

Trabalho de Conclusão de Curso

ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E DO CRESCIMENTO BACTERIANO SOBRE BIOVIDRO 58S+CaBr₂

Ana Beatriz Sant'Ana M. Khoury



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

Ana Beatriz Sant`Ana Moysés Khoury

**ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO EXPERIMENTAL
PARA ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E DO
CRESCIMENTO BACTERIANO SOBRE BIOVIDRO 58S+CaBr₂**

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito para a conclusão do Curso de
Graduação em Odontologia.

Orientador: César A. M. Benfatti

Co-Orientador: Bernardo B. Passoni

Florianópolis

2016

Ana Beatriz Sant'Ana Moysés Khoury

**ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO EXPERIMENTAL
PARA ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E DO
CRESCIMENTO BACTERIANO SOBRE BIOVIDRO 58S+CaBr₂**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 20 de Outubro de 2016

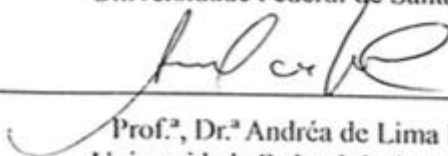
Banca examinadora:



Prof. Dr. Cesar A. M. Benfatti

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.ª, Dr.ª Andréa de Lima Pimenta
Universidade Federal de Santa Catarina



Dr.ª Mariane Beatriz Sordi
Universidade Federal de Santa Catarina

**Dedico este trabalho a Deus; à minha família;
aos meus orientadores, Cesar A. M. Benfatti e
Andréa de Lima Pimenta.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida que tenho; à minha família, por todo apoio e oportunidade de estar completando mais um ciclo e ter me incentivado e encorajado em momentos difíceis, além de ter me ensinado a sempre persistir. Sou grata a minha mãe, Ana Carla e ao meu pai, Mauricio, por proporcionarem a chance de eu estar me tornando essa profissional.

Agradeço aos meus professores orientadores, Cesar A. M. Benfatti e Andréa Pimenta, que me ajudaram a solucionar os diversos percalços nesse caminho da pesquisa, os quais se tornaram aprendizado acadêmico e pessoal, graças ao seu apoio. Por isso, muito obrigada. Aos meus co-orientadores, Bernardo B. Passoni e Mariane Sordi, que dispuseram do seu tempo e dedicação para me auxiliar e ensinar.

Também, agradeço aos demais professores que enriqueceram meu aprendizado e que demonstraram claramente o amor pela profissão. A estes agradeço pelo incentivo de prosseguir nesse caminho da Odontologia.

Não posso deixar de agradecer e também à minha dupla, Carolina Bruns e aos meus outros amigos, por estarem presentes durante todo o crescimento e aprendizado da graduação.

Ao meu namorado, Guilherme Santos, que me acompanha e apoia em cada passo essencial desse novo começo profissional que está por vir.

Quando alguém deseja algo ardentemente, já se encontra a caminho da realização.
(Francisco Cândido Xavier, 1944)

RESUMO

A periodontite e cárie dental ainda são as doenças bucais mais prevalentes e a terapêutica usada para cura tem sido afetada pela resistência bacteriana aos antibióticos. A fim de tentar reverter essa situação, estão sendo estudados materiais biocompatíveis contendo novos compostos antibacterianos em sua composição para uso em próteses e implantes dentários. Um exemplo deste tipo de material é o biovidro, desenvolvido na década de 60, com propriedades antibacterianas, bioativo, com capacidade de aumentar a expressão de indutores angiogênicos e osteocondutor, promovendo uma resposta intra e extracelular que permite a colonização da sua superfície por células tronco livres no ambiente defeituoso. Os biovidros derivados do processo sol-gel, como o 58S utilizado neste trabalho, possuem mais nanoporosidades e maior área de superfície do que os derivados do processo de fusão, como o 4S5S, o que torna os primeiros mais bioativos.

O objetivo deste estudo é estabelecer um protocolo para avaliar formação de biofilme e o crescimento da microbiota (*Streptococcus oralis*) em meio de cultura BHI, em presença de pó de biovidro 58S contendo diferentes quantidades de brometo de cálcio (CaBr_2) em sua composição.

Para desenvolvimento deste trabalho, foram escolhidas 4 concentrações de CaBr_2 na composição do biovidro (0%, 5%, 10% e 20%) e duas concentrações de pó de biovidro 58S, 50mg/ml e 100mg/ml, em TRIS em pH 7,5 e concentração de 0,05 g/mol. Em uma placa de 96 poços foram depositados 100µl de cada suspensão de CaBr_2 e adicionados 100µl do pré-inóculo *S.oralis* cultivados por 16h à 37°C em BHI. As quantificações do crescimento planctônico e do biofilme foram realizadas através da leitura de densidade óptica diretamente à 600nm no caso do crescimento planctônico e à 595nm após coloração com cristal violeta 0,1% no caso do biofilme.

Os resultados indicaram presença de formação de biofilme no pó de biovidro, assim como inibição do crescimento planctônico induzida pelas amostras de biovidro. Porém, não foi possível quantificar com precisão visto que algumas variáveis não puderam ser controladas, como a baixa solubilidade do biovidro nas condições do experimento e a reatividade do mesmo ao corante cristal violeta.

Conclui-se que, estudos posteriores são necessários para o estabelecimento de um protocolo que resulte em resultados quantitativos

precisos dos dois parâmetros aqui estudados, a começar pela determinação das condições necessárias à solubilização do biovidro.

Palavras-chave: Pó de biovidro, Biovidro 45S5, atividade antibacteriana, antibiofilme, implante, cárie, Bromo.

ABSTRACT

Periodontitis and dental caries are still the most prevalent oral disease and the conventional therapy used to treat it has been affected by the development of bacterial antibiotic resistance. In order to try to reverse this situation, biocompatible materials containing novel antibacterial compounds in its composition are being studied for use in prosthetics and dental implants. Bioglass is one example of this type of material; it has been developed in the 60s, with antibacterial properties, bioactive, capable of increasing the expression of angiogenic inducers and osteoconductive, promoting intra and extracellular response that allows the colonization of the surface by stem cells. Bioactive glasses derived from the sol-gel process, such as the 58S used in this work, have more nanoporosities and greater surface area than the derivatives of the fusion process, such as 4S5S, which makes the first more bioactive.

The aim of this study was to establish a protocol to assess biofilm formation and planktonic growth of bacteria (*Streptococcus oralis*) in the presence of bioglass powder 58S, containing different percentages of calcium bromide (CaBr_2) in its composition.

To develop this study were selected bioglasses containing 4 different concentrations of CaBr_2 in their compositions (0%, 5%, 10% and 20%). The experiments were performed using two bioglass 58S concentrations, 50mg/ml and 100mg/ml, in TRIS pH 7,5 at 0,05 g/mol. 100 μl of each bioglass suspension were placed in individual wells of a 96-well plate. 100 μl of *S.oralis* pre-inoculum cultured in BHI were added to each well and plates were incubated for 16h at 37° C. Quantification of biofilm and planktonic growth were performed by optical density reading directly (600nm) in the case of planktonic growth and after staining with crystal violet 0,1% in the case of biofilm (595nm).

Results indicated the presence of biofilm formation in bioglass powder, as well as inhibition of planktonic growth induced by bioglass samples. However, it was not possible to quantify these parameters accurately because some variables could not be controlled, such as low solubility of bioglass in the experiment conditions and its reactivity to the crystal violet coloring.

We conclude that further studies are necessary to establish a protocol that results in accurate quantitative results of the two parameters studied here, mainly with the determination of the conditions for bioglass solubilization .

Keywords: bioglass powder, Bioglass 45S5, antibacterial activity, antibiofilm, implant, decay, Bromine.

LISTA DE FIGURAS

- Fig.1- Disposição da placa de 96 poços
- Fig.2- Diferença de dispersão do biovidro 58S em TRIS
- Fig.3- Pó de biovidro corado em cristal violeta.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Leitura Estatística do crescimento planctônico;
- Gráfico 2- Inibição do crescimento planctônico;
- Gráfico 3- Inibição do biofilme aderido ao fundo do poço;
- Gráfico 4- Fixação de biofilme no pó de biovidro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. *S. oralis*: *Streptococcus oralis*
2. CaBr₂ : Brometo de cálcio
3. BHI: Brain Heart Infusion
4. TRIS: Tris-hidroximetilaminometano
5. PBS: Phosphate buffered saline
6. DO: Densidade óptica
7. BV: Biovidro
8. CERMAT: ceramic and composite materials research laboratories

SUMÁRIO

1- CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA	25
2- ARTIGO	27
2.1-INTRODUÇÃO	30
2.2 - OBJETIVOS DO TRABALHO	31
2.3 -METODOLOGIA E RESULTADOS	32
2.4 – DISCUSSÃO	42
2.5-CONCLUSÃO	47
3 - REFERÊNCIAS	48
4. APÊNDICE	51

1- CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

Na odontologia, a compreensão das mudanças da microbiota oral que predizem o início da periodontite e cárie dental, doenças bucais crônicas mais prevalentes, pode permitir o melhor diagnóstico e tratamento. Desvendar as interações dessa complexa microbiota é, portanto, de suma importância para recuperar o controle destas doenças (LIU et al., 2012).

Tais bactérias, desenvolvendo-se na região oro-faríngea, encontram-se em equilíbrio entre sua capacidade de adesão e as forças de remoção contra elas, como a fricção causada pelos alimentos, deglutição, a língua, a higiene oral e a lavagem feita pela saliva e o fluido crevicular. A maioria dos microorganismos patogênicos só conseguem sobreviver quando estão aderidos firmemente numa superfície estável, livre de tais forças externas, sendo que os dentes e seu periodonto servem como reservatório para os mesmos. Uma vez instaladas na placa dental, as bactérias não funcionam como seres independentes, mas como uma comunidade microbiana metabolicamente integrada e coordenada. Ademais, sabe-se que a adesão bacteriana não ocorre por uma só forma, mas que fímbrias, flagelos e outros receptores proteicos são essenciais para a conexão com as superfícies. Superfícies mais ásperas (coroas, pilares de implantes e bases de prótese) acumulam e retêm mais placa. O interstício entre componentes do implante, especialmente aqueles localizados subgengivalmente, oferecem um ambiente ideal para formação de placas e / ou para retenção das mesmas durante a higiene (TEUGHELDS et al., 2006).

Membros do gênero *Streptococcus* são os principais habitantes da cavidade oral. Os 4 maiores grupos do *Streptococcus* oral são: *salivarius*, *anginosus*, *mutans* e *mitis*. A espécie *S.oralis* faz parte do grupo *mitis* e está mais relacionada a saúde oral do que à instalação de doenças (ROSSETTI et al., 2013). Porém, de acordo com Do et al. (2009), essa espécie é pioneira na colonização primária dental e geralmente está envolvida nas causas da endocardite bacteriana. A *S. oralis* se classifica como comensal, gram-positiva e anaeróbio facultativa (ALMEIDA et al., 2002).

