N., & Giese, R. F. (1995). The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. *Clay and Clays Minerals*, 43(4), 474–477.
- Pereira, U. a, Barbosa, L. C. a, Maltha, C. R. a, Demuner, A. J., Masood, M. a, & Pimenta, A. L. (2014a). Inhibition of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by highly active lactones and lactams analogues of rubrolides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 82, 127–38. doi:10.1016/j.ejmech.2014.05.035
- Pereira, U. a, Barbosa, L. C. a, Maltha, C. R. a, Demuner, A. J., Masood, M. a, & Pimenta, A. L. (2014b). γ -Alkylidene- γ -lactones and isobutylpyrrol-2(5H)-ones analogues to rubrolides as inhibitors of biofilm formation by gram-positive and gram-negative bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(4), 1052–6. doi:10.1016/j.bmcl.2014.01.023
- Quirynen, M., Abarca, M., Van Assche, N., Nevins, M., & van Steenberghe, D. (2007). Impact of supportive periodontal therapy and implant surface roughness on implant outcome in patients with

a history of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(9), 805–15. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01106.x

Rasmussen, T. B., & Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 296(2-3), 149–61. doi:10.1016/j.ijmm.2006.02.005

Ren, D., Sims, J. J., & Wood, T. K. (2001). Brief report Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environmental Microbiology*, 3, 731–736.

Ren, D., Sims, J. J., & Wood, T. K. (2002). Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Letters in Applied Microbiology*, 34(4), 293–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940163>

Robert m. urban, Joshua j. jacobs, michael j. tomlinson, john gavriloic, michel peoc'h. (2000). Dissemination of Wear Particles to the Liver , Spleen , and Abdominal Lymph Nodes of Patients with Hip or Knee Replacement *. *The Journal of Bone and Joint Surgery, Incorporated Months*, 82-A(4, A), april.

Romero, D., Traxler, M. F., López, D., & Kolter, R. (2011). Antibiotics as Signal Molecules. *Chemical Reviews*, 111(9), 5492–5505. doi:10.1021/cr2000509.Antibiotics

Sagomonyants, K. B., Jarman-Smith, M. L., Devine, J. N., Aronow, M. S., & Gronowicz, G. a. (2008). The in vitro response of human osteoblasts to polyetheretherketone (PEEK) substrates compared to commercially pure titanium. *Biomaterials*, 29(11), 1563–72. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.12.001

Sarot, J. R., Contar, C. M. M., Cruz, A. C. C. Da, & Magini, R. de S. (2010). Evaluation of the stress distribution in CFR-PEEK dental implants by the three-dimensional finite element method. *Journal*

of Materials Science. Materials in Medicine, 21(7), 2079–85.
doi:10.1007/s10856-010-4084-7

- Schuster, M., Joseph Sexton, D., Diggle, S. P., & Peter Greenberg, E. (2013). Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application. *Annual Review of Microbiology*, 67, 43–63.
doi:10.1146/annurev-micro-092412-155635
- Souza, J. C. M., Henriques, M., Oliveira, R., Teughels, W., Celis, J.-P., & Rocha, L. a. (2010). Biofilms inducing ultra-low friction on titanium. *Journal of Dental Research*, 89(12), 1470–5.
doi:10.1177/0022034510378428
- Souza, J. C. M., Ponthiaux, P., Henriques, M., Oliveira, R., Teughels, W., Celis, J.-P., & Rocha, L. a. (2013). Corrosion behaviour of titanium in the presence of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dentistry*, 41(6), 528–34. doi:10.1016/j.jdent.2013.03.008
- Subramani, K., Jung, R. E., Molenberg, D. M. D. A., & Hämmerle, C. H. F. (2009). Biofilm on Dental Implants : A Review of the Literature. *INT J ORAL MAXILLOFAC IMPLANTS*, 24(4), 616–626.
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., & Quirynen, M. (2006a). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 17 Suppl 2, 68–81. doi:10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., & Quirynen, M. (2006b). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 17 Suppl 2, 68–81. doi:10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., & Quirynen, M. (2006c). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 17 Suppl 2, 68–81. doi:10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x

