

# ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL E MICROBIOLÓGICA DA ASSOCIAÇÃO DE CLOREXIDINA E HIDROXIAPATITA: POTENCIAL MATERIAL PARA TERAPIA DE DOENÇA PERIODONTAL.

---

Ultrastructural analysis of the association of chlorhexidine and hydroxyapatite: potential material for periodontal disease therapy.

## **Carlos Alberto Soriano de Souza**

Doutorando do Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química – UFRJ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Mestre em Ciências pelo Instituto de Microbiologia - UFRJ. Especialista em Endodontia pela FO-UFRJ.

## **Renata Martins do Souto**

Doutora em Ciências pelo Instituto de Microbiologia. Bolsista de Pós-doutorado do Instituto de Microbiologia - UFRJ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

## **Ana Paula Vieira Colombo**

Doutora em Medical Sciences in Oral Biology - Harvard School of Dental Medicine, Harvard University, Harvard, Estados Unidos. Professora Adjunta IV do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia - UFRJ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

## **Jose Mauro Granjeiro**

Doutor em Química pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil. Professor Adjunto III do Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFF, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

## **Alexandre Malta Rossi**

Doutor em Física pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Pesquisador Titular do Departamento de Física Aplicada, CBPF, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

## **Maria Helena Miguez Rocha Leão**

Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. Professora Associada 2 do Departamento de Engenharia Química, Escola de Química - UFRJ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

E-mail: mhr@eq.ufrj.br

Recebido em 18/09/2010

Aceito em 30/09/2010

---

## **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi realizar as avaliações ultra-estrutural e microbiológica de um biomaterial constituído de microesferas de hidroxiapatita associadas à clorexidina visando à aplicação no tratamento das periodontopatias. Foram desenvolvidos estudos sobre associação hidroxiapatita e clorexidina e feitas caracterizações físicas e morfológicas. Ensaio microbiológicos foram realizados para avaliação da capacidade de microesferas de hidroxiapatita contendo clorexidina de inibir o crescimento de *E. faecalis*. Os resultados demonstraram uma ligação estável entre hidroxiapatita e clorexidina sem prejudicar a estrutura cristalina da hidroxiapatita após a adsorção de clorexidina. A clorexidina presente na hidroxiapatita manteve atividade antimicrobiana inibindo o crescimento de *E. faecalis*. Os resultados obtidos sinalizam para a realização de testes in vivo e a aplicação do material obtido em estudos pré-clínicos.

**Palavras-chave:** clorexidina, hidroxiapatita, doença periodontal.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was the ultrastructural and microbiological evaluations of a biomaterial composed of hydroxyapatite microspheres associated with chlorhexidine designing their application in the treatment of periodontal diseases. Studies were conducted on

hydroxyapatite and chlorhexidine association and made physical and morphological characterizations. Microbiological tests were conducted to evaluate the ability of hydroxyapatite microspheres containing chlorhexidine to inhibit the proliferation of *E. faecalis*. The results demonstrated a stable bond between hydroxyapatite and chlorhexidine, with maintenance of the crystalline structure of hydroxyapatite after adsorption of chlorhexidine. Chlorhexidine present in hydroxyapatite maintained antimicrobial activity inhibiting the growth of *E. faecalis*. The results point out the in vivo testing and application of the material obtained in preclinical studies.

**Keywords:** chlorhexidine, hydroxyapatite, periodontal disease.

## INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus produtos exercem um papel fundamental na patogenia e na perpetuação da doença periodontal e alterações pulpares e periapicais (KAKEHASHI et al., 1965). Estas infecções são de natureza polimicrobiana havendo uma variação do grupo bacteriano predominante dependendo do tipo da doença (KOBAYASHI et al., 1990). Em função disso as terapias odontológicas têm como um dos seus principais objetivos a eliminação dos microrganismos presentes nos tecidos dentários e periodontais, o que é alcançado em grande parte pelo preparo químico-mecânico. Entretanto, resultados de estudos anteriores demonstraram que bactérias podem permanecer viáveis após os tratamentos clínicos convencionais, perpetuando as infecções (BYSTROM et al., 1985) e conseqüentemente acarretando insucesso das terapias. Com isto, a utilização de uma medicação tópica com ação antimicrobiana adjuvante tem sido indicada objetivando a eliminação destes microrganismos remanescentes, principalmente nos casos de necroses pulpares e periodontopatias graves.

