

Avaliação da presença de microrganismos aeróbios em blocos de cimento fosfato de cálcio submetidos a três técnicas de esterilização

Evaluation of the aerobic microorganisms presence in calcium phosphate cement blocks submitted to three methods of sterilization

Adriana Corsetti*
Mauro Gomes Trein Leite*
Deise Ponzoni**
Edela Puricelli***

Resumo

O fosfato de cálcio previamente moldado pode ser utilizado para reconstruções em regiões bucomaxilofaciais. A esterilização prévia desse material é um importante passo na prevenção de processos inflamatórios e infecciosos. No presente trabalho foram utilizados quatro blocos de cimento de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), divididos em quatro grupos, cada qual contendo uma peça. Os processos de esterilização para os três grupos experimentais foram: autoclave ou calor úmido (Grupos 1a e 1b), peróxido de hidrogênio (Grupos 2a e 2b) e óxido de etileno (Grupos 3a e 3b). O grupo de controle (Ca e Cb) não foi submetido à esterilização. Inicialmente, cada bloco foi semeado em tubo contendo caldo tripticase de soja (TSB) (Grupos a). Os meios líquidos resultantes foram semeados em placas de Petri contendo ágar sangue (Grupos b). Os meios de cultura sofreram processo de incubação em aerobiose. Os resultados foram determinados pela turvação ou não dos meios líquidos e pela presença ou não de colônias bacterianas nos meios sólidos. Ao contrário do grupo de controle, não houve crescimento bacteriano em nenhum dos grupos experimentais. O resultado do exame bacterioscópico ou método de Gram do grupo de controle mostrou numerosos *Staphylococcus sp* e *Streptococcus sp*. Conclui-se que os métodos de esterilização testados calor úmido ou autoclave, peróxido de hidrogênio e óxido de etileno são eficazes para aeróbios. Recomenda-se a utilização do processo de esterilização de blocos de

fosfato de cálcio para implantação *in vivo*. Sugerem-se novos estudos para avaliação das propriedades mecânicas deste material após o processo de esterilização.

Palavras-chave: Esterilização. Métodos. Materiais biocompatíveis.

Introdução

Numerosos materiais de implante vêm sendo testados nas cirurgias para reconstruções ósseas. Dentre esses se podem citar os metais (titânio, platina), os polímeros (polietileno, poliéster, silicone) e as cerâmicas (hidroxiapatita, cimento de fosfato de cálcio)^{1,2}.

A primeira fórmula de cimento de fosfato de cálcio foi desenvolvida por Brown e Chow³ (1986). Esses cimentos não são um componente natural do osso. Sendo absorvíveis, estão indicados quando a bioabsorção é desejável para posterior substituição por tecido ósseo. Em virtude de suas propriedades químicas, o cimento de fosfato de cálcio participa da formação de hidroxiapatita (HA) quando implantado *in vivo*³⁻⁶.

Em seus estudos, Chow et al⁷. (1991) e Driessens et al⁸. (1997) afirmam que os cimentos de fosfato de

* Mestres em Clínicas Odontológicas – CTBMF – FO-UFRGS.

** Mestre e Doutora em CTBMF; professora do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da FO-UFRGS.

*** Doutora pela Universidade de Dusseldorf, Alemanha; professora permanente do Programa de Pós-Graduação em Clínicas Odontológicas, nível mestrado e doutorado FO-UFRGS; chefe da Unidade de CTBMF – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA – UFRGS.

cálcio apresentam uma série de vantagens quando utilizados em aplicações biomédicas. Por isso, são objetos de intenso estudo, principalmente por se apresentarem como materiais biocompatíveis e bioativos. Para ser biocompatível, o material não deve causar efeitos nocivos no local de sua inserção ou no sistema biológico como um todo⁹⁻¹³. Por sua vez, bioativos são os materiais que, em razão de sua similaridade química com a parte mineral do tecido ósseo, ligam-se a ele, permitindo a osteocondução. Assim, resulta a produção de um novo osso, pela proliferação e migração de células osteocompetentes ao longo de um condutor¹⁴⁻¹⁶. Combinando-se biocompatibilidade/bioatividade, estimula-se uma deposição direta de osso na superfície dos materiais^{17,18}.

