

ODAIR PIMENTEL MARTINS

**SINTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE VIDROS BIOATIVOS OBTIDOS POR SOL-GEL NO
SISTEMA Si:Ca:P, DOPADOS COM PRATA E TRICLOSAN**

CAMPO GRANDE
2010

ODAIR PIMENTEL MARTINS

**SINTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE VIDROS BIOATIVOS OBTIDOS POR SOL-GEL NO
SISTEMA Si:Ca:P, DOPADOS COM PRATA E TRICLOSAN**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: José Renato Jurkevics Delben

CAMPO GRANDE
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

ODAIR PIMENTEL MARTINS

**SINTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE VIDROS BIOATIVOS OBTIDOS POR SOL-GEL NO
SISTEMA Si:Ca:P, DOPADOS COM PRATA E TRICLOSAN**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maura e Antônio de origem humilde que com seus exemplos de luta e perseverança me inspiraram na realização deste ideal. Faço deles esta conquista como retribuição a todo esforço que fizeram no sentido de prover-me a oportunidade de alcançar o saber.

Aos meus filhos, Ana Carolina, Daniela, Pedro Henrique e Túlio, como exemplo de que o trabalho edificante enaltece o ser humano e o faz transcender os seus limites imaginários.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador José Renato Jurkevics Delben pela oportunidade, pela confiança em meu trabalho e forma como conduziu o desafio da produção de um trabalho interdisciplinar.

À Pollyana Candeloro, amiga e irmã de turma, pela síntese dos compostos estudados neste trabalho e por compartilhar comigo as dificuldades deste percurso. Aos demais colegas do programa com quem compartilhei ansiedades, angústias, e alegrias.

Ao Professor Kennedy Roche, pela gentileza da elaboração da versão em inglês do texto.

Aos técnicos de laboratório de materiais do Departamento de Física da UFMS e da UFSCar pela elaboração das análises que serviram de base de muitas discussões.

À Ms Ana Cláudia do Hospital Regional de Campo Grande – MS, pela cedência de 36 cepas de bactérias isoladas de pacientes hospitalizados nesta instituição.

Ao Programa de Pós-graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste, que através do seu corpo docente nos capacitou para envergar a responsabilidade que este título nos confere.

A todos aqueles, cuja lista é infindável, que me incentivaram dia após dia na consecução deste objetivo de vida.

*"Pouco conhecimento, faz que as criaturas se sintam orgulhosas.
Muito conhecimento, que se sintam humildes.
É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu ,
enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua Mãe."*

(LEONARDO DA VINCI)

RESUMO

Odair, PM. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antibacteriana de vidros bioativos obtidos por sol-gel no sistema Si:Ca:P, dopados com prata e triclosan. Campo Grande, 2010. [Tese de Doutorado - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].**

Infecções associadas a implantes de biomateriais são uma das principais causas de revisão do ato cirúrgico. A natureza química dos biomateriais e a interação com as defesas do organismo favorecem a colonização bacteriana e a criação de biofilmes que dificultam o tratamento antibiótico. A criação de biomateriais resilientes às infecções tem se tornado uma meta da engenharia de tecidos, ciência multidisciplinar que visa o reparo de tecidos danificados ou enfermos e das funções orgânicas. Dentre os novos biomateriais estudados, as biocerâmicas se destacam pelas suas excelentes propriedades físico-químicas e biológicas. Em face de necessidade de criação de biomateriais resilientes à infecção, um novo vidro bioativo em pó foi sintetizado pela rota sol-gel, sistema 60Si:36Ca:4P, estabilizado por tratamento térmico a 600°C por 4 h e dopado com vários teores de prata e triclosan. A caracterização físico-química foi realizada com técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectrometria de Energia Dispersiva, Termogravimetria, Difração de Raios-X e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier. A incorporação de quantidades crescentes de prata resultou em progressiva compactação e organização da matriz vítrea dos compostos. A bioatividade foi demonstrada pela formação de apatitas após imersão por 7 dias em solução de fluido simulado corpóreo (SBF). A atividade antibacteriana demonstrada por meio de um procedimento microbiológico modificado é proporcional à concentração de prata do composto, e a dinâmica de liberação de antimicrobianos em SBF em função do tempo, sugere relação com as reações químicas de troca iônica da bioatividade. Foi demonstrada a adsorção de triclosan à superfície de vidro bioativo e que quando em vidros bioativo dopados com prata o composto final é mais potente que seus componentes isolados, com excelente atividade antibacteriana contra a cepa de *Escherichia coli* ATCC25922 e mais 36 cepas de bactérias isoladas de infecções em pacientes hospitalizados. O composto VB-Ag3%-triclosan possui características que o torna um bom candidato para uso em futuras aplicações de implantes em Medicina e Odontologia, necessitando de testes suplementares *in vivo* para seu uso seguro.

