

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PARTÍCULAS DE FOSFATO DICÁLCICO DIHIDRATADO CARREGADAS COM POLIHEXANIDA BIGUANIDA

Palavras-Chave: AGENTE ANTIMICROBIANO; POLIHEXANIDA; PARTÍCULAS DE FOSFATO.

Autores(as):

Melina Zambrotti Machado

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp (Piracicaba, SP, Brasil)

Me. Iago Torres Cortês de Sousa

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp (Piracicaba, SP, Brasil)

Me. Larissa Pavanello

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp (Piracicaba, SP, Brasil)

Prof^a. Dr^a. Leticia Cristina Cidreira Boaro

Faculdade de Odontologia - Universidade de Saskatchewan (Saskatoon, Canadá)

Prof^a. Dr^a. Karina Cogo Müller

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unicamp (Campinas, SP, Brasil)

1. INTRODUÇÃO

O microbioma oral é composto por bactérias, fungos, vírus e protozoários que coexistem em simbiose com o hospedeiro, podendo estar presentes na saliva ou aderidos como biofilme (Samaranayake et al., 2017; Pedersen e Belstron, 2019; Mosaddad et al., 2019). Alterações ambientais e interações microbianas influenciam sua composição e podem desencadear doenças como cárie dentária, gengivite e infecções sistêmicas (Ogunrinola et al., 2020; Sedghi et al., 2021; Radaic e Kapila, 2021).

A cárie dentária é uma infecção multifatorial associada ao biofilme e à ingestão de carboidratos fermentáveis, que promove acidificação e desmineralização do esmalte dentário (Karched et al., 2019; Cury; Tenuta, 2009; Lamont, 2018; Balhaddad et al., 2019). Trata-se de um desafio clínico e de saúde pública devido à sua alta prevalência, baixo índice de tratamento e reincidência (Cheng et al., 2022).

Para combatê-la, empregam-se estratégias como higiene oral, agentes remineralizantes e antimicrobianos (Baehni et al., 2003). Dentre os materiais promissores estão as partículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), que liberam íons Ca e PO₄ e atuam na remineralização profunda do esmalte, sendo biocompatíveis e utilizadas tanto para reparo ósseo quanto para prevenção de cáries (Langhorst et al., 2009; Pinto et al., 2018; Mok et al., 2021; Italiano, 2023). Além disso, essas partículas podem funcionar como carreadoras de antimicrobianos (Epple et al., 2010; Mancini et al., 2022). A clorexidina (CHX) tem sido amplamente empregada, porém apresenta efeitos adversos e risco de resistência microbiana (Qiu et al., 2020; Baehni & Takeuchi, 2003; Graciano e Romão, 2020), exigindo novas alternativas com melhor perfil de segurança e eficácia.

A polihexanida biguanida (PHMB), com amplo espectro antimicrobiano e baixa toxicidade, destaca-se como alternativa à CHX, atuando sobre a membrana bacteriana e o DNA (Carmona-Ribeiro et al., 2013; Sowlati-Hashjin et al., 2020; Kaehn, 2010). Já é aplicada na medicina, como em infecções cutâneas, oftalmológicas e cervicais (Babalska et al., 2021; Gentil et al., 2012; Dietrich et al., 2023; Melo et al., 2019; Alvarenga et al., 2000).

Apesar de promissora, a incorporação direta do fármaco em materiais restauradores é limitada devido à incompatibilidade química, podendo comprometer as propriedades do material restaurador (Llorens et al., 2015; De Paula et al., 2011). Assim, a incorporação em partículas de liberação sustentada é uma alternativa viável, já

que a DCPD apresenta vantagens como índice de refração compatível com a matriz resinosas, boa solubilidade, facilidade de síntese e baixo custo (Braga, 2019).

Esse projeto teve como objetivo sintetizar e caracterizar partículas de DCPD incorporadas com PHMB, visando seu uso como material antimicrobiano e remineralizante em odontologia. Visando o desenvolvimento de um material com potencial de aplicação odontológica, além de ser um material com propriedades favoráveis, pela compatibilidade com matrizes resinosas, alta solubilidade e facilidade de síntese.

