



**Universidade Federal de São Carlos**  
**Centro de Ciências Exatas e Tecnologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Lidiani Aparecida Campanini**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO BIOVIDRO F18  
E F18 COM PRATA PARA APLICAÇÕES MÉDICAS**

**São Carlos**  
**2015**

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Centro de Ciências Exatas e Tecnologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Lidiani Aparecida Campanini**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO BIOVIDRO F18 E  
F18 COM PRATA PARA APLICAÇÕES MÉDICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientadores:

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza  
Prof. Dr. Oscar Peitl Filho

**São Carlos**  
**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C186a Campanini, Lidiani Aparecida  
Avaliação da atividade bactericida do biovidro F18 e F18 com prata para aplicações médicas / Lidiani Aparecida Campanini. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
67 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Implantes. 2. Infecção de sítio cirúrgico. 3. Biovidro. 4. Atividade bactericida. 5. Prata. I. Título.

**Lidiani Aparecida Campanini**

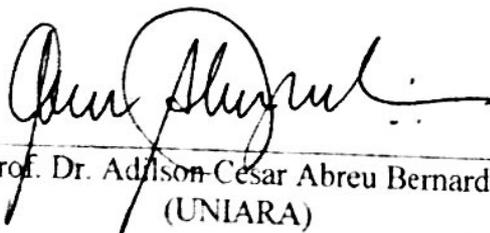
Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

**Aprovado em: 21/08/2015**

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza - Orientador  
(UFSCar)



Prof. Dr. Adilson César Abreu Bernardi  
(UNIARA)



Prof. Dr. Alessandra Nara de Souza Rastelli  
(UNESP - Araraquara)

*Dedico aos meus pais Dorival e Maria Aparecida.  
Com eterna gratidão por todo apoio, estrutura e carinho, sem os quais não  
seria possível percorrer nem mesmo metade do caminho que me fez chegar  
até aqui.*

## A g r a d e c i m e n t o s

---

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

À toda equipe do LaMaV, em especial ao Prof. Dr. Oscar Peitl, Clever Chinaglia e Marina Trevelin por toda paciência em esclarecer minhas dúvidas sobre os materiais, pela colaboração durante a pesquisa toda, troca de ideias, e apoio.

À técnica Zélia Venézio por toda ajuda durante o processo de ensaios, pela amizade e conversas.

A todos os amigos do laboratório pelo suporte no decorrer dessa fase e pelas trocas de experiências.

Às amigas Amanda, Bianca, Camila, Denise e Fernanda pela enorme amizade, conselhos e alegrias desde o primeiro ano de faculdade.

Aos meus pais Dorival e Maria Aparecida pelo incentivo, carinho e sacrifícios para me ajudarem a concluir mais esta etapa na minha vida. Obrigada por conduzirem meu desenvolvimento pessoal e profissional da melhor forma possível!

Aos meus irmãos e exemplos Luciano e Adriano pelas conversas, atenção, preocupação e carinho de sempre.

À minha avó Maria por tanta fé e amor em me guiar pelos caminhos da vida.

Ao meu amigo e namorado Miguel por sempre dividir comigo minhas dúvidas, planos e alegrias, e me ajudar a superar cada novo desafio.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais retorna ao seu tamanho original”.*

*(Albert Einstein)*

## R e s u m o

---

Milhões de cirurgias para colocação de implantes e próteses são realizadas anualmente no mundo todo. Dentre estes procedimentos cirúrgicos, são observadas alguns tipos de falhas. A complicação mais preocupante é a infecção que pode causar deformidade corporal na região, amputação de partes do corpo, e pode evoluir para osteomielite e morte do paciente. Nesse contexto, a propriedade bactericida dos vidros bioativos está sendo amplamente estudada. O F18 é um novo biovidro desenvolvido no Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos, e que apresenta possibilidade de manipulação em diferentes formatos, podendo ser utilizado como agente auxiliar no tratamento médico de processos infecciosos. Os objetivos do presente trabalho foram investigar a ação bactericida do F18 sob a forma de pó para ser utilizado em recobrimento de implantes, e sob a forma de manta composta por fibras de biovidro para utilização no auxílio de cicatrização de feridas. Os microrganismos utilizados nos testes foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, buscou-se comparar a cinética de atividade bactericida sobre *S. aureus* do F18 em pó, F18 em pó acrescido de prata (F18Ag), e o biovidro padrão no mercado atual, chamado de 45S5. A atividade bactericida do F18 foi testada, primeiramente, utilizando-se uma metodologia de análise baseada na norma JIS (*Japanese Industrial Standard*) Z2801:2010, onde o inóculo padrão permaneceu em contato com o material durante 24 horas. Para a realização dos ensaios cinéticos as amostras dos materiais em teste foram colocadas em contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* e uma alíquota das misturas foi plaqueada em diferentes tempos. A redução de células bacterianas viáveis foi observada por meio de contagem direta de colônias em placas de Petri. O F18 tanto na forma de pó quanto na forma de manta apresentou elevada atividade bactericida. A eliminação dos microrganismos foi próxima a 100%. A redução logarítmica das bactérias foi entre  $5,9 \pm 0,4$  e  $7,0 \pm 0,2 \log_{10}$  UFC ml<sup>-1</sup>, sendo que a norma utilizada considera como bactericida o material que apresenta redução a partir de 2,0 logs. Nos testes cinéticos observou-se que a atividade bactericida do F18Ag iniciou-se logo após os primeiros 30 minutos de contato com os microrganismos e as células viáveis foram eliminadas após uma hora. Nos ensaios cinéticos também observou-se que a ação bactericida do F18 iniciou-se após seis horas e eliminou as células viáveis em 24 horas. Ambos os materiais demonstraram ação bactericida similar àquela apresentada pelo padrão 45S5.

**Palavras-chave:** implantes, infecção de sítio cirúrgico, biovidro, atividade bactericida, prata.

## Abstract

---

Millions of surgeries for implants and prosthesis placement are performed annually worldwide. Among these surgical procedures are observed some types of failures. The most worrying complication is the infection that can cause deformity in the region, amputation of body parts, and may progress to osteomyelitis and patient death. In this context, the bactericidal property of the bioactive glasses is being widely studied. The F18 is a new bioglass that was developed at Vitreous Materials Laboratory (LaMaV) and can be manipulated in different forms to be used as auxiliary agent in the medical treatment of infectious processes. The purpose of this study was to investigate the bactericidal activity of F18 in powder form for coating implants and in fibers form to be used in wound healing, on the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. In addition, it was proposed to compare the kinetic of bactericidal activity of F18 in powder, F18 in powder doped with silver (F18Ag), and the standard bioglass called 45S5, on *S. aureus*. The bactericidal activity of F18 was tested using an analysis method based on a standard JIS (*Japanese Industrial Standard*) Z2801: 2010, where the inoculum was in contact with the material for 24 hours and the reduction of viable cells was observed after this period. For the realization of kinetic tests the powder samples from different materials were placed in contact with the *S. aureus* suspension and an aliquot of these mixtures was plated in a culture media at different times. The direct count of colony on Petri dishes demonstrated the viable cells reduction. F18 both in powder form and in the form of fibers showed an extremely efficient bactericidal activity. The elimination of the microorganisms was close to 100%. The log of reduction of bacteria was between  $5.9 \pm 0.4$  and  $7.0 \pm 0.2 \log_{10} \text{CFU ml}^{-1}$ , and the standard considers as a bactericide the material that shows a reduction of 2.0 logs or more. The bactericidal activity of F18Ag began after the first 30 minutes of contact with microorganisms and practically eliminated the bacterial colonies after one hour of contact. The bactericidal action of F18 started after six hours and eliminated viable cells after 24 hours. Both materials demonstrated bactericidal action similar to that presented by the standard 45S5.

**Keywords:** implants, surgical site infection, bioglass, bactericidal activity, silver.

## Lista de figuras

---

Figura 1 - Próteses produzidas a partir de diferentes materiais. ....	7
Figura 2 - Etapas do desenvolvimento de um biomaterial e profissionais das áreas de pesquisa envolvidas. ....	9
Figura 3 - Principais microrganismos isolados a partir de diferentes locais do corpo humano acometido por osteomielite. Os microrganismos estão escritos classificados em sua ordem decrescente de ocorrência. ....	14
Figura 4 - Etapas de formação da camada de hidroxiapatita a partir do contato do vidro bioativo com o meio no qual é inserido. ....	17
Figura 5 - Corpo de prova composto por manta de fibras do biovidro F18 (A). Corpo de prova recoberto com pó do biovidro F18 (B). Detalhe da superfície da placa recoberta por partículas de pó do biovidro (C). ....	22
Figura 6 - Esquema de montagem da metodologia de ensaio microbiológico segundo a norma JIS Z 2801:2010. ....	25
Figura 7 - Incubação em câmara úmida dos corpos de prova em contato com o inóculo. ....	26
Figura 8 - Início da recuperação dos microrganismos viáveis por meio da lavagem dos corpos de prova em saco plástico esterilizado. ....	27
Figura 9 - Esquema simplificado de montagem do experimento de avaliação da cinética de ação bactericida do F18 e F 18 Ag. Cada condição foi feita em duplicata. ....	30
Figura 10 - Esquema da metodologia utilizada no ensaio de avaliação da cinética de ação bactericida do F18, F18Ag e 45S5. ....	32

Figura 11 - Valor da atividade bactericida do pó do F18 sobre as diferentes cepas bacterianas, seguindo o cálculo estipulado pela norma JIS Z 2801:2010. ....	35
Figura 12 - Valor da atividade bactericida da manta de fibras do F18 sobre as diferentes cepas bacterianas, seguindo o cálculo estipulado pela norma JIS Z 2801:2010. ....	37
Figura 13 - Valores da viabilidade celular de <i>S. aureus</i> encontrados no decorrer de diferentes períodos de contanto entre a suspensão bacteriana e 50 mg de F18, F18Ag ou sílica (controle). ....	41
Figura 14 - Valores da viabilidade celular de <i>S. aureus</i> encontrados no decorrer de diferentes períodos de contanto entre a suspensão bacteriana e 30 mg de F18, F18Ag ou sílica (controle). ....	42
Figura 15 - Valores da viabilidade celular de <i>S. aureus</i> encontrados no decorrer de diferentes períodos de contanto entre a suspensão bacteriana e 15 mg de F18, F18Ag ou sílica (controle). ....	43
Figura 16 - Valores da viabilidade celular de <i>S. aureus</i> encontrados no decorrer de diferentes períodos de contanto entre a suspensão bacteriana e 5 mg de F18, F18Ag ou sílica (controle). ....	44
Figura 17 - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante 30 minutos de contato com a suspensão bacteriana de <i>S. aureus</i> sob agitação. ....	47
Figura 18 - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante uma hora de contato com a suspensão bacteriana de <i>S. aureus</i> sob agitação. ....	48
Figura 19 - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante três horas de contato com a suspensão bacteriana de <i>S. aureus</i> sob agitação. ....	49
Figura 20 - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante seis horas de contato com a suspensão bacteriana de <i>S. aureus</i> sob agitação. ....	50

Figura 21 - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante 24 horas de contato com a suspensão bacteriana de <i>S. aureus</i> sob agitação. ....	51
Figura 22 - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante 30 minutos de contato com a suspensão bacteriana de <i>S. aureus</i> sem agitação. ....	52
Figura 23 - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante uma hora de contato com a suspensão bacteriana de <i>S. aureus</i> sem agitação. ....	53
Figura 24 - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante três horas de contato com a suspensão bacteriana de <i>S. aureus</i> sem agitação. ....	54
Figura 25 - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante seis horas de contato com a suspensão bacteriana de <i>S. aureus</i> sem agitação. ....	54
Figura 26 - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante 24 horas de contato com a suspensão bacteriana de <i>S. aureus</i> sem agitação. ....	55

## Lista de tabelas

---

Tabela 1 - Resultados obtidos a partir dos ensaios baseados na norma JIZ Z 2801:2010 a partir do contato do pó do biovidro F18 com diferentes cepas bacterianas. .... 34

Tabela 2 - Resultados obtidos a partir dos ensaios baseados na norma JIZ Z 2801:2010 a partir do contato de mantas de fibras do vidro bioativo F18 com diferentes cepas bacterianas. .... 36

## Lista de abreviaturas e siglas

---

ATCC – *American Type Culture Collection*  
DEMa – Departamento de Engenharia de Materiais  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
HA – Hidroxiapatita  
HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose  
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
ISC – Infecção de Sítio Cirúrgico  
JIS – *Japanese Industrial Standard*  
LaMaV – Laboratório de Materiais Vítreos  
PBS – *Phosphate Buffered Saline*  
PCA – *Plate Count Agar*  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
PPM – Parte Por Milhão  
RPM – Rotações Por Minuto  
TSB – *Tryptone Soya Broth*  
UFC – Unidade Formadora de Colônia  
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos  
ZAS – Zircônia-Alumina-Sílica

## S u m á r i o

---

Resumo .....	VI
Abstract.....	VII
Lista de figuras .....	VIII
Lista de tabelas .....	XI
Lista de abreviaturas e siglas .....	XII
1 Introdução.....	4
2 Objetivos .....	6
2.1 Objetivos gerais.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3 Revisão Bibliográfica .....	7
3.1 Biomateriais: Uma visão geral .....	7
3.2 As Cirurgias de implantes .....	11
3.3 Falhas nos implantes .....	12
3.3.1 Falhas Atribuídas às Infecções Bacterianas e os Principais Microrganismos Associados .....	12
3.4 A cicatrização de feridas e as infecções .....	15
3.5 Vidros Bioativos.....	16
3.6 Uso da Prata Como Agente Bactericida.....	19
4 Materiais e métodos.....	21
4.1 Biovidro.....	21
4.2 Biovidro na forma de pó (F18).....	21
4.3 Preparação do pó do F18 contendo prata (F18Ag) .....	21
4.4 Recobrimento das superfícies com o pó do F18 .....	21
4.5 Biovidro na forma de fibras e mantas .....	22
4.6 Cepas dos microrganismos.....	23

4.7	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade bactericida do vidro bioativo segundo a norma JIS Z 2801:2010.....	23
4.7.1	Preparação do inóculo.....	24
4.7.2	Montagem do experimento .....	24
4.7.3	Recuperação dos microrganismos .....	26
4.7.4	Metodologia para análise dos resultados encontrados nos ensaios baseados na norma JIS Z 2801:2010 .....	28
4.8	Avaliação <i>in vitro</i> da cinética de ação bactericida do vidro bioativo.....	29
4.8.1	Comparação da cinética de ação bactericida entre o pó do F18 e F18Ag em diferentes quantidades aplicadas ao inóculo.....	29
4.8.1.1	Método de análise dos dados obtidos.....	30
4.8.2	Análise da cinética da atividade bactericida do F18 e F18Ag em comparação com o padrão Bioglass® 45S5 e em condições de incubação com e sem agitação .....	31
4.8.2.1	Método de análise estatística dos dados obtidos.....	32
5	Resultados e Discussões .....	34
5.1	Ensaio baseado na norma JIS Z 2801:2010 .....	34
5.2	Cinética de atividade bactericida do F18 e F18Ag .....	40
5.3	Análise da cinética da atividade bactericida do pó do F18 e F18Ag em comparação ao padrão Bioglass® 45S5 em condição de incubação com e sem agitação.....	46
5.3.1	Incubação sob agitação durante 30 minutos .....	46
5.3.2	Incubação sob agitação durante uma hora .....	47
5.3.3	Incubação sob agitação durante três horas.....	48
5.3.4	Incubação sob agitação durante seis horas .....	49
5.3.5	Incubação sob agitação durante 24 horas .....	50
5.3.6	Incubação estática durante 30 minutos .....	51
5.3.7	Incubação estática durante uma hora.....	52
5.3.8	Incubação estática durante três horas .....	53
5.3.9	Incubação estática durante seis horas .....	54

5.3.10	Incubação estática durante 24 horas .....	55
5.3.11	Variação na forma de incubação.....	55
6	Conclusão .....	57
7	Referências Bibliográficas.....	58

# 1 Introdução

---

Quando tecidos vivos sofrem lesões por traumas, patologias ou fraturas, dependendo do caso clínico, há necessidade do uso de biomateriais para reparo ou reposição do tecido lesionado. Para esse fim, o aprimoramento técnico-científico em diversas áreas de estudo, faz-se essencial. A grande busca dos pesquisadores é, principalmente, pelo desenvolvimento de materiais que facilitem a reparação óssea visando o restabelecimento rápido das funções fisiológicas e mecânicas perdidas (ANDRADE e DOMINGUES, 2006).

Milhões de cirurgias de implantes são realizadas anualmente no mundo. A colocação de uma prótese pode acarretar maior facilidade de locomoção dos pacientes, resultando no aumento na qualidade de vida dessas pessoas. A demanda é tão grande que o mercado referente ao segmento de próteses está projetado para atingir US\$ 46,5 bilhões em 2017 (INDUSTRY EXPERTS, 2011).

Dentre tantas cirurgias sendo realizadas, há uma grande preocupação com as falhas que possam ocorrer no período pós-operatório. Existem diversos fatores químicos e físicos que podem acarretar casos de complicações, porém os mais preocupantes são os processos infecciosos. Na maioria dos casos de infecção, há necessidade de revisão cirúrgica que gera longos períodos de internação, podendo, inclusive, causar deformidades, amputação de partes do corpo, osteomielite e até levar o paciente à morte (XIANG e SPECTOR, 2006).

Outro fator preocupante para as pessoas que permanecem sob observação em hospitais, além das Infecções do Sítio Cirúrgico (ISC), são aquelas que se iniciam a partir de outras feridas ou lesões presentes no corpo dos pacientes. O principal microrganismo encontrado nos casos de ISC e em casos de infecções hospitalares é o *Staphylococcus aureus*, seguido de outras espécies de grande importância, dentre os quais se destacam *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (DAROUCHE, 2004; LEW e WALDVOGEL, 2004).

Dessa forma, o conhecimento sobre esses problemas e a tentativa de evitá-los deve guiar pesquisas para o desenvolvimento de biomateriais que possam ser implantados no corpo humano ou utilizados nos processos de cicatrização de feridas. O sucesso de um implante, por exemplo, pode ser dependente de um material que auxilie no combate aos microrganismos, além de ser eficiente no processo de osseointegração (SOUNDRAPANDIAN, 2007).

Na década de 1960, Larry Hanch desenvolveu a primeira composição de uma cerâmica bioativa (HENCH, 2006). Com esse novo material, chamado de Bioglass<sup>®</sup> 45S5, foram realizadas diversas pesquisas que ajudaram o processo de entendimento de suas propriedades e ações sobre o corpo humano. Atualmente, sabe-se que ele possui, por exemplo, ação osseointegradora, antiinflamatória e bactericida (HENCH e WEST, 1996; HU et al., 2009; RIVADENEIRA et al., 2013; ALLAN et al., 2001; RECTENWALD et al., 2002).

A partir da composição do 45S5, iniciaram-se diversos estudos para desenvolvimento de novos vidros bioativos (SIQUEIRA e ZANOTTO, 2011). Ainda assim, muitos materiais desenvolvidos possuíam característica mecânica frágil e alta tendência à cristalização, impedindo o processo de manipulação em diferentes formas.

Souza (2011) desenvolveu, no LaMaV-DEMa/UFSCar, uma nova formulação de um biovidro, denominado internamente de F18, cujo material possui características necessárias para a formação de fibras, pó, *scaffolds*, dentre outros formatos possíveis.

A possibilidade de confecção de fibras finas, que podem ser entrelaçadas formando uma manta fina e flexível, pode representar grande avanço no campo da engenharia tecidual, pois esse material poderá ser utilizado em enxertia e/ou regeneração de tecidos duros e/ou moles, sendo aplicado como auxiliar no processo de cicatrização em diferentes partes do corpo humano e, ao mesmo tempo, evitar a proliferação de microrganismos que poderiam causar uma infecção local. Sua aplicação e manipulação também apresentam vantagem em relação a outros materiais, pois, por possuir flexibilidade, se ajusta a diferentes contornos de fratura ou sítios cirúrgicos (SOUZA, 2011).

A apresentação do vidro bioativo F18 na forma de pó permite, dentre outros processos, o recobrimento de implantes de uso ortopédico e odontológico. A deposição de uma camada do vidro bioativo na superfície dos implantes poderá auxiliar na aceleração de reparação dos tecidos, no processo de osseointegração, além de combater as infecções que podem acometer os pacientes.