Palavras-chave: vidro bioativo, prata, triclosan

ABSTRACT

Odair, PM. **Synthesis, characterization and evaluation of antibacterial activity of bioactive glass obtained by sol-gel in a, silver and triclosan doped, system Si:Ca:P. Campo Grande, 2010. [Doctoral Thesis – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].**

Infections associated with biomaterial implants are one of the principal causes of surgical revision. The chemical nature of biomaterials and the interaction with the organism's defences favour bacterial colonization and the creation of biofilms which are resistant to antibiotic treatment. The creation of biomaterials resilient to infections has become a goal of the tissue engineering, a multidisciplinary science that goal the repair of damaged tissues and organic functions. Among the new biomaterials being studied, bioceramics stand out due to their excellent physico-chemical and biological properties. In the face of the necessity of creating biomaterials resilient to infection, we synthesized a new bioactive glass in powder form by the sol-gel route, 60Si:36Ca:4P system, stabilized by heat treatment at 600°C during four hours, and doped with various concentrations of silver and triclosan. Physico-chemical characterization was carried out with Scanning Electron Microscopy, Energy-dispersive X-ray Spectroscopy, Thermogravimetry, X-Ray Diffraction, and Infrared spectroscopy with Fourier Transform. The incorporation of increasing quantities of silver resulted in progressive desinfection and organization of the glass matrix of the compounds. Bioactivity was demonstrated by the formation of apatite after immersion for seven days in simulated body fluid (SBF). Antibacterial activity, demonstrated by means of a modified microbiological procedure, was found to be proportional to the concentration of silver in the compound. The temporal dynamics of antimicrobial agent liberation into the SBF suggest a relationship with the ion exchange chemical reactions of the bioactivity. Absorption of triclosan to the surface of the bioactive glass was demonstrated when using bioactive glass silver doped. The antibacterial activity of final compound was found to be more intense than its isolated components, with excellent activity against the *Escherichia coli* ATCC25922 strain and another 36 bacterial strains isolated from infections of hospitalized patients. The compound VB-Ag3%-triclosan has characteristics that make it an excellent candidate for use in medical and orthodontic implants, after additional tests *in vivo* to ensure its safe use.

