

## RECOBRIMENTO DE HIDROXIAPATITA DOPADA COM AG SOBRE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO COMERCIALMENTE PURO

Jonas de Oliveira Vieira<sup>1</sup>, Luci Cristina de Oliveira Vercik<sup>2</sup>, Eliana Cristina da Silva Rigo<sup>3</sup>(Orientador),

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga (SP),

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia-Universidade de São Paulo, São Carlos (SP)

e-mail: [jonasvieira@usp.br](mailto:jonasvieira@usp.br)

### **Resumo.**

*O Titânio comercialmente puro (Ticp) e suas ligas são os biomateriais mais utilizados para a confecção de implantes odontológicos devido as suas excelentes e reconhecidas características de biocompatibilidade. O grande interesse pela hidroxiapatita (HA) se dá pelo fato de que essa fase é quimicamente similar à fase mineral óssea, denotando uma forte interação HA/tecido ósseo, delegando excelentes características bioativas e biocompatíveis quando implantada. Mesmo obtendo um material com características desejáveis para ser implantado, mas isso não impede que a presença desses materiais estranhos no corpo, não só podem interferir com o mecanismo de defesa como também influenciar nas doses de antibióticos necessárias para protegê-lo contra as possíveis infecções, tornando-se um sério problema na área médica. Uma maneira de prevenção e tratamento de infecções microbianas é mediante a utilização de sais de prata. Dessa forma, o presente trabalho apresenta resultados de recobrimento bioativo (HA) sobre superfície de titânio comercialmente puro (Ticp) dopado com íons Ag. O recobrimento consiste em 3 etapas, na etapa 1- tratamento químico de superfície das amostras com NaOH, etapa 2 - imersão do substrato em questão em uma solução de silicato de sódio (SS) para a fase de nucleação e a etapa 3 - reimersão desses substratos em solução sintética que simula o plasma sangüíneo (SBF) para a precipitação e crescimento da camada de apatita. Após a etapa de recobrimento os substratos foram imersos em soluções de AgNO<sub>3</sub> com concentrações de 20 ppm e 100 ppm por 48h a 37°C. Os substratos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho (IV) e por difração de raios X (DRX). Mediante os resultados constatou-se a formação de uma camada de apatita, com aspectos de glóbulos, sobre a superfície do Ticp. O aumento na concentração da Ag provoca um aumento na quantidade de Ag dopada na camada de apatita. Com os resultados obtidos foi possível concluir de que é possível obter uma camada de apatita sobre uma superfície metálica como o Ticp dopada com íons Ag.*

**Palavras-chave:** Recobrimento biomimético, Hidroxiapatita, Prata.

## 1. INTRODUÇÃO

Alguns materiais artificiais implantados no osso tendem a ser encapsulados com tecidos fibrosos que os isolam do contato direto com a matriz óssea. Conseqüentemente, eles não aderem ao osso devido à ausência de ligação química na interface material/tecido ósseo. Dentre os materiais que apresentam tais características estão o titânio e suas ligas, o aço inoxidável, as ligas de Co-Cr-Mo e o polietileno, que são considerados bioinertes (KOKUBO et al., 2004).

Segundo KOKUBO et al. (2000), um dos pré-requisitos para um material ligar-se ao osso é a formação de uma camada de apatita biologicamente ativa na interface material/osso, usualmente conhecida como “bone-like apatite”. Tal camada de apatita é similar à fase mineralizada do tecido ósseo, em composição e estrutura. Acredita-se que ela atua como sinalizadora de proteínas e células para iniciar a cascata de eventos que resulta na formação da estrutura óssea. Ou seja, os osteoblastos, células ósseas responsáveis pela produção do tecido ósseo, proliferam preferencialmente e se diferenciam produzindo apatita e colágeno sobre a camada de apatita formada anteriormente, o que favorece a união do implante com o osso.

Quando isso ocorre, uma ligação química é formada entre o osso e a camada de apatita, reduzindo a energia interfacial entre elas (KOKUBO et al., 2003).

No entanto, essa implantação somente é possível em situações de baixas tensões ou apenas de tensões de compressão. Esforços têm sido feitos para combinar a resistência mecânica de biomateriais metálicos com a propriedade bioativa da hidroxiapatita (HA), sendo um deles a possibilidade em recobrir o biomaterial metálico de boa resistência mecânica com uma camada bioativa através da deposição de um material bioativo.