Estudos sobre a osteocondutibilidade desses cimentos realizados por Yuan et al.¹⁹ (2000) demonstraram que os osteoblastos secretam matriz no sítio onde os osteoclastos estão reabsorvendo o cimento.

As principais características do cimento de fosfato de cálcio são ausência de toxicidade e de propriedades alogênicas ou carcinogênicas, reabsorvibilidade e condução, associadas à estimulação da neoformação óssea^{19,20}.

Santos²¹ (2002) implantou blocos cilíndricos de cimento de fosfato de cálcio baseado no α -fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) em osso rádio de coelhos. Nas suas formulações acrescentou de forma isolada poliacrilamida, fibras de carbono, fibras de polipropileno ou fibras de náilon, no intuito de aumentar sua resistência, criando, assim, quatro diferentes cimentos. O autor concluiu que o cimento de fosfato de cálcio testado é biocompatível em todas as formulações. Observou pequena reabsorção do cimento de fosfato de cálcio nos períodos estudados, com formação de tecido conjuntivo de espessura reduzida junto a todos os implantes. Além disso, parte das fibras liberadas do cimento foram envoltas por tecido fibroso, exceto as de carbono.

Hong et al.²² (2003) analisaram, em estudo *in vitro*, o comportamento de células osteoblásticas quanto à adesão, proliferação, expressão de genes marcadores e formação de matriz óssea mineralizada num substrato de filme de cristais de fosfato de cálcio. Foram utilizadas células osteoblásticas primárias de calvária de feto de rato em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino. A superfície rugosa do material apresentou um número maior de células aderidas, estatisticamente significativas em relação à cultura sobre discos lisos de polipropileno. As células cultivadas sobre o fosfato de cálcio expressam genes marcadores como a fosfatase alcalina, osteocalcina, osteonectina e osteopontina, analisados por meio da técnica de transcrição reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Os resultados demonstraram que os osteoblastos cultivados sobre o fosfato de cálcio exibem atividade celular de adesão, proliferação, diferenciação e formação de matriz calcificada.

Santos²¹ (2002) desenvolveu uma composição de cimento de fosfato de cálcio baseada no α -fosfato tricálcico, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, com a adição de um redutor de líquido, o poliacrilato de amônia.

Dentre as várias possibilidades de esterilização, os métodos a vapor ou autoclave, peróxido de hidrogênio e óxido de etileno são, no momento, os mais utilizados no preparo dos instrumentais e materiais cirúrgicos. A esterilização em autoclave é um método rápido, com grande poder de penetração e inócuo para a maioria dos materiais²³.

Autores como Feldman e Hui²⁴ (1997) e Kyi et al.²⁵ (1995) afirmam que os métodos de esterilização com plasma de gás, como o peróxido de hidrogênio, não produzem resíduos tóxicos; seus subprodutos não são nocivos ao meio ambiente, ao contrário do óxido de etileno. Com menor tempo para aeração, apresentam-se como um processo eficaz, de fácil acesso, rápido e de menor custo.

Segundo Ries et al.²⁶ (1996) e Page e Cyr²⁷ (1998), o óxido de etileno é um método eficaz. Suas desvantagens estão no ciclo de esterilização longo, na alta toxicidade e no alto custo.

Considerando a potencialidade dos cimentos de fosfato de cálcio e a escassa literatura a respeito de métodos de esterilização sobre estes materiais, trabalhos experimentais como este visam avaliar a eficácia e a possibilidade de utilização das técnicas citadas.

O desenvolvimento deste trabalho propõe-se:

- avaliar a eficácia dos métodos de esterilização sobre o cimento de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), em calor úmido ou autoclave, peróxido de hidrogênio e óxido de etileno, comparando-os com o grupo de controle (sem esterilização prévia);
- comprovar a possibilidade de esterilização desses materiais para o uso biológico.

Materiais e método

O cimento de fosfato de cálcio submetido aos processos de esterilização foi confeccionado no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Cada bloco pré-curado mediu 6 mm de diâmetro por 3 mm de espessura e foi confeccionado com cimento de fosfato de cálcio baseado no α -fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e adição de redutor de líquido, o poliacrilato de amônia²¹. As peças lisas, livres de ranhuras superficiais, tinham coloração branco-gesso característica.

