

Hidroxiapatita: suporte para liberação de fármacos e propriedades antimicrobianas

(Hydroxyapatite: support for drug release and antimicrobial properties)

M. V. B. dos Santos, J. A. Osajima, E. C. da Silva Filho

Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI

mvbeserradossantos@gmail.com, josy_osajima@yahoo.com.br, edsonfilho@ufpi.edu.br

Resumo

Os fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos que apresentam propriedades particulares como biocompatibilidade e similaridade química com os tecidos ósseos e dentários dos seres vivos. Sua morfologia porosa permite que estes se apresentem como material apropriado para a utilização em substituição de pequenas partes de tecido ósseo, já que proporciona o crescimento de canais de sistemas nervosos, suporte para vasos sanguíneos como também suporte para deposição de fármacos. Dentre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita se apresenta como fosfato mais estável, o qual é encontrado em maior proporção nos tecidos ósseo e dentário no organismo. Este trabalho teve por objetivo buscar nos bancos de artigos e de patentes trabalhos que relacionem a atividade antimicrobiana da hidroxiapatita, dando suporte a pesquisadores que trabalhem com esta cerâmica para aplicações em tecido dentário, como também a utilização da hidroxiapatita focando o suporte para incorporação de fármaco. Os bancos pesquisados foram o Scopus, Scielo e Web of Science para os artigos e USPTO, EPO e INPI para os bancos de patentes. Os critérios de exclusão levaram a 19 artigos que estudaram hidroxiapatita em conjunto com a clorexidina e zero patente encontrado. Dentre os artigos encontrados, a clorexidina é o fármaco mais empregado como agente antimicrobiano, e a bactéria mais utilizada nos testes é a gram-positiva *Streptococcus mutans*.

Palavras-chave: hidroxiapatita, atividade antimicrobiana, prospecção.

Abstract

*Calcium phosphates are ceramic materials that have special properties such as biocompatibility and chemical similarity to bone and dental tissues of organisms. Its porous morphology allows them as suitable material for use in small pieces of bone replacement because it provides channels growth of nervous systems, support for blood vessels as well as support for deposition of drugs. Among the calcium phosphates, hydroxyapatite is the more stable phosphate and is found in greater proportion in bone and dental tissues in the body. This study aimed to search in articles and patents databases works related to antimicrobial activity of hydroxyapatite, supporting the researchers working on these ceramics for applications in dental tissue, as well as the use of hydroxyapatite as support for drug incorporation. The databases studied were the Scopus, Scielo and Web of Science for articles and USPTO, EPO and INPI for patents. Exclusion criteria led to 19 articles and zero patent. Among the articles found, chlorhexidine is the most commonly used drug as an antimicrobial agent, and the most used bacteria in the tests is the gram-positive *Streptococcus mutans*.*

Keywords: hydroxyapatite, antimicrobial activity, prospecting.

INTRODUÇÃO

As apatitas e alguns materiais relacionados a fosfatos de cálcio têm despertado interesse de pesquisadores nas mais diversas áreas dos campos de pesquisa, que se unem como público interessado nesta temática. O fato que os motiva baseia-se na compatibilidade e similaridade química existente entre os minerais (fosfatos de cálcio e apatitas) com diversas partes do corpo humano, como tecidos ósseos e tecidos dentários [1]. Por volta do ano de 1920, Albee [2] utilizou o fosfato tricálcico como material no auxílio ao combate à pseudoartrose. Nesse mesmo experimento estudou-se também a utilização do fosfato tricálcico (TCP) na formação e regeneração de tecidos ósseos em ratos e cachorros. Mesmo com promissoras aplicações para estas cerâmicas, foi apenas após 1971 que Levitt [3] e Monroe *et al.* [4] publicaram a primeira aplicação destas, feita no campo

da odontologia no tratamento de doenças periodontais.

As cáries se apresentam como patologias bucais proveniente das ações dos ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo de bactérias presentes na boca [5]. Este processo ocorre através da formação de um biofilme ou placa dental, que dá suporte para o desenvolvimento e crescimento de colônias bacterianas. As bactérias por sua vez liberam ácidos orgânicos que metabolizam os carboidratos. Esse processo desencadeia a desmineralização e conseqüentemente o desgaste deste tecido dentário, podendo levar até a perda do dente [6]. No campo ortopédico, patologias como as osteomielite ou infecção óssea bacteriana se apresentam como um grande desafio no sucesso das intervenções cirúrgicas. Estas trazem como características inflamações agudas e crônicas ocasionando, em muitos casos, perda óssea e disseminação em todo o tecido circundante à inflamação [7]. Naturalmente, o organismo humano possui defesa

contra os agentes patogênicos externos, pois é relativamente bem protegido dos agentes causadores de infecção; dessa forma, a osteomielite é um quadro patológico particular, comum entre os pacientes que se encontram no período pós-operatório e pós-traumático após procedimentos cirúrgicos ortopédicos [8].

Ao se pensar no tratamento terapêutico convencional contra microrganismos através do uso de antibióticos, encontram-se dificuldades no tocante ao enfrentamento desta patologia, pois estes tratamentos se dão através da injeção de uma grande quantidade de doses de fármacos, feita ou por via oral ou venosa, por um grande intervalo de tempo. Essa forma de tratamento traz consigo grandes desvantagens terapêuticas, como exemplo, a grande quantidade de fármaco que é utilizada, o longo tempo de administração do fármaco e a possível seleção de bactérias mais resistentes [9]. Outra opção de tratamento se dá através de procedimentos cirúrgicos, que consistem na remoção das partes ósseas afetadas pela ação dos microrganismos afim de se evitar uma infecção crônica. Esta ação abre precedentes para se iniciar uma nova infecção pós-operatória [9]. Entre os microrganismos causadores de patologias bucais e ósseas, a *Staphylococcus aureus* se apresenta como o micro-organismo patogênico responsável por mais de 80% das infecções, como mostrado na Tabela I [9, 10].