Key-words: bioactive glass, silver, triclosan

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Incidência de infecções associadas à biomateriais segundo o local de implantação.....	27
Tabela 2 -	Incidência de bacteremias transitórias associadas à função, procedimentos de saúde bucal ou intervenções odontológicas.....	34
Tabela 3 -	Usos e aplicações mais comuns para a prata.....	40
Tabela 4 -	Concentração iônica do plasma sanguíneo humano e SBF.....	58
Tabela 5 -	Relação de biocerâmicas com diferentes fontes e concentrações de prata, incorporadas e efeito sobre a bioatividade avaliada <i>in vitro</i> , de segundo vários autores.....	65
Tabela 6 -	Relação dos componentes utilizados na síntese e dopagem de VBs, procedência, pureza e quantidades.....	70
Tabela 7 -	Representação dos grupos funcionais e seus respectivos modos vibracionais.....	90
Tabela 8 -	Comportamento de VB sem e com diferentes concentrações de prata em relação á bioatividade e pico máximo de atividade antibacteriana em sistema fechado (SF) e sistema aberto (SA) de dissolução, aferidas em Unidades Inibitórias (UIn).....	105
Tabela 9 -	Reagentes para a preparação de SBF (pH7.4, 1L).....	139
Tabela 10 -	Peso em mg, média e desvio padrão (dp) após secagem a 50° C por 12 horas de 20 amostras de 100µl cada de uma suspensão de SBF contendo 10 mg.mL ⁻¹ de VB.....	140
Tabela 11 -	Distribuição de frequências (N=20),média, desvio padrão e mediana de diâmetros (nm) de partículas primárias da superfície de amostras de VB sem (VB0) e com 1, 3, 5mol % de prata.....	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema representativo das forças de interação entre as superfícies de materiais e corpos bacterianos.....	28
Figura 2 -	Freqüência das principais espécies bacterianas isolados de infecções associadas a implantes ortopédicos.....	36
Figura 3 -	Fórmula plana da molécula de triclosan ($C_{12}H_7Cl_3O_2$).....	49
Figura 4 -	Representação esquemática da estrutura vitro-cerâmica	60
Figura 5 -	Comportamento de vidros bioativos obtidos por fusão com diferentes composições relativas.....	60
Figura 6 -	Aspecto visual (i) e sob ampliação ótica (ii,iii,iv) do VB em pó, obtido por sol-gel no sistema $SiO_2:CaO:P_2O_5$, sinterizado a 600°C.....	79
Figura 7 -	Fotomicrografia da MEV de grânulos de VB sem prata, aumento x 500.....	82
Figura 8 -	Fotomicrografia da MEV das partículas primárias de VB sem prata. Aumento x 10.000.....	82
Figura 9 -	Fotomicrografia da MEV de grânulos de VB com 1 mol% de prata. Aumento x 500.....	83
Figura 10 -	Fotomicrografia da MEV de partículas primárias de VB com 1 mol % de prata. Aumento x10.000.....	83
Figura 11 -	Fotomicrografia da MEV de grânulos de VB com 3 mol % de prata. Aumento x 500.....	84
Figura 12 -	Fotomicrografia da MEV de partículas primárias de VB com 3 mol % de prata. Aumento x10.000.....	84
Figura 13 -	Fotomicrografia da MEV de grânulos de VB com 5 mol % de prata. Aumento x 500.....	85
Figura 14 -	Fotomicrografia da MEV de partículas primárias de VB com 5 mol % de prata. Aumento x10.000.....	85
Figura 15 -	Espectro de raios-X de energia dispersiva da amostra de VB semprata.....	86
Figura 16 -	Análise termo-gravimétrica (TG) de VBs com diferentes concentrações de prata.....	87
Figura 17 -	Curvas de absorção por IVTF de VB com diferentes concentrações de prata, para amostras secas a 130° C e a 600°C.....	89
Figura 18 -	Picos de absorção no infravermelho de VB com 0,1, 3 e 5% mol prata.....	90

Figura 19 -	Difratograma de Raio-X de VB dopado com prata, e picos de cristalização de SiO ₂ (△), prata(■) e hidroxiapatita(★).....	91
Figura 20 -	Fotomicrografia da MEV de grãos de VB dopados de triclosan.....	93
Figura 21 -	Espectro de Raios-X Energia Dispersiva de uma amostra de VB dopado com triclosan.....	94
Figura 22 -	Análise termogravimétrica de uma amostra de VB dopado de triclosan e de triclosan puro.....	94
Figura 23 -	DRX entre 30 e 34°, da amostra de VB-Ag 5 mol % durante 7 dias de dissolução em SBF.....	96
Figura 24-	Espectro de raios-X de energia dispersiva da amostraVB-Ag 5%, após 1 dia em SBF.....	97
Figura 25 -	Teste proposto para avaliação do número de Unidades Inibidoras (UIn) através da técnica das diluições seriadas em microplaca.....	99
Figura 26 -	Títulos de atividade antibacteriana contra <i>Escherichia coli</i> em sistema de amostragem fechado de VB com diferentes concentrações de prata.....	100
Figura 27 -	Títulos de atividade antibacteriana contra <i>Escherichia coli</i> em sistema aberto das frações líquidas obtidas de quatro compostos de VB com prata.....	102
Figura 28 -	Títulos de atividade antibacteriana contra <i>Escherichia coli</i> em sistema fechado, de VB e VB dopado com triclosan.....	106
Figura 29 -	Títulos de atividade antibacteriana contra <i>Escherichia coli</i> em sistema fechado, das amostras de VB, VB-Ag3%, VB-triclosan e VB-Ag3%-triclosan.....	109
Figura 30 -	Teste de inibição em ágar Agar Muller Hinton de VBe VB-Ag3%-triclosan, semeadas com 36 cepas de bactérias isoladas de infecções em pacientes hospitalares.....	110
Figura 31 -	Fotomicrografia de MEV das áreas dos grãos onde foram feitas as morfometrias das partículas primárias.....	124
Figura 32 -	Replicador de Stirrer de fabricação própria com seção transversal de 3 mm, para múltiplos inócuos na técnica de inibição em ágar.....	144