- Weng, Y., Howard, L., Chong, V. J., Sun, J., Gregory, R. L., & Xie, D. (2012). A novel furanone-modified antibacterial dental glass ionomer cement. *Acta Biomaterialia*, 8(8), 3153–60. doi:10.1016/j.actbio.2012.04.038
- Xing, P., Robertson, G. P., Guiver, M. D., Mikhailenko, S. D., Wang, K., & Kaliaguine, S. (2004). Synthesis and characterization of sulfonated poly(ether ether ketone) for proton exchange membranes. *Journal of Membrane Science*, 229(1-2), 95–106. doi:10.1016/j.memsci.2003.09.019
- Xu, J., Zhang, Z., Xiong, X., & Zeng, H. (1992). A new solvent for poly(ether ether ketone) Jiarui. *Polymer*, 33(20), 4432–4434.
- Zaidi, S. M. J. (2003). Polymer Sulfonation – A versatile Route to prepare proton -conducting membrane material for advanced technologies: صلاحة - صلاخلا. *The Arabian Journal for Science and Engineering*, 28(2B), 183–194.
- Zaidi, S. M. J., Mikhailenko, S. ., Robertson, G. ., Guiver, M. ., & Kaliaguine, S. (2000). Proton conducting composite membranes from polyether ether ketone and heteropolyacids for fuel cell applications. *Journal of Membrane Science*, 173(1), 17–34. doi:10.1016/S0376-7388(00)00345-8
- Zhao, L., Chu, P. K., Zhang, Y., & Wu, Z. (2009). Antibacterial coatings on titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 91(1), 470–80. doi:10.1002/jbm.b.31463
- Zhao, Y., Tsuchida, E., Choe, Y.-K., Ikeshoji, T., Barique, M. A., & Ohira, A. (2014). Ab initio studies on the proton dissociation and infrared spectra of sulfonated poly(ether ether ketone) (SPEEK) membranes. *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP*, 16(3), 1041–9. doi:10.1039/c3cp53146e
- Zhao, Y., Wong, H. M., Wang, W., Li, P., Xu, Z., Chong, E. Y. W., ... Chu, P. K. (2013). Cytocompatibility, osseointegration, and bioactivity of three-dimensional porous and nanostructured

network on polyetheretherketone. *Biomaterials*, 34(37), 9264–77.
doi:10.1016/j.biomaterials.2013.08.071

Zijngel, V., van Leeuwen, M. B. M., Degener, J. E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R., & Harmsen, H. J. M. (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*, 5(2), e9321.
doi:10.1371/journal.pone.0009321

Zitzmann, N. U., Abrahamsson, I., Berglundh, T., & Lindhe, J. (2002). Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(5), 456–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060429>

Zitzmann, N. U., & Berglundh, T. (2008). Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8 Suppl), 286–91. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x

REFERÊNCIAS

- Appleby, a. J., & Twidell, J. (1996). Recent Developments and Applications of the Polymer Fuel Cell [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 354(1712), 1681–1693. <http://doi.org/10.1098/rsta.1996.0073>
- Barrett, C. T., & Barrett, J. F. (2003). Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? *Current Opinion in Biotechnology*, 14(6), 621–626. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.10.003>
- Broggini, N., Mcmanus, L. M., Hermann, J. S., Medina, R. U., Oates, T. W., Schenk, R. K., ... Cochran, D. L. (2003). at the Implant-Abutment Interface. *Journal of Dental Research*, 82(3), 232–238.
- Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, a. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1771–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Costerton, J. W. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <http://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- De Lima Pimenta, A., Chiaradia-Delatorre, L. D., Mascarello, A., de Oliveira, K. A., Leal, P. C., Yunes, R. A., ... Smânia, A. (2013). Synthetic organic compounds with potential for bacterial biofilm inhibition, a path for the identification of compounds interfering with quorum sensing. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(6), 519–23. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.07.006>
- He, Z., Wang, Q., Hu, Y., Liang, J., Jiang, Y., Ma, R., & Tang, Z. (2012). Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its

- luxS mutant strain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40, 30–35.
- Heitz-Mayfield, L. J. a. (2008). Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8 Suppl), 292–304. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01275.x>
- Hentzer, M., & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(9), 1300–1307. <http://doi.org/10.1172/JCI200320074>.One
- Jansen, V. K., Conrads, G., & Richter, E. J. (1997). Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 12(4), 527–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9274082>
- Kurtz, S. M., & Devine, J. N. (2007). PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. *Biomaterials*, 28(32), 4845–69. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.013>
- Lee, W.-T., Koak, J.-Y., Lim, Y.-J., Kim, S.-K., Kwon, H.-B., & Kim, M.-J. (2012). Stress shielding and fatigue limits of poly-ether-ether-ketone dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 100(4), 1044–52. <http://doi.org/10.1002/jbm.b.32669>
- Listgarten, M. a, & Lai, C. H. (1999). Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *Journal of Periodontology*, 70(4), 431–7. <http://doi.org/10.1902/jop.1999.70.4.431>
- Manefield, M., Rasmussen, T. B., Hentzer, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., & Givskov, M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 4), 1119–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932456>