No contexto das condições citadas acima, a presente pesquisa propõe a avaliação e investigação da atividade bactericida do biovidro F18 sob a forma de pó e manta de fibras para ser utilizado em aplicações médicas. Além disso, foi proposta a avaliação do desempenho antimicrobiano do F18 em pó acrescido de prata, que é um importante e amplamente estudado agente bactericida (BERGER et al., 1976; FENG et al., 2000, BLAKER et al., 2004).

## 2 Objetivos

---

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar e investigar a atividade bactericida do biovidro F18 na forma de pó e de manta de fibras bioativas sobre os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar se o biovidro F18 possui atividade bactericida sobre os microrganismos selecionados.
- Avaliar a ação bactericida do F18 sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.
- Investigar a cinética de ação bactericida do F18 em pó em diferentes tempos de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus*.
- Comparar a eficiência de ação bactericida do pó do F18 e F18 incorporado com prata (F18Ag) sobre *S. aureus*.
- Comparar o efeito antimicrobiano do pó do F18 e F18Ag com o pó do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 sobre *S. aureus*.
- Avaliar se a incubação sob agitação ou de forma estática de amostras do pó do biovidro em contato com microrganismos interfere na atividade bactericida do material.

### 3 Revisão Bibliográfica

---

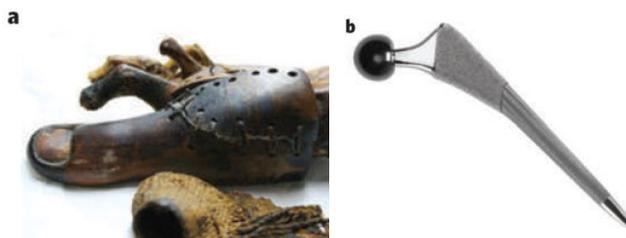
#### 3.1 BIOMATERIAIS: UMA VISÃO GERAL

A relação existente entre materiais não biológicos e corpo humano é observada há muitos anos desde a pré-história. Há relatos de arqueólogos que encontraram vestígios humanos de um indivíduo em Washington (EUA) que viveu há, aproximadamente, 9000 anos atrás com uma ponta de lança incorporada em seu quadril e foi descrito pelos especialistas como sendo saudável e ativo durante sua vida. O objeto pontiagudo presente em seu corpo já estava cicatrizado e a posição de inserção não atrapalhava a mobilidade do indivíduo. Fatos como este demonstram a capacidade do corpo humano em lidar com materiais externos implantados (RATNER et al., 2004).

Historicamente, para reparar lesões corporais causadas por doenças ou traumas, a confecção de implantes era feita a partir de materiais selecionados baseando-se em sua disponibilidade natural no ambiente. Sabe-se que até mesmo madeira era utilizada para essa finalidade (Figura 1a) (HUEBSCH e MOONEY, 2009).

Apenas no início do século XX os materiais naturais utilizados para produção de implantes foram sendo substituídos por novas composições de polímeros sintéticos, cerâmicas e ligas metálicas. Esses novos materiais aumentaram a funcionalidade e resistência dos dispositivos, levando ao aumento da qualidade de vida dos usuários de próteses. A partir de então, o uso desses biomateriais aumentou cada vez mais e milhões de vidas foram salvas ou tiveram sua qualidade melhorada pelo uso de diferentes dispositivos fabricados, como prótese de quadril (Figura 1b), implantes odontológicos, lentes de contato, dentre outros (HUEBSCH e MOONEY, 2009).

**Figura 1** - Próteses produzidas a partir de diferentes materiais.



(a) Prótese feita de madeira para substituição de um dedo do pé amputado encontrada em uma escavação feita em túmulos em Tebas Ocidental, Egito, 1065-740 a.C. (b) Prótese de quadril.

Fonte: Adaptado de Huebsch e Mooney, 2009.

O conceito adotado na Conferência Consenso sobre definições de Biomateriais, realizada nos Institutos Nacionais de Saúde (EUA, 1982), define biomateriais como “qualquer substância (exceto fármacos) ou a combinação de substâncias sintéticas ou de origem natural, que pode ser usada durante períodos de tempo, como um todo ou como parte de um sistema que trata, aumenta, ou substitui qualquer tecido, órgão, ou função do corpo”.

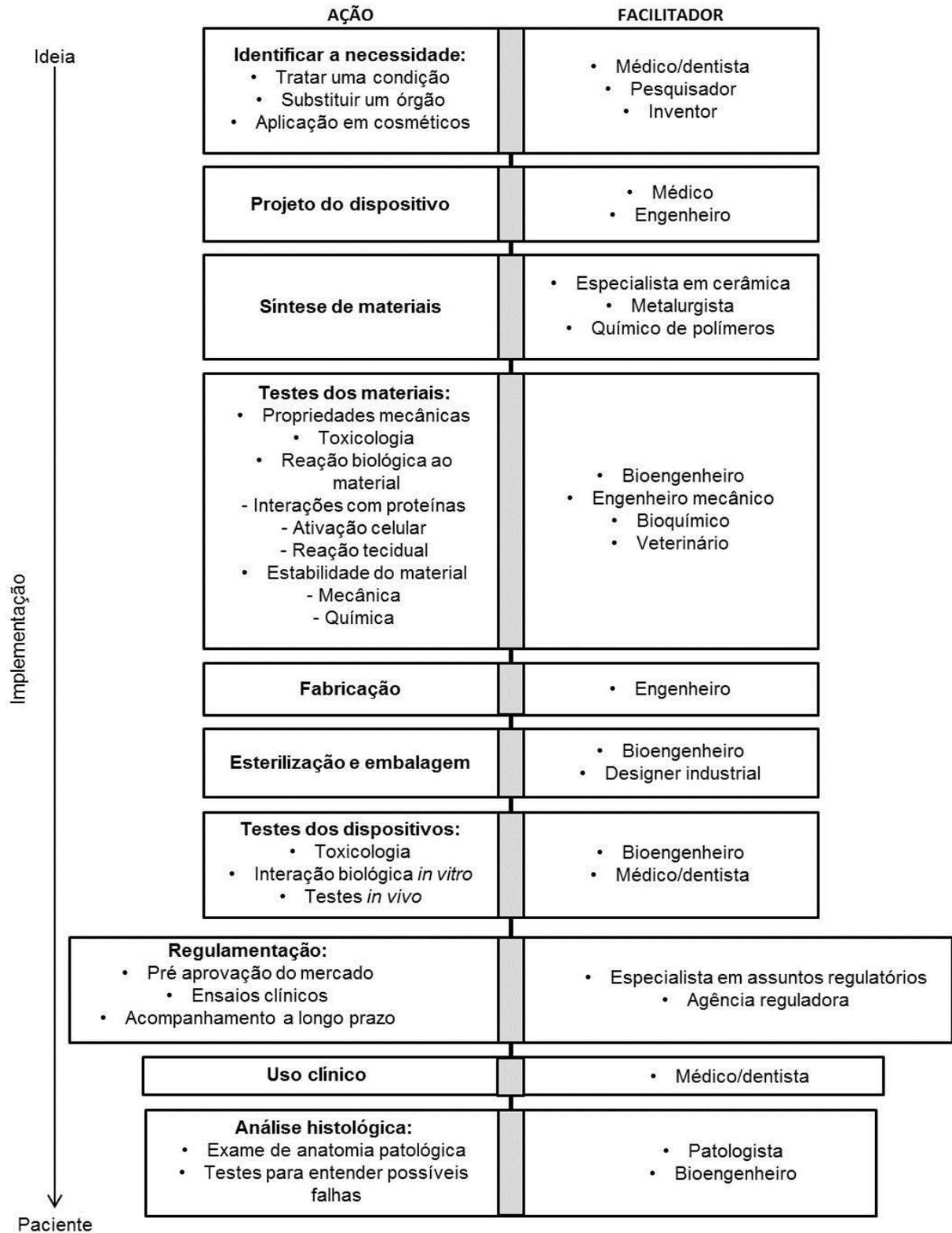
O conhecimento sobre o conceito de biocompatibilidade também se faz necessário para entender a ação dos biomateriais. Biocompatibilidade é a capacidade de interação entre um biomaterial e o tecido do corpo humano circundante a ele (WILLIAMS, 1999). Esse processo ocorre quando não há respostas inflamatórias, alérgicas, mutagênicas ou ocorrência de citotoxicidade no corpo do paciente após entrar em contato com o biomaterial (ARVIDSON et al., 1986; TZEKAO et al., 2007).

Os materiais sintéticos a partir dos quais são confeccionados implantes ou dispositivos de uso médico podem ser utilizados com diferentes propósitos, como por exemplo: substituir partes do corpo, recuperar determinada função e auxiliar na cicatrização de feridas. Dessa forma, se faz importante o conhecimento sobre as propriedades do tecido no qual o biomaterial deve ser aplicado, para que sua função seja desempenhada de forma desejada, similar à condição natural do organismo (HUKINS; LEAHY e MATHIAS, 1999). Além disso, para a escolha e manipulação do biomaterial, devem ser levados em conta aspectos como: preço, facilidade de manuseio, reprodutibilidade da peça e possibilidade de produção em larga escala (PARK e LAKES, 2007).

No caso de implantes para substituição de tecido ósseo, por exemplo, segundo Chinaglia (2013), a base para o sucesso na produção de dispositivos eficientes está no desenvolvimento de próteses que possuam uma estrutura resistente com superfície que tenha a capacidade de favorecer a osseointegração, além de manter a interface tecido ósseo-implante por longos períodos de tempo.

Ao longo das décadas, pesquisas para o desenvolvimento de novos e eficientes biomateriais envolveu profissionais de diferentes áreas do conhecimento e a multidisciplinaridade se tornou uma característica central desse processo. A Figura 2 lista as principais disciplinas envolvidas durante estas etapas de pesquisa desde a definição das propriedades do biomaterial, sendo o objetivo principal de um novo produto, bem como as etapas de produção e venda (RATNER et al., 2004).

**Figura 2** - Etapas do desenvolvimento de um biomaterial e profissionais das áreas de pesquisa envolvidas.



Fonte: Adaptado de Ratner et al., 2004.

Ao longo do tempo, a busca pelos biomateriais ideais para utilização no corpo humano teve diferentes objetivos. Nos anos de 1960 e 1970 foram desenvolvidos os chamados materiais de primeira geração, nos quais, o principal foco era encontrar uma eficiente combinação entre as propriedades físicas, que deveriam ser similares às do tecido humano que seria substituído, e mínima resposta tóxica ao usuário. A busca se concentrava em um material que fosse inerte ao corpo humano (HENCH, 1980).

Em 1980 já havia cerca de 50 tipos de próteses feitas a partir de 40 tipos diferentes de materiais e cerca de dois a três milhões de implantes eram utilizados em cirurgias anualmente nos Estados Unidos (HENCH, 1980). Milhões de pessoas tiveram sua qualidade de vida aumentada com o uso de próteses feitas a partir de materiais inertes. (HENCH e POLAK, 2002).

O foco na escolha das composições mais adequadas para a fabricação desses dispositivos de uso médico começou a mudar com a utilização dos materiais classificados como de segunda geração. Materiais de segunda geração são aqueles que, ao entrarem em contato com o meio circundante no interior do corpo, produzem alguns componentes que por sua vez induzem uma resposta fisiológica no ambiente em que foram inseridos (HENCH e WILSON, 1984).

O que se espera hoje e para uso futuro, é o desenvolvimento e utilização dos chamados biomateriais de terceira geração. Nessa classe de produtos, objetiva-se a interação direta do material com as células do corpo do usuário. Segundo Hench e Polak (2002, p. 1016) “Os materiais de terceira geração estão sendo elaborados para estimular respostas celulares específicas ao nível molecular”.

Um tipo de estrutura que vem sendo desenvolvida, principalmente a partir dos biomateriais de terceira geração, é o *scaffold*. Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais porosas que são capazes de estimular as células a se proliferarem e se fixarem em seu interior à medida que a estrutura é degradada no corpo humano, além de auxiliar na formação de matriz extracelular. Dessa forma, percebe-se que o desenvolvimento e aperfeiçoamento dos biomateriais representa também um grande avanço para a engenharia de tecidos e para a medicina regenerativa, e diversas pesquisas na área estão sendo feitas (NAVARRO et al, 2008; HUTMACHER, HÜRZELER e SCHLIEPHAKE, 1996; AGRAWAL e RAY, 2001).

Diversas composições de biomateriais estão presentes hoje em várias áreas da medicina, segundo a Associação Brasileira de Odontologia (ABO, 2009), os biomateriais representam atualmente cerca de 300 mil produtos existentes na área médica e muitos deles

ainda são comercialmente inviáveis, fato que reforça a importância da continuidade de projetos de pesquisa na área.

### 3.2 AS CIRURGIAS DE IMPLANTES

O número de cirurgias realizadas no mundo para a colocação de implantes ou próteses cresce continuamente. Estima-se que mais de 4,4 milhões de pessoas possuam algum tipo de dispositivo médico de fixação interna. Um dos fatores que pode ser destacado e que corrobora com o elevado número desse indicador é o aumento da expectativa de vida da população. Para os pacientes que possuem um alto nível de imobilidade e dor nas articulações, por exemplo, a solução mais indicada é a cirurgia. Esse processo é de extrema importância na vida dos indivíduos, pois impacta diretamente sobre o fim das dores e aumento da independência nas movimentações (CHEN et al., 2006; INDUSTRY EXPERTS, 2011).

O grande desafio a ser alcançado dentre estes procedimentos cirúrgicos é a longevidade dos implantes com eficiente osseointegração (INDUSTRY EXPERTS, 2011), ou seja, o objetivo fundamental nesses casos é alocar o dispositivo no corpo do paciente e possibilitar que a pessoa leve uma vida normal com longa duração do material implantado.

Essas cirurgias se fazem recorrentes em diversas áreas da saúde e da medicina. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos, Odontológicos, Hospitalares e de Laboratórios (ABIMO, 2013), por exemplo, cerca de 800 mil implantes odontológicos são consumidos por ano no Brasil, além de 2,4 milhões de acessórios e componentes protéticos. A demanda de implantes ortopédicos também é tão grande que o mercado global nesse segmento atingiu US\$ 21,1 bilhões em 2007 e está projetado para atingir US\$ 46,5 bilhões em 2017 (INDUSTRY EXPERTS, 2011).

Estima-se que sejam realizadas anualmente 500.000 cirurgias de substituição de articulações (artroplastia) somente nos Estados Unidos (WARNAWIN et al., 2005), e é esperado que no mundo todo, dentro dos próximos 50 anos, haja uma incidência de fraturas no quadril que necessitem de cirurgias maior do que o triplo de casos registrados em 1990 (UNIVERSITY OF ABERDEEN, 2014).

Uma consulta à literatura realizada por Chinaglia (2013) mostra que os implantes de quadril e joelho totalizam quase 50% do mercado mundial. Além disso, o titânio é o metal mais amplamente utilizado em implantes e próteses atualmente. Isso se deve ao fato

desse metal ser bastante resistente à corrosão e haver uma perfeita integração entre tecidos e sua superfície, ou seja, osseointegração.

Com o crescente número desses procedimentos cirúrgicos, há uma grande preocupação em torno dos casos de falhas que ocorrem com os dispositivos e na região implantada, e que causam danos aos pacientes.

### 3.3 FALHAS NOS IMPLANTES

As falhas que podem ocorrer nas cirurgias de implantes ou próteses podem ser resultantes de diferentes processos. Dentre as principais causas estão, por exemplo: a soltura asséptica do material (SUNDFELDT et al., 2006), perda óssea ao redor do implante em áreas que estão sujeitas a pouca ou nenhuma carga (OH e HARRIS, 1978), aumento da pressão de fluídos corpóreos em espaços gerados pelo descolamento da interface osso-implante (LINDER, 1994; ASPENBERG e VAN-DER-VIS, 1998), micromovimentos da região implantada (GOODMAN, 1994), infecções e endotoxinas liberadas na região que induzem a ativação de macrófagos para reabsorção óssea (BI et al., 2001; SKOGLUND et al., 2002) e infecções bacterianas (XIANG e SPECTOR, 2006; PRAWEL, 2011).

#### **3.3.1 Falhas Atribuídas às Infecções Bacterianas e os Principais Microrganismos Associados**

Dentre as complicações que podem ser geradas na região implantada, os processos infecciosos são considerados os problemas mais devastadores. Os casos de infecção podem acarretar longos períodos de internação, necessidade de nova intervenção cirúrgica, perda definitiva do implante, encurtamento do membro afetado e deformidades permanentes. Geralmente, quando as infecções tentam ser tratadas sem nova intervenção cirúrgica, a tentativa de eliminação do microrganismo falha (ZIMMERLI, 2006).

Segundo Xiang e Spector (2006), os casos mais severos de infecções podem evoluir para osteomielite, amputação de parte do corpo e até para a morte do paciente. A osteomielite é um processo infeccioso e inflamatório que acarreta destruição óssea, sendo causado pela presença de microrganismos patogênicos. O desenvolvimento da osteomielite

está relacionado com a espécie do microrganismo e também com fatores intrínsecos à saúde do hospedeiro (LEW e WALDVOGEL, 2004).

Dentre os microrganismos patogênicos, o *Staphylococcus aureus* é, sem dúvida, o mais citado (Figura 3). Além deste, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* são bactérias comumente isoladas de pacientes em estágios de osteomielite crônica (MACKOWIAK, 1978; HAAS e MCANDREW, 1996; CAREK et al., 2001).

De modo geral, os implantes infectados com o microrganismo *Staphylococcus aureus* devem passar pelo processo de remoção cirúrgica (DAROUICHE, 2004). A revisão cirúrgica é um procedimento perigoso para o paciente, além de gerar altos custos e consumo de tempo para o hospital. Os resultados obtidos com essas cirurgias não são tão bons quanto os esperados com a primeira artroplastia (SUNDFELDT et al., 2006).

A fonte de contaminação pode ser o ar circundante à operação, o contato direto entre objetos contaminados e a fratura, o próprio implante, a abertura cirúrgica, dentre outros fatores. A infecção pode ser limitada a uma região específica ou pode acabar se espalhando por outros locais no corpo do paciente como periósteo (camada que reveste externamente os ossos) e tecidos moles (CAREK et al., 2001).

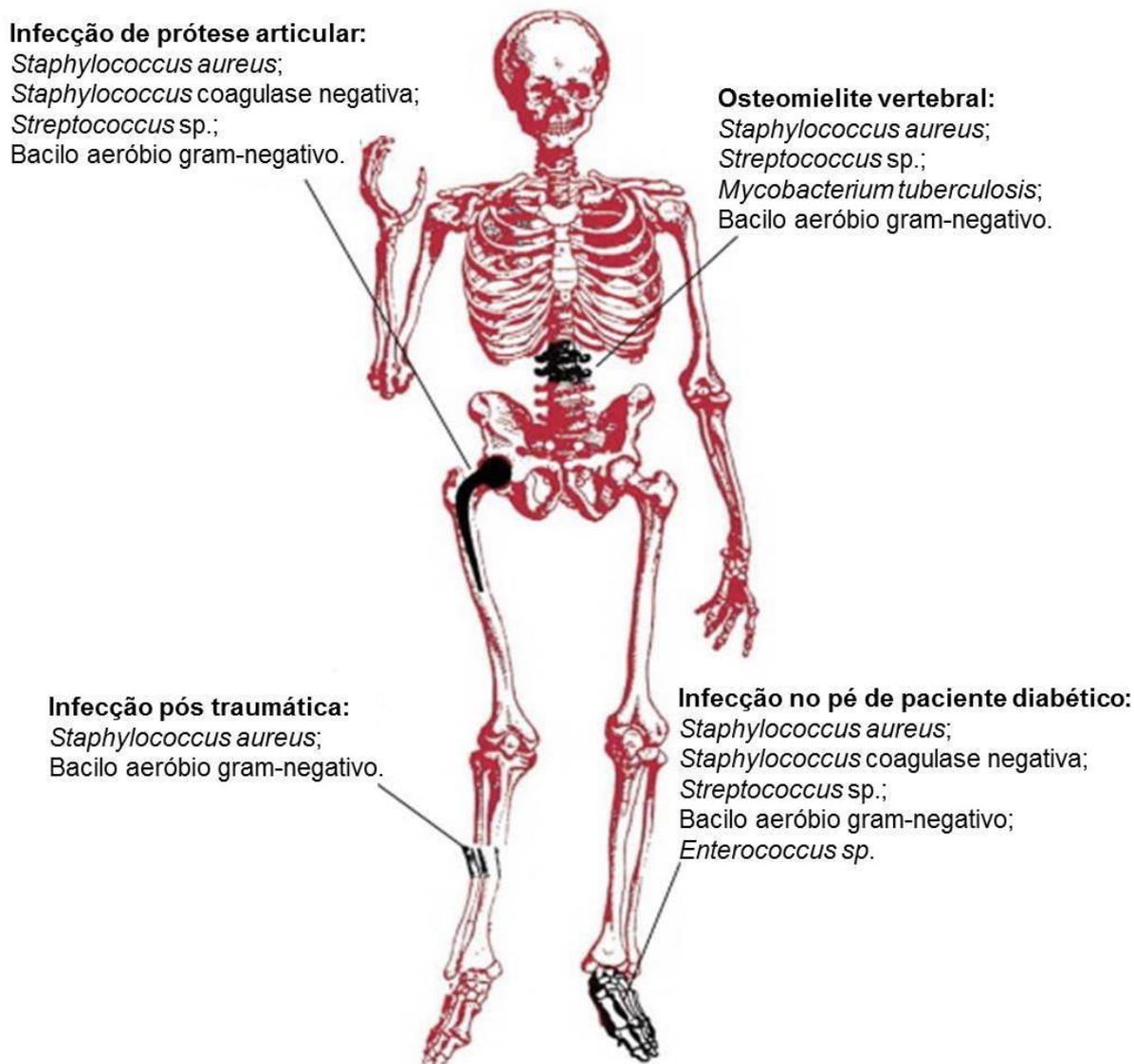
O desenvolvimento de uma infecção no sítio cirúrgico (ISC) pode ocorrer em três estágios, classificados, principalmente, de acordo com o período de tempo no qual os sintomas se manifestam. No estágio I há infecção superficial como resultado de uma contaminação no momento da cirurgia. Ocorre entre três e seis meses após o procedimento e é responsável por 40% do total de casos. O estágio II apresenta infecção superficial ou profunda e ocorre entre seis meses e dois anos após a cirurgia. Correspondem a 45% dos casos de infecção. Já o estágio III apresenta infecção após dois anos do procedimento e correspondem a 15% do total das infecções (ERCOLE e CHIANCA, 2002).

