



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“ATIVIDADE BACTERICIDA E INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE
BIOFILMES DE *staphylococcus aureus* PELO VIDRO BIOATIVO F18”**

TATHIANE FERRONI PASSOS *

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Clovis W. Oliveira de Souza

* bolsista CAPES - 1674448

**São Carlos - SP
2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“ATIVIDADE BACTERICIDA E INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE
BIOFILMES DE *staphylococcus aureus* PELO VIDRO BIOATIVO F18”**

TATHIANE FERRONI PASSOS *

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Clovis W. Oliveira de Souza

*** bolsista CAPES - 1674448**

**São Carlos - SP
2019**



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Tathiane Ferroni Passos, realizada em 21/02/2019:

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar

Profa. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan
USP

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Raquel e Adevar. Em especial à minha mãe, esteja onde estiver, que sempre vibra por mim. Com eterna gratidão, sem o apoio e incentivo de vocês não seria possível chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois, mesmo em momentos de pouca fé, sei que nunca deixou de olhar por mim.

À minha mãe, Raquel, que por muito tempo foi meu anjo na terra e hoje olha por mim do céu. Agradeço pelo amor incondicional e por sempre acreditar que eu conseguiria, até mesmo mais do que eu mesma. Meus agradecimentos se estendem muito além deste. Este trabalho é para você.

Ao meu pai, Adevar, pois, graças ao incentivo e apoio eu ingressei e hoje termino meu mestrado. Agradeço ainda pela imensa confiança depositada em mim. Aos meus irmãos, Neto e Rodrigo, por serem meus primeiros amigos, pela força e encorajamento. À Giseli, minha cunhada, amiga, irmã, pelas longas conversas e por sempre me mostrar o lado bom das coisas.

Ao Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza pela incrível orientação, confiança e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À toda equipe do LaMaV, em especial à Marina Trevelin por toda paciência em esclarecer minhas dúvidas, pela colaboração durante todo o projeto e troca de ideias.

À Zélia Venézio por todo o suporte durante a realização dos experimentos, imensa amizade, carinho e conversas.

A todos os amigos do LMP, que nestes últimos dois anos tem sido como uma segunda família. Vocês foram extremamente importantes.

Às minhas amigas de Araraquara Marina, Rosimeire e Bruna por aturarem minhas constantes reclamações e me entenderem mesmo sem ter a mesma vivência.

Aos amigos que fiz em São Carlos e levarei para a vida, Isabeli, Cristian, Chiara, Pedro e Robert pela torcida, pelas histórias vividas e por ajudar a tornar o período de mestrado muito mais leve.

Ao Higor, que chegou em um período bastante conturbado do projeto, pelo apoio e carinho, você foi essencial.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a concretização deste trabalho.

RESUMO

O número de cirurgias para colocação de implantes e próteses que são realizadas anualmente no mundo vêm crescendo exponencialmente, em conjunto surge a preocupação com infecções que possam acometer os pacientes no período pós-operatório. Neste contexto, a propriedade bactericida dos vidros bioativos vem sendo amplamente estudada. O F18 é um novo vidro bioativo desenvolvido no Laboratório de Materiais Vítreos do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (LaMaV-DEMa/UFSCar), que apresenta a possibilidade de manipulação em diferentes formatos, como pó, podendo ser utilizado no recobrimento de implantes e em aplicações diretas na pele, auxiliando na cicatrização de feridas. Este trabalho teve como objetivos avaliar a atividade antibiofilme e bactericida *in vitro* do F18 em biofilmes de *Staphylococcus aureus* e atividade bactericida em biofilmes de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Para tanto, verificou-se a capacidade de inibição do crescimento do biofilme pelo F18, mantendo-se um contato direto entre o inóculo bacteriano e o biomaterial. Além disso, investigou-se a atividade bactericida dos produtos de dissolução do F18 e do pó, por meio de aplicação direta, nas concentrações de 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL e 3,12 mg/mL. Por fim, analisou-se a influência do pH na atividade bactericida. Notou-se que o F18 apresentou atividade antibiofilme, após 12 horas de contato direto entre o inóculo de *S. aureus* e o biomaterial reduzindo em mais de 6 logs a população bacteriana viável. Além disso, o F18 apresentou atividade bactericida em biofilmes pré-formados de *S. aureus* e MRSA, reduzindo mais que 6 logs de células bacterianas viáveis após 24 horas do tratamento com 50 mg/mL e nas duas formas de aplicação testadas. Notou-se que a neutralização do pH está diretamente relacionada com a diminuição da eficácia bactericida do F18. Os resultados ampliaram a possibilidade de utilização do vidro bioativo F18 devido a sua eficácia na atividade antibiofilme e bactericida, nas condições testadas. O que futuramente, poderá resultar na sua utilização como auxiliar no tratamento de infecções.

Palavras chave: Biomaterial. Antimicrobiano. Biocompatibilidade. MRSA.

ABSTRACT

The number of surgeries for implants placement and prostheses that are performed annually in the world have been growing exponentially, together with concerns about infections that can affect patients in the postoperative period. In this context, the bactericidal properties of bioactive glasses have been widely studied. F18 is a new bioactive glass developed at the Vitreous Materials Laboratory of the Department of Materials Engineering of the Federal University of São Carlos (LaMaV-DEMa/UFSCar), which presents the possibility of manipulation in different formats, such as powder, and can be used in the coating of implants and in direct applications in the skin, aiding in the healing of wounds. The objectives of this study were to evaluate the *in vitro* antibiofilm and bactericidal activity of F18 biofilms of *Staphylococcus aureus* and bactericidal activity in biofilms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). For this purpose, the ability to inhibit the growth of the biofilm by F18 was verified, maintaining a direct contact between the bacterial inoculum and the biomaterial. In addition, the bactericidal activity of the dissolution products of F18 and of the powder was investigated by means of direct application, at concentrations of 50 mg/mL, 25 mg /mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL and 3,12 mg/mL. Finally, the influence of pH on the bactericidal activity was analyzed. It was observed that F18 presented antibiofilm activity after 12 hours of direct contact between the inoculum of *S. aureus* and the biomaterial reducing in more than 6 logs the viable bacterial population. In addition, F18 presented bactericidal activity in a preformed biofilms of *S. aureus* and MRSA, reducing more than 6 logs of viable bacterial cells after 24 hours of contact with 50mg/mL in the two forms of application tested. It was noted that pH neutralization is directly related to the decrease in bactericidal efficacy of F18. The results extended the possibility of using the F18 bioactive glass due to its effectiveness in the antibiofilm and bactericidal activity under the conditions tested. In the future, it may result in its use as an aid in the treatment of infections.

Keyword: Biomaterial. Antimicrobial. Biocompatibility. MRSA.

Lista de Figuras

FIGURA 1: Esquema resumido dos estágios de formação de HA.....	22
FIGURA 2: Estágios de desenvolvimento na formação do Biofilme.....	27
FIGURA 3: Resumo geral do procedimento experimental.....	30
FIGURA 4: Corpo de prova, disco de aço inox 304 (A). Corpo de prova 60% recoberto com pó do vidro bioativo F18 (B).....	31
FIGURA 5: Esquema da Montagem das microplacas de 24 orifícios para realização do teste de estudo cinético da ação do F18.....	33
FIGURA 6: Esquema de Montagem das microplacas de 24 orifícios para realização do ensaio de redução do biofilme através do tratamento com o vidro bioativo F18.....	35
FIGURA 7: Esquema de Montagem da microplaca de 24 orifícios para avaliação da influência do pH na atividade bactericida do F18.....	37
FIGURA 8: Representação gráfica do log UFC/cm ² do biofilme de <i>S. aureus</i> após realização do estudo cinético da ação do F18.....	40
FIGURA 9: Resultado obtido após realização do estudo cinético da ação do F18 na formação do biofilme de <i>S. aureus</i>	41
FIGURA 10: Representação gráfica dos valores de redução logarítmica de células viáveis (R) após realização do estudo cinético da ação do F18.....	42
FIGURA 11: Imagens obtidas através de MEV, biofilme de <i>S. aureus</i> formado na superfície dos corpos de prova após realização do estudo cinético.....	43
FIGURA 12: Representação gráfica do log de UFC/cm ² do biofilme de <i>S. aureus</i> após realizar o teste de redução com diferentes concentrações de F18.....	44
FIGURA 13: Representação gráfica dos valores de Redução logarítmica de células viáveis (R) após realização do teste de redução do biofilme de <i>S. aureus</i>	47
FIGURA 14: Imagens obtidas através de MEV, biofilme de 24 horas de <i>S. aureus</i> formado na superfície do corpo de prova após realização do teste de redução.....	48

FIGURA 15: Representação gráfica do log de UFC/cm ² do biofilme de <i>S. aureus</i> resistente à metilicina (MRSA), após realizar o teste de redução com diferentes concentrações de F18.....	49
FIGURA 16: Representação gráfica dos valores de Redução logarítmica de células viáveis (R) após realização do teste de redução do biofilme de <i>S. aureus</i> resistente à metilicina (MRSA)	50
FIGURA 17: Representação gráfica do log de UFC/cm ² do biofilme de <i>S. aureus</i> após verificação da influência do pH na ação do F18.....	52
FIGURA 18: Representação gráfica dos valores de Redução logarítmica de células viáveis (R) após realização do teste de verificação da influência do pH sobre a ação do F18.....	53
FIGURA 19: Imagens obtidas através de MEV, biofilme de 24 horas de <i>S. aureus</i> formado na superfície do corpo de prova após realização do teste de influência do pH.....	55
FIGURA 20: Imagens obtidas através de MEV, sobrenadante filtrado em membrana após realização do teste de influência do pH na ação do F18.....	57

Lista de Quadros

QUADRO 1: Composição de alguns vidros bioativos. Composição é reportada em porcentagem e se refere a concentração em massa do composto.....	21
QUADRO 2: Resumo de alguns estudos <i>in vitro</i> relevantes com vidros bioativos para prevenção de infecções bacterianas.....	24
QUADRO 3: Resumo dos principais estudos com vidros bioativos relacionando-se valores de pH e tamanho de partículas utilizadas.....	58

Lista de Siglas

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

DEMa – Departamento de Engenharia de Materiais

DMP – Departamento de Morfologia e Patologia

EDS – Espectroscopia de Raio X por Dispersão de Energia

FOAr – Faculdade de Odontologia de Araraquara

GRSA – *S. aureus* Resistente a Glicopeptídeos

HA – Hidroxiapatita

HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose

ISC – Infecções do Sítio Cirúrgico

JIS – Japanese Industrial Standard

LaMaV – Laboratório de Materiais Vítreos

LCE – Laboratório de Caracterização Estrutural

LMP – Laboratório de Microbiologia e Parasitologia

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MH – Meio de cultura Müller Hinton

MRSA – *S. aureus* Resistente à Meticilina

PBS – Solução Tampão Fosfato

TSA – Meio de cultura Agar Triptona Soja

TSB – Meio de cultura Caldo Soja Triptona

UFC/mL – Unidade Formadora de Colônia por mililitro

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos gerais	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Biomateriais	18
3.2 Vidro bioativo	19
3.3 Biofilmes bacterianos	27
3.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> – resistência aos agentes antimicrobianos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Vidro bioativo	30
4.1.1 Vidro bioativo na forma de pó.	30
4.1.2 Preparo dos corpos de prova.....	31
4.1.3 Recobrimento dos corpos de prova com F18.....	31
4.2 Estudo cinético da ação do F18 na formação do biofilme de <i>S. aureus</i>	31
4.2.1 Preparação do inóculo.....	32
4.2.2 Montagem do experimento.	32
4.2.3 Quantificação de células viáveis do biofilme	33
4.3 Teste de redução do biofilme de <i>S. aureus</i> e MRSA	34
4.3.1 Preparação dos inóculos.	34
4.3.2 Preparo de amostras.	34
4.3.3 Montagem do experimento.	34
4.3.4 Quantificação de células viáveis do biofilme	36
4.4 Influência do pH na ação bactericida do F18	36
4.4.1 Montagem do experimento.	36
4.4.2 Morfologia de células bacterianas presentes no sobrenadante.....	37
4.5 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
4.6 Análise estatística	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Estudo cinético da ação do F18 na formação do biofilme de <i>S. aureus</i>	39
5.2 Teste de redução do biofilme de <i>S. aureus</i> e MRSA	44
5.3 Influência do pH na ação bactericida do F18	51
6. CONCLUSÕES	61
7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

Historicamente a função dos biomateriais tem sido substituir ou até mesmo regenerar tecidos danificados ou doentes no corpo humano, em busca de uma melhor qualidade de vida para esses indivíduos. Os vidros bioativos foram descobertos em 1969 e promoveram pela primeira vez uma alternativa para a ligação interfacial entre um implante e o tecido hospedeiro. A primeira composição Bioglass® 45S5 está em uso clínico desde 1985 (Hench, 2006).

A descoberta do 45S5 deu início a diversos estudos para desenvolvimento de novos vidros bioativos. Atualmente, existe uma grande variedade de materiais cerâmicos que apresentam bioatividade ou são biocompatíveis. Dentre as aplicações encontram-se reparação de tecidos duros, como ossos, articulações e dentes. (Hench; Wilson, 1993 apud Souza, 2015).

Recentemente, desenvolveu-se no LaMaV-DEMa/UFSCar um vidro bioativo com nova formulação, denominado de F18, capaz de ser manipulado em diversos formatos, como pó e fibras. A apresentação na forma de pó permite, dentre outros processos, aplicações em pele e recobrimento de implantes. Estudos prévios demonstraram biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* da nova composição e sua habilidade de estimular a formação de novos tecidos ósseos quando aplicado na forma de fibras e scaffold (Gabbai-Armelin et al., 2015).

Além disso, também foi observado em estudo realizado no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar (LMP-DMP/UFSCar) em colaboração com o LaMaV-DEMa/UFSCar, que partículas do pó de F18 apresentaram eficácia no efeito bactericida *in vitro* contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* na forma planctônica (Campanini, 2015; Souza et al., 2017).

Milhões de cirurgias de implantes são realizadas anualmente no mundo, sendo que mais de 50 tipos de implantes feitos com 40 tipos de biomateriais diferentes têm sido utilizados (Hench, 2015). Dentre tantas, existe uma grande preocupação com as falhas que possam ocorrer no período pós-operatório, sendo considerados os mais preocupantes os processos infecciosos (Xiang; Spector, 2006).

Infecções associadas com implantes cirúrgicos, são geralmente mais difíceis de tratar pois requerem um longo período de terapia com antibióticos, o que prolonga a estadia do paciente no hospital (Whitehouse et al., 2002). Muitas vezes chega a ser

necessária uma revisão de todo o processo, sendo requeridas cirurgias adicionais com altos riscos de complicações (Peel; Busing; Choong, 2012). Além disso, não são atingidas altas taxas de efetividade de terapias antimicrobianas em infecções nos ossos e em articulações devido às características fisiológicas e anatômicas dos mesmos (Lew; Waldvogel, 2004).

Para as pessoas que permanecem sob observação em hospitais, além da atenção com Infecções no Sítio Cirúrgico (ISC), que caracteristicamente envolvem biofilmes bacterianos, existem aquelas que podem se iniciar a partir de feridas ou lesões presentes no corpo do paciente. Um dos microrganismos mais frequentemente encontrados nos casos de ISC, é *Staphylococcus aureus*, que se apresenta resistente a diversas drogas utilizadas atualmente para combatê-lo como, (MRSA) *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (Darouiche, 2004; Lew; Waldvogel, 2004; Romanò et al., 2011).

A atividade bactericida é uma propriedade muito importante do vidro bioativo e em associação com propriedades regenerativas ajuda a prevenir e combater infecções. Desta forma, pesquisas devem ser guiadas de modo a avaliar a atividade antimicrobiana em novos biomateriais, como o vidro bioativo F18, fonte de estudo deste trabalho, que apresenta grandes chances de ser utilizado como uma possível alternativa para combater infecções de biofilmes bacterianos em humanos, já que resultados prévios demonstraram sua eficácia na atividade bactericida *in vitro* frente a microrganismos planctônicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivos gerais avaliar e investigar a atividade antibiofilme e bactericida do vidro bioativo F18 na forma de pó, utilizando-se partículas com diâmetro médio de 49 μm sobre biofilmes de *Staphylococcus aureus*, partindo-se da inibição da formação deste biofilme no corpo de prova e também como tratamento em biofilmes pré-formados.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antibiofilme do F18 após períodos pré-estabelecidos de contato direto do inóculo de *S. aureus* com corpo de prova recoberto com o vidro bioativo;
- Avaliar a atividade bactericida do F18 em diferentes concentrações e formas de aplicação, em biofilmes pré-formados de *S. aureus* e *S. aureus* resistente à metilina (MRSA);
- Verificar relação do pH com atividade bactericida do F18 em cepa de *S. aureus*;
- Verificar por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) a influência do corpo de prova na aderência e formação do biofilme bacteriano;
- Avaliar a influência do F18 na morfologia das células bacterianas nos corpos de prova e sobrenadante por meio de MEV.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

Numerosas pesquisas na área de medicina regenerativa vêm sendo feitas com o intuito de desenvolvimento de materiais estáveis a longo prazo, que se assemelhem às características do tecido fisiológico lesionado, capazes de restaurar a função do mesmo. A aplicação clínica destes materiais vem resultando em um processo chamado osteoestimulação, que ocorre quando o próprio corpo repara o osso danificado. Este termo refere-se à ativação de células progenitoras no corpo, pelo material ou seus produtos de dissolução, tornando-o capaz de auxiliar na produção óssea (Hench; Jones, 2015).

Segundo Hench, (1991) os biomateriais geralmente são classificados em relação à resposta tecidual que provocam. Podem ser biologicamente não ativos, quando ao serem implantados acabam sendo encapsulados por algum tecido fibroso não aderente. Biologicamente ativos, quando capazes de formar uma ligação interfacial com o tecido vivo circundante, como é o caso dos vidros bioativos, e reabsorvíveis que são degradados por fluídos corpóreos e/ou digeridos pelas células, gerando produtos que são muitas vezes expelidos pelo corpo.

Quando se fala da evolução dos biomateriais nos últimos 60 anos, observam-se quatro gerações distintas. Os biomateriais de primeira geração foram selecionados para serem o mais bioinertes possíveis, escolhidos de modo a apresentar uma maior proximidade com as propriedades físicas do tecido a ser substituído e assim minimizar a interação com tecidos hospedeiros. Os materiais cerâmicos desta geração são alumina e zircônia (Hench, 2006; Navarro, 2008; Hench, 2015). A utilização clínica destes materiais leva, muitas vezes, a adsorção de diversas proteínas inespecíficas à sua superfície depois de implantado, o que acarreta em uma sinalização celular não específica, e a formação de um tecido fibroso encobrindo o material. Com o intuito de evitar a formação desta “cápsula” fibrosa, surgiram os materiais bioativos (Souza, 2015).