A *Staphylococcus aureus* é um tipo bactéria encontrado nas mucosas bucais e nasais de indivíduos saudáveis. Estes microrganismos têm a habilidade de penetrar células epiteliais, células osteoblásticas e endoteliais, adaptando-se ao ambiente celular, conseguindo obter a replicação dentro dos vacúolos celulares, ambientes estes que dificultam a ação dos conhecidos métodos terapêuticos convencionais [11]. Aliada à infecção, causada pela grande quantidade de colônia de bactérias presente no interior das células e onde a eficácia do fármaco é bastante reduzida, ocorre que a grande quantidade de ácido liberado pelo metabolismo dos microrganismos afeta a composição do fármaco, comprometendo assim a sua eficácia antibiótica [12-14]. Nas mucosas bucais, o ataque das bactérias acontece após a *Staphylococcus aureus*, como principal agente causador, e outros microrganismos aderirem às chamadas superfícies duras. Como exemplos, têm-se os dentes, implantes dentários e próteses de enchimento. A colonização feita pelas bactérias costuma seguir a seguinte sequência: formação de película, colonização de bactérias e maturação do biofilme [14, 15].

Esta sequência de crescimento se apresenta de maneira mais acentuada em superfícies rugosas, onde, se estas rugosidades forem diminuídas, acarretará na diminuição da formação da placa bacteriana [14].

Frente a esta situação, os fosfatos de cálcio apresentam propriedades interessantes na ação de minimizar e até evitar patologias como a osteomielite e as doenças bucais. Os fosfatos de cálcio apresentam em geral o cálcio (Ca), o fósforo (P) e o oxigênio (O) como átomos que constituem a sua fórmula molecular mínima [16]. Os diversos fosfatos de cálcio existentes diferenciam-se pela razão entre os átomos de cálcio e fósforo em sua molécula [17]. Como exemplo, pode-se citar alguns que apresentam extrema importância ao organismo humano, sendo estes a hidroxiapatita (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, o fosfato de cálcio amorfo (ACP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, e o fosfato octacálcico (OCP), $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Esta importância se deve a propriedades específicas, como morfologia e solubilidade, frente ao organismo humano. Os valores para as relações de Ca/P dos fosfatos de cálcio mencionados são, respectivamente, de 1,67, 1,5 e 1,33 [16, 18]. A importância dos fosfatos reside em dois fatores principais: suas propriedades específicas e sua similaridade química com tecidos dentário e ósseo [16]. A similaridade química é o suporte que garante a utilização deste material em seres vivos garantindo a sua aceitação por parte do organismo e se evita intoxicação e rejeição do organismo [19]. Por sua propriedade específica de solubilidade, os fosfatos podem, assim, permitir a remineralização do tecido ósseo, enfrentando o desgaste causado pelo ácido orgânico liberado pelo metabolismo das bactérias através de trocas de íons, restaurando os níveis de cálcio (Ca) e de fósforo (PO_4) sendo, conseqüentemente, uma resistência à erosão da superfície do dente, combatendo assim a cárie [20-22].

As características citadas mostram que os fosfatos de cálcio, em especial a hidroxiapatita, concentram propriedades que oportunizam a sua aplicação e utilização como prótese e cimento para reconstrução de pequenas partes do dente. A morfologia porosa dos fosfatos de cálcio lhe confere a possibilidade de incorporar fármacos em sua superfície; assim, com fármacos adsorvidos em sua superfície, pode-se gerar um biomaterial que pode ser utilizado em revestimento de próteses e até mesmo como material de cimento em procedimento de restauração dentária [23]. Assim, este estudo teve por objetivo fazer uma busca bibliográfica para

Tabela I - Relação entre faixa etária e micro-organismos causadores de patologias no tecido ósseo (osteomielites) [10].
[Table I - Relationship between age and microorganisms-causing diseases in the bone (osteomyelitis) [10].]

Faixa etária	Micro-organismo
Recém-nascido (menos de quatro meses)	<i>S. aureus</i> , espécies <i>Enterobacter</i> e espécies grupos A e B <i>Streptococcus</i>
Criança (4 meses a 4 anos)	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus</i> grupo A, <i>Haemophilus influenza</i> e espécies <i>Enterobacter</i>
Criança adolescente (4 anos até adulto)	<i>S. aureus</i> (80%), grupo <i>Streptococcus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> e espécies <i>Enterobacter</i>
Adulto	<i>S. aureus</i> e, ocasionalmente, <i>Enterobacter</i> ou espécies <i>Streptococcus</i>

se verificar as quantidades e os conteúdos das publicações e depósitos de patentes com suas respectivas peculiaridades, reunindo informações que direcionem os pesquisadores no estudo da aplicação de hidroxiapatita combinada à clorexidina para aplicação na odontologia. A pesquisa foi realizada com os seguintes bancos de dados de artigos: Scopus, Scielo e Web of Science; e de patentes: EPO, USPTO e INPI.

MÉTODOS

O estudo foi realizado através de acesso aos bancos de dados de artigos Scopus, Scielo e Web of Science, entre 14 e 28 de março de 2014, com atualização entre 10 e 28 de dezembro de 2014. A pesquisa se desenvolveu com a utilização das seguintes palavras: *calcium phosphate*, *antimicrobial activity*, *hydroxyapatite*, *chlorhexidine*, *calcium phosphate and antimicrobial activity*, *calcium phosphate and antimicrobial activity and chlorhexidine*, *hydroxyapatite and antimicrobial activity* e *hydroxyapatite and antimicrobial activity and chlorhexidine*. Palavras compostas, como exemplo, *calcium phosphate and antimicrobial activity*, foram colocadas entre aspas, para que estas fossem encontradas seguidas no texto escrito, sendo utilizada da seguinte maneira nos campos de busca: “*calcium phosphate*” and “*antimicrobial activity*”. Resumos, palavras-chave e títulos foram os campos utilizados para se buscar as palavras-chave utilizadas. Para as pesquisas mais abrangentes, como *calcium phosphate*, *antimicrobial activity* e *calcium phosphate and antimicrobial activity*, fez-se a restrição do tempo; para pesquisa mais específicas utilizando o nome de um fosfato específico, como *hydroxyapatite and antimicrobial activity*, não houve a restrição de tempo.