Cada peça do material foi embalada em polietileno. Seguiu-se a esterilização em autoclave (processo físico) a 121 °C durante 15min.; em plasma de peróxido de hidrogênio (processo físico-químico)

a 45 °C durante 50min e em óxido de etileno – 600 mg/L (processo físico-químico) a 55 °C durante 4h, conforme protocolo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre²⁸. Tanto os corpos-de-prova de teste esterilizados quanto os corpos-de-prova de controle não esterilizados foram independentemente semeados em meio líquido de caldo tripticase de soja (TSB) (Grupos a). Passadas 72h, o meio de cultura líquido obtido de cada grupo foi semeado em placas de Petri contendo ágar sangue (Grupos b).

Em ambos os procedimentos, utilizou-se o protocolo de semeadura à chama, evitando-se a contaminação contida no ar ambiente.

Os grupos foram divididos em:

Grupo 1a - bloco esterilizado em autoclave; semeado em caldo TSB;

Grupo 1b - meio líquido do Grupo 1a; semeado em ágar sangue;

Grupo 2a - bloco esterilizado em peróxido de hidrogênio; semeado em caldo TSB;

Grupo 2b - meio líquido do Grupo 2a; semeado em ágar sangue;

Grupo 3a - bloco esterilizado em óxido de etileno; semeado em caldo TSB;

Grupo 3b - meio líquido do Grupo 3a; semeado em ágar sangue;

Grupo Ca - bloco não esterilizado; semeado em caldo TSB;

Grupo Cb - meio líquido do Grupo Ca; semeado em ágar sangue.

Realizou-se ainda o teste de esterilização do meio. Os procedimentos, seguindo o protocolo anteriormente especificado, resultaram nos Grupos “T”:

Grupo Ta - meio líquido TSB; ausência do bloco de fosfato de cálcio;

Grupo Tb - meio líquido do Grupo Ta; semeado em ágar sangue.

Tanto os tubos de ensaio como as placas de Petri, em tempos diferentes, sofreram processo de incubação em estufa a 37 °C, sob aeração.

A avaliação dos resultados dos meios líquidos foi feita por identificação macroscópica de turvação do meio. O estudo experimental controlado foi realizado no setor de bacteriologia (Laboratório Knijnik Ltda, avenida Cairú, 1293. Porto Alegre. NBR ISO 9001:2000).

Para os resultados dos meios sólidos fez-se a identificação macroscópica, sendo nestes considerada a presença ou ausência de colônias bacterianas no meio de cultura após o período de incubação (segundo protocolo do laboratório).

Resultados

Nos grupos experimentais 1a, 2a e 3a, esterilizados, respectivamente, em autoclave, peróxido de hidrogênio e óxido de etileno e semeados em caldo TSB, não houve crescimento bacteriano (Tab. 1),

constatado pela ausência de turvação dos meios (Fig. 1). Já no grupo de controle (Ca) houve crescimento de microrganismos, constatado pela turvação do meio (Fig. 2).

Tabela 1 - Crescimento bacteriano nos três métodos de esterilização, mostrando presença (+) ou ausência (-) de crescimento bacteriano nos tubos com TSB (Grupos a) e nas placas de Petri com ágar sangue (Grupos b) analisados

Tipos de esterilização	Grupos	Crescimento bacteriano
Autoclave	1a	-
	1b	-
Peróxido de hidrogênio	2a	-
	2b	-
Óxido de etileno	3a	-
	3b	-
Sem esterilização	Ca	+
	Cb	+

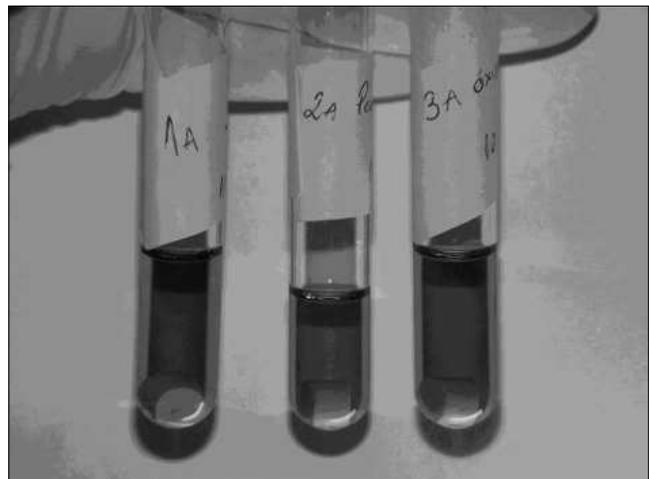


Figura 1 - Tubos de ensaio contendo a peça esterilizada (Grupos 1a, 2a e 3a), após 72h de incubação. Os meios apresentam-se límpidos, evidenciando a ausência de microrganismos