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2013) a infecção de sítio cirúrgico é um dos tipos principais de infecções relacionadas à saúde. Dentre todos os casos registrados que relatam a presença de processos infecciosos, a ISC, especificamente, ocupa a terceira posição, e é encontrada em 14 a 16% dos pacientes hospitalizados.

Um estudo realizado por Whitehouse et al. (2002) demonstrou que pacientes com ISC tiveram que permanecer hospitalizados, em média, duas semanas a mais do que aqueles que não apresentaram infecção, além dos custos com os tratamentos aumentarem mais

de 300% em comparação ao grupo controle, e ainda assim, essas pessoas ficaram com algumas limitações físicas e apresentaram redução na qualidade de vida.

**Figura 3** - Principais microrganismos isolados a partir de diferentes locais do corpo humano acometido por osteomielite. Os microrganismos estão escritos classificados em sua ordem decrescente de ocorrência.



**Fonte:** Adaptado de Lew e Waldvogel, 2004.

Na tentativa de reduzir ou eliminar esses problemas, são realizados vários tipos de tratamentos à base de diversas medicações antibióticas existentes. Há estratégias para prevenir e tratar as infecções que consistem, até mesmo, na injeção ou administração via oral de antibióticos antes e depois da cirurgia. Entretanto, deve-se atentar à resistência que os

microrganismos podem desenvolver frente ao grande uso de antibióticos (NEU, 1992; PEERSMAN et al., 2001)

Tomando como base os dados apresentados acima, o conhecimento sobre as complicações causadas pelas infecções bacterianas é de extrema importância para guiar pesquisas de desenvolvimento de novos implantes ou a escolha de novos materiais para produção de próteses e materiais de uso médico (SOUNDRAPANDIAN, 2007).

### 3.4 A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS E AS INFECÇÕES

O tecido epitelial de revestimento externo do corpo é responsável por proteger os tecidos internos do contato prejudicial ou indevido com componentes do ambiente externo. Os danos epiteliais causados por inflamações ou lesões mecânicas que resultam no rompimento dessa barreira podem trazer consequências graves para o organismo. As aberturas causadas por processos cirúrgicos ou qualquer outro tipo de lesão e ferida podem representar uma porta de entrada de microrganismos que podem desencadear processos infecciosos. Dessa forma, o reparo e a cicatrização desses tecidos são processos essenciais para manter o indivíduo saudável (LEONI et al., 2015)

O processo de cicatrização envolve, basicamente, o acontecimento de três etapas que ocorrem em sequência: inflamação, proliferação celular, e, por fim, maturação das células para recompor o tecido. Esse processo como um todo é complexo, envolvendo um alto nível de interação celular, e a presença de diferentes moléculas mediadoras. Quando o local apresenta infecção, o tempo da fase inflamatória é prolongado prejudicando o andamento da recomposição tecidual (BROUGHTON, JANIS e ATTINGER, 2006).

Principalmente nos pacientes que permanecem internados, qualquer abertura pode resultar em contaminação, já que o ambiente hospitalar pode ser um facilitador do contato com microrganismos patogênicos. As infecções hospitalares também têm consequências graves e podem colocar a vida dos pacientes contaminados em risco caso haja disseminação do microrganismo para outras partes do corpo (EROAN e PASSOS, 2001).

Bôas e Ruiz (2004) avaliaram a ocorrência de infecção hospitalar em pacientes internados em um hospital universitário. A frequência dos isolados bacterianos nos casos infecciosos foi de: 35,7% para *Pseudomonas aeruginosa*, 21,5% para *Staphylococcus aureus*, 14,2% para *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase negativa (como *Staphylococcus epidermidis*) foi encontrada em 11,9% dos casos.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, especialmente, pode habitar quase todos os equipamentos médicos e hospitalares, sendo o mais importante patógeno humano do gênero *Pseudomonas sp.* e grande responsável por infecções hospitalares em ferimentos e queimaduras em diferentes partes do corpo humano (TADEU et al., 2000).

Dessa forma, diversos estudos são realizados na tentativa de desenvolverem novos biomateriais para serem usados como curativos que auxiliem um processo eficiente de cicatrização de feridas com reestabelecimento e reorganização tecidual (ISHIHARAA et al., 2002; AZAD et al., 2004; YH et al., 2015). A rápida e eficaz cicatrização, caso seja aliada a um curativo com propriedades bactericidas, pode trazer ainda mais benefícios para os pacientes, pois além de evitar a entrada de microrganismos no local, pode ainda eliminar as bactérias presentes, e conseqüentemente, as infecções.

### 3.5 VIDROS BIOATIVOS

Em 1969, Larry Hench e colaboradores observaram que algumas composições vítreas possuíam a capacidade de se ligarem aos tecidos vivos sem causar danos. A partir dessas observações foi desenvolvido, nesse mesmo período, um material denominado de Bioglass<sup>®</sup> 45S5 e, juntamente com essa descoberta, surgiu o termo “bioatividade”, uma das características principais desse novo material (HENCH, 2006).

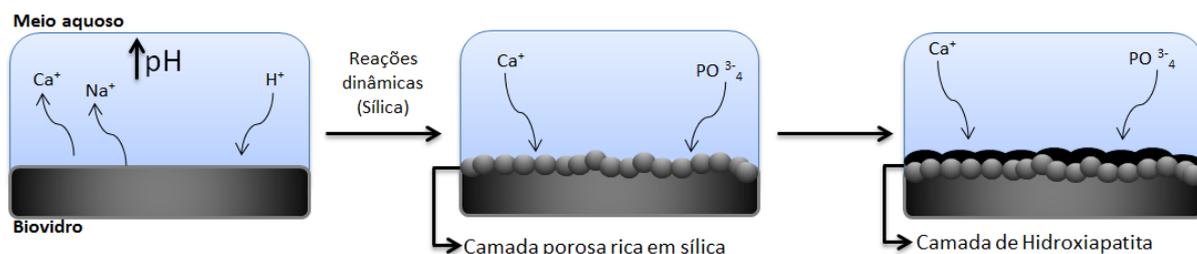
Um material bioativo provoca uma resposta biológica específica no tecido com o qual entra em contato. Mais detalhadamente, esses materiais promovem a formação de uma camada biologicamente ativa de hidroxiapatita (HA) em sua superfície formando uma interface entre o tecido e o biomaterial, promovendo a formação de uma ligação química muito forte entre eles (HENCH e WILSON, 1984; HENCH, 2006).

A hidroxiapatita faz parte dos grupos de fosfatos presentes nos sistemas biológicos. Esse material é, por exemplo, o principal constituinte do esmalte dentário e do tecido ósseo, podendo promover a integração entre implantes e tecidos (GATTI et al., 1993).

A formação de HA a partir do contato de vidros bioativos com o meio aquoso no qual são inseridos, resumidamente, ocorre em três etapas (Figura 4). Primeiramente, a troca iônica de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> presentes na superfície do material com o meio circundante resulta em aumento do pH da solução. Em seguida, ocorre uma série de reações dinâmicas envolvendo a sílica presente nos compostos vítreos, levando à formação de uma camada porosa rica em sílica na superfície do biomaterial. Com a saturação de íons na solução,

começa a ocorrer a deposição de íons  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  na camada de sílica, resultando em outra camada amorfa a partir da incorporação desses íons. E, finalmente, com incorporação de ânions  $\text{OH}^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$  ocorre a cristalização da camada formada, produzindo a HA (SIQUEIRA e ZANOTTO, 2011).

**Figura 4** - Etapas de formação da camada de hidroxiapatita a partir do contato do vidro bioativo com o meio no qual é inserido.



**Fonte:** Campanini, 2015.

O primeiro biovidro desenvolvido, o 45S5, já passou por diversos estudos e muitas de suas propriedades são conhecidas e consolidadas. O Bioglass<sup>®</sup> é a biocerâmica com o maior índice de bioatividade conhecida, além de ser um biomaterial osseoindutor (HENCH e WEST, 1996), possuir propriedade angiogênica (DAY, 2005; JELL e STEVENS, 2006; HENCH, 2009), bactericida (HU et al., 2009; RIVADENEIRA et al., 2013; ALLAN et al., 2001), e anti-inflamatória (RECTENWALD et al., 2002).

A partir do surgimento do Bioglass<sup>®</sup>, outros materiais começaram a ser desenvolvidos com a finalidade de expansão de seu uso e novas aplicações desses produtos, especialmente na área médica. Nesse contexto, pesquisadores do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) no departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) desenvolveram, no decorrer do mestrado de Ravagnani (2003), o Biosilicato<sup>®</sup>.

O Biosilicato<sup>®</sup> é uma vitrocerâmica que foi produzida a partir de composições próximas ao Bioglass<sup>®</sup> 45S5 tendo sua microestrutura controlada, garantindo melhoria nas propriedades mecânicas, elasticidade e melhor usinabilidade em comparação ao biovidro de partida, além de manter a alta bioatividade (SIQUEIRA e ZANOTTO, 2011).

Stoor et al. (1998), também observaram que os biovidros podem ter potencial bactericida. Quando as partículas de um biovidro chamado de S53P4 foram colocadas em ambiente aquoso, houve liberação de íons cálcio e sódio para o meio causando um aumento na pressão osmótica e no pH. Segundo os autores, possivelmente, a combinação desses efeitos

foi responsável por eliminar alguns dos microrganismos patogênicos presentes no ambiente após pouco tempo de contato entre o material e as bactérias.

Uma pesquisa realizada por Martins et al. (2011), evidenciou a eficácia da atividade bactericida do Biosilicato<sup>®</sup>. Este biomaterial inibiu o crescimento de grande parte dos microrganismos avaliados em diferentes metodologias de testes.

Ainda assim, a maioria das composições de vidros bioativos até agora desenvolvidos, tem uma alta tendência à cristalização e possui uma faixa de trabalho e manipulação bastante estreita (BRINK et al., 2000). Dessa maneira, alguns desses biomateriais geralmente não podem ser manufaturados para obtenção de diferentes formas de apresentação, como fibras, *scaffolds* ou outras peças sintetizáveis, limitando suas aplicações clínicas.

Essa dificuldade estimulou novas pesquisas e resultou no desenvolvimento de um biovidro classificado como altamente bioativo e que possui as características necessárias à confecção de fibras e de pó. Esse vidro bioativo foi desenvolvido por Souza (2011) no LaMaV-DEMa/UFSCar e é denominado, internamente, de F18. A nova composição vítrea bioativa está compreendida no sistema  $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$ , o que confere ao material elevada reatividade e, portanto, baixa durabilidade química, como é esperado para um vidro altamente bioativo.

Alguns testes já realizados com o F18 mostraram que superfícies de titânio recobertas com esse biovidro em contato com células osteoblásticas proporcionaram viabilidade celular igual àquela encontrada em superfícies de titânio recoberta com o padrão 45S5 (CHINAGLIA, 2013).

Uma revisão bibliográfica feita por Chinaglia (2013) na área de falhas de implantes ortopédicos e odontológicos mostrou que as causas de problemas nas cirurgias de próteses podem ser reduzidas por meio da associação dos implantes metálicos com materiais como o Bioglass<sup>®</sup> e Biosilicato<sup>®</sup>.

Os vidros bioativos já possuem uma boa quantidade de dados que dão suporte à comprovação de sua eficiência em diversas aplicações, principalmente no que se refere aos seus efeitos antibióticos, antiinflamatórios e de reparação do tecido ósseo. Apesar disso, novas pesquisas ainda se fazem necessárias para compreender as propriedades biológicas dos biovidros (THOMAS et al., 2005).

### 3.6 USO DA PRATA COMO AGENTE BACTERICIDA

A atividade bactericida da prata já é conhecida há muito tempo. Uma das características interessantes dessa propriedade é o amplo espectro de ação. (BERGER et al., 1976; FENG et al., 2000, BLAKER et al., 2004).

Berger et al. (1976) demonstraram que íons  $\text{Ag}^+$  apresentaram eficiente atividade bactericida contra dezesseis tipos diferentes de isolados clínicos bacterianos. A prata foi eficiente até mesmo na eliminação de uma espécie bacteriana que havia se tornado resistente a diversos antibióticos. A inibição dos microrganismos iniciou a partir de concentrações de 1,25  $\mu\text{g}$  de prata por ml de suspensão bacteriana e não apresentou efeitos tóxicos às células de mamíferos.

Feng et al. (1998) produziram filmes de hidroxiapatita contendo prata para aplicações em implantes e comprovaram que concentrações a partir de 20 ppm foram bactericidas contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.

Diversos estudos têm sido realizados a fim de explicar a atividade bactericida da prata. Esse efeito se deve ao fato de que os íons de  $\text{Ag}^+$ , quando liberados no meio em que é inserido, têm a capacidade de reagir com as estruturas do DNA dos microrganismos ali presentes e causar o impedimento da replicação do material genético, levando à morte celular da bactéria (BLAKER et al., 2004; MORONES et al., 2005).

Morones et al. (2005) encontraram evidências de prata tanto na superfície quanto no interior de células bacterianas tratadas com este metal. Além desses autores, outros estudos sugerem que a ação bactericida aconteça devido à interação dos íons com a membrana celular, afetando sua permeabilidade e a cadeia respiratória. A carga positiva dos íons  $\text{Ag}^+$  pode ser atraída pela carga negativa da membrana celular levando aos danos celulares descritos (DIBROV et al., 2002; MORONES et al., 2005; KIM et al., 2007).

Feng et al. (2000) evidenciaram a presença de dano celular representado por um espaço causado pelo afastamento entre membrana e parede celular, após exposição de células bacterianas à prata, além de observarem interações de  $\text{Ag}^+$  com o material genético, levando à condensação do DNA o que impossibilita a replicação.

Alguns trabalhos utilizaram prata incorporada em biomateriais para usos clínicos e obtiveram bons resultados. Bellantone et al. (2002) testaram a atividade bactericida de partículas de 90-710  $\mu\text{m}$  de um biovidro dopado com óxido de prata em comparação à atividade de partículas de mesmo diâmetro do Bioglass<sup>®</sup>. O biovidro que continha a prata

demonstrou uma eficiente eliminação dos microrganismos, porém o 45S5 nessa granulometria não apresentou resultado.

Blaker et al. (2004) desenvolveram curativos dopados com prata e demonstraram que essa formulação não afetou a bioatividade nem a capacidade de manipulação do material. Clupper e Hench (2001) também produziram curativos com Bioglass<sup>®</sup> e prata e obtiveram bons resultados, demonstrando que a adição do metal não interferiu no processo de formação de hidroxiapatita.

A partir disso, pode-se observar que o uso da prata incorporada ao biovidro é viável e pode ser um aliado quando há grande necessidade de atividade bactericida, nos casos em que somente o vidro bioativo não seja suficiente para desempenhar esse papel.

## 4 Materiais e métodos

---

### 4.1 BIOVIDRO

O biovidro utilizado neste trabalho, denominado internamente de F18, pertence ao sistema  $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$ . Esse material foi desenvolvido pelo Laboratório de Materiais Vítreos do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (LaMaV – DEMa/UFSCar) e é coberto pela patente BR10 INPI 20130209619.

### 4.2 BIOVIDRO NA FORMA DE PÓ (F18)

O biovidro foi obtido por fusão e os blocos formados por esse processo foram moídos em almofariz de ágata exclusivo para moagem desse material. O pó resultante foi peneirado a seco com o auxílio de pincel macio tipo “pelo de marta”. 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.

### 4.3 PREPARAÇÃO DO PÓ DO F18 CONTENDO PRATA (F18AG)

O biovidro contendo 1% em peso de prata foi obtido por fusão adicionando-se nitrato de prata à composição original do F18. A obtenção do pó segue a sequência descrita no item 4.2.

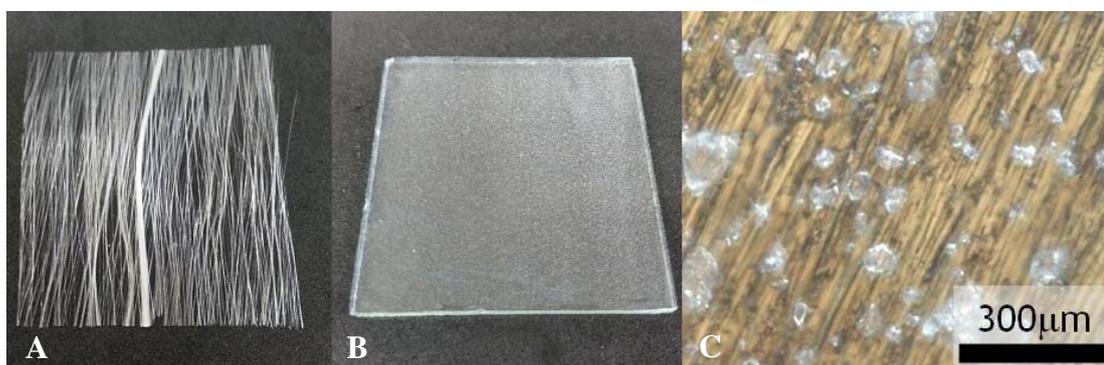
### 4.4 RECOBRIMENTO DAS SUPERFÍCIES COM O PÓ DO F18

Para produzir os corpos de prova (Figura 5) que foram utilizados nesses ensaios, uma camada do pó do biomaterial foi aplicada sobre uma placa de vidro inerte quadrada de cinco centímetros de lado. A deposição dessa camada foi feita por meio do uso da técnica de atomização pneumática, utilizando-se o equipamento conhecido como aerógrafo ou pulverizador a ar comprimido. As partículas de biovidro, dispersas em um gel de

hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), recobriram 25% da superfície das placas de vidro. Essa técnica, desenvolvida por Chinaglia (2013) é coberta pela patente INPI BR 10 2014 003817 5.

A quantidade em peso de pó disperso na área de 25 cm<sup>2</sup> de cada placa foi de 30 mg. Também foram feitos os corpos de prova controle a partir do mesmo procedimento de recobrimento. Neste caso, as placas de vidro inerte foram recobertas apenas com o gel de HPMC.

**Figura 5** - Corpo de prova composto por manta de fibras do biovidro F18 (A). Corpo de prova recoberto com pó do biovidro F18 (B). Detalhe obtido por meio de microscópio ótico em aumento de 100 vezes da superfície da placa recoberta por partículas de pó do biovidro (C).



Fonte: Campanini, 2015.

