

# Recobriments antiadherents sobre titani: mètodes de deposició de poli(etilenglicol)

Judit Buxadera-Palomero<sup>1</sup>, Cristina Calvo<sup>1</sup>, Sergi Torrent-Camarero<sup>1</sup>, Adriana Carreter<sup>1</sup>, Cristina Canal<sup>2</sup>, F. Xavier Gil<sup>2</sup>, Daniel Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grup de recerca de Biomaterials, Biomecànica i Enginyeria de Teixits, Departament de Ciència de Materials i Enginyeria Metal·lúrgica, E. U. d'Enginyeria Tècnica Industrial de Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), C/ Comte d'Urgell 187, 08036 Barcelona, Spain [judit.buxadera@upc.edu](mailto:judit.buxadera@upc.edu)

<sup>2</sup>Grup de recerca de Biomaterials, Biomecànica i Enginyeria de Teixits, Departament de Ciència de Materials i Enginyeria Metal·lúrgica, E. T. S. d'Enginyeria Industrial de Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Av. Diagonal 647, 08028 Barcelona,

## Resum

Els implants dentals són àmpliament utilitzats per a la substitució de peces dentals perdudes. Tot i la seva elevada taxa d'èxit, es produeixen fallades en un 5-10% dels implants col·locats. Per evitar les fallades per infecció cal evitar l'adhesió bacteriana inicial, fita que es pot assolir amb els recobriments antiadherents. En aquest estudi es realitza la comparativa de tres mètodes diferents per l'obtenció de recobriments de poli(etilenglicol) (PEG) sobre titani per aplicacions en implants dentals. Els mètodes estudiats han estat la polimerització per plasma, l'electrodeposició i la silanització. Els tres mètodes permeten obtenir un recobriment de PEG a la superfície del titani, amb composició química semblant i una reducció de l'adhesió bacteriana. L'adhesió cel·lular no es veu significativament afectada en cap dels casos.

**Paraules clau:** Poli(etilenglicol), implants dentals, recobriments antiadherents, polimerització per plasma.

## Abstract

Dental implants are widely used for the replacement of teeth. Despite their high success rate, they fail in 5-10% of the cases. To avoid the failures caused by infection is important to avoid the initial bacterial adhesion, and this can be done with the antifouling coatings. In this study, a comparison between different deposition methods of poly(ethylene glycol) (PEG) on titanium has been done. Studied methods were plasma polymerization, electrodeposition and silanization. All the methods provided a PEG coating on the titanium surface, with similar composition. They showed a reduction on the bacterial adhesion while the cell adhesion was not modified.

**Keywords:** Poly(ethylene glycol), dental implants, antifouling coatings, plasma polymerization

## 1. Introducció

Tot i que els implants dentals tenen la major taxa d'èxit dins dels implants de titani, es produeixen fallades en 5-10% dels implants col·locats. D'entre les causes de la fallada, es pot destacar la infecció amb una prevalença de fins un 28% dels casos [1–3].

La infecció en implants dentals ve provocada per l'adhesió bacteriana, amb la subseqüent formació d'un biofilm, és a dir, un conjunt de bacteris continguts en una matriu extracel·lular produïda pels mateixos bacteris. La formació del biofilm protegeix els bacteris tan de la resposta immune de l'hoste com de l'ús d'antibiòtics. Per això, una de les principals estratègies en el camp dels recobriments antibacterians és l'ús de recobriments que evitin l'adhesió bacteriana inicial.

El poli(etilenglicol) és un polímer amb capacitat antiadherent, que no és tòxic i no provoca reaccions adverses en l'hoste. Les cadenes polimèriques de PEG eviten l'adsorció de proteïnes mitjançant dos mecanismes diferents: la repulsió estàtica provocada per la compressió de les

cadena i actuant com a barrera creada per l'aigua associada al PEG. Per això, s'ha utilitzat com a recobriments en diferents tipus d'implants, com ara catèters o pròtesis ortopèdiques [4–7].