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l	Microlitro
ATCC	<i>American Type Culture Colection</i>
$^{\circ}$ C	Celsius
CDC	Centers of Desease Control and Prevention
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CuK	Radiação Cobre K alfa
DL50	Dose Letal 50%
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DRX	Difração de Raio X
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administrattion
g	Gramma
h	Hora
HA	Hidroxiapatita
IVTF	Infra Vermelho por Transformada de Fourier
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
KV	Kilovolt
M	Mol
mA	Miliamperes
m μ M	Milimicromóis
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nm	Nanometro
OFP	Oxigênio Formador de Ponte
ONFP	Oxigênio Não Formador de Ponte
pH	Concentração Hidrogeniônica
SBF	Simulated Body Fluid
SUS	Sistema Único de Saúde
TEOS	Tetraetilortosilicato
TEP	Tetraetilfosfato

TG	Termogravimetria
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRIS	Hidroximetil aminometano
VB	Vidro bioativo
VB-Ag(n)%	Vidro Bioativo dopado com (n)% prata
VB-Ag(n)%tri	Vidro Bioativo dopado com (n)% de prata e com triclosan

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 Infecções associadas à biomateriais	26
2.2 A prata e seu uso em biomateriais	37
2.3 Triclosan: descrição e uso em biomateriais	49
2.4 Vidros bioativos e bioatividade	55
3 OBJETIVOS	67
4. MATERIAIS E MÉTODOS	68
4.1 Síntese do vidro bioativo pela técnica sol-gel e dopagem com prata	68
4.2 Dopagem do VB com triclosan	69
4.3 Caracterização físico-química dos VB	70
4.3.1 Caracterização morfológica do VB	70
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	70
4.3.3 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	71
4.3.4 Análise Termogravimétrica (TG)	71
4.3.5 Espectroscopia de Adsorção no Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (IVTF)	72
4.3.6 Difractometria de Raios-X (DRX)	72
4.4 Avaliação <i>in vitro</i> da bioatividade dos VBs	73
4.5 Avaliação da atividade antibacteriana	73
4.5.1 Titulação do N^o de Unidades Inibitórias	75
4.5.2 Técnica da difusão em Agar	77
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1 Caracterização ótica do VB	79
5.2.1 Caracterização pela MEV	80
5.2.2 Caracterização por EDS	81
5.2.3 Comportamento termogravimétrico	86
5.2.4 Espectroscopia Infra-Vermelho por Transformada de Fourier	88
5.2.5 Difractometria de Raios-X	90
5.3 Caracterização do VB dopado com triclosan	92
5.4 Avaliação da bioatividade	95
5.5 Avaliação da atividade antibacteriana	97
5.5.1 Titulação pelo número de Unidades Inibitórias	98

5.5.1.1 Titulação do VB dopado com prata.....	98
5.5.1.2 Titulação do VB dopado com triclosan.....	105
5.5.1.3 Titulação do VB dopado com prata e triclosan.....	107
5.5.2 Teste de Inibição e Ágar.....	110
6 CONCLUSÕES.....	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
ANEXOS.....	139

1. INTRODUÇÃO

A principal causa de incapacidade funcional de órgãos e tecidos é o envelhecimento, um processo natural de todos os seres vivos, resultado do desgaste orgânico em função do tempo e por falha dos processos bioquímicos de reparação. Além desse processo natural, as doenças infecciosas, degenerativas, iatrogênicas e traumáticas, resultantes do grande potencial de mutilação que o ser humano desenvolveu ao longo de sua história, aumentam estas causas. Como consequência importante parte da população em idade ativa para o trabalho é perdida, elevando o contingente de inválidos que dependem da previdência social, o que configura um grave problema de custo muito elevado.