#### 4.5 BIOVIDRO NA FORMA DE FIBRAS E MANTAS

A partir da composição vítrea do F18, fibras de 25 µm de diâmetro foram obtidas pelo processo de *downdrawing* ou puxamento. Neste processo, utilizado no LaMaV, uma amostra de 400g de vidro é colocada em um cadinho de ZAS (zircônia-alumina-sílica) e levado ao interior do forno, sendo aquecida até uma temperatura patamar, normalmente acima de 1200°C durante, aproximadamente, trinta minutos ou tempo necessário para que a amostra esteja fundida e homogênea. Posteriormente, a temperatura do forno é ajustada para que a massa vítrea alcance a viscosidade adequada para iniciar-se o processo de puxamento de fibras. Durante esse procedimento, as fibras são processadas em mecanismo específico que as recobre com colágeno e em seguida as une de modo a formar uma manta de um não-tecido de fibra de vidro bioativo. As mantas foram confeccionadas pelo LaMaV-DeMa/UFSCar e cortadas em quadrados de 4 x 4 cm para servirem como corpos de prova (Figura 5) nos ensaios microbiológicos.

Os corpos de prova controle de manta vítrea foram feitos pelo mesmo processo, porém compostos apenas por fibras de vidro inerte (“vidro de janela”). As mantas controle também foram cortadas nas mesmas dimensões daquelas compostas por F18.

#### 4.6 CEPAS DOS MICRORGANISMOS

As cepas bacterianas da *American Type Culture Collection* (ATCC) utilizadas na pesquisa são procedentes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e pertencentes ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Carlos. Para a realização dos ensaios foram utilizadas duas cepas de microrganismos estabelecidas pela metodologia da norma escolhida, citada na seção 4.7. São elas: *Escherichia coli* (ATCC 8739P) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Também foram selecionadas para o estudo as cepas de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). A seleção desses microrganismos foi feita baseada na importância de cada um dentro do cenário da pesquisa.

#### 4.7 AValiação IN VITRO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO VIDRO BIOATIVO SEGUNDO A NORMA JIS Z 2801:2010

Os primeiros experimentos foram realizados com o objetivo de investigar se o novo biovidro F18, sem o acréscimo de prata em sua composição, possui alguma atividade bactericida após 24 horas de contato com microrganismos.

A metodologia selecionada para essa finalidade foi baseada na norma JIS (*Japanese Industrial Standard*) Z 2801:2010 “*Antibacterial products - Test for antibacterial activity and efficacy*” que padroniza uma forma de teste para avaliação do efeito bactericida a partir do contato com a superfície de diferentes tipos de materiais, sendo compatível com o objetivo da pesquisa em questão, e podendo ser utilizada para testar o F18 tanto na forma de pó quanto na forma de fibras.

A partir desta metodologia é possível avaliar quantitativamente a redução de microrganismos pela contagem direta do número de UFC (Unidade Formadora de Colônia) por mililitro de amostra de suspensão bacteriana antes e depois de entrar em contato com o material a ser testado. Foram realizados, pelo menos, dois ensaios completos e individuais

com cada uma das cepas bacterianas escolhidas em contato com cada uma das duas formas de utilização do F18 (pó e manta de fibras).

#### 4.7.1 Preparação do inóculo

Em cada ensaio, a bactéria utilizada foi transferida de sua cultura estoque para o caldo triptona de soja (TSB – *Tryptone Soya Broth*) e incubada por 20 a 24 horas a  $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Após esse tempo de crescimento, a cultura foi centrifugada por 15 minutos a 3000 RPM (rotações por minuto). O sobrenadante foi descartado e a bactéria sedimentada foi ressuspendida em solução salina tamponada (PBS – *Phosphate buffered saline*).

A partir desse procedimento, a suspensão em PBS foi ajustada para que fosse obtida uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland, o que significa que havia aproximadamente  $10^8$  UFC por ml. Essa suspensão passou ainda por diluições seriadas até atingir a concentração de  $10^5$  UFC por ml, desejada para o inóculo inicial. Para que esse valor de viabilidade do inóculo fosse confirmado, essa suspensão bacteriana padrão passou por mais três diluições em série, sendo que a partir da última delas foram plaqueados em duplicata os volumes de 100  $\mu\text{l}$  e 1000  $\mu\text{l}$  em ágar padrão para contagem (PCA – *Plate Count Ágar*).

Essas placas que indicavam a viabilidade do inóculo foram feitas pelo método de *pour-plate* e incubadas por 48 horas a  $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Após esse período, foram realizadas as contagens das colônias em cada placa e o valor obtido foi multiplicado pelo inverso da diluição para estimar e confirmar o valor inicial células no inóculo.

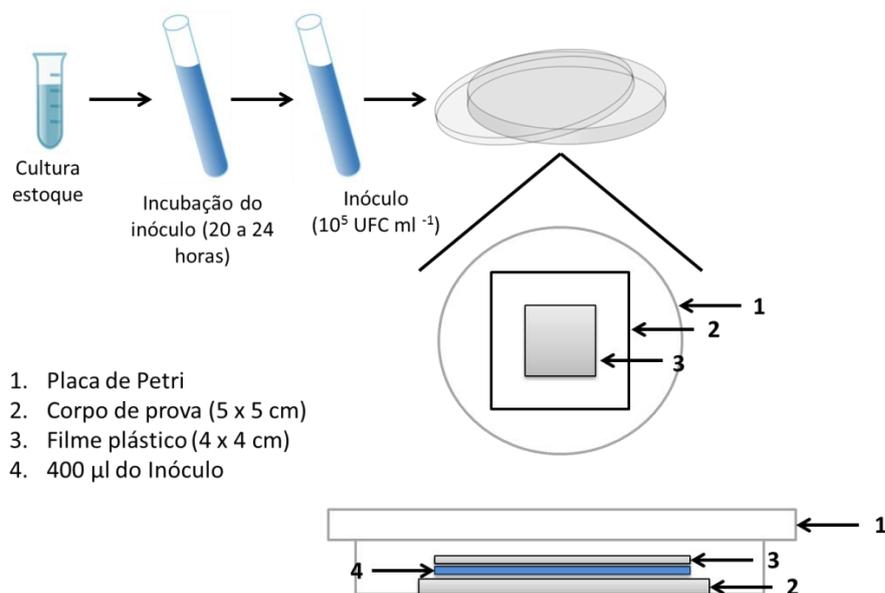
#### 4.7.2 Montagem do experimento

Para cada ensaio foram utilizados nove corpos de prova, dentre estes, seis eram os controles e os outros três continham o vidro bioativo F18. Para a esterilização destes materiais foi utilizado o processo de exposição à luz UV (ultravioleta) por 20 minutos de cada lado. Os corpos de prova esterilizados foram acomodados dentro de placas de Petri e 400  $\mu\text{l}$  do inóculo padrão ( $10^5\text{ UFC ml}^{-1}$ ) foram adicionados sobre a superfície bioativa de cada um. No caso da manta, os corpos de prova foram apoiados sobre um quadrado de 5 cm de vidro inerte e posteriormente, acrescidos da alíquota do inóculo. Um filme plástico de polietileno de

4 x 4 cm, também esterilizado e inerte, foi colocado sobre a alíquota, levando à formação de uma fina camada do inóculo em íntimo contato com o vidro bioativo (Figura 6).

Após a colocação do filme plástico, a área efetiva de contato da suspensão bacteriana com o pó do biovidro foi de 16 cm<sup>2</sup>. Para esta área de contato, estima-se que a proporção da quantidade em peso de pó para cada mililitro do inóculo foi de, aproximadamente, 50mg/ml.

**Figura 6** - Esquema de montagem da metodologia de ensaio microbiológico segundo a norma JIS Z 2801:2010.



**Fonte:** Campanini, 2015.

Três corpos de prova controle e três corpos de prova teste (F18) foram incubados por 24 horas a 35°C ± 1°C em câmara úmida (Figura 7). A umidade desejada foi obtida pelo armazenamento das placas de Petri contendo as amostras em um recipiente de plástico tampado e revestido internamente com papel toalha úmido. Após o tempo de incubação, os corpos de prova passaram pelo procedimento de recuperação dos microrganismos para obtenção do número de UFC ml<sup>-1</sup>.

Três corpos de prova controle não foram incubados e passaram pelo processo de recuperação e análise da quantidade de UFC ml<sup>-1</sup> logo após a inoculação dos 400 µl da suspensão bacteriana, como descrito a seguir. Dessa forma, foi possível validar a eficácia do procedimento de recuperação dos microrganismos ao realizar a comparação entre o resultado obtido nesse tempo zero (inicial) e a contagem obtida a partir da viabilidade do inóculo.

**Figura 7** - Incubação em câmara úmida dos corpos de prova em contato com o inóculo

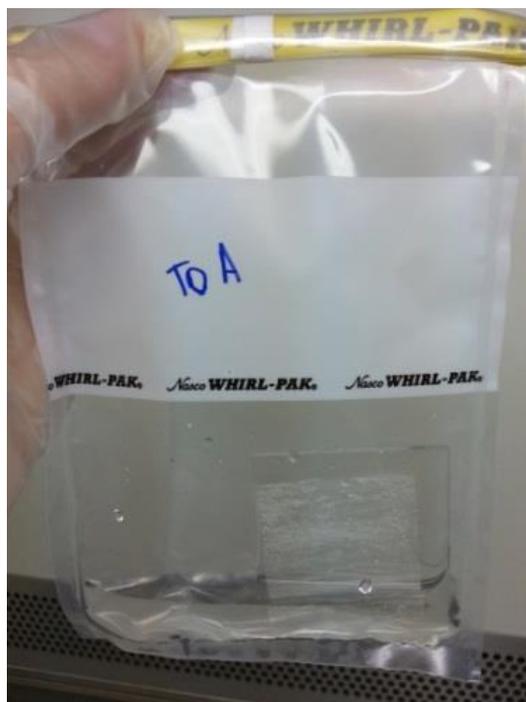


**Fonte:** Campanini, 2015.

#### 4.7.3 Recuperação dos microrganismos

Para o procedimento de recuperação e determinação do número de UFC  $\text{ml}^{-1}$ , cada um dos corpos de prova foi transferido assepticamente para um saco plástico esterilizado (Figura 8), onde foram acrescentados 10 ml de PBS junto à amostra. Os sacos foram fechados e agitados manualmente de modo constante durante um minuto, de forma que todos os microrganismos presentes nas amostras fossem distribuídos e homogeneizados com o PBS. A partir da suspensão presente na bolsa plástica, foram feitas diluições decimais e seus respectivos plaqueamentos a fim de possibilitar a contagem do número de UFC.

**Figura 8** - Início da recuperação dos microrganismos viáveis por meio da lavagem dos corpos de prova em saco plástico esterilizado.



Fonte: Campanini, 2015.

Foram realizados experimentos prévios com o intuito de estabelecer quais seriam as quantidades de diluições adequadas em cada tratamento dos corpos de prova para possibilitar a contagem das colônias. A partir disso, a lavagem no saco plástico dos controles foi diluída quatro vezes (até  $10^{-4}$ ) e 50  $\mu\text{l}$  de cada uma dessas diluições foi plaqueado em duplicata no meio de cultura PCA pela técnica de *spread-plate*.

Os corpos de prova teste passaram por menos diluições. A partir da suspensão formada no saco plástico após a agitação, foi plaqueado um ml em duplicata em PCA pelo método de *pour-plate*. Essa medida foi importante para determinar com maior confiabilidade o limite de detecção do experimento, pois ao realizar a análise dessas placas, foi possível obter diretamente o valor de UFC em cada ml da lavagem. Depois disso, foram feitas ainda duas diluições decimais (até  $10^{-2}$ ) com o restante da suspensão e cada uma seguiu o procedimento de plaqueamento dos controles. Todas as placas obtidas foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, exceto aquelas preparadas pela técnica de *pour-plate*, que permaneceram em incubação por 48 horas. Cada valor de UFC obtido nas placas foi multiplicado pelo inverso da respectiva diluição para obtenção do valor em um ml da suspensão inicial.

#### 4.7.4 Metodologia para análise dos resultados encontrados nos ensaios baseados na norma JIS Z 2801:2010

Todos os valores obtidos por meio das contagens de colônias nas placas de Petri foram multiplicados pelo inverso de suas respectivas diluições, possibilitando a estimativa do valor de UFC ml<sup>-1</sup> em cada situação. Esses valores foram representados por seus respectivos logaritmos, facilitando a visualização dos resultados e, posteriormente, da eficiência bactericida do material. Para os logaritmos obtidos nas réplicas de uma mesma condição, foi calculada a média e o desvio padrão de cada um desses valores.

Como a partir da lavagem dos corpos de prova que continham o F18 e o inóculo, foram plaqueados 1 ml em duplicata para posterior contagem, o limite de detecção desse ensaio para a redução de microrganismos foi de 1 UFC ml<sup>-1</sup>, sendo que, quando não foram encontradas colônias nas contagens realizadas nas placas, foi considerado o valor de 1 UFC. A partir disso, foram feitas as tabelas (Tabelas 1 e 2) contendo todos esses dados coletados dos ensaios microbiológicos com a manta e o pó do biovidro.

Segundo o item 5.8 da norma JIS Z 2801:2010 que discorre sobre os resultados dos testes, a atividade bactericida do material em análise deve ser calculada de acordo com a seguinte equação (1):

$$(1) \quad R = U_t - A_t$$

Onde,

R = Valor da atividade bactericida/Redução logarítmica de células viáveis.

U<sub>t</sub> = Média dos logaritmos dos números de células bacterianas viáveis após a incubação por 24 horas em contato com corpos de prova controle

A<sub>t</sub> = Média dos logaritmos dos números de células bacterianas viáveis após a incubação por 24 horas em contato com corpos de prova contendo o biovidro F18

Ainda segundo a mesma norma, o material em teste é considerado como eficiente caso os valores da atividade bactericida (R), sejam, pelo menos, 2,0. Ou seja, o material deverá proporcionar uma redução de 2,0 ou mais logs na contagem do inóculo após do tempo de incubação.

Para facilitar a visualização do resultado final de redução dos microrganismos em cada condição, os valores de R foram representados na forma de gráficos.

#### 4.8 AVALIAÇÃO IN VITRO DA CINÉTICA DE AÇÃO BACTERICIDA DO VIDRO BIOATIVO

Após a realização dos experimentos que seguiram a norma JIS Z 2801:2010, foi possível se obter conhecimento prévio sobre a eficiência da atividade bactericida do F18 após 24 horas de contato com as suspensões bacterianas selecionadas. A partir disso, novos ensaios foram planejados com o objetivo de investigar a ação bactericida do biovidro F18 no decorrer de períodos mais curtos de tempo.

Antes do início dos experimentos com o F18, havia a existência de uma hipótese de que esse novo material pudesse ter apenas ação bacteriostática e não bactericida, como era desejado. Por esse motivo, neste trabalho, também foi proposta a realização de ensaios posteriores com o pó do biovidro acrescido de prata (F18Ag) que é um importante e conhecido agente bactericida.

Baseando-se nas premissas citadas acima, os próximos ensaios foram elaborados a fim de possibilitar a comparação da ação bactericida do F18 e do F18Ag, ambos na forma de pó, por meio da contagem de UFC de *S. aureus* submetidas a estes diferentes tratamentos e em períodos de tempo menores do que 24 horas de contato entre o inóculo e os materiais. Nos testes cinéticos também buscou-se avaliar a efetividade de diferentes proporções de pó de vidro bioativo por mililitro de suspensão do inóculo, e a interferência da incubação estática ou sob agitação na ação dos materiais.

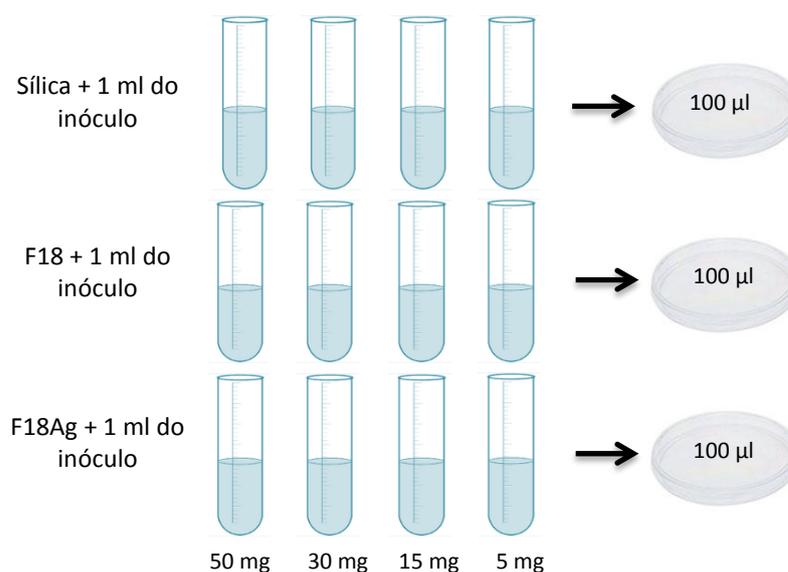
##### **4.8.1 Comparação da cinética de ação bactericida entre o pó do F18 e F18Ag em diferentes quantidades aplicadas ao inóculo**

Nesse experimento foram colocadas diferentes quantidades do pó do biovidro F18 e F18Ag em tubos de ensaios estéreis e em cada um deles foi acrescentado 1 ml do inóculo padrão. O microrganismo utilizado nesses ensaios foi o *S. aureus*, devido sua grande importância e prevalência em casos infecciosos, como comentado na revisão bibliográfica. O inóculo na concentração de  $10^5$  UFC ml<sup>-1</sup> foi previamente preparado de acordo com a metodologia citada na seção 4.5.3.

Em diferentes tubos de ensaio foram colocadas, individualmente, as quantidades de 50, 30, 15 e 5 mg do pó de F18, do pó de F18Ag e, como controle, sílica (SiO<sub>2</sub>) em pó. Todos os materiais na forma de pó possuíam a mesma granulometria média de 49 µm e foram esterilizados, dentro de seus respectivos tubos, em estufa a 170 °C por duas horas. Cada tubo, com as diferentes quantidades de pó, foi feito em duplicata para aumentar a confiabilidade dos resultados.

Após o acréscimo de 1 ml do inóculo sobre o pó dos materiais dentro de cada um dos tubos, o conjunto foi colocado sob incubação em shaker a 35°C ± 1°C e 150 RPM (rotações por minuto). A partir disso, em tempos determinados, foi plaqueada uma alíquota de 100 µl de cada condição em PCA para possibilitar a contagem das UFC em cada tempo. Os tempos escolhidos para o plaqueamento foram: 0, 30, 60, 90 minutos e 24 horas. Todas as placas foram feitas pelo método de *spread plate* e foram incubadas por 24 horas a 35 °C ± 1°C antes da contagem.

**Figura 9** - Esquema simplificado de montagem do experimento de avaliação da cinética de ação bactericida do F18 e F 18 Ag. Cada condição foi feita em duplicata.



**Fonte:** Campanini, 2015.

#### **4.8.1.1 Método de análise dos dados obtidos**

Os resultados obtidos nas contagens foram multiplicados pela respectiva diluição (10<sup>-1</sup>) para que fosse determinado o número de UFC ml<sup>-1</sup>. Todos os valores foram

representados em sua forma logarítmica para que fosse mais fácil a visualização numérica de redução microbiana. A partir disso, foi possível se obter a média das contagens e também o desvio padrão entre os valores. Com esses dados, foi elaborado um gráfico para representação da ação bactericida do F18 e F18Ag ao longo do tempo e em comparação com o controle (Sílica).

