

DEPOSIÇÃO DE HIDROXIAPATITA SOBRE MATERIAL A BASE DE ALUMINATO DE CÁLCIO E SUA ATIVIDADE BACTERICIDA EM FUNÇÃO DA ADIÇÃO DE PRATA

R. M. Parreira, T. L. Andrade, L. Y. Cho, I. R. Oliveira
Universidade do Vale do Paraíba – Univap
Av. Shishima Hifumi 2911, São José dos Campos – SP, 12244-000
renatamparreira@bol.com.br

RESUMO

*A hidroxiapatita, por ser uma fase bioativa, vem sendo utilizada para o recobrimento de materiais visando melhorar a sua compatibilidade com sistemas biológicos. Neste trabalho, a deposição de hidroxiapatita sobre a superfície de material a base de cimento de aluminato de cálcio (CAC) foi avaliada usando o método biomimético. Pastilhas de CAC (20 mm de diâmetro x 4 mm de altura) foram moldadas, contendo diferentes teores de prata. As pastilhas foram mantidas em contato com solução de fluido corporal simulado (SBF) durante 7 dias. Para o teste bactericida foi utilizado o método de difusão em Agar no qual foram adicionadas pastilhas de CAC com diferentes teores de prata e medidos os halos de inibição de crescimento bacteriano. O aumento do teor de prata não influenciou na formação do teor de Ca e P na superfície do material caracterizado por meio da técnica MEV-EDS. O material proporcionou efeito bactericida para os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.*

Palavras-chave: aluminato de cálcio, prata, hidroxiapatita, bioatividade, atividade bactericida.

INTRODUÇÃO

Algumas características que indicam vantagens da aplicação do cimento de aluminato de cálcio (CAC) nas áreas da endodontia e ortopedia 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 material mais usado (MTA)^(1,2). Entretanto, poucos estudos têm sido encontrados na literatura sobre métodos para aumentar a sua biocompatibilidade assim como sobre sua propriedade bactericida.

Com relação à biocompatibilidade, mesmo com o relativo sucesso de alguns materiais sintéticos como titânio, alumina, zircônia, processos físicos e químicos vem sendo testados visando modificar a superfície desses materiais a fim de possibilitar a deposição de materiais similares ao osso como a hidroxiapatita (HA) e assim favorecer a osseointegração⁽³⁾.

A HA é um fosfato de cálcio hidratado $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, presente em cerca de 95% da fase mineral de dentes e ossos humanos. O uso da HA em recobrimentos tornou-se comum, pois se trata de uma fase bioativa a qual promove uma ligação estável com os tecidos vivos melhorando a compatibilidade dos materiais sintéticos com sistemas biológicos⁽⁴⁾.

Dentre os vários processos físicos e químicos utilizados para obtenção de recobrimento de HA destaca-se o método biomimético, pois recobre superfícies complexas, em condições ambientes⁽⁵⁾. Esse método consiste em colocar o substrato a ser recoberto em uma solução sintética simuladora do fluido corporal (SBF) cuja composição iônica é semelhante ao plasma sanguíneo, em temperatura de 37°C. Entre as principais vantagens apresentadas por esse método pode-se destacar a possibilidade de controlar a espessura da camada, o tamanho de grão e a diversidade de formas cristalinas, além de permitir o recobrimento de materiais com geometria complexa sejam metálicos ou cerâmicos⁽⁶⁾.

Com relação à propriedade bactericida é reconhecido que o sucesso de um material biocompatível depende da sua capacidade de evitar contaminação durante a fase de manipulação assim como de inibir o crescimento de microrganismos. A infecção por bactéria começa com a adesão da bactéria seguido da colonização das mesmas^(7,8,9). Por isso, é importante inibir a adesão de bactérias na superfície do material por meio da presença de aditivos que apresentem ação antimicrobiana como a prata (Ag)^(10,11).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estudar a eficiência do método biomimético quanto à deposição de fases de fosfato de cálcio sobre a superfície de

