

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE *IN VITRO* DE CIMENTO ENDODÔNTICO A BASE DE ALUMINATO DE CÁLCIO

I. R. Oliveira*, T. L. Andrade*, G. L. Santos*, V. C. Pandolfelli**

*Universidade do Vale do Paraíba – Univap

**Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Av. Shishima Hifumi 2911, São José dos Campos – SP, 12244-000

ivonero@univap.br

RESUMO

Bioatividade é referida como a capacidade de um material desenvolver uma ligação estável com tecidos vivos via a deposição de hidroxiapatita. Materiais os quais exibem essa propriedade podem ser usados para reparar danos nos tecidos ósseos e podem permanecer in situ indefinidamente. Uma indicação da bioatividade pode ser obtida pela avaliação da superfície de um substrato em contato com fluidos corporais simulados (SBF) in vitro. Neste trabalho, amostras de cimento endodôntico a base de aluminato de cálcio foram colocadas em contato com diferentes soluções SBF (Kokubo e Rigo) e suas superfícies foram posteriormente avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X. Medidas de pH e condutividade iônica foram também realizadas para as soluções de SBF em contato com as amostras de cimento endodôntico. As condições ideais de precipitação foram obtidas em SBF Rigo, sendo observada uma camada superficial com morfologia esférica característica de hidroxiapatita estequiométrica.

Palavras-chave: cimento, aluminato de cálcio, pH, condutividade iônica, bioatividade.

INTRODUÇÃO

Um novo biomaterial a base de cimento de aluminato de cálcio (CAC) tem sido estudado^(1,2) visando preservar as propriedades positivas e aplicações clínicas dos materiais correntes nas áreas de endodontia permitindo que suas aplicações

possam ser estendidas, superando as desvantagens apresentadas por esses materiais.

O cimento de aluminato de cálcio é composto principalmente pelas fases $\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$ (CA) e dialuminato de cálcio ($\text{CaO} \cdot 2\text{Al}_2\text{O}_3 = \text{CA}_2$) as quais são responsáveis pelo seu processo de endurecimento hidráulico⁽³⁾. A dissolução dessas fases em contato com a água promove a liberação dos íons Ca^{2+} , $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ e OH^- , o que é seguido pela precipitação de hidratos de aluminato de cálcio ($\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e hidróxido de alumínio (AH) devido a saturação da solução⁽⁴⁾.

Algumas características que indicam vantagens da aplicação do CAC na área da endodontia são: a sua coloração branca, o desenvolvimento de pega hidráulica não necessitando de campo seco para sua aplicação, baixa temperatura durante a pega e um tempo de reação que pode ser controlado pela adição de aditivos específicos. Além disso, os estudos envolvendo o desenvolvimento da composição do CAC para endodontia tem resultado em melhor fluidez, melhores condições de trabalhabilidade, maior resistência mecânica e reduzida porosidade, quando comparado ao MTA⁽²⁾.

Entretanto, outra propriedade relevante do material diz respeito a sua bioatividade. A bioatividade de um material se refere a sua capacidade de desenvolver uma ligação estável com tecidos vivos via a deposição de hidroxiapatita (HA)⁽⁵⁾. Materiais que exibem esta propriedade podem ser usados para reparar doenças ou danos no tecido ósseo e podem permanecer *in situ* indefinidamente. Uma indicação da bioatividade pode ser obtida pela formação de uma camada de HA na superfície de um substrato em contato com solução de fluido corporal simulado (SBF)⁽⁶⁾.

Dessa forma, neste trabalho amostras de cimento endodôntico a base de aluminato de cálcio foram colocadas em contato com diferentes soluções SBF (Kokubo e Rigo)^(7,8) e suas superfícies foram posteriormente avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X a fim de avaliar as possíveis interações e identificar as fases formadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O cimento hidráulico selecionado foi o cimento de aluminato de cálcio (Secar 71, Kerneos, França) com 68,5% Al_2O_3 e 29,5% CaO . A preparação do cimento de aluminato de cálcio (CAC) endodôntico foi realizada pela adição dos aditivos

apropriados ao cimento aluminoso comercial seguido pela homogeneização em moinho de bolas durante uma hora. Os aditivos usados foram: (a) um dispersante polimérico da família poliglicol (Bayer, 0,6%-p), (b) um aditivo para induzir plasticidade ao cimento (CaCl_2 , Labsynth, 2,8%-p), (c) um aditivo para fornecer radiopacidade ao cimento (ZnO , J.T. Baker, 25%-p) e (d) uma mistura de aditivos para promover a aceleração da pega constituída por $\text{Li}_2\text{CO}_3:\text{CaO}$ numa razão 1:1 (Synth, 0,4%-p). Os teores de aditivos (%-p) são em relação a massa de cimento.