#### **4.8.2 Análise da cinética da atividade bactericida do F18 e F18Ag em comparação com o padrão Bioglass® 45S5 e em condições de incubação com e sem agitação**

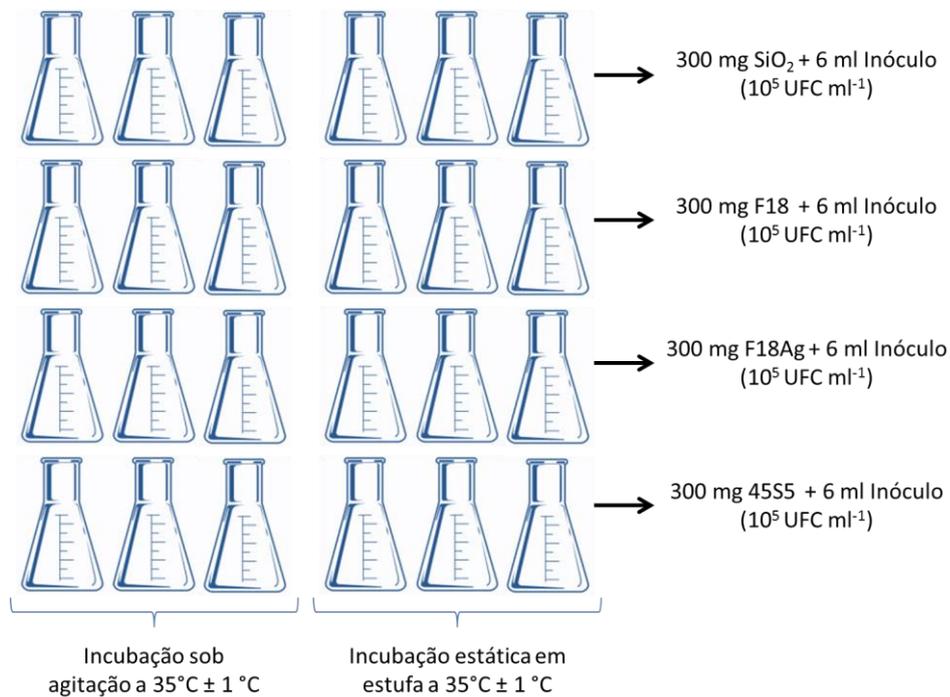
No experimento comparativo entre a ação do F18, F18Ag e do padrão 45S5, 300 mg do pó de cada um desses materiais foram colocados individualmente dentro de diferentes erlenmeyers estéreis com capacidade para 125 ml. Sobre o pó, foi acrescentado em cada frasco seis ml do inóculo ( $10^5$  UFC ml<sup>-1</sup>) padronizado de *S. aureus* de acordo com 4.5.3.

O controle foi feito da mesma forma, utilizando-se sílica (SiO<sub>2</sub>) em pó na mesma granulometria média dos demais materiais. O 45S5 na forma de pó foi produzido pelo LaMaV–DEMa/UFSCar pelo mesmo procedimento que os demais pós.

As quantidades de pó e os frascos erlenmeyers foram esterilizados por duas horas em estufa a 170 °C. Para cada uma das condições (SiO<sub>2</sub>, F18, F18Ag e 45S5) foram preparados 6 erlenmeyers com a mistura de pó e inóculo. Todos os 24 frascos passaram por incubação e plaqueamento em tempos determinados, como descrito no ensaio cinético anterior. Porém, como o objetivo principal do experimento em questão era avaliar se a incubação das amostras sob agitação influenciava na ação bactericida do biovidro, neste caso, três frascos de cada um dos tratamentos foram incubados sob agitação em shaker e os outros três de cada um, de forma estática em estufa de cultura (Figura 10).

Os tempos, nos quais as alíquotas de 100 µl de cada tratamento foram plaqueadas em duplicata, foram: 30, 60, 180, 360 minutos e 24 horas. As placas resultantes do processo foram incubadas por 24 horas a 35 °C ± 1°C e depois passaram pela contagem das colônias.

**Figura 10** - Esquema da metodologia utilizada no ensaio de avaliação da cinética de ação bactericida do F18, F18Ag e 45S5.



**Fonte:** Campanini, 2015.

#### **4.8.2.1 Método de análise estatística dos dados obtidos**

A partir de cada condição testada foi obtido um conjunto de dados com seis valores de contagens de UFC, resultantes do plaqueamento em duplicata de um dos frascos que compunham a triplicata. Cada um desses valores foi representado pelo seu respectivo logaritmo, de forma que a representação gráfica da atividade bactericida pudesse ficar mais visível.

Para a avaliação dos dados coletados, objetivou-se responder às seguintes perguntas: “Há diferença de ação bactericida entre os materiais (45S5, F18 e F18Ag) em cada período de tempo determinado?” e “A forma de incubação (com ou sem agitação) das amostras que continham a suspensão bacteriana em contato com os biovidros interfere na ação bactericida de cada um dos materiais?”.

Para responder as perguntas, foram aplicados três tipos de testes estatístico sobre os dados, resultando em maior confiabilidade na avaliação. O teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, utilizado para comparar mais de dois grupos de dados entre si, foi aplicado para auxiliar na resposta da primeira pergunta. Para isso, as variáveis “agitação”

(com ou sem) e “tempo” (30 minutos, uma, três, seis ou 24 horas) foram fixadas e o conjunto de dados obtidos em cada combinação foi analisado segundo o teste apontado, possibilitando a comparação entre cada dupla de material individualmente.

Para responder a segunda pergunta, as variáveis “tempo” (30 minutos, uma, três, seis ou 24 horas) e “material” (45S5, F18 e F18Ag) foram fixadas, e os conjuntos de dados obtidos na condição de incubação com agitação foi comparado com os dados obtidos na incubação estática. Cada dois grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Os testes foram realizados por meio do programa estatístico Graphpad Prism 6.

## 5 Resultados e Discussões

### 5.1 ENSAIOS BASEADOS NA NORMA JIS Z 2801:2010

Em todos os experimentos realizados com base na norma JIS Z 2801:2010, primeiramente, o processo de recuperação dos microrganismos mostrou-se eficiente e confiável, pois para todas as cepas utilizadas, o número de UFC encontrado em cada ml da suspensão de lavagem dos três corpos de prova controle no tempo zero (tempo inicial de contato) foi correspondente àquele encontrado nas contagens da viabilidade de cada inóculo.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos com os experimentos baseados na norma JIS e realizados com os corpos de prova recobertos com o pó do biovidro F18 em contato com as quatro diferentes cepas bacterianas selecionadas para a pesquisa.

**Tabela 1** - Resultados obtidos com os ensaios baseados na norma JIS Z 2801:2010 a partir do contato do pó do biovidro F18 com as diferentes cepas bacterianas.

	Viabilidade do inóculo (log <sub>10</sub> UFC ml <sup>-1</sup> )	Controle - 24 horas (log <sub>10</sub> UFC ml <sup>-1</sup> )	F18 24 - horas (log <sub>10</sub> UFC ml <sup>-1</sup> )
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739P)	5,8 ± 0,1	6,0 ± 0,1	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	5,7 ± 0,2	6,1 ± 0,1	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	5,2 ± 0,01	5,9 ± 0,4	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	5,8 ± 0,01	6,5 ± 0,1	0

Fonte: Campanini, 2015.

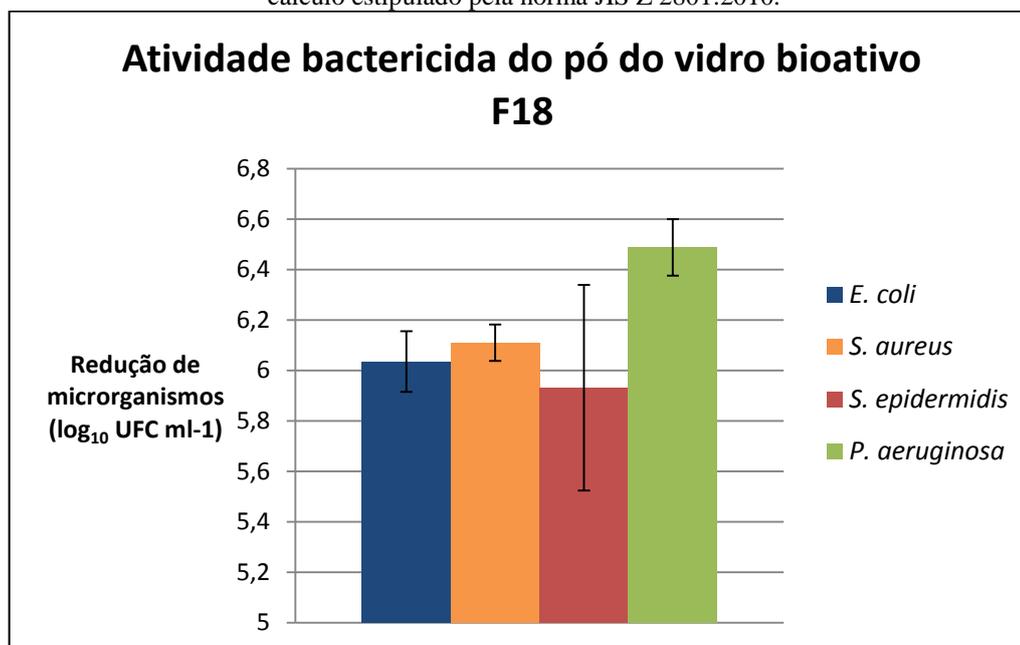
De acordo com a Tabela 1 é possível observar que, em todas as condições de ensaio, os inóculos bacterianos iniciais estavam dentro da concentração desejada, ou seja, pelo menos 10<sup>5</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. Observa-se também que após 24 horas de contato entre os corpos de prova controle e a suspensão bacteriana, houve um aumento no número de colônias em comparação com a viabilidade. Esse fato mostra que os microrganismos foram capazes de se reproduzir sob as condições fornecidas durante a incubação. O gel HPMC, utilizado no processo de recobrimento dos corpos de prova controle, não possuiu nenhum efeito

bactericida, podendo-se constatar que a redução bacteriana observada se deve, exclusivamente, ao biovidro.

No momento das contagens das placas de Petri feitas a partir das amostras que continham o F18, não foram encontradas colônias de nenhuma das bactérias. Ao considerar esses resultados como 1 UFC ml<sup>-1</sup> (limite de detecção da técnica), o valor do logaritmo obtido a partir do número um é igual a zero e, portanto, o desvio padrão entre as amostras também foi zero, como demonstra a Tabela 1.

A Figura 11 indica o valor da redução logarítmica do número de células viáveis de cada microrganismo testado, seguindo a equação (1) da norma utilizada. O desvio padrão das contagens de cada cepa está representado pela barra de erro.

**Figura 11** - Valor da atividade bactericida do pó do F18 sobre as diferentes cepas bacterianas, seguindo o cálculo estipulado pela norma JIS Z 2801:2010.



Fonte: Campanini, 2015.

Observando-se a Figura 11 é possível perceber que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi a que apresentou maior redução logarítmica no número de células viáveis e *Staphylococcus epidermidis*, a menor redução em comparação as outras. Porém, esses valores de redução são proporcionais ao crescimento dos microrganismos durante o período de incubação. Sendo que *P. aeruginosa* foi a que mais se reproduziu e *S. epidermidis* teve um menor aumento no número de colônias após as 24 horas, quando comparados à viabilidade.

No experimento em questão, para todas as cepas, o valor de atividade bactericida (redução logarítmica de microrganismos) foi maior que o dobro do limite 2,0

estipulado pela JIS. Observa-se também, que não houve diferença de sensibilidade ao F18 entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas após o tempo de contato de 24 horas. Nos quatro casos pode-se afirmar que a eficiência bactericida do pó do F18 foi próxima de 100%. As repetições do ensaio completo com cada microrganismo tiveram o mesmo resultado de redução, aumentando a confiabilidade dos dados.

A análise de resultados dos ensaios realizados com a manta de biovidro seguiu o mesmo padrão daquela realizada com o pó do mesmo material. A Tabela 2 mostra os dados obtidos a partir desses cálculos.

**Tabela 2** - Resultados obtidos com os ensaios baseados na norma JIZ Z 2801:2010 a partir do contato das mantas de fibras do vidro bioativo F18 com as diferentes cepas bacterianas.

	<b>Viabilidade</b> (log <sub>10</sub> UFC ml <sup>-1</sup> )	<b>Controle - 24 horas</b> (log <sub>10</sub> UFC ml <sup>-1</sup> )	<b>F18 24 - horas</b> (log <sub>10</sub> UFC ml <sup>-1</sup> )
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739P)	5,8 ± 0,1	7,0 ± 0,2	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	5,2 ± 0,1	6,2 ± 0,1	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	5,1 ± 0,1	6,1 ± 0,2	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	5,8 ± 0,01	7,3 ± 0,2	0,8 ± 0,6

**Fonte:** Campanini, 2015.

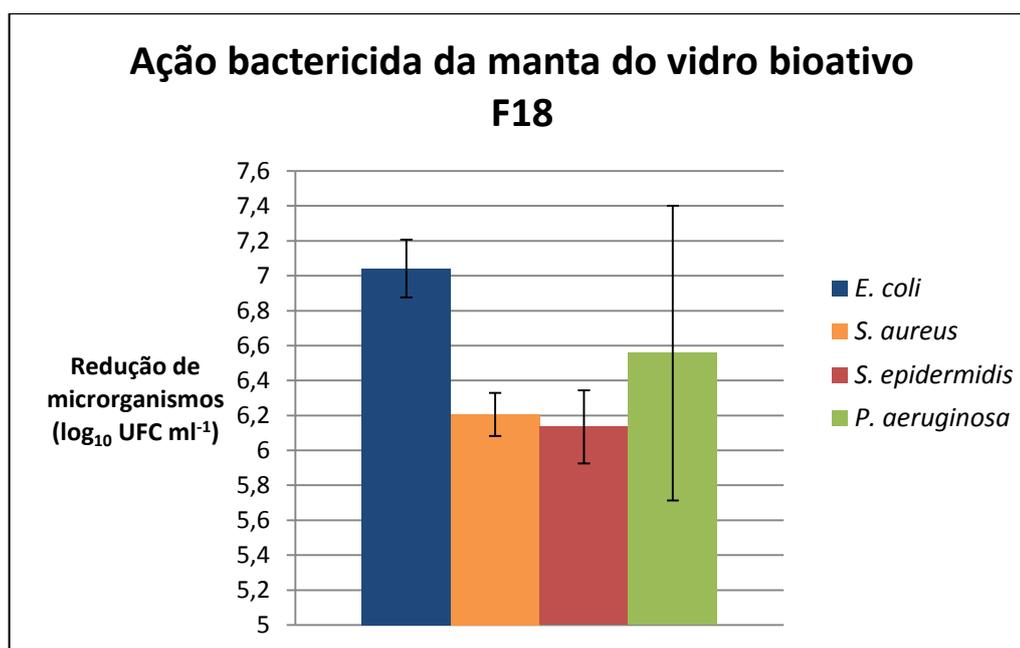
A partir desses resultados pode-se confirmar, por meio dos valores da viabilidade, que o inóculo inicial também estava dentro do desejado para os testes (pelo menos 10<sup>5</sup> UFC ml<sup>-1</sup>). Observa-se que o ocorrido para os ensaios com o pó do biovidro nas comparações entre os valores da viabilidade do inóculo e do controle após a incubação, foi repetido para estes testes realizados com a manta de fibras bioativas. Porém, no caso das mantas, o aumento de células viáveis após 24 horas foi maior do que com o pó. A diferença entre essas duas situações de incubação é que na manta controle há presença do colágeno que une as fibras de biovidro. É provável, então, que os microrganismos tenham utilizado compostos dessa proteína como fonte de nutrientes para sua multiplicação.

Mesmo com o grande aumento no número de células no controle após 24 horas, o F18 na forma de manta também se mostrou bactericida. Para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, o logaritmo médio das contagens após 24 horas de contato com a manta foi igual a zero, pois não foram encontradas colônias nas placas. Apenas em um dos ensaios

com a manta de F18 em contato com *P. aeruginosa*, houve o crescimento de algumas células viáveis após 24 horas, porém, como se observa na Tabela 2, o logaritmo desse valor é mínimo.

A Figura 12 apresenta os valores da redução logarítmica dos microrganismos em contato com a manta de biovidro.

**Figura 12** - Valor da atividade bactericida da manta de fibras do F18 sobre as diferentes cepas bacterianas, seguindo o cálculo estipulado pela norma JIS Z 2801:2010.



Fonte: Campanini, 2015.

A Figura 12 mostra que a redução dos quatro microrganismos em contato com a manta de F18 foi eficiente, ficando bem acima do limite (2,0) de atividade bactericida determinado pela norma. No caso de *P. aeruginosa*, o desvio padrão encontrado entre as contagens realizadas nas amostras foi alto, pois em algumas das placas obtidas restaram poucas colônias após 24 horas e em outras não foram observadas células viáveis. Mesmo com o maior desvio, o F18 foi altamente bactericida contra esse microrganismo, atingindo um valor mínimo de redução de 5,7 logs.

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas também foram igualmente sensíveis ao material nesse tempo de contato. A ação bactericida foi próxima de 100%, já que restou um número mínimo de colônias ao final do período de incubação do experimento.

O efeito bactericida de algumas composições de biovidro já foi reconhecido em determinados estudos. Hu et al. (2009) identificaram uma grande atividade antibacteriana do

pó do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Concentrações a partir de 50 mg do pó do 45S5 colocados em 1 ml de suspensão foram as mais eficientes para eliminação dos microrganismos presentes e as partículas do pó utilizado desse estudo possuíam diâmetro inferior a 50 µm. Esse dado corrobora com a presente pesquisa, onde a concentração utilizada de 50 mg de pó F18 em cada ml da suspensão do inóculo apresentou alta atividade bactericida durante a realização dos ensaios baseados na norma JIS. A ação das partículas de diâmetro médio de 49 µm das partículas de F18 também concordaram os resultados obtidos por Hu et al. (2009) com o 45S5.

Rivadeneira et al. (2013) também atingiram bons resultados de atividade bactericida com partículas de 45S5 de diâmetro entre 5 a 100 µm aplicadas na fabricação de biocompósitos contra *S. aureus* e *S. epidermidis*. A concentração utilizada foi menor do que a estabelecida para a pesquisa em questão com o F18, porém o pico da atividade se deu após 48 horas de incubação, ou seja, o dobro do tempo estabelecido pela metodologia da norma JIS.

Martins et al. (2011) provaram a atividade bactericida do Biosilicato<sup>®</sup> em pó com partículas de diâmetro entre 0,1 e 20 µm contra alguns microrganismos. Apesar da confirmação de um amplo espectro de ação, em duas dentre três metodologias diferentes testadas pelos autores, o microrganismo *S. aureus* resistiu aos testes e em uma delas, também restaram colônias de *P. aeruginosa*. Nesse ponto, os testes com F18 apresentaram maior eficiência contra esses dois microrganismos após as 24 horas de contato.

Os resultados descritos nos artigos citados acima concordam com o obtido nos testes de atividade bactericida com pó e manta do F18. Porém, Bellantone et al. (2002) mostraram a ineficácia bactericida de partículas maiores de 45S5 com diâmetro de 90 a 710 µm contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Da mesma forma, Gorriti et al. (2009) demonstraram que não houve redução significativa de *S. aureus* a partir do contato com scaffolds feitos a partir de 45S5, mesmo após 24 horas de contato.

Com essas evidências é possível perceber que partículas pequenas (aproximadamente até 100 µm) de pó de vidro bioativo possuem uma maior eficiência na atividade bactericida, provavelmente pela maior superfície de contato com o meio em que serão inseridas. Além disso, o observado na presente pesquisa, pode levar a crer que dispersão dessas partículas também interferem nessa atividade, sendo que a aglomeração do pó pode diminuir a eficácia.

Observa-se também que partículas grandes (maiores que 100 µm) e scaffolds de 45S5 não tiveram ação antimicrobiana contra as bactérias testadas (Bellantone et al., 2002

e Gorriti et al., 2009). Porém o F18 na forma de manta de fibras bioativas foi extremamente eficiente na eliminação dos microrganismos selecionados para o presente trabalho. Nesse caso, apesar de o F18 não estar em formato de partículas pequenas e sim de fibras, ele apresentou uma ação tão eficaz quanto a do pó, provavelmente por ser mais solúvel no meio em que é inserido do que as amostras dos materiais citados nesses outros trabalhos. Esse resultado promove uma vantagem a esse novo biomaterial a partir da confirmação de sua atividade bactericida mesmo em diferentes e maiores formatos.

Allan, Newman e Wilson (2000) demonstraram eficiente atividade bactericida, próxima de 100%, do 45S5 após três horas de contato do pó desse material com diferentes microrganismos encontrados no ambiente bucal humano. No teste cinético realizado no presente trabalho, este também foi o tempo necessário para a eficiência máxima do 45S5, apesar das espécies bacterianas serem diferentes, colaborando com a credibilidade desse ensaio.

O mecanismo exato de ação dos vidros bioativos na eliminação de microrganismos ainda está sendo estudado. Um ponto comum que aparece nos trabalhos citados acima é a observação do aumento do pH do meio após o contato com o biovidro, independente de sua composição específica. Hu et al. (2009) mostraram que o pH da suspensão com pó de 45S5 após uma hora de contato passou de 7,0 para 9,8. Segundo Rivadeneira et al. (2013) o pH do meio que contém o pó do Bioglass<sup>®</sup> aumenta com o aumento do período de incubação da mistura. Também foi observado que há correlação entre o aumento do pH e a efetividade contra *S. aureus*.