A pesquisa de patentes ocorreu nos seguintes bancos de patentes: European Patent Office (EPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO) e Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. Os acessos aos bancos de patentes ocorreram entre 2 e 5 de abril de 2014, com atualização dos resultados entre 2 e 5 de janeiro de 2015. Para a busca de patentes, utilizaram-se as mesmas palavras-chave da pesquisa de artigos, da mesma forma,

com os nomes compostos sempre entre aspas. Os campos pesquisados foram o título e o resumo, não havendo restrição do tempo. Devido à grande quantidade e diversidade de artigos encontrados, alguns critérios de exclusão foram utilizados, de modo a serem analisados apenas artigos que apresentassem contribuições relevantes ao trabalho. Dentre os critérios utilizados pode-se citar a função que a HAP desempenha no estudo e o tipo de artigo encontrado. Assim, artigos de revisão, artigos que trouxeram as palavras-chave no mesmo tópico frasal, mas sem conexão textual e artigos pagos ou inacessíveis gratuitamente foram considerados como descartados neste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigos pesquisados

A pesquisa da quantidade de artigos revelou que, ao passo em que as palavras vão sendo combinadas, observa-se uma diminuição da quantidade de publicações encontradas, mostrando que a especificidade da pesquisa revela uma pequena quantidade de publicação. A utilização das expressões mais simples como *calcium phosphate* ou *antimicrobial activity* mostra, de forma geral, uma vasta quantidade de publicações. Entretanto, combinações das expressões, como *calcium phosphate and antimicrobial activity*, mostram um refinamento da pesquisa acerca do tema estudado. As tabelas que mostram as quantidades das publicações encontradas na pesquisa, correspondentes a cada banco de artigo, estão mostradas nas Tabelas II a IV. Ao se analisar as tabelas, comparando-se o tempo de publicação dos artigos, pôde-se notar que as pesquisas dos fosfatos de cálcio, em especial a hidroxiapatita, são recentes, visto que a comparação dos dados buscados sem a limitação do tempo com os dados restritos no período entre 2004 e 2014 mostra que a maior parte das publicações se concentra neste intervalo de tempo. Sendo as palavras *hydroxyapatite*, *antimicrobial activity* e *chlorhexidine* as principais para o trabalho realizado, nota-se que a quantidade de pesquisa acerca deste tema ainda é pequena, demonstrada pela inexistência de artigos no banco de dados da Scielo.

Tabela II - Quantidades de artigos encontrados no banco de dados Scopus.

[Table II - Numbers of articles found in the Scopus database.]

Palavras-chave	Publicações (Total)	Publicações (2004 - 2014)
<i>Calcium phosphate</i>	34010	18541
<i>Antimicrobial activity</i>	58854	41003
<i>Hydroxyapatite</i>	41874	24861
<i>Chlorhexidine</i>	16339	8267
<i>Calcium phosphate and antimicrobial activity</i>	64	51
<i>Calcium phosphate and antimicrobial activity and chlorhexidine</i>	3	2
<i>Hydroxyapatite and antimicrobial activity</i>	157	145
<i>Hydroxyapatite and antimicrobial activity and chlorhexidine</i>	12	8

Tabela III - Quantidades de artigos encontrados no banco de dados Web of Science.
 [Table III - Numbers of articles found in the Web of Science database.]

Palavras-chave	Publicações (Total)	Publicações (2004 - 2014)
<i>Calcium phosphate</i>	27428	16862
<i>Antimicrobial activity</i>	41690	31191
<i>Hydroxyapatite</i>	41327	27720
<i>Chlorhexidine</i>	9476	5263
<i>Calcium phosphate and antimicrobial activity</i>	55	43
<i>Calcium phosphate and antimicrobial activity and chlorhexidine</i>	0	0
<i>Hydroxyapatite and antimicrobial activity</i>	165	145
<i>Hydroxyapatite and antimicrobial activity and chlorhexidine</i>	12	9

Tabela IV - Quantidades de artigos encontrados no banco de dados Scielo.
 [Table IV - Numbers of articles found in the Scielo database.]

Palavras-chave	Publicações (Total)	Publicações (2004 - 2014)
<i>Calcium phosphate</i>	142	122
<i>Antimicrobial activity</i>	699	629
<i>Hydroxyapatite</i>	280	232
<i>Chlorhexidine</i>	243	215
<i>Calcium phosphate and antimicrobial activity</i>	0	0
<i>Hydroxyapatite and antimicrobial activity</i>	1	0
<i>Hydroxyapatite and antimicrobial activity and chlorhexidine</i>	0	0

A Tabela V traz a comparação das quantidades de artigos encontrados nos diversos bancos de dados com relação à expressão *hydroxyapatite and antimicrobial activity and chlorhexidine*, tanto com a restrição de tempo como também sem a restrição de tempo. Outra informação fornecida pela Tabela V confirma o quanto a pesquisa sobre hidroxiapatita utilizada como agente antimicrobiano é recente. Os bancos de dados Scopus e Web of Science apresentaram 67% e 75%, respectivamente, de sua pesquisa na última década, enquanto o banco Scielo ainda não apresentou nenhuma publicação. Analisando-se os artigos encontrados com a expressão *hydroxyapatite and antimicrobial activity and chlorhexidine*, sem se fazer restrição de tempo, têm-se 12 artigos encontrados tanto no Scopus como também no Web of Science. Do total de 24 artigos, percebeu-se que 5 artigos estavam presentes em ambos bancos de dados. A divisão dos artigos pode ser melhor visualizada pelo diagrama de Venn mostrado na Fig. 1.