Dentre inúmeros medicamentos aparece a clorexidina (CHX – fórmula molecular:  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ ), que é um agente antimicrobiano catiônico que vem sendo utilizado nos últimos 50 anos na clinica odontológica com sucesso, principalmente na formulação solúvel digluconato de CHX com ação inibitória contra fungos e uma grande variedade de bactérias orais Gram-positivo e Gram-negativo (GJERMO, 1974; EMILSON et al., 1977). Ainda que outros mecanismos tenham sido relatados, o conceito geral estabelecido sobre a ação sobre os microrganismos corresponde à interação de grupamentos positivos de CHX com a camada fosfolipídica da membrana citoplasmática dos microrganismos, com carga negativa, o que provoca desde a perda do controle osmótico e interferência nos processos metabólicos como a respiração e a biossíntese (ação bacteriostática), até a solubilização da membrana resultando na liberação dos componentes intracelulares

(ação bactericida) (GILBERT & MOORE, 2005).

CHX também foi utilizada em sistemas de liberação controlada. Addy & Langiroudi (1984) estudaram o efeito de um dispositivo de tiras de polimetilmetacrilato contendo 40% (m/m) de acetato de CHX em pacientes que apresentavam doença periodontal avançada observando resultados clínicos favoráveis. Anos depois foi desenvolvido um dispositivo retangular com área de 20 mm<sup>2</sup> e 0,35 mm de espessura para também ser aplicado em bolsas com profundidades maiores que 5 mm como adjuvante da terapia periodontal tradicional (Periochip™). Corresponde a uma matriz gelatinosa reabsorvível contendo 2,5 mg de CHX que após sua aplicação permanece por até 10 dias no sítio patológico (KILLOY, 1998). Apesar de resultados promissores iniciais, estudos subseqüentes foram contraditórios a respeito de sua eficácia (HEASMAN et al., 2001; DANESHMAND et al., 2002; ZAFIROPOULOSI et al., 2005).

Outro material extensamente estudado é a hidroxiapatita (HA - fórmula molecular  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ), uma biocerâmica extensivamente utilizada em enxertos ósseos e também como carreador de drogas em várias aplicações médicas (KRAJEWSKI et al., 2000) devido à sua semelhança química e estrutural com a fase mineral do tecido ósseo, sendo classificada como material bioativo e osteocondutor, capaz de favorecer a regeneração de tecidos ósseos (RIPAMONTI, 1996). Neste trabalho foi estudada a associação de CHX-HA projetando um biomaterial para o tratamento de infecções orais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparação de Hidroxiapatita

A HA foi sintetizada a partir de uma solução de fosfato de amônio dibásico,  $(NH_4)_2HPO_4$ , gotejada sobre uma solução de nitrato de cálcio,  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  0,2 M (fluxo de 4,5 mL/min), mantendo-se o pH 10-11 com hidróxido de amônio ( $NH_4OH$ ) concentrado, à temperatura de 90°C.

Após gotejamento a mistura permaneceu em digestão por 2 horas nas mesmas condições, sendo então filtrada em funil de Buckner e ressuspensa em água Milli-Q® (Millipore Corporate) por três vezes. O sólido obtido foi seco em estufa a 80°C por 24 horas.

### Produção de Microesferas de Hidroxiapatita e Adsorção de Clorexidina

Uma mistura de HA e alginato de sódio (Fluka Biochemika) foi suspensa em água MilliQ® e homogeneizada vigorosamente numa razão de 15:1. Em seguida foi realizada a extrusão da mistura através de agulhas BD Precision Glide® e gotejada numa solução de cloreto de cálcio 0,15 molar. As microesferas se formam instantaneamente ao entrar em contato com a solução de cloreto de cálcio. Após 24 horas na solução de CaCl<sub>2</sub>, as microesferas foram lavadas em água MilliQ e tratadas termicamente numa rampa de aquecimento lento até atingir 1100°C. As microesferas obtidas foram encubadas com digluconato de CHX 2% (Sigma-Aldrich) e mantidas em agitação moderada por 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata de testes e triplicata de amostras com temperatura controlada a 37°C e pH 7. Os valores de clorexidina adsorvida na HA foram determinados pela espectrofotometria de UV-Vis (UV-Vis Espectrofotômetro 2550 com o acessório da esfera integradora ISR-2200 Shimadzu Corp) operando no modo de refletância difusa.