O termo bioatividade foi utilizado pela primeira vez para descrever a habilidade de um certo material em se ligar fortemente ao tecido ósseo (Hench, 2006). Mais recentemente o adjetivo “bioativo” foi dito como qualquer interação ou efeito que um material exerce sob uma célula com o objetivo de guiar ou ativar uma resposta biológica ou comportamento específico (Navarro, 2008), referindo-se à habilidade do

material de reagir em resposta a um estímulo fisiológico de ligação ao tecido hospedeiro (Jones, 2013).

A segunda geração então, com materiais bioativos, foi caracterizada pelo desenvolvimento de materiais capazes de interagir com tecidos corpóreos. As cerâmicas mais conhecidas nesta geração são os vidros bioativos, fosfatos de cálcio e hidroxiapatita (HA) (Hench, 2006; Souza, 2015).

A ideia de desenvolver biomateriais que combinassem as propriedades bioativas com as propriedades de reabsorção no organismo gerou o conceito dos biomateriais de terceira geração. Geralmente apresentam alta interação celular, sendo capazes de estimular respostas celulares específicas a nível molecular. Podem sofrer degradação pelos fluídos corpóreos e/ou podem ser digeridos pelas células. (Navarro, 2008).

A estratégia principal da engenharia de tecidos envolve a geração de estruturas híbridas contendo biomateriais bioativos e células. Os biomateriais fornecem a estrutura de suporte inicial para as células se organizarem e se reunirem em um tecido funcional. Assim estes biomateriais classificados como pertencentes à uma quarta geração, devem ser capazes de simular facilmente os microambientes nativos, necessários para a regeneração da função e do destino celular (Di Cio; Gautrot, 2016)

O uso de partículas de vidro bioativo na prevenção de doenças e danos bucais é também um exemplo de uma quarta geração de biomateriais. Materiais bioativos, que buscam a reprodução da forma e/ou função dos tecidos biológicos para a prevenção de danos (Hench, 2013).

Tratando-se de regeneração, as cerâmicas tem sido uma das classes de materiais mais pesquisadas, devido a sua vasta variedade de composições químicas e de possibilidades de uso, que se estende desde o emprego isolado do material, que pode ser processado de diferentes formas e morfologias, até o revestimento de implantes e próteses metálicas.

3.2 Vidro bioativo.

Em 1969, Hench e colaboradores propuseram o uso do vidro bioativo como uma promessa de alternativa para materiais de enxertos. O vidro bioativo é um material sintético que utiliza sílica como base com excelentes propriedades mecânicas e formação de ligação química com tecidos vivos, principalmente os tecidos duros. Além disso foi observado que uma composição de vidro particular $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-$

SiO₂, Bioglass® 45S5, era capaz de se ligar fortemente com o osso, não podendo ser removido sem danificar o tecido preso a ele, lançando o campo dos vidros bioativos (Hench et al., 1971).

O primeiro relato da aplicação clínica do Bioglass® 45S5, ocorreu em 1985, na substituição de ossículos do ouvido médio, no tratamento da perda auditiva condutiva. O dispositivo foi chamado de “Bioglass® Prótese de Reconstrução Ossicular” com nome comercial MEP®. Outro procedimento documentado foi a utilização do mesmo vidro bioativo em cirurgias orais, em 1988. Dispositivos de Bioglass® 45S5 em forma de cones foram empregados para preencher defeitos ósseos na mandíbula originados após extrações dentárias e ficaram conhecidos comercialmente como ERMI® Implante de Manutenção da Crista Endóssea (Hench, 2006).

Vidros bioativos foram então usados em cirurgias no pescoço e cabeça, como implantes para substituir ossos ou dentes, revestimentos para ancorar aparelhos ortopédicos ou odontológicos ou na forma de pós, para preencher vários tipos de defeitos ósseos. A taxa e a quantidade de regeneração óssea dependem da composição do material (Jones, 2013).

É sabido que a concentração das partículas de SiO₂ influenciam na ligação com os tecidos hospedeiros ao redor; 45-52% (m/m) SiO₂ é suficiente para garantir a ligação ao osso e a outros tecidos moles, enquanto 52-60% (m/m) permite apenas a ligação ao osso. Uma concentração maior que 60% de sílica diminui enormemente as taxas de ligação, tornando o vidro praticamente biologicamente inerte (Hench; Jones, 2015; Välimäki; Aro 2006). O primeiro vidro bioativo proposto, Bioglass® 45S5 do sistema quaternário Na₂O–CaO–P₂O₅–SiO₂, tem uma mistura, porcentagem em massa, de 24,5% Na₂O, 24,5% CaO, 45% SiO₂, e 6% P₂O₅. (Hench, 1998).

Diferentes formulações de vidros bioativos já foram desenvolvidas de acordo com seu uso clínico. Como o S53P4, conhecido como BonAlive® que apresenta um maior conteúdo de sílica. Deste modo se comparado com o 45S5, é esperado que apresente uma menor bioatividade. Foi aprovado para uso ortopédico em 2006 (Hench, 2015).

A maioria dos vidros bioativos já descobertos faz parte de sistemas à base de sílica, sendo compostos normalmente por SiO₂, Na₂O, CaO e P₂O₅. Outros compostos podem ser introduzidos, tais como CaF₂, MgO e B₂O₃ (Quadro 1).

O vidro bioativo estimula várias respostas biológicas quando imerso em fluidos fisiológicos, o que resulta na formação de uma camada biologicamente ativa de HA

$((\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ na superfície desse material, promovendo uma interface ligada ao tecido. A composição química e estrutura da HA é comparável a fase mineral do tecido ósseo, o que resulta na forte ligação observada (Zhang et al., 2010; Hench, 1998).

QUADRO 1: Composição de alguns vidros bioativos. Composição é reportada em porcentagem e se refere a concentração em massa do composto.

	Na₂O	CaO	P₂O₅	SiO₂	CaF₂	B₂O₃
45S5	24,5	24,5	6,0	45,0	0,0	0,0
42S5	26,3	29,0	2,6	42,1	0,0	0,0
S53P4	23,0	20,0	4,0	53,0	0,0	0,0
55S4	21,5	23,8	2,6	52,1	0,0	0,0
28S5	42,0	24,5	6,0	27,5	0,0	6,0
77S	0,0	16,3	4,0	79,7	0,0	0,0
45S5F	24,5	24,5	45,0	6,0	12,5	0,0
40S5B5	24,5	24,5	6,0	40,0	0,0	5,0
Biossilicato®	23,7	23,8	4,0	48,5	0,0	0,0

Fonte: Adaptado de Drago, Toscano; Bottagisio, 2018.

A formação da HA acontece resumidamente em cinco estágios (Figura 1). Logo após a implementação do vidro bioativo, estágio 1, a exposição do biomaterial ao meio aquoso, gera a substituição de íons (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) na estrutura do vidro por íons H^+ do meio circundante. Isso leva a um aumento no pH, resultando em um microambiente alcalino, a liberação de íons aumenta a concentração iônica e consequentemente a pressão osmótica. Estes mecanismos de ação podem ser os responsáveis por inibir o crescimento bacteriano e consequentemente impedir a adesão e contaminação de implantes. Este estágio é controlado pelos processos de difusão (Drago et al., 2014).

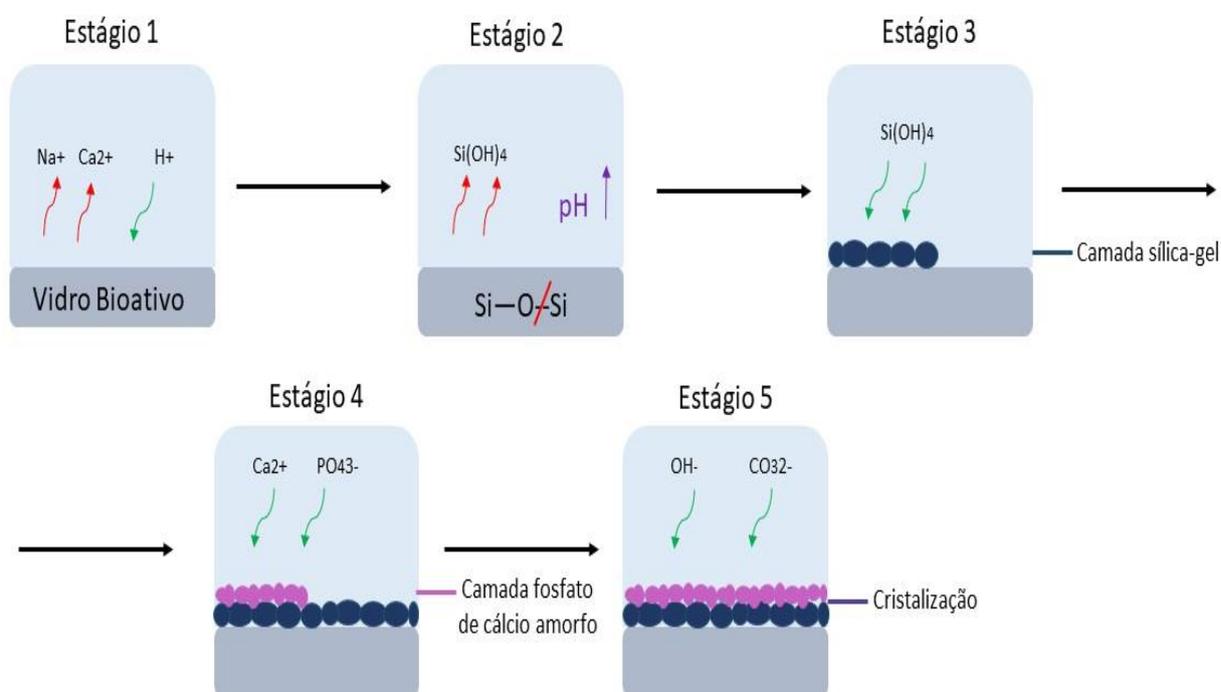
Estágio 2, o aumento do pH promove a liberação de sílica solúvel do material vítreo, por consequência da quebra das ligações (Si-O-Si), sendo desprendidos silanóis para a solução $\text{Si}(\text{OH})_4$.

Em seguida, no estágio 3 ocorre a policondensação dos grupos silanol, levando à formação de uma camada porosa rica em sílica-gel na superfície do vidro (Rabiee et al., 2015; Turdean-Ionescu et al., 2016).

A nova camada age como suporte para a aglomeração de íons PO_4^{3-} e Ca^{2+} presentes nos fluídos corporais, na superfície do vidro. A porosidade da sílica-gel permite que as trocas iônicas entre vidro e solução continuem ocorrendo criando um filme amorfo, rico em cálcio e fosfato (Estágio 4).

O último estágio, é composto pela incorporação de ânions OH^- e CO_3^{2-} circundantes, ocorrendo a cristalização da camada, formando gradualmente HA. (Hench, 1991).

FIGURA 1: Esquema resumido dos estágios de formação de HA.



Fonte: Do autor.

De fato, o contato do vidro bioativo com fluídos biológicos resulta na liberação de íons da superfície deste, levando a um aumento na pressão osmótica e pH, tornando o ambiente hostil para o crescimento microbiano (Zhang et al., 2006, Gluber et al., 2008; Zhang, Hupa; Hupa, 2008; Zhang et al., 2010). O aumento do pH, como dito anteriormente, ocorre devido a liberação de íons alcalinos, como Na^+ principalmente, e a incorporação de íons H^+ no material (Sepulveda et al., 2002, Ratner et al., 2004). Pode-se dizer então que, as reações de superfície descritas acima não são vantajosas apenas para regeneração óssea, mas também no que diz respeito às propriedades bactericidas do vidro bioativo.

Uma atenção especial vem sendo dada às potenciais propriedades bactericidas dos vidros bioativos. Diferentes tipos dos mesmos já foram testados frente a amplo espectro de microrganismos, sendo a maioria dos estudos desenvolvidos sobre as formas de vida planctônicas. Foram observados ainda, níveis de eficácia bactericida, sendo que partículas menores do pó dos vidros bioativos vêm apresentando melhores resultados na de redução de células viáveis, quando comparadas com partículas de tamanho maior. Alguns estudos relevantes envolvendo os vidros bioativos neste sentido são mostrados no Quadro 2.

Determinados mecanismos de ação já foram estudados, como mudanças no pH e pressão osmótica e ainda partículas de vidro afiadas como “agulhas” que poderiam danificar as paredes das células bacterianas, criando buracos que facilitariam a penetração de agentes antimicrobianos no citoplasma microbiano (Leu; Leach, 2008).

O deslocamento para um ambiente altamente alcalino gera uma tensão para a bactéria, que pode responder mudando sua morfologia e estrutura, modificando o padrão de expressão de diversos genes e proteínas. (Ran; He; Liang, 2013). Outro fator que contribui para propriedades antimicrobianas é a liberação de íons como cálcio e fosfato que perturbam o potencial da membrana da bactéria, resultando em aumento da pressão osmótica. A concentração de solutos no citoplasma bacteriano é normalmente mais alta que a detectada no ambiente ao redor, resultando em uma pressão positiva na membrana celular. Um aumento repentino na concentração de solutos no exterior gera um fluxo de água e a pressão abaixa através da membrana celular, podendo resultar em uma célula com tamanho e forma alterados. (Pilizota; Shaevitz, 2013).

QUADRO 2: Resumo de alguns estudos *in vitro* relevantes com vidros bioativos para controle de crescimento bacteriano.

Procedimento Experimental	Composição vidro bioativo	Microrganismo	Forma de vida do Microrganismo	Diâmetro da partícula do vidro bioativo	Efeitos bactericidas
Stoor; Söderling; Salonen, 1998	S53P4	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , e <i>Streptococcus sanguis</i>	Microrganismos Planctônicos	45 µm	<i>A. naeslundii</i> perdeu sua viabilidade em 10 min, <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. gingivalis</i> , e <i>S. mutans</i> perderam em 1 hora. <i>S. sanguis</i> foi o único que ainda apresentava células viáveis após 1 hora.
Allan; Newman; Wilson, 2001	45S5	<i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> ,	Microrganismos Planctônicos	90 a 710 µm	Todas as cepas testadas mostraram redução maior que 90% na viabilidade das células após três horas de contato com vidro bioativo. A neutralização do pH reduziu para 30% a porcentagem de redução celular.
		<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Prevotella Intermedia</i> e <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>		355-500 µm	
Bellantone; Williams; Hench, 2002	45S5	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas. Aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	Microrganismos Planctônicos	90 a 710 µm	Biovidro não teve efeito bactericida em nenhuma das cepas testadas.
Waltimo et al., 2007	45S5	<i>Enterococcus faecalis</i>	Microrganismos Planctônicos	20-60 nm	Nanopartículas de 45S5 reduziram a viabilidade de <i>enterococci</i> depois de 100 min.

Continuação Quadro 2

Procedimento Experimental	Composição vidro bioativo	Microrganismo	Forma de vida do Microrganismo	Diâmetro da partícula do vidro bioativo	Efeitos bactericidas
Gluber et al., 2008	45S5, 28S5, 77S	<i>Enterococcus faecalis</i>	Biofilme Bacteriano	Nanopartículas	Nanopartículas de 45S5 e 28S5 mataram todas as células bacterianas do biofilme em um dia . 77S atingiu a desinfecção depois de uma semana. Solução tampão com pH 9 não foi capaz de reduzir a viabilidade das células.
Xie et al., 2008 <i>in vivo</i>	45S5	<i>Staphylococcus aureus</i>	Biofilme Bacteriano	355-500 µm	Não houve diferença significativa entre o controle e as amostras tratadas com o vidro bioativo.
Hu et al., 2009	45S5	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Escherichia coli</i>	Microrganismos Planctônicos	50 µm	Alta ação bactericida, dose dependente do biomaterial. 50 mg/mL 45S5 chegou a reduzir 98% da população bacteriana.
Zhang et al., 2010	S53P4 e derivados	<i>Streptococcus sanguis</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i> entre outras	Microrganismos Planctônicos	< 45 µm	Concentração de 50 mg/mL foi requerida para gerar efeitos bactericidas. Efeito depende da composição do biovidro e também da concentração
Rivadeneira et al., 2013	45S5	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	Microrganismos Planctônicos	5-100 µm	Forte efeito bactericida contra cepas testadas em concentrações em torno de 10 ⁵ UFC/mL após 48 horas atingiu-se o limite de detecção da técnica (<2 UFC/mL).

Continuação Quadro 2

Procedimento Experimental	Composição vidro bioativo	Microrganismo	Forma de vida do Microrganismo	Diâmetro da partícula do vidro bioativo	Efeitos bactericidas
Coraça-Huber et al., 2014	S53P4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Biofilme Bacteriano	< 45 µm	Redução de mais de 5 logs na quantidade de células do biofilme de <i>S. aureus</i> após 24 horas
Drago et al., 2014	S53P4	MRSA - <i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biofilme Bacteriano	< 45 µm	Redução significativa de 80% da biomassa (metodologia cristal violeta) e diminuição do volume celular total em ambos os biofilmes bacterianos.
Begum et al., 2016	45S5	<i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	Microrganismos Planctônicos	< 63 µm	Mesmo em pH elevado, não observou-se efeito bactericida considerável sobre <i>S. aureus</i> , enquanto um efeito dose dependente foi observado para <i>E. coli</i> (10 mg/mL com agitação após 48 horas) Atividade cessou quando pH foi neutralizado.
Souza et al., 2017	F18	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Microrganismos Planctônicos	50 µm	Partículas de F18 apresentaram atividade bactericida contra os microrganismos testados na forma planctônica. Após 24 h atingiu-se o limite de detecção da técnica (1 UFC/mL) utilizando-se 50mg/mL F18.

Fonte: Do autor.

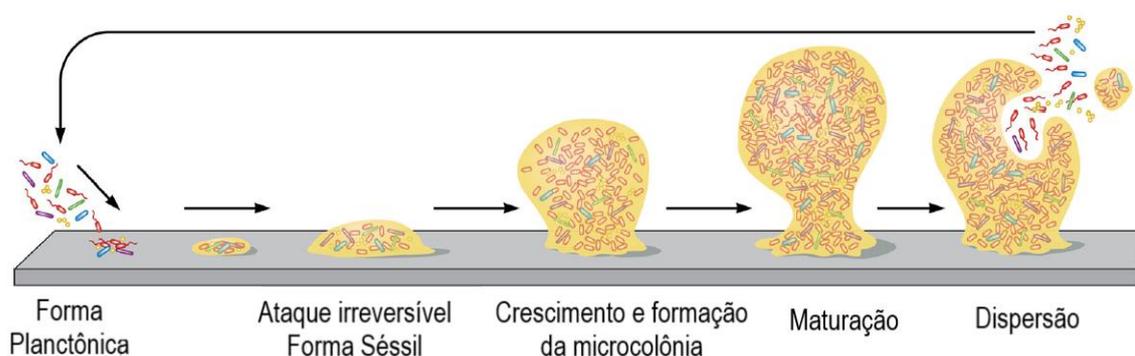
3.3 Biofilmes bacterianos

Biofilmes são comunidades multidimensionais, nas quais bactérias presentes coexistem com a auto derivada matriz extracelular tipicamente composta por alguns tipos de polissacarídeos, proteínas e/ou DNA (Wimpenny; Manz; Szewzyk, 2000; Flemming; Wingender, 2010).