De acordo com Langer (2000), anualmente são gastos em saúde nos EUA mais de 400 bilhões de dólares, em problemas como perdas de tecidos ou falhas orgânicas. Aproximadamente 8 milhões de procedimentos cirúrgicos são realizados anualmente, que necessitam de 40 a 90 milhões de dias de internação hospitalar para cuidados médicos associados (LANGER & VACANTI, 1993).

Segundo Marinho (2010), o Brasil ocupa o segundo lugar mundial em número de transplantes perdendo apenas para os Estados Unidos. Em 2005, os EUA realizaram 28.108 transplantes, enquanto que no mesmo ano, o Brasil realizou 15.527, sendo 11.095 pagos pelo SUS com um custo da ordem de R\$ 521,8 milhões, o que representou um aumento de quase 30% em relação ao ano anterior. Já em 2008, o número de transplantes aumentou para 19 mil. Enquanto nos EUA o paciente arca diretamente com os custos de forma particular, por meio de planos de saúde, ou ainda no caso dos muito pobres através dos programas governamentais assistenciais, no Brasil, em média, noventa por cento das cirurgias que envolvem transplantes ou implantes são cobertos financeiramente pelo Governo, o que se constitui em um gasto considerável dos recursos públicos destinados com a Saúde.

Dentre os procedimentos cirúrgicos que visam restaurar as funções fisiológicas e anatômicas de tecidos danificados ou irremediavelmente perdidos

destacam-se os implantes, transplantes e enxertos. Implantes são dispositivos médicos feitos para substituir ou atuar como uma estrutura biológica ausente do corpo. Os mais comuns são as próteses de articulações e as dentárias. Um transplante é a substituição de um órgão ou parte dele, como o de rins e de coração. Em medicina, a denominação “enxerto” é utilizada para designar um procedimento cirúrgico para transplantar tecidos sem nutrição sanguínea. O tecido obtém a vascularização sanguínea a partir de um novo leito vascular(HENCH, 1998a).

Segundo Thomas (2005), os enxertos cirúrgicos de tecidos podem ser classificados de acordo com a sua origem em:

- autoenxertos; quando o material é retirado do mesmo paciente.
- aloenxertos; quando o material é retirado de outro doador da mesma espécie.
- xenoenxertos; quando o material é retirado de outra espécie animal.

Os autoenxertos são reconhecidos como o procedimento padrão de reparo para a maioria das indicações médicas. Entretanto, possuem limitações conhecidas tais como a necessidade de uma primeira cirurgia para a retirada do enxerto, limitações quanto ao seu tamanho e ou volume, muitas vezes inadequados ao local a ser tratado. Os aloenxertos apresentam maior disponibilidade para uso imediato, mas também possuem maior risco para a transmissão de infecções latentes e de reações de rejeição imunológica. Os xenoenxertos, ou seja, materiais originários de outras espécies animais apresentam grande disponibilidade para uso, mas como no caso anterior, têm problemas associados com rejeição e transmissão de agentes infecciosos (BREKKE & TOTH, 1980;THOMAS, 2005).

O reparo ou regeneração óssea é um problema clínico comum e complicado na cirurgia ortopédica. Todo ano milhões de pessoas sofrem defeitos ósseos que variam de traumatismos severos, tumores, infecções ou doenças ósseas que necessitam de intervenção para prover o paciente de continuidade esquelética adequada e suporte mecânico. Entretanto muitas morrem por insuficiência de um reparo ósseo adequado ou por complicações advindas das extensas cirurgias ortopédicas a que foram submetidas (MURUGAN & RAMAKRISHNA, 2004).

Segundo Coleman & Nicholson, (2006), aproximadamente 90% da população com idade superior a 40 anos, sofre com algum tipo de degeneração óssea. Por outro lado, a expectativa de vida das pessoas em alguns países tem alcançado mais de 80 anos, o que faz com que muitas atinjam um excessivo desgaste de suas articulações. Com o aumento da idade começam a ocorrer falhas nos processos de reparação, infecções, injúrias por carga excessiva e em função da diminuição da compleição física. Em muitos destes casos, o enxerto ósseo é a indicação terapêutica de escolha.