### Caracterizações Físicas e Morfológicas

Os biomateriais obtidos foram submetidos à análise de difração de raios-X - DRX (X'Pert Pro X-Ray diffractometer) operando com radiação CuK $\alpha$  (1.5418 Å) a 40 kV de tensão e corrente de 40 mA. Os padrões de DRX foram obtidos no ângulo 2 $\theta$  em intervalos de 10 a 100° e passos de 0,05° e comparados com os padrões da ficha 9-432 do ICDD (International Centre for Diffraction Data) utilizando-se o programa PCPDF Win 2.1. As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas através do equipamento JSM-6460 LV (JEOL) operado a 15 kV.

### Ensaios Microbiológicos: Inibição de Crescimento de *E. faecalis*

Foram realizados ensaios de inibição do crescimento microbiano em placas. Para tal foram semeados inóculos padronizados pela turbidez a 10<sup>-2</sup> da escala 0,5 de McFarland ( $\approx 1,5 \times 10^6$  células/mL) em placas de Petri com

meio de cultura agar BHI - *brain heart infusion*, e então microesferas de HA e HA-CHX autoclavadas foram posicionadas. Os plaqueamentos foram realizados para obtenção de crescimento confluinte e observada a inibição de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Foram utilizados discos de papel impregnados com digluconato de CHX 2% como controle positivo. As placas foram encubadas a 37°C por 24 horas.

## RESULTADOS

Em função da técnica aplicada, foi possível o aperfeiçoamento da obtenção de microesferas de HA controlando as dimensões das partículas. Através da técnica de extrusão aplicada foram obtidas microesferas de diâmetros na faixa de 0,425 a 1,20 mm (Figura 1). Após tratadas termicamente foram selecionadas microesferas com diâmetros na faixa de 600 a 700  $\mu$ m para os ensaios microbiológicos (Figura 2).

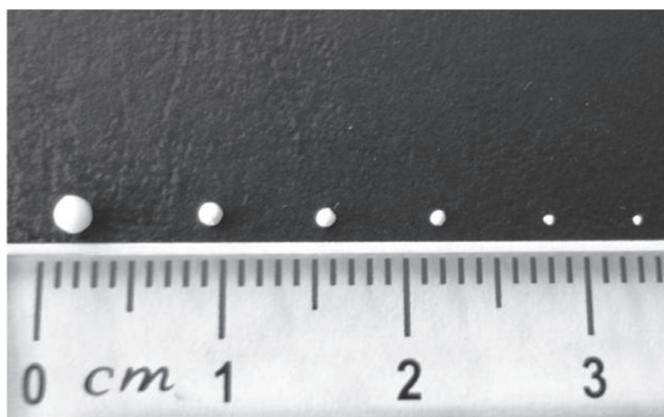


Figura 1. Microesferas de HA produzidas com diâmetro de 0,425 a 1,20 mm.

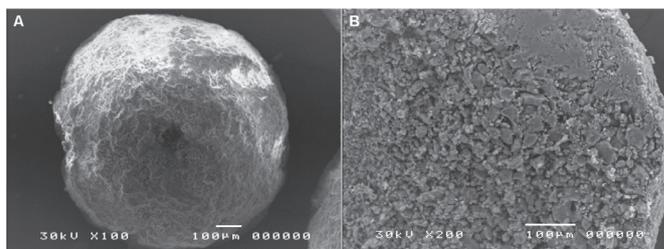


Figura 2. MEV de microesferas de HA selecionadas para os ensaios microbiológicos com diâmetro na faixa de 600 a 700  $\mu$ m. (A) aumento de 100x e corte transversal em (B), 200x.

Foi realizada a caracterização da HA após a adsorção de CHX pela difração do pó por raios-X (DRX). É possível observar a estrutura cristalina da HA-CHX no difratograma da Figura 3. Os principais picos referentes

aos planos cristalinos típicos da HA foram observados conforme ficha nº 09-0432 do JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

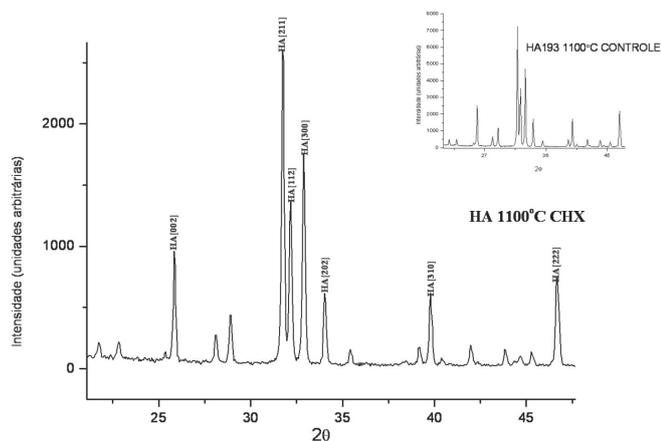


Figura 3. DRX HACHX e controle (canto superior direito) após ensaio de adsorção com uma solução de DGCHX 2% destacando os principais picos.