Uma possibilidade consiste em recobrir o material bioinerte ou biotolerável de boa resistência mecânica com uma camada bioativa através da deposição de um material bioativo (DHERT, 1992). Neste caso, a principal dificuldade consiste em obter uma boa união da camada bioativa com o substrato. Nos últimos anos tem-se utilizado na obtenção de tais recobrimentos, diferentes métodos, entre os quais: íon sputtering, plasma spray, sol-gel, eletrólise e biomimético. O plasma spray é o único que se utiliza para fins comerciais, mas esse método apresenta algumas desvantagens em decorrência da alta temperatura de trabalho (10.000 °C), onde a HA decompõe-se em oxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6O]$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ -TCP [ $\alpha$  e  $\beta$ - $Ca_3(PO_4)_2$ ], e uma fase vítrea amorfa alterando o processo de dissolução e biodegradação, além disso a natureza da ligação HA-metal é puramente mecânica, falhando quando submetidos as cargas de tração devido a grande diferença entre os coeficientes de expansão térmica (FISHER, 1986).

Abe e colaboradores (1990) têm proposto um método para o recobrimento de substratos de natureza variada com uma camada de hidroxiapatita “biológica”. O método consiste em colocar o substrato a ser recoberto em uma solução sintética de composição iônica semelhante a do plasma sanguíneo (simulated body fluid - SBF) mais um vidro bioativo (vidro G). Depois de determinado período o substrato é reimerso em uma solução 1,5 vezes mais concentrada (1,5 SBF) (ABE, 1990).

Inicialmente, os materiais utilizados na realização de implantes podem ser classificados de acordo com sua origem ou através dos princípios da fisiologia óssea. Quanto aos tipos de materiais utilizados, os implantes dividem-se em biológicos ou sintéticos. Por sua vez, os implantes biológicos subdividem-se em autógenos, alógenos e xenógenos.

Quando o material a ser enxertado advém de outro indivíduo da mesma espécie, geralmente através de bancos de tecidos biológicos e biomateriais temos o implante alógeno.

A principal desvantagem do enxerto alógeno é a rejeição, requerendo medicamentos que controlem a reação do sistema imunológico, assim os implantes são dependentes da prevenção da infecção bacteriana após a colocação do implante. Uma saída é utilizar

quantidade de material, na interface osso-implante, em doses mais elevadas, entretanto, em alguns casos, acaba ocorrendo a remoção desse implante (SANT, 1999).

Uma maneira de prevenção e tratamento de infecções microbianas é a utilização de sais de prata, (SANT, 1999). O efeito bactericida de íons de prata é bem conhecida e tem sido utilizado em diferentes campos da medicina, na cicatrização de feridas ou em biomateriais. Em um estudo *in vitro* a avaliação das propriedades antibactericida e da citotoxicidade de íons de prata mostrou boa atividade antibacteriana com ausências de citotoxicidade (Alt V et al., 2004).

O presente trabalho visa o estudo do efeito das variáveis de processo sobre o mecanismo de precipitação e crescimento de apatita pelo método biomimético, bem como o efeito da dopagem com íons Ag.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

As soluções empregadas no recobrimento foram 1,5SBFe solução de silicato de sódio (SS). Para o preparo do 1,5SBF e da solução de SS, foram solubilizados NaCl, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e (Na<sub>2</sub>O)SiO<sub>2</sub> de grau analítico em água destilada e deionizada. O pH dessas soluções foi ajustado a 7,25 à 37 °C com HCl 0,1 mol.dm<sup>-3</sup> e tris(hidroximetil)aminometano 0,05 mol.dm<sup>-3</sup>, e guardadas em frascos fechados de polipropileno.

Para a etapa de dopagem com íons prata utilizou-se soluções de 20ppm e 100ppm de AgNO<sub>3</sub>.

Para o ensaio de cultura de bactérias utilizou-se meio de cultivo *Mueller-Hinton Agar* (padrão para antibiograma), discos CEFAR de antibiótico (gentamicina) e cepa *Staphylococcus aureus*, ATCC (*American Type Culture Collection*) 29213 doada pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

### 2.2 Recobrimento da superfície do Tícp

**Tratamento T1:** O recobrimento consistiu em 2 etapas, na etapa 1 - imersão do substrato em uma solução de silicato de sódio (SS) para a fase de nucleação e a etapa 2 - reimersão desses substratos em solução sintética que simula o plasma sanguíneo (SBF) para a precipitação e crescimento da camada de apatita.