Figura 2 - Tubo de ensaio contendo a peça não esterilizada (grupo de controle), após 72h de incubação. A turbidez do meio demonstra a contaminação bacteriana

Nos grupos experimentais 1b (Fig. 3), 2b e 3b, semeados em placas de Petri contendo ágar sangue, não houve crescimento bacteriano. Porém, no grupo de controle (Cb) grande contaminação bacteriana foi constatada pela presença de colônias em toda a extensão da placa (Fig. 3).

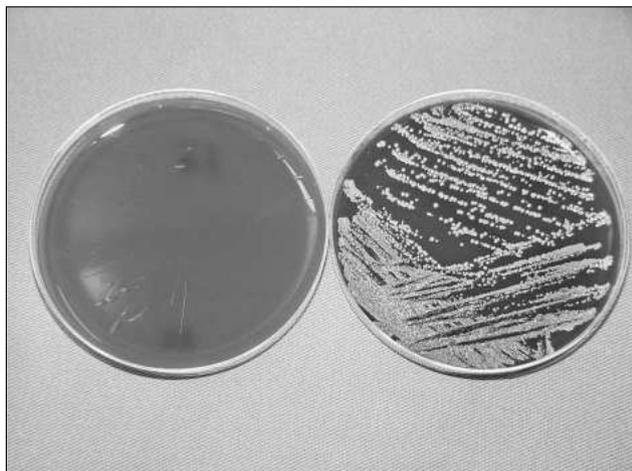


Figura 3 - À esquerda, placa de Petri do Grupo 1b: ausência de colônias de bactérias. À direita, placa de Petri do grupo de controle: presença de grande contaminação de microrganismos em toda a extensão da placa

O resultado do exame bacterioscópico ou método de Gram do grupo de controle mostra “numerosos cocos Gram positivos em aglomerados (*Staphylococcus*) e em cadeias (*Streptococcus*)”. No exame bacteriológico do mesmo grupo há referência ao crescimento de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* sp e *Streptococcus* sp, confirmando os achados do exame bacterioscópico.

Nos grupos Ta e Tb não houve turvação dos meios líquidos (Fig. 4) nem crescimento bacteriano nas placas de Petri (Tab. 2).



Figura 4 - Grupo Ta. Ausência de contaminação

Tabela 2 - Controle padrão ouro dos meios de cultura. Teste de esterilização dos meios, mostrando presença (+) ou ausência (-) de crescimento bacteriano nos tubos (TSB) e nas placas de Petri (ágar sangue) analisados

Tipos de meio	Crescimento bacteriano
Meio líquido (Ta)	-
Meio sólido (Tb)	-

Discussão

O calor úmido tem sido o método de esterilização mais utilizado em razão do baixo custo e da maior facilidade de acesso. Segundo Yuan et al.¹⁹ (2000), a utilização desse sistema não revelou reações do tipo inflamatórias no local do implante. Concordando com Burnett et al.²³ (1976), o método, além de eficaz (Tab. 1), é de fácil obtenção, rápido e econômico.

O fosfato de cálcio utilizado neste estudo apresenta-se como um material poroso, necessitando-se, assim, de um método de esterilização de alta penetração. Burnett et al.²³ (1976) afirmam que o calor úmido tem grande poder de penetração, combinando com os resultados aqui apresentados.

Com relação à utilização de peróxido de hidrogênio, Feldman e Hui²⁴ (1997) e Kyi et al.²⁵ (1995) classificam-no como um sistema eficaz e de extrema facilidade de acesso, corroborando os resultados obtidos (Tab. 1). Na esterilização em peróxido de hidrogênio o método é seguro e igualmente eficaz se comparado à autoclave. As baixas temperaturas não oferecem qualquer risco de alteração da composição do material.