O surgimento e evolução da resistência dos microorganismos patogênicos aos antibióticos tem afetado o sucesso da terapêutica para a periodontite (LIU et al., 2012). Como tentativa de reverter essa situação, diversos inibidores de adesão bacteriana têm sido estudados, visto que

não induziriam o aparecimento de resistência bacteriana como acontece com os antibióticos. Alguns compostos têm sido testados a fim de inibir a adesão do biofilme, como: peptídeos derivados de proteínas de ligação à fibronectina (FnBPs), segundo Hawley et al. (2013) e o Brometo de N-fenaciltiazolio (PTB), de acordo com Chang et al. (2014). Segundo Minami (2010), supõe-se que o Bromo também contenha propriedade antibacteriana.

Entretanto, para uso odontológico, necessita-se determinar um material compatível onde pudessem ser incorporados estes compostos anti-bacterianos, como por exemplo o biovidro, que foi desenvolvido pela primeira vez na década de 60, com a marca comercial Bioglass 45S5 (BELLON, 2012). Estudos que analisaram como materiais dentários atuais podem ser modificados, para manter propriedades bioativas e antibacteriana, proveram evidências sobre o potencial benéfico do uso do biovidro como aditivos a estes materiais (CHATZISTAVROU et al., 2015).

Nesse aspecto, além do desenvolvimento da composição original do biovidro, atualmente se encontram vários tipos de vidro bioativo: os silicatos convencionais, tais como o Bioglass 45S5; vidros à base de fosfatos; e vidros a base de borato (JONES, 2013).

O Br, somado à propriedade antibacteriana do biovidro, apresenta-se como excelente composição para ser testada em diferentes concentrações na inibição da adesão do biofilme bacteriano. Isto poderá ser útil futuramente na utilização deste biomaterial, tanto na parte de materiais restauradores quanto em superfícies de implantes e/ou componentes protéticos. Portanto, baseado no que diz a literatura, este trabalho tem por objetivo testar o efeito antibiofilme do pó de biovidro 58S com adição de brometo de cálcio em sua composição, em 4 concentrações diferentes, contra o biofilme monoespécie (*Streptococcus oralis*).

2- ARTIGO

RESUMO

A periodontite e cárie dental ainda são as doenças bucais mais prevalentes e a terapêutica usada para cura tem sido afetada pela resistência bacteriana aos antibióticos. A fim de tentar reverter essa situação, estão sendo estudados materiais biocompatíveis contendo novos compostos antibacterianos em sua composição para uso em próteses e implantes dentários. Um exemplo deste tipo de material é o biovidro, desenvolvido na década de 60, com propriedades antibacterianas, bioativo, com capacidade de aumentar a expressão de indutores angiogênicos e osteocondutor, promovendo uma resposta intra e extracelular que permite a colonização da sua superfície por células tronco livres no ambiente defeituoso. Os biovidros derivados do processo sol-gel, como o 58S utilizado neste trabalho, possuem mais nanoporosidades e maior área de superfície do que os derivados do processo de fusão, como o 4S5S, o que torna os primeiros mais bioativos.

O objetivo deste estudo é estabelecer um protocolo para avaliar formação de biofilme e o crescimento da microbiota (*Streptococcus oralis*) em meio de cultura BHI, em presença de pó de biovidro 58S contendo diferentes quantidades de brometo de cálcio (CaBr_2) em sua composição.

Para desenvolvimento deste trabalho, foram escolhidas 4 concentrações de CaBr_2 na composição do biovidro (0%, 5%, 10% e 20%) e duas concentrações de pó de biovidro 58S, 50mg/ml e 100mg/ml, em TRIS em pH 7,5 e concentração de 0,05 g/mol. Em uma placa de 96 poços foram depositados 100 μ l de cada suspensão de CaBr_2 e adicionados 100 μ l do pré-inóculo *S.oralis* cultivados por 16h à 37°C em BHI. As quantificações do crescimento planctônico e do biofilme foram realizadas através da leitura de densidade óptica diretamente à 600nm no caso do crescimento planctônico e à 595nm após coloração com cristal violeta 0,1% no caso do biofilme.

Os resultados indicaram presença de formação de biofilme no pó de biovidro, assim como inibição do crescimento planctônico induzida pelas amostras de biovidro. Porém, não foi possível quantificar com precisão visto que algumas variáveis não puderam ser controladas, como a baixa solubilidade do biovidro nas condições do experimento e a reatividade do mesmo ao corante cristal violeta.

Conclui-se que, estudos posteriores são necessários para o

estabelecimento de um protocolo que resulte em resultados quantitativos precisos dos dois parâmetros aqui estudados, a começar pela determinação das condições necessárias à solubilização do biovidro.

Palavras-chave: Pó de biovidro, Biovidro 45S5, atividade antibacteriana, antibiofilme, implante, cárie, Bromo.

Abstract

Periodontitis and dental caries are still the most prevalent oral disease and the conventional therapy used to treat it has been affected by the development of bacterial antibiotic resistance. In order to try to reverse this situation, biocompatible materials containing novel antibacterial compounds in its composition are being studied for use in prosthetics and dental implants. Bioglass is one example of this type of material; it has been developed in the 60s, with antibacterial properties, bioactive, capable of increasing the expression of angiogenic inducers and osteoconductive, promoting intra and extracellular response that allows the colonization of the surface by stem cells. Bioactive glasses derived from the sol-gel process, such as the 58S used in this work, have more nanoporosities and greater surface area than the derivatives of the fusion process, such as 4S5S, which makes the first more bioactive.

The aim of this study was to establish a protocol to assess biofilm formation and planktonic growth of bacteria (*Streptococcus oralis*) in the presence of bioglass powder 58S, containing different percentages of calcium bromide (CaBr_2) in its composition.

To develop this study were selected bioglasses containing 4 different concentrations of CaBr_2 in their compositions (0%, 5%, 10% and 20%). The experiments were performed using two bioglass 58S concentrations, 50mg/ml and 100mg/ml, in TRIS pH 7,5 at 0,05 g/mol. 100 μl of each bioglass suspension were placed in individual wells of a 96-well plate. 100 μl of *S.oralis* pre-inoculum cultured in BHI were added to each well and plates were incubated for 16h at 37° C. Quantification of biofilm and planktonic growth were performed by optical density reading directly (600nm) in the case of planktonic growth and after staining with crystal violet 0,1% in the case of biofilm (595nm).

Results indicated the presence of biofilm formation in bioglass powder, as well as inhibition of planktonic growth induced by bioglass samples. However, it was not possible to quantify these parameters accurately because some variables could not be controlled, such as low solubility of bioglass in the experiment conditions and its reactivity to

the crystal violet coloring.

We conclude that further studies are necessary to establish a protocol that results in accurate quantitative results of the two parameters studied here, mainly with the determination of the conditions for bioglass solubilization .

Keywords: bioglass powder, Bioglass 45S5, antibacterial activity, antibiofilm, implant, decay, Bromine.

2.1-INTRODUÇÃO

Na odontologia, a compreensão das mudanças da microbiota oral que predizem o início da periodontite e cárie dental, doenças bucais crônicas mais prevalentes, pode permitir o melhor diagnóstico e tratamento. Desvendar as interações dessa complexa microbiota é, portanto, de suma importância para recuperar o controle destas doenças (LIU et al., 2012).

Tais bactérias, desenvolvendo-se na região oro-faríngea, encontram-se em equilíbrio entre sua capacidade de adesão e as forças de remoção contra elas, como a fricção causada pelos alimentos, deglutição, a língua, a higiene oral e a lavagem feita pela saliva e o fluido crevicular. A maioria dos microorganismos patogênicos só conseguem sobreviver quando estão aderidos firmemente numa superfície estável, livre de tais forças externas, sendo que os dentes e seu periodonto servem como reservatório para os mesmos. Uma vez instaladas na placa dental, as bactérias não funcionam como seres independentes, mas como uma comunidade microbiana metabolicamente integrada e coordenada. Ademais, sabe-se que a adesão bacteriana não ocorre por uma só forma, mas que fímbrias, flagelos e outros receptores proteicos são essenciais para a conexão com as superfícies. Superfícies mais ásperas (coroas, pilares de implantes e bases de prótese) acumulam e retêm mais placa. O interstício entre componentes do implante, especialmente aqueles localizados subgingivalmente, oferecem um ambiente ideal para formação de placas e / ou para retenção das mesmas durante a higiene (TEUGHELS et al., 2006).

Membros do gênero *Streptococcus* são os principais habitantes da cavidade oral. Os 4 maiores grupos do *Streptococcus* oral são: *salivarius*, *anginosus*, *mutans* e *mitis*. A espécie *S.oralis* faz parte do grupo *mitis* e está mais relacionada a saúde oral do que à instalação de doenças (ROSSETTI et al., 2013). Porém, de acordo com Do et al. (2009), essa espécie é pioneira na colonização primária dental e geralmente está envolvida nas causas da endocardite bacteriana. A *S. oralis* se classifica como comensal, gram-positiva e anaeróbio facultativa (ALMEIDA et al., 2002).

O surgimento e evolução da resistência dos microorganismos patogênicos aos antibióticos tem afetado o sucesso da terapêutica para a periodontite (LIU et al., 2012). Como tentativa de reverter essa situação, diversos inibidores de adesão bacteriana têm sido estudados, visto que não induziriam o aparecimento de resistência bacteriana como acontece

com os antibióticos. Alguns compostos têm sido testados a fim de inibir a adesão do biofilme, como: peptídeos derivados de proteínas de ligação à fibronectina (FnBPs), segundo Hawley et al. (2013) e o Brometo de N-fenaciltiazolio (PTB), de acordo com Chang et al. (2014). Segundo Minami (2010), supõe-se que o Bromo também contenha propriedade antibacteriana.

Entretanto, para uso odontológico, necessita-se determinar um material compatível onde pudessem ser incorporados estes compostos anti-bacterianos, como por exemplo o biovidro, que foi desenvolvido pela primeira vez na década de 60, com a marca comercial Bioglass 45S5 (BELLON, 2012). Estudos que analisaram como materiais dentários atuais podem ser modificados, para manter propriedades bioativas e antibacteriana, proveram evidências sobre o potencial benéfico do uso do biovidro como aditivos a estes materiais (CHATZISTAVROU et al., 2015).

Nesse aspecto, além do desenvolvimento da composição original do biovidro, atualmente se encontram vários tipos de vidro bioativo: os silicatos convencionais, tais como o Bioglass 45S5; vidros à base de fosfatos; e vidros a base de borato (JONES, 2013).