**Tratamento T2:** O recobrimento consistiu em 3 etapas, na etapa 1 - tratamento químico da superfície das amostras com NaOH 5M por 24 horas a temperatura de 60°C. Etapa 2 - imersão do substrato em questão em uma solução de silicato de sódio (SS) para a fase de nucleação e a etapa 3 - reimersão desses substratos em solução sintética que simula o plasma sanguíneo (SBF) para a precipitação e crescimento da camada de apatita.

### 2.3 Etapa da dopagem da camada de fosfato de cálcio com íons Ag

Após a etapa de recobrimento os substratos foram imersos em soluções de AgNO<sub>3</sub> com concentrações de 20 ppm e 100 ppm por 48h a 37°C.

## 2.4 Caracterização físico-química das amostras

As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura - MEV (Hitachi modelo TM 3000) e por difratometria de raios X com incidência rasante - DRX (Analytical X-Ray Systems, Siemens D5005, com radiação  $\text{Cu-K}_\alpha$  e passo de  $0,032^\circ$ ).

## 2.5 Caracterização *in vitro*

### 2.5.1 Ensaio de cultura de bactérias - Teste de halo de inibição

O meio de cultivo foi preparado e esterilizado conforme as instruções do fabricante (BioBrás Diagnósticos) e distribuído em placas de Petri. Para a obtenção da bactéria utilizada,  $100\mu\text{L}$  da solução estoque (armazenada em glicerol 10% e mantido sob congelamento) foram incubados em 10mL de caldo de triptona de soja e ficaram sob agitação lenta e constante por 18 horas à  $37^\circ\text{C}$ . A cultura foi diluída para  $3 \times 10^8$  UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia/mL) e  $100\mu\text{L}$  desta suspensão foram inoculados em superfície de agar *Mueller-Hinton* e espalhadas com o auxílio de uma alça de *Drigalsky* até a secagem do mesmo. Sobre o material semeado foram depositados 5 discos com 7 mm de diâmetro de diferentes composições. Também, como parâmetro, foi usado um disco contendo antibiótico Gentamicina  $10\mu\text{g}$  (CEFAR). As placas foram incubadas à  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após este período foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição com o auxílio de uma régua. Os resultados foram comparados com os halos de inibição formados pelos discos da gentamicina ( $10\mu\text{L}$ ). Foi realizado o registro fotográfico dos mesmos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Etapa de recobrimento e dopagem com íons prata

Os resultados obtidos por DRX, independente dos tratamentos adotados (**T1** e **T2**) pode-se observar que todos os substratos após imersão na solução contendo íons Ag, apresentaram uma fase de prata ( $33^\circ$  e  $38,2^\circ$ ) e a obtenção de HA através do recobrimento sobre a superfície do titânio. Além disso dois picos do titânio foram detectados em  $40,1^\circ$ .

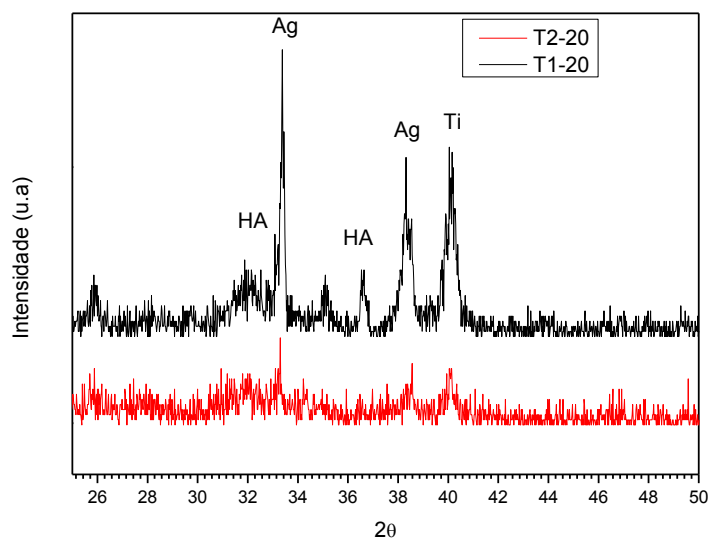


Figura 1- DRX das amostras T2-20 e T1-20 obtidas por recobrimento biomimético com e sem tratamento de superfície e com concentração de 20 ppm cada, respectivamente.