material a base de cimento de aluminato de cálcio (CAC) variando-se a quantidade de Ag. Também, avaliar *in vitro* a propriedade bactericida de material a base de cimento de aluminato de cálcio (CAC) na presença de Ag, frente a diferentes microrganismos por meio de testes de difusão do microrganismo em Agar.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material utilizado foi o cimento de aluminato de cálcio (CAC, Kerneos) o qual foi preparado pela adição de alguns aditivos: dispersante poliglicol (Bayer, 0,6%-p), plastificante (Labsynth, 2,8%-p) e prata (MH Nano), com teores de 0, 1, 2, 4 e 6%-p. A prata utilizada esta na sua forma pura com partícula em torno de 700 nm.

Suspensões de CAC foram preparadas contendo 77%-p de sólidos e vertidas em moldes (20 mm de diâmetro por 4 mm de altura), sendo preparadas amostras para cada teor de Ag. As amostras 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 sete dias. Após esse período, foram imersas em acetona por 1 hora e secas a temperatura ambiente, onde posteriormente foram esterilizadas utilizando uma câmara de fluxo (BioFlux II) com radiação ultravioleta durante 10 horas. Para avaliação quanto o método biomimético as amostras foram colocadas em contato com uma solução simuladora de fluido corporal (SBF), mantendo-se uma razão área superficial/volume de 0,1 cm⁻¹, durante 7 dias sob agitação (175 rpm) 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⁽¹²⁾.

A preparação da solução de fluido corporal simulado seguiu procedimentos de preparação descritos na literatura por Rigo⁽¹³⁾ como apresentado na Tabela 1, utilizando uma quantidade dos reagentes 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: Preparação de solução de fluido corporal simulado de acordo com Rigo⁽¹³⁾.

Reagente	Ordem	SBF 1,5 Rigo
Água	#0	400 ml
NaCl	#1	11.992 g
KCl	#2	0.529 g

K ₂ HPO ₄	#3	0.335 g
NaHCO ₃	#4	0.261 g
Na ₂ SO ₄	#5	0.458 g
HCl 0.1M	#6	15 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	#7	0.551 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	#8	0.107 g
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂ 0.05M	#9	Teor necessário para ajuste pH= 7.25
HCl 0.1M	#10	Teor necessário para ajuste pH= 7.25

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.

Para avaliação da propriedade bactericida, suspensões de CAC foram preparadas contendo 88%-p de sólidos e vertidas em moldes (10 mm de diâmetro por 2 mm de altura), sendo preparadas amostras para cada teor de Ag. Os microrganismos utilizados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Preparação das suspensões de microrganismo contendo 10⁶ células/ml ou 10⁸ células/ml (*P. aeruginosa*).

Microrganismo	Procedência	Turbidez da cultura em caldo	
		Densidade óptica	λ (nm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	0.374	490
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	0.090	630
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	0.324	590
<i>Candida albicans</i>	ATCC 18804	0.284	530
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 35688	0.620	398
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 4083	0.298	760

As cepas bacterianas foram cultivadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI - Himedia, Mumbai, Índia) e *C. albicans* em Sabouraud-dextrose (Himedia), por 24 h a 37°C, com condições de microaerofilia (5% de CO₂) para *S. mutans*. Após incubação, o inóculo foi padronizado em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e sua turbidez ajustada em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, Brasil), para densidade óptica (DO) adequada a cada microrganismo (Tabela 2), com desvio-padrão de 0.020, para obtenção de suspensão com 10⁶ células/ml. Para *P. aeruginosa* obteve-se uma suspensão de 10⁸ células/ml, seguindo de duas diluições decimais para obtenção de uma concentração final de 10⁶ células/ml. Em seguida, uma alíquota de 100 µl da suspensão padronizada de cada microrganismo foi semeada em ágar Mueller Hinton (Himedia) ou ágar Sabouraud-dextrose (Himedia), para *C. albicans*. Após 5 minutos, foram aplicadas sobre o inóculo uma pastilha de cada teor de prata (Figura 1). Posteriormente, as placas foram levadas para incubação a 37°C por 24 h, com 5% de CO₂ para *S. mutans*. O experimento foi realizado em triplicata. Por fim, o diâmetro total (mm) dos halos de inibição de crescimento foi mensurado.