Ao se fazer uma análise dos 19 artigos com o objetivo de se traçar um perfil de pesquisa da hidroxiapatita como

suporte de fármaco, pôde-se fazer uma breve classificação, sendo esta feita de acordo com o objetivo que cada trabalho apresentou. A classificação é mostrada na Tabela VI. A partir dos resultados apresentados na Tabela VI e considerando os critérios de exclusão, foram analisados 14 artigos. A leitura investigativa dos 14 artigos revelou particularidades acerca da temática da atividade antimicrobiana da HAp, onde se pôde abstrair importantes informações como os microrganismos mais utilizados em testes antimicrobianos, que tipos de testes antimicrobianos são mais executados, quais os fármacos estão mais presentes e os objetivos de cada pesquisa. Uma maior visibilidade da divisão de cada objetivo apresentada pela pesquisa, dá-se pela Fig. 2, mostrando que mais de 50% das pesquisas realizadas possuem a HAp apenas com função secundária no desenvolvimento do trabalho, sendo a de apenas ser suporte para o crescimento dos microrganismos.

Com os trabalhos sempre voltados para uma aplicação antibacteriana e também para a verificação da eficácia de agentes antimicrobianos alternativos, diversos biofilmes de microrganismos foram testados. A Fig. 3 traz uma

Tabela V - Comparação entre as pesquisas.
 [Table V - Comparison among researches.]

Palavras-chave	Scopus		Web of Science		Scielo	
	Total	2004 - 2014	Total	2004 - 2014	Total	2004 - 2014
<i>Hydroxyapatite and antimicrobial activity and chlorhexidine</i>	12	8	12	9	0	0

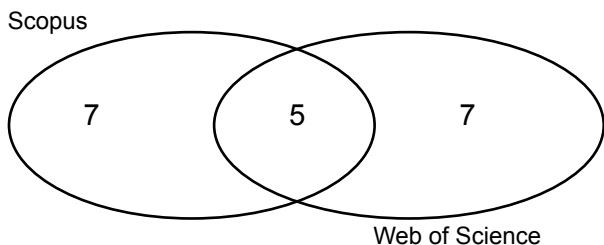


Figura 1: Separação de artigos por banco de dados. [Figure 1: Separation of articles by database.]

Tabela VI - Classificação dos artigos encontrados no Scopus e Web of Science. [Table VI - Classification of articles found in Scopus and Web of Science.]

Classificação	Quantidade de artigos
Hidroxiapatita utilizada apenas como suporte para crescimento de microrganismos	10
Hidroxiapatita aparece apenas nas referências bibliográficas	1
Síntese de hidroxiapatita e utilização para suporte de fármacos	3
Revisão	1
Inacessíveis: revistas não são assinadas pelo Portal de Periódicos Capes ou não estão disponíveis de forma gratuita	4
Total	19



Figura 2: Classificação dos artigos. [Figure 2: Classification of articles.]

visão dos microrganismos que foram testados. Dentre os microrganismos mais testados, ganha destaque a bactéria Gram-positiva *Streptococcus Mutans*, uma espécie de bactéria que age como microrganismo pioneiro que dá suporte para formação da placa bacteriana oportunizando

adesão, desenvolvimento e colonização de outros tipos de bactérias sobre a superfície dos dentes, restauração, próteses e implantes [24, 25]. *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus oralis* também ganham destaque, já que estes microrganismos sempre vêm acompanhando a adesão e a colonização iniciada pela *S. Mutans*. De forma geral, os artigos trazem sempre um biofilme misto composto por diversos microrganismos, que em geral aparecem em número de 4 a 6 tipos de microrganismos diferentes em cada biofilme.

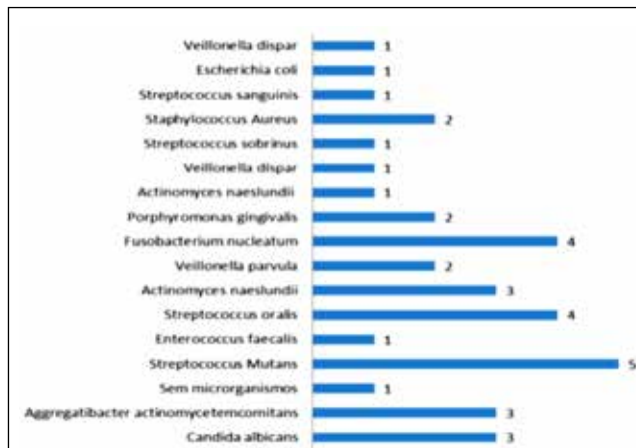


Figura 3: Variedades de microrganismos testados nos artigos analisados. [Figure 3: Varieties of tested microorganisms in the analyzed articles.]

Tabela VII - Fármacos e quantidades de vezes que foram testados. [Table VII - Medicines and amounts of times which were tested.]

Peptídeos híbridos	1
Óxido de amina	3
Sem fármaco	2
Digluconato de clorexidina	5
Digluconato de clorexidina + fluoreto de sódio	1
Digluconato de clorexidina + cloreto de cetilpiridíneo	1
Óleos (sálvia, menta e mirra)	1
Compostos polifenólicos	1
Laser semiconductor	1

Tabela VIII - Testes antimicrobianos executados. [Table VIII - Antimicrobial tests performed.]

Monitoramento da permeabilidade da membrana através de sonda fluorescente	1
Não houve teste	3
Método de diluição	6
Difusão	1
Concentração mínima inibitória	2
Aplicação de laser	1

Tabela IX - Características dos artigos estudados.
 [Table IX - Characteristics of the studied articles.]