D'entre els mètodes per l'obtenció de recobriments de PEG, podem destacar els recobriments obtinguts per fisiorció 1, per enllaç covalent amb un dels terminals del PEG [10,11] o per polimerització per plasma [12,13].

En aquest estudi comparem tres mètodes d'obtenció de recobriments de PEG, la polimerització per plasma, que consisteix en sotmetre les mostres a un plasma amb la presència d'un precursor del PEG, la silanització, que consisteix en fer reaccionar el terminal hidroxil del PEG amb tetraclorur de silici per enllaçar-lo posteriorment amb el titani, i l'electrodeposició, que consisteix en enllaçar el terminal amino del PEG amb la superfície del titani col·locant el titani com a càtode d'una cel·la electrolítica amb el PEG dissolt. La comparació es porta a terme tenint en compte l'adhesió bacteriana i cel·lular i les propietats físiques dels recobriments.

## 2. Materials i mètodes

### 2.1. Materials i reactius

Per a tots els estudis s'ha utilitzat titani comercialment pur de grau 2, que s'ha obtingut en forma de barra i s'ha tallat per tal d'obtenir discs de 10mm de diàmetre i 2mm de gruix. La superfície dels discs s'ha desbastat amb paper de desbast de carbur de silici (P600, P800, P1200 and P2500, Buehler, USA) i s'ha polit amb una suspensió de sílice col·loidal (mida de partícula de 0.05  $\mu\text{m}$ , Buehler, USA). Posteriorment, les mostres s'han netejat amb una seqüència de dissolvents orgànics: toluè, isopropanol, aigua, etanol i acetona en un bany d'ultrasons durant 15 min per cada dissolvent. Les mostres polides i netes fins a aquest punt han estat utilitzades com a control en tots els assajos (Ti).

Per l'obtenció dels diferents recobriments s'ha utilitzat tetra(etilenglicol) dimetil èter (tetraglyme), bis(3-aminopropil)-poli(etilenglicol) ( $M_n=1500$ ), poli(etilenglicol) ( $M_n=1000$ ), trimetilamina, tetraclorur de silici i toluè (99.8%). Tots els reactius s'han obtingut de Sigma-Aldrich (USA).

### 2.2. Mètodes de recobriment i caracterització

Com a tractament previ al recobriment amb PEG s'ha realitzat una activació per plasma amb argó de 5min, a una pressió de 0.40mbar i a una potència de 100W amb un reactor comercial de ràdio freqüència (13.56MHz) (Diener Femto, Diener, Alemanya).

Per a la polimerització per plasma s'ha utilitzat el tetraglyme com a precursor i l'argó com a gas portador. S'ha efectuat un tractament per polsos ( $t_{on}=10\mu\text{s}$ ,  $t_{off}=10\text{ms}$ ) durant 1h a una potència màxima de 100W. Les mostres polimeritzades per plasma tindran el codi Plasma.

Per a l'electrodeposició s'ha utilitzat una dissolució al 2% en massa de bis(3-aminopropil)-poli(etilenglicol) i 0,3M de clorur de sodi en aigua. El procés s'ha portat a terme en una cel·la electrolítica connectada a un potenciostat (Princeton Applied Research, Parstat 2273) amb la mostra de titani activada per plasma com a càtode, un elèctrode de referència de calomelans i un contra-elèctrode de platí. El tractament consta d'una rampa de potencial a una velocitat de 0,1V/s fins a 5V. El potencial de 5V s'ha mantingut constant durant 5min. Les mostres obtingudes per electrodeposició tindran el codi Electrodepositada.

Per a la silanització s'ha preparat una dissolució de poli(etilenglicol) al 0.98% en massa en toluè anhidre(99.8%, Sigma Aldrich, USA). Es fa reaccionar, en atmosfera inert (argó), amb 136 $\mu\text{l}$  de trimetilamina durant 1h i posteriorment amb 20 $\mu\text{l}$  de tetraclorur de silici durant 5min. Un cop preparat el PEG silanitzat, es fa la immersió de les mostres de titani activades per plasma durant 2h. Les mostres silanitzades tindran el codi Silanitzada.