Os resultados obtidos neste estudo laboratorial (Tab. 1) vão ao encontro da literatura discutida em relação ao óxido de etileno. Apesar de comprovadamente eficaz, os autores acreditam que seu uso deve ser restrito. Como já demonstrado, dispõe-se de métodos igualmente eficazes, que utilizam baixas temperaturas e são atóxicos, rápidos e de baixo custo²³⁻²⁵.

O presente trabalho apresenta-se como um estudo microbiológico, não tendo sido avaliada a reação química nas peças de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ após o processo de esterilização.

Conclusões

- Conclui-se que os métodos de esterilização testados calor úmido ou autoclave, peróxido de hidrogênio e óxido de etileno são eficazes para aeróbios.
- Recomenda-se a utilização do processo de esterilização de blocos de fosfato de cálcio para implantação *in vivo*.

- Guardadas suas características, há uma tendência à indicação do calor úmido (autoclave) ou peróxido de hidrogênio como meio mais apropriado de esterilização para o fosfato de cálcio.
- Sugerem-se novos estudos para avaliação das propriedades mecânicas deste material após o processo de esterilização.

Agradecimentos

Ao Dr. Renato Knijnik, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho. À Dr^a Cássia Maria Cardoso e à Dr^a Giovana Pereira, farmacêuticas bioquímicas, pelo atendimento especializado para a realização do trabalho.

Abstract

Calcium phosphate previously molded can be used for reconstruction in oral maxillofacial regions. The previous sterilization of this biomaterial is an important step on the prevention of inflammatory and infectious processes. Four blocks of calcium phosphate cement (Ca₃(PO₄)₂) were used in this work, divided into four groups, each one consisting of one part. The sterilization methods used to the three experimental groups were the following: autoclave or steam sterilization (Groups 1a and 1b), peroxide hydrogen (Groups 2a and 2b) and ethylene oxide (Groups 3a e 3b). The control group (Ca and Cb) was not submitted to sterilization. Initially the each block was placed in tubes containing tryptic soy broth TSB (Groups a). The resulting liquid media were placed in Petri plates containing blood agar (Groups b). The culture media suffered incubation process in aerobiosis and the results were determined through bleary or not bleary liquid media or through the presence or not of bacterial colonies in solid media. Contrary to the control group, there was no bacterial growth in any of the experimental groups. The result of the bacterioscopy examination or GRAM method of the control group showed numerous *Staphylococcus sp* and *Streptococcus sp*. It can be concluded that the methods tested, that is, the autoclave or steam sterilization, ethylene oxide peroxide hydrogen are efficient for aerobiosis. The use of the blocks of calcium phosphate Sterilization method for implantation in vivo is recommended and as well as new studies for evaluation of mechanical properties of this material after the sterilization process.

Key-words: Ssterilization. Methods. Biocompatible materials.