Embora os estágios de desenvolvimento que levam a formação do biofilme pareçam ser preservados, toda espécie forma uma comunidade multicelular, logo, a formação do biofilme permite que organismos unicelulares, assumam temporariamente um estilo de vida multicelular. E a transição do crescimento planctônico para biofilme ocorre em resposta a mudanças no ambiente, envolvendo múltiplas reações reguladoras (Stoodley et al., 2002 e Monds; O'Toole 2009).

Resumidamente, o desenvolvimento do biofilme se dá quando uma ou mais espécies de bactérias na forma planctônica se aderem à uma superfície abiótica/biótica. Bactérias anexadas crescem como uma comunidade multicelular, formando microcolônias, nas quais elas se multiplicam e maturam. Essa estrutura microbiana resulta no desenvolvimento de um biofilme maduro que eventualmente, serve como reserva de células bacterianas que são transmitidas de volta para o ambiente através da dispersão do biofilme para que ocorra então, a colonização de novas superfícies (Figura 2) (Kostakioti; Hadjifrangiskou; Hultgren, 2013).

FIGURA 2: Estágios de desenvolvimento na formação do Biofilme.



Fonte: Adaptado de Chatzipanagiotou et al., 2018.

O estilo de vida do biofilme resulta em características fenotípicas, que são marcadamente diferentes daquelas da existência planctônica. A reprogramação da célula altera a expressão de moléculas na superfície, utilização de nutrientes, fatores de virulência, e equipa a bactéria com um arsenal de propriedades que permitem sua

sobrevivência em ambientes desfavoráveis, gerando um aumento da resistência a agentes antimicrobianos, bloqueio ou prevenção do acesso de agentes bactericidas na estrutura interna do biofilme e proteção contra as defesas do hospedeiro (Wallace; McKain, 1996, Dumitru; Hornby; Nickerson, 2004; Ramage et al., 2005).

Ainda falando sobre o aumento da resistência frente a medicamentos, Distel; Hatton; Gillespie, (2002) apontam que a matriz polimérica produzida pelas próprias bactérias atua como um certo tipo de proteção para elas, o que facilita o espalhamento de infecções. A habilidade da bactéria de crescer como biofilme é um dos fatores que mais influenciam na persistência e recolonização após tratamentos.

A construção do biofilme é altamente variável. Bactérias podem formar biofilmes expostos ou submersos em condições estáticas ou em fluxo, em ambas superfícies bióticas e abióticas. Biofilmes associados a superfícies, são altamente dependentes do substrato, podendo ou não estar em contato com o ar. Entre os materiais mais comuns que promovem a formação do biofilme estão policloreto de vinila (PVC) e metais, estes muitas vezes presentes em dispositivos médicos implantados, por exemplo, podendo chegar em infecções associadas ao biofilme, constituindo um problema significativo de saúde pública (Ude et al., 2006; Jakubovics, 2017).

Biofilmes correspondem a 80% das infecções microbianas crônicas em humanos, levando a um aumento nas taxas de hospitalização, nos custos no cuidado com a saúde e nas taxas de mortalidade e morbidade (Romling; Balsalobre, 2012). Considerando estes fatos, os biofilmes microbianos, tem se tornado um problema global e as pesquisas para o desenvolvimento de drogas alternativas para o tratamento de biofilmes bacterianos vem se tornando cada vez mais urgentes (Lynch; Robertson, 2008).

3.3.1 *Staphylococcus aureus* – resistência aos agentes antimicrobianos

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, considerada um patógeno humano oportunista e frequentemente está ligado a infecções associadas com biofilmes adquiridas no ambiente hospitalar. Sendo que as mais comuns envolvem a pele e feridas em sítios cirúrgicos. Segundo Romanò e colaboradores, (2011) *Staphylococcus* é comumente isolado em casos de infecções relacionadas a implantes. Esse *status* pode estar relacionado ao fato de que este microrganismo é correntemente encontrado na pele e em membranas mucosas humanas, sendo mais

fácil de introduzi-los como contaminantes durante a implantação cirúrgica (Vuong; Otto, 2002).

Biofilmes de *Staphylococcus* são caracterizados como agregados multicelulares revestidos pela matriz extracelular. As células bacterianas podem se aderir as superfícies e são as maiores causas de infecções hospitalares, ao colonizarem dispositivos biomédicos, como respiradores, cateteres e implantes ortopédicos. Na forma de biofilme, apresenta resistência a agentes antimicrobianos 1000 vezes maior que na forma planctônica (Otto, 2008).

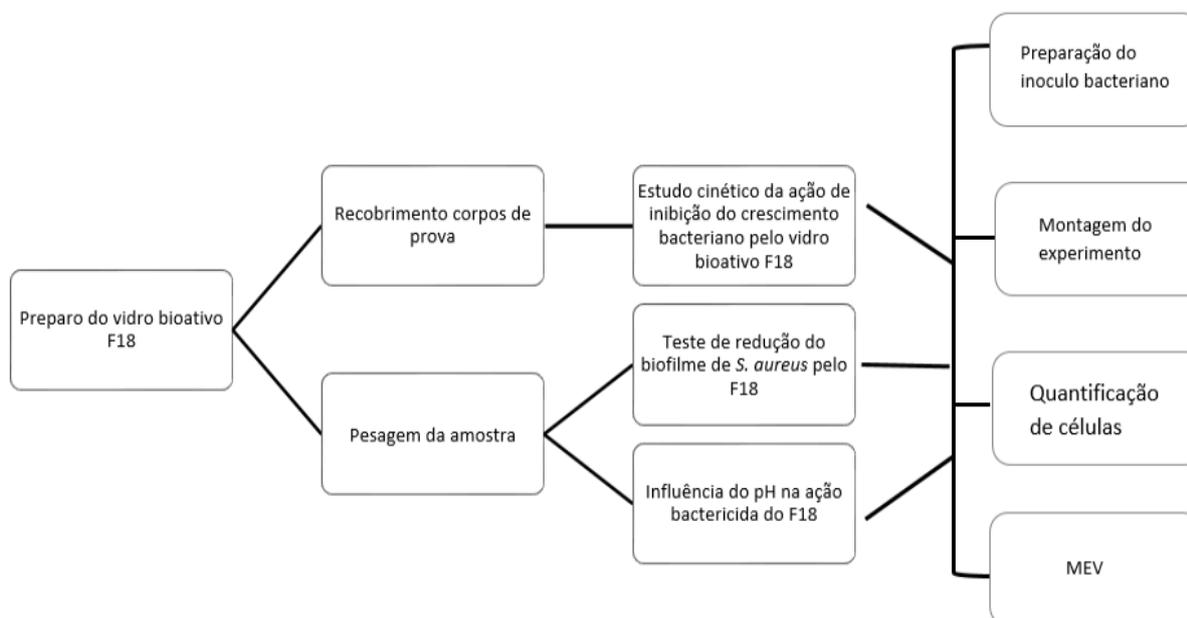
Segundo a ANVISA (Brasil, 2007) a resistência de *S. aureus* a penicilina foi detectada logo após o início do seu uso, na década de 40. Na década de 50, a produção de penicilinases pelos mesmos passou a predominar nas cepas isoladas de pacientes hospitalizados. Em 1960, a metilina foi lançada como alternativa para cepas produtoras de penicilinase, já que esta droga não sofre ação desta enzima, porém em 1961 cepas de *S. aureus* também foram descritas como resistentes à metilina (MRSA). Com o aumento da resistência a metilina, surgiram os glicopeptídeos como opção para tratamento deste patógeno. Já em 2002 foi descrito o primeiro isolado de *S. aureus* com resistência total aos glicopeptídeos (GRSA). Apesar da classificação de resistência intermediária, muitas cepas não respondem clinicamente ao tratamento com vancomicina ou com teicoplanina.

Deste modo, o aumento de resistência a antimicrobianos convencionais pelas cepas de *S. aureus* vem guiando pesquisas para o desenvolvimento de novos compostos que possam ser usados como alternativas para seu tratamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma das principais etapas experimentais realizadas no presente estudo é apresentado na Figura 3. Os procedimentos experimentais serão descritos detalhadamente nos itens a seguir.

FIGURA 3: Resumo geral do procedimento experimental.



Fonte: Do autor.

4.1 Vidro bioativo.

O vidro bioativo utilizado neste trabalho, que pertence ao sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$, foi desenvolvido pelo LaMaV – DEMa/UFSCar e é coberto pela patente BR10 INPI 20130209619. A nova formulação foi denominada F18.

4.1.1 Vidro bioativo na forma de pó.

O vidro bioativo foi obtido no LaMaV – DEMa/UFSCar, por fusão dos reagentes em cadinho de platina e os blocos formados por esse processo foram moídos em almofariz de ágata. A granulometria desejada (diâmetro médio de partículas igual a $49\ \mu\text{m}$) foi obtida com o uso de peneiras de nylon com aberturas na faixa de tamanho desejada.

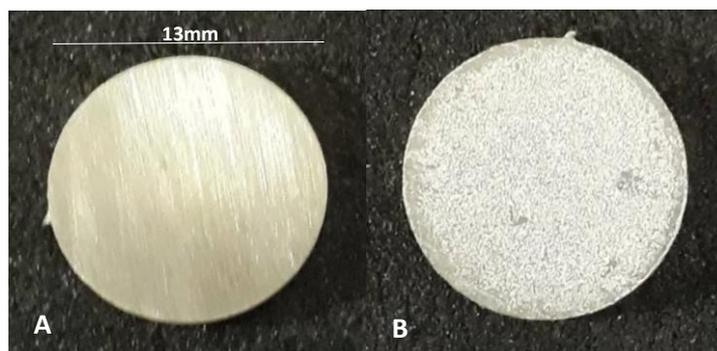
4.1.2 Preparo dos corpos de prova.

Os corpos de prova, aço inox 304 com 13 mm de diâmetro e um milímetro de espessura cada, (Figura 4A), foram limpos com detergente neutro, EXTRAN® 2%, deixando-os de molho nesta solução por no mínimo duas horas. Passado este tempo, foram lavados com água corrente seguido de lavagem com água destilada. As peças de aço foram então lixadas com lixas d'água 320 e 400, deixadas no ultrassom da marca Kondortech e modelo cd-4820, na potência de 150 W e 50 Hz, em álcool isopropílico, por 16 minutos. Após secarem, alguns dos corpos de prova foram recobertos com o vidro bioativo F18, outros permaneceram sem recobrimento.

4.1.3 Recobrimento dos corpos de prova com F18.

Para o recobrimento dos corpos de prova foi utilizada a técnica descrita por Chinaglia (2013). As partículas de vidro bioativo dispersas em hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) recobriram 60% da superfície dos corpos de prova para o estudo cinético da ação de inibição da formação do biofilme de *Staphylococcus aureus*. A disposição foi feita utilizando-se o um aerógrafo ou pulverizador a ar comprimido. A camada do pó do F18 aplicada pode ser vista na Figura 4B.

FIGURA 4: Corpo de prova, disco de aço inox 304 (A). Corpo de prova 60% recoberto com pó do vidro bioativo F18 (B).



Fonte: Do autor.

4.2 Estudo cinético da ação do F18 na formação do biofilme de *S. aureus*.

A metodologia selecionada foi baseada na norma JIS (*Japanese Industrial Standard*) Z 2801:2010 que padroniza uma forma de teste para avaliação da atividade bactericida a partir do contato com a superfície de diferentes materiais.

4.2.1 Preparação do inóculo.

Utilizou-se, para a preparação do inóculo, a cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* da *American Type Culture Collection* (ATCC 25923) oriunda da Fundação Oswaldo Cruz e pertencente ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Carlos (DMP-UFSCar). Para ativação da cepa, em cada ensaio, a bactéria utilizada foi transferida de sua cultura estoque (mantida a -20°C) para o meio de cultura caldo Müller Hinton (MH) pH $7,3 \pm 0,1$ (Oxoid®) e incubada em estufa no período de 24 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após esse tempo de crescimento, a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 3600 g, em uma centrífuga da marca Eppendorf, modelo 5418. O sobrenadante foi descartado e a bactéria sedimentada ressuspensa em solução tampão fosfato, (PBS) 0,01 M (NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na_2HPO_4 1,15 g; KH_2PO_4 0,2 g; para 1 L água destilada) pH $7,4 \pm 0,1$.

O inóculo foi padronizado, primeiramente, através da escala 0,5 de McFarland, e posteriormente por meio do espectrofotômetro da marca Femto, modelo 600, medindo-se a absorção em 600 nm, obtendo-se um valor de absorbância entre 0,08 e 0,09, correspondente a aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL). A suspensão já padronizada foi, então, diluída em PBS, para se obter uma concentração de 10^6 UFC/mL, requerida para o inóculo inicial.

4.2.2 Montagem do experimento.

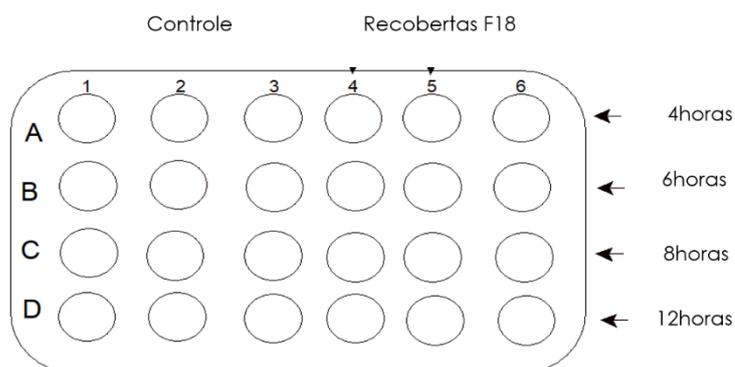
Os corpos de prova foram esterilizados por meio de exposição à radiação ultravioleta, durante 20 minutos, cada lado. Colocou-se então um corpo de prova por poço em uma microplaca de poliestireno de 24 orifícios (Kasvi®) com auxílio de pinça esterilizada.

O teste foi realizado em triplicatas, sendo divididos em amostras controle, sem recobrimento com o biomaterial, e amostras recobertas com 60% de vidro bioativo F18. Adicionou-se 33 μL do inóculo bacteriano padronizado como descrito em 4.2.1, na superfície de cada corpo de prova. Um filme de polietileno de aproximadamente 13 mm de diâmetro, previamente esterilizado por calor úmido em autoclave, foi posicionado sobre a alíquota, o que levou a formação de uma fina camada do inóculo em contato direto com os corpos de prova. Além destas, foram feitas amostras em uma segunda microplaca, referentes a análise por MEV. As microplacas foram

incubadas em câmara úmida, recipiente de plástico tampado e revestido com papel toalha úmido, a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para realizar o estudo cinético da ação bactericida do vidro bioativo em contato direto com os microrganismos, foram escolhidos os tempos de quatro, seis, oito e 12 horas de incubação. Para tanto, retirou-se a microplaca da estufa, o filme de polietileno do corpo de prova e adicionou-se um mililitro do meio de cultura MH, em cada poço, após cada tempo pré-estabelecido (Figura 5). Passadas 12 horas, todos os corpos de prova estavam em meio de cultura, a microplaca foi então retirada da câmara úmida e mantida em estufa a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ até completar 24 horas de incubação de cada tempo em meio de cultura, especificamente.

FIGURA 5: Esquema da Montagem das microplacas de 24 orifícios para realização do teste de estudo cinético da ação do F18. Em todas as fileiras tem-se as triplicatas controle, corpos de prova sem recobrimento com o vidro bioativo e recobertas com 60% de F18.



Fonte: Do autor.

4.2.3 Quantificação de células viáveis do biofilme.

Decorrido o tempo de incubação, os corpos de prova foram lavados três vezes com PBS, transferidos para tubos do tipo Falcon de 15 mL, com o auxílio de uma pinça esterilizada, e foram adicionados 5 mL de PBS em cada um deles. Para desagregação dos biofilmes os tubos foram transferidos para o ultrassom por 16 minutos na potência de 150 W e 50 Hz.

Foram realizadas diluições seriadas de 10 até 100.000 vezes em PBS, a partir da suspensão original desagregada. O espalhamento foi realizado segundo o método de *Spread Plate* para avaliação quantitativa das células, em duplicatas de 25 μL de todas as diluições e da suspensão original no meio de cultivo Agar Triptona Soja (TSA) pH $7,3 \pm 0,2$ (Oxoid®) com auxílio de alças de Drigalsky esterilizadas. As placas foram

incubadas a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e após este período foi realizada a contagem de UFC.

4.3 Teste de redução do biofilme de *S. aureus* e MRSA.

4.3.1 Preparação dos inóculos.

O inóculo de *S. aureus* (ATCC 25923) foi preparado como em 4.2.1. Foi utilizado também, em teste independente, a cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ATCC 33591) gentilmente cedida pelo professor Ewerton Garcia de Oliveira Mima pertencente à Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (FOAr-UNESP). Modificou-se o meio de cultura para Caldo Soja Triptona (TSB) pH $7,3 \pm 0,2$ (Oxoid®) para ativação das cepas e diluição dos inóculos já padronizados obtendo-se a concentração de aproximadamente 10^6 UFC/mL requerida inicialmente, em meio de cultura.

4.3.2 Preparo de amostras.

Utilizou-se diferentes concentrações do vidro bioativo F18. Para tanto pesou-se o pó (4.1.1) em balança analítica da marca Scientech, modelo AS 210, separando-se cada massa em frascos diferentes. O vidro bioativo já pesado e separado foi esterilizado por calor seco em estufa a 170°C , durante duas horas.

4.3.3 Montagem do experimento.

Foram utilizados para este teste apenas os corpos de prova sem o recobrimento com o vidro bioativo. Para esterilização dos mesmos foi utilizado calor seco 170°C .