- Marsh P, M. M. (2009). *Oral microbiology*. (C. L. Elsevier, Ed.) (5th ed.). Edinburgh.
- Meningaud, J.-P., Spahn, F., & Donsimoni, J.-M. (2012). After titanium, peek? *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale*, 113(5), 407–10. <http://doi.org/10.1016/j.stomax.2011.12.016>
- Natrah, F. M. I., Kenmegne, M. M., Wiyoto, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2011). Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Aquaculture*, 317(1-4), 53–57. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.038>
- Neto, A. R. L. P. (Universidade F. D. S. C. (2013). “Estudo do comportamento celular e bacteriano sobre polímeros tratados com agentes antibiofilmes visando a funcionalização de dispositivos implantáveis”. tese (Doutorado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Florianópolis, Santa Catarina.
- Niinomi, M. (1998). Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Materials Science and Engineering A* 243, 243, 231–236.
- Nyvad, B., & Kilian, M. (1987). Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 95(5), 369–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3477852>
- Pereira, U. a, Barbosa, L. C. a, Maltha, C. R. a, Demuner, A. J., Masood, M. a, & Pimenta, A. L. (2014a). Inhibition of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by highly active lactones and lactams analogues of rubrolides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 82, 127–38. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.035>
- Pereira, U. a, Barbosa, L. C. a, Maltha, C. R. a, Demuner, A. J., Masood, M. a, & Pimenta, A. L. (2014b). γ -Alkylidene- γ -lactones and isobutylpyrrol-2(5H)-ones analogues to rubrolides as inhibitors of biofilm formation by gram-positive and gram-negative bacteria.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 24(4), 1052–6.
<http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.01.023>

- Quirynen, M., Abarca, M., Van Assche, N., Nevins, M., & van Steenberghe, D. (2007). Impact of supportive periodontal therapy and implant surface roughness on implant outcome in patients with a history of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(9), 805–15. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01106.x>
- Rasmussen, T. B., & Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 296(2-3), 149–61. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.005>
- Ren, D., Sims, J. J., & Wood, T. K. (2001). Brief report Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environmental Microbiology*, 3, 731–736.
- Ren, D., Sims, J. J., & Wood, T. K. (2002). Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Letters in Applied Microbiology*, 34(4), 293–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940163>
- Romero, D., Traxler, M. F., López, D., & Kolter, R. (2011). Antibiotics as Signal Molecules. *Chemical Reviews*, 111(9), 5492–5505. <http://doi.org/10.1021/cr2000509.Antibiotics>
- Sarot, J. R., Contar, C. M. M., Cruz, A. C. C. Da, & Magini, R. de S. (2010). Evaluation of the stress distribution in CFR-PEEK dental implants by the three-dimensional finite element method. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 21(7), 2079–85. <http://doi.org/10.1007/s10856-010-4084-7>
- Schuster, M., Joseph Sexton, D., Diggle, S. P., & Peter Greenberg, E. (2013). Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application. *Annual Review of Microbiology*, 67, 43–63. <http://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155635>

- Subramani, K., Jung, R. E., Molenberg, D. M. D. A., & Hämmerle, C. H. F. (2009). Biofilm on Dental Implants: A Review of the Literature. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 24(4), 616–626.
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., & Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 17 Suppl 2, 68–81. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>
- Weng, Y., Howard, L., Chong, V. J., Sun, J., Gregory, R. L., & Xie, D. (2012). A novel furanone-modified antibacterial dental glass ionomer cement. *Acta Biomaterialia*, 8(8), 3153–60. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.038>
- Zaidi, S. M. J. (2003). Polymer Sulfonation – A versatile Route to prepare proton -conducting membrane material for advanced technologies: صلاحة - صلخلا. *The Arabian Journal for Science and Engineering*, 28(2B), 183–194.
- Zhao, L., Chu, P. K., Zhang, Y., & Wu, Z. (2009). Antibacterial coatings on titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 91(1), 470–80. <http://doi.org/10.1002/jbm.b.31463>
- Zijngel, V., van Leeuwen, M. B. M., Degener, J. E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R., & Harmsen, H. J. M. (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS One*, 5(2), e9321. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0009321>
- Zitzmann, N. U., Abrahamsson, I., Berglundh, T., & Lindhe, J. (2002). Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(5), 456–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060429>
- Zitzmann, N. U., & Berglundh, T. (2008). Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8 Suppl), 286–91. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x>