2. METODOLOGIA

2.1. Síntese das Partículas

A síntese das partículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) foi realizada de acordo com Silva (2023). Na qual foram adicionadas uma solução de fosfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e de nitrato de cálcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, simultaneamente com bomba peristáltica (10 mL/min), mantendo a agitação por 15 min após mistura. A purificação incluiu a filtração a vácuo, cinco lavagens com água deionizada e três com etanol. A secagem foi feita em dessecador a vácuo. Para incorporação do PHMB, a mistura foi agitada por 48 h, decantada, e o sobrenadante filtrado para quantificação. O restante foi seco em dessecador para obtenção de pó por 72h.

2.2. Análise Microbiológica

Foram utilizados os seguintes microrganismos: aeróbios facultativos *Streptococcus mutans* (UA 159), *Streptococcus oralis* (ATCC 10556), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus salivarius* (ATCC 10556) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); e anaeróbios obrigatórios *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 51190), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e *Prevotella intermedia* (ATCC 49046). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por meio do método de diluição seriada em placas de 96 poços, seguindo o protocolo estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007 e 2012)*. As placas foram incubadas em estufa com atmosfera contendo 10% de CO_2 por 24 horas para os microrganismos aeróbios facultativos, e em câmara de anaerobiose para os microrganismos anaeróbios. Os tempos de incubação dos anaeróbios foram: *P. intermedia*, 48 horas; *F. nucleatum*, 72 horas; e *P. gingivalis*, 4 dias. Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), 5 μL de cada poço foram cultivados em meio ágar por 24 horas (aeróbios facultativos) ou 48 horas (anaeróbios). No caso de *P. gingivalis*, a incubação foi estendida por 7 dias.

2.3. Caracterização das Partículas

2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para a caracterização morfológica das partículas, com imagens obtidas em diferentes ampliações (500 \times , 1000 \times e 3000 \times), a fim de evidenciar com maior precisão a morfologia do material. A análise por espectroscopia de dispersão de energia (EDX) foi empregada para determinar a composição elementar da superfície das amostras, expressa em percentual de área (Shibasaki et al., 2021).

2.3.2. Espalhamento de Luz a Laser

Utilizado para mensurar por meio de espalhamento de luz a laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido) o tamanho e distribuição das partículas. Na quais foram suspensas em isopropanol, mantidas em ultrassom por 10 min e introduzidas no equipamento. As distribuições dos tamanhos das partículas foram calculadas a partir da medição da variação angular na intensidade da luz à medida que um feixe de laser irá interagir com as partículas em suspensão.

2.3.3. Análise termogravimétrica (TGA)

O perfil de decomposição dos componentes das partículas foi investigado pela TGA (TGA/DSC1, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suíça). Para isto, aproximadamente 10 g da amostra foi aquecida na faixa de

temperatura entre 25 e 600 °C e taxa de aquecimento de 10 °C/min⁻¹. A partir da curva TGA, foi determinada a temperatura máxima de desintegração.

2.4. Quantificação do PHMB por UV/Vis

O perfil de decomposição dos componentes das partículas será investigado pela TGA (TGA/DSC1, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suíça). Para isto, aproximadamente 10 g da amostra foi aquecida na faixa de temperatura entre 25 e 600 °C e taxa de aquecimento de 10 °C/min⁻¹. A partir da curva TGA, foi determinada a temperatura máxima de desintegração.

2.5. Análise Estatística

Será utilizado o software GraphPad Prism 9. A Normalidade será testada por Shapiro-Wilk. ANOVA/Tukey-Bonferroni para dados paramétricos e Kruskal-Wallis/Dunn para não-paramétricos. Significância adotada: 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trabalhos prévios envolvendo sínteses de partículas DCPD, e DCPD amorfo, carregadas com clorexidina demonstraram resultados promissores (Silva, 2023), sendo capazes de inibir o crescimento de *Streptococcus mutans* (Yang et al., 2021). Para Silva (2021), a escolha pelas partículas DCPD em detrimento as amorfas deveu-se à sua maior solubilidade, fator que favorece uma liberação mais eficiente do fármaco. No presente estudo, diferentemente do trabalho citado, todas as amostras de partículas DCPD carregadas com PHMB obtiveram êxito na incorporação e foram efetivas na atividade antimicrobiana, com exceção de *Prevotella.intermedia*, na qual a inibição não foi observada com a concentração de 5% do fármaco.