Figura 1: Fotos das placas de (a) ágar Mueller Hinton (Himedia) ou (b) ágar Sabouraud-dextrose (Himedia), para *C. albicans*; contendo as pastilhas de cimento sem Ag (s) e com diferentes teores de prata (1, 2, 4 e 6%-p).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de CAC (Figura 2) e preparadas na presença de diferentes teores de prata apresentadas na Figura 3. Observa-se que o aumento do teor de prata não favorece uma maior deposição na superfície das amostras.

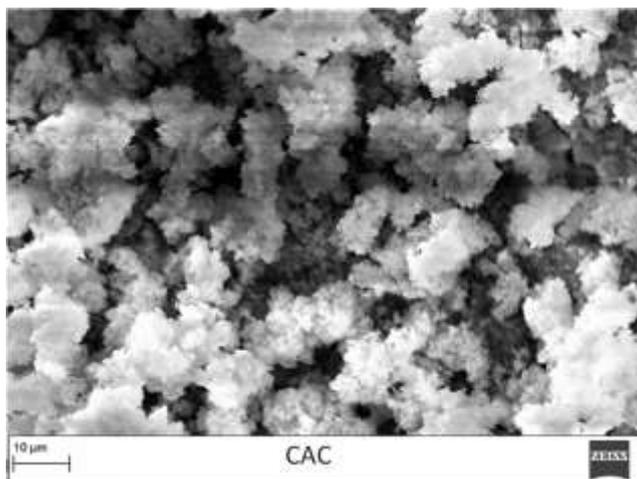


Figura 2: Micrografia eletrônica de varredura da amostra de CAC após imersão em SBF durante 7 dias.