O Br, somado à propriedade antibacteriana do biovidro, apresenta-se como excelente composição para ser testada em diferentes concentrações na inibição da adesão do biofilme bacteriano. Isto poderá ser útil futuramente na utilização deste biomaterial, tanto na parte de materiais restauradores quanto em superfícies de implantes e/ou componentes protéticos. Portanto, baseado no que diz a literatura, este trabalho tem por objetivo testar o efeito antibiofilme do pó de biovidro 58S com adição de brometo de cálcio em sua composição, em 4 concentrações diferentes, contra o biofilme monoespécie (*Streptococcus oralis*).

2.2 - OBJETIVOS DO TRABALHO

2.1-Objetivo geral:

Estabelecer protocolo para avaliar o potencial antibiofilme do Biovidro 58S + CaBr₂ em pó.

2.1.2-Objetivos específicos:

Testar 4 concentrações de associação de Biovidro com brometo de cálcio e suas respectivas atividades antibiofilme;

Avaliar o crescimento bacteriano planctônico;

Avaliar o biofilme formado no fundo do poço da placa de 96;

Avaliar a fixação de biofilme no pó de biovidro poços;

A fim de se estabelecer um protocolo para análise da formação de

biofilme e do crescimento bacteriano, objetivo do trabalho, foi necessário executar mudanças no protocolo inicial ao longo dos resultados obtidos com os experimentos. Por isso, abaixo será descrito o protocolo inicial e sua subsequente modificação.

2.3 -METODOLOGIA E RESULTADOS

2.3.1 - 1º PROTOCOLO

MATERIAIS

Neste protocolo utilizou-se o biovidro 58S + CaBr₂ contendo 4 concentrações diferentes de brometo (0%, 5%, 10% e 20%), desenvolvido e produzido na UFSC (CERMAT); 200ml de caldo BHI; 200ml de PBS. Esses materiais foram autoclavados por 20 min a 120 atm. Também foram utilizados água destilada; cristal violeta 0,1%, dissolvido em água destilada; álcool 96%; digluconato de clorexidina 0,12%.

A linhagem bacteriana utilizada em todos os experimentos foi da espécie *Streptococcus oralis* ATCC[®] 6249, (Microbiologics[®], KWIK-STIK[™]). As bactérias foram reativadas conforme instruções do fabricante, (descritas em www.microbiologics.com), estocadas a -20°C em glicerol 20% (300µl de glicerol+ 1,5ml de pré-inóculo) e manipuladas sempre em câmara de fluxo laminar. .

METODOLOGIA

Para iniciar os experimentos 3 ml da linhagem bacteriana comercial foram inoculados em caldo BHI, conforme instruções do fabricante, e cultivados por 24h em estufa à 37°C. No dia seguinte 1ml desse pré-inóculo foi transferido para um tubo de ensaio estéril contendo 9ml de caldo BHI, e cultivado à 37°C por 16h. Essa cultura foi utilizada para os experimentos microbiológicos

Os materiais a serem testados foram depositados em placa de 96 poços da seguinte forma (sempre em triplicata):

Linha A : 100µl da suspensão de bactérias + 0,005g de cada biovidro com suas respectivas concentrações de CaBr₂, começando com o de menor concentração e terminando com o de maior (0%,5%,10%,20%), previamente depositados no fundo dos poços;

Linha B: 100µl da suspensão de bactérias + 0,01g de biovidro como descrito na linha A.

Linha C: 100µl de BHI puro + 0,005g de biovidro como descrito na linha A;

Linha D: 100µl de BHI puro + 0,01g de biovidro como descrito na linha A.

Linha E : controles - sendo (1) os controles negativos contendo 100µl de BHI puro, (2) sendo o controle negativo do padrão comercial de inibição contendo 100µl de clorexidina 0,12% pura; (3) o controle de inibição do padrão comercial contendo 100µl da cultura bacteriana + 100µl clorexidina 0,12%.

Após 24 horas de incubação das culturas em presença (ou ausência) de biovidro, o crescimento bacteriano planctônico foi medido através da leitura de densidade óptica do sobrenadante das culturas, a um comprimento de onda de 600nm (DO_{600}).

O biofilme foi quantificado pelo protocolo padrão após coloração com cristal violeta, conforme Pimenta et al. (2003), modificado para se adaptar às condições do experimento. Resumidamente, após 24 horas de incubação, o sobrenadante de cultura foi pipetado e removido, e cada poço cuidadosamente lavado duas vezes com 100µl de 1x PBS. Em seguida, 100µl de álcool 96% foram adicionados à cada poço, para fixação do biofilme formado. Após 20 minutos de incubação, o álcool foi retirado e as placas expostas à temperatura ambiente para secagem. A coloração prevista para posterior leitura (DO_{600}) não foi realizada pelo motivo citado abaixo.

RESULTADOS

Notou-se que, 24 horas após montado o experimento, o biovidro não solubilizara em BHI, tendo se depositado no fundo dos poços da placas. Concluiu-se que não seria possível prosseguir com os procedimentos, já que o pó depositado no fundo impediria correta leitura por densidade óptica.

Tentou-se então, aquecer a suspensão do pó de biovidro em BHI à 60°C, por 1h, na mesma concentração citada anteriormente e, em seguida agitá-los em vortex. Ainda assim não se obteve uma dissolução. Por isso, resolveu-se adaptar o protocolo para o que se segue abaixo, utilizando a solução TRIS, segundo descrito por Rohanova et al. (2011).

2.3.2 - 2º PROTOCOLO

MATERIAIS

Neste protocolo foi utilizado biovidro 58S + CaBr₂ em 4 concentrações diferentes de brometo (0%, 5%, 10% e 20%), desenvolvido e produzido na UFSC (CERMAT); 200ml de BHI 2X concentrado em relação à concentração indicada pelo fabricante e 200ml de PBS. Foram preparados 4 tubos de ensaio, cada um contendo 0,1g de biovidro 58S e sua respectiva concentração de brometo de cálcio (0%, 5%, 10% e 20%) e 2ml de TRIS em pH 7,5; e outros 4 tubos de ensaio semelhantes, porém cada um com 0,2g de bioglass 58S e as respectivas concentrações de CaBr₂ citadas. O ajuste de pH da solução TRIS foi feito acrescentando-se NaOH ou NaCl conforme fosse necessário. Todos esses materiais e soluções foram esterilizados previamente ao início do experimento. Além destes, outros materiais utilizados foram água destilada, cristal violeta a 0,1%, diluída em água destilada, lauril sulfato de sódio e digluconato de clorexidina 0,12%.

A linhagem bacteriana cultivada foi a mesma citada anteriormente, cultivadas e manipuladas da mesma forma que no 1º protocolo, porém desta vez em caldo BHI 2x concentrado.

METODOLOGIA

A)- Quantificação do crescimento planctônico:

Após as 16h de cultura em estufa, suspensões contendo $7,5 \times 10^6$ CFU/ml de *S. oralis* foram preparadas em BHI fresco e 100µl pipetados dessa suspensão foram expostos à solução de pó de Biovidro + CaBr₂ em TRIS a pH 7,5 previamente depositada, durante 24 horas. Cada biovidro com sua respectiva concentração de brometo de cálcio foi preparada em 2 concentrações, 50mg/ml e 100mg/ml em TRIS. Imediatamente antes da pipetagem dessa solução para transferir para os respectivos poços, agitou-se cada tubo de ensaio em vortex por alguns segundos, pois ainda nessa solução não se alcançou solubilização do pó de biovidro.

A organização da placa (1) de 96 poços se deu da seguinte forma (Figura 1): da fileira A à B foram depositados 100µl de cultura de *S.oralis* em BHI 2x concentrado, a $7,5 \times 10^6$ CFU/ml em todos os 12 poços; na fileira C e D foram depositados 100µl de BHI 2x concentrado puro, em todos os poços; da fileira A à D foram adicionados também

100µl de solução de biovidro em TRIS, porém nas fileiras A e C em concentração de 50mg/ml e nas B e D em 100mg/ml, de forma que de 3 em 3 poços a concentração de CaBr_2 aumentava gradativamente. Na fileira E, a cada 3 poços encontrava-se 200µl de BHI 2x concentrado; 200µl de clorexidina 0,12% pura; 200µl de cultura da cepa *S.oralis* em BHI 2x concentrado, na unidade de $7,5 \times 10^6$ CFU/ml, e nos último 3 poços, 100µl de clorexidina 0,12% + 100µl de cultura bacteriana na mesma unidade citada.

O crescimento planctônico bacteriano foi medido 24 horas após montagem do experimento, em leitura da densidade óptica (DO_{600}). Para tanto, pipetou-se 100µl do sobrenadante de cada poço e transferiu-os para outra placa (2), a qual foi realizada a leitura.

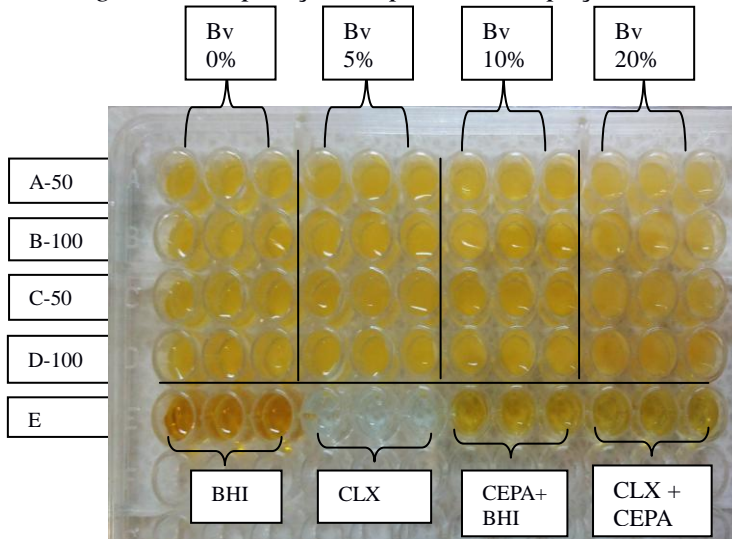
Em razão da falha de tentativas de dissolução do pó de biovidro em BHI e mesmo em TRIS, adaptou-se novamente o protocolo para leitura da formação de biofilme de duas formas: formação em fundo do poço da placa e provável formação de biofilme fixado no próprio pó de biovidro.