Suspensões aquosas de CAC endodôntico contendo 75%-p de sólidos foram preparadas usando um misturador mecânico (Ética) e usadas para preparar amostras cilíndricas (10 mm de diâmetro x 5 mm de altura, Figura 1) as quais foram mantidas em estufa a 37°C durante 24 horas em ambiente saturado. Após este tempo, as amostras foram desmoldadas e mantidas a 37°C em ambiente saturado durante 7 dias. Após esse período foram colocadas em acetona para parada da reação de hidratação e usadas para avaliação do pH e solubilização de íons (condutividade iônica).



Figura 1: Amostras produzidas a partir da moldagem de suspensões de fases de cimento de aluminato de cálcio.

Os ensaios consistiram em medidas de pH e condutividade iônica em 50 ml de diferentes soluções simuladoras de fluido corporal (SBF) em contato com as amostras de CAC endodôntico, em função do tempo (até 21 dias). Foram utilizados um equipamento medidor de pH e um condutímetro, ambos com sensor de temperatura individual (MA 522/E e MA 521/E, Marconi).

A preparação das soluções de fluido corporal simulada (SBF) seguiu procedimentos descritos na literatura por Kokubo e Rigo^(7,8), como apresentado na Tabela 1. As soluções de SBF foram preparadas utilizando-se uma quantidade dos reagentes em uma proporção 1,5 vezes superior (SBF 1,5) a concentração de íons

(mM) inorgânicos presentes no plasma humano a fim de acelerar a formação de apatita.

Tabela 1: Reagentes usados na preparação de um litro de solução de fluido corporal simulado de acordo com Kokubo e Rigo.

Reagente	Ordem	SBF 1,5 Kokubo	Ordem	SBF 1,5 Rigo
água	#0	750 ml	#0	400 ml
NaCl	#1	11.994 g	#1	11.992 g
NaHCO ₃	#2	0.525 g	#4	0.529 g
KCl	#3	0.336 g	#2	0.335 g
K ₂ HPO ₄	#4	0.288 g	#3	0.261 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	#5	0.458 g	#8	0.458 g
HCl 1M	#6	60 ml		
HCl 0.1M			#6	15 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	#7	0.507 g	#7	0.551 g
Na ₂ SO ₄	#8	0.107 g	#5	0.107 g
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	#9	9.086 g		
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂ 0.05M			#9	Teor necessário para ajuste pH= 7.25
HCl 1M	#10	Teor necessário para ajuste pH= 7.25		
HCl 0.1M			#10	Teor necessário para ajuste pH= 7.25

As pastilhas preparadas como descrito acima também foram usadas nos ensaios de bioatividade. Esses ensaios consistiram em colocar as pastilhas em contato com as soluções de fluido corporal simulado (SBF) mantendo-se uma razão área superficial/volume de 0,1 cm⁻¹, durante 7 dias sob agitação a 37°C usando um shaker MA420 (Marconi). Após esse período, as amostras foram levemente lavadas com água para remover a solução e posteriormente secas à temperatura ambiente. A superfície das amostras antes e após o tratamento com as soluções SBF foi caracterizada usando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV, EVO MA10 Zeiss) e microanálise de raios X (EDS) a fim de avaliar a interação do material com as soluções SBF. As amostras também foram analisadas por difração de raios X em um difratômetro, modelo XRD-6000 da Shimadzu e radiação Cu-K α (λ = 1,54439 Å) para a identificação das fases formadas na superfície das amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Medidas de pH e condutividade iônica em função do tempo para soluções SBF em contato com amostras endurecidas de CAC endodôntico são apresentadas na Figura 2. Na presença de SBF Kokubo a presença das amostras praticamente não promoveu alteração no pH da solução mantendo-se em 7,5 para todo o intervalo de tempo medido. Por outro lado, para a solução SBF Rigo foi observado aumento de pH atingindo pH=9 após aproximadamente seis dias de contato. As medidas de condutividade mostraram comportamento contrário com maior aumento sendo verificado para solução SBF Kokubo.

