



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM – FFOE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – PPGO

MATHEUS VIEIRA NASCIMENTO

**TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM LACCASE ASSOCIADA A
CATECÓIS NA MOLHABILIDADE, ADESÃO DE CÉLULAS E
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM SUBSTRATOS DE POLI(ÉTER-
ÉTER-CETONA).**

FORTALEZA

2020

MATHEUS VIEIRA NASCIMENTO

TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM LACCASE ASSOCIADA A
CATECÓIS NA MOLHABILIDADE, ADESÃO DE CÉLULAS E
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM SUBSTRATOS DE POLI(ÉTER-
ÉTER-CETONA).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Dra. Karina Matthes de Freitas Pontes

FORTALEZA

2020

MATHEUS VIEIRA NASCIMENTO

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V716t Vieira Nascimento, Matheus.

TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM LACCASE ASSOCIADA A CATECÓIS NA
MOLHABILIDADE, ADESÃO DE CÉLULAS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM
SUBSTRATOS DE POLI(ÉTER-ÉTER-CETONA). / Matheus Vieira Nascimento. – 2020.
45 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Karina Matthes de Freitas Pontes.

1. Poli(éter-éter-cetona). 2. Laccase. 3. Catecóis. 4. Molhabilidade. 5. Adesão Celular. I.
Título.

CDD 617.6

TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM LACCASE ASSOCIADA A
CATECÓIS NA MOLHABILIDADE, ADESÃO DE CÉLULAS E
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM SUBSTRATOS DE POLI(ÉTER-
ÉTER-CETONA).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Karina Matthes de Freitas Pontes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Bruna Albuquerque Garcia
University of Florida

Prof. Dr. Marcelo Barbosa Ramos
Universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, **Marta Vieira** e **Aldemir Nascimento**, pelo apoio e o suporte durante toda minha jornada dentro e fora da vida acadêmica.

À Profa. Dra. **Karina Matthes** pela orientação, paciência, cordialidade e todas as oportunidades de aprendizado proporcionado ao longo desse período que já se estende desde a graduação, agora chegando a oito de orientação, e que me motivam a continuar seguindo na carreira de pesquisa.

Ao meu companheiro de vida **Leandro Castelo** por todo carinho, apoio e incentivo, bem como aos meus amigos **Beatriz Coelho**, **Bruna Kauamy**, **Fugita Filho** por todo companheirismo e suporte emocional, mesmo que às vezes à distância por conta do cenário atual.

A minha dupla de faculdade **Priscila Lopes** que mesmo à distância continua dando apoio e incentivo a tudo que me proponho fazer.

Ao Dr. **Klaus Rischka**, a Dra. **Welchy Cavalcanti** bem como ao **Instituto Fraunhofer** em Bremen na Alemanha pela oportunidade de estágio que resultou neste trabalho.

Aos meus amigos **Stephani Stamboroski** e **Vinicius Beber** pelo apoio e suporte no decorrer da estadia na Alemanha durante a execução de parte deste trabalho.

Aos meus amigos **Osias Vieira** e **Mateus Plutarco** por toda vivência, companheirismo e conhecimentos compartilhados durante a trajetória do mestrado.

Às colegas **Mayara Vasconcelos** e **Lara Vale** pela ajuda e suporte durante algumas das várias etapas deste trabalho.

À banca avaliadora deste trabalho, Dra. **Bruna Albuquerque** e Dr. **Marcelo Barbosa** pela disposição em avaliar e contribuir para este trabalho.

Aos Professores Dra. **Bruna Marjorie** e Dr. **Raniel Peixoto** por aceitarem o convite como membros suplentes da banca avaliadora.

Ao **Programa de Pós Graduação em Odontologia** e aos funcionários da coordenação pela disposição e suporte durante esse período.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de auxílio financeiro