B)- Quantificação do biofilme:

O biovidro restante depositado no fundo dos poços da placa (1) foi lavado com 600µl de PBS, pipetado e transferido para eppendorfs. O sobrenadante foi pipetado e descartado. Os eppendorfs foram então lavados 3x com 200µl de PBS para serem corados com 200µl de Cristal Violeta por 15min. Após, o sobrenadante corado foi descartado e então os eppendorfs foram lavados 9x com 200µl de PBS. Depois da última lavagem, acrescentou-se 200µl de Lauril sulfato de sódio em cada um por 15 minutos, para serem pipetados e transferidos para uma placa (3) e feita a leitura em DO_{600} .

Em seguida, a placa (1) foi então lavada 3x com uma pisseta com água destilada, corada com 200µl de Cristal violeta em cada poço por 15 minutos e lavada 5x para ser feita sua leitura, a fim de que se quantificasse o biofilme aderido no fundo dos poços.

Figura 1- Disposição da placa de 96 poços



Linha A:

3 poços para cada tipo de Bioglass com sua respectiva concentração de CaBr_2 , da menor para a maior (0%, 5%, 10% e 20%): 100 μl de suspensão de Bioglass em TRIS, a 50mg/ml, + 100 μl de suspensão de cultura bacteriana;

Linha B:

-3 poços para cada tipo de biovidro com sua respectiva concentração de CaBr_2 , menor para a maior (0%, 5%, 10% e 20%): 100 μl de suspensão de Bioglass em TRIS, a 100mg/ml, + 100 μl de suspensão de cultura bacteriana;

Linha C: Controle negativo

-3 poços para cada tipo de biovidro com sua respectiva concentração de CaBr_2 : 100 μl de suspensão de Bioglass em TRIS, a 50mg/ml, +100 μl de BHI puro 2x concentrado ;

Linha D: Controle negativo

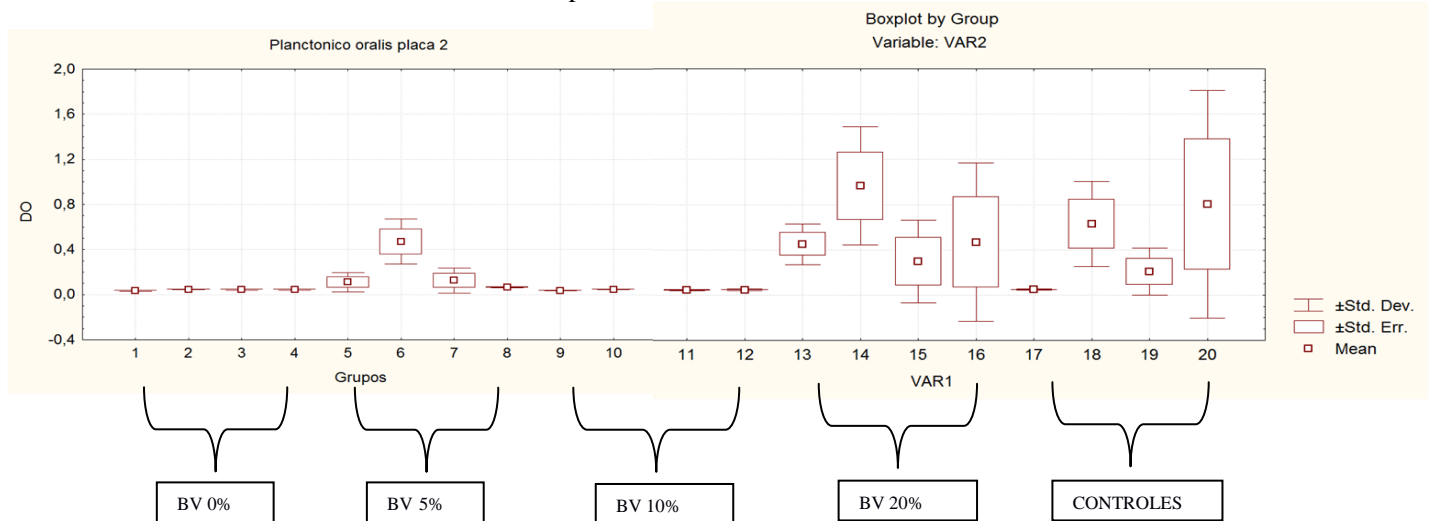
-3 poços para cada tipo de biovidro com sua respectiva concentração de CaBr_2 : 100 μl de suspensão de Bioglass em TRIS, a 100mg/ml, + 100 μl de BHI puro 2x concentrado;

Linha E: Controles na seguinte ordem:

- 3 poços (E1-3) com 200 μl de BHI puro 2x;
- 3 poços (E4-6) com 200 μl de clorexidina 0,12% pura;
- 3 poços (E7-9) com 200 μl de cultura bacteriana em BHI 2x;
- 3 poços (E 10-12) com 100 μl de cultura bacteriana em BHI2x + 100 μl de clorexidina 0,12%.

RESULTADOS

Gráfico 1: Análise estatística do crescimento planctônico



Comparando-se o grupo 1 com o 3, seu controle negativo, pode-se inferir que não houve diferença significativa entre eles. O mesmo pode-se observar nas comparações dos grupos 2 com 4, 5 com 7, 9 com 11, 10 com 12, 13 com 15 e 14 com 16. Entende-se, portanto, que não houve crescimento bacteriano nos grupos 1, 2, 5, 9, 10, 13 e 14. Já a comparação do grupo 6 com seu controle de biovidro, grupo 8, houve diferença significativa e sugere que na concentração de 5% de CaBr_2 , a 100mg/ml, houve crescimento bacteriano.

***Grupo 1:** Biovidro 0% CaBr₂ a 50 mg/ml de TRIS + Ceba;

Grupo 2: Biovidro 0% CaBr₂ a 100 mg/ml de TRIS+ Ceba;

Grupo 3: Biovidro 0% CaBr₂ a 50 mg/ml de TRIS+ BHI;

Grupo 4: Biovidro 0% CaBr₂ a 100 mg/ml de TRIS+ BHI;

Grupo 5: Biovidro 5% CaBr₂ a 50 mg/ml de TRIS + Ceba;

Grupo 6: Biovidro 5% CaBr₂ a 100 mg/ml de TRIS + Ceba;

Grupo 7: Biovidro 5% CaBr₂ a 50 mg/ml de TRIS+ BHI;

Grupo 8: Biovidro 5% CaBr₂ a 100 mg/ml de TRIS+ BHI;

Grupo 9: Biovidro 10% CaBr₂ a 50 mg/ml de TRIS + Ceba;

Grupo 10: Biovidro 10% CaBr₂ a 100 mg/ml de TRIS + Ceba;

Grupo 11: Biovidro 10% CaBr₂ a 50 mg/ml de TRIS+ BHI

-**Grupo 12:** Biovidro 10% CaBr₂ a 100 mg/ml de TRIS+ BHI;

Grupo 13: Biovidro 20% CaBr₂ a 50 mg/ml de TRIS + Ceba;

Grupo 14: Biovidro 20% CaBr₂ a 100 mg/ml de TRIS + Ceba;

Grupo 15: Biovidro 20% CaBr₂ a 50 mg/ml de TRIS+ BHI;

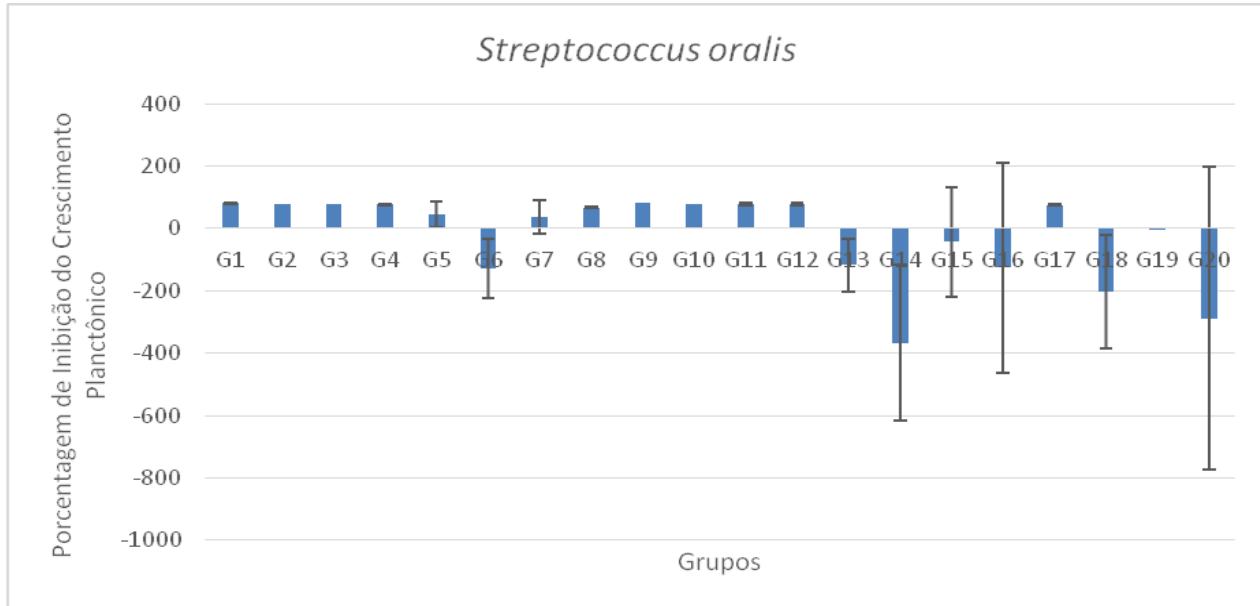
Grupo 16: Biovidro 20% CaBr₂ a 100 mg/ml de TRIS+ BHI.