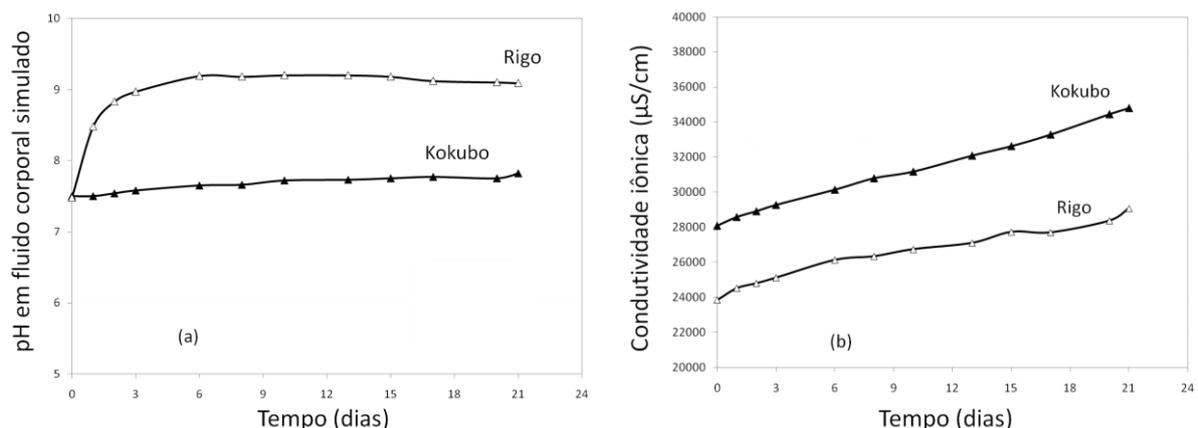


Figura 2: (a) pH e (b) condutividade iônica em função do tempo para soluções SBF (simulated body fluid) em contato com amostras endurecidas de CAC endodôntico.

Espectros EDS da superfície das amostras de CAC endodôntico antes e após tratamentos com as soluções SBF são apresentados na Figura 3. Estes ensaios confirmam a presença dos principais elementos constituintes do CAC endodôntico antes do tratamento: alumínio, oxigênio, cálcio e zinco. Após imersão por sete dias em SBF, foi identificado fósforo nas amostras principalmente em SBF Rigo.

Análises de MEV das amostras de CAC endodôntico endurecidas após imersão por sete dias em soluções SBF Kokubo ou Rigo são apresentadas nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Essas análises confirmam que a presença de cálcio e fósforo ocorre principalmente na presença de SBF Rigo. A presença desses elementos indica a formação de fases de fosfato de cálcio na superfície das amostras.

Análises da superfície de amostras de CAC endodôntico por difração de raios X antes e após tratamentos nas soluções SBF são apresentadas na Figura 6. Nas amostras tratadas com solução SBF Kokubo não foram identificadas fases de fosfato

de cálcio. Por outro lado, após imersão em SBF Rigo foi identificada a presença de hidroxiapatita $[Ca_5(PO_4)_3OH]$.