La mullabilitat superficial s'ha determinat mitjançant el mètode de gota sèssil amb l'equip OCA15 (Dataphysics instrument Company, Germany) amb aigua ultrapura MilliQ (Millipore

Corporation). S'ha utilitzat una gota de 2µl depositada a una velocitat de 1µl/s. Les fotografies de la gota s'han analitzat amb el software SCA20 (Dataphysics Instrument Company, Alemanya). S'han pres tres mesures de l'angle de contacte per cada condició estudiada.

L'anàlisi per XPS s'ha efectuat en una cambra d'ultra-alt buit ( $5.0 \cdot 10^{-9}$  mbar) amb un ànode XR50 Mg operant a 150W i un detector Phoibos 150 MCD-9 (D8 advance, SPECS Surface Nano Analysis GmbH, Germany). Els espectres s'han analitzat a una energia de pas de 25eV amb un espaiat de 1.0eV per als espectres generals i de 0.1eV per als espectres d'alta resolució. S'han enregistrat els nivells energètics del C 1s, O 1s, Si 2p, Cl 2p, N 1s i Ti 2p. El pic del C 1s s'ha utilitzat com a referència. Per tal de determinar la composició elemental s'ha utilitzat el software CasaXPS (Casa Software Ltd, UK) aplicant el valor predefinit dels factors de sensibilitat relatius.

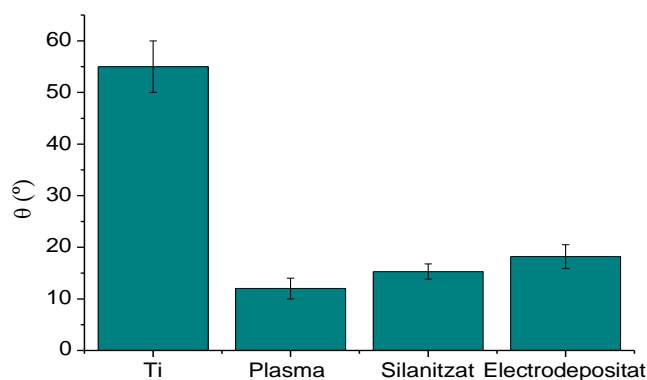
S'han dut a terme assajos d'adhesió bacteriana amb dues soques bacterianes presents a la flora bucal: *Streptococcus sanguinis* (S. sanguinis CECT 480, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia, Spain) and *Lactobacillus salivarius* (L. salivarius CCUG 17826, Culture Collection University of Göteborg (CCUG), Göteborg, Sweden). S'ha utilitzat Todd-Hewitt (TH) broth (Scharlab SL, Spain) com a medi de cultiu per als S. sanguinis i MRS broth (Scharlab SL, Spain) com a medi de cultiu per als L. salivarius. Els cultius s'han incubat durant 16h abans de cada assaig, i s'ha ajustat la densitat òptica de cada suspensió a una absorbància de  $0.2 \pm 0.01$  a 600 nm, per donar aproximadament  $1 \cdot 10^8$  unitats formadores de colònies per ml (CFU)/ml. Es fa una immersió de les mostres en 1ml de la suspensió de bacteris durant 2h a 37°C. Passat aquest temps, es fan dos rentats amb PBS (Gibco, UK). Per tal de desenganxar els bacteris de les mostres aquestes s'agiten amb el vòrtex durant 5min en 1ml de PBS. Els bacteris obtinguts es sembren utilitzant dilucions seriades en plaques de medi de cultiu amb agar, i s'incuben entre 24-48h a 37°C. Finalment, es compten les colònies formades. Per cada assaig s'utilitzen tres mostres de cada condició.