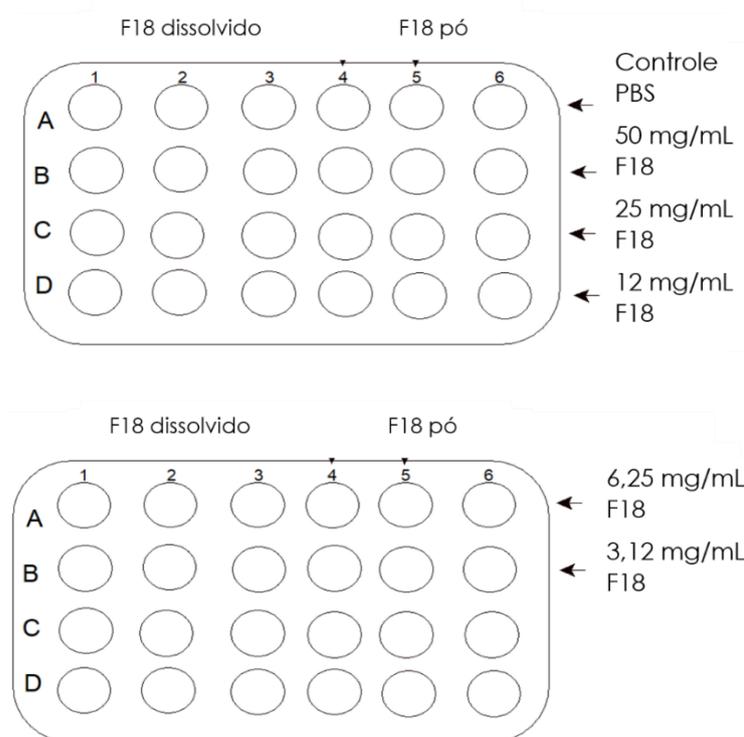
Adicionou-se um mililitro do inóculo bacteriano padronizado em 4.3.1, em cada poço de uma placa de 24 orifícios já contendo o corpo de prova. Além destas, foram feitas, em uma terceira placa, amostras referentes a posterior análise microscópica. As microplacas foram incubadas a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Para realizar o estudo da redução do biofilme bacteriano pelo vidro bioativo F18, fez-se uso das concentrações de 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL e 3,12 mg/mL do mesmo, diferindo o tratamento pela aplicação direta dos produtos da dissolução do F18 em PBS e das partículas do pó de F18, sendo PBS também utilizado como solvente. Para o preparo da solução dos produtos de

dissolução, manteve-se previamente um mililitro de PBS em contato direto com cada massa do pó do vidro bioativo, separadamente, em estufa a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Decorrido este período as amostras foram filtradas, utilizando-se um filtro de seringa de $0,22\ \mu\text{m}$ fabricado pela GVS Filter Technology UK Ltd. para cada concentração.

Após incubação do inóculo bacteriano, retirou-se a microplaca da estufa, lavou-se os poços três vezes com PBS e transferiu-se os corpos de prova para uma nova microplaca esterilizada. Adicionou-se então um mililitro da solução filtrada contendo os produtos da dissolução do F18 de cada concentração nas referentes triplicatas, e também o pó seco, nas demais triplicatas, adicionando-se posteriormente um mililitro de PBS. O controle permaneceu em contato com um mililitro de PBS (Figura 6). As microplacas foram mantidas em estufa a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ até completar 24 horas de incubação com os tratamentos.

FIGURA 6: Esquema de Montagem das microplacas de 24 orifícios para realização do ensaio de redução do biofilme através do tratamento com o vidro bioativo F18. A primeira linha da primeira placa corresponde a fileira controle, na qual não é adicionado o vidro bioativo, nas demais o tratamento é realizado diferenciando-se a forma de aplicação do F18, produtos da dissolução e em pó, variando-se também a concentração 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL e 3,12 mg/mL.



Fonte: Do autor.

4.3.4 Quantificação de células viáveis do biofilme.

A inoculação deu-se como em 4.2.3, porém desta vez, decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante de cada um dos poços foi removido e adicionado a tubos do tipo Falcon de 15 mL, já separados e previamente identificados, contendo quatro mililitros de PBS. Os corpos de prova também foram transferidos, com o auxílio de uma pinça esterilizada.

Após desagregados os biofilmes, foram realizadas diluições seriadas de 10 até 10.000 vezes da solução original, em PBS, segundo método *Spread Plate*. O restante da suspensão foi inoculado em alíquotas de 2 mL, 1,8 mL, 1 mL e 100 µL utilizando-se o método de semeadura *Pour-Plate* em TSA. As placas foram incubadas a 36°C±1°C por 48 horas e após este período realizou-se a contagem de UFC.

4.4 Influência do pH na ação bactericida do F18.

Preparou-se o inóculo como descrito em 4.3.1, utilizando-se apenas a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) para realização deste teste. A amostra do vidro bioativo a ser utilizada foi pesada e esterilizada como em 4.3.2.

4.4.1 Montagem do experimento.

Adicionou-se um mililitro do inóculo bacteriano padronizado sobre a superfície dos corpos de prova sem recobrimento com o biomaterial, já esterilizados e acondicionados nos poços de uma microplaca. Foram feitas também amostras para sequente análise por MEV. As microplacas foram incubadas a 36°C±1° C por 24 horas.

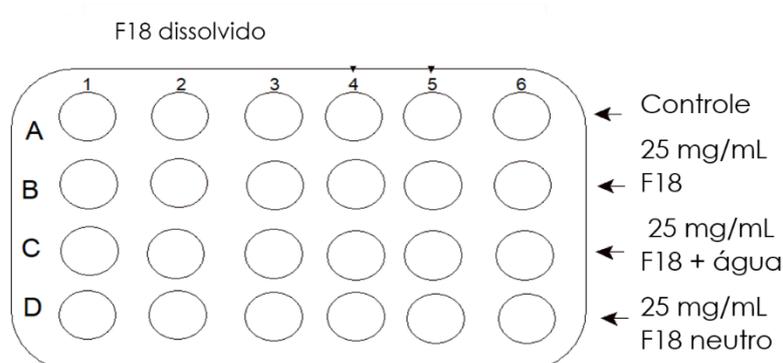
Para avaliar o efeito do pH frente ação bactericida do F18, fez-se uso de 25 mg/mL do vidro bioativo, aplicando-se apenas os produtos de dissolução do mesmo. A solução foi preparada como descrito em 4.3.3. Após filtração, aferiu-se o pH da solução, utilizando-se o medidor de pH de bancada da marca qualXtron®, modelo QX 1500. Dividiu-se então o volume total da solução em três partes iguais, transferindo-a para frascos separados.

Foram adotados três tratamentos diferentes. No primeiro, não foi realizada nenhuma alteração no que diz respeito ao valor de pH, mantendo-se a solução de F18 em pH alcalino. Para o preparo do segundo tratamento, o pH da solução de F18 foi neutralizado utilizando-se 470µL de ácido clorídrico (HCl) 2 M obtendo-se um valor de

pH de $7,5 \pm 0,2$. E para o último tratamento escolhido, adicionou-se à solução de F18 $470 \mu\text{L}$ de água destilada, mesma quantidade em volume que foi utilizada de HCl no segundo tratamento. As amostras foram filtradas novamente.

Os corpos de prova contendo biofilme bacteriano pré-formado em sua superfície, foram lavados com PBS e transferidos para uma nova microplaca esterilizada. Adicionou-se então um mililitro da solução contendo os produtos da dissolução do F18 referente a cada tratamento nas respectivas triplicatas. O controle foi mantido em PBS (Figura 7). As microplacas foram incubadas em estufa a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

FIGURA 7: Esquema de Montagem da microplaca de 24 orifícios para avaliação da influência do pH na atividade bactericida do F18. A primeira linha corresponde ao controle, na qual não é adicionado o vidro bioativo, nas demais os tratamentos com F18 diferem basicamente com relação aos valores de pH.



Fonte: Do autor.

Ocorreu-se como em 4.3.4, para a quantificação das células bacterianas viáveis.

4.4.2 Morfologia de células bacterianas presentes no sobrenadante.

Colocou-se uma membrana filtrante de acetato de celulose com poros de $0,2 \mu\text{m}$ sobre um suporte de filtração previamente esterilizado. Com o auxílio de uma micropipeta, transferiu-se lentamente os sobrenadantes das amostras referentes à análise microscópica de cada tratamento com F18 realizado e o controle, separadamente, para o aparato de modo a realizar a filtração sob vácuo. A membrana foi então transferida para uma placa, onde fixou-se com glutaraldeído, preparando-as para subsequente análise por microscopia.

4.5 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Para avaliação da aderência, formação do biofilme sobre os corpos de prova após 24 horas de indução do mesmo, e análise morfológica das células presentes no sobrenadante após tratamento com F18, as membranas filtrantes, e os corpos de prova referentes a cada experimento realizado, foram lavados com PBS e fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% durante 15 minutos, seguido da desidratação gradual em série crescente de álcool etílico (70, 80, 90, e 100%), por 30 minutos cada um, sendo a solução de 100% substituída duas vezes.

As amostras secas, foram recobertas com uma camada nanométrica de ouro e fixadas no porta amostra por meio de fitas condutoras. Para obtenção das imagens foram feitas análises prévias em aumentos menores de modo a percorrer uma maior área superficial da amostra, garantindo-se assim, que as imagens obtidas em maiores aumentos refletissem realmente a amostra como um todo. Para tanto, foi utilizado o microscópio da marca Philips modelo XL30 FEG com acessório EDS (Espectroscopia de raio X por dispersão de energia) do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE-DEMa / UFSCar).

4.6 Análise estatística

A partir de cada teste realizado, em três ocasiões distintas, obteve-se um conjunto de dados resultantes das contagens de células bacterianas. Quando necessário, os valores foram multiplicados pelas respectivas diluições escolhidas para contagem, obtendo-se o número de UFC/mL. A partir do valor da área do corpo de prova, converteu-se o resultado acima para UFC/cm². Todos os valores foram representados em sua forma logarítmica para facilitar a visualização de redução microbiana. Foi possível também, obter a média das contagens e o desvio padrão entre os valores e com esses dados foram elaborados os gráficos.

Com o intuito de verificar a dimensão dos dados e a variabilidade de cada tratamento, utilizou-se da estatística. Primeiramente realizou-se o teste de Levene, para avaliar a homogeneidade de variância, seguido da análise de variância (ANOVA), para verificar a diferença estatística das médias e, por último o Teste de Tukey, para comparar a igualdade das médias. Os testes foram realizados com um nível de significância de 0,05, por meio do programa OriginPro 8.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo cinético da ação do F18 na formação do biofilme de *S. aureus*.

Os resultados das contagens de UFC para visualização da inibição da formação dos biofilmes, após diferentes tempos de contato de *S. aureus* com os corpos de prova recobertos com vidro bioativo F18, são apresentados na Figura 8.

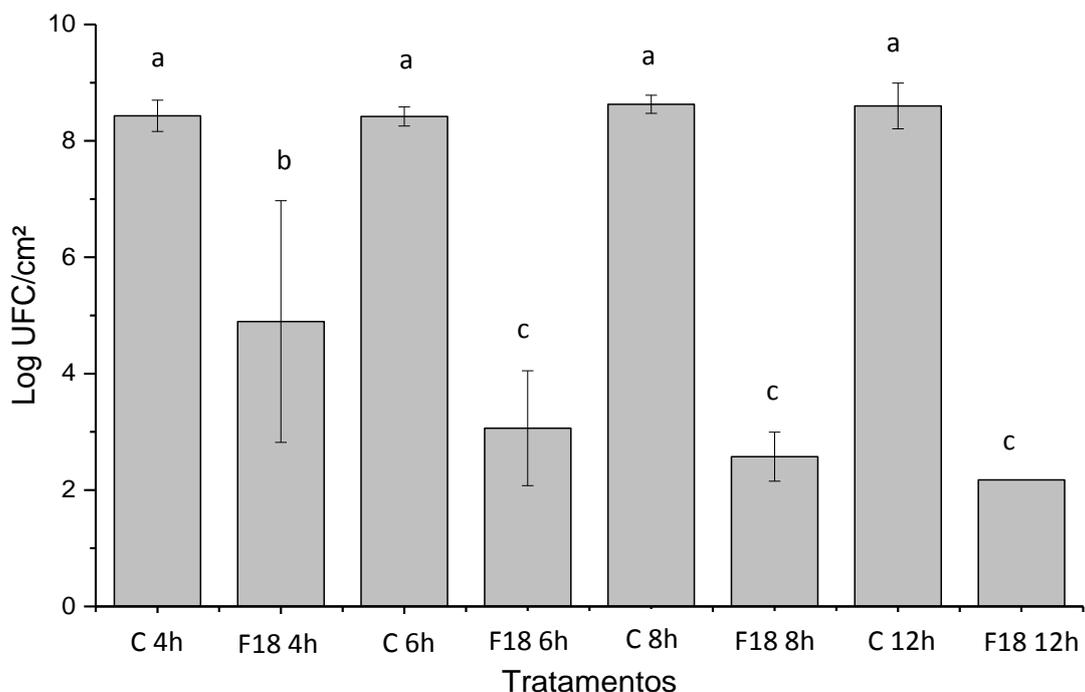
Neste ensaio houve um aumento no número de colônias nas amostras controle em comparação com o inóculo inicial padronizado em 10^6 UFC/mL, mostrando que o período de quatro horas já foi suficiente para que as células do microrganismo se aderissem à superfície do corpo de prova, as quais após contato com meio de cultura nutritivo foram capazes de se multiplicar.

Comparando-se médias específicas por meio de teste estatístico, notou-se que todos os tratamentos, após quatro, seis, oito e 12 horas de contato direto do inóculo com o F18 são significativamente diferentes dos respectivos controles (Figura 8). Os controles não diferem entre si, ou seja, há uma forte indicação de que o crescimento bacteriano é independente do tempo de contato direto do inóculo em PBS com o corpo de prova.

O biofilme bacteriano que esteve em contato direto com F18 por quatro horas é significativamente diferente dos que permaneceram em contato por seis, oito e 12 horas. E não há diferença significativa entre as amostras tratadas com F18 por seis, oito e 12 horas. O que pode indicar um efeito dependente do tempo

Com base nas informações obtidas após a análise estatística, apesar do F18 ter apresentado atividade antibiofilme ligeiramente superior nos períodos de oito e 12 horas (restaram $2,57 \log \text{ UFC/cm}^2$ e $2,18 \log \text{ UFC/cm}^2$ respectivamente após o tratamento) quando comparamos com seis horas (restaram $3,06 \log \text{ UFC/cm}^2$), as médias não são significativamente diferentes, podendo-se sugerir que para um tratamento mais rápido, manter a amostra bacteriana em contato direto com o F18 por seis horas seria suficiente para reduzir efetivamente 5,36 logs da população de *S. aureus*.

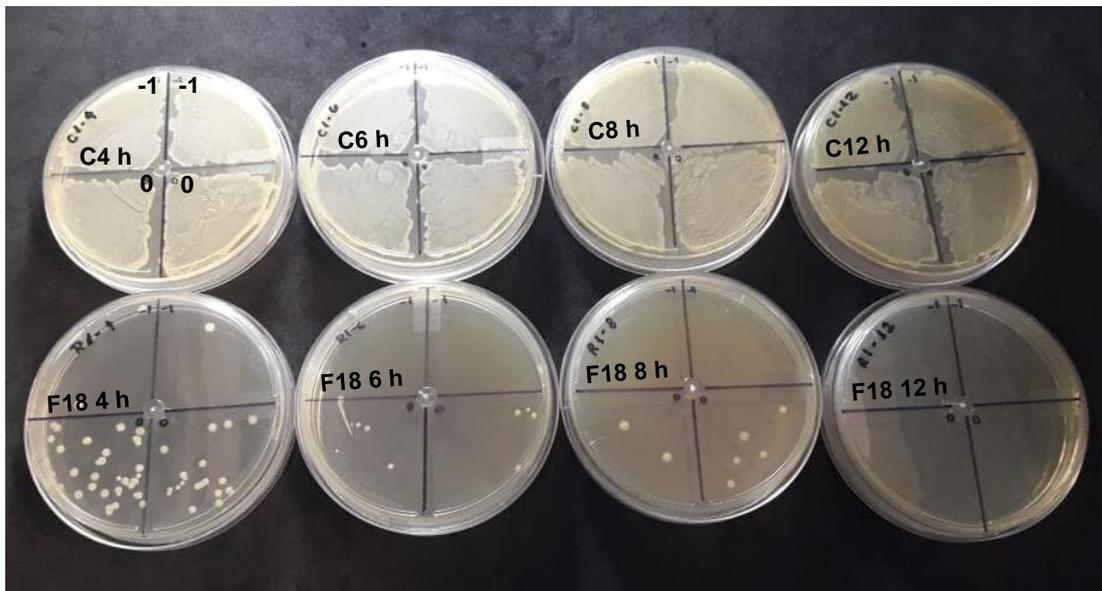
FIGURA 8: Representação gráfica do log UFC/cm² do biofilme de *S.aureus* após realização do estudo cinético da ação do F18. Corpos de prova recobertos 60% com vidro bioativo F18 comparados com controle (C), sem recobrimento. Barras representam desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Do autor.

Decorridas 12 horas de contato direto entre o inóculo de *S. aureus* com o biomaterial, as amostras não apresentaram nenhum crescimento bacteriano visível, o que pode ser notado na Figura 9, na qual é mostrado o resultado após inoculação das amostras originais do biofilme bacteriano desagregado em PBS, sem diluição e com diluições de 10 vezes de todas as condições testadas. O limite de detecção do experimento é de 200 UFC/mL, e foi este o resultado considerado, quando não havia crescimento microbiano aparente. Isso explica o desvio padrão igual a zero para a média logarítmica após 12 horas de contato do inóculo com F18, sabendo-se que o valor real seria o de < 200 UFC/mL para esta amostra.

FIGURA 9: Resultado obtido após realização do estudo cinético da ação do F18 na formação do biofilme de *S. aureus*. Controles na linha superior da imagem, e tratados com F18 na linha inferior, inoculadas diluições de 10 vezes e amostra original sem diluição de cada tratamento.



Fonte: Do autor.

Este experimento foi baseado na norma JIS Z 2801:2010, a qual estipula a redução de 2,0 logs de microrganismos como limite de sensibilidade. Após todos os períodos de incubação com contato direto entre o inóculo em PBS e o biomaterial (quatro, seis, oito e 12 horas) obteve-se uma redução maior que 3,0 logs, na quantidade de células viáveis do biofilme de *S. aureus*, quando comparados com o controle (Figura 10), valores maiores que o estipulado pela JIS.

Utilizou-se a equação (1) para avaliar a atividade bactericida do F18.

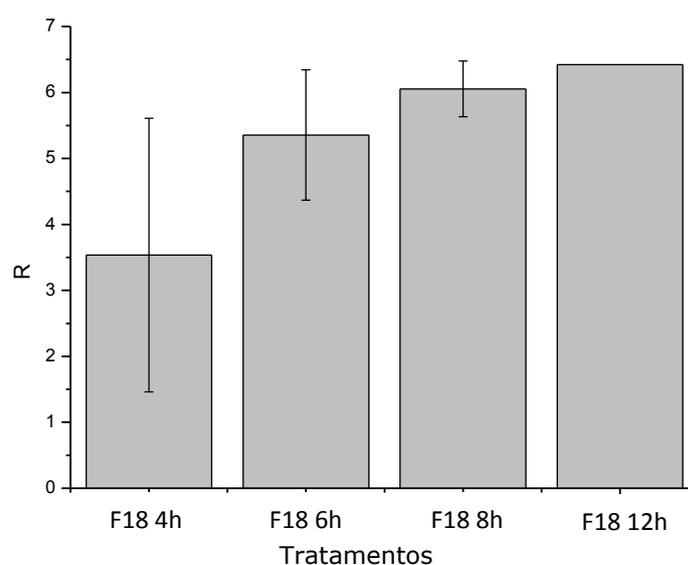
$$R = Ct - Tr \quad (1)$$

Sendo R a redução logarítmica de células viáveis, Ct a média dos logaritmos de UFC/cm² após 24 horas de contato do inóculo com os corpos de prova controle e Tr a média dos logaritmos de UFC/cm² de cada tratamento após 24 horas em contato com os corpos de prova recobertos com 60% de F18.