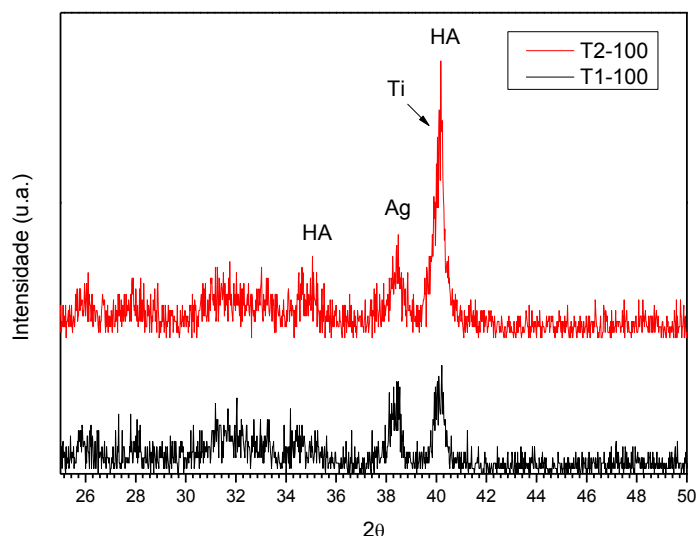
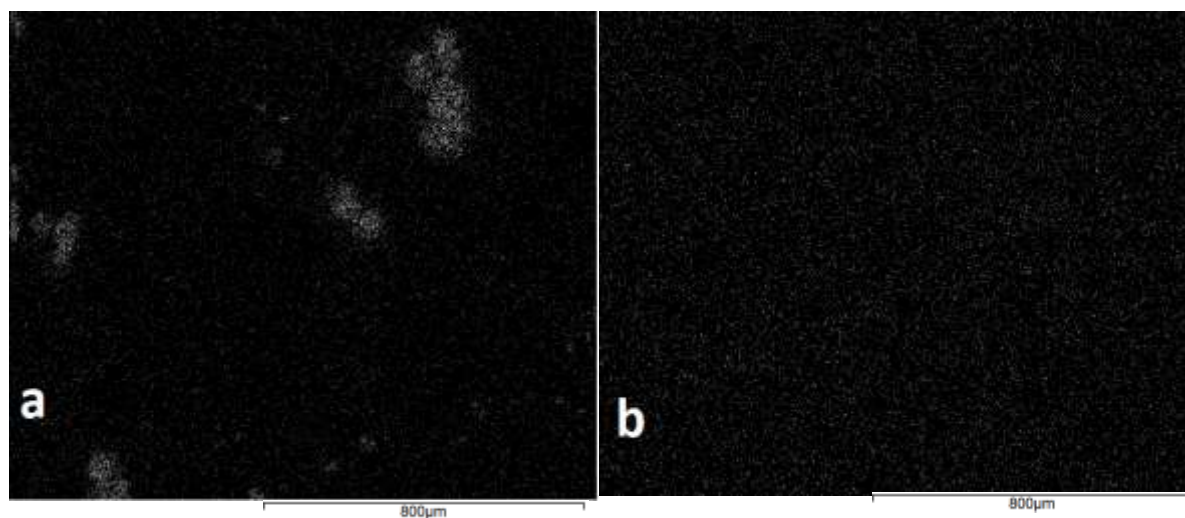


Figura 2- DRX das amostras T2-100 e T1-100 obtidas por recobrimento biomimético com e sem tratamento de superfície e com concentração de 100 ppm cada, respectivamente.

O crescimento da HA e de outras apatitas, tanto no meio biológico quanto em SBF, ocorre em meio contendo, além de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , íons-traços essenciais tais como:  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ .

Kim et al,1996 e Kokubo et al,1999, promoveram a nucleação da HA através do tratamento do Ti com NaOH. Mostraram que o tratamento promove o aumento da atividade da superfície para nucleação da HA.

A análise da morfologia da superfície do titânio foi feita mediante a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), todas as amostras foram caracterizadas por aglomerados e com formas irregulares. Utilizando-se a técnica de elétrons retroespalhados (BSE - *backscattering electrons*) foi possível observar a presença de outra fase (pontos mais claros) que corresponde à prata. Assim, também, o aumento da concentração de  $\text{AgNO}_3$  favoreceu a homogeneidade da dopagem, vista nas figuras a e b.