Els assajos d'adhesió cel·lular s'han realitzat amb fibroblasts humans (human Foreskin Fibroblasts, hFFs, Merck Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Les mostres s'han esterilitzat per immersió en etanol al 70%. Posteriorment, s'han sembrat  $2 \cdot 10^4$  cèl·lules per mostra i s'han incubat durant 6h a 37°C. Passat el temps d'incubació, s'han lisat les cèl·lules amb mammalian extraction protein reagent (mPER, Thermo Scientific, USA) i s'ha analitzat el nombre de cèl·lules a partir de la quantificació de l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH) amb un kit de detecció de citotoxicitat (Thermo Scientific, USA).

Per a l'observació de les cèl·lules adherides amb SEM s'han fixat amb una solució al 4% de paraformaldehid en PBS, i s'ha efectuat una seqüència de deshidratació per immersió de les mostres en solucions d'etanol al 50%, 70%, 90%, 96% i 100% (v/v) durant 15 min cada solució. Com a etapa final, s'ha efectuat una immersió de les mostres en hexametildisiloxà (HMDS) i s'han recobert amb carboni.

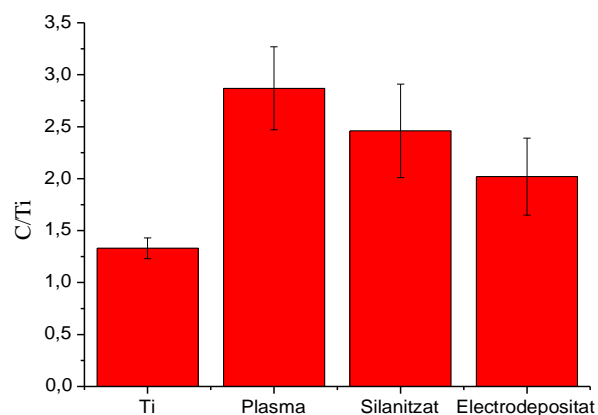
### 3. Resultats

Les mostres recobertes amb PEG mostren una disminució en l'angle de contacte (Figura 1), indicant la presència d'un recobriment hidrofílic. Tot i que l'angle de contacte és lleugerament inferior que els valors trobats a la literatura [7,14–17], es pot relacionar aquest augment de la mullabilitat amb la presència d'un recobriment de PEG. La caracterització química del recobriment mitjançant XPS mostra un augment de la relació C/Ti en les mostres recobertes respecte a les mostres sense recobrir (Figura 2). L'increment del contingut atòmic ve donat per dos motius. Per una banda, pel fet que l'XPS és una tècnica superficial capaç de detectar els primers nanòmetres de gruix. Aquest fet comporta una atenuació de la senyal del titani quan hi ha un recobriment. Per altra banda, depositar un recobriment polimèric augmenta la presència de carboni a la superfície [18,6,19,20].

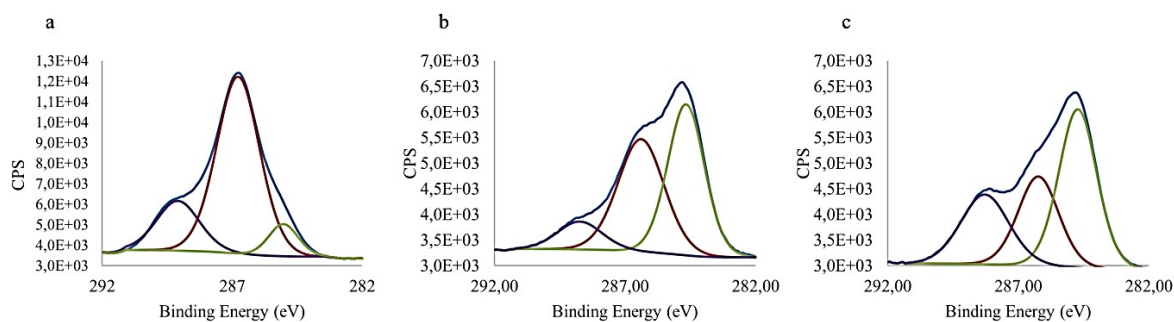


**Figura 1.** Angle de contacte de les condicions estudiades. La presència dels recobriment provoca un augment de la mullabilitat