Os valores de adsorção foram de  $54 \pm 3.1$   $\mu\text{g}$  de CHX por mg de HA para as microesferas. Nos ensaios microbiológicos com as microesferas de HA adsorvidas com CHX foram observados halos de inibição do crescimento para todos os microrganismos testados. As médias do diâmetro dos halos de inibição de crescimento foram  $6,40 \pm 0,84$  mm para o *E. faecalis*. Não houve formação de halos de inibição nas microesferas de HA puras, controle negativo (Figura 4).

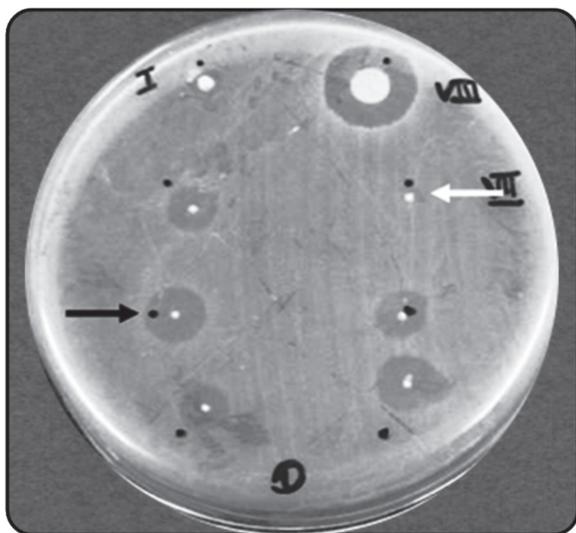


Figura 4. Fotografia dos testes de inibição de crescimento em placa de agar para *E. faecalis*. Seta preta indica microesfera HA-CHX enquanto a seta branca mostra HA controle. Discos de CHX controle positivo aparecem nos canto superior direito da placa.

## DISCUSSÃO

Na literatura, muitos estudos foram desenvolvidos para o entendimento da associação da HA do esmalte dentário e CHX em função de manchas nos dentes decorrentes do uso prolongado de anti-sépticos bucais contendo CHX (PRAYITNO & ADDY, 1979), porém poucas investigações foram conduzidas no desenvolvimento de um biomaterial que associasse as importantes características biológicas da HA e CHX para o de tratamentos de infecções relacionadas ao tecido ósseo.

Na ocorrência de lesões ósseas um dos maiores obstáculos na regeneração tecidual é a presença de microrganismos em tais sítios ou a contaminação bacteriana das áreas afetadas durante os procedimentos terapêuticos provenientes da atmosfera ambiente da sala de cirurgia, de materiais cirúrgicos, dos profissionais de saúde e bactérias residentes próprias do paciente (ZILBERMAN & ELSNER, 2008). Uma vez que a infecção se instala, um processo inflamatório é deflagrado em resposta, não possibilitando assim, a proliferação de células ósseas. Um biomaterial HA-CHX poderia associar as propriedades de regeneração óssea da biocerâmica com a atividade antimicrobiana do agente catiônico.

O desenvolvimento de um material formado pela associação HA-CHX foi baseado nas boas propriedades biológicas da HA e uma das primeiras avaliações realizadas foi a confirmação da manutenção da estrutura cristalina da HA nos ensaios de adsorção com CHX. Caso a interação com o antimicrobiano acarretasse uma decomposição ou a formação de outros tipos de fosfatos de cálcio implicaria num material com outras características biológicas daquelas atribuídas a HA, o que poderia gerar resultados desfavoráveis. Um dos parâmetros que pode ter favorecido a estabilidade da HA foi a manutenção do pH na faixa próxima do neutro durante os ensaios de adsorção.

Nos testes microbiológicos foram utilizadas microesferas de HA como carreadoras de CHX em função de perspectivas futuras de aplicações *in vivo*, pois estudos anteriores indicaram que o uso de HA nesta geometria poderia favorecer as propriedades biológicas do material (FERRAZ et al., 2007). Por outro lado era fundamental avaliação da atividade antimicrobiana da CHX ligada a HA, pois uma ligação muito estável, onde a liberação da medicação fosse inexequível, ou interações químicas específicas com grupamentos res-

ponsáveis pela atividade biológica poderiam tornar inviável uma aplicação *in vivo*.