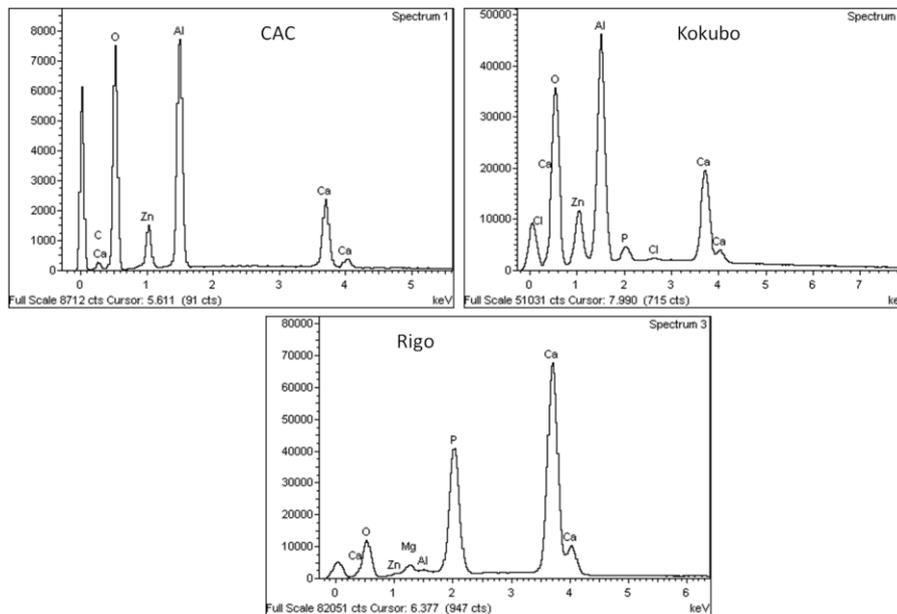


Figura 3: Espectros de microanálise de raios X (EDS) das amostras de CAC endodôntico antes do tratamento (spectrum 1) ou após tratamento nas soluções SBF preparadas de acordo com Kokubo (spectrum 2) e Rigo (spectrum 3).

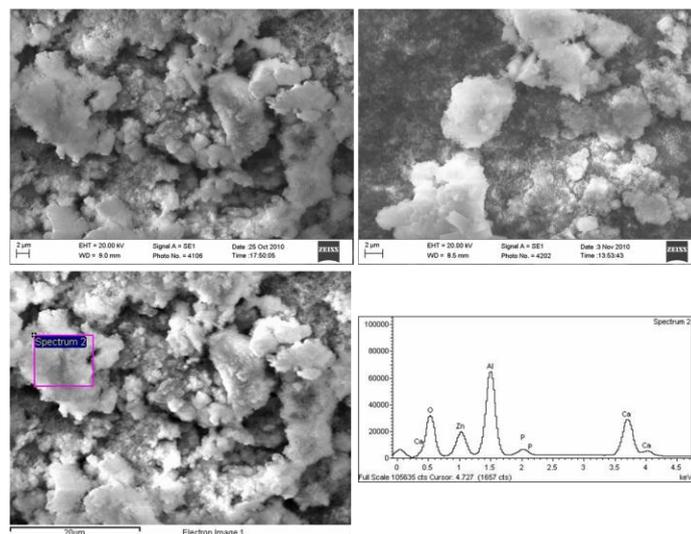


Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura e espectro EDS para a superfície de CAC endodôntico após 7 dias de imersão em solução SBF preparada de acordo com Kokubo.

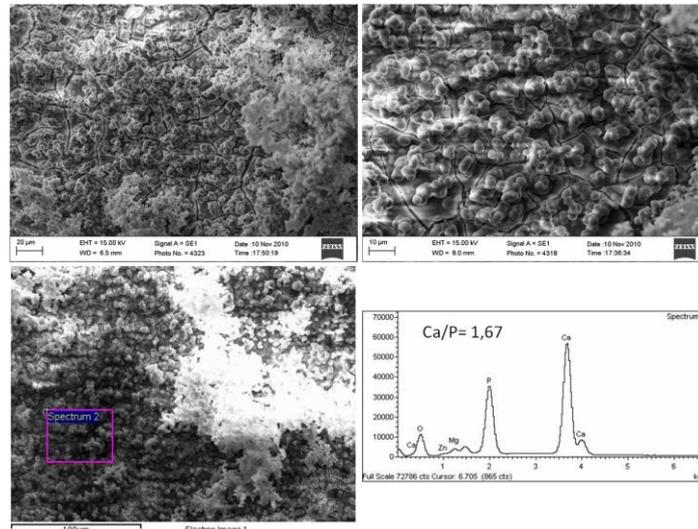


Figura 5: Microscopia eletrônica de varredura e espectro EDS para a superfície de CAC endodôntico após 7 dias de imersão em solução SBF preparada de acordo com Rigo.