3.1. Análise Microbiológica

Os resultados obtidos foram descritos abaixo no Quadro 1, medidos em (µg /mL). Sendo válido destacar que em todos os experimentos as partículas DCPD foram utilizadas como controle da partícula de o fármaco PHMB, e em nenhum experimento, a partícula DCPD inibiu o crescimento bacteriano. As diluições foram preparadas a partir de uma solução-mãe de PHMB com concentração de 20%. após testes preliminares, determinou-se a concentração de 5% como a mais adequada para os experimentos microbiológicos. A faixa de concentração utilizada nessa pesquisa foi de 50.000 µg /mL a 24,41 µg /mL.

As amostras testadas apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. mutans*. com valores de CIM de 781,25 µg /mL e CBM de 3.125 µg /mL; *S.oralis* apresentou CIM e CBM de 12.500 µg /mL; *S. mitis* CIM e CBM de 1.562,50 µg /mL; *S.salivarius* e *P. gingivalis*, apresentaram CIM e CBM igual a 12.500 µg /mL *E. faecalis* CIM igual a 3.125 µg /mL e CBM de 12.500 µg /mL, e *F.nucleatum* CIM variou entre 1.562,50 µg /mL e 3.125 µg /mL e CBM de 6.250 µg /mL. O único microrganismo que não a apresentou atividade antimicrobiana foi *P.intermedia*, que cresceu em todos os poços testados (representado por um hífen na tabela).

Tabela1 – Resultados de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima para microrganismos aeróbios facultativos

<i>Streptococcus mutans</i> (µg/mL)		<i>Streptococcus oralis</i> (µg/mL)		<i>Streptococcus mitis</i> (µg/mL)		<i>Streptococcus salivarius</i> (µg/mL)		<i>Enterococcus faecalis</i> (µg/mL)	
CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
781,25	3.125	12.500	12.500	1.562,50	1.562,50	12.500	12.500	3.125	12.500

Fonte: dados da pesquisa

Tabela2 – Resultados de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima para microrganismos anaeróbios

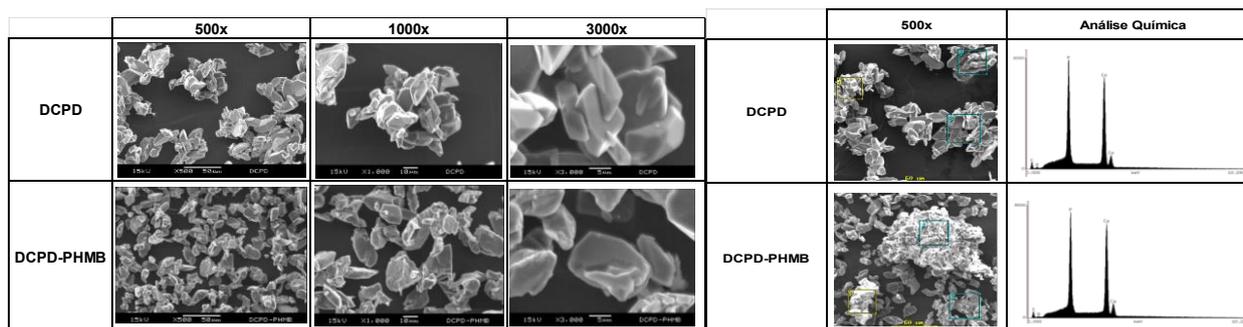
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (µg/mL)		<i>Prevotella intermedia</i> (µg/mL)		<i>Fusobacterium nucleatum</i> (µg/mL)	
CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
12.500	12.500	-	-	3.125	6.250

Fonte: dados da pesquisa

3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX).

A partir das imagens obtidas pela análise por microscopia eletrônica de varredura, nos aumentos de 500x, 1000x e 3000x, foi possível observar que as partículas DCPD apresentavam maior aglomeração, e superfície mais lisa, em comparação as amostras de DCPD-PHMB, as quais exibiram distribuição mais dispersiva e textura mais rugosa em sua superfície. Essas características morfológicas sugerem a incorporação do fármaco à partícula. Para a análise de espectroscopia de dispersão de energia, foram analisados três sítios distintos, foram identificados os elementos carbono, oxigênio, fósforo e cálcio, sendo estes últimos dois, os mais abundantes, conforme o esperado. A Imagem 2 ilustra os sítios analisados a 500x de aumento, bem como os perfis químicos obtidos nas amostras.