Stoor et al. (1998), em seu trabalho com o vidro bioativo S53P4, também observaram o aumento do pH do meio que entra em contato com o material. Além disso, afirmaram que ao entrar em contato com meio aquoso, o biovidro libera íons, principalmente de cálcio, fósforo e sódio. Esses íons, em especial os de sódio, alteram a pressão osmótica do meio em que as células bacterianas se encontram, sendo essa mudança de pressão responsável, também, por causar danos às células viáveis de microrganismos.

Segundo Stoor et al. (1998), a liberação dos íons que causam o aumento do pH e da pressão osmótica aumenta com uma maior superfície de contato entre as partículas do biovidro e o meio no qual elas estão inseridas. Essa observação justifica a ineficiência de grandes partículas de vidro bioativo, já que para uma mesma quantidade em peso de partículas grandes e pequenas, o contato entre a superfície das pequenas com meio é bem maior.

Além dos possíveis motivos da atividade antimicrobiana dos vidros bioativo citados acima, Hu et al. (2009) ainda observaram em microscópio eletrônico de transmissão pequenas partículas de 45S5 em escala manométrica que estavam acopladas às partículas maiores. Estas menores possuíam formato pontiagudo e, por meio de sua colisão com células bacterianas de *E. coli*, causaram dano físico e morte celular da bactéria.

A partir dessas referências, pode-se observar que os principais mecanismos que auxiliam na atividade bactericida dos biovidro são: o aumento do pH, o aumento da pressão osmótica e dano físico às células por partículas pontiagudas. Porém esses mecanismos serão iniciados a partir do contato do material com um ambiente aquoso que permita a liberação de íons a partir do vidro bioativo.

Apesar da observação de redução de alguns microrganismos nos estudos citados, nota-se que a potencialidade do efeito bactericida é diferente dentre as diferentes composições de biovidro existentes. Ao comparar-se a ação do F18 com os resultados obtidos nessas pesquisas, nota-se que esse novo material possui a vantagem de apresentar-se muito eficiente, tanto na forma de pó quanto de fibras, após o tempo de contato estipulado pela norma testada.

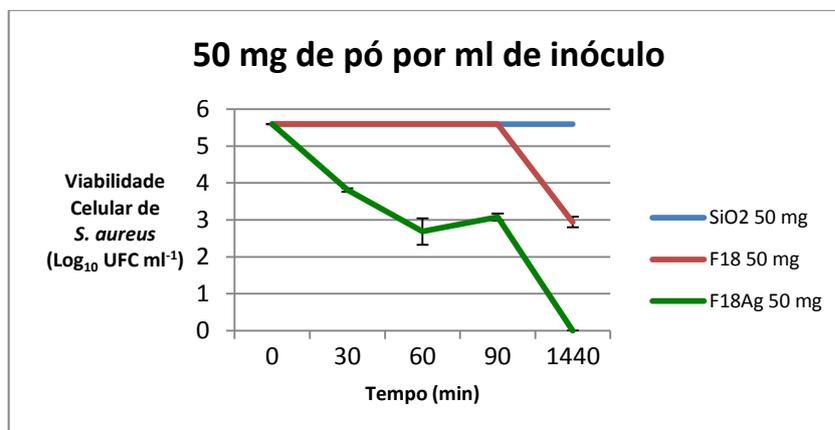
## 5.2 CINÉTICA DE ATIVIDADE BACTERICIDA DO F18 E F18AG

Nos ensaios de avaliação da cinética de ação bactericida do F18 e F18Ag em comparação com o controle (sílica), as amostras desses materiais na forma de pó foram misturadas diretamente com o inóculo preparado, diferente do que foi realizado seguindo à norma JIS, onde o pó era disperso em superfície para posterior adição do inóculo.

A viabilidade inicial do inóculo utilizado para ser misturado ao pó das amostras foi de  $5,59 \log_{10}$  UFC ml<sup>-1</sup>. A seguir estão apresentados os gráficos resultantes das análises dos dados obtidos nos ensaios cinéticos.

A Figura 13 representa os valores de viabilidade celular de *S. aureus* encontrados em cada tempo de plaqueamento de amostras da mistura da suspensão bacteriana e 50 mg de pó de biovidro em comparação com o controle. As barras de erro em cada ponto de análise representam o desvio padrão entre valores obtidos.

**Figura 13** - Valores da viabilidade celular de *S. aureus* encontrados no decorrer de diferentes períodos de contanto entre a suspensão bacteriana e 50 mg de F18, F18Ag ou sílica (controle).



Fonte: Campanini, 2015.

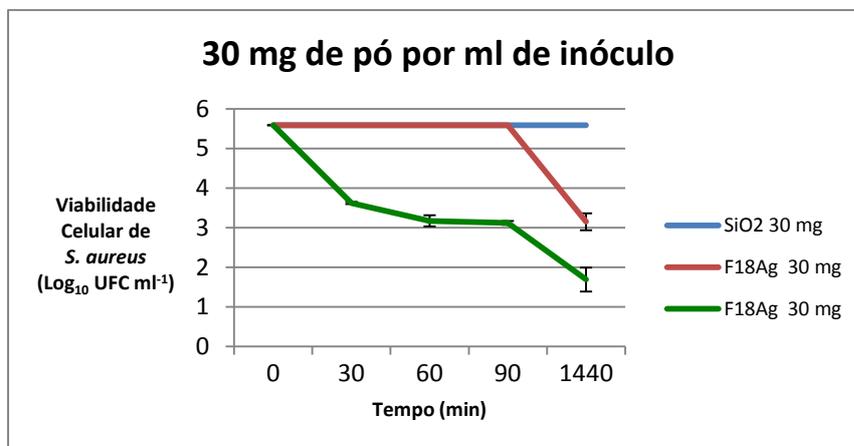
De acordo com o demonstrado pelo gráfico acima, após 24 horas de contato de 50 mg de pó de sílica e 1 ml de suspensão bacteriana de *S. aureus* sob agitação em shaker, não houve redução na viabilidade celular desses microrganismos. As partículas de sílica, nesse caso, não influenciaram o crescimento dos microrganismos e o número de UFC se manteve constante ao longo do tempo.

Já o F18 apresentou uma redução de 2,65 logs após 24 horas, sendo que a viabilidade da bactéria passou de 5,59 para 2,94 log<sub>10</sub> UFC ml<sup>-1</sup>. Esse resultado apresenta menor eficiência do que o encontrado nos ensaios que foram baseados na norma JIS Z 2801:2010 utilizando-se a mesma proporção de biovidro para volume de inóculo, onde após o mesmo tempo de contato, praticamente não eram encontradas células de *S. aureus* nas amostras.

O F18Ag foi o único material que possibilitou a redução total de microrganismos após 24 horas de contato, sendo que em 90 minutos, sua atividade bactericida foi similar à ação do F18 após 24 horas. Após 90 minutos de contato com o inóculo, o F18Ag proporcionou uma ação bactericida mais eficiente, chegando a zerar o número de UFC encontrado nas placas feitas a partir das amostras coletadas em 24 horas. O F18Ag apresentou redução de 5,59 logs na viabilidade celular do microrganismo.

A Figura 14 mostra o efeito bactericida de F18, F18Ag e Sílica na proporção de 30 mg de pó para cada ml de inóculo.

**Figura 14** - Valores da viabilidade celular de *S. aureus* encontrados no decorrer de diferentes períodos de contanto entre a suspensão bacteriana e 30 mg de F18, F18Ag ou sílica (controle).

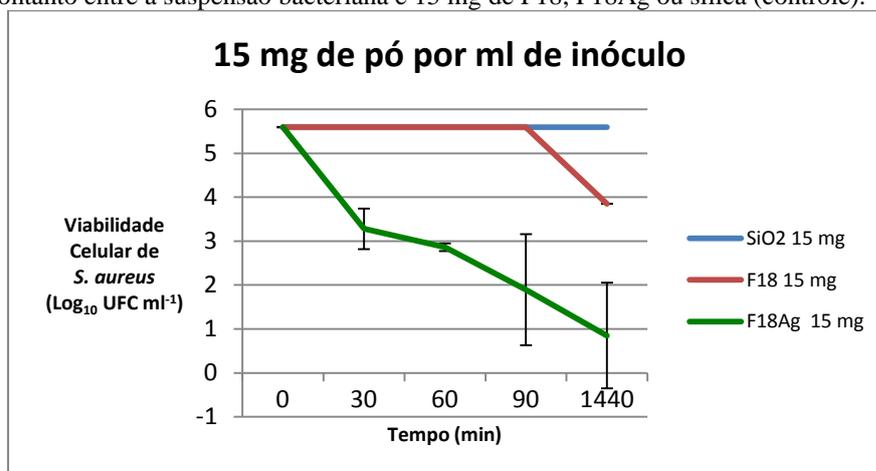


**Fonte:** Campanini, 2015.

Na condição da mistura do inóculo com 30 mg sílica, o resultado foi o mesmo para o obtido no gráfico anterior. Não houve alterações no número de UFC ml<sup>-1</sup> de *S. aureus* no decorrer do tempo de contato. O F18 apresentou uma redução de 2,44 logs, já que a viabilidade celular passou de 5,59 para 3,15 log<sub>10</sub> UFC ml<sup>-1</sup>. Essa redução é próxima do resultado que foi obtido quando colocou-se 50 mg desse pó em contato com o inóculo inicial. Já a atividade bactericida do F18Ag foi afetada negativamente quando houve a diminuição da proporção do biovidro na suspensão bacteriana. A redução máxima nessa condição testada de 3,9 log<sub>10</sub> UFC ml<sup>-1</sup>, como aponta a Figura 14.

Quando a quantidade em peso de pó dos materiais foi reduzida ainda mais, passando de 30 mg para 15 mg, os resultados obtidos de redução de microrganismos estão representados na Figura 15.

**Figura 15** - Valores da viabilidade celular de *S. aureus* encontrados no decorrer de diferentes períodos de contanto entre a suspensão bacteriana e 15 mg de F18, F18Ag ou sílica (controle).



**Fonte:** Campanini, 2015.

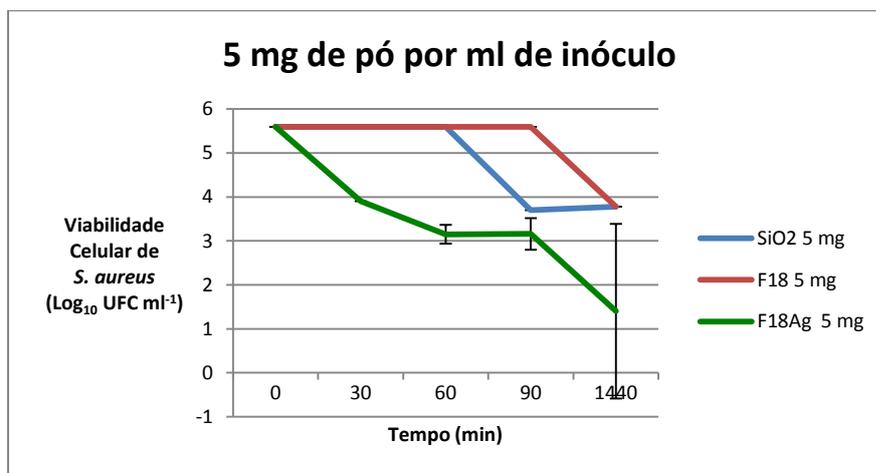
Na condição representada pela Figura 15, é possível observar-se que a sílica utilizada como controle, também manteve constante a viabilidade celular do inóculo no decorrer das 24 horas estabelecidas para o experimento.

Com a diminuição da concentração de F18 na mistura, obteve-se uma menor redução bacteriana, sendo que a viabilidade celular dos microrganismos passou de 5,59 para 3,84, ou seja, reduzindo 1,74  $\log_{10}$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ .

Para a condição de 15 mg de F18Ag para cada ml de inóculo, o valor de redução foi de 4,74 logs, sendo um pouco maior do que a redução de 3,9  $\log_{10}$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  apresentada por 30 mg desse mesmo pó. Porém, um ponto que deve ser observado nessa condição experimental é que o desvio padrão apresentado nas contagens das placas em 90 e 1440 minutos foi grande, dessa forma, não é possível afirmar que a redução foi diferente daquela obtida com 30 mg do inóculo.

Na condição de menor peso (5 mg) de biovidro por ml de inóculo, foram obtidos os resultados representados a seguir (Figura 16).

**Figura 16** - Valores da viabilidade celular de *S. aureus* encontrados no decorrer de diferentes períodos de contanto entre a suspensão bacteriana e 5 mg de F18, F18Ag ou sílica (controle).



**Fonte:** Campanini, 2015.

De acordo com o gráfico acima, pode-se observar que a sílica utilizada como controle provocou uma redução na viabilidade celular dos microrganismos após 90 minutos e 24 horas de contato com a suspensão. A máxima redução foi de 1,8 log, sendo equivalente à redução proporcionada pelo F18 nas mesmas condições. Esse resultado para a sílica não foi repetido em nenhum outro teste realizado nesse trabalho, sendo que a sílica foi um bom parâmetro como padrão de comparação em todos os outros ensaios, portanto esse fato pode ser atribuído a alguma interferência ao acaso que acarretou o erro experimental.

A quantidade de 5 mg de F18Ag apresentou uma redução de 4,18 logs após 24 horas de contato com o inóculo, porém, como no caso anterior, o desvio padrão obtido entre as contagens das placas foi muito alto e não se pode afirmar que essa redução foi significativamente maior ou menor do que os experimentos feitos com 30 mg e 15 mg desse material.

A concentração de biovidro que apresentou melhores resultados de eliminação de microrganismos foi 50 mg de pó por ml de suspensão bacteriana. Essa proporção ótima também foi a mesma utilizada nos ensaios realizados baseados na norma JIS, porém nestes ensaios cinéticos, o F18 apresentou um desempenho bactericida inferior ao demonstrado nos primeiros ensaios.

Para explicar essa diferença de resultado buscou-se encontrar as principais diferenças entre as metodologias dos dois experimentos. Nos corpos de prova utilizados para a JIS, o pó do biovidro foi disperso na superfície de placas de vidro inerte pelo método de pulverização, sendo que as partículas ficaram distribuídas sobre toda a superfície das placas, possibilitando grande contato com a suspensão. Já nos primeiros ensaios cinéticos, o pó do

biovidro foi colocado em tubos de ensaios, sendo que foi observado que o material ficava, em grande parte, depositado no fundo dos tubos. Além disso, nesse caso, os tubos também foram incubados em shaker enquanto na metodologia JIS, as amostras eram incubadas estaticamente em estufa. Para entender melhor essas diferentes condições, os resultados do experimento seguinte, realizado em frascos que possuíam uma área de base maior (erlenmeyers) e comparando-se a incubação com e sem agitação, puderam esclarecer algumas dessas questões.

Com relação a adição de prata aos vidros bioativos, Clupper e Hench (2001) observaram que esse composto não afetou a bioatividade do 45S5 e não interferiu no processo de fabricação do biomaterial, sendo que esse elemento metálico pode ser considerado viável para ser utilizado em casos de alta necessidade bactericida.

Lohbauer et al. (2005) não identificaram efeitos negativos de uma composição própria de biovidro dopado com prata sobre células epidérmicas humanas, demonstrando mais uma vez que esse material pode ser utilizado para finalidades médicas, como na cicatrização de feridas, sem prejuízo ao paciente.

Balamurugana et al. (2008) observaram que um determinado biovidro com prata apresentou atividade bactericida eficiente após 24 horas na proporção de 20 mg de material para cada ml de inóculo, porém não foi possível afirmar que o número de células bacterianas viáveis foi igual a zero. Os autores confirmaram também que esse mesmo biovidro sem a adição de prata não possuía atividade bactericida. Esse fato demonstra outra vantagem conferida do F18, que já possui alta eficiência bactericida em 24 horas e a adição de prata pode ser utilizada apenas para os casos que demandam maior urgência na eliminação de microrganismos.

Pratten et al. (2004) utilizaram um biovidro contendo 2% de  $Ag_2O$  e na forma de partículas menores que  $38 \mu m$  para recobrir linhas de sutura cirúrgica, e observaram que após três horas de contato com *S. epidermidis* o número da viabilidade celular do microrganismo havia diminuído para, aproximadamente 4 logs. Porém, em comparação ao F18Ag utilizado nesse trabalho, no mesmo período de tempo e com uma menor composição de prata, a eficiência do presente material foi maior, zerando as células viáveis no mesmo período de tempo se utilizado na proporção ótima (50mg/ml de inóculo).

### 5.3 ANÁLISE DA CINÉTICA DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO PÓ DO F18 E F18Ag EM COMPARAÇÃO AO PADRÃO BIOGLASS® 45S5 EM CONDIÇÃO DE INCUBAÇÃO COM E SEM AGITAÇÃO

#### 5.3.1 Incubação sob agitação durante 30 minutos

Ao analisar as amostras incubadas sob agitação constante em shaker e após 30 minutos de contato entre os diferentes materiais e a suspensão bacteriana, foi possível observar que houve redução estatisticamente significativa dos microrganismos em contato com F18Ag e 45S5 em comparação ao controle.

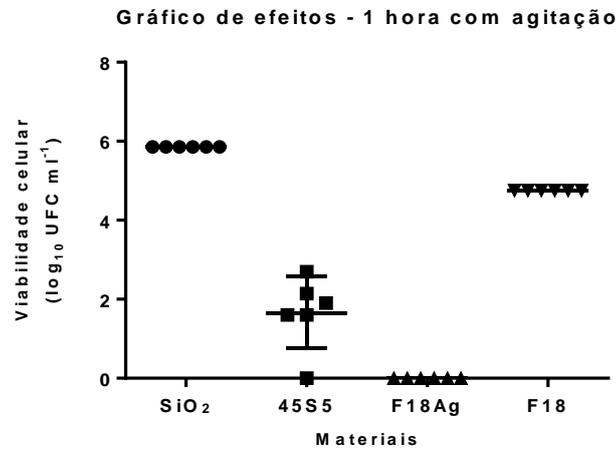
Os gráficos obtidos a partir do teste estatístico representam os valores de viabilidade celular encontrados nas contagens a partir de cada condição testada, e as barras representam a média e o desvio padrão de cada conjunto de dados. Os resultados detalhados de cada comparação feita entre os grupos de cada material, assim como o valor da probabilidade estatística de haver diferença entre eles ou não, representado pelo p-valor, encontram-se no Apêndice A deste trabalho.

Ao observar-se a Figura 17, percebe-se que o F18Ag foi o material que apresentou maior redução bacteriana, chegando a quase eliminar todas as células após 30 minutos, porém não se pode afirmar estatisticamente que a eficiência de redução deste biomaterial foi maior do que a do padrão 45S5.

Já o F18 não apresentou redução significativa quando comparado com SiO<sub>2</sub> e nem quando comparada ao 45S5, porém sua eficiência bactericida foi menor do que a apresentada pelo F18Ag, fato que confirma a potencialização antimicrobiana conferida pela prata.



**Figura 18** - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante uma hora de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* sob agitação.



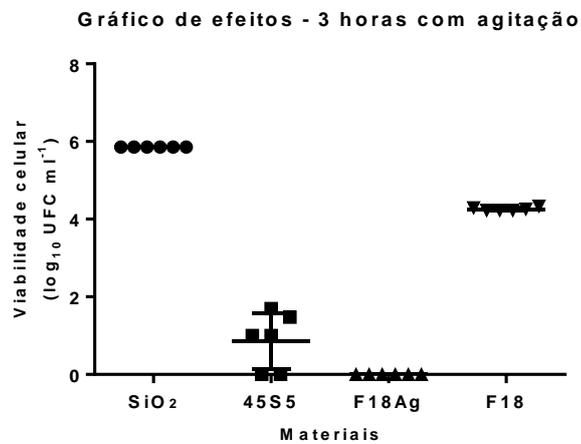
Cada figura geométrica representa um valor de contagem de colônias (UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) obtido no contato de *S. aureus* com os diferentes materiais. A maior barra horizontal apresentada em cada grupo de dados representa a média das contagens e as barras horizontais mais externas representam o desvio padrão entre os valores.

**Fonte:** Campanini, 2015.

### 5.3.3 Incubação sob agitação durante três horas

O principal efeito bactericida que se observa após três horas de incubação das amostras sob agitação é a contínua redução no número de células viáveis pelo 45S5, tendendo a zerar as colônias, como aconteceu com F18Ag em uma hora. Porém, como citado anteriormente, não é possível afirmar que há uma diferença significativa na ação desses dois materiais. O F18, por sua vez, ainda não se diferenciou estatisticamente do controle, mas, de acordo com o p-valor maior que 0,05 (Apêndice A), também não é possível afirmar que sua atividade apresenta diferença com o 45S5. Em três horas ainda há diferença entre a ação do F18Ag em relação ao F18, portanto ainda nesse tempo de contato a presença da prata aumentou a atividade bactericida.