Referências

1. Kurashina K, Kurita H, Kotani A, Kobayashi K, Kyoshima K, Hirano M. Experimental cranioplasty and skeletal augmentation using α -tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement: a preliminary short-term experiment in rabbits. *Biomaterials* 1998; 19:701-6.
2. Puricelli E, Baraldi CE, Ponzoni D, Peschke R. Estudo histológico do polímero poliuretano da mamona implantado no ângulo mandibular de ratos. *Rev Fac Odontol Porto Alegre* 1999; 40(1):38-41.
3. Brown WE, Chow LC. A new calcium phosphate, water-setting cement. In: Brown PW. *Cements Research Progress*. Westerville: American Ceramic Society; 1986. p. 351-79.
4. Mirtchi AA, Lemaitre J, Munting E. Calcium phosphate cements: study of the β -tricalcium phosphate-dicalcium phosphate-calcite cements. *Biomater* 1990; 11:83-8.
5. Mirtchi AA, Lemaitre J, Munting E. Calcium phosphate cements: effect of fluorides on the setting and hardening of α -tricalcium phosphate-dicalcium phosphate-calcite cements. *Biomater* 1991; 12:505-10.
6. Bermudez O, Boltong MG, Driessens FCM, Planell JA. Development of some calcium phosphate cements from combination of α -TCP, MCPM and CaO. *J Mater Sci Mater Med* 1994; 5:160-3.
7. Chow LC, Takagi S, Constantino CD, Friedman CD. Self-setting calcium phosphate cements. *Mater Res Soc Symp Proc* 1991; 179:3-24.
8. Driessens FCM, Fernández E, Ginebra MP, Boltong MG, Planell JA. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. *Anal Quim Int Ed* 1997; 93:38-43.
9. Nishimura N, Yamamuro T, Taguchi Y, Ikenaga M, Nakamura T, Kokubo T et al. A new bioactive bone cement: its histological and mechanical characterization. *J Appl Biomater* 1991; 2:219-29.
10. Driessens FCM, Boltong MG, Zapatero MI, Verbeeck RMH, Bonfield W, Bermudez O et al. *In vivo* behaviour of three calcium phosphate cements and a magnesium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 1995; 6:272-8.
11. Kurashina K, Kurita H, Hirano M, de Blicke JMA, Klein CPAT, de Groot K. Calcium phosphate cement: *in vitro* and *in vivo* studies of α -tricalcium phosphate-dicalcium phosphate dibasic-tetracalcium phosphate monoxide system. *J Mater Sci Mater Med* 1995; 6:340-7.
12. Kurashina K, Kurita H, Kotani A, Klein CPAT, de Groot K. *In vivo* study of calcium phosphate cements: implantation of an α -tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement paste. *Biomaterials* 1997a; 18:539-43.
13. Kurashina K, Kurita H, Kotani A, Takeuchi H, Hirano M. *In vivo* study of calcium phosphate cement consisting of α -tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide. *Biomaterials* 1997b; 18:147-52.
14. Koshino T, Kubota W, Morii T. Bone formation as a reaction to hydraulic hydroxyapatite thermal decomposition product used as bone cement in rabbits. *Biomater* 1996; 16:125-8.
15. Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Yuasa M, Kon M, Nagayama M et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: setting behaviour in calf serum and its tissue response. *Biomater* 1996; 17:1429-35.
16. Tenhuisen KS, Brown PW. Variation in solution chemistry during calcium-deficient and stoichiometric hydroxyapatite formation from CaHPO₄·2H₂O and Ca₄(PO₄)₂O. *J Biomed Mater Res* 1997; 36:233-41.
17. Paris MF. Reconstrução de osso alveolar, em área dentada, com uso de hidroxiapatita: estudo experimental em ratos *Rattus norvegicus albinus*, Cepa Wistar [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2002.
18. Schenk RK. Regeneração óssea: bases biológicas. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK. *Regeneração óssea guiada na Implantodontia*. Chicago: Quintessence Books; 1996. p. 49-100.

19. Yuan H, Li Y, de Bruijn JD, de Groot K, Zhang X. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomater* 2000; 21:1283-90.
20. Lemaitre J, Mirtchi A, Mortier A. Calcium phosphate cement for medical use: state of the art and perspectives of development. *Sil Ind Ceram Sci Technol* 1987; 52:141-6.
21. Santos LA. Cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras [Tese de Doutorado]. Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas; 2002. p. 249.
22. Hong JY, Kim YJ, Lee HW, Lee WK, Ko JS, Kim HM. Osteoblastic cell response to thin film of poorly crystalline calcium phosphate apatite formed at low temperatures. *Biomater* 2003; 24:2977-84.
23. Burnett GW, Scherp HW, Schuster GS. *Microbiologia Oral e Doenças Infecciosas*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1976. p.12-26.
24. Feldman LA, Hui HK. Compatibility of medical devices and materials with low-temperature hydrogen peroxide gas plasma. *Med Dev Diag Ind* 1997; 19:57-62.
25. Kyi MS, Holton J, Ridgway GL. Assessment of the efficacy of a low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization system. *J Hosp Infect* 1995; 31:275-84.
26. Ries MD, Weaver K, Beals N. Safety and efficacy of ethylene oxide sterilized polyethylene in total knee arthroplasty. *Clin Orthop* 1996; 331:159-63.
27. Page BF, Cyr H. A guide to AAMI's TIR for EtO-sterilized medical devices. *Med Dev Diag Ind* 1998; 20:73-8.
28. HCPA - Implicações na Prática da Enfermagem. Atualização em Centro de Material e Esterilização. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 2002. p. 61-80.

Endereço para correspondência

Adriana Corsetti
 Rua Gonçalo de Carvalho 271/1002
 Bairro Floresta
 90035-170 Porto Alegre - RS
 Fone: (51) 9972-5227; 3222-6767
 E-mail: adriana@vecor.com.br