Grupo 17: Caldo BHI puro;

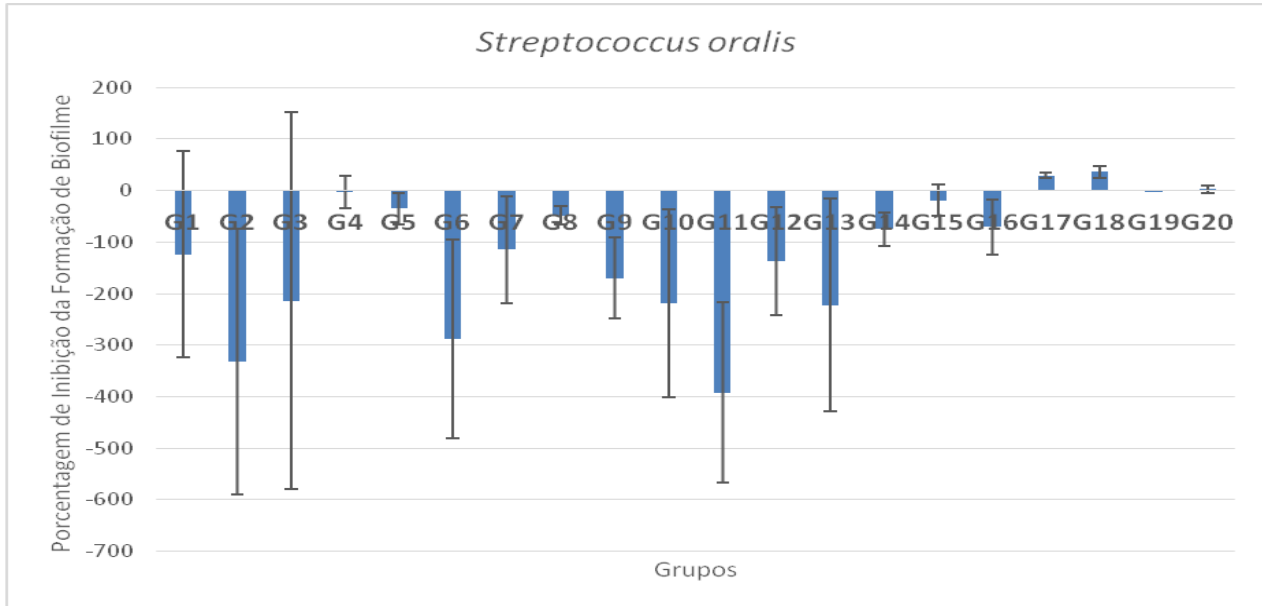
Grupo 18: Clorexidina 0,12% pura;

Grupo 19: Caldo BHI+cepa a $7,5 \times 10^6$ CFU/ml;

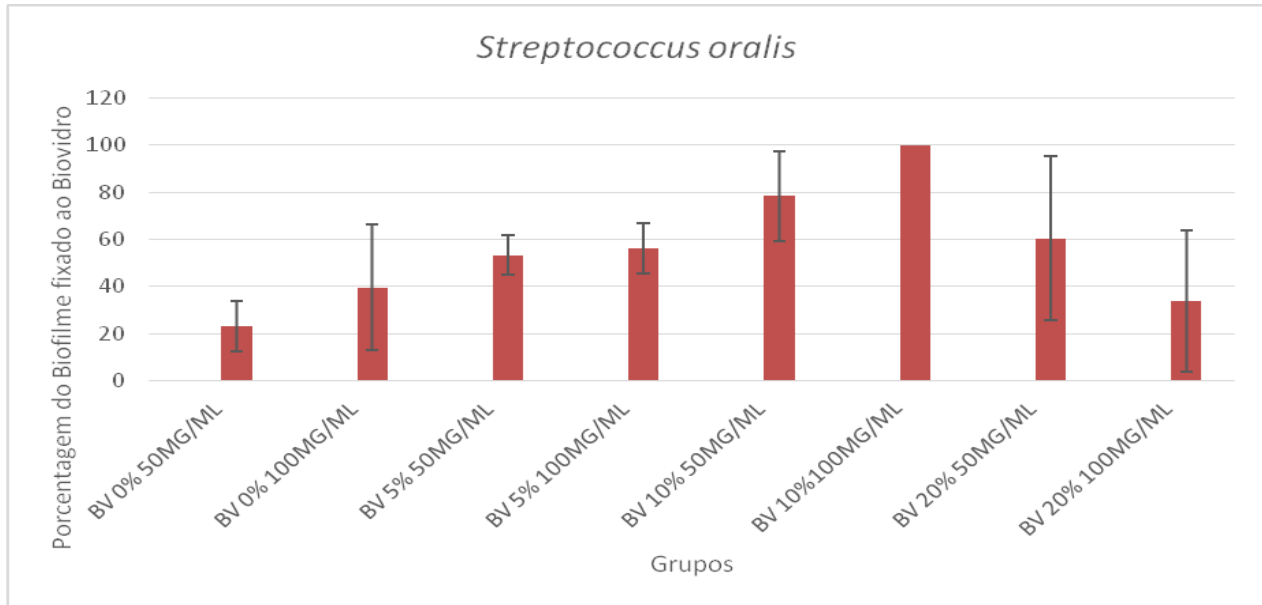
Grupo 20: Clorexidina 0,12% + cepa a $7,5 \times 10^6$ CFU/ml

Grafico 2-Inibição do crescimento planctônico

Formação e/ou inibição de crescimento planctônico da placa em que foi feito o experimento. Após 24h da montagem do experimento, foram transferidos para outra placa 100µl sobrenadantes de cada poço e feita a leitura (DO_{600nm}).

Gráfico 3-Inibição do biofilme no fundo do poço

Análise da formação e/ou inibição de biofilme sobre poliestireno da placa em que foi feito o experimento, após transferir todo o sobrenadante e o biovídrio depositado no fundo.

Gráfico 4- Biofilme fixado ao biovidro

Análise da fixação do biofilme no biovidro. Este, após ser transferido do fundo dos poços da placa em que foi feito o experimento, lavado e corado.

2.4 – DISCUSSÃO

Quando implantados no corpo humano, biomateriais permitem a formação de substrato para células humanas e para a colonização de bactérias também. Por isso, os biomateriais podem aumentar o risco de infecção. Para reduzir as chances de infecção pós-operatória, foram estudados meios de adicionar aos materiais substâncias antibacterianas como antibióticos e prata (ZHU et al., 2014). Neste trabalho, escolheu-se a linhagem *S.oralis* já que ela está relacionada à colonização primária do meio oral e à causa de uma infecção importante no ambiente odontológico, a endocardite bacteriana. Como dito anteriormente, de acordo com Mao et al. (2015), os biovidros derivados do processo sol-gel, como o 58S (60 mol% SiO₂, 36 mol% CaO, 4 mol% P₂O₅), utilizado neste trabalho, são mais bioativos que o 45S5. Em estudos anteriores, ao produzirem arcabouços com este biovidro 58S, descobriram que, mais rapidamente do que biovidro derivados do processo de fusão, ele se degrada e se converte em hidroxiapatita, além de estimular a interação entre células por simular a estrutura do osso trabecular humano e de ter maior área de superfície por conter nanoporosidades (RAHAMAN et al., 2011). Para desenvolvimento deste trabalho, o biovidro 58S teve adicionado à sua composição o brometo de cálcio, o qual tem sua propriedade antibacteriana conhecida, porém ainda não explicadas sua citotoxicidade e dissolução.

Os resultados apresentados indicam que algumas variáveis não puderam ser controladas e algumas propriedades do pó de 58S precisam ser estudadas. Por isso, serão discutidos alguns tópicos importantes para o prosseguimento desse trabalho.

- INCUBAÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS

Assim como Xu et al., (2015), onde os microorganismos foram diluídos na razão de 1:100 e incubados na concentração final de 1×10^6 CFU/ml em meio de cultura BHI, nossa cultura de *S.oralis* incubada a 37°C foi quantificada em concentração final de $7,5 \times 10^6$ CFU/ml, também nesse mesmo meio, em presença de oxigênio, sem agitação e sem umidade.

- DISSOLUÇÃO DO BIOVIDRO 58S

A primeira dificuldade para estabelecimento de um protocolo da análise do crescimento planctônico e da formação do biofilme em biovidro 58S, foi a saturação do meio, sem que houvesse dissolução desse biomaterial utilizado. O 2º protocolo em questão foi desenvolvido após tentativa de dissolução, em que se depositou 5 e 10mg de pó de biovidro no fundo de diferentes poços, previamente à adição de 100µl de cultura da cepa *S.oralis* em meio BHI. A deposição do pó no fundo do poço, após 24h de preparo da placa, impossibilitou a leitura em densidade óptica e, portanto, a análise do crescimento planctônico também. A concentração do biovidro em meio de cultura usada nesse experimento se deu a exemplo de pesquisas realizadas anteriormente. De acordo com Hu et al. (2009), em seu experimento, partículas de biovidro 45S5 foram adicionadas ao meio de cultura lysogeny broth em uma concentração de 10, 50 e 100mg/ml e depois agitadas em vortex por 1min e incubadas a 37°C. Porém, neste trabalho, em tais concentrações em meio BHI, mesmo agitando-os e expondo-os a temperatura de 60°C, as partículas de biovidro não se solubilizaram. Observa-se que o meio utilizado neste trabalho foi diferente da pesquisa referida acima, e tal variável pode ter sido um dos obstáculos para alcançar a dissolução do biovidro 58S. Em uma próxima tentativa de estabelecer um protocolo com esse objetivo, poderiam ser averiguadas as forças iônicas dos dois meios citados, já que este é um parâmetro importante para solubilização do biovidro.

Por isso, após esses resultados, baseando-se em Rohanova et al. (2011), que concluiu que o arcabouço de biovidro 45S5 é altamente solúvel em TRIS, optou-se por dissolver o biovidro 58S em solução com adição de TRIS. Entretanto, mesmo em uma solução de tampão TRIS, o biovidro 58S com brometo de cálcio não se tornou totalmente solúvel. Segundo Cerruti, Greenspan e Powers (2005), em seu experimento 0.3g de pó de biovidro 45S5 com partículas de 2µm foram dissolvidos em 200ml de TRIS, a um pH de 7,8. Em nosso estudo, 0,1g e 0,2g de pó, cujas partículas obtinham tamanho médio de 29µm, foram acrescentados a 2ml de TRIS, em pH 7,5 ocorrendo saturação do meio. Esta variável pode ter interferido quando se transferiu os 100µl dessa suspensão para cada poço ao montar o experimento. Isto se explica, pois, quando em solução, um material é distribuído homogeneamente em todo o líquido, e neste caso, não havendo dissolução, as partículas de biovidro foram transferidas em quantidades diferentes a cada 100µl

pipetados. Portanto, ao realizar a leitura em DO de cada grupo com suas respectivas concentrações de brometo, as diferentes porções de biovidro presentes interferiram na obtenção de resultados quantitativos confiáveis. Além disso, a diferença no tamanho das partículas dos pós pode representar mais uma variável importante na dissolução do biovidro.

• INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

• Crescimento planctônico

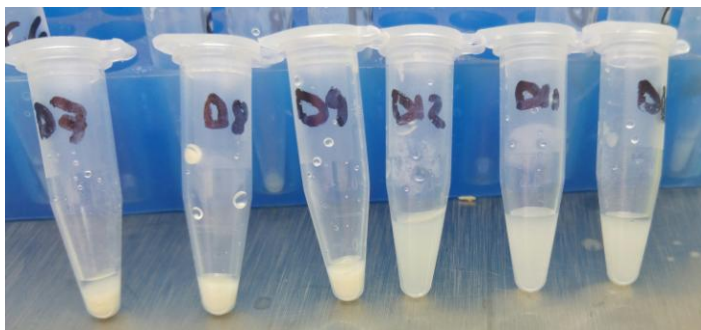
O gráfico 1 faz a leitura estatística do crescimento planctônico e através dele pode-se perceber que nos grupos de biovidro em 50mg/ml nas concentrações de 0%, 5%, 10% e 20%, o biovidro inibiu o crescimento planctônico, assim como nas de 0%, 10% e 20% em 100mg/ml. Já a comparação do grupo de 5% em 100mg/ml com seu controle de biovidro sem cepa, pode-se dizer que houve crescimento bacteriano e que, portanto, o biovidro não exerceu sua propriedade antibacteriana.