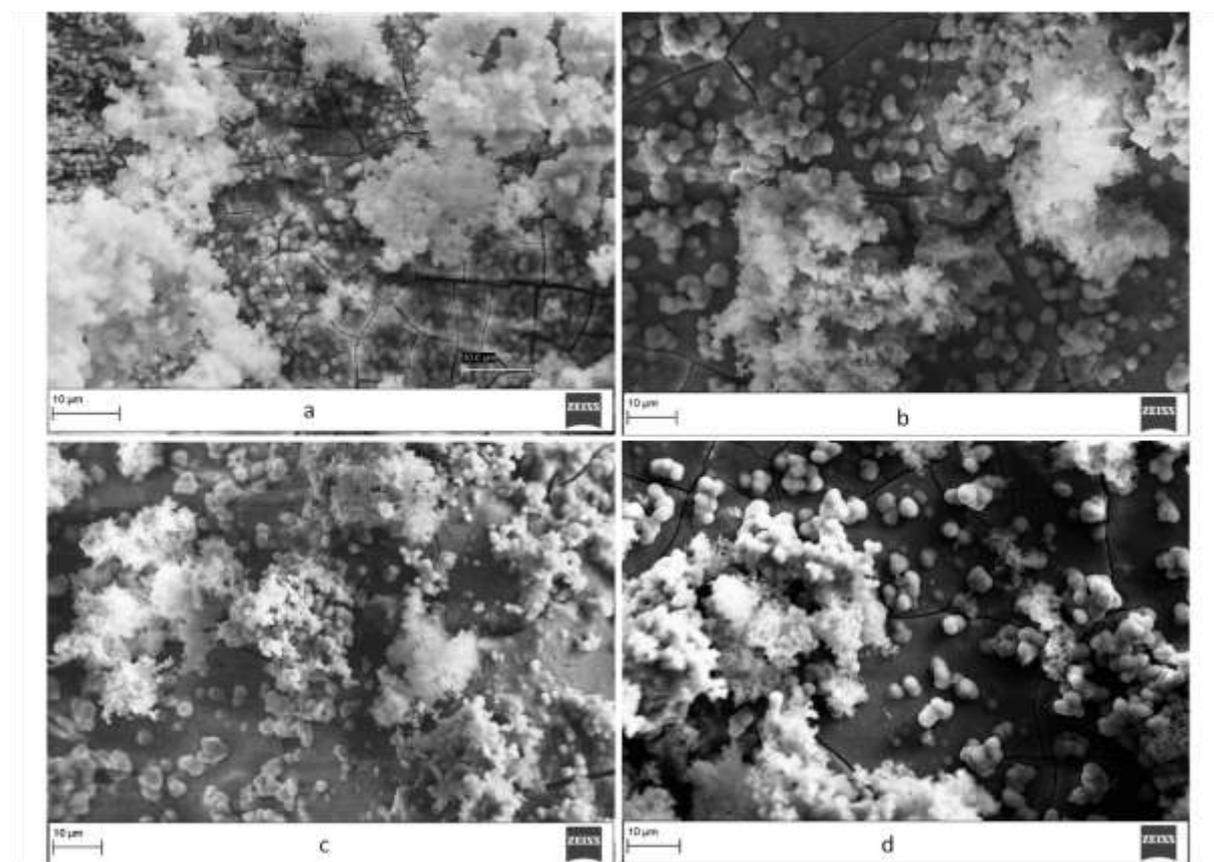


Figura 3: Micrografia eletrônica de varredura das amostras de CAC com adição de diferentes teores de prata após imersão em SBF durante 7 dias, (a) 1%-p (b) 2%-p (c) 4%-p (d) 6%-p.

Microanálises de raios X realizadas na superfície das amostras preparadas com diferentes teores de Ag (Tabela 3) mostram que o teor de prata não influenciou

na quantidade de fósforo quantificada. Cabe ressaltar, que à medida que ocorre a deposição de fases de fosfato na superfície das partículas, identificadas pela presença dos elementos Ca e P, um menor teor de Al é quantificado. Os principais constituintes do material avaliado são Al e Ca, assim para a amostra sem tratamento um maior teor de Al e menor teor de Ca são verificados.

Tabela 3: Resultados médios obtidos para as amostras de CAC preparadas na presença de diferentes teores de prata por meio de microanálise de raios X (EDS).

Amostra Ag (%-atômica)			
	Al	P	Ca
Sem tratamento	17.96	-	5.45
Tratamento SBF			
0%-p Ag	3.14	30.09	66.31
1%-p Ag	2.21	13.09	18.98
2%-p Ag	4.50	33.68	61.60
4%-p Ag	6.60	32.22	60.61
6%-p Ag	13.60	23.89	62.63

As análises de DRX (Figura 4) confirmaram a presença de diferentes fosfatos, e hidroxiapatita estequiométrica $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ na superfície das amostras.

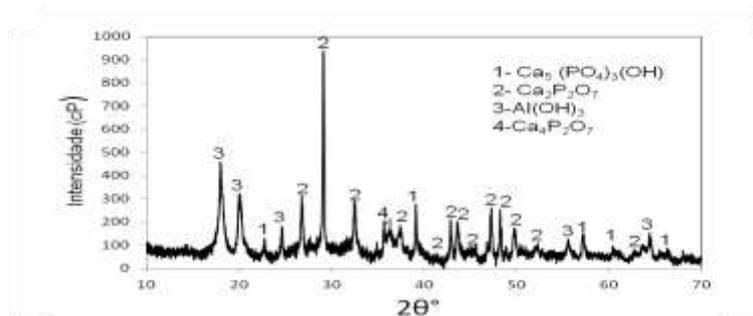


Figura 4: Difratograma da amostra de CAC após imersão em SBF durante 7 dias.