Em estudo realizado, Souza e colaboradores (2017) observaram valores de redução em torno de 6,0 logs para *S. aureus* na forma planctônica após 24 horas de contato com F18. Notou-se que no presente trabalho foi possível otimizar o tempo de tratamento, sendo necessárias apenas oito horas de contato do biofilme de *S. aureus* com F18 para que se atingisse a redução de 6,05 logs.

Como pode-se notar, em todos os períodos nos quais manteve-se contato direto entre o inóculo e o biomaterial foi possível observar a eficácia da ação bactericida pelo F18, sendo este capaz de controlar a formação do biofilme de *S. aureus* nas condições testadas.

FIGURA 10: Representação gráfica dos valores de redução logarítmica de células viáveis (R) após realização do estudo cinético da ação do F18.



Fonte: Do autor.

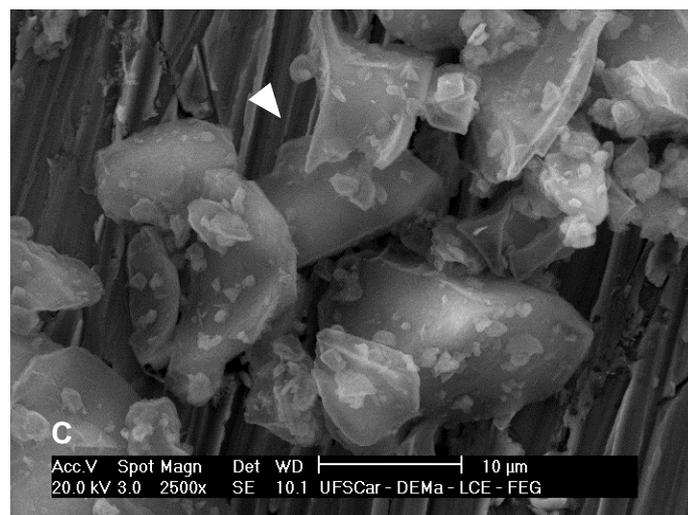
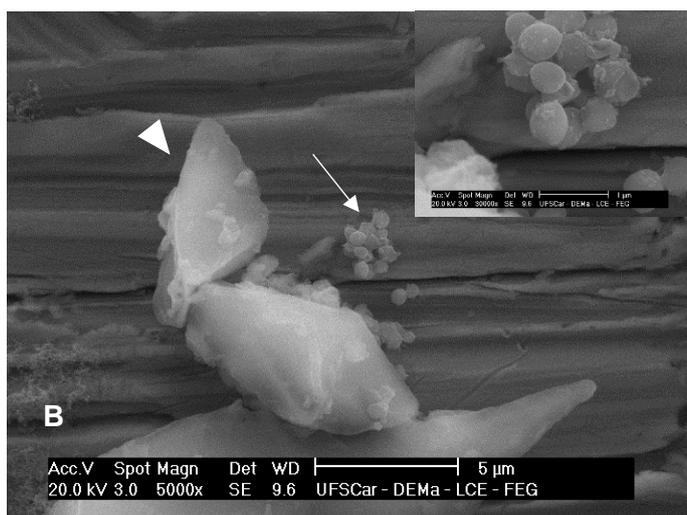
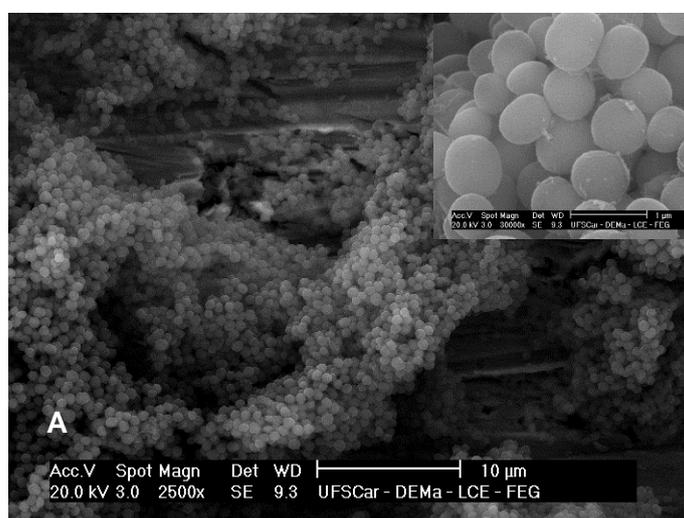
Utilizou-se então a Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para verificar aderência, estrutura e formação do biofilme bacteriano sobre a superfície dos corpos de prova. Segundo Priester et al., (2007) esta técnica é considerada a melhor ferramenta de imagem para tal objetivo, oferecendo detalhes e permitindo a visualização de biofilme em 3D de alta resolução.

Nas imagens obtidas por MEV após a realização do estudo cinético, pode-se observar uma diferença no número de células bacterianas aderidas na superfície do corpo de prova, quando comparamos o controle (Figura 11A), com as amostras tratadas com F18 (Figura 11B e C), o que condiz com os resultados quantitativos de redução das células viáveis.

Como não havia diferença significativa entre a quantidade de UFC nos controles, optou-se por mostrar apenas um período estudado. Passadas quatro horas de contato direto do inóculo com o F18 presente na superfície do corpo de prova (Figura 11B), quase não se encontravam células bacterianas na amostra, porém ainda era possível notar a diferença de tamanho entre as partículas do F18 marcadas com

cabeça de seta, que apresentam um diâmetro médio igual a 49 μm antes de entrar em contato com meio aquoso e as células bacterianas, marcadas com seta branca, que apresentam em média um diâmetro entre 0,5 e 1 μm . Após 12 horas não foi perceptível, na área da superfície analisada, notar a presença de *S. aureus*, restando apenas o biomaterial desgastado na superfície do corpo de prova.

FIGURA 11: Imagens obtidas através de MEV, biofilme de *S. aureus* formado na superfície dos corpos de prova após realização do estudo cinético. Controle, corpo de prova sem recobrimento após 4 horas (A) corpo de prova recoberto com 60% de F18 após quatro horas (B) e 12 horas (C) de contato direto do inóculo com a superfície. No canto superior direito das imagens (A) e (B) aumento de 30000x da célula bacteriana. Seta indica célula bacteriana *S. aureus*, cabeça de seta mostra partícula do vidro bioativo F18.



Fonte: do autor.

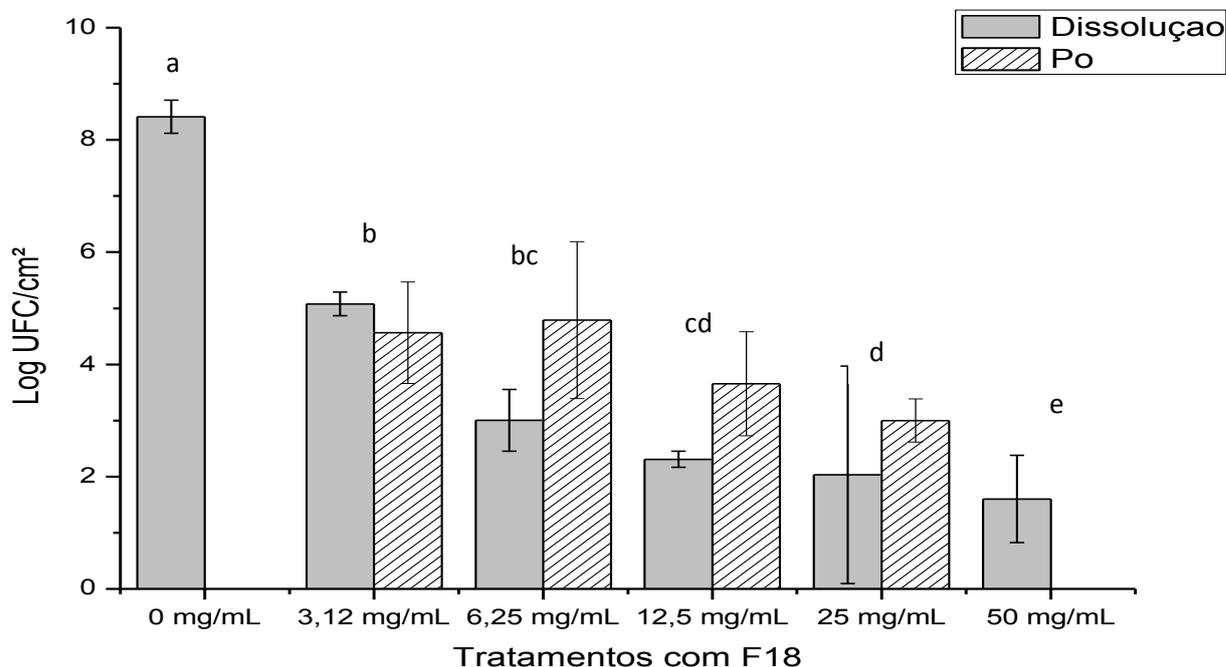
Considerando os resultados obtidos, pode-se dizer que o F18 apresentou atividade antibiofilme, sendo essencial o contato direto do inóculo de *S. aureus* em meio salino (PBS) com o vidro bioativo para a eficácia na diminuição do desenvolvimento bacteriano na superfície do corpo de prova.

5.2 Teste de redução do biofilme de *S. aureus* e MRSA.

Neste teste, realizou-se a semeadura por *Pour Plate* das amostras tratadas com F18, garantindo-se assim, que todo o volume das amostras fosse inoculado, trazendo maior precisão para os resultados, reduzindo também o valor de limite de detecção do experimento para 1 UFC/mL.

Na Figura 12 tem-se o gráfico do log UFC/cm² do biofilme de *S. aureus* após tratamento com diferentes concentrações e aplicações do vidro bioativo F18.

FIGURA 12: Representação gráfica do log de UFC/cm² do biofilme de *S. aureus* após realizar o teste de redução com diferentes concentrações de F18. Compara-se tratamentos onde foram aplicados os produtos de dissolução e o pó com controle (0 mg/mL). Barras representam desvio padrão. Letras diferentes mostram que há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Do autor.

Pode-se dizer que o vidro bioativo F18 apresentou um efeito bactericida efetivo sobre o biofilme pré-formado de *S. aureus*. Comparando-se médias específicas

estatisticamente, notou-se que todos os tratamentos com F18 são significativamente diferentes do controle.

Analisando a Figura 12 notou-se que ao se aplicar 50 mg do pó do F18 seguido de 1 mL de PBS, atingiu-se o limite de detecção da técnica, de 1 UFC/mL, e foi este o valor considerado quando não havia crescimento microbiano aparente. Souza e colaboradores (2017) também mostraram que com 50 mg/mL de F18 conseguiu-se inviabilizar toda a população de microrganismos planctônicos de *S. aureus*.

Após realizar uma comparação entre as médias, o teste estatístico mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos no que diz respeito às formas de aplicação, produtos de dissolução e aplicação direta do pó do F18. Podendo-se sugerir que qualquer uma das formas de aplicação resultaria em uma redução representativa na quantidade de células viáveis do biofilme de *S. aureus*.

Os valores de redução logarítmica de células viáveis diminuíram ligeiramente com a redução da concentração de F18 (Figura 13), tanto após o tratamento com os produtos de dissolução quanto para o tratamento com aplicação direta do pó, o que pode indicar um efeito bactericida dose dependente do vidro bioativo. Segundo estatística, ao menos uma das concentrações utilizadas difere nos resultados quando se trata da redução de UFC. A utilização da menor concentração testada (3,12 mg/mL) apesar de apresentar menor valor de redução do que as demais concentrações, ainda se mostra bastante eficaz reduzindo mais que 3 logs da quantidade de células viáveis do biofilme em ambos os modos de aplicação do F18.

Para uma proposta de tratamento que utilize uma quantidade intermediária do biomaterial, pode-se recomendar o emprego de 12,5 mg/mL garantindo-se ainda uma redução maior que a de 4 logs no número de células bacterianas viáveis presentes. Além disso, segundo análise estatística, esta concentração não se mostra significativamente diferente das concentrações anteriormente (6,25 mg/mL) e posteriormente (25 mg/mL) testadas.

O efeito antimicrobiano de algumas composições de vidro bioativo já foram estudados, pode-se citar Hu e colaboradores, (2009) que identificaram atividade bactericida no pó do Bioglass® 45S5. As partículas utilizadas possuíam diâmetro médio de 50 µm e uma concentração de 50 mg/mL do pó do 45S5 atingiu 98% (~2,0 logs) de eliminação dos microrganismos planctônicos presentes. Coraça-Huber e colaboradores (2014) observaram um valor de redução correspondente a 6 logs na quantidade de células bacterianas viáveis de biofilmes de *S. aureus*, após 24 horas

do tratamento com 500 mg/mL e partículas com 45 µm do vidro bioativo S53P4. Sendo necessário o uso de uma concentração 10 vezes maior do biomaterial do que a utilizada no presente estudo para comprovação da eficácia da atividade bactericida.

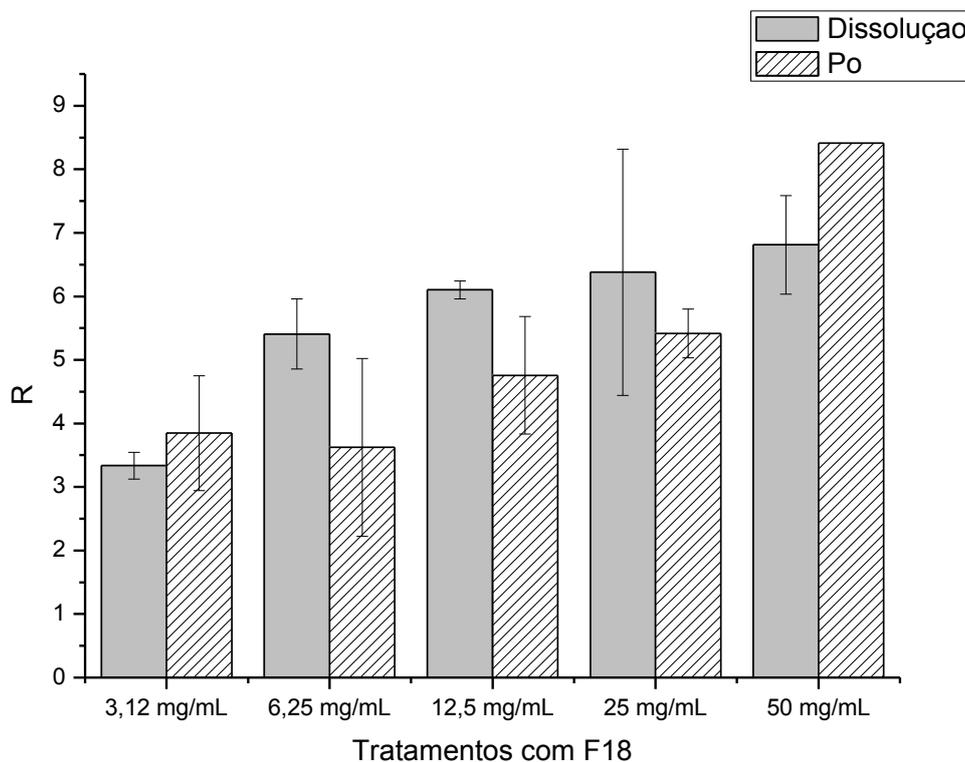
Os resultados obtidos na pesquisa em questão foram muito superiores aos encontrados pelos autores citados acima, onde ao se utilizar 50 mg/mL do pó de F18 com aproximadamente 49 µm de diâmetro obteve-se uma redução de mais de 8 logs da população bacteriana, durante a realização dos ensaios de redução do biofilme de *S. aureus*.

Como reportado por Zhang e colaboradores (2010) foi necessário o uso de 100 mg/mL de S53P4, concentração duas vezes maior do que a utilizada de F18, para que houvesse a redução das células bacterianas viáveis, na forma planctônica, testadas. Hu e colaboradores (2009) também observaram que para se obter valores de redução de células bacterianas acima de 98% foi preciso o uso de 100 mg/mL do pó de 45S5. Ambos os trabalhos confirmaram uma relação dose dependente para o aumento da eficácia da ação bactericida dos vidros bioativos, assim como também pode ser observado na presente pesquisa. Apesar da semelhança, os resultados obtidos com F18 mostraram maior eficiência na redução de microrganismos viáveis em biofilmes bacterianos e em concentrações muito menores.

Rivadeneira e colaboradores (2013) também atingiram bons resultados de atividade bactericida com partículas de 45S5 entre 5 a 100 µm contra *S. aureus* na forma planctônica, a concentração utilizada foi menor do que a estabelecida no presente estudo para o F18, porém eles observaram que foram necessárias 48 horas para que se obtivesse uma redução na quantidade de células viáveis, o dobro do tempo necessário para o pó e as fibras de F18 (Souza et al., 2017).

Considerando os diferentes procedimentos experimentais usados em estudos prévios, o F18 apresenta um efeito bactericida mais rápido e efetivo quando comparado com outros vidros bioativos.

FIGURA 13: Representação gráfica dos valores de Redução logarítmica de células viáveis (R) após realização do teste de redução do biofilme de *S. aureus*.