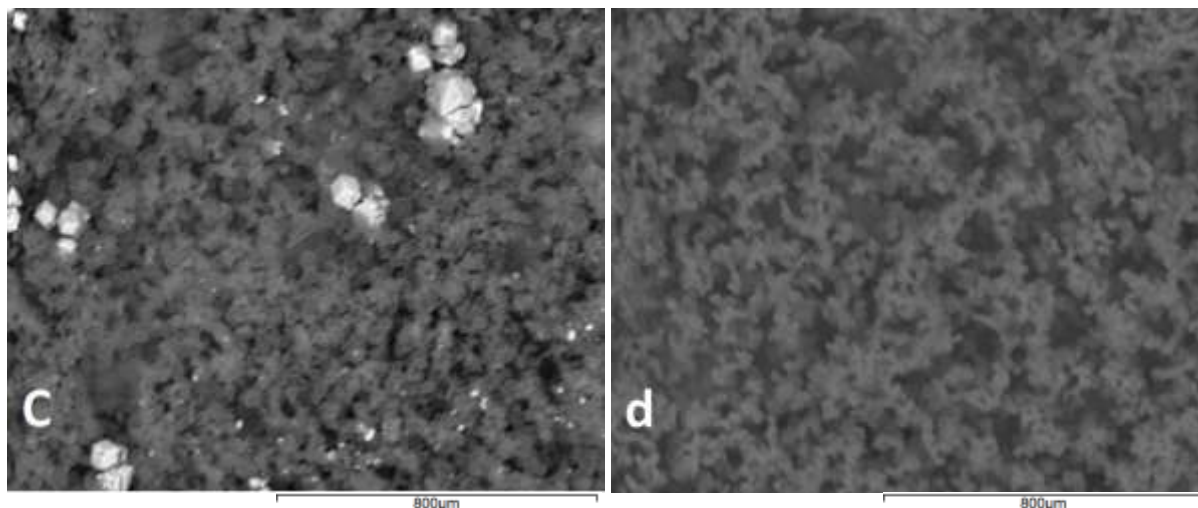


Figura 3 – Micrografia das amostras T1-20 e T2-20 obtidas por recobrimento biomimético com concentração de 20 ppm de solução de  $\text{AgNO}_3$  cada, sendo que as figuras a e b correspondem a imagem de detecção da prata e as figuras c e d correspondem a imagem inicial da micrografia com a morfologia do recobrimento.

### 3.2 Ensaio de cultura de bactérias – Teste de halo de inibição

O estudo bactericida pelo método de halo de inibição foi realizado nas amostras com o tratamento T1 e T2, com concentrações de prata de 20 e 100 ppm, para caracterizar o efeito da substituição da Ag na HA. O efeito direto da lixiviação dos íons de prata das amostras T1 e T2 nos meios de cultura foram estudados pelo método do teste de halo de inibição, com *Mueller-Hinton* agar contendo a bactéria *Staphylococcus aureus*, após 24 h de inoculação.

Com o aumento da concentração de Ag na HA as amostras apresentaram maior halo de difusão. Observa-se na Figura 4 que esse efeito é crescente na amostra com 20ppm (T1-20), maior na amostra com 100ppm (T1-100) e mais nítido nas amostras T2 com o tratamento de superfície.

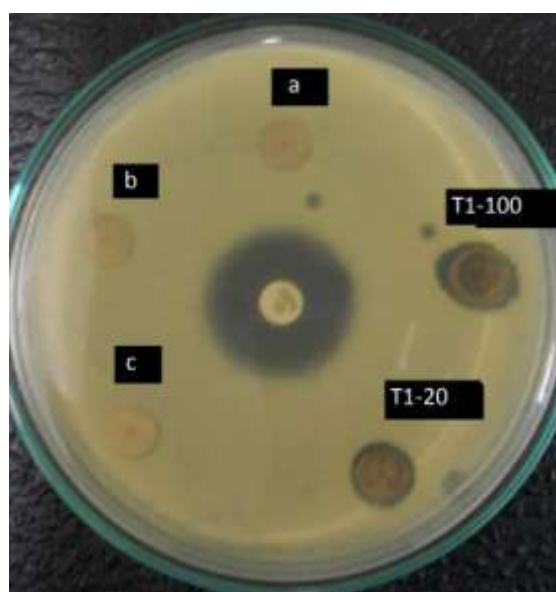




Figura 4- Resultado do teste de halo de inibição da amostra T1 obtidas pelo recobrimento com concentrações de 20 e 100 ppm de solução de  $\text{AgNO}_3$ , amostras T1-20 e T1-100 respectivamente. As amostras a,b,c não foram dopadas com prata.