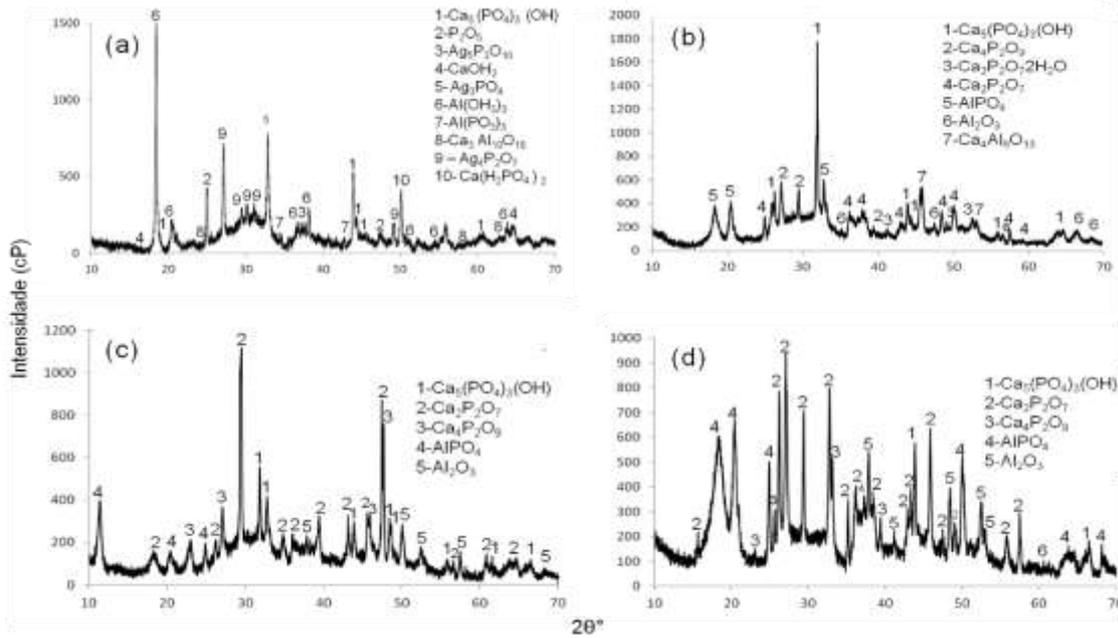


Figura 5: Difratomogramas das amostras de CAC após imersão em SBF durante 7 dias, preparadas na presença de diferentes teores de prata (a) 1%-p (b) 2%-p (c) 4%-p e (d) 6%-p.

Os resultados das medidas de halo de inibição de crescimento bacteriano são apresentados na Tabela 4 e Figura 6. O material proporcionou efeito bactericida para os microrganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Tabela 4: Valores médios e desvio-padrão (mm) dos halos de inibição formados em placa de cultura de microrganismos após contato de 24 horas com as pastilhas.

Microrganismo	0%-p Ag	1%-p Ag	2%-p Ag	4%-p Ag	6%-p Ag
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	14.33 ± 1.15	13.33 ± 1.53	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	3.33 ± 5.77	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-