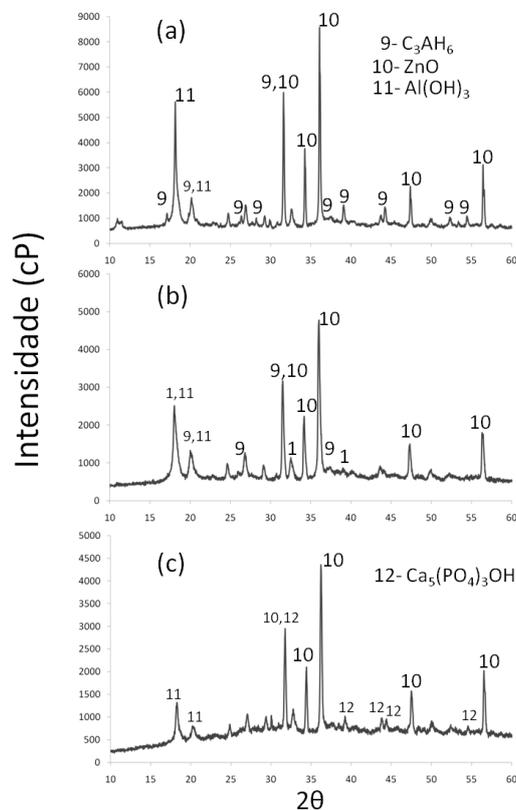
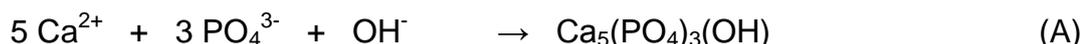


Figura 6: Difratogramas de raios X para CAC endodôntico (a) antes da imersão em SBF, (b) após sete dias em SBF Kokubo e (c) após sete dias em SBF Rigo.

De acordo com a literatura⁽⁹⁾, o cimento de aluminato de cálcio, tomando como exemplo a fase CA, se dissolve em meio aquoso gerando íons Ca^{2+} , $Al(OH)_4^-$ e OH^-

aumentando o pH ao redor do material. O CA endurecido em um ambiente úmido é formado por hidratos de aluminato de cálcio (C_3AH_6) e $Al(OH)_3$. Entretanto, na presença de fluidos corpóreos contendo outros íons como PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} e CO_3^{2-} , a composição dos produtos pelo menos na superfície é diferente.

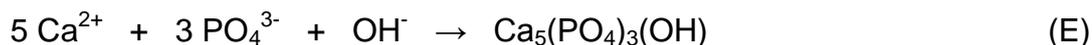
O teor de fosfato em fluidos corpóreos esta presente como componentes em equilíbrio no sistema H_3PO_4 , significando que em pH neutro, o HPO_4^{2-} é o íon dominante e que o grupo PO_4^{3-} é dominante em pH maior que 12,3. Isso não significa que o PO_4^{3-} não esta presente em pH neutro mas que sua quantidade é pequena. A precipitação de apatita desloca o equilíbrio para mais PO_4^{3-} (10):



Hidroxiapatita (HA) tem um pK_s de 58 o que resulta numa solubilidade dos íons individuais de 300 nM em água pura. A solubilidade dos íons cálcio esta abaixo 10^{-5} em pH de aproximadamente 8,5 sugerindo que a apatita pode precipitar até mesmo em fluidos onde a concentração de fosfato é muito baixa a medida que íons cálcio estão presentes e o pH é aumentado. Quando CA reage fornece ambos Ca^{2+} e um alto pH. Além disso, tem sido sugerido que as seguintes reações ocorrem na presença de um acceptor de prótons(10,11):



Esta reação pode ser vista como um mecanismo de defesa onde o corpo neutraliza o pH básico por meio da produção de HA. A introdução de CA hidratado em tal sistema irá então promover a seguinte cadeia de reações:



A dissolução dos hidratos de aluminato de cálcio é a principal responsável pela liberação de íons, uma vez que o hidróxido de alumínio é insolúvel em água. A solubilização de íons OH^- a partir das pastilhas é responsável pelo aumento do pH do meio enquanto a liberação de íons Ca^{2+} é responsável pelo aumento da condutividade iônica.