Título/Ano de publicação	Agente antimicrobiano / Fármaco	Resumo
<i>Novel molecules for intra-oral delivery of antimicrobials to prevent and treat oral infectious diseases</i> / 2008 [28]	Peptídeos híbridos	O desenvolvimento um peptídeo híbrido que apresenta alta afinidade com o esmalte do dente (hidroxiapatita) teve sua atividade antimicrobiana testada contra <i>Candida albicans</i> e <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> . A HAp apareceu com função secundária, sendo utilizada apenas para crescimento de microrganismos
<i>Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate</i> / 2007 [29]	Óxido de amina	Buscou-se mostrar a concentração mínima de hipoclorito de sódio, concentração que não afeta as propriedades do digluconato de clorexidina. Esta união dos dois se mostra mais eficaz quando comparado com a ação de cada um individualmente. Neste trabalho a HAp apareceu apenas nas referências
<i>A simulated oral hygiene model to determine the efficacy of repeated exposure of amine oxide on the viability of Streptococcus mutans biofilms</i> / 2007 [30]	Óxido de amina	O objetivo foi verificar o efeito da exposição repetida a agentes antimicrobianos no biofilme, representando a imitação do regime de ação dos antissépticos nos cuidados orais. Com um papel secundário, a HAp foi utilizada apenas como suporte para o crescimento do biofilme dos microrganismos
<i>Activity of amine oxide against biofilms of Streptococcus mutans: a potential biocide for oral care formulations</i> / 2005 [31]	Óxido de amina	O objetivo foi avaliar o potencial da atividade bactericida do óxido de amina contra <i>Streptococcus Mutans</i> , tendo sua atividade bacteriana testada e avaliada por contagem de UFC. A HAp deu o suporte para o crescimento do microrganismo testado
<i>Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats</i> / 2003 [32]	Sem fármaco	Objetivou avaliar os efeitos de compostos que exibem atividades biológicas na composição dos biofilmes que suportam o crescimento da <i>Streptococcus Mutans</i> , com a HAp dando suporte para o cultivo do biofilme
<i>Adsorption of chlorhexidine on synthetic hydroxyapatite and in vitro biological activity</i> / 2011 [33]	Digluconato de clorexidina	Propôs a síntese de um biomaterial, HAp/CHX, tendo a incorporação do fármaco testada por UV-Vis. A avaliação microbiológica se dá por microesferas contra <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)
<i>Characterization and application of a flow system for in vitro multispecies oral biofilm formation</i> / 2014 [34]	Digluconato de clorexidina / digluconato de clorexidina + fluoreto de sódio / digluconato de clorexidina + cloreto de cetilpiridíneo	Buscou desenvolver um modelo de biofilme que cresce sob condições de baixo fluxo de material e condições de cisalhamento, avaliando a atividade de três agentes antiplacas. O crescimento das placas bacterianas se deu com a ajuda da HAp
<i>Biofilm reduction and staining potential of a 0.05% chlorhexidine rinse containing essential oils</i> / 2011 [35]	Digluconato de clorexidina	O objetivo principal foi a avaliação da potencialidade de descoloração e ação antimicrobiana de um composto formado por clorexidina, contendo óleos essenciais e componentes de álcool. Os micro-organismos estudados tiveram seu crescimento sobre a superfície da HAp
<i>Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an in vitro subgingival-biofilm model</i> / 2013 [36]	Sem fármaco	Utilizou da bioluminescência do trifosfato de adenosina (ATP) como ferramenta para avaliar a eficácia de bochechos de antissépticos bucais onde a HAp simulou a superfície dos dentes, servindo de suporte para o crescimento dos micro-organismos
<i>Development, characterization, and anti-microbial efficacy of hydroxyapatite-chlorhexidine coatings produced by surface-induced mineralization</i> / 2000 [37]	Digluconato de clorexidina	Usa a técnica de mineralização induzida sobre a superfície desejada para sintetizar hidroxiapatita como revestimento sobre pinos de fixação externa tendo a clorexidina como agente antimicrobiano. A CHX foi incorporada na hidroxiapatita após ser imersa em várias soluções e entre os ciclos de mineralização

Título/Ano de publicação	Agente antimicrobiano / Fármaco	Resumo
<i>In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of natural polyphenolic compounds on oral bacteria</i> / 2008 [24]	Compostos polifenólicos	Busca verificar a ação de diferentes compostos polifenólicos extraídos tanto do vinho tinto, do bagaço e da casca de pinho. Obteve-se ação antiplaca ao se testar contra bactérias da cavidade oral. O suporte para o crescimento dos microrganismos foi dado pela HAp
<i>Antimicrobial efficacy of semiconductor laser irradiation on implant surfaces</i> / 2003 [38]	Aplicação de laser	Verificou a ação antimicrobiana de um laser semiconductor produzido por gálio, alumínio e arseneto para ser aplicado a superfícies de implantes dentários. A ação antimicrobiana foi comparada com digluconato de clorexidina tendo a HAp como suporte para o crescimento dos biofilmes dos micro-organismos
<i>Adsorption, system release and antimicrobial properties of chlorhexidine on nanohydroxyapatite coatings</i> / 2013 [39]	Digluconato de clorexidina	Teve por objetivo a incorporação de clorexidina em nanohidroxiapatita através de adsorção na interface sólido líquido, tendo sua atividade antimicrobiana testada contra cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> e de <i>Escherichia Coli</i>
<i>In vitro effect of chlorhexidine mouth rinses on polyspecies biofilms</i> / 2011 [40]	Digluconato de clorexidina	Principal objetivo foi comparar a ação antimicrobiana da clorexidina com os enxaguantes bucais mais utilizados em Zurich. Os testes foram realizados contra uma poliespécie de biofilmes bacterianos, composta por diversos micro-organismos, onde o crescimento dos micro-organismos foi nas superfícies de HAp

Com o objetivo de possuir atividade antimicrobiana, diversos fármacos foram testados nos trabalhos analisados, sendo alguns já consagrados no mercado, ao tempo que outros tinham sua atividade antimicrobiana desconhecida ou até então não testadas. Os fármacos que foram testados e a quantidade de vezes que estes apareceram sendo aplicados estão na Tabela VII. Agentes antimicrobianos como laser semiconductor, peptídeos híbridos, compostos polifenólicos e diversos óleos tiveram sua eficácia contra microrganismos testada de forma original. Em geral, os compostos derivados de grupos aminos como o óxido de amina e digluconato de clorexidina apareceram em maior evidência e destaque. Este destaque se deve às interações eletrostáticas entre os grupos aminos, cargas positivas, presentes nos fármacos com as cargas negativas provenientes dos lipopolissacarídeos complexos, proteínas e fosfolípidios organizados de maneira complexa presentes na parede celular das bactérias [26]. Assim, a eficaz ação dos grupos aminos apresenta 50% de participação destes nas pesquisas, enquanto que a busca por novos agentes completa os 50% restantes.