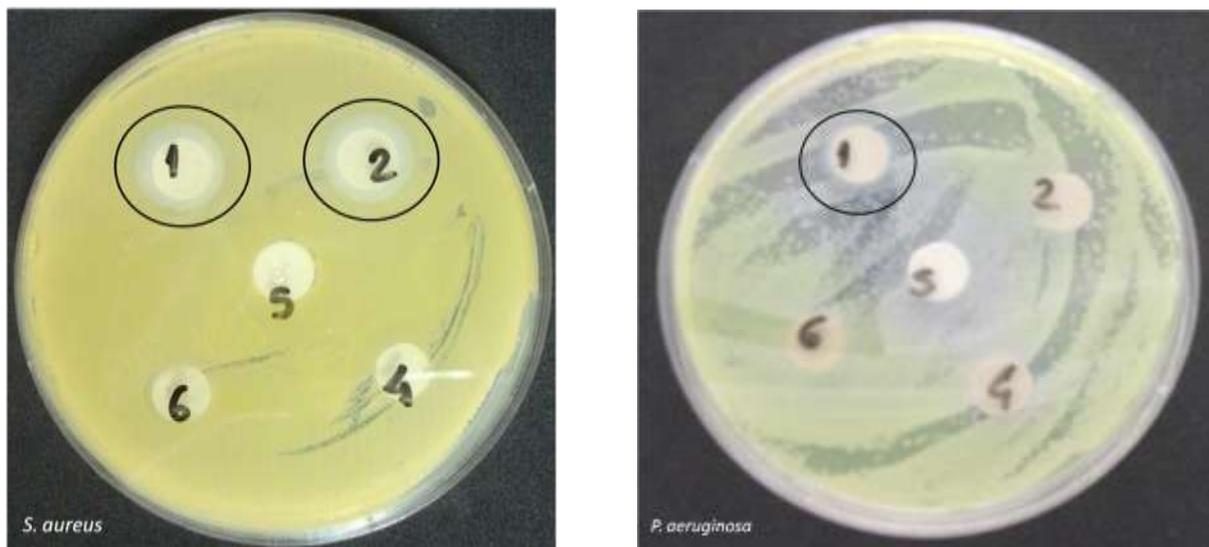


Figura 6: Fotos das placas de cultura de microrganismos após contato de 24 horas com as pastilhas. Destaque para os halos de inibição verificados para os microrganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

A prata tem sido descrita como oligodinâmico pela capacidade de exercer um efeito bactericida em concentrações mínimas⁽¹⁰⁾. Dentro de uma micro-visão da ação bactericida dos íons prata podem-se notar dois tipos de ações:

- a) devido à liberação do íon prata na água ou em ambiente úmido, ocorre a ação catalítica deste íon destruindo a membrana plasmática das células das bactérias, pela diferença de potencial (eletropotência) entre a parte interna e externa das células;
- b) outra ação do íon prata, no ambiente úmido (água ou ar), está em penetrar na membrana plasmática da célula bacteriana, destruindo seu citoplasma.

Nanopartículas de prata tem proporcionado ação sobre *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*^(14,15). Como as nanopartículas de prata possuem uma grande área de superfície disponível para a interação bacteriana elas exibem um mais forte efeito antibacteriano comparado aos íons micrométricos⁽¹¹⁾.

O poder antimicrobiano da prata tem sido relacionado aos seus variados mecanismos de ação como citados anteriormente. O mecanismo é sempre o mesmo, independente de sua forma de apresentação. No entanto, se estiver na forma elementar, a prata precisa sofrer um processo de oxidação a fim de que seja transformada em um composto de óxido de prata e íons de prata, que conferem o efeito antimicrobiano. Um dos benefícios da forma elementar é de poder

proporcionar um maior reservatório de prata disponível na cobertura, permitindo um potencial de liberação por um tempo ampliado^(16,17).

O efeito antimicrobiano produzido pela prata sobre os microrganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa* é de extrema importância para a saúde. O *S. aureus* produz um longo espectro de doenças desde lesões superficiais até severas infecções sistêmicas, no homem e outros animais. Esse microrganismo pode provocar doenças que vão desde uma simples infecção (espinhas e furúnculos) até infecções mais graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras⁽¹⁸⁾). A *P. aeruginosa* esta associada a uma variedade de infecções em indivíduos debilitados, é um dos principais agentes isolados em casos de infecção hospitalar além de causar infecções urinárias e respiratórias, pneumonias, meningites, endocardites e diversos outros tipos de infecção⁽¹⁹⁾.

CONCLUSÕES

O CAC em contato com a solução de fluido corporal simulado (SBF) durante o período de sete dias apresenta uma precipitação de fases de fosfato de cálcio sendo que o teor adicionado influencia na morfologia das fases. O material proporciona efeito antimicrobiano para os microrganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa*, importante uma vez que estes são causadores de doenças. A atividade antimicrobiana encontrada para esses microrganismos indica um efeito positivo para sua utilização.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro e as empresas Kerneos e MH Nano pelo fornecimento dos materiais.

REFERÊNCIAS

- (1) Pandolfelli V.C., Oliveira I.R., Rossetto H.L., Jacobovitz M. 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) Oliveira I.R., Pandolfelli V.C., Jacobovitz M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. *International Endodontic Journal* 43, 1069-1076, 2010.