O CAC apresentou a capacidade de alcalinizar o meio principalmente em SBF Rigo (Figura 2). O nível de alcalinização do meio em contato com um material determina a sua atividade antibacteriana. No caso da odontologia a reincidência de cáries é considerada o principal motivo que leva uma restauração a falhar. Deste modo, o emprego de agentes de cimentação que possuam propriedades antibacterianas é de considerável importância clínica⁽¹²⁾.

Dessa forma, o CAC endurecido em contato com fluidos corpóreos promove a precipitação de apatita desde que a sua dissolução promova aumento do pH (liberação de íons OH^-). Essa condição é verificada em SBF Rigo e de fato as análises de MEV e EDS (Figuras 4 e 5) indicaram a formação de fases de fosfato de cálcio, a qual foi identificada por DRX como hidroxiapatita (Figura 6).

As soluções SBF usadas neste trabalho apresentam concentração de íons inorgânicos similares a do fluido extracelular humano (plasma humano) a fim de reproduzir a formação de apatita sobre materiais bioativos in vitro. SBF é uma solução metaestável contendo íons cálcio e fósforo já supersaturados com relação a apatita^(7,8).

A camada de HA superficial formada é similar em estrutura aos componentes minerais do osso e fornece uma ancoragem e condições para a proliferação de novas células formadoras de osso⁽¹³⁾. Um material com uma camada de apatita sobre a sua superfície próxima a tecidos calcificados como dentes e osso forma uma ligação química e integração biológica com eles⁽¹⁴⁾. Assim, esses materiais podem restaurar os dentes mais próximo ao seu estado original comparado a outros materiais restauradores como amálgama.

A precipitação de hidroxiapatita na superfície de um material em contato com SBF in vitro dá uma indicação sobre a bioatividade do material^(5,6). Além disso, a incorporação dos íons Ca^{2+} e OH^- resultantes da dissolução dos hidratos de CAC na estrutura da hidroxiapatita inibe o aumento da condutividade iônica.

Os íons OH^- liberados do CAC endurecido são parcialmente tamponados pelo líquido sobrenadante e resultam em um aumento moderado no pH. O aumento no pH e na concentração iônica acentua a supersaturação da solução SBF com relação a hidroxiapatita promovendo a sua precipitação⁽¹³⁾. Assim, esse mecanismo é provavelmente o responsável pela formação de uma camada de fosfato de cálcio na superfície das amostras após imersão em SBF Rigo. Por outro lado, a liberação de íons não é suficiente para acentuar a supersaturação nas soluções SBF Kokubo e a formação de fosfato de cálcio não foi verificada. Como apresentado na Figura 2, a

liberação de íons OH^- não foi suficiente para aumentar o pH nas soluções SBF Kokubo sendo verificado que o pH é mantido aproximadamente constante em 7,5 em todo o intervalo de tempo medido.

A principal diferença na preparação das soluções consiste no teor de tampão usado. De acordo com Rigo, o tampão tris é adicionado apenas em uma quantidade apropriada para ajuste do pH em 7,25 enquanto em SBF Kokubo um teor significativamente superior foi usado. Isso poderia explicar o aumento no pH verificado em SBF Rigo o que promoveu a supersaturação da solução e a formação de fosfato de cálcio na superfície das amostras.

Resultados de DRX confirmaram que CAC endodôntico após a hidratação é composto por hidrato de aluminato de cálcio ($\text{C}_3\text{AH}_6 = 3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e hidróxido de alumínio. Picos de óxido de zinco (ZnO) adicionado para fornecer radiopacidade ao material também foram identificados.

Após a imersão em SBF Kokubo não foram identificadas fases de fosfato de cálcio. Por outro lado, após imersão em SBF Rigo, hidroxiapatita estequiométrica [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$] foi obtida. Hidroxiapatita é o constituinte mineral natural encontrado nos ossos, representando 30-70% da massa de ossos e dentes. As análises de MEV revelaram que a fase de fosfato de cálcio obtida apresenta morfologia esférica característica de HA estequiométrica (Figura 5) com uma razão Ca/P de 1,67 e tamanhos homogêneos.

CONCLUSÕES

Esta pesquisa tem sido baseada no fato de que quando exposto a soluções de fluido corporal simulado (SBF) *in vitro*, uma camada de fosfato de cálcio é precipitada na superfície de materiais bioativos dentro de 7 dias de contato. Esta camada fornece uma ancoragem e condições para a proliferação de novas células formadoras de osso *in vivo*.