**Figura 19** - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante três horas de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* sob agitação.



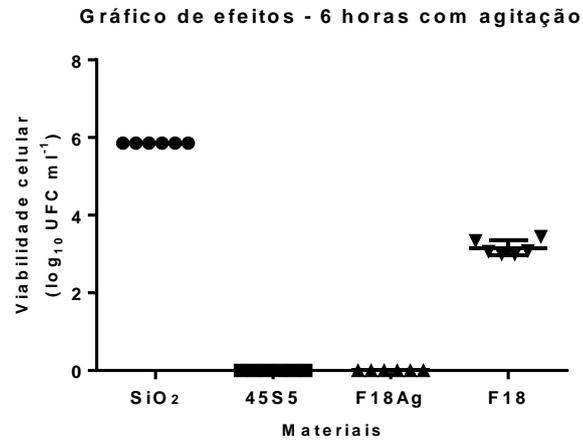
Cada figura geométrica representa um valor de contagem de colônias (UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) obtido no contato de *S. aureus* com os diferentes materiais. A maior barra horizontal apresentada em cada grupo de dados representa a média das contagens e as barras horizontais mais externas representam o desvio padrão entre os valores.

**Fonte:** Campanini, 2015.

#### 5.3.4 Incubação sob agitação durante seis horas

Após seis horas sob agitação, a atividade bactericida do F18 ainda não pode ser considerada diferente do que a do controle, porém como houve uma redução no número de células viáveis em comparação aos tempos anteriores, a atividade do F18 pode ser considerada, neste ponto, similar àquela apresentada pelo F18Ag. Este fato indica que a prata é importante para o aumento da eficiência bactericida nas primeiras horas de contato com os microrganismos, porém a partir de um determinado ponto, possivelmente após 6 horas, sua presença deixa de causar diferença na ação dos materiais. Neste tempo também não foram mais encontradas colônias nas contagens referentes ao contato com o 45S5 (Figura 20).

**Figura 20** - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante seis horas de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* sob agitação.



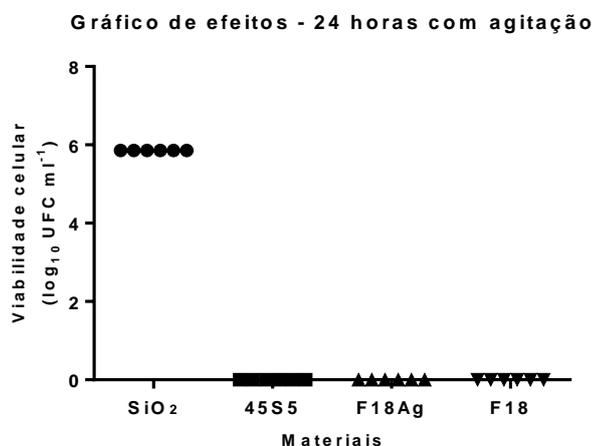
Cada figura geométrica representa um valor de contagem de colônias (UFC ml<sup>-1</sup>) obtido no contato de *S. aureus* com os diferentes materiais. A maior barra horizontal apresentada em cada grupo de dados representa a média das contagens e as barras horizontais mais externas representam o desvio padrão entre os valores.

**Fonte:** Campanini, 2015.

### 5.3.5 Incubação sob agitação durante 24 horas

Após 24 horas de contato com a suspensão bacteriana todos os materiais testados, exceto o controle, não apresentaram diferença de ação bactericida entre si. Não foram encontradas colônias em nenhuma das placas obtidas a partir dessas amostras. Possivelmente, após seis horas de contato com os microrganismos sob agitação é que se inicia a alta atividade antimicrobiana do F18, sendo possível a eliminação das bactérias em 24 horas e resultando em diferença de ação em relação ao controle (Figura 21). Essa evidência corrobora com os resultados encontrados nos ensaios baseados na norma JIS Z 2801:2010, onde após 24 horas de contato entre o F18 e microrganismos, não havia mais células viáveis.

**Figura 21** - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante 24 horas de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* sob agitação.



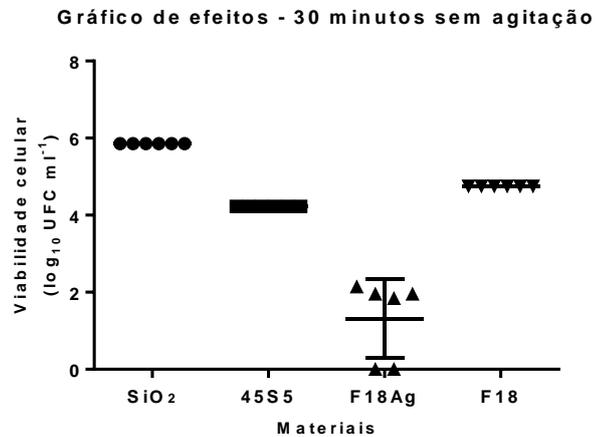
Cada figura geométrica representa um valor de contagem de colônias (UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) obtido no contato de *S. aureus* com os diferentes materiais. A maior barra horizontal apresentada em cada grupo de dados representa a média das contagens e as barras horizontais mais externas representam o desvio padrão entre os valores.

**Fonte:** Campanini, 2015.

### 5.3.6 Incubação estática durante 30 minutos

Para as amostras que foram incubadas sem agitação e durante 30 minutos, os resultados de ação bactericida entre os materiais foram similares àqueles encontrados na condição de agitação para o mesmo tempo. O 45S5 e o F18Ag se diferenciaram do controle pela redução bacteriana, porém o F18 não apresentou distinção, se diferenciando apenas do F18Ag, o que demonstra que a adição de prata foi responsável por essa diferença (Figura 22). Apesar da redução causada pelo F18Ag ser aparentemente maior do que àquela causada pelo 45S5 (Figura 22), o teste estatístico demonstra que os valores não são significativamente diferentes (Apêndice A).

**Figura 22** - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante 30 minutos de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* sem agitação.



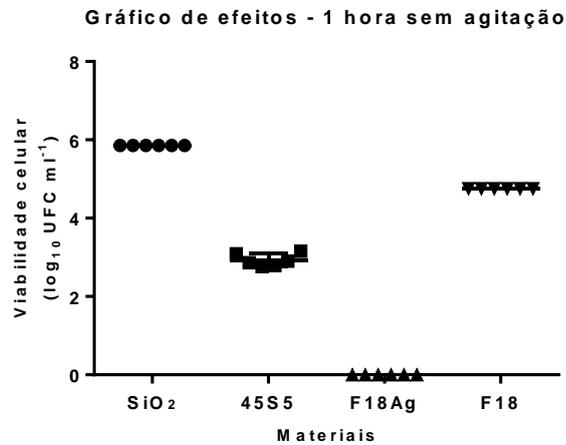
Cada figura geométrica representa um valor de contagem de colônias (UFC ml<sup>-1</sup>) obtido no contato de *S. aureus* com os diferentes materiais. A maior barra horizontal apresentada em cada grupo de dados representa a média das contagens e as barras horizontais mais externas representam o desvio padrão entre os valores.

**Fonte:** Campanini, 2015.

### 5.3.7 Incubação estática durante uma hora

Os resultados também são similares ao apresentado na condição de agitação. Na incubação estática não foram encontradas colônias bacterianas nas placas obtidas a partir do F18Ag (Figura 23), porém sua atividade não difere estatisticamente daquela apresentada pelo 45S5. O F18 não apresentou redução significativa em comparação ao controle.

**Figura 23** - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante uma hora de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* sem agitação.



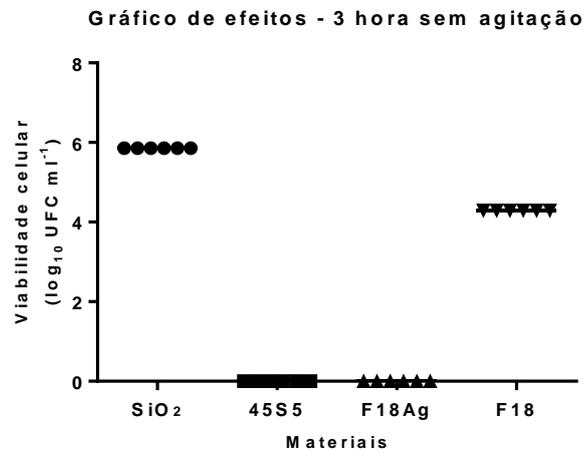
Cada figura geométrica representa um valor de contagem de colônias (UFC ml<sup>-1</sup>) obtido no contato de *S. aureus* com os diferentes materiais. A maior barra horizontal apresentada em cada grupo de dados representa a média das contagens e as barras horizontais mais externas representam o desvio padrão entre os valores.

**Fonte:** Campanini, 2015.

### 5.3.8 Incubação estática durante três horas

No contato estático de três horas entre microrganismos e os diferentes materiais, é possível observar que a diferença de ação bactericida entre F18 e F18Ag já não é mais significativa. O 45S5, nesse tempo, eliminou todas as colônias presentes nas placas, da mesma forma que o F18Ag o fez em uma hora, apesar dessa diferença, suas ações ainda foram consideradas similares, como demonstrado estatisticamente. A redução proporcionada pelo F18 ainda não se diferenciou do controle.

**Figura 24** - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante três horas de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* sem agitação.



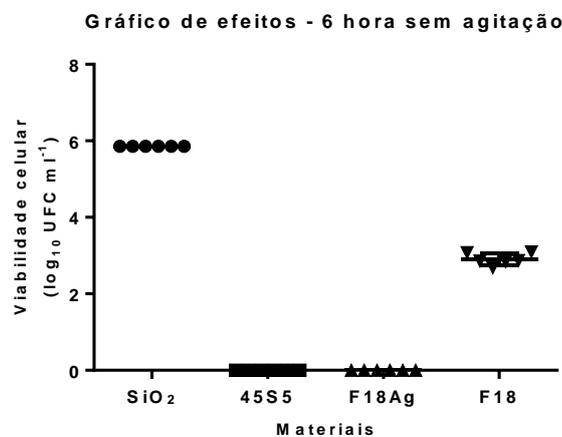
Cada figura geométrica representa um valor de contagem de colônias (UFC ml<sup>-1</sup>) obtido no contato de *S. aureus* com os diferentes materiais. A maior barra horizontal apresentada em cada grupo de dados representa a média das contagens e as barras horizontais mais externas representam o desvio padrão entre os valores.

**Fonte:** Campanini, 2015.

### 5.3.9 Incubação estática durante seis horas

Neste ponto das análises sob incubação estática, as evidências de comparação entre as atividades bactericidas dos materiais são as mesmas do que no tempo anterior (Figuras 24 e 25).

**Figura 25** - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante seis horas de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* sem agitação.



Cada figura geométrica representa um valor de contagem de colônias (UFC ml<sup>-1</sup>) obtido no contato de *S. aureus* com os diferentes materiais. A maior barra horizontal apresentada em cada grupo de dados representa a média das contagens e as barras horizontais mais externas representam o desvio padrão entre os valores.

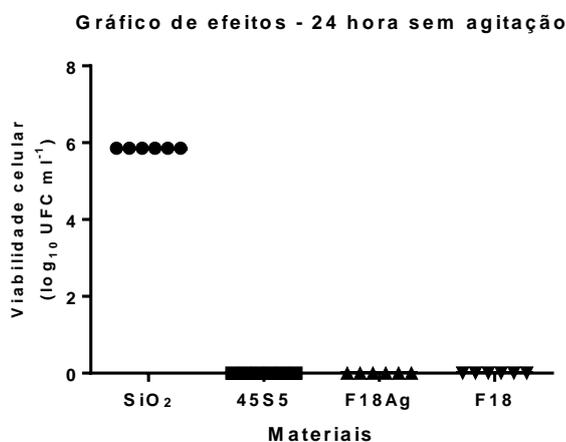
**Fonte:** Campanini, 2015.

### 5.3.10 Incubação estática durante 24 horas

Após 24 horas de incubação estática, a atividade bactericida do F18, F18Ag e 45S5 foram iguais, sendo que todos os materiais eliminaram todas as colônias bacterianas (Figura 26). Este resultado também está de acordo com o observado nos ensaios baseados na norma JIS Z 2801:2010 para o F18.

Dessa forma, é possível inferir que a distribuição das partículas de biovidro pode interferir na eficiência bactericida do pó em contato com a suspensão bacteriana. De forma que quanto mais dispersas e distribuídas as partículas estiverem maior será a ação bactericida em 24 horas, como demonstrado pela metodologia JIS e pelo último ensaio cinético feito em erlenmeyers. E quanto mais aglomeradas as partículas estiverem menor será a ação bactericida em 24 horas, como demonstrado pelo primeiro ensaio cinético onde o pó acumulava no fundo dos tubos de ensaio.

**Figura 26** - Gráfico de efeito da atividade bactericida dos diferentes materiais durante 24 horas de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* sem agitação.



Cada figura geométrica representa um valor de contagem de colônias (UFC ml<sup>-1</sup>) obtido no contato de *S. aureus* com os diferentes materiais. A maior barra horizontal apresentada em cada grupo de dados representa a média das contagens e as barras horizontais mais externas representam o desvio padrão entre os valores.

**Fonte:** Campanini, 2015.

### 5.3.11 Variação na forma de incubação

A partir da aplicação do teste estatístico Mann-Whitney para comparar cada grupo de materiais em tempos fixos, variando-se apenas a forma de incubação, foi possível

observar que não houve diferença significativa nos resultados apresentados ( $p$ -valor  $> 0,05$ ). Apenas o material 45S5 no tempo de uma hora de incubação com agitação apresentou redução bacteriana significativamente diferente da condição de incubação estática ( $p$ -valor  $< 0,05$ ), sendo que foi observada uma viabilidade celular razoavelmente maior nas amostras incubadas em estufa do que naquelas incubadas em shaker.

Com base nas informações obtidas, pode-se perceber que, devido a ampla possibilidade de manuseio para produção de diferentes formas como descrito na revisão bibliográfica, o F18 pode apresentar um amplo campo de aplicação em locais e situações que demandem de efeito bactericida e bioatividade. O pó pode ser utilizado para recobrimento de implantes, aplicação em cremes e pomadas, produção de biocompósitos, dentre outras utilidades. Enquanto as fibras podem compor as mantas que podem ser usadas como curativos e podem dar origem a diferentes formatos, auxiliando no desenvolvimento de produtos para pesquisas no campo de engenharia tecidual.

Em casos de urgência na eliminação de microrganismos, o uso da prata aliado ao F18 pode ser considerado como uma solução interessante, com base nos resultados de redução bacteriana apresentados na presente pesquisa. Também é necessário ressaltar que a avaliação dos efeitos ambientais causados pelo uso e produção de materiais com prata é um fator importante a ser levado em consideração no momento da decisão pelo uso dessa tecnologia. Diversos trabalhos demonstram preocupação com o tema e citam que diferentes quantidades de prata podem ser transmitidas para o meio ambiente tanto na fase de produção quanto de utilização dos produtos que contém esse metal, e que a acumulação de prata pode levar a prejuízos ambientais (FABREGA et al., 2011; WIJNHOFEN et al., 2009; JONES E HOEK, 2010).

Para a expansão dos conhecimentos sobre as propriedades desse biomaterial, devem ser realizadas novas pesquisas em busca da identificação das alterações provocadas pelo biovidro F18 na célula bacteriana e no contato com as células humanas.

## 6 Conclusão

---

A partir dos resultados obtidos com a realização dos experimentos baseados na norma JIS Z 2801:2010 com o pó e manta de fibras do biovidro F18, pode-se afirmar que esse material apresentou uma eficiente atividade bactericida contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, eliminando as células viáveis após o tempo de contato de 24 horas. Ambas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram igualmente sensíveis ao contato de 24 horas com o F18, tanto na forma de pó quanto de manta.

Por meio da comparação dos dois ensaios cinéticos realizados, nota-se que a dispersão e a distribuição das partículas de biovidro parecem interferir na eficiência da atividade bactericida do material, sendo que quanto mais distribuídas e dispersas as partículas estiverem, portanto, menos aglomeradas, maior será a redução bacteriana.

Observa-se que a eliminação de células bacterianas viáveis pelo F18Ag, inicia-se rapidamente, logo nos primeiros 30 minutos de contato. Porém, com o conjunto de dados apresentado pelo estudo, não se pode afirmar que a ação bactericida desse material difere significativamente daquela proporcionada pelo 45S5 em um mesmo período de tempo.

Por outro lado, de acordo com o teste estatístico aplicado, a atividade bactericida do F18 também não pode ser considerada significativa diferente do 45S5, sendo que este primeiro material apresenta a vantagem de confecção de fibras, o que não é possível com o 45S5, por exemplo, fato que aumenta as possibilidades de aplicações do F18.

Portanto, apesar de existir diferença significativa de ação bactericida entre o F18 e F18Ag, ambos não possuem essa diferença em comparação ao 45S5 que é o padrão atual do mercado, ou seja, são igualmente eficientes ao padrão nas condições estipuladas.

A adição de prata ao F18 aumentou a atividade bactericida desse material, sendo que o efeito desse íon metálico foi eficiente na eliminação de microrganismos logo nos primeiros tempos de contato, porém após três horas, ambos os materiais desempenharam a mesma ação. É possível concluir também, de acordo com o último ensaio cinético, que a atividade bactericida do F18 inicia-se após seis horas de contato com os microrganismos. A forma de incubação das misturas formadas por biovidro e suspensão bacteriana ao longo do tempo não influenciou significativamente a ação dos materiais.

## 7 Referências Bibliográficas

---

ABIMO. **Nova norma padroniza esterilização de implantes odontológicos**. Associação Brasileira da Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos, Odontológicos, Hospitalares e de Laboratório. Disponível em:

<<http://www.abimo.org.br/modules/news/article.php?storyid=95>>. Acesso em: 20 mai. 2013.

ABO - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ODONTOLOGIA. Programa de Pós-graduação Abre Espaço para Cirurgiões-dentistas. **Associação Brasileira de Odontologia (ABO)**, 2009. Disponível em: <<http://www.abo.org.br/revista/80/materia-6.php>>. Acesso em: 28 nov. 2014.

AGRAWAL, C. M.; RAY, R. B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 55, p. 141–150, 2001.

ALLAN, I.; NEWMAN, H.; WILSON, M. Antibacterial Activity of Particulate Bioglass® Against Supra and Subgingival Bacteria. **Biomaterials**, v. 22, n. 15, p. 1683-1687, jun. 2001.

ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas bioativas – estado da arte. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 100-104, 2006.

ASPENBERG, P.; VAN-DER-VIS, H. Fluid Pressure May Cause Periprosthetic Osteolysis. Particles are not the Only Thing. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 69, n. 1, p. 1-4, 1998.

AZAD, A. K.; SERMSINTHAM, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W. F. Chitosan Membrane as a Wound-Healing Dressing: Characterization and Clinical Application. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. v. 69 B, n. 02, p. 216-222, 2004.

BALAMURUGANA, A.; BALOSSIER, G.; LAURENT-MAQUINC, D.; PINA, S.; REBELO, A. H. S.; FAURE, J.; FERREIRA, J. M. F. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. **Dental Materials**. v. 24, p.1343-1351, 2008.

BELLANTONE, M.; WILLIAMS, H. D.; HENCH, L. L. Broad-Spectrum Bactericidal Activity of Ag<sub>2</sub>O-Doped Bioactive Glass. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 06, p. 1940-1945, jun. 2002.

BERGER, T. J.; SPADARO, J. A.; CHAPIN, S. E.; BECKER, R. O. Electrically Generated Silver Ions: Quantitative Effects on Bacterial and Mammalian Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 9, n. 2, p. 357-358, fev. 1976.

BI, Y.; SEABOLD, J. M.; KAAR, S. G.; RAGAB, A. A.; GOLDBERG, V. M.; ANDERSON, J. M.; GREENFIELD, E. M. Adherent Endotoxin on Orthopedic Wear Particles Stimulates Cytokine Production and Osteoclast Differentiation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 11, p. 2082-2091, 2001.

BLAKER, J. J.; NAZHATB, S. N.; BOCCACCINI, A. R. Development and Characterisation of Silver-Doped Bioactive Glasscoated Sutures for Tissue Engineering and Wound Healing Applications. **Biomaterials**, v. 46, n. 06, p. 1940-1945, jun. 2004.