Imagem 1 – Imagem das partículas obtidas através do Microscópio Eletrônico de Varredura em aumentos de 500, 1000 e 3000 vezes, com análise química dos elementos através Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X



Fonte: da autora

3.3. Espalhamento de Luz a Laser

Para a análise do tamanho das partículas por espalhamento de luz a laser, foi preparada uma suspensão da partícula DCPD-PHMB em álcool isopropílico, submetido a sonicação por 10 minutos. Foram analisadas três amostras, na qual uma era o controle de DCPD e duas amostras contendo o PHMB, identificadas DCPD-PHMB-B e DCPD-PHMB-C provenientes de dois lotes distintos. Os resultados revelaram que a média do diâmetro correspondente ao D50 (valor no qual 50% das partículas são menores) foi de 20,74 μm ($\pm 2,82$), enquanto o D10 apresentou média de 4,66 μm ($\pm 0,66$) e o D90, 44,96 μm ($\pm 12,17$). Com base nesses valores, observa-se que todas as amostras apresentaram distribuição dentro da faixa de micropartículas, com variações esperadas entre os lotes, mas sem alterações significativas na faixa de distribuição.

Análise termogravimétrica (TGA)

Foram analisadas três amostras por termogravimetria, sendo elas DCPD e DCPD-PHMB, a 600°C. Para a DCPD a decomposição térmica ocorreu entre 450 °C e 500°C, resultando em um resíduo final de 93,61%, o que indica uma degradação de apenas 6,49% do material. Já a amostra de DCPD-PHMB, apresentou dois eventos de decomposição distintos. O primeiro entre 180°C e 200°C e o segundo entre 450 °C e 500°C. Tal comportamento pode ser atribuído à degradação térmica do fármaco (PHMB), entorno dos 200°C, seguida da decomposição da matriz inorgânica acima de 450°C. Nesse caso, o resíduo foi de 82,99%, indicando uma perda de massa total de 17,01%.

3.4. Quantificação do PHMB por UV/Vis

Para análise por espectrofotometria na região do ultravioleta-visível, foram utilizados 10 mL do sobrenadante das amostras de DCPD-PHMB, previamente filtrados em filtros de 45 μm , para a quantificação do fármaco remanescente. A curva de calibração foi construída a partir de uma solução de PHMB a 5%. Foi necessária a diluição de 27.000 vezes para o comprimento de onda de 235nm. Já os sobrenadantes foram diluídos em 100.000 vezes para adequação à faixa de leitura.

Três amostras foram analisadas, sendo elas DCPD-PHMB-A (armazenada por 5 meses), DCPD-PHMB-B (armazenada por 30 dias) e DCPD-PHMB-C (coletada no mesmo dia da análise). Para as amostras B e C, a variação entre os valores foi discreta. A concentração média de PHMB no sobrenadante da amostra B foi de 4,266%, enquanto da amostra C, foi de 3,83%. Com base nesses resultados, estimou-se que na amostra que foi colhida no dia, teve 1,17% do fármaco incorporado na partícula, comprovando sua incorporação. Entretanto, observou-se que na amostra A e B, a presença de partículas não totalmente filtradas pode ter promovido liberação residual de PHMB, resultando em um teor mais elevado de fármaco na solução, e conseqüentemente comprometendo a precisão dos resultados dessas amostras.

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que partículas de DCPD incorporadas à PHMB foram sintetizadas e caracterizadas com sucesso, apresentando potencial como material bioativo com ação antimicrobiana. As análises confirmaram a incorporação do fármaco, sua liberação controlada e atividade contra microrganismos orais. Esses achados reforçam a viabilidade do uso de partículas inorgânicas como estratégia promissora para prevenir o biofilme oral, unindo ação remineralizante e efeito antimicrobiano de amplo espectro