Resumo

Estudos prévios sugerem o poli(éter-éter-cetona) (PEEK) como um potencial material alternativo aos implantes de titânio devido as suas características estéticas e mecânicas satisfatórias. Contudo, sua natureza polimérica dificulta a osseointegração, sendo o tratamento enzimático com laccase e catecóis uma alternativa para melhorar algumas propriedades do material. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com laccase associada a catecóis na molhabilidade, na adesão de células e na atividade antimicrobiana de substratos de PEEK. Para tal, discos de PEEK (15 x 2 mm) foram confeccionados e distribuídos aleatoriamente em grupos de tratamentos (n=3): controles - solução de acetato (Ac), enzima laccase (Lc) e catecóis (dopa, DOc; dopamina DMc; e ácido cafeico ACc); experimentais - laccase+dopa (LDO), laccase+dopamina (LDM) e laccase+ácido cafeico (AC). Todas as substâncias foram diluídas individualmente em solução de acetato pH 4,75 a 0,5 mg/mL à temperatura ambiente e mantidas em contato com os substratos de PEEK por 18 horas. Alterações na molhabilidade foram mensuradas por ângulo de contato (AC) 0, 10, 30 minutos, 1, 2, 4 horas 1, 2, 5, 7, 14, 21 e 30 dias após os tratamentos. A densidade celular (células/mm²) de *osteoblast-like cells* (MG-63) foi mensurada após 24h de contato, com coloração eosina-hematoxilina sob microscopia óptica. A atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 11205) foi executada contabilizando-se as unidades formadoras de colônia (UFC/mL) após 24 horas de contato. Os dados foram analisados com *one-way* ANOVA e ANOVA de medidas repetidas submetidos aos pós-testes de Dunnet, Sidak e Tukey, além da execução de análise de tendência linear ($\alpha=0,05$). Todos os tratamentos diminuíram significativamente o AC das amostras em relação ao controle acetato (Ac - $85,6^\circ \pm 0,6$; $p<0,0001$) em todos os tempos avaliados. Os grupos tratados com laccase+catecóis obtiveram os menores AC, com destaque para LDM no T=0min ($18,5^\circ \pm 2,3$). Os grupos tratados com laccase+catecol exibiram maior densidade celular de MG-63 que o grupo tratado com Lc ($p<0,05$), bem como com relação ao grupo controle acetato Ac ($p<0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos controles e os tratados na redução de UFC tanto para *S. aureus* quanto para *E. coli* ($p>0,05$). Conclui-se que o tratamento de superfície com laccase associado a catecóis diminuiu significativamente o ângulo de contato do substrato PEEK e melhorou a

adesão de MG-63, embora não tenha apresentado atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*.

Palavras-chave: poli(éter-éter-cetona), catecol, laccase, molhabilidade, implante.

ABSTRACT

Previous studies suggest poly(ether-ether-ketone) (PEEK) as a potential alternative to titanium implants because of its satisfactory aesthetic and mechanical characteristics. However, its polymeric nature hinders osseointegration, which could be overcome with enzymatic treatment combining laccase and catechols. This study aimed to evaluate the effects of treatment with laccase associated with catechols on wettability, cell adhesion, and antimicrobial activity of PEEK substrates. PEEK discs (15 x 2 mm) were cut and randomly distributed in treatment groups (n = 3): controls - acetate solution (Ac), laccase enzyme (Lc) and catechols (dopa, DOc dopamine DMc; and caffeic acid ACc); experimental - laccase + dopa (LDO), laccase + dopamine (LDM) and laccase + caffeic acid (AC). All substances were individually diluted in acetate solution pH 4.75 at 0.5 mg/mL at room temperature and kept in contact with PEEK substrates for 18 hours. Changes in wettability were measured by water contact angle (WCA) 0, 10, 30 minutes, 1, 2, 4 hours 1, 2, 5, 7, 14, 21, and 30 days after treatments. The cell density (cells / mm²) of osteoblast-like cells (MG-63) was measured after 24 hours of contact, with eosin-hematoxylin staining under optical microscopy. Antimicrobial activity against *S. aureus* (ATCC 25923) and *E. coli* (ATCC 11205) was performed by counting the colony-forming units (CFU/mL) after 24 hours of contact. The data were analyzed with one-way ANOVA and ANOVA of repeated measures submitted to the post-tests of Dunnett, Sidak, and Tukey, and linear trend analysis was also performed ($\alpha = 0.05$). All treatments significantly decreased the WCA of the samples compared to the acetate control (Ac - $85.6^\circ \pm 0.6$; $p < 0.0001$) at all times evaluated. The groups treated with laccase+catechols had the lowest WCA, with an emphasis on LDM at T = 0min ($18.5^\circ \pm 2.3$). The groups treated with laccase + catechol exhibited higher cell density of MG-63 than the group treated with Lc ($p < 0.05$), as well as with the control group Ac acetate ($p < 0.05$). There was no statistical difference between the control and treated groups in the reduction of CFU for both *S. aureus* and *E. coli* ($p > 0.05$). The surface treatment with laccase associated with catechols significantly decreased the contact angle of the PEEK substrates and improved the adhesion of MG-63, although it did not show antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli*.

Keywords: poly (ether-ether-ketone), catechol, laccase, wettability, implant.

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	10
2. Proposição Geral.....	14
3. Capítulos	15
Effects of a novel enzymatic treatment with laccase associated with catechols on wettability, cell adhesion, and antimicrobial activity of polyetheretherketone (PEEK) substrates.....	15
4. Conclusão geral	41
Referências Gerais	41
Anexo A.....	45