A revolução tecnológica das últimas décadas associada à tendência da multidisciplinaridade gerou importantes avanços na área da biotecnologia. Um deles é a criação da engenharia de tecidos, nova área de conhecimento multidisciplinar, que integra as ciências da vida (biologia celular, bioquímica, imunologia, microbiologia e fisiologia) com a física e as engenharias (bioquímica, ciência de biomateriais, engenharia biomédica e química) visando desenvolver materiais e métodos para reparar o tecido danificado ou enfermo e para criar substitutos completos desses tecidos e reparar funções orgânicas (PUTNAM & MOONEY, 1996; VATS, *et al.*, 2003).

A escassez de materiais biológicos para atender a demanda clínica crescente de reparos em pacientes necessitados de implantes e enxertos e a necessidade de estender a vida útil destes materiais pelo aumento da expectativa de vida da população, tem aumentado o uso de aplicações artificiais. Entretanto, somente 10% dos procedimentos de enxertos são realizados com materiais sintéticos, principalmente porque ainda é senso comum dos especialistas que os materiais de enxerto sintético possuem qualidade inferior aos alo ou autoenxertos (VACANTI & LANGER, 1999).

Biomateriais são definidos como compostos sintéticos ou naturais utilizados na substituição de tecidos ou órgãos, visando a recuperação de sua função, ou para fins estéticos. Eles entram em contato permanente ou temporariamente com os tecidos do organismo e devem apresentar características apropriadas aos fins propostos (SIVAKUMAR, 1999).

Alguns materiais ao serem implantados no organismo, estimulam uma reação de rejeição do organismo, que na tentativa de livrar-se deste corpo estranho começa a formação de um tecido fibroso que freqüentemente o encapsula, impedindo a sua incorporação aos tecidos adjacentes (HENCH & WILSON, 1984). Esta condição é indesejável e é a causa de muitos fracassos de implantes (MURUGAN & RAMAKRISHNA, 2004).

O termo biocompatibilidade foi citado pela primeira vez em 1970 por Hegyeli (1970), e seu uso e sentido vêm sendo adaptado por vários autores. Segundo Keong, biocompatibilidade é definida como a capacidade de um biomaterial ser assimilado pelo organismo sem apresentar toxicidade, estimular inflamação ou rejeições (KEONG & HALIM, 2009).

A primeira geração de biomateriais foi criada nos anos 60 e 70 e tinha como meta a “inatividade ou inércia” orgânica de modo a reduzir ao mínimo o desenvolvimento de reações do sistema imune ao corpo estranho. Isto permaneceu válido por 21 anos durante os quais dezenas de milhões de pessoas tiveram sua qualidade de vida aumentada pelo uso de implantes feitos com materiais inertes (HENCH & POLAK, 2002). Com a descoberta de que alguns biomateriais tinham a capacidade de formar “pontes” químicas com os tecidos adjacentes e com o uso clínico destes materiais no começo dos anos 80, teve início a segunda geração de biomateriais. Nesta fase buscava-se uma resposta específica do biomaterial que poderia ser a sua fixação aos tecidos do paciente ou mesmo a sua dissolução e substituição por tecido saudável. As “pontes” constituem-se em forças químicas que unem o enxerto aos tecidos, garantido a sua fixação (HENCH & PASCHALL, 1974). Entretanto, é importante lembrar que nem sempre a bioatividade é desejada haja vista que, em muitas oportunidades a condição de ausência completa de reatividade ou inércia é necessária, como no caso de implantes oculares de cristalino, lentes oftálmicas, etc.