A partir de la deconvolució del pic de C 1s (figura 3) es poden observar els principals components presents al PEG: enllaç C-H o C-C a 285eV, enllaç èter C-O a 286.5eV, i enllaços carbonil (C=O) i carboxil (O=C-O) a 288eV. El pic èter (286.5eV) es considera el pic característic del PEG. Aquest pic és majoritari en les mostres obtingudes per polimerització per plasma, mentre que és menor per les mostres electrodepositades i silanitzades. Aquest fet es pot justificar per un major entrecruament el polímer obtingut per polimerització per plasma, fet que redueix la presència d'enllaços C-C [21–23].

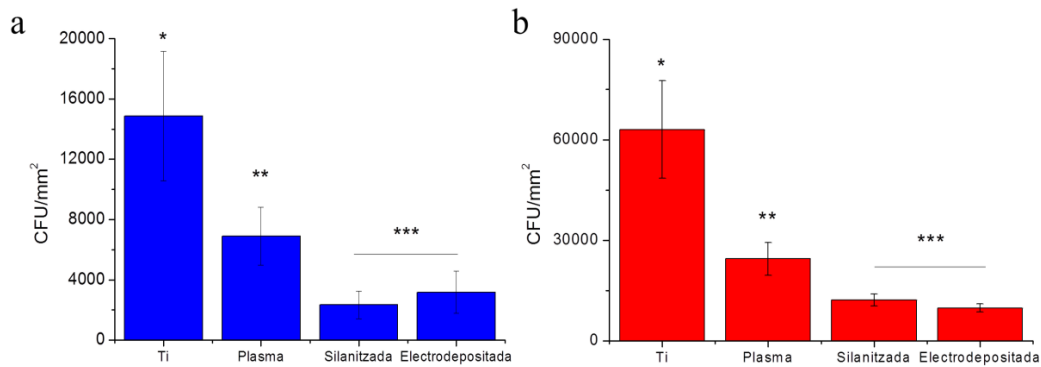


**Figura 2.** Relació C/Ti (en % atòmic) de les diferents mostres estudiades. La presència del recobriment polimèric provoca un augment del carboni respecte al tita



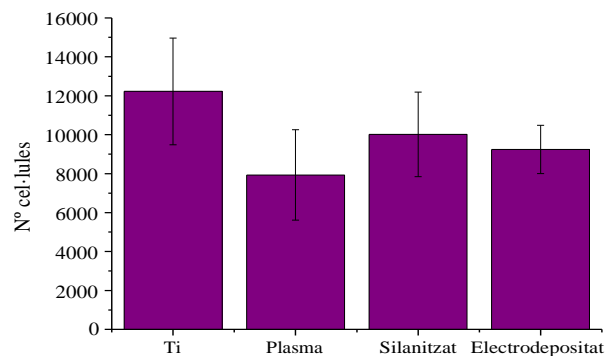
**Figura 3.** Deconvolució del pic C1s de Plasma (a), Electrodepositada (b) i Silanitzada (c). El pic a 285eV indica la presència d'enllaços hidrocarboni (C-C, C-H), el pic a 286.5eV indica la presència d'enllaços èter (C-O) i el pic a 288eV indica la presència d'espècies oxidades d'oxigen enllaçades al carboni (C=O, O-C=O).

En quant als assajos d'adhesió bacteriana (figura 4), s'observa una menor adhesió en les mostres recobertes amb PEG respecte al control amb les dues soques bacterianes estudiades. Aquesta disminució és més accentuada pels recobriments obtinguts per electrodeposició i silanització. Aquest fet es pot explicar per una major quantitat de molècules polimèriques depositades o per una llargada de cadena major, fet que faria augmentar el caràcter antiadherent del recobriment [24–26].