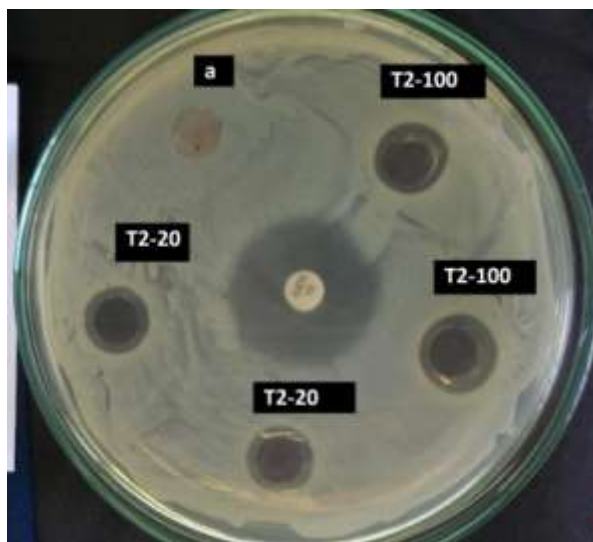


Figura 5 – Resultado do teste de halo de inibição da amostra T2 obtidas pelo recobrimento com concentrações de 20 e 100 ppm de solução de  $\text{AgNO}_3$ , amostras T1-20 e T1-100 respectivamente. A Amostra “a” não foi dopada com prata.

#### 4. CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais empregadas, foi possível concluir que:

Houve formação de uma camada de apatita, com aspectos de glóbulos, sobre a superfície do T1cp.

O método de recobrimento biomimético se mostrou efetivo para a obtenção da camada de hidroxiapatita.

O tratamento de superfície favoreceu a obtenção da camada de apatita sobre a superfície.

A análise por DRX e MEV das amostras T1 e T2 indicam que a HA foi dopada com Ag.

Independente da concentração de íons Ag, foi constatado o efeito bactericida, sendo que é mais evidente com o aumento da concentração de íons Ag.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e o departamento de bioengenharia - USP pelo apoio e suporte financeiro.

#### REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. (1990), *Apatite coatings on ceramics, metals and polymers utilising a biological process*. Journal of materials science-materials in medicine., v. 1, p. 536-540.
- ALT V., BECHERT T., STEINRUCKE P., et al. (2004). *An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement*, Biomaterials, vol. 25, no. 18, pp. 4383–4391.
- CULLITY, B. D.(1978). *Elements of X-Ray diffraction*. 2nd ed. Reading: Addison-Wesley, 555 p.

- DHERT W.J. A.(1992). *Plasma-Sprayed Coatings and Hard-Tissue Compatibility*. A Comparative Study on Fluorapatite, Magnesiumwhitlockite and Hydroxyapatite. Offsetdrukkerij Haveka B.U., Ablasserdam. 4-6.
- FISHER G. (1986). "Ceramic Coating Enhance Performance Engineering". *Ceram. Bull.* 65(2):283-287.
- KOKUBO T., KIM H. M., MIYAJI F., TAKADAMA H. and MIYAZAKI T.(1999). *Ceramic-metal and ceramic-polymer composites prepared by a biomimetic process*. *Composite: Part A: applied science and manufacturing*, 30, 405-409.
- KOKUBO, T., KIM, H.M., KAWASHITA, M. *et al.* (2000), "What kinds of materials exhibit bone-bonding?". In: Davies, J.E. (eds), *Bone Engineering*, Toronto, Canadá.
- KOKUBO, T., KIM, H.M., KAWASHITA, M., (2003), "Novel bioactive materials with different mechanical properties", *Biomaterials*, v. 24, n. 13, pp. 2161-2175.
- KOKUBO, T., KIM, H.M., KAWASHITA, M. *et al.* (2004), "Bioactive metals: preparation and properties", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v. 15, n. 2, pp. 99-107.
- SANT S.B., GILL K.S and BURREL R.E., , 1999, *Morphology of novel antimicrobial silver films deposited by magnetron sputtering*, *Scripta Materialia*, vol.41. n°12, 1333-1339.