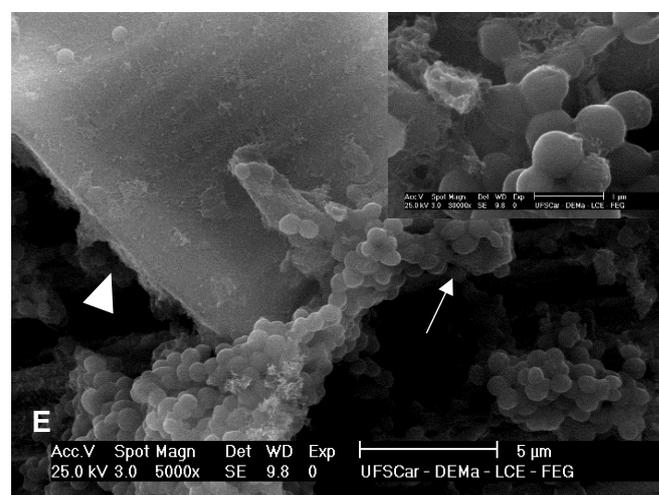
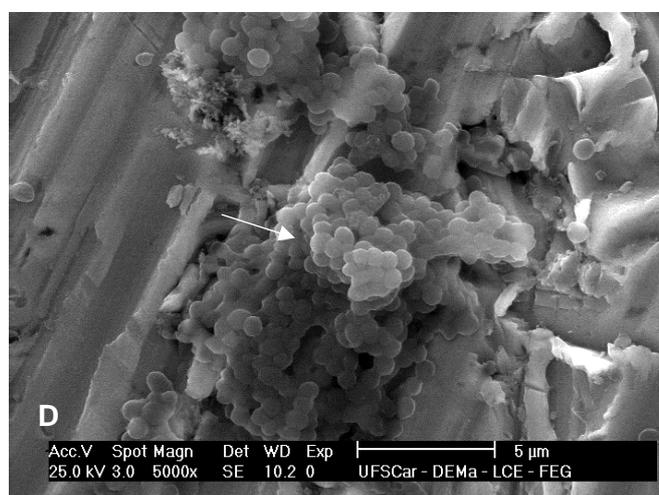
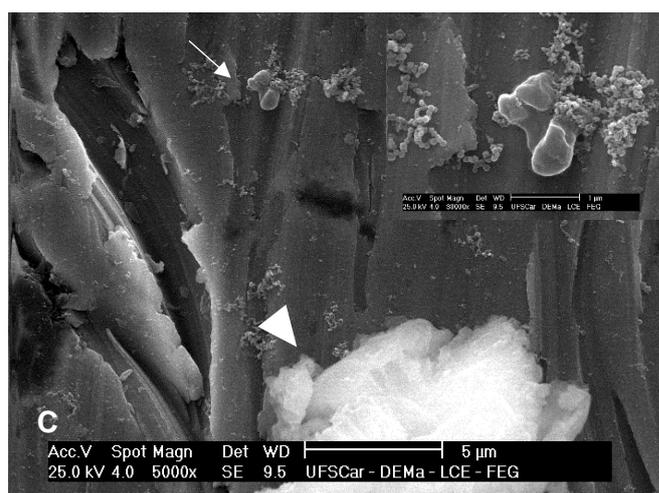
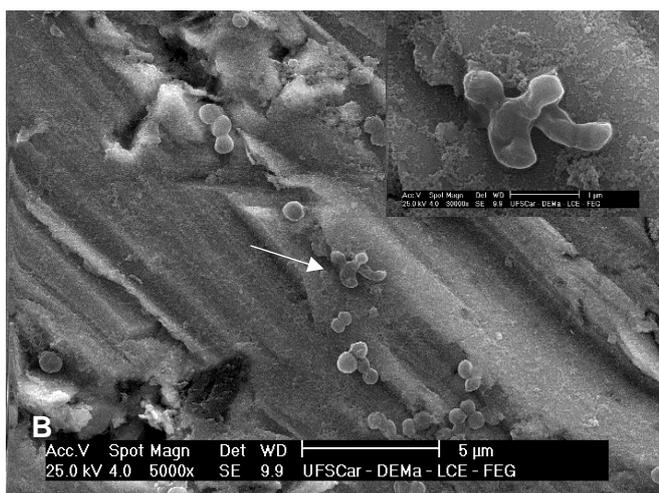
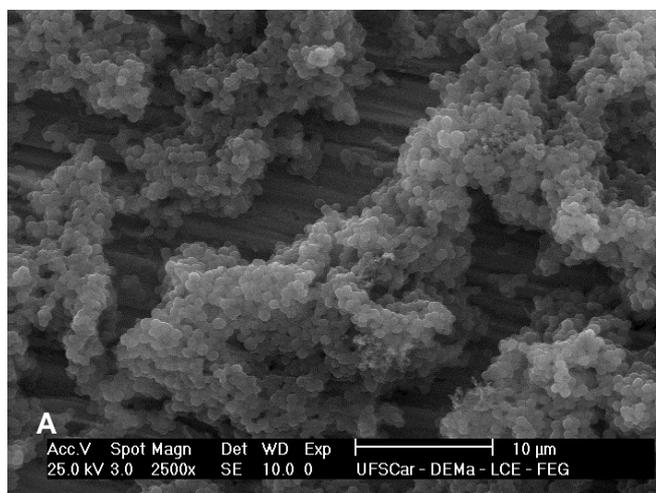


Fonte: Do autor.

Com as imagens obtidas por MEV, tem-se uma visão qualitativa da redução do número de células bacterianas presentes na superfície do corpo de prova quando se compara o controle (Figura 14A) com as amostras tratadas com F18 (Figura 14B, C, D, e E). O que auxilia na comprovação da eficácia da ação bactericida do F18 em biofilmes de *S. aureus*.

Ainda analisando as imagens obtidas por MEV após aplicação dos produtos de dissolução e pó do F18 nas concentrações de 50 mg/mL (Figura 14B e C) e 3 mg/mL (Figura 14D e E), nota-se uma diminuição na quantidade de células presentes na superfície do corpo de prova da menor para a maior concentração testadas, o que corrobora com a relação de possível dependência da dose de biomaterial aplicada sugerida, e com os dados quantitativos apresentados. Ademais, nota-se que as células bacterianas que estiveram em contato com F18, aparentam estar bastante danificadas (aumento 30000x Figura 14B, C e E).

FIGURA 14: Imagens obtidas através de MEV, biofilme de 24 horas de *S. aureus* formado na superfície do corpo de prova após realização do teste de redução. Controle, corpo de prova sem recobrimento com o biomaterial (A) corpo de prova após aplicação dos produtos da dissolução e aplicação direta do pó, 50 mg/mL F18 (B) e (C) e 3 mg/mL (D) e (E). No canto superior direito das imagens (B), (C) e (E) aumento de 30000x da célula bacteriana. Seta indica célula bacteriana *S. aureus*, cabeça de seta mostra partícula do vidro bioativo F18.

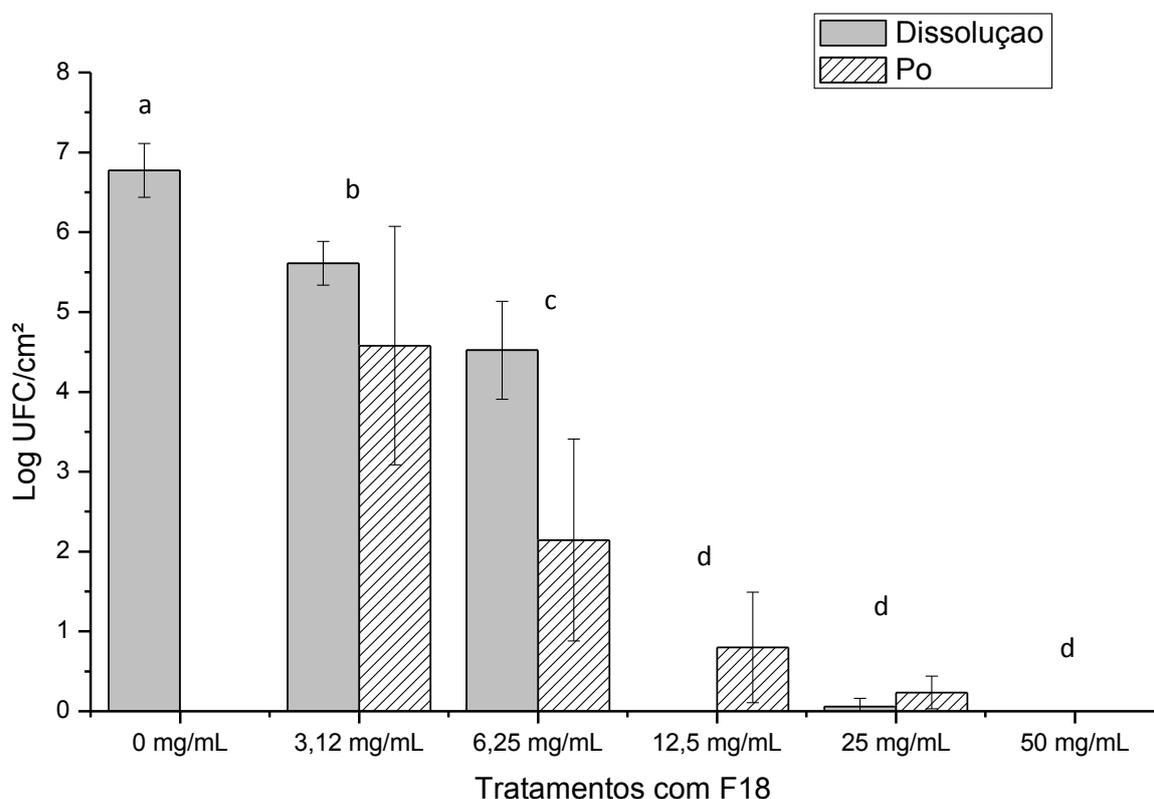


Fonte: Do autor.

Resultados semelhantes foram encontrados ao se realizar o teste de redução em biofilmes pré-formados de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

Na Figura 15 encontra-se o gráfico do log UFC/cm² do biofilme de MRSA após tratamento com as mesmas concentrações e maneiras de aplicação do vidro bioativo F18 utilizadas para o biofilme de *S. aureus*.

FIGURA 15: Representação gráfica do log de UFC/cm² do biofilme de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), após realizar o teste de redução com diferentes concentrações de F18. Compara-se tratamentos onde foram aplicados os produtos de dissolução e o pó, com controle sem pó (0 mg/mL em PBS). Barras representam desvio padrão. Letras diferentes mostram que há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

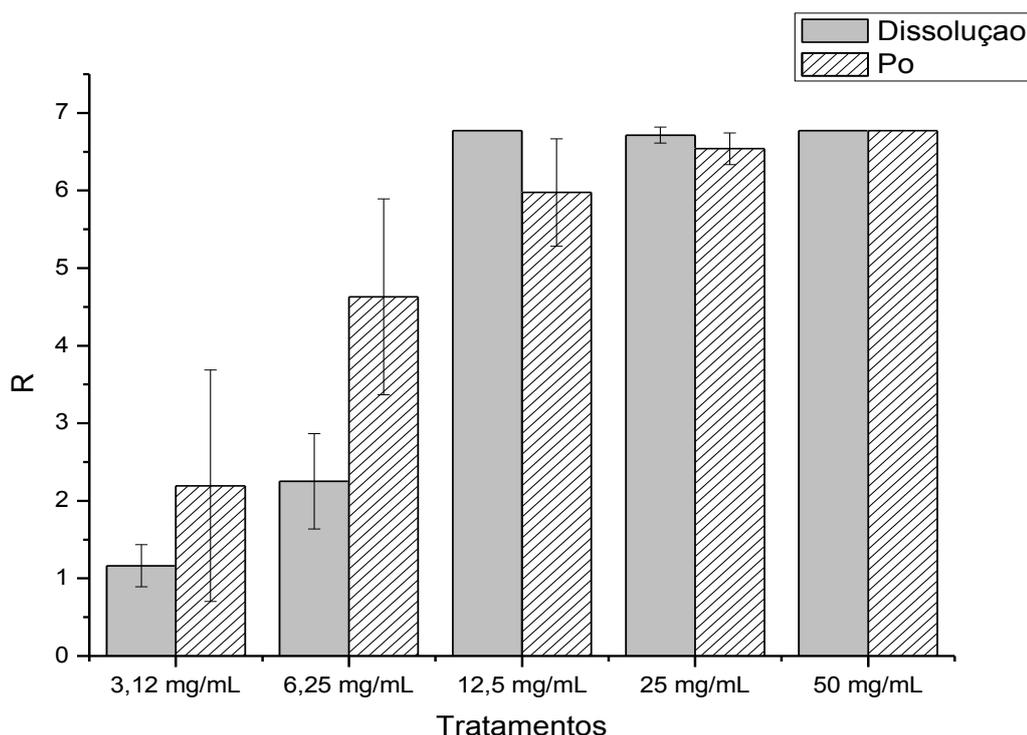


Fonte: Do autor.

Avaliando-se os valores médios obtidos após realização do experimento, notou-se que os tratamentos com vidro bioativo apresentaram efeito bactericida sobre o biofilme de MRSA, reduzindo a quantidade de células bacterianas viáveis ao se comparar com o controle. Segundo estatística, todos os tratamentos se mostraram significativamente diferentes do controle.

Comparando-se os modos distintos de aplicação do F18 sobre o biofilme pré-formado de MRSA por meio de teste estatístico, observou-se que ao menos um dos tratamentos testados difere significativamente com o modo de aplicação no valor médio de redução de células viáveis, apesar disto, ambas as formas resultaram em valores representativos de redução de UFC (Figura 16).

FIGURA 16: Representação gráfica dos valores de Redução logarítmica de células viáveis (R) após realização do teste de redução do biofilme de *S. aureus* resistente à metilina (MRSA).



Fonte: Do autor

As maiores concentrações testadas (50 mg/mL, 25mg/mL e 12,5 mg/ml) não se mostraram significativamente diferentes umas das outras, e atingiu-se o limite de detecção da técnica de 1 UFC/mL ao se aplicar 50 mg/mL dos produtos de dissolução e pó do F18. Assim como aplicação de 12,5 mg/mL dos produtos de dissolução F18. Pode-se sugerir então, o uso de 12,5 mg/mL para o tratamento garantindo-se ainda um valor de redução de aproximadamente 6 logs.

Em estudo realizado por Drago e colaboradores em 2014, abordou-se o efeito bactericida do vidro bioativo S53P4 em biofilmes bacterianos de MRSA. Para tanto, foram utilizadas partículas com diâmetro médio menor que 45 μm em uma concentração de 400 mg/mL do pó do biomaterial evidenciando-se uma redução de

80% da biomassa total obtida por meio da técnica do cristal violeta. Na presente pesquisa, foram obtidos resultados com qualidade bastante excedente ao citados acima, onde a concentração utilizada de 50 mg/mL (20 vezes menor) de pó F18 com aproximadamente 49 μm de diâmetro apresentou uma redução de mais de 6,77 logs do biofilme de MRSA.

Considerando os resultados de redução obtidos em biofilmes pré-formados de *S. aureus* e MRSA, pode-se dizer que o F18 apresentou atividade bactericida em ambos, reduzindo mais que 6 logs de células bacterianas viáveis após 24 horas do tratamento com a maior concentração do F18 (50 mg/mL) em ambas as formas de aplicação testadas.

5.3 Influência do pH na ação bactericida do F18.

O mecanismo de ação dos vidros bioativos na eliminação de microrganismos ainda está sendo estudado. Pontos em comum que aparecem em alguns trabalhos dizem respeito ao aumento do pH do meio aquoso e aumento da pressão osmótica, além da formação de partículas de vidro em formato de agulhas, que podem danificar a parede celular e causar a morte da bactéria. Deste modo, ao se realizar este teste propõe-se avaliar o efeito do pH na ação bactericida do F18.

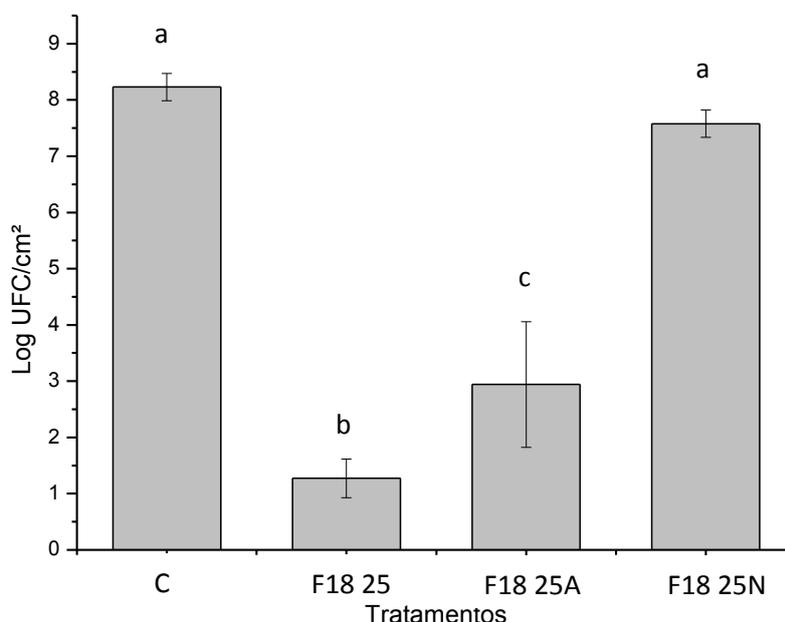
Sabe-se que a aplicação direta do pó de F18 acrescenta a variável “formato da partícula” no modo de ação bactericida do biomaterial, quando comparada com a aplicação dos produtos de dissolução do mesmo. Porém, partindo-se dos resultados apresentados em 5.2, notou-se que não houveram diferenças significativas entre as formas de aplicação do F18, na redução de células bacterianas, tratando-se de valores iguais de concentração. Logo, nas condições testadas, esta variável aparenta não interferir representativamente nos resultados. Allan, Newman e Wilson, (2001) obtiveram resultados similares, onde notaram que não era necessário o contato direto entre a partícula do vidro bioativo e a célula bacteriana para eficácia da atividade bactericida.

Ainda, o pó do vidro bioativo em contato com meio aquoso favorece a constante lixiviação de íons para o meio o que provavelmente dificultaria a manutenção do valor de pH neutro durante o período de 24 horas necessário para a realização do experimento. Optou-se, então trabalhar, neste teste, apenas com os produtos de dissolução do F18.

Observou-se também, que ao se utilizar a concentração de 25 mg/mL do F18 como tratamento, obteve-se valores de redução em torno de 6 logs na quantidade de células viáveis dos biofilmes pré-formados de *S. aureus*. Além disso, segundo estatística, não houve diferença significativa entre esta concentração e as anteriormente (12,5 mg/mL) e posteriormente (50 mg/mL) testadas.

Utilizou-se então, 25 mg/mL dos produtos de dissolução do F18 em todos os tratamentos com vidro bioativo realizados. Após 24 horas de contato do biomaterial com meio aquoso o pH da solução encontrava-se com o valor de $11,4 \pm 0,1$ devido a lixiviação principalmente de íons Na^+ para o meio. Na amostra onde ocorreu a neutralização com HCl o valor de pH foi reduzido para $7,5 \pm 0,1$. Na Figura 17, pode-se observar os resultados na redução de células bacterianas viáveis em biofilme de *S. aureus* em diferentes condições de pH

FIGURA 17: Representação gráfica do log de UFC/cm² do biofilme de *S. aureus* após verificação da influência do pH na ação do F18. Compara-se tratamento com 25 mg/mL do F18 em pH alcalino sem (F1825) e com adição de água destilada (F1825A) em pH neutralizado (F1825N) e o controle (C). Barras representam desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Do autor.