Na história da evolução dos biomateriais a terceira geração está sendo caracterizada por aplicações que visam estimular respostas específicas a nível

molecular (NAVARRO, *et al.*, 2008). Duas rotas alternativas se apresentam para a consecução destes objetivos. Na primeira, moldes de materiais biodegradáveis que mimetizam a estrutura dos tecidos são combinados com células especializadas do hospedeiro *in vitro* e implantados *in vivo* no paciente, para a formação de um novo tecido saudável. Com o tempo o molde é reabsorvido e substituído por tecidos do hospedeiro incluindo suprimento sanguíneo e inervações. Os tecidos construídos por engenharia adaptam-se ao ambiente fisiológico promovendo um reparo duradouro. As aplicações clínicas incluem: reparo de cartilagem auricular, pele e sistema vascular (HENCH & POLAK, 2002; JONES, 2007). A segunda rota envolve o uso de biomateriais em forma de pó, soluções ou micropartículas para estimular uma resposta de reparação tecidual local. Materiais bioativos liberam drogas sob condições controladas na forma de produtos de sua dissolução iônica ou fatores de crescimento como proteínas morfogenéticas que estimulam a osteogênese (HENCH & POLAK, 2002).

Dentre as classes de biomateriais, tem crescido o interesse pela utilização das cerâmicas pelo seu grande potencial de uso clínico, que tem sido motivado principalmente pelo aumento da taxa de falhas em próteses metálicas ou poliméricas (HENCH & WILSON 1996).

Cerâmicas são sólidos inorgânicos mantidos juntos por ambas, ligações covalentes e iônicas, compostas por elementos metálicos ou não em combinação com oxigênio, nitrogênio, silício ou carbono, obtidas originalmente por fusão de seus constituintes. Muitas são baseadas em silicatos, alumi-silicatos, boratos e zirconatos e dependendo da composição são caracteristicamente duras, quimicamente inertes e termo resistentes (COLEMAN & NICHOLSON, 2006).

As biocerâmicas, são cerâmicas com aplicações em medicina/odontologia e conseguem agregar propriedades biológicas como a biocompatibilidade, bioatividade, capacidade de osteoindução, osteocondução, osteoprodução, e ainda degradabilidade controlada, o que coloca este biomaterial entre os de maior potencial de desenvolvimento em novas aplicações (BAYAZIT, *et al.*, 2010). Entre as biocerâmicas tem sido bastante explorada a capacidade dos Vidros Bioativos (VB)

adaptarem-se a diversas condições fisiológicas importantes nos processos de implantes.

Com o desenvolvimento da técnica sol-gel, tornou-se mais fácil a obtenção de vidros bioativos e o desenvolvimento de novas composições. As suas principais vantagens sobre os procedimentos tradicionais de fusão são, a possibilidade do uso de baixas temperaturas, a maior homogeneidade de composição, a possibilidade de controle do tamanho da porosidade e do tamanho de partículas. Estas variáveis têm grande importância na taxa de dissolução de vidros bioativos em fluidos biológicos e na sua bioatividade o que é uma grande vantagem em relação ao procedimento tradicional (GUPTA & KUMAR, 2008).

Vidros bioativos podem ser dopados (acrescidos de pequenas quantidades de até 5%) com substâncias de interesse na promoção da homeostasia orgânica. A liberação destas substâncias durante os processos de dissolução nos fluidos corporais pode ser controlada mediante a variação da formulação dos VBs. Estas drogas incluem agentes para controlar infecções, inflamações, promoção do crescimento ósseo como peptídeos, proteínas morfogenéticas, fatores de crescimento e outros agentes osteogênicos (GUPTA & KUMAR, 2008).

A despeito de todos os avanços obtidos no desenvolvimento de novos biomateriais, alguns problemas ainda preocupam os médicos e cirurgiões dentistas. Um dos mais importantes fatores de risco da cirurgia ortopédica é a infecção associada ao implante. Ader & Bernard (2005), em extensa revisão sobre infecções associadas à biomateriais ortopédicos, relata que os biomateriais usados em ortopedia possuem características superficiais que facilitam a adesão mediada por adesinas bacterianas, que se ligam às proteínas da interface do implante. As colônias bacterianas formam um biofilme recoberto por um limo para a sua proteção, podendo então entrar em um estado reversível de crescimento estacionário. Desta forma perpetuam-se de forma silenciosa no implante, podendo retomar seu crescimento e expansão em outra oportunidade favorável.