- (3) Fernandes, B.G, Bioativação superficial do PEUAPM com hidroxiapatita (Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
- (4) Rigo, E.C.S.; Oliveira, L.C.; Santos, L.A.; Bosch, A.O.; Carrodegua, R.G., Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* 15, 21-29, 1999.
- (5) Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphate- based biocomposites and hybrid biomaterials. *J. Mater. Sci.* 44, 2343, 2009.
- (6) Klopčič, S. B., Kováčik, J., Kosmac, T. Apatite-forming ability of alumina and zirconia ceramics in a supersaturated Ca/P solution. *Biomolecular Engineering* 24, 467-471, 2007.
- (7) Zhou, H. Xu. L., Ogino, A. Nagatsu, M. Investigation into the antibacterial property for carbon films. *Diam. And Rel. Materials* 17, 1416-1419, 2008.
- (8) Kopper, P. M. P., Rosa, R. O., Figueiredo, J. A. P. P., Charles, C., Tartarotti, E. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de três cimentos endodônticos. *Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS*, v. 22, n. 56, abr./jun, 2007.
- (9) Dino, C. P., Telmo, S. A., Jorge, K. C. Estudo “in vitro” da ação antimicrobiana de agentes cimentantes utilizados em odontologia, sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. *R. Un. Alfenas, Alfenas*, 4:175-178, 1998.
- (10) Clement JL, Jarrett PS. Antibacterial silver. *Met Based Drugs*;1:467- 482, 1994.
- (11) Kvitek L, Panacek A, Soukupova J, Kolar M, Vecerova R, Pucek R, et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *J Phys Chem C*,112: 5825–5834, 2008.
- (12) Wang X., Sun H., Chang J. Characterization of $\text{Ca}_3\text{SiO}_5/\text{CaCl}_2$ composite cement for dental application. *Dental Materials* 24, 74-82, 2008.
- (13). Rigo E.C.S., Boschi A.O., Yoshimoto M., Allegrini S. Konig B., Carbonari M.J. Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. *Materials Science and Engineering* 24, 647-651, 2004.
- (14) Xu, X.H., Brownlow, W.J., Kyriacou, S.V., Wan, Q., Viola, J.J. Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry*. 42, 10400-13, 2004.
- (15) Gogoi, S.K., Gopinath, P., Paul, A., Ramesh, A., Ghosh, S.S., Chattopadhyay, A. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Lagmuir*. 22, 9322-8, 2006.

- (16) Hoffmann, S. Silver sulfadiazine: an antibacterial agent for topical use in burns. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 18:119-126, 1984.
- (17) Hugo, W. In: Russell, A., Hugo, W., Ayliffe, G., eds. *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization.* Blackwell Scientific. 2:3-6,1992.
- (18) Santos, A.L; Santos, O.D; Freitas, C.C; Ferreira, B.A.L; Afonso, I.L; Rodrigues, C.R; Castro, H.C. *Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar.* *Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial*, 43 (6): 413-423, 2007.
- (19) Arruda, E. A. G. *Infecção hospitalar por Pseudomonas aeruginosa multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP.* *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.31, n.5, p.503-504, 1998.

HYDROXYAPATITE DEPOSITION ON THE SURFACE OF CALCIUM ALUMINATE CEMENT AND ITS BACTERICIDAL ACTIVITY AS A FUNCTION OF SILVER CONTENT

Hydroxyapatite has the capacity to develop a stable bond with living tissue and has been used to cover material surfaces to improve their interaction with biological systems. In this work, the biomimetic method was used to cover the surface of a material based on calcium aluminate cement (CAC) with hydroxyapatite. Samples of CAC were prepared containing Ag powder (0, 1, 2, 4, and 6%-wt) and immersed in simulated body fluid (SBF) for 7 days. The characterization of deposited layer on the surface of the samples was evaluated by SEM, EDS, and XRD. Samples were also evaluated for their bactericide activity by means of agar diffusion test, in which the inhibition of bacterial growth was measured. The increase in silver content did not influence the Ca and P content on the surface of the material, which was verified by SEM-EDS technique. The material provided bactericidal activity only for the microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Key-words: calcium aluminate, silver, hydroxyapatite, bioactivity, bactericide activity.