De acordo com o gráfico 2, em relação ao grupo-controle BHI + Cepa, percebe-se que na concentração de 0% e 10% de CaBr_2 em 50mg/ml e 100mg/ml de dissolução do biovidro em TRIS e na concentração de 5% de CaBr_2 em 50mg/ml, houve inibição do crescimento planctônico após 24h de preparo da placa. Porém, já nos grupos de 5% em 100mg/ml e 20% em 50 e 100mg/ml houve a interpretação de indução de crescimento de bactérias. Durante o experimento, notou-se que, nos eppendorfs em que havia maior concentração de CaBr_2 , além de não haver dissolução do biovidro, este também ficava mais em suspensão que em outros de menor concentração (fig.2), o que interferiu na pipetagem do mesmo em quantidades desiguais. Por isso, na leitura deste gráfico, talvez não tenha havido realmente indução de crescimento de bactérias nos grupos citados, mas sim uma leitura DO_{600} que tenha incluído o pó de biovidro que possivelmente tenha sido pipetado dos poços junto ao sobrenadante, ao invés de estar totalmente depositado no fundo do poço como se desejava. Essa maior suspensão em concentração de 20% de brometo pode ser dada pela higroscopia do sal. Isto pode ser verificado em testes como o TGA (análise termogravimétrica) e FTIR (Fourier transform infrared), nos quais se analisa a existência de água de concentração do pó e a quantidade de água absorvida pelo mesmo, respectivamente. Pode-se inferir que a falta de conhecimento sobre as propriedades deste sal sejam mais uma hipótese para explicar a não dissolução do biovidro

em questão.

Em relação aos grupos- controle de Clorexidina e Clorexidina + cepa, em primeira análise parece que houve indução de crescimento bacteriano. Porém, de acordo com Yamaguchi et al. (1981), em sua pesquisa o digluconato de clorexidina inibiu a placa dental e, mesmo 24h após contato intraoral, obteve efeito residual na saliva. Portanto, nessa leitura, é provável que a pigmentação da clorexidina tenha interferido e, não de fato, tenha induzido crescimento planctônico, já que em pesquisas anteriores foi comprovado seu efeito antibacteriano.

Fig.2- Diferença do pó de biovidro em suspensão no grupo D7-D9 (10% de CaBr_2) e no D10-12 (20% de CaBr_2), ambos com a mesma quantidade de biovidro em TRIS (100mg/ml).



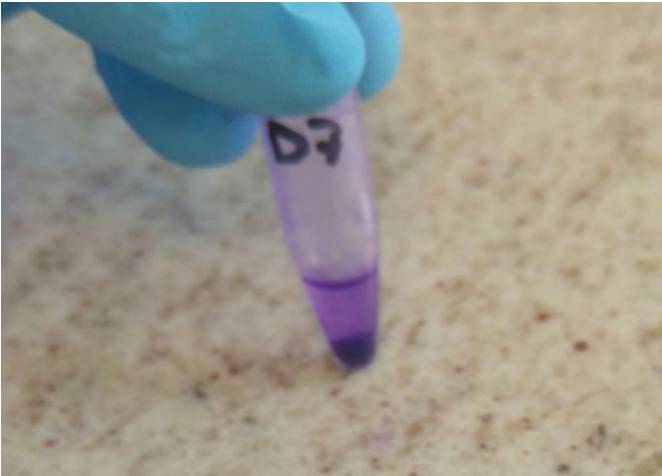
- Formação de biofilme sobre poliestireno

No que diz respeito ao efeito sobre o biofilme, observando-se o gráfico3, a primeira análise é a de que todos os grupos em contato com o biovidro, não importando a concentração de brometo, induziram crescimento de biofilme bacteriano. Nessa parte experimental, alguns problemas técnicos ocorreram. Novamente, pode ter interferido o fato de não se ter conseguido uma solução uniforme de biovidro em TRIS e BHI, já que, como citado anteriormente, o biovidro se deposita no fundo do poço. Em paralelo, notou-se que o próprio pó de biovidro cora em cristal violeta (fig.3). Dessa forma, ao se pipetar o sobrenadante e, posteriormente, o próprio biovidro, lavando a placa, em seguida, com água destilada, é possível que tenha permanecido algum pó de biovidro remanescente, mesmo não se percebendo a olho nu. Por isso, é provável que, ao levar a placa à máquina de leitura DO_{600} após corada por cristal violeta, esse pó residual tenha aumentado o resultado, já que ele é reage ao corante utilizado, mimetizando a leitura de bactérias que teriam

proliferado e se fixado no fundo do poço.

Comparando-se os grupos controle de Clorexidina e Clorexidina + cepa com os do gráfico1, nesse caso a leitura feita foi congruente com o que se espera das propriedades desse material. Isso se deve ao fato de que, após a lavagem da placa em que lá foi depositada, toda a solução foi removida do poço, não havendo interferência da sua pigmentação natural na leitura.

Fig.3- Pó de biovidro do grupo D7 (10% de CaBr_2 , em 100mg/ml de TRIS) corado com cristal violeta 0,1%, depositado no fundo do eppendorf, com sobrenadante lavado em PBS também corado.



- Formação de biofilme sobre biovidro

Finalmente, analisando-se o gráfico4, comparando-se os grupos de pó de biovidro com suas respectivas concentrações de CaBr_2 , infere-se que em todos houve biofilme fixado e que o grupo de concentração 10% de CaBr_2 , em dissolução de 100mg/ml, obteve a maior quantidade. Porém, o que realmente se pode afirmar deste gráfico é a análise qualitativa de que há fixação de biofilme no biovidro, pois em relação à quantidade isto não é possível devido às variáveis do experimento que não foram controladas, citadas anteriormente: a não dissolução do pó em TRIS e em BHI e a reatividade do pó ao corante cristal violeta. Isso induz a concluir que, ao transferir o pó de biovidro para os eppendorfs e lavá-los em seguida com PBS, sempre pipetando e descartando o sobrenadante, as quantidades remanescentes entre os eppendorfs não foram iguais, e como o biovidro cora com o cristal violeta, ao realizar

suas leituras, não se pode concluir que estas sejam somente do biofilme fixado, mas também do pó em conjunto.

Em todos os gráficos foi possível notar um erro de desvio padrão muito alto, o que não permite concluir estatisticamente nenhum valor quantitativo.

2.5-CONCLUSÃO

Para futuras pesquisas, sugere-se que se comece por determinar um método para dissolver adequadamente o pó de biovidro no meio de cultura que deseja utilizar. Pode-se inferir que houve inibição do biofilme, porém não é possível quantificá-la com precisão neste trabalho conforme protocolo realizado.

3 - REFERÊNCIAS

- ALLAN, I; NEWMAN, H; WILSON, M. Antibacterial activity of particulate Bioglass® against supra- and subgingival bacteria. **Biomaterials**, [s.l.], v. 22, n. 12, p.1683-1687, jun. 2001. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0142-9612(00)00330-6. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0142961200003306?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 13 out. 2016.
- Almeida, PF. Microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental. **R. Ci. Méd. Biol.**, Salvador, v. 1, n. 1, p. 33-41, nov. 2002.
- ALVES-REZENDE, Maria Cristina Rosifini; DEKON, Stefan Fiuza de Carvalho; GRANDIN, Carlos Roberto. TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE IMPLANTES DENTÁRIOS: SBF. **Revista Odontológica de Araçatuba**, Araçatuba, v. 32, n. 2, p.38-43, dez. 2011. Disponível em: <<http://apcdaracatuba.com.br/revista/v322jd2011/7-.pdf>>. Acesso em: 28 jun. 2016.
- BEGUM, Saima et al. The influence of pH and fluid dynamics on the antibacterial efficacy of 45S5 Bioglass. **Biomed. Mater.**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.015006-01514, 2 fev. 2016. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1748-6041/11/1/015006>.
- BELLON, P.A. **Síntese do biovidro e sua caracterização**, 2012.59f. Monografia (Graduação do curso de Engenharia Química), Escola De Engenharia De Lorena -Universidade De São Paulo.
- CERRUTI, Marta; GREENSPAN, David; POWERS, Kevin. Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5. **Biomaterials**, [s.l.], v. 26, n. 14, p.1665-1674, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.009>
- CHANG, Po-chun et al. N-Phenacylthiazolium Bromide Inhibits the Advanced Glycation End Product (AGE)–AGE Receptor Axis to Modulate Experimental Periodontitis in Rats. **Journal Of Periodontology**, [s.l.], v. 85, n. 7, p.268-276, jul. 2014. American Academy of Periodontology (AAP). DOI: 10.1902/jop.2014.130554.
- CHATZISTAVROU, Xanthippi et al. Designing dental composites with bioactive and bactericidal properties. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 52, p.267-272, jul. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.msec.2015.03.062. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0928493115002441?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 03 nov. 2015.
- DHIR, Sangeeta. Biofilm and dental implant: The microbial link. **Journal Of Indian Society Of Periodontology**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.5-

11, 2013. Medknow. DOI: 10.4103/0972-124x.107466. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3636945/>>. Acesso em: 09 nov. 2015.

DO, T. et al. Population structure of *Streptococcus oralis*. **Microbiology**, [s.l.], v. 155, n. 8, p.2593-2602, 7 maio 2009. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.027284-0>.

DRAGO, L. et al. Antimicrobial activity and resistance selection of different bioglass S53P4 formulations against multidrug resistant strains **Future Microbiol**, Londres, v.10,n.8 ,p.1293-1299, 2015.

ECHEZARRETA-LÓPEZ, M.m.; LANDIN, M.. Using machine learning for improving knowledge on antibacterial effect of bioactive glass. **International Journal Of Pharmaceutics**, Londres, v. 453, n. 2, p.641-647, set. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.06.036. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0378517313005450?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 23 out. 2015.

HOWLEY, A.C. et al. A MAM7 Peptide-Based Inhibitor of *Staphylococcus aureus* Adhesion Does Not Interfere with *In Vitro* Host Cell Function,**Pols One**,United Kingdom, v.8, 2013.

HU, Sheng et al. Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass®. **J Mater Sci: Mater Med**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.281-286, 3 set. 2008. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-008-3564-5>

JONES, Julian R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.4457-4486, jan. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.08.023. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S1742706112003996?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 05 out. 2015.