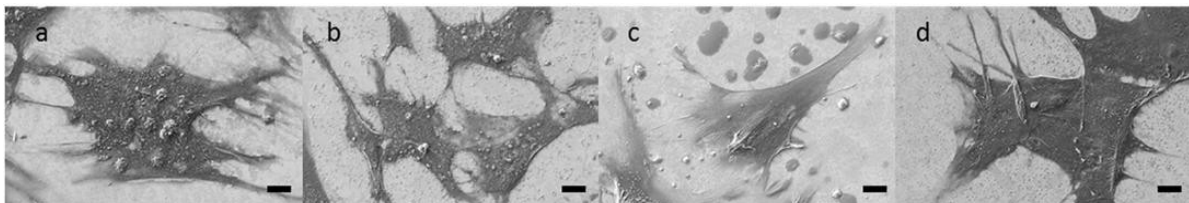


**Figura 4.** Adhesió bacteriana de les mostres amb *S. sanguinis* (a) i *L. salivarius* (b). Les barres amb el mateix símbol no presenten diferències estadísticament significatives

L'adhesió cel·lular és lleugerament menor en el cas de les mostres tractades, tot i que les diferències no són estadísticament significatives (Figura 5). Si es té en compte la morfologia de les cèl·lules adherides, no s'observen diferències entre la mostra control i les recobertes (Figura 6). Aquest fet permet l'ús del recobriment en aplicacions com implants dentals, ja que provoquen una disminució de l'adhesió bacteriana sense alterar l'adhesió ni la morfologia cel·lular [27–29].



**Figura 5.** Adhesió cel·lular (hFFs) en les mostres estudiades. Les diferències entre les mostres no són estadísticament significatives.



**Figura 6.** Adhesió de fibroblasts en la mostra de Ti (a), Plasma (b), Electrodepositada (c) i Silanitzada (d)

#### 4. Conclusions

S'han obtingut recobriments de PEG mitjançant tres mètodes diferents, la polimerització per plasma, l'electrodeposició i la silanització. La presència del recobriment queda demostrada a partir dels valors d'angle de contacte i de XPS. L'adhesió bacteriana es menor en tots els casos, tot i que els valors mínims corresponen a les mostres electrodepositada i silanitzada. L'adhesió i la morfologia cel·lular no es veuen afectades, de manera que els recobriments poden ser utilitzats per aplicacions en implants dentals.

## Agraiments

El finançament per la beca de J. B-P prové de la Universitat Politècnica de Catalunya i la Fundación Ramon Areces. El finançament del projecte prové de la Fundación Ramon Areces (projecte *Biosellado*) i el projecte MAT2012-2012-30706, co-financiat per la UE amb els Fons de Desenvolupament Regional i de l'European Cooperation in Science and Technology, dins de l'acció COST MP1101.