A formação de halos de inibição de crescimento em placas tanto para *E. faecalis* sinalizaram que a CHX, associada a HA manteve sua atividade antimicrobiana. Embora não se tenha comparado os halos de inibição do disco de filtro com digluconato de CHX 2% (controle) com aqueles proporcionados pelas microesferas, fica evidente o maior potencial inibitório das esferas uma vez que os halos são muito semelhante entre si, mas a microesfera é muito menor que o disco (Figura 4). A seleção de *E. faecalis* para os testes foi definida em função das características do microrganismo. São cocos anaeróbios facultativos Gram-positivos de fácil obtenção e crescimento. Também são microrganismos comensais que em condições de laboratório não são patogênicos. Por outro lado, estão relacionados a infecções hospitalares de difícil tratamento e infecções orais persistentes por serem resistentes a antibióticos (MUNDY et al., 2005) e, ainda, por sobreviverem em condições adversas, incluindo pH alcalino e altas pressões osmóticas. Por estes motivos freqüentemente são utilizados para avaliações microbiológicas. Estes resultados foram coerentes com testes anteriores onde a HA em pó associada à CHX inibiu o crescimento de *E. faecalis* em caldo de cultura por até 8 dias (SOUZA et al., 2009).

## CONCLUSÕES

Em conclusão este trabalho revelou que a interação HA-CHX não modificou a estrutura cristalina da HA e que não bloqueou os sítios ativos do agente antimicrobiano, inibido o crescimento *E. faecalis*. Estes resultados indicaram que microesferas de HA-CHX pode ser um sistema promissor para o tratamento e profilaxia de infecções orais. No entanto, estudos *in vivo* devem ser desenvolvidos para proporcionar uma melhor compreensão da atividade desse agente catiônico no tratamento de infecções orais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg* 1965;20:340-349.
2. Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. *Int Endod J* 1990;23:100-106.
3. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985; 1: 170-175.
4. Gjermo P. Chlorhexidine in dental practice. *J Clin Periodontol* 1974;1:143-152.
5. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977;85:255-265.
6. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* 2005;99:703-715.
7. Addy M, Langiroudi M. Comparison of the immediate effects on the sub-gingival microflora of acrylic strips containing 40% chlorhexidine, metronidazole or tetracycline. *J Clin Periodontol* 1984;11:379-386.
8. Killoy WJ. The use of locally delivered chlorhexidine in the treatment of periodontitis. *Clinical results. J Clin Periodontol* 1998; 25:953-958.
9. Heasman PA, Heasman L, Stacey F, Mccracken GI. Local delivery of chlorhexidine gluconate (PerioChip) in periodontal maintenance patients. *J Clin Periodontol* 2001; 28:90-95.
10. Daneshmand N, Jorgensen MG, Nowzari H, Morrison JL, Slots J. Initial effect of controlled release chlorhexidine on subgingival microorganisms. *J Periodontal Res* 2002; 37:375-379.
11. Zafiropoulosi GGK, Ho A, Willershausen B, Kasaj A, Sculean A, Spiekermann H. A chlorhexidine sustained release dosage system for the treatment of chronic periodontitis. *Stomatologie* 2005;102:197-203.
12. Krajewski A, Ravaglioli A, Roncari E, Pinasco PE, Montanari L. Porous ceramic bodies for drug delivery. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11:763-771.
13. Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* 1996;17:31-35.
14. Zilberman M, Elsner JJ. Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *J Control Release* 2008;130: 202-215.

15. Prayitno S, Addy M. An *in vitro* study of factors affecting the development of staining associated with the use of chlorhexidine. *J Periodont Res* 1979;14:397-402.
16. Ferraz MP, Mateus AY, Sousa JC, Monteiro FJ. Nanohydroxyapatite microspheres as delivery system for antibiotics: release kinetics, antimicrobial activity, and interaction with osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*;2007;81:994-1004.
17. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:513-522.
18. Souza CAS, Souto RM, Colombo APV, Rossi AM, Rocha-Leão MHM. In vitro evaluation of the antimicrobial action of chlorhexidine associated to hydroxyapatite. *Key Eng Mater* 2009;396-398:531-534.

---

**Agradecimentos:** Os autores agradecem o apoio financeiro das agências de fomento FAPERJ, CNPQ, CAPES, FINEP, MS-DECIT pelo apoio ao desenvolvimento da pesquisa.