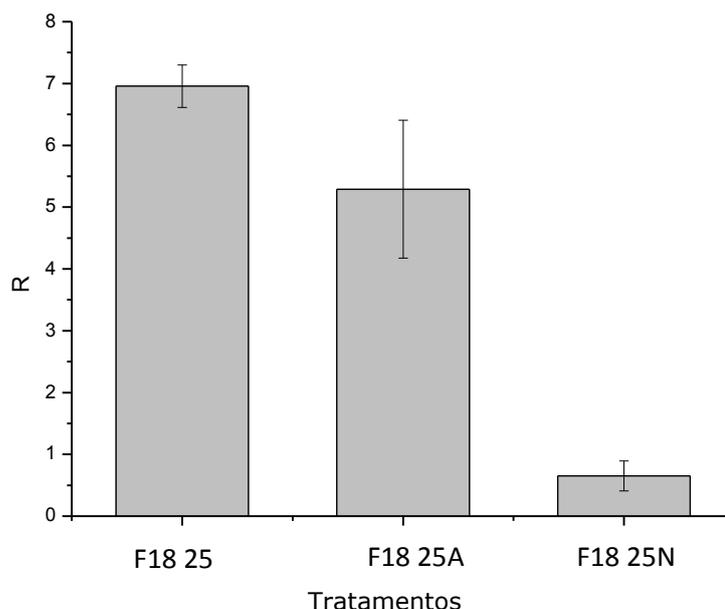
Analisando a Figura 17, ao se comparar a amostra que esteve em contato com a dissolução de F18 mantida em pH neutro e o controle, que não recebeu nenhum

tipo de tratamento com F18, nota-se que não houve efeito representativo de redução de UFC na superfície dos corpos de prova, e segundo a estatística, as médias obtidas não são significativamente diferentes.

De maneira oposta, na Figura 18, é perceptível a diferença ao se comparar os valores de redução bacteriana da amostra tratada com a solução de F18 mantida em pH alcalino sem adição de água, (6,96 logs) e a amostra mantida em pH neutro, (0,65 log) o que é suportado por teste estatístico, onde as médias são significativamente diferentes.

Pode-se observar, ainda, que o tratamento com 25 mg/mL de F18 em pH alcalino no qual não foi adicionado água destilada, promoveu uma maior redução na quantidade de células bacterianas viáveis (6,96 logs) se comparado com o tratamento no qual foi adicionado água destilada (5,29 logs) (Figura 18). Segundo teste estatístico estes tratamentos se mostram significativamente diferentes um do outro. O que nos leva a sugerir que uma possível diluição da concentração dos íons da solução de F18 pode ter afetado a atividade bactericida. Apesar disso, ambos os tratamentos são significativamente diferentes do controle, e da amostra mantida em pH neutro e apresentaram alta eficácia na atividade bactericida em biofilmes de *S. aureus*.

FIGURA 18: Representação gráfica dos valores de Redução logarítmica de células viáveis (R) após realização do teste de verificação da influência do pH sobre a ação do F18.



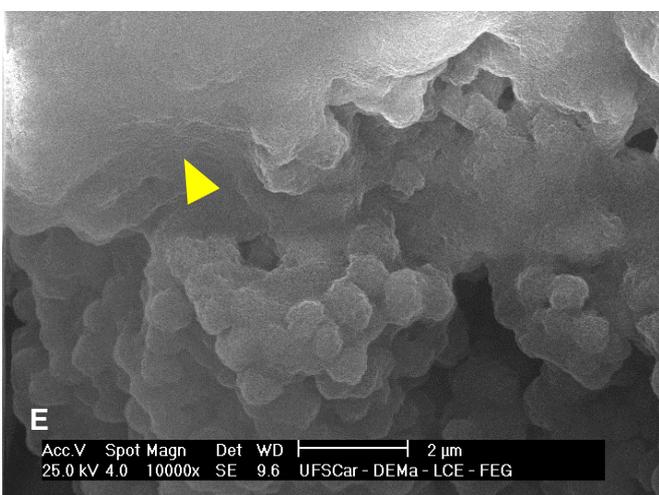
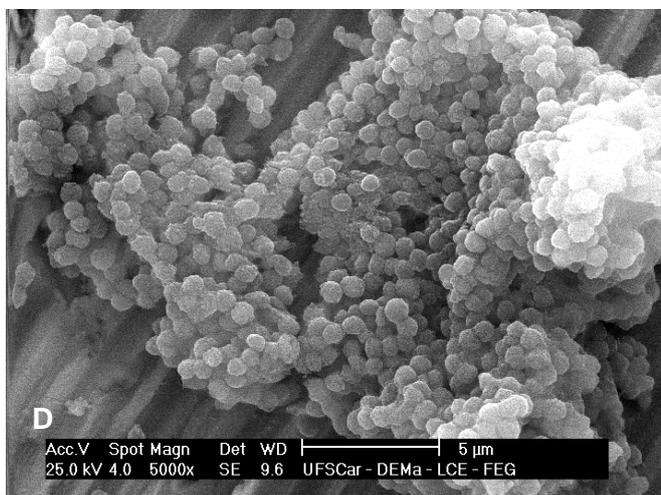
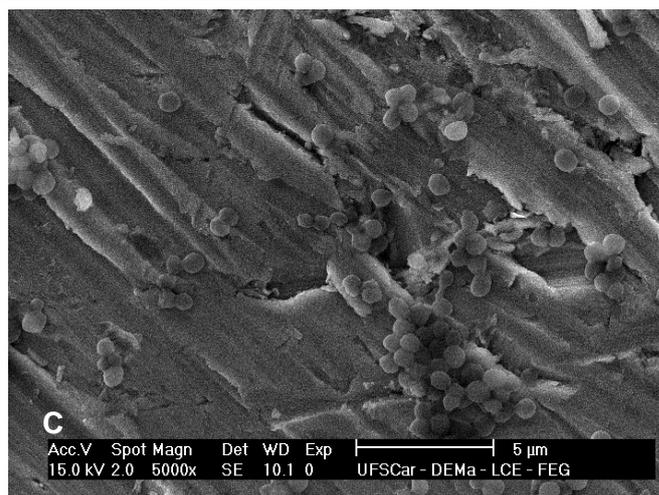
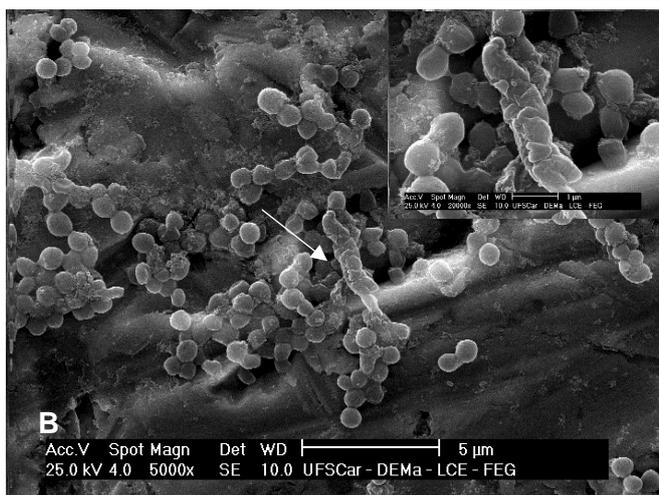
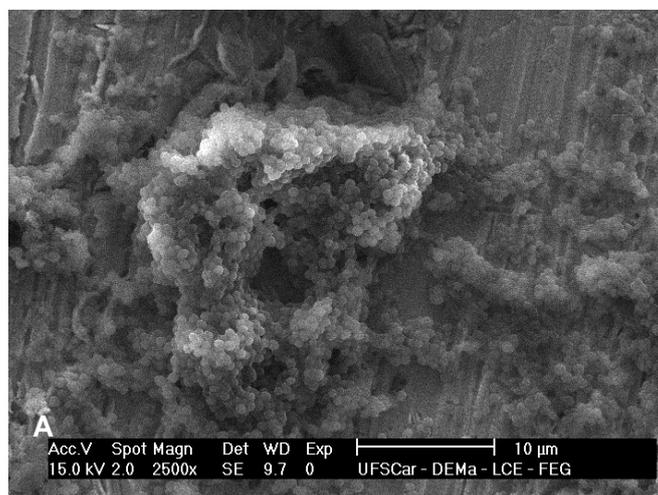
Fonte: Do autor.

Comparando-se as imagens obtidas por MEV, nota-se uma diminuição na quantidade de células presentes na superfície dos corpos de prova após tratamento com os produtos de dissolução de 25 mg/mL do F18 em pH alcalino (Figura 19B e C) quando comparados com o controle (Figura 19A). Ao contrário, quando se relaciona as superfícies dos corpos de prova mantidos em solução neutra de F18 (Figura 19D e E) com o controle (Figura 19A), não é perceptível essa diferença no desenvolvimento bacteriano. O que corrobora com os dados quantitativos apresentados.

Na Figura 19E encontra-se, o que aparentemente pode ser a formação de uma camada porosa rica em sílica-gel recobrando a superfície dos aglomerados celulares de *S. aureus* após manter-se o biofilme bacteriano pré-formado em contato com a solução neutralizada de F18 por 24 horas. Sabe-se que quando imerso em meio aquoso o vidro bioativo estimula a formação de uma camada biologicamente ativa de hidroxiapatita (HA) e segundo Rabiee e colaboradores, (2015) a formação da camada de sílica-gel é uma das etapas de formação da mesma, este fato corrobora com a observação de formação de sílica-gel no presente estudo.

Como pôde-se observar nas imagens uma redução na quantidade de células bacterianas presentes na superfície dos corpos de prova tratados com F18 em relação ao controle, tem-se as hipóteses de que na superfície restaram apenas restos celulares, e que algumas células que não foram desagregadas durante o tratamento.

FIGURA 19: Imagens obtidas através de MEV, biofilme de 24 horas de *S. aureus* formado na superfície do corpo de prova após realização do teste de influência do pH. Controle, corpo de prova sem recobrimento com o biomaterial (A) corpo de prova após aplicação com produtos da dissolução de 25 mg/mL F18 (B), 25 mg/mL mais água destilada (C) e 25 mg/mL pH neutralizado (D) e (E). No canto superior direito da imagem (B) aumento de 30000x da célula bacteriana. Seta indica célula bacteriana *S. aureus*, cabeça de seta mostra possível camada de sílica gel



. Fonte: Do autor.

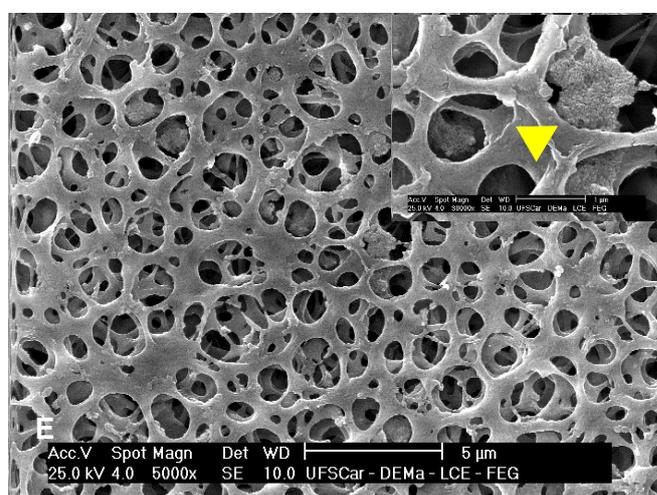
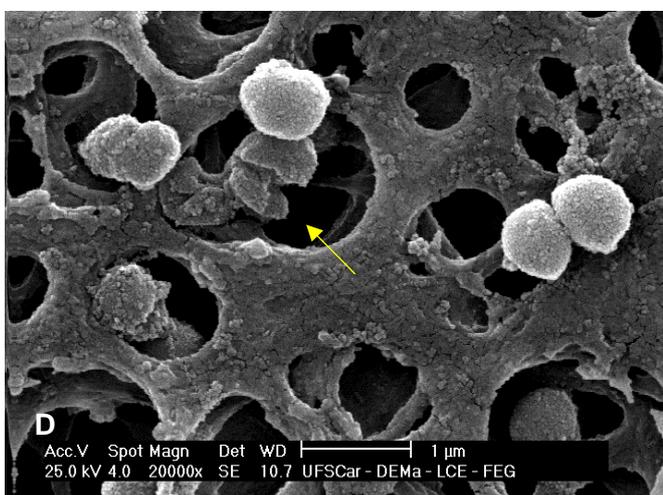
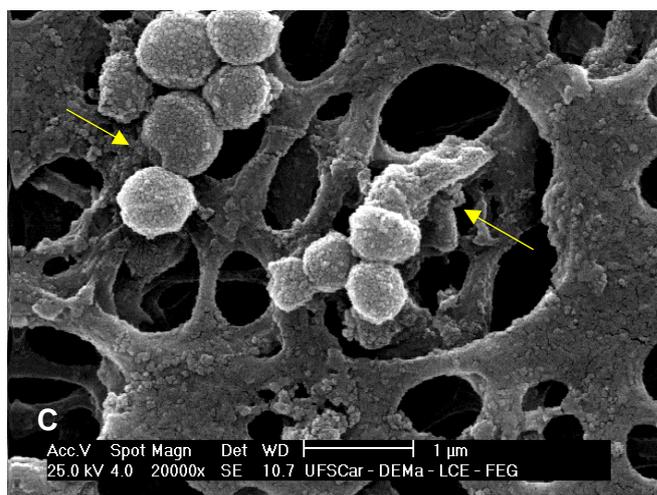
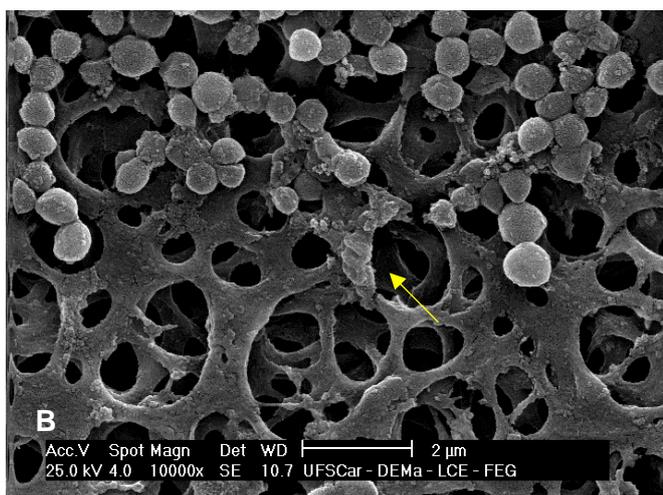
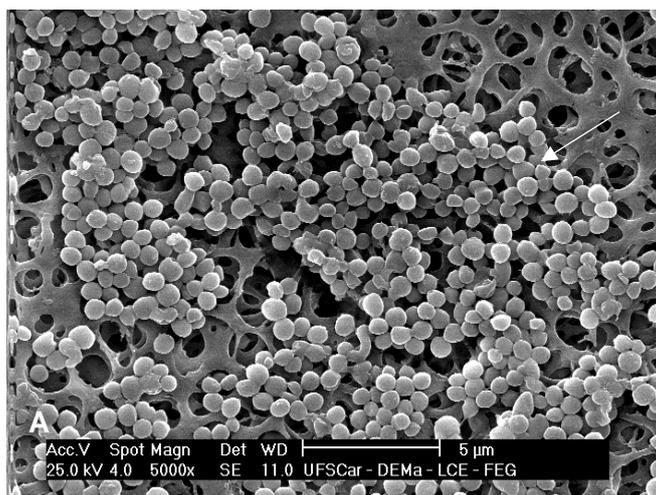
Analisou-se, então, as imagens de MEV das células retidas nas membranas filtrantes do sobrenadante do controle e de cada tratamento com F18 (pH alcalino e pH neutro). Foi possível observar a presença de células bacterianas desagregadas da superfície dos corpos de prova controle (Figura 20A) e tratado com F18 em pH alcalino (Figura 20B).

Sabe-se que a presença de células bacterianas em forma de cocos esféricos arranjados em agrupamentos tipo cacho de uva (estafilococos) são típicos do gênero *Staphylococcus* (indicados pelas setas brancas Figura 20). Entretanto pode-se observar, que as células que estiveram em contato com a solução de F18 em pH alcalino, indicadas pelas setas amarelas, aparentam ter sido danificadas, alterando sua morfologia (Figura 20B, C e D).

Drago e colaboradores, (2015) observaram o encolhimento e a redução das dimensões de células bacterianas após contato com o vidro bioativo S53P4. Ran, He e Liang (2013), notaram que o deslocamento para um ambiente alcalino, como o da solução de F18 utilizada como tratamento no presente estudo, gera uma tensão na célula bacteriana, que pode responder mudando sua morfologia e estrutura. Outro fator que deve ser levado em consideração é o aumento da pressão osmótica devido a liberação de íons para a solução, como Na^+ , Ca^{2+} por exemplo, que são liberados do F18 quando em contato com o meio aquoso. A concentração de solutos no citoplasma bacteriano é normalmente maior que a detectada no ambiente externo, resultando em uma pressão positiva na membrana celular. Um aumento repentino na concentração de solutos ao redor torna o meio hipertônico, e o abaixamento da pressão através da membrana celular resulta em um rápido fluxo de água de dentro para fora da célula, podendo resultar em células enrugadas, com tamanho alterados (Pilizota; Shaevitz, 2013), semelhantes as observadas na Figura 20B, C e D.

Dentro da área superficial da membrana analisada, onde ocorreu a filtração do sobrenadante após tratamento com F18 em pH neutro (Figura 20E), não foi possível notar a presença de células bacterianas, sugerindo-se que a possível formação da camada de sílica gel tenha influência sobre o desprendimento de agregados celulares de *S. aureus* da superfície do corpo de prova. Juntamente com as imagens por MEV, realizou-se uma análise por EDS (Espectroscopia por de raio X por dispersão de energia) na superfície da membrana onde observou-se a presença de 43,96% de silício (porcentagem em massa). O que corrobora com a possível formação da camada de sílica gel.

FIGURA 20: Imagens obtidas através de MEV, sobrenadante filtrado em membrana após realização do teste de influência do pH na ação do F18. Células de *S. aureus* desagregadas das superfícies, do corpo de prova controle, (A) do corpo de prova após aplicação com produtos da dissolução de 25 mg/mL F18 em pH alcalino (B) (C) e (D). No filtrado do corpo de prova com solução de F18 neutralizada (E) não foi possível observar células de *S. aureus*. No canto superior direito da imagem (E) aumento de 30000x, cabeça de seta mostra possível camada de sílica gel. Seta indica célula bacteriana *S. aureus*, seta amarela indica célula bacteriana com provável mudança morfológica.



Fonte: Do autor.

Relacionando os resultados obtidos pode-se dizer que a neutralização do pH da solução com os produtos da dissolução do F18 teve forte influência na diminuição da atividade bactericida do vidro bioativo em biofilmes de *S. aureus*.