As formas como os compósitos sintetizados tinham sua atividade antimicrobiana testada foram as mais diversas.

Essa variedade de testes se deve ao fato da necessidade de se comprovar a eficácia do material em relação ao objetivo proposto pelo estudo. A Tabela VIII traz o perfil dos testes antimicrobianos de compósitos de HAp com agentes antimicrobianos. Testes como monitoramento da permeabilidade da membrana através de sonda fluorescente e aplicação de laser apareceram como testes inovadores, sendo executados apenas uma vez cada. Testes mais comumente executados como o método de diluição, difusão e concentração inibitória mínima foram mais aplicados, com destaque para o método de diluição. O método de diluição é um teste simples que se limita a microrganismos de crescimento rápido, podendo estes serem microrganismos anaeróbicos ou aeróbicos, tendo seus resultados obtidos através da comparação do número da quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) entre um padrão biológico de referência (controle positivo) e as placas de testes [27]. A simplicidade e eficácia deste método o tornaram o mais executado nas pesquisas.

As análises feitas acerca dos artigos trazem juntas informações de todos os artigos, porém a Tabela IX traz um resumo dos artigos individualmente. Informações como

Tabela X - Quantidade de patentes encontradas nos bancos de patentes EPO, USPTO e INPI.
[Table X - Number of patents found in the EPO, USPTO and INPI patents database.]

Palavras-chave	EPO	USPTO	INPI
<i>Calcium phosphate</i>	9372	983	0
<i>Antimicrobial activity</i>	5377	839	0
<i>Hydroxyapatite</i>	5427	506	0
<i>Chlorhexidine</i>	1692	196	0
<i>Calcium phosphate and antimicrobial activity</i>	0	3	0
<i>Hydroxyapatite and antimicrobial activity</i>	0	4	0
<i>Calcium phosphate and antimicrobial activity and chlorhexidine</i>	0	0	0
<i>Hydroxyapatite and antimicrobial activity and chlorhexidine</i>	0	0	0

o nome do artigo, ano de publicação, fármaco utilizado e resumo estão dispostos, oportunizando assim uma análise individual de cada artigo. Do total de 19 artigos encontrados,

apenas 14 estão na tabela, já que 4 artigos não puderam ser acessados por motivos já citados anteriormente e um artigo é de revisão.

Tabela XI - Quantidade de patentes depositadas no INPI, utilizando-se palavras-chave na língua portuguesa.
[Table XI - Number of patents registered at INPI, using keywords in Portuguese.]

Palavras-chave	INPI
Fosfato de cálcio	24
Atividade antimicrobiana	26
Hidroxiapatita	26
Clorexidina	9
Fosfato de cálcio <i>and</i> atividade antimicrobiana	0
Hidroxiapatita <i>and</i> atividade antimicrobiana	0
Fosfato de cálcio <i>and</i> atividade antimicrobiana <i>and</i> clorexidina	0
Hidroxiapatita <i>and</i> atividade antimicrobiana <i>and</i> clorexidina	0

Tabela XII - Características das patentes encontrada no USPTO.
[Table XII - Characteristics of patents found in the USPTO.]

Título - Data de depósito	Inventor	Classificação	País	Resumo
<i>Silicate-substituted hydroxyapatite</i> - jul/2010 [41]	I.R. Gibson, J.S.M. Skakle	A61L/C01B/A61K	Escócia	Apresenta um biomaterial que tem em sua composição silicato e hidroxiapatita, apresentando-se como um material altamente solúvel. Por sua classificação, este material pode ser utilizado para finalidades médicas, odontológicas ou de toalete
<i>Functionally graded biocompatible coating and coated implant</i> - dez/2009 [42]	A. Rabiei	A61C/A61F/A61K	Estados Unidos	Apresenta em sua composição hidroxiapatita para ser aplicada em revestimento de implantes, podendo a hidroxiapatita ter em seu interior um agente antimicrobiano, que de acordo com sua classificação está apto para ser utilizado como próteses, preparações para finalidades médicas, para a odontologia ou método para higiene oral ou dental
<i>Antimicrobial hydroxyapatite powders containing hinokitiol, protamine or sorbic acid</i> - dez/1990 [43]	S. Sakuma, K. Atsumi, K. Fujita	A01N/A61K	Japão	Descreve um invento de pós de hidroxiapatita que contenham agentes orgânicos de hinoquitiol, protamina e ácido ascórbico que possuem função antimicrobiana e podem ser utilizados para finalidades médicas como também para conservação de corpos de seres humanos e animais
<i>Antimicrobial hydroxyapatite powders and methods for preparing them</i> - set/1989 [44]	S. Sakuma, K. Atsumi, K. Fujita	A01N/A61K/A61L	Japão	Apresenta como invenção pós de hidroxiapatita que contêm na sua composição íons metálicos (prata, cobre e zinco) provenientes de hinoquitiol, tanino, lisozima, protamina e ácido sórbico que apresentam função antimicrobiana, podendo ser utilizados para finalidades médicas, odontológicas, saúde bucal como também para conservação de corpos de seres humanos e animais
<i>Mineral precipitation system and method for inhibiting mineral precipitate formation</i> - jul/1998 [45]	J.D. Selengut, W.H.O. Johnson, S.P. Dretler, H. Asakura	C02F	Estados Unidos	Apresenta um sistema para análise de formação de precipitado mineral como também identificação de compostos que afetam a precipitação mineral, sendo os fosfatos de cálcio um dos precipitados que é evitado. Por sua classificação, esta invenção tem por finalidade tratamento de água, águas residuais, esgotos e lamas