5. BIBLIOGRAFIA

1. BAEHNI, P. C.; TAKEUCHI, Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. **Oral diseases**, v. 9, p. 23-29, 2003.
2. BALHADDAD, Abdulrahman A. et al. Toward dental caries: Exploring nanoparticle-based platforms and calcium phosphate compounds for dental restorative materials. **Bioactive materials**, v. 4, p. 43-55, 2019.
3. BRAGA, Roberto Ruggiero. Calcium phosphates as ion-releasing fillers in restorative resin-based materials. **Dental Materials**, v. 35, n. 1, p. 3-14, 2019.
4. CARMONA-RIBEIRO, Ana Maria; DE MELO CARRASCO, Letícia Dias. Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9906-9946, 2013.
5. CURY, Jaime Aparecido; TENUTA, Livia Maria Andalo. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions?. **Brazilian oral research**, v. 23, p. 23-30, 2009.
6. De PAULA, G. F.; NETTO, G. I.; MATTOSO, L. H. C. **Physical and chemical characterization of poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride**. **Polymers**, v. 3, p. 928-941, 2011.
7. GENTILE, Antonio; GERLI, Sandro; DI RENZO, Gian Carlo. A new non-invasive approach based on polyhexamethylene biguanide increases the regression rate of HPV infection. **BMC clinical pathology**, v. 12, p. 1-5, 2012.
8. GRACIANO, Malcon Soares; ROMÃO, Guilherme Santos. Resistência bacteriana ao antisséptico clorexidina utilizado na prática clínica brasileira. **Scientia Generalis**, v. 1, n. S1, p. 74-74, 2020.
9. KARCHED, Maribasappa; ALI, Dena; NGO, Hien. In vivo antimicrobial activity of silver diammine fluoride on carious lesions in dentin. **Journal of oral science**, v. 61, n. 1, p. 19-24, 2019.
10. LAMONT, Richard J.; KOO, Hyun; HAJISHENGALLIS, George. **The oral microbiota: dynamic communities and host interactions**. **Nature reviews microbiology**, v. 16, n. 12, p. 745-759, 2018.
11. LANGHORST, S. E.; O'DONNELL, J. N. R.; SKRTIC, D. In vitro remineralization of enamel by polymeric amorphous calcium phosphate composite: quantitative microradiographic study. **Dental Materials**, v. 25, n. 7, p. 884-891, 2009.
12. LLORENS, Elena et al. Polybiguanide (PHMB) loaded in PLA scaffolds displaying high hydrophobic, biocompatibility and antibacterial properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 50, p. 74-84, 2015.
13. MOK, Z. H., MYLONAS, P., AUSTIN, R., PROCTOR, G., PITTS, N., & THANOU, M. **Calcium phosphate nanoparticles for potential application as enamel remineralising agent tested on hydroxyapatite discs**. **Nanoscale**, v. 13, n. 47, p. 20002-20012, 2021.
14. OGUNRINOLA, G. A., OYEWALE, J. O., OSHAMIKA, O. O., & OLASEHINDE, G. I. (2020). **The human microbiome and its impacts on health**. **International journal of microbiology**, v. 2020, 2020.
15. RADAIC, Allan; KAPILA, Yvonne L. O oraloma e sua disbiose: Novos insights sobre interações microbioma oral-hospedeiro. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 19, p. 1335-1360, 2021.
16. SEDGHI, Lea et al. **The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease**. **Periodontology** 2000, v. 87, n. 1, p. 107-131, 2021.
17. Shibasaki P, Cavalli V, Oliveira M, Barbosa J, Boriollo M, Martins L. Influence Of Surface Treatment On The Physical Properties And Biofilm Formation Of Zirconia-Reinforced Lithium
18. Silva, Larissa Tavares Sampaio. **Desenvolvimento de partículas de fosfato dicálcico dihidratado carregadas com clorexidina**. 2023. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
19. SOWLATI-HASHJIN, Shahin; CARBONE, Paola; KARTTUNEN, Mikko. Insights into the polyhexamethylene biguanide (PHMB) mechanism of action on bacterial membrane and DNA: A molecular dynamics study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 22, p. 4487-4497, 2020.
20. YANG, Yanwei et al. Novel core-shell CHX/ACP nanoparticles effectively improve the mechanical, antibacterial and remineralized properties of the dental resin composite. **Dental Materials**, v. 37, n. 4, p. 636-647, 2021.