LIU, Bo et al. Deep Sequencing of the Oral Microbiome Reveals Signatures of Periodontal Disease. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.1-16, 4 jun. 2012. Public Library of Science (PLoS). DOI: 10.1371/journal.pone.0037919. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0037919>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

MAO, Cong et al. Angiogenesis stimulated by novel nanoscale bioactive glasses.**Biomed. Mater.**,[s.l.], v. 10, n. 2, p.025005-025015, 25 mar. 2015. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1748-6041/10/2/025005>.

MINAMI, J. et al. New approach to use ethidium bromide monoazide as an analytical tool. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 109, n. 3, p.900-909, 16 ago. 2010. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1365-

2672.2010.04716.x. Disponível em:

<<http://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1111/j.1365-2672.2010.04716.x>>. Acesso em: 05 out. 2015.

MUNUKKA, Eveliina et al. Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria. **J Mater Sci: Mater Med**, [s.l.], v.19, n.1, p.27–32, 14 jun. 2007. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-007-3143-1>.

PIMENTA. et al. In vitro identification of two adherence factors required for in vivo virulence of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbes Infect.*, [s.l.], v. 5, n. 13, p.1177-87, 2003.

RAHAMAN, Mohamed N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v.7, n.6, p.2355-2373, jun.2011. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.016>

ROHANOVA, Dana, et al. TRIS buffer in simulated body fluid distorts: the assessment of glass–ceramic scaffold bioactivity, **Acta Biomaterialia**, Oxford, v.7, p.2623-2630, 2011.

ROSSETTI, Valentina et al. Phenotypic Diversity of Multicellular Filamentation in Oral Streptococci. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 9, p.76221-76228, 27 set. 2013. Public Library of Science (PLoS).

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076221>

SILVA, A.C.; APARECIDA, A.H.; BRAGA, F.J.C.; Compositos de hidroxiapatita ossea bovina dispersa em biovidro: desenvolvimento da matriz vítrea silicato-fosfato, **Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência Dos Materiais**, 19, São Paulo, 2010.

TEUGHELDS, Wim et al. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. **Clinical Oral Implants Research**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.68-81, out. 2006. Wiley-Blackwell. DOI:

10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x. Disponível em:

<<http://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>>. Acesso em: 03 dez. 2015.

WALTIMO, T. et al. Antimicrobial Effect of Nanometric Bioactive Glass 45S5. **Journal Of Dental Research**, Amsterdam, v. 86, n. 8, p.754-757, 1 ago. 2007. SAGE Publications. DOI: 10.1177/154405910708600813.

XU, Yu-ting et al. Antimicrobial effects of a bioactive glass combined with fluoride or triclosan on *Streptococcus mutans* biofilm. **Archives Of Oral Biology**, [s.l.], v. 60, n. 7, p.1059-1065, jul. 2015. Elsevier BV.

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2015.03.007. Disponível em:

<<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0003996915000825?httpAc>

cept=text/xml>. Acesso em: 22 nov. 2015.

YAMAGUCHI, H. et al.. The inhibitory effect of chlorhexidine digluconate on dental plaque formation. A scanning and transmission electron microscope study. **Journal of Periodontology**, v. 52, n.10, p. 630-638, October 1981.

ZHU, Hailin et al. Preparation and antibacterial property of silver-containing mesoporous 58S bioactive glass. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 42, p.22-30, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.004>.

4. APÊNDICE

REVISÃO DE LITERATURA

A organização das bactérias na placa dental as proporciona muitas vantagens, tais como a disponibilidade de uma gama mais ampla de habitat para o crescimento (os primeiros colonizadores alteram o ambiente local, tornando as condições mais adequadas para os microorganismos que se instalariam posteriormente), uma maior diversidade e eficiência metabólica e um aumento na resistência ao estresse ambiental, aos agentes antimicrobianos e às defesas do hospedeiro (TEUGHELIS et al., 2006).

O processo de adesão das bactérias pode ser explicado sob o ponto de vista bioquímico ou físico-químico. Sob o primeiro, destaca-se a ligação específica entre componentes complementares de superfície. Nesse processo, as fímbrias e flagelos são essenciais. Mudanças de expressão gênica e a comunicação célula-célula intra e inter-espécies complicam ainda mais a compreensão do processo de adesão e / ou a formação de biofilme. O processo físico-químico de adesão envolve o modelo termodinâmico, baseado nas energias livres interfaciais dos líquidos e na interação de superfícies, ou ainda explica-se sob a teoria na qual a adesão é dada pelas interações eletrostática, Lifshitz-Van der Waals e ácido-base. Os gêneros *Streptococcus* e *Actinomyces*, por exemplo, primeiros colonizadores, ligam-se a moléculas salivares específicas (TEUGHELIS et al., 2006).

Após a formação de uma monocamada na superfície, o biofilme pode começar a partir da multiplicação das espécies já aderidas ou a partir da adesão de novas espécies. Existem 4 fases da formação do biofilme pelo processo físico-químico de adesão: a primeira fase diz

respeito ao transporte da bactéria para a superfície através do movimento browniano, ou pela sedimentação da bactéria através da solução, pelo fluxo líquido, ou ainda pelo movimento ativo bacteriano. A próxima fase seria a adesão inicial, fraca e reversível. A terceira fase ocorre com o estabelecimento firme da bactéria na superfície por interações específicas (ligação covalente, iônica ou de hidrogênio), após o contato entre bactérias e superfície. Após a adesão, os microorganismos começam a secretar muco e se organizam no glicocálice, um importante fator para a virulência por proporcionar proteção contra componentes imunológicos humoral e celular. A última fase do processo seria a colonização/maturação da placa, quando os microorganismos ligados firmemente começam a crescer e as células recém formadas permanecem anexadas, permitindo a formação do biofilme (TEUGHELIS et al., 2006).

O risco de colonização bacteriana também está presente no uso de implantes no organismo. As combinações de drogas /implante ou materiais de implante com propriedades antibacterianas representaria uma abordagem excelente para prevenção de potenciais infecções pós-operatórias (LÓPEZ; LANDIN, 2013). Isso porque, apesar de a osseointegração ao redor do implante dentário ser, em grande parte, influenciada pela sua rugosidade da superfície, quanto maior for a rugosidade da superfície, maior será a taxa de formação de biofilmes em torno do mesmo (DHIR, 2013).

O impacto da rugosidade da superfície sobre a formação de biofilmes pode ser explicado pelo fato de que a aderência inicial de bactérias preferencialmente começa em locais onde são protegidas contra as forças de cisalhamento, de modo que elas encontram o momento de mudar de reversível para fixação irreversível; pelo aumento da rugosidade da superfície propiciar uma maior área disponível para a aderência; e pela razão de que superfícies ásperas são difíceis de limpar, resultando em um re-crescimento rápido do biofilme pela multiplicação das espécies remanescentes (TEUGHELIS et al., 2006).

De acordo com Allan, Newman e Wilson (2001), a propriedade antibacteriana do Bioglass contra certas bactérias supra e subgingivais pode ser uma vantagem para o sucesso da osseointegração, sendo que não é necessário o contato direto da superfície do Bioglass com as bactérias, já que produz uma solução bactericida que age na bactéria alvo a distância.

O nome " Bioglass " foi registrado pela Universidade da Flórida como um nome para a composição original do 45S5 (46,1 mol.% De SiO_2 , 24,4 mol.% De Na_2O , 26,9 mol.% De CaO e 2,6 mol.% De P_2O_5),

o qual se liga com osso rapidamente e também estimula o crescimento ósseo à distância da interface osso-implante. O mecanismo para a ligação óssea é atribuída a uma camada de apatita de hidroxicarbonato (HCA) na superfície do vidro, seguido da sua dissolução inicial. O segundo dispositivo Bioglass 45S5 comercial foi o Endosseous Ridge Maintenance Implant (ERMI) em 1988, que também era um simples cone de Bioglass 45S5. Os dispositivos foram inseridos em locais de extração de dentes para reparar as raízes dos dentes (JONES, 2013).

Reconhece-se que revestimentos bioativos são importantes para implantes metálicos, tais como próteses de quadril e implantes dentários, visto que os metais sozinhos são bio-inertes. Tais revestimentos têm o potencial de melhorar a estabilidade de implantes ligando-os ao osso hospedeiro (JONES, 2013). Ainda sobre a rugosidade de implantes, é dito que o aumento da mesma na superfície do implante aumenta sua molhabilidade, afetando a adsorção de proteínas depositadas e facilitando a aderência de células rugofílicas, como os osteoblastos, e a interação biomecânica do implante com o tecido ósseo. Porém, independentemente da topografia da superfície, sua bioatividade não é o suficiente para, sozinha, induzir formação óssea em um curto período de tempo. Para potencializar as interações entre células periimplantares e a superfície do implante, tem sido desenvolvida a técnica biomimética, na qual utiliza-se a precipitação heterogênea de fosfatos de cálcio, tais como a hidroxiapatita, sobre substratos metálicos em solução de íons semelhante ao plasma sanguíneo (SBF) (REZENDE et al., 2011). A formação da camada de hidroxiapatita na superfície de materiais bioativos acontece através de reações que ocorrem no material e são mais rápidas quanto maior o nível de bioatividade (BELLON, 2012).

De acordo com Hench (1998 apud RAHAMAN et al., 2011), há 5 fases de formação da camada de hidroxiapatita através do biovidro. Primeiro há troca iônica entre Na^+ e Ca^{2+} das partículas do biovidro, com o H^+ da solução, levando à hidrólise dos grupos de sílica e à criação dos grupos de silanol (Si-OH). Em seguida, o aumento do pH leva ao ataque da SiO_2 e à dissolução da sílica na forma de ácido silícico Si(OH)_4 , continuando a formar grupos de SiOH . A terceira fase se trata da condensação e polimerização de uma camada rica em SiO_2 sobre a superfície do vidro. Na quarta fase, através da dissolução do vidro, juntamente com a migração de íons Ca^{2+} e $(\text{PO}_4)^{3-}$ do vidro e da solução sobre a camada de SiO_2 , forma-se uma camada amorfa de fosfato de cálcio. A última fase se dá com a contínua dissolução do vidro enquanto a camada de fosfato de cálcio incorpora $(\text{OH})^-$ e $(\text{CO}_3)^{2-}$ da

solução e cristaliza como uma camada de hidroxiapatita. Peitl et al., (2001 apud BELLON, 2012, p. 27) demonstraram que “no sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$, a quantidade de P_2O_5 influencia positivamente na formação de hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ou seja, na concentração de 6 % de P_2O_5 a formação foi mais rápida (8 h) que na composição sem P_2O_5 (35 h)”.