Patentes depositadas

Com a pesquisa executada nos bancos de patentes EPO (European Patent Office), USPTO (United States Patent and Trademark Office's) e INPI (Instituto Nacional Da Propriedade Industrial), utilizando *calcium phosphate, antimicrobial activity, hydroxyapatite, chlorhexidine, calcium phosphate and antimicrobial activity, calcium phosphate and antimicrobial activity and chlorhexidine, hydroxyapatite and antimicrobial activity and chlorhexidine*, foram obtidos os resultados mostrados na Tabela X. Em decorrência dos resultados encontrados pela pesquisa executada no banco de patentes do INPI estarem todas zeradas, a pesquisa foi refeita utilizando-se as mesmas expressões, porém estas estando na língua nativa, o português. O resultado está mostrado na Tabela XI. Mesmo se utilizando as palavras-chave da pesquisa em português, não foi possível se encontrar resultados para os depósitos de patentes no INPI. A Tabela X mostra que a quantidade de depósitos encontrados para a expressão *hydroxyapatite and antimicrobial activity and chlorhexidine* indica que um trabalho neste tema é inovador, apoiado nos resultados obtidos pela pesquisa da quantidade dos artigos que possuíram apenas 3 publicações com esta expressão.

Ao se fazer uma análise acerca dos 7 depósitos de patentes (3 patentes com a expressão *calcium phosphate and antimicrobial activity* e 4 patentes com a expressão *hydroxyapatite and antimicrobial activity*) encontrados no banco de patentes USPTO para se observar o perfil das patentes, observou-se que duas patentes se encontram repetidas em ambas pesquisas, permanecendo apenas 5 patentes que tratam da atividade antimicrobiana da hidroxiapatita. Após leitura das patentes, pôde-se chegar à conclusão de que uma patente das cinco encontradas traz a expressão fosfato de cálcio apenas como um precipitado que se deseja evitar ou detectar caso se inicie, sendo sua aplicação voltada para o tratamento de dejetos, lamas e águas residuais. As 4 patentes restantes apresentaram pós de hidroxiapatita que tinham em sua estrutura a incorporação de agentes antimicrobianos. A finalidade destas invenções sempre se volta para aplicações médicas, odontológicas e até conservação do corpo humano e de animais. Na Tabela XII encontram-se as informações acerca das 5 patentes encontradas. Pode-se entender que a inexistência de depósito de patentes como consequência da baixa quantidade de publicações, quanto também entender que, nesta área de pesquisa bastante promissora, ainda não existe um elo entre os centros produtores de conhecimento, as universidades e os grandes produtores, indústrias, os agentes transformadores de ciência em tecnologia aplicada.

CONCLUSÕES

Analisados os artigos e as patentes encontrados percebe-se que os artigos apresentam a hidroxiapatita mais como um agente secundário da pesquisa, onde, em mais da metade dos artigos (52%), a HAp exerce apenas a função de suporte

para crescimento de microrganismos, o biofilme. Acerca dos microrganismos testados, a *Streptococcus Mutans*, bactérias consideradas agente colonizador pioneiro, foi a que mais apareceu nos estudos. O método de diluição foi o teste antimicrobiano mais executado, onde o principal motivo apresentado para a escolha do teste é a simplicidade e eficácia do mesmo. Dentre os agentes antimicrobianos estudados, diversos fármacos alternativos foram utilizados, mas com destaque aos já consagrados no mercado, que possuem grupamentos amins na sua composição molecular. Sobre as patentes, nenhuma foi encontrada, onde se aponta como maior causa para a inexistência de patentes acerca do tema o recente início da pesquisa nesse campo de pesquisa, como também a possível inexistência do elo entre universidades e empresas.

AGRADECIMENTOS

A CAPES, CNPQ, FAPEPI e UFPI.

REFERÊNCIAS

- [1] J.C. Elliot, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, 18th Ed., Elsevier Science, Londres (1994) 8.
- [2] F.H. Albbe, *Annu. Surgery* **71** (1920) 32-36.
- [3] G.E. Levitt, *J. Biomed. Mater. Res.* **3** (1969) 683-685.
- [4] E.A. Monroe, W. Votava, D.B. Bass, J. McMullen, *J. Dent. Res.* **50** (1971) 860-862.
- [5] J.D.B. Featherstone, *J. Am. Dent. Assoc.* **131** (2000) 887-899.
- [6] E. Kidd, *J. Dent.* **39**, 2 (2011) 3-8.
- [7] A. Stellar, S. Teitelbaum, In: *Essential pathology*, Ed.: E. Rubin, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, EUA (2001).
- [8] A.T. Qureshi, L. Terrell, W.T. Monroe, V. Dasa, M.E. Janes, J.M. Gimble, D.J. Hayes, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **8** (2014) 386-395.
- [9] Mayo Foundation for Medical Education and Research, Osteomyelitis, <http://www.mayoclinic.com/print/osteomyelitis/DS00759/DSECTION=all&METHOD=print>.
- [10] News Medical - The A to Z of Medical News, Osteomyelitis-Causes, <http://www.news-medical.net/health/Osteomyelitis-Causes.aspx>.
- [11] R.A. Almeida, K.R. Matthews, E. Cifrian, A.J. Guidry, S.P. Oliver, *J. Dairy Sci.* **79**, 6 (1996) 1021-1026.
- [12] A.F. Radovic-Moreno, T.K. Lu, V.A. Puscasu, C.J. Yoon, R. Langer, O.C. Farkhzad, *ACS Nano* **6** (2012) 4279-4287.
- [13] A. Carlén, K. Nikdel, A. Wennerberg, K. Holmberg, J. Olsson, *Biomater.* **22**, 5 (2001) 481-487.
- [14] M. Quirynen, *J. Dent.* **22**, 1 (1994) 13-16.
- [15] R.A. Burne, *J. Dent. Res.* **77** (1998) 445-452.
- [16] A.C. Guastaldi, A.H. Aparecida, *Quím. Nova* **33**, 6 (2010) 1352-1358.
- [17] A.H. Aparecida, M.V.L. Fook, M.L. Santos, A.C. Gustaldi, *Quím. Nova* **30**, 4 (2007) 892-896.