Evidências mostram que o aumento do pH é um fator crítico para o efeito da atividade bactericida. De acordo com Begun et al., (2016) ambientes alcalinos podem alterar o pH da membrana citoplasmática, que tem um papel importante do carregamento de nutrientes para dentro da célula, o que explica em partes a inibição do crescimento e os efeitos tóxicos na célula bacteriana. É sabido que ambientes alcalinos muitas vezes não são tolerados pelos microrganismos e que o valor de pH ótimo para o crescimento das células de *Staphylococcus aureus* é entre 7,0 e 7,5 sendo que elas são capazes de crescer entre 4,5 e 9,3 (Misra et al., 2010).

No Quadro 3, tem-se um resumo dos principais estudos já realizados com vidros bioativos, nos quais foi comprovada a eficácia da atividade bactericida dos mesmos, nas condições testadas.

Quadro 3: Resumo dos principais estudos com vidros bioativos relacionando-se valores de pH e tamanho de partículas utilizadas.

Fonte	Vidro Bioativo	pH	Tamanho da partícula do vidro bioativo
Stoor; Söderling; Salonen, 1998	S53P4	10,8	45 µm
Waltimo et al., 2007	45S5	11,7	20-60 nm
Gluber et al., 2008	45S5 e 28S5	~12	Nanopartículas
	77S	<10	
Hu et al., 2009	45S5	10,3	50 µm
Zhang et al., 2010	S53P4	11	<45 µm
Rivadeneira et al., 2013	45S5	11	5-45
Coraça-Huber et al., 2014	S53P4	10-11	<45 µm

Fonte: Do autor.

Stoor; Söderling; Salonen (1998) mostraram em seu trabalho com o S53P4, que ao entrar em contato com meio aquoso, o vidro bioativo libera íons que alteram a pressão osmótica do meio, e causam perturbações no potencial da membrana. Ademais, notaram que partículas com 45 µm do biovidro S53P4, tamanho aproximado

das utilizadas no presente estudo, apresentaram lixiviação dos íons como Na^+ , Ca^{2+} 300 vezes maior que partículas entre 297 e 500 μm , observando-se uma alteração no valor de pH de 7,0 para 11,0 com partículas menores e de 7,0 para 9,0 no caso de partículas maiores, sendo estes mecanismos cruciais para a efetividade da atividade bactericida encontrada frente aos microrganismos planctônicos testados.

Bellantone, Willians e Hench (2002) também notaram em seu estudo, que o uso de partículas maiores de 45S5 com diâmetro de 90 a 710 μm não resultaram em um aumento de pH significativo, passando de 7,1 para 7,4 após 24 horas, sendo ineficaz com relação a atividade bactericida.

Allan, Newman e Wilson, observaram em 2001, uma redução maior que 90% na viabilidade das células bacterianas, na forma planctônica, em contato com sobrenadante de 45S5 em pH 9,8 o que também foi observado com a adição de NaOH no meio de cultura. Waltimo e colaboradores (2007) também observaram uma redução maior que 99% ao se utilizar nanopartículas do mesmo vidro bioativo (45S5) frente a microrganismos planctônicos.

Hu e colaboradores notaram em seu estudo, que a solução contendo o vidro bioativo 45S5 sofreu alteração no valor de pH passando de 7,0 para 10,3, assim como Zhang e colaboradores (2010) com o S53P4, o qual atingiu um valor de pH local em solução de 11,0. Ambos os trabalhos citados confirmaram uma relação entre o aumento do valor do pH e a eficácia da atividade bactericida dos vidros bioativos.

Pode-se notar que os estudos apresentados acima mostraram uma relação intrínseca da ação bactericida dos vidros bioativos com o aumento do pH. O que também foi observado no presente trabalho, onde a solução contendo os produtos de dissolução de 25 mg/mL atingiu um valor de pH de 11,4 após 24 horas de contato com o pó de F18, resultando em uma redução de 6,96 logs da população de células viáveis do biofilme de *S. aureus*.

Gluber e colaboradores (2008) mostraram que quando adicionados em solução salina, os vidros bioativos 45S5 e 28S5 atingiram pH em torno de 12,0 enquanto 77S que não contem sódio em sua composição manteve-o abaixo de 10,0. Ao serem testadas em biofilmes bacterianos, notou-se que as soluções com maior valor de pH foram capazes de inviabilizar as células em apenas 24 horas, enquanto a solução de 77S levou uma semana para desinfecção. Sabe-se que o F18 apresenta sódio em sua composição, e que no estudo em questão atingiu-se valores de pH semelhantes ao descrito pelo artigo citado acima. Sendo assim possível notar uma relação entre o

aumento do pH com a presença de íons alcalinos como o Na⁺ na composição dos vidros bioativos.

Begun e colaboradores (2016) observaram que partículas de 45S5 não mostraram atividade bactericida frente a microrganismos planctônicos quando o pH do meio foi neutralizado para 7,3. Allan, Newman e Wilson (2001), também notaram que com a neutralização do pH (7,2) da solução de 45S5, o valor de redução de células viáveis diminuiu em mais de 60% quando comparado com a solução em pH alcalino. Estes dados corroboram com o presente estudo, onde pode-se observar uma diminuição de 6,31 logs no valor de redução de células bacterianas viáveis após contato com solução de F18 em pH 7,5 quando comparado com solução de F18 em pH alcalino.

Os resultados descritos nos artigos acima concordam com os obtidos nos testes de atividade bactericida com F18. Já, Xie e colaboradores (2008) não observaram ação bactericida quando testadas *in vivo* 300 mg de 45S5 contra biofilmes bacterianos de *S. aureus*. Este resultado também pode estar ligado à ineficácia no aumento do pH devido à capacidade tamponante dos fluidos corpóreos, refletindo-se a diferença entre ambientes *in vitro* e *in vivo*.

Com isto, sugere-se que o pH pode ser um mecanismo fundamental para a ação bactericida do vidro bioativo. Porém, não se pode concluir que este é único mecanismo envolvido na morte celular bacteriana pelo biomaterial. A redução do pH pode alterar a solubilidade de íons particulares, os quais em pH elevado podem ser também ser responsáveis pela atividade bactericida. (Allan; Newma; Wilson, 2001; Begun et al., 2016). Sabe-se que concentração de sílica solúvel, um dos produtos da dissolução do F18 no meio aquoso, por exemplo, é ligada a basicidade da solução (Weber et al., 2004), logo, com a diminuição do pH diminui-se a quantidade deste soluto no meio, o que pode resultar na diminuição da pressão osmótica.

Segundo Drago e colaboradores (2014), é o aumento do pH simultâneo com aumento da pressão osmótica que tornam o ambiente hostil para a adesão e proliferação bacteriana.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo mostrou-se que o uso de partículas com diâmetro médio de 49 μm do vidro bioativo F18 ($\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$) apresentou eficácia na inibição do crescimento do biofilme de *Staphylococcus aureus*, sendo necessário um contato direto entre o inóculo em (PBS) e o biomaterial por pelo menos seis horas para que houvesse uma redução de aproximadamente 6 logs da população bacteriana viável. Além disso, o uso de 12 mg/mL dos produtos de dissolução e do pó do F18 também apresentaram alta atividade bactericida, reduzindo efetivamente a quantidade de células viáveis do biofilme de *S. aureus* e *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) em torno de 5 logs. Conclui-se que o F18 apresenta atividade antibiofilme e bactericida, podendo alterar a morfologia celular durante o processo. Avalia-se ainda uma relação intrínseca entre a atividade antimicrobiana e o aumento do pH. Representando assim, uma nova perspectiva no controle de infecções relacionadas à biofilmes bacterianos.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Verificar a atividade antibiofilme e bactericida em diferentes espécies microbianas, como *E. coli* e *P. aeruginosa*;
- Otimizar o estudo da atividade antimicrobiana e antibiofilme do F18 e comparar com outros vidros bioativos;
- Caracterizar interação celular de *S.aureus* com F18 através de proteômica;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do F18 *in vivo*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, I.; NEWMAN, H.; WILSON, M. **Antibacterial activity of particulate Bioglass® against supra- and subgingival bacteria.** *Biomaterials*, v. 22, n. 12, p. 1683–87, 2001.

BEGUM S, et al. **The influence of pH and fluid dynamics on the antibacterial efficacy of 45S5 Bioglass.** *Biomed Mater.*, v. 11, 2016.

BELLANTONE, M.; WILLIAMS, H.D.; HENCH, L.L. **Broad-Spectrum Bactericidal Activity of Ag₂O-Doped Bioactive Glass.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 46, n. 6, p. 1940–45, 2002.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resistência Microbiana- Mecanismos e Impacto Clínico. Módulo 3:II, 2007. Acesso em 12/07/2018.

CAMPANINI, A. L. **Avaliação da Atividade Bactericida do Biovidro F18 e F18 com Prata para Aplicações Médicas**, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 2015.

CHATZIPANAGIOTOU, S. et al. **Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms**, *Clin. Microbiol Rev.*, v. 31, n. 3, p. 1–49, 2018.

CHINAGLIA, C. R. **Uso de um Vidro Altamente Bioativo para Conferir Bioatividade à Superfície do Titânio - Desenvolvimento de um Método para Recobrimentos Descontínuos.** Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p.162, 2013.

CORAÇA-HUBER, D.C. et al. **Efficacy of Antibacterial Bioactive Glass S53P4 Against *S. aureus* Biofilms Grown on Titanium Discs *In Vitro*.** *J. Orthop. Res.*, v. 32(1), p. 175–177, 2014.

DAROUICHE, R. O. **Treatment of Infections Associated with Surgical Implants.** *The New England Journal of Medicine: Research & Review Articles*, v. 350, p. 1422-1429, 2004.

DISTEL, J.W.; HATTON, J.F.; GILLESPIE, J.M.; **Biofilm formation in medicated root canals.** *Journal of Endodontics*, v. 28, n^o10, p. 679-83, 2002.

DI CIO, S.; GAUTROT. J.E. **Cell sensing of physical properties at the nanoscale: Mechanisms and control of cell adhesion and phenotype.** *Acta biomaterialia*, v. 30, p. 26-48, 2016.

DRAGO, L. et al. **In vitro antibiofilm activity of bioactive glass S53P4.** *Future Microbiol.*, v. 9, p. 593–601, 2014.

DRAGO, L. et al. **Antimicrobial activity and resistance selection of different bioglass S53P4 formulation against multidrug resistente strains.** *Future Microbiol*, v. 10, p. 1293-1299, 2015.

DRAGO, L.; TOSCANO, M.; BOTTAGISIO, M. **Recent Evidence on Bioactive Glass Antimicrobial and Antibiofilme Activity: A Mini-Review**. *Materials*, v.11(2), p.326, 2018.

DUMITRU, R.; HORNBY, J.M.; NICKERSON, K.W. **Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs**. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48(7), p. 2350-4, 2004.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. **The biofilm matrix**. *Nat Rev Microbiol*, v. 8, p. 623- 33, 2010.

GABBAI-ARMELIN, P. R. et al. **Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair**. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, n. 5, p. 1–13, 2015.

GUBLER, M. et al. **Do bioactive glasses convey a disinfecting mechanism beyond a mere increase in pH?** *Int. Endod. J.*, v. 41, p. 670–78, 2008.

HENCH, L. L. **Bioceramics: From Concept to Clinic**. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 74, p. 1487-1510, 1991.

HENCH, L.L. **Bioceramics**. *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 81, p. 1705–28, 1998.

HENCH, L. L. **The story of Bioglass**. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v. 17, p. 967, 2006.

HENCH, L.L. et al. **Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials**. *J. Biomed. Mater. Res. Symp*, v. 334, p. 117–141, 1971.

HENCH, L.L. **Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications**. *New Journal of Glass and Ceramics*, v. 3, p. 67-73, 2013.

HENCH, L.L. **Opening paper 2015- Some coments on Bioglass: Four Eras of Discovery and Development**. *Biomed. Glasses*, v. 1, p.1-11 , 2015.

HENCH, L.L.; JONES, J.R. **Bioactive Glasses: Frontiers and Challenges**. *Front. Bioeng. Biotechnol*, v. 3, p.194, 2015.

HU, S. et al. **Study on Antibacterial Effect of 45S5 Bioglass**. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 20, p. 281–86, 2009.

JAKUBOVICS, N.S. **The sixth sensor: a *Candida albicans* biofilm master regulator that responds to inter-kingdom interactions**. *Virulence* ,v. 5594, p. 1-3, 2017.

JAPANESE INDUSTRIAL STANDARD (JIS). Z 2801: Antibacterial Products - Test for Antibacterial Activity and Efficacy. Japão, p.20, 2010.

JONES, J.R. **Review of bioactive glass: From Hench to hybrids**. *Acta Biomater*, v. 9,p. 4457–86, 2013.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S.J. **Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era**. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 3(4), 2013.

LEU, A.; LEACH, J.K. **Proangiogenic potential of a collagen/bioactive glass substrate**. *Pharm. Res.*, v. 25,p.1222–29, 2008.

LEW, D. P.; WALDVOGEL, F. A. **Osteomyelitis**. *Lancet*, v. 364, n. 9431, p. 369–79, 2004.

LYNCH, A.S.; ROBERTSON, G.T. **Bacterial and fungal biofilm infections**. *Annu Rev Med*, v.59, p.415-28, 2008.

MISRA, S. K. et al. **Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications**. *Biomaterials*, v. 31, n. 10, p. 2806–15, 2010.

MONDS, R.D.; O'TOOLE, G.A. **The developmental model of microbial biofilms: Ten years of a paradigm up for review**. *Trends Microbiol*, v.17, p.73-87, 2009.

NAVARRO, M. et al. **Biomaterials in Orthopaedics**. *J. R. Soc. Interface*, v. 5, p. 1137-58, 2008.

OTTO, M. **Staphylococcal biofilms**. *Curr. Top. Microb. Immunol*, v. 322, p. 207–228, 2008.

PEEL, T.N.; BUISING, K.L.; CHOONG, P.F. **Diagnosis and management of prosthetic joint infection**. *Current. Opin. Infect. Dis*, v. 25(6), p. 670–676 , 2012.

PILIZOTA, T.; SHAEVITZ, J.W. **Plasmolysis and cell shape depend on solute outer-membrane permeability during hyperosmotic shock in *E. coli***. *Biophys. J.*,v. 104, p. 2733–42, 2013.

PRIESTER, J. H. et al. **Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy**. *Journal of Microbiological Methods*, v. 68, n. 3, p. 577–87, 2007.

RABIEE, S.M. et al. **Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review**. *Ceram. Int.*,v. 41,p. 7241–51, 2015.

RAMAGE, G. et al. **Candida Biofilms: an Update**. *Eukaryot Cell*, v. 4(4), p. 633-8, 2005.

RAN, S.; HE, Z.; LIANG, J. **Survival of *Enterococcus faecalis* during alkaline stress: Changes in morphology, ultrastructure, physiochemical properties of the cell wall and specific gene transcripts**. *Arch. Oral Biol.*,v. 58, p. 1667–76, 2013.

RATNER, B. et al. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. 2^a ed. 2004.

RIVADENEIRA, J. et al. **In Vitro Antistaphylococcal effects of a novel 45S5 Bioglass/Agar-Gelatin Biocomposite Films**. *Journal of Applied Microbiology*, v. 115, n. 02, p. 604-12, 2013.

ROMANÒ, C.L. et al. **Bone and joint infections in adults: a comprehensive classification proposal**. *Eur. Orthop. Traumatol*, v. 1(6), p. 207–217, 2011.

ROMLING, U.; BALSALOBRE, C. **Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies.** J Intern Med, v. 272, p. 541–61, 2012.

SOUZA, M. T. **Desenvolvimento e caracterização de tecidos vítreos flexíveis altamente bioativos.** Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2015.

SOUZA, M. T. et al. **Broad-spectrum bactericidal activity of a new bioactive grafting material (F18) against clinically important bacterial strains.** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 50, n. 6, p. 730–33, 2017.

SOUZA, M.T. et al. **New highly bioactive crystallizationresistant glass for tissue engineering applications.** Transl Mater Res,v. 4, 2017.

STOODLEY, P. et al. **Biofilms as complex differentiated communities.** Annu Rev Microbiol, v. 56, p.187–209, 2002.

STOOR, P.; SÖDERLING, E.; SALONEN, J. I. **Antibacterial Effects of a Bioactive Glass Paste on Oral Microorganisms.** Acta Odontologica Scandinavica, v. 56, n. 03, p. 161-5,1998.

TURDEAN-IONESCU, C. et al. **Surface Reactions of Mesoporous Bioactive Glasses Monitored by Solid-State NMR: Concentration Effects in Simulated Body Fluid.** J. Phys. Chem. C, v. 120, p. 4961–74, 2016.

UDE S. et al. **Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas isolates*.** Environ Microbiol, v. 8, p. 1997–2011, 2006.

VÄLIMÄKI, V.V.; ARO, H.T. **Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute.** Scand. J. Surg, v. 95, p.95–102. 2006.

VUONG, C.; OTTO, M. ***Staphylococcus epidermidis* infections.** Microbes Infect, v.4, p. 481–489, 2002.

WALLACE, R.J.; MCKAIN, N. **Influence of 1,10-phenanthroline and its analogues, other chelators and transition metal ions on dipeptidase activity of the rumen bacterium *Prevotella ruminicola*.** Journal of Applied Bacteriology, v. 81,p.42-7, 1996.

WALTIMO, T. et al. **Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5.** Journal of Dental Research, v. 86, n. 8, p. 754–57, 2007.

WEBER, G.H.; O'BRIEN, J.K.; BENDER, F.G. **Control of *Escherichia coli* O157:H7 with sodium metasilicate.** J Food Prot, v. 67, p. 1501-1506, 2004.

WHITEHOUSE, J. D. et al. **The impact of surgical-site infections following orthopedic surgery at a community hospital and a university hospital: adverse quality of life, excess length of stay, and extra cost.** Infect Control Hosp Epidemiol, v.23, p.183-9, 2002.

WIMPENNY, J.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. **Heterogeneity in biofilms.** FEMS Microbiol Ver., v. 24, p. 661- 71, 2000.

XIANG, Z.; SPECTOR, M. **Biocompatibility of Materials.** *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*. 2^a ed. New York: John Wiley & Sons, p. 104-120, 2006.

XIE, Z. P. et al. **Failure of particulate bioglass to prevent experimental staphylococcal infection of open tibial fractures.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, n. 5, p. 1162–63, 2008.

ZHANG, D. et al. **Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses.** *J. Biomed. Mater. Res. A*, v. 93, p. 475–83, 2010.

ZHANG, D. et al. **Comparison of antibacterial effect of three bioactive glasses.** *Key Eng. Mater*,v.309, p. 345–48, 2006.

ZHANG, D.; HUPA, M.; HUPA, L. **In situ pH within particle beds of bioactive glasses.** *Acta Biomater*, v. 4,p.1498–1505, 2008.