## Referències

1. K. Hori and S. Matsumoto, *Biochem. Eng. J.* **48**, 424 (2010).
2. H. F. Morris, S. Winkler, and S. Ochi, *J. Oral Implantol.* **27**, 180 (2001).
3. M. Salwiczek, Y. Qu, J. Gardiner, R. A. Strugnell, T. Lithgow, K. M. McLean, and H. Thissen, *Trends Biotechnol.* **32**, 82 (2014).
4. M. Shen, M. S. Wagner, D. G. Castner, B. D. Ratner, and T. A. Horbett, *Langmuir* **19**, 1692 (2003).
5. A. Michelmore, C. Charles, R. W. Boswell, R. D. Short, and J. D. Whittle, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 5387 (2013).
6. Y. Li, B. W. Muir, C. D. Easton, L. Thomsen, D. R. Nisbet, and J. S. Forsythe, *Appl. Surf. Sci.* **288**, 288 (2014).
7. G. M. Harbers, K. Emoto, C. Greef, S. W. Metzger, H. N. Woodward, J. J. Mascali, D. W. Grainger, and M. J. Lochhead, *Chem. Mater.* **19**, 4405 (2007).
8. A. K. Muszanska, H. J. Busscher, A. Herrmann, H. C. van der Mei, and W. Norde, *Biomaterials* **32**, 6333 (2011).
9. S. Saxer, C. Portmann, S. Tosatti, K. Gademann, S. Zürcher, and M. Textor, *Macromolecules* **43**, 1050 (2010).
10. Y. Tanaka, K. Matin, M. Gyo, A. Okada, Y. Tsutsumi, H. Doi, N. Nomura, J. Tagami, and T. Hanawa, *J. Biomed. Mater. Res. A* **95**, 1105 (2010).
11. S. Sharma, R. W. Johnson, and T. A. Desai, *Biosens. Bioelectron.* **20**, 227 (2004).
12. J. Buxadera-Palomero, C. Canal, S. Torrent-Camarero, B. Garrido, F. Javier Gil, and D. Rodríguez, *Biointerphases* **10**, 029505 (2015).
13. Y. J. Wu, R. B. Timmons, J. S. Jen, and F. E. Molock, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **18**, 235 (2000).
14. F. Rupp, L. Scheideler, N. Olshanska, M. de Wild, M. Wieland, and J. Geis-Gerstorfer, *J. Biomed. Mater. Res. A* **76**, 323 (2006).
15. R. Schlapak, P. Pammer, D. Armitage, R. Zhu, P. Hinterdorfer, M. Vaupel, T. Frühwirth, and S. Howorka, *Langmuir* **22**, 277 (2006).
16. S. R. Kane, P. D. Ashby, and L. A. Pruitt, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **21**, 1037 (2010).

17. E. E. Johnston, J. D. Bryers, and B. D. Ratner, *Langmuir* **21**, 870 (2005).
18. A. Michelmores, P. Gross-Kosche, S. A. Al-Bataineh, J. D. Whittle, and R. D. Short, *Langmuir* **29**, 2595 (2013).
19. R. Michel, S. Pasche, M. Textor, and D. G. Castner, *Langmuir* **21**, 12327 (2005).
20. P. J. Cumpson, *Surf. Interface Anal.* **29**, 403 (2000).
21. F. Brétagnol, M. Lejeune, A. Papadopoulou-Bouraoui, M. Hasiwa, H. Rauscher, G. Ceccone, P. Colpo, and F. Rossi, *Acta Biomater.* **2**, 165 (2006).
22. V. Zoulalian, S. Zürcher, S. Tosatti, M. Textor, S. Monge, and J.-J. Robin, *Langmuir* **26**, 74 (2010).
23. A. Roosjen, H. J. Kaper, H. C. van der Mei, W. Norde, and H. J. Busscher, *Microbiology* **149**, 3239 (2003).
24. P. Kingshott, J. Wei, D. Bagge-Ravn, N. Gadegaard, and L. Gram, *Langmuir* **19**, 6912 (2003).
25. K. D. Park, Y. S. Kim, D. K. Han, Y. H. Kim, E. H. B. Lee, H. Suh, and K. S. Choi, *Biomaterials* **19**, 851 (1998).
26. L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, and R. G. Richards, *Biomaterials* **25**, 4135 (2004).
27. J. Chen, J. Cao, J. Wang, M. F. Maitz, L. Guo, Y. Zhao, Q. Li, K. Xiong, and N. Huang, *J. Colloid Interface Sci.* **368**, 636 (2012).
28. M. Zhang, T. Desai, and M. Ferrari, *Biomaterials* **19**, 1924 (1998).
29. C. Choi, I. Hwang, Y.-L. Cho, S. Y. Han, D. H. Jo, D. Jung, D. W. Moon, E. J. Kim, C. S. Jeon, J. H. Kim, T. D. Chung, and T. G. Lee, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 697 (2013).