- [18] A.C.F.M. Costa, M.G. Lima, L.H.M.A. Lima, V.V. Cordeiro, K.M.S. Viana, C.V. Sousa, *Rev. Eletr. Mater. Proces.* **4**, 3 (2009) 29-38.
- [19] A.A. Campbell, *Mater. Today* **6**, 11 (2003) 26-30.
- [20] D. Skrtic, J.M. Antonucci, E.D. Eanes, F.C. Eichmiller, G.E. Schumacher, *J. Biomed. Mater. Res.* **53B** (2000) 381-391.
- [21] S.H. Dickens, G.M. Flaim, S. Takagi, *Dent. Mater.* **19** (2003) 558-566.
- [22] S.E. Langhorst, J.N.R. O'Donnell, D. Skrtic, *Dent. Mater.* **25** (2009) 884-891.
- [23] J. Schnieders, U. Gbureck, E. Vorndran, M. Schossig, T. Kissel, *J. Biomed. Mater. Res. Part B* **99B** (2011) 391-398.
- [24] A. Furiga, A. Lonvaud-Funel, G. Dornignac, C. Badet, *J. Appl. Microbiol.* **105** (2008) 1470-1476.
- [25] F.B. Zanatta, C.K. Rösing, *Scientifi-A* **1**, 2 (2007) 35-43.
- [26] G. Rölla, B. Melsen, *J. Dentist Res.* **54 B** (1975) 57-62.
- [27] E.A. Ostrosky, M.K. Mizumoto, M.E.L. Lima, T.M. Kaneko, S.O. Nishikawa, B.R. Freitas, *Rev. Bras. Farmacogn* **18** (2008) 301-307.
- [28] P.A. Raj, L. Rajkumar, A.R. Dentino, *Biochem. J.* **409** (2008) 601-609.
- [29] B.R. Basrani, S. Manek, R.N.S. Sodhi, E. Fillery, A. Manzur, *J. Endod.* **33** (2007) 966-969.
- [30] S. Fraud, J-Y. Maillard, S.P. Denyer, M.A. Kaminski, G.W. Hanlon, *Eur. J. Oral Sci.* **115** (2007) 71-76.
- [31] S. Fraud, J-Y. Maillard, S.P. Denyer, M.A. Kaminski, G.W. Hanlon, *J. Antimicrob. Chemother.* **56** (2005) 672-677.
- [32] H. Koo, S.K. Pearson, K. Scott-Anne, J. Abranches, J.A. Cury, P.L. Rosalen, Y.K. Park, R.E. Marquis, W.H. Bowen, *Oral Microbiol. Immunol.* **17** (2003) 337-343.
- [33] C.S.A. Soriano, A.P.V. Colombo, R.M. Sousa, C.M. Silva-Boghossian, J.M. Granjeiro, G.G. Alves, A.M. Rossi, M.H.M. Rocha-Leão, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **87** (2011) 310-318.
- [34] V. Blanc, S. Isabal, M.C. Sanchez, A. Llama-Palacios, D. Herrera, M. Sanz, R. Leon, *J. Periodont. Res.* **49** (2014) 323-332.
- [35] D. Hofer, A. Meier, B. Sener, B. Guggenheim, T. Attin, P.R. Schmidlin, *Int. J. Dent. Hyg.* **9** (2011) 60-67.
- [36] M. Sánchez, A. Llama-Palacios, M. Marín, E. Figuero, R. León, V. Blanc, D. Herrera, M. Sanz, *Med. Oral Patol. Oral* **18** (2013) 86-92.
- [37] A.A. Campbell, L. Song, X.S. Li, B.J. Nelson, C. Bottoni, D.E. Brooks, E.S. DeJong, *J. Biomed. Mater. Res.* **53** (2000) 400-407.
- [38] M. Kreisler, W. Kohnen, C. Marinelo, J. Schoof, E. Langnau, B. Jansen, B. d'Hoedt, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **18** (2003) 706-711.
- [39] J. Barros, L. Grenho, C.M. Manuel, O.C. Nunes, L.F. Melo, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, *Eur. Cells Mater. Suppl.* **26** (2013) 30.
- [40] B. Guggenheim, A. Meier, *Schweiz Monatsschr Zahnmed* **121** (2011) 432-436.
- [41] I.R. Gibson, J.S.M. Skakle, *Silicate substituted hydroxyapatite*, USPTO, 8545895 (2013).
- [42] A. Rabiei, *Functionally graded biocompatible coating and coated implant*, USPTO, 8535722 (2013).
- [43] S. Sakuma, K. Atsumi, K. Fujita, *Antimicrobial hydroxyapatite powders containing hinokitiol, protamine or sorbic acid*, USPTO, 5268174 (1993).
- [44] S. Sakuma, K. Atsumi, K. Fujita, *Antimicrobial hydroxyapatite powders and methods for preparing them*, USPTO, 5009898 (1991).
- [45] J.D. Selengut, W.H. OrmeJohnson, S.P. Dretler, H. Asakura, *Mineral precipitation system and method for inhibiting mineral precipitate formation*, USPTO, 5776348 (1998).
- (Rec. 22/09/2015, Rev. 01/12/2015, 08/03/2016, Ac. 08/03/2016)