Este comportamento foi avaliado para o CAC endodôntico após imersão em solução SBF preparadas de acordo com Kokubo e Rigo. O material apresentou maior capacidade de alcalinizar o meio em SBF Rigo. Este comportamento acentua a supersaturação da solução SBF promovendo a precipitação de uma camada superficial com morfologia esférica característica de HA estequiométrica. Entretanto, na solução SBF Kokubo o teor de tampão existente não permitiu aumento do pH inibindo a formação de fases de fosfato.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- [1] V. C. Pandolfelli, I. R. Oliveira, H. L. Rossetto, M. Jacobovitz, Composição a base de cimento aluminoso para aplicações em endodontia e produto cimentício obtido. Registro de patente INPI 0704502-6. Universidade Federal de São Carlos, (2007).
- [2] I. R. de Oliveira, V. C. Pandolfelli, M. Jacobovitz, Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. *International Endodontic Journal* 43 (2010) 1069-1076.
- [3] K. M. Parker, J. H. Sharp, Refractory calcium aluminate cements. *British Ceramic Transitions Journal* 81 (1982) 35-42.
- [4] C. Alt, L. Wong, C. Parr, Measuring castable rheology by exothermic profile. *Refractories Applications and News* 8 (2003) 15-8.
- [5] B. Czarnecka, N. J. Coleman, H. Shaw, J. W. Nicholson, The use of mineral trioxide aggregate on endodontics – Status report. *Dental and Medical Problems* 45 (2008) 5-11.
- [6] N. J. Coleman, J. W. Nicholson, K. Awosanya, A preliminary investigation of the in vitro bioactivity of white Portland cement. *Cement and Concrete Research* 37 (2007) 1518-1523.
- [7] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27 (2006) 2907-2915.
- [8] E. C. S. Rigo, A. O. Boschi, M. Yoshimoto, Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. *Materials Science and Engineering* 24 (2004) 647-651.
- [9] S. A. Rodger, D. D. Double, The chemistry of hydration of high alumina cement in the presence of accelerating and retarding admixtures. *Cement and Concrete Research* 14 (1984) 73-82.
- [10] T. S. B. Narasaraju, D. E. Phebe, Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite. *Journal of Materials Science* 31 (1996) 1-21.
- [11] H. M. Kim, T. Himeno, T. Kokubo, T. Nakamura, Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid. *Biomaterials* 26 (2005) 4366-4373.

[12] R. L. Oréfice, M. M. Pereira, H. S. Mansur, Biomateriais: Fundamentos e Aplicações, Editora, Cultura Médica, Rio de Janeiro, Brasil (2006).

[13] N. J. Coleman, J. W. Nicholson, K. Awosanya, A preliminary investigation of the *in vitro* bioactivity of white Portland cement. Cement and Concrete Research 37 (2007) 1518-1523.

[14] N. K. Sarkar, R. Caicedo, P. Ritwik, R. Moiseyeva, I. Kawashima, Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. JOE 31 (2005) 97-100.

EVALUATION OF BIOACTIVITY IN VITRO OF ENDODONTIC CALCIUM ALUMINATE CEMENT

ABSTRACT

Bioactivity is referred to as the capacity of a material to develop a stable bond with living tissue via the deposition of hydroxyapatite. Materials which exhibit this property can be used to repair diseased or damaged bone tissue and can be designed to remain *in situ* indefinitely. An indication of bioactivity can be obtained by the formation of a hydroxyapatite layer on the surface of a substrate in simulated body fluids (SBF) *in vitro*. Therefore, set samples of calcium aluminate endodontic cement were maintained in contact with SBF solutions (Kokubo and Rigo) and their surfaces were later evaluated by means of SEM, EDX and DRX. Measurements of pH and ionic conductivity were also carried out for SBF solutions in contact with set samples of endodontic cement. The ideal conditions of precipitation were obtained in SBF Rigo been observed a surface layer with spherical morphology characteristic of stoichiometric hydroxyapatite.

Key-words: cement, calcium aluminate, pH, ionic conductivity, bioactivity.