O índice de bioatividade é descrito como o tempo necessário para ocorrer 50% da ligação interfacial entre um biomaterial e o tecido ósseo. Dessa forma, o biovidro 45S5 é classificado como osteocondutor, ou seja, promovem uma resposta intra e extracelular que permite a colonização da sua superfície por células tronco livres no ambiente defeituoso. Já a cerâmica bioativa e a Hidroxiapatita são classificadas como osteocondutores apenas, permitindo crescimento ósseo ao longo de sua superfície (SILVA; APARECIDA; BRAGA, 2010). De acordo com Mao et al. (2015), os biovidros derivados do processo sol-gel, como o 58S (60 mol% SiO_2 , 36 mol% CaO , 4 mol% P_2O_5), possuem mais nanoporosidades e maior área de superfície, assim como também tamanhos mais controláveis e homogêneos, do que os derivados do processo de fusão, como o 4S5S, o que os torna mais bioativos.

Também Mao et al.(2015), relataram que o biovidro 45S5, além de propriedades antibacterianas, possui capacidade de aumentar a expressão de indicadores angiogênicos, tanto por contato direto quanto indireto das células com suas partículas ou com os produtos da sua dissolução. DAY et al., (2005 apud MAO et al.,2015) constataram aumento da neovascularização em um polímero revestido de biovidro 45S5, após ser implantado subcutâneamente em ratos e houve um aumento significativo na secreção de fator de crescimento endotelial vascular e de fator básico de crescimento de fibroblasto.

Outra composição de vidro bioativo, S53P4 (BAG-S53P4; 53% de dióxido de silício, óxido de sódio 23%, 20% de óxido de cálcio e 4% de pentóxido de fósforo) é também um substituto de osso biocompatível e osteocondutor, com capacidade de ligação óssea, pró-angiogênica, antibacteriana e propriedades antibiofilme. Resultados promissores foram obtidos com este biomaterial no tratamento de osteomielite crônica. Bons resultados a longo prazo foram também observadas no tratamento de fraturas ósseas. A capacidade de BAG-S53P4 para inibir o crescimento bacteriano baseia-se em processos que ocorrem em simultâneo, quando o biovidro reage com os fluidos corporais. Em primeiro lugar, o sódio é liberado a partir da superfície do vidro, induzindo uma elevação do pH. Além disso, o cálcio, os íons fósforo e silício são liberados a partir da superfície, aumentando a

pressão osmótica e criando assim um ambiente hostil para o crescimento bacteriano (DRAGO et al., 2015).

Em tentativas de intensificar a capacidade antibacteriana, alguns estudos acrescentaram a prata ao biovidro, porém sua biocompatibilidade se torna questionável.(2002 BELLANTONE et al. apud WALTIMO et al.,2007). Segundo Waltimo et al., uma alternativa encontrada foi diminuir o tamanho da partícula do biovidro, aumentando a superfície ativa de troca entre o biovidro e o líquido circundante.“Na mesma razão de sólido para líquido (peso / vol), a nanopartícula 45S5 liberou aproximadamente 10 vezes mais sílica para dentro do fluido corporal simulado que o biovidro convencional” (WALTIMO et al.,2007, p. 755).

Estudos analisaram a ação de substâncias como triclosan e fluoreto de sódio juntamente com o Biovidro. A combinação de dois ou três agentes poderiam melhorar a sua eficácia antibacteriana. O objetivo foi comparar os efeitos antibacterianos do BAG 45S5 e dois agentes tradicionais (NaF e TCS) utilizados, quer isoladamente ,quer em combinação em um modelo de biofilme cariogênico. O teste estatístico mostrou que houve diferença significativa ($p < 0,001$) na unidade formadora de colônia (UFC) detectados em três momentos. Comparado com o grupo controle (colônia de bactérias sem tratamento), com o BAG sozinho, e suas duas combinações , foram todos estatisticamente significativos às 6 , 12 e 24 h ($P 0,002$) . Em contrapartida , os grupos de NaF e TCS não apresentaram diferenças significativas , com exceção de NaF em 12 h ($p = 0,01$) . Comparações adicionais entre BAG e suas duas combinações mostraram uma diferença estatisticamente significativa apenas entre BAG e tratamento combinado BAG + NaF às 24 h ($p = 0,001$) (XU et al., 2015) .

As variadas composições do biovidro continuam sendo exploradas e a incorporação do Brometo ao pó do biovidro se deve à sua capacidade de impedir o crescimento bacteriano. De acordo com Chang et al. (2014), o bloqueio dos receptores dos produtos avançados de glicação (RAGEs) permitiu a redução da perda óssea periodontal e da inflamação. Tal fato explica-se pela atividade da AGEs de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Obteve-se como resultado, nesse estudo, a redução da perda óssea periodontal na indução, estabelecimento e na recuperação das fases da periodontite, no grupo tratado com Brometo de N- fenaciltiazolio (PTB). Além deste, no estudo realizado com EMA (brometo de etídio monoácido), foi demonstrado que a amplificação do DNA (50 ciclos) de 10.000.000 células mortas/

ml⁻¹ da bactéria *Enterobacter sakazakii* foi completamente suprimido pelo duplo tratamento com 20 e 10 µg/ml⁻¹ de EMA (MINAMI et al., 2010).

É sabido que a bioatividade do Bioglass ocorre quando este é dissolvido em soluções aquosas, pois nesse estado liberam seus componentes iônicos, aumentando o pH, o qual se torna intolerante para o crescimento bacteriano (WALTIMO et al., 2007).

Em relação a esses meios solúveis do biovidro, durante duas décadas de testes de bioatividade foram realizados em SBF. No entanto, em ensaios *in vitro* para investigar mudanças estruturais em superfícies de vidro, cerâmicas de vidro e cerâmica só foram realizados em soluções de TRIS. Solução TRIS, em combinação com componentes inorgânicos de plasma sanguíneo (SBF + TRIS), reproduz alterações do “in vivo” na estrutura da superfície do material de forma mais precisa. O biovidro é altamente solúvel em soluções que contenham TRIS e, portanto, mesmo uma pequena quantidade do material em uma célula de teste irá perturbar o equilíbrio metaestável da solução e induzirá a precipitação da fase cristalina HAp. Verificou-se que em soluções contendo o tampão TRIS (SBF + TRIS) as fases de dissolução foram essencialmente as fases cristalinas (Na₂O₂CaO₃SiO₂ e CaOSiO₂), mas a fase vítrea residual também foi parcialmente dissolvida. Em soluções que não contêm o tampão TRIS (SBF e H₂O), a única fase de dissolução foi a fase vítrea residual. Verificou-se que a presença do TRIS nas soluções duplica a taxa de dissolução do material (em TRIS o material dissolve a uma taxa de 0,2wt% h⁻¹; na água desmineralizada foi 0,1.% h⁻¹). Este achado está de acordo com os resultados de estudos anteriores, que identificaram o mesmo efeito sobre a dissolução da forma cristalina de b-tricálcio fosfato (ROHANOVA et al., 2011).

Sobre a concentração do biovidro dissolvido, de acordo com Hu et al.(2009), a adesão de bactérias no meio de cultura com biovidro dissolvido é dose-dependente, ou seja, quanto maior for a concentração de partículas de biovidro, maior a adesão. Apesar de Allan et al. (2001 apud BEGUM et al.,2016) afirmarem que o contato direto das bactérias com as partículas de biovidro não serem necessárias para sua atividade antibacteriana, no estudo de Hu et al.(2009), comparações foram realizadas entre soluções de biovidro contendo partículas e soluções sem partículas (extrato). O resultado demonstrou que, na presença destas, o efeito bactericida foi mais eficiente em cada espécie bacteriana. Deduziu-se que a presença de debris do biovidro na superfície de bactérias provoca destruição da estrutura da parede celular. Partículas de 45S5 BAG foram adicionadas a soluções de meio de cultura LB(Luria

Bertani) com 10 ml, obtendo concentração final de 10, 50 and 100 mg/ml. As soluções mais eficientes foram a de 50mg/ml e 100mg/ml. A de 50mg/ml teve 98% de efeito antibacteriano e a maior diferença estatística obteve-se entre bactérias gram-negativas e gram-positivas. Sugeriu-se que a composição da parede celular bacteriana seja a responsável por essa diferença, já que gram-negativas, onde houve maior efeito, são compostas por fosfolipídeos, lipossacarídeos e proteínas e as gram-positivas por peptídeoglicanos em sua grande maioria. Doyle et al. e Hughes et al (1980,1973 apud BEGUM,2016) explicaram que camada de peptidoglicano e ácidos teicóico contribuíram para a ligação de íons de metais (tais como Na e Ca) à parede celular. Isto poderia explicar por que não há inibição de crescimento para *S. aureus*, já que sítios de ligação de metal presentes na parede da célula promovem fixação sobre a superfície de partículas de 45S5 Bioglass.

Em contrapartida, Munukka et al.(2007), testaram concentrações de 100mg/ml, 50mg/ml, 25mg/ml, 12,5mg/ml e 6,25mg/ml de diferentes tipos de pó de biovidro dissolvidos em meios de cultura adequados, como o Ágar, Tryptone Soy Broth (TSB) and Fastidious Anaerobe Broth (FAB). Em sua pesquisa, não houve diferença significativa entre bactérias gram-negativas e gram-positivas, sendo que todos os tipo de biovidro tiveram resposta antibacteriana na concentração de 100mg/ml. Na concentração de 25mg/ml, *Neisseria meningitidis* perdeu totalmente sua viabilidade após 24h, e com as espécies de *Streptococcus sp.*, a viabilidade foi totalmente perdida em torno de 24-72h.

Begum et al.(2016), realizaram uma pesquisa com o intuito de verificar a eficácia antibacteriana do 45S5 Bioglass sob uma variedade de condições clínicas relevantes, como o contato direto ou indireto, efeito dos produtos da dissolução em estado movimentado ou e estático, e elevação ou neutralização do pH, por exemplo. Foi concluído que *S.aureus* teve maior taxa de adesão nas partículas do biovidro, porém estas não obtiveram um forte efeito antibacteriano contra essa espécie. Entretanto, sob condições movimentadas, não estáticas, o efeito antibacteriano foi forte contra *E.coli*. Assim como já era esperado, o pH se tornou mais alcalino com o aumento da concentração de partículas de biovidro na solução. Em condições de pH neutralizado, sob situação estática ou movimentada, o contato direto das partículas de biovidro não tiveram atividade antibacteriana, assim como os produtos da dissolução das partículas do 45S5, contato indireto, também não tiveram. Este

resultado foi aplicado no estudo *in vivo* de Xie et al. (2009 apud BEGUM et al.,2016), no qual o sistema tampão do corpo humano inativa a atividade antibacteriana das partículas do 45S5 Bioglass por impedir o aumento suficiente do pH para tal.