BÔAS, P. J. F. V.; RUIZ, T. Ocorrência de Infecção Hospitalar em Idosos Internados em Hospital Universitário. **Revista de Saúde Pública**. v. 38, n. 03, p.372-378, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Brasília, 2013. 82 p.

BRINK, M; KARLSSON, K; YLI-URPO, A. **Bioactive Glasses and Their Use**. U.S. Patent n. 6054400, 11 jul. 1997, 25 abr. 2000.

BROUGHTON, G.; JANIS, J.; ATTINGER, C. Wound Healing: An Overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 117, n. 07, p. 01-32, 2006.

CAREK, P. J.; DICKERSON, L. M.; SACK, J. L. Diagnosis and management of osteomyelitis. **American Family Physician**, v. 84, n. 09, p. 2413–2420, nov. 2001.

JONES, C. M.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **J nanopart res**. V. 12, p. 1531-1551, 2010.

CHEN, W.; LIU, Y.; COURTNEY, H. S.; BETTENG, M.; AGRAWAL, C. M.; BUMGARDNER, J. D.; ONG, J. L. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. **Biomaterials**. v. 27, p. 5512-5517, 2006.

CHINAGLIA, C. R. **Uso de um Vidro Altamente Bioativo para Conferir Bioatividade à Superfície do Titânio** - Desenvolvimento de um Método para Recobrimentos Descontínuos. 2013. 162 p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

CLUPPER, D. C.; HENCH, L. L. Bioactive Response of Ag-Doped Tape Cast Bioglass 45S5 Following Heat Treatment. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, p. 917-921, jan. 2001.

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.

DAY, R. M. Bioactive Glass Stimulates the Secretion of Angiogenic Growth Factors and Angiogenesis in Vitro. **Tissue Engineering**, v. 11, p. 768-777, 2005.

DIBROV, P.; DZIOBA, J.; GOSINK, K. K.; HÄSE, C. C. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 08, p. 2668-2670, 2002.

ERCOLE, F. F.; CHIANCA, T. C. M. Infecção de Sítio Cirúrgico em Pacientes Submetidos a Artroplastias de Quadril. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 10, n. 02, p. 157-165, mar. – abr. 2002.

EROAN, L.J.; PASSOS, S.; Early Discharge of Infected Patients Through Appropriate Antibiotic Use. **Archives of Internal Medicine**, v. 161, p. 61-65, 2001.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, MARYLAND. National Institutes of Health Consensus Statement. **Clinical Applications of Biomaterials**. Maryland, nov. 1982. 19 p.

FABREGA, J.; LUOMA, S. N.; TYLER, C. R.; GALLOWAY, T. S.; LEAD, J. R. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment International**. V. 37, p. 517-531, 2011.

FENG, Q. L.; KIM, T. N.; WU, J.; PARK, E. S.; KIM, J. O.; LIM, D. Y.; CUI, F. Z. Antibacterial effects of Ag-HAp thin films on alumina substrates. **Thin Solid Films**. V. 335, p. 214-219, 1998.

FENG, Q.L.; WU, J.; CHEN, G.Q.; CUI, F.Z.; KIM, T.N.; KIM, J.O. A mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 04, p. 662-668, dez. 2000.

GATTI, A. M.; YAMAMURO, T.; HENCH, L. L.; ANDERSSON, O. H.; *In Vivo* Reactions in Some Bioactive Glasses and Ceramics Granules. **Cells and Materials**, v. 03, n. 03, p. 283-291, 1993.

GOODMAN, S. B. The Effects of Micromotion and Particulate Materials on Tissue Differentiation. Bone Chamber Studies. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 258, p. 1-43, 1994.

GORRITI, M. F.; LÓPEZ, J. M. P.; BOCCACCINI, A. R.; AUDISIO, C.; GORUSTOVICH, A. A. In Vitro Study of the Antibacterial Activity of Bioactive Glass-Ceramic Scaffolds. **Advanced Engineering Materials**, v. 11, p. B67-B70, jun. 2009.

HAAS, D. W.; MCANDREW, M. P. Bacterial Osteomyelitis in Adults: Evolving Considerations in Diagnosis and Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 101, n. 05, p. 550-561, nov. 1996.

HENCH, L. L. Biomaterials. **Science**, v. 208, n. 4446, p. 826-831, mai. 1980.

HENCH, L. L. Genetic design of bioactive glass. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, p. 1257-1265, 2009.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 195, n. 1014, p. 1014-1017, fev. 2002.

HENCH, L. L.; WEST, J. K. Biological Application of Bioactive Glasses. **Life Chemistry Reports**, v. 13, p. 187-241, 1996.

HENCH, L. L.; WILSON, J. Surface-Active Biomaterials. **Science**, v. 226, n. 4675, p. 630-636, nov. 1984.

HENCH, L.L. The Story of Bioglass. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 17, p. 467-978, 2006.

HU, S.; CHANG, J.; LIU, M.; NING, C. Study on Antibacterial Effect of 45S5 Bioglass. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p. 281–286, 2009.

HUEBSCH, N.; MOONEY, D. J. Inspiration and Application in the Evolution of Biomaterials. **Nature**, v. 462, p. 426-432, nov. 2009.

HUKINS, D. W. L.; LEAHY, J. C.; MATHIAS, K. J. Biomaterials: defining the mechanical properties of natural tissues and selection of replacement materials. **Journal of Materials Chemistry Feature Articles**, n. 09, p. 629-636, 1999.

HUTMACHER, D.; HÜRZELER, M. B.; SCHLIEPHAKE, H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymer for GTR and GBR applications. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. v. 11, n. 05, p. 667–678, 1996.

INDUSTRY EXPERTS. Orthopedic Implants - A Global Market Overview. **Industry Experts - Redefines Business Acumen**, 2011. Disponível em: <<http://industry-experts.com/verticals/healthcare/orthopedic-implants-a-global-market-overview.html>>. Acesso em: 20 mai. 2013.

ISHIHARAA, M.; NAKANISHI, K.; ONO, K.; SATO, M.; KIKUCHI, M.; SAITO, Y.; YURA, H.; MATSUI, T.; HATTORI, H.; UENOYAMA, M.; KURITA, A. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. **Biomaterials**. v. 23, p. 833-840, 2002.

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

JELL, G.; STEVENS, M. M. Gene activation by bioactive glasses. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, p. 997–1002, 2006.

KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J. H.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; KIM, S. H.; PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; HWANG, C. Y.; KIM, Y. K.; LEE, Y. S.; JEONG, D. H.; CHO, M.H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v. 03, n. 01, p. 95-101, 2007.

LOHBAUER, U.; JELL, G.; SARAVANAPAVAN, P.; JONES, J. R.; HENCH, L. L. Indirect Cytotoxicity Evaluation of Silver Doped Bioglass Ag-S70C30 on Human Primary Keratinocytes. **Key Engineering Materials**. v. 284 e 286, p. 431-434, 2005.

LEONI, G.; NEUMANN, P. A.; SUMAGIN, R.; DENNING, T. L.; NUSRAT, A. Wound repair: role of immune–epithelial interactions. **Mucosal Immunology**. Advance online publication, p. 01-10, 15 julho 2015. doi:10.1038/mi.2015.63. Disponível em <<http://www.nature.com/mi/journal/vaop/ncurrent/full/mi201563a.html>> Acesso em 20 julho 2015.

LEW, D. P.; WALDVOGEL, F. A. Osteomyelitis. **Lancet**, v. 364, n. 9431, p. 369–379, jul. 2004.

LINDER, L. Implant Stability, Histology, RSA and Wear - More Critical Questions are Needed. A view point. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 65, n. 6, p. 654-658, 1994.

MACKOWIAK, P. A.; JONES, S. R.; SMITH, J. W.; Diagnostic Value of Sinus-Tract Cultures in Chronic Osteomyelitis. **The Journal of the American Medical Association**, v. 239, n. 26, p. 2772-2775, jun. 1978.

MARTINS, C. H. G.; CARVALHO, T. C.; SOUZA, M. G. M.; RAVAGNANI, C.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D. Assessment of Antimicrobial Effect of Biosilicate® Against Anaerobic, Microaerophilic and Facultative Anaerobic Microorganisms. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 06, p. 1439-1446, 2011.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346-2356, out. 2005.

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society Interface**. v. 05, n. 27, p. 1137-1158, 2008.

NEU, H. C. The Crisis in Antibiotic Resistance. **Science**. V. 257, p. 1064-1073, 1992.

OH, I.; HARRIS, W. H. Proximal Strain Distribution in the Loaded Femur. An In Vitro Comparison of the Distributions in the Intact Femur and After Insertion of Different Hip-Replacement Femoral Components. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 60, n. 1, p. 75-85, jan. 1978.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials – An Introduction**. 3 ed. New York: Springer, 2007. 564 p.

PEERSMAN, G.; LASKIN, R.; DAVIS, J.; PETERSON, M. INFECTION IN TOTAL KNEE REPLACEMENT: A Retrospective Review of 6489 Total Knee Replacements. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v. 392, p. 15-23, 2001.

PRATTEN, J.; NAZHAT, S. N.; BLAKER, J. J.; BOCCACCINI, A. R. In Vitro Attachment of Staphylococcus epidermidis to Surgical Sutures with and without Ag-containing Bioactive Glass Coating. **Journal Of Biomaterials Applications**. v. 19, p. 47-57, 2004.

PRAWEL, D. A. **A Drug Eluting, Osseointegrative Phospholipid Coating for Orthopedic Implants**. 2011. Tese de Doutorado, Colorado State University, Fort Collins, 2011, 291 p.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMANS, J. E. **Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine**. 2 ed. San Diego: Elsevier Academic press, 2004. 864 p.

RAVAGNANI, C. **Biosilicato para Promoção da Saúde Oral**. 2003. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

RECTENWALD, J. E.; MINTER, R. M; ROSENBERG, J. J.; GAINES, G. C; LEE, S. ; MOLDAWER, L. L. Bioglass® attenuates a proinflammatory response in mouse peritoneal endotoxemia. **Shock**, v. 17, n. 2, p. 135-138, 2002.

RIVADENEIRA, J.; AUDISIO, M. C.; BOCCACCINI, A. R.; GORUSTOVICH, A. A. In Vitro Antistaphylococcal effects of a novel 45S5 Bioglass/Agar-Gelatin Biocomposite Films. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 02, p. 604-612, ago. 2013.

SIQUEIRA, R.L.; ZANOTTO, E.D. Biosilicato<sup>®</sup>: Histórico de uma Vitrocerâmica Brasileira de Elevada Bioatividade", **Química Nova**, v. 34, n. 07, p. 1231-1241, 2011.

SKOGLUND, B.; LARSSON, L.; ASPENBERG, P. A. Bone-Resorptive Effects of Endotoxin-Contaminated High-Density Polyethylene Particles Spontaneously Eliminated In Vivo. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 84, n. 5, p. 767-773, 2002.

SOUNDRAPANDIAN, C.; DATTA, S.; SA, B. Drug-eluting implants for osteomyelitis. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 24, n. 6, p. 493-545, 2007.

SOUZA, M. T. **Desenvolvimento de Manta Flexível Altamente Bioativa**. 2011. 150 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

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. 161-165, jan. 1998.

SUNDFELDT, M.; CARLSSON, L. V.; JOHANSSON, C. B.; THOMSEN, P.; GRETZER, C. Aseptic Loosening, not Only a Question of Wear: a Review of Different Theories. **Acta Orthopaedica**, v. 77, n. 02, p. 177-197, abr. 2006.

TADEU, A. F.; FERNANDES, M. L. V.; RIBEIRO, N. F. **Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

THOMAS, M. V.; PULEO, D. A.; AL-SABBAGH, M. Bioactive Glass Three Decades On. **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**, v. 16, n. 06, p. 585-597, 2005.

TZEKAO, C.; JYHDING, S.; MIN, Y.; HSU, T. C.; CHOU, M. Y.; HUANG, T. H. The cytotoxicity of orthodontic metal bracket immersion media. **European Journal of Orthodontics**. v. 29, p. 198-203, 2007.

UNIVERSITY OF ABERDEEN. Department of Orthopaedic Surgery. **Osteoarthritis and Osteoporosis**. Disponível em: <<http://www.abdn.ac.uk/ims/research/musculoskeletal/osteoarthritis-and-osteoporosis-1184.php>>. Acesso em: 28 nov. 2014.

WARNAWIN, E.; BURAKOWSKI, T.; GAJEWSKI, M.; RADZIKOWSKA, A.; KORNATKA, A.; MICHALAK, C.; MALDYK, P.; MAOELINSKI, S.; MAOELINSKI, W. Preservation of Chondrogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Osteoarthritic Patients During Proliferation in Response to Platelet-Derived Growth Factor (PDGF). **Central European Journal of Immunology**. v. 30, p. 26–31, 2005.

WHITEHOUSE, J. D.; FRIEDMAN, N. D.; KIRKLAND, K. B.; RICHARDSON, W. J.; SEXTON, D. J. 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. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 23, n. 04, p. 183-189, abr. 2002.

WIJNHOVEN, S. W. P.; W. J. G. M. PEIJNENBURG.; HERBERTS, C. A.; HAGENS, W. I.; OOMEN, A. G.; HEUGENS, E. H. W.; ROSZEK, B.; BISSCHOPS, J.; GOSENS, I.; MEENT, D. V. D.; DEKKERS, S.; JONG, W. H. D.; ZIJVERDEN, M. V.; SIPS, A. J. A. M.; GEERTSMA, R. E. Nano-silver a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. **Nanotoxicology**. V. 03, p.109-138, 2009.

WILLIAMS, D.F. **Williams dictionary of biomaterials**. 1 ed. Liverpool: Liverpool University Press, 1999. 343 p.

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

YH, L.; WS, H.; WY, C.; TH, K.; JH, L. Silver-based wound dressings reduce bacterial burden and promote wound healing. **International Wound Journal – Online**. 4 junho 2015. doi:10.1111/iwj.12467.

Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iwj.12467/abstract>> Acesso em 20 julho 2015.

ZIMMERLI, W. Infection and Musculoskeletal Conditions: Prosthetic Joint Associated Infections. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. v. 20, n. 06, p. 1045-1063, 2006.

**APÊNDICE A – COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS ENTRE OS MATERIAIS AVALIADOS NO ENSAIO DE CINÉTICA DE ATIVIDADE BACTERICIDA**

**Tabela I** – Comparação entre a atividade bactericida dos materiais testados após 30 minutos de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* em incubação sob agitação.

<b>Comparações Múltiplas (Teste de Dunn)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Significativo?</b>
45S5 vs. SiO <sub>2</sub>	0,0166	Sim
F18Ag vs. SiO <sub>2</sub>	< 0,0001	Sim
F18 vs. SiO <sub>2</sub>	0,8080	Não
F18Ag vs. 45S5	0,8080	Não
F18 vs. 45S5	0,8080	Não
F18 vs. F18Ag	0,0166	Sim

Fonte: Campanini, 2015.

**Tabela II** – Comparação entre a atividade bactericida dos materiais testados após 60 minutos de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* em incubação sob agitação.

<b>Comparações Múltiplas (Teste de Dunn)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Significativo?</b>
45S5 vs. SiO <sub>2</sub>	0,0098	Sim
F18Ag vs. SiO <sub>2</sub>	< 0,0001	Sim
F18 vs. SiO <sub>2</sub>	0,7832	Não
F18Ag vs. 45S5	> 0,9999	Não
F18 vs. 45S5	0,6085	Não
F18 vs. F18Ag	0,0225	Sim

Fonte: Campanini, 2015.

**Tabela III** – Comparação entre a atividade bactericida dos materiais testados após três horas de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* em incubação sob agitação.

<b>Comparações Múltiplas (Teste de Dunn)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Significativo?</b>
45S5 vs. SiO <sub>2</sub>	0,0064	Sim
F18Ag vs. SiO <sub>2</sub>	0,0001	Sim
F18 vs. SiO <sub>2</sub>	0,7847	Não
F18Ag vs. 45S5	> 0,9999	Não
F18 vs. 45S5	0,4676	Não
F18 vs. F18Ag	0,0336	Sim

Fonte: Campanini, 2015.

**Tabela IV** – Comparação entre a atividade bactericida dos materiais testados após seis horas de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* em incubação sob agitação.

<b>Comparações Múltiplas (Teste de Dunn)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Significativo?</b>
45S5 vs. SiO <sub>2</sub>	0,0004	Sim
F18Ag vs. SiO <sub>2</sub>	0,0004	Sim
F18 vs. SiO <sub>2</sub>	0,6786	Não
F18Ag vs. 45S5	> 0,9999	Não
F18 vs. 45S5	0,1048	Não
F18 vs. F18Ag	0,1048	Não

Fonte: Campanini, 2015.

**Tabela V** – Comparação entre a atividade bactericida dos materiais testados após 24 horas de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* em incubação sob agitação.

<b>Comparações Múltiplas (Teste de Dunn)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Significativo?</b>
45S5 vs. SiO <sub>2</sub>	0,0005	Sim
F18Ag vs. SiO <sub>2</sub>	0,0005	Sim
F18 vs. SiO <sub>2</sub>	0,0005	Sim
F18Ag vs. 45S5	> 0,9999	Não
F18 vs. 45S5	> 0,9999	Não
F18 vs. F18Ag	> 0,9999	Não

Fonte: Campanini, 2015.

**Tabela VI** – Comparação entre a atividade bactericida dos materiais testados após 30 minutos de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* em incubação sem agitação.

<b>Comparações Múltiplas (Teste de Dunn)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Significativo?</b>
45S5 vs. SiO <sub>2</sub>	0,0157	Sim
F18Ag vs. SiO <sub>2</sub>	< 0,0001	Sim
F18 vs. SiO <sub>2</sub>	0,7938	Não
F18Ag vs. 45S5	0,7938	Não
F18 vs. 45S5	0,7938	Não
F18 vs. F18Ag	0,0157	Sim

Fonte: Campanini, 2015.

**Tabela VII** – Comparação entre a atividade bactericida dos materiais testados após 60 minutos de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* em incubação sem agitação.

<b>Comparações Múltiplas (Teste de Dunn)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Significativo?</b>
45S5 vs. SiO <sub>2</sub>	0,0157	Sim
F18Ag vs. SiO <sub>2</sub>	< 0,0001	Sim
F18 vs. SiO <sub>2</sub>	0,7948	Não
F18Ag vs. 45S5	0,7948	Não
F18 vs. 45S5	0,7948	Não
F18 vs. F18Ag	0,0157	Sim

Fonte: Campanini, 2015.

**Tabela VIII** – Comparação entre a atividade bactericida dos materiais testados após três horas de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* em incubação sem agitação.

<b>Comparações Múltiplas (Teste de Dunn)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Significativo?</b>
<b>45S5 vs. SiO<sub>2</sub></b>	0,0004	Sim
<b>F18Ag vs. SiO<sub>2</sub></b>	0,0004	Sim
<b>F18 vs. SiO<sub>2</sub></b>	0,6594	Não
<b>F18Ag vs. 45S5</b>	> 0,9999	Não
<b>F18 vs. 45S5</b>	0,0989	Não
<b>F18 vs. F18Ag</b>	0,0989	Não

Fonte: Campanini, 2015.

**Tabela IX** – Comparação entre a atividade bactericida dos materiais testados após seis horas de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* em incubação sem agitação.

<b>Comparações Múltiplas (Teste de Dunn)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Significativo?</b>
<b>45S5 vs. SiO<sub>2</sub></b>	0,0004	Sim
<b>F18Ag vs. SiO<sub>2</sub></b>	0,0004	Sim
<b>F18 vs. SiO<sub>2</sub></b>	0,6786	Não
<b>F18Ag vs. 45S5</b>	> 0,9999	Não
<b>F18 vs. 45S5</b>	0,1048	Não
<b>F18 vs. F18Ag</b>	0,1048	Não

Fonte: Campanini, 2015.

**Tabela X** – Comparação entre a atividade bactericida dos materiais testados após 24 horas de contato com a suspensão bacteriana de *S. aureus* em incubação sem agitação.

<b>Comparações Múltiplas (Teste de Dunn)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Significativo?</b>
<b>45S5 vs. SiO<sub>2</sub></b>	0,0005	Sim
<b>F18Ag vs. SiO<sub>2</sub></b>	0,0005	Sim
<b>F18 vs. SiO<sub>2</sub></b>	0,0005	Sim
<b>F18Ag vs. 45S5</b>	> 0,9999	Não
<b>F18 vs. 45S5</b>	> 0,9999	Não
<b>F18 vs. F18Ag</b>	> 0,9999	Não

Fonte: Campanini, 2015.