Casos de infecções relacionadas a dispositivos médicos tais como articulações artificiais, válvulas cardíacas, e cateteres são freqüentes (SCHIERHOLZ, 2001). Mesmo com o uso de todas as medidas de controle de infecção no pré-operatório e um ambiente cirúrgico submetido a fluxo laminar de ar, o risco de uma infecção é ainda em torno de 1% para implantes de quadril e ombro e 2 % para joelho. Com mais de 200.000 implantes de quadris e joelhos realizados a cada ano somente nos EUA, os custos hospitalares com o desenvolvimento destas infecções tornam-se consideráveis (SCHIERHOLZ, 2001).

Uma possível explicação para a dificuldade de controle de infecções associadas á implantes é o fenômeno da translocação bacteriana (GUO, *et al.*, 1993a). Estes autores demonstraram que a implantação intra-abdominal de biomateriais estimula a migração bacteriana a partir dos intestinos e colonização bacteriana em sua superfície.

Outro problema das infecções associadas á implantes, é o fato destas serem extremamente resistentes a antibióticoterapia (SMITH, 2005). Presume-se que a deficiência ou ausência de condutividade celular e de circulação sanguínea do implante facilita o isolamento das bactérias da circulação e das defesas do sistema imunológico. Estas infecções persistem até que o biomaterial ou corpo estranho seja removido cirurgicamente, o que é o procedimento padrão (GRISTINA & SHERK, 2004, SCHIERHOLZ, *et al.*, 2004).

A presença de infecções persistentes e de difícil tratamento tem motivado alguns autores a adotarem a estratégia do desenvolvimento de biomateriais resilientes (resistentes) as infecções (SCHIERHOLZ, *et al.*, 2004). Isto pode ser alcançado pela mudança das características físico-químicas de suas superfícies (GOTTENBOS, *et al.*, 2003) visando dificultar a adesão da bactéria ao biomaterial, ou ainda pelo recobrimento ou incorporação de substâncias antimicrobianas como óxido nítrico (NABLO, *et al.*, 2005).A literatura é extensa em citações de incorporação de antibióticos (NEUT, *et al.*, 2003;MAKINEN, *et al.*, 2005;ANTOCI, *et al.*, 2008) e outras substâncias antimicrobianas (CHOU, *et al.*, 2010) aos

biomateriais. Entretanto, dentre elas, a prata se destaca como um dos mais usados pelas suas propriedades antimicrobianas e baixa toxicidade.

De acordo com o *Web of Science* (WS) em pesquisa realizada em julho de 2010, cerca de 70 trabalhos científicos foram publicados no período de 1998 a 2009 que abordam a presença de prata em algum tipo de biomaterial. A maior parte deles, ou seja, quase 48% são dos últimos três anos o que mostra um crescente interesse na utilização deste metal em biomateriais.

Não obstante ao potencial de uso, nota-se que bactérias podem desenvolver mecanismos de resistência à prata após exposição prolongada, assim como ocorre com os antibióticos. Em um estudo sobre a prevalência de genes de resistência a prata em 112 bactérias isoladas de feridas de pele de pacientes internados na clínica de diabéticos do *Hospital Geral de Tameside-UK*, foram isoladas duas cepas de *Enterobacter cloacae*, ambas portadoras de genes de resistência a prata (PERCIVAL, *et al.*, 2008). Na instituição era freqüente o uso de bandagens impregnadas de prata para tratamento das feridas.

A utilização da prata como agente antimicrobiano oferece muitas vantagens e poucos riscos, entretanto é importante ter em consideração que a pressão seletiva exercida pelo seu uso intensivo contribui para o surgimento de cepas resistentes, o que deve ser levado em consideração na adoção de medidas de controle de infecção.

O triclosan ou argasan é um produto bem conhecido e largamente utilizado como antimicrobiano de amplo espectro em sabões, pastas de dente, tecidos e polímeros sintéticos e que vem também sendo utilizado para aumentar a resiliência de biomateriais a infecções. Uma revisão sobre o período de 1997 a 2010 no WS evidenciou a existência de 46 artigos científicos publicados que abordam a aplicação de triclosam em dispositivos médicos ou odontológicos, sendo que estes são 29 patentes, 13 artigos simples e 3 revisões.

Como virtualmente as bactérias desenvolvem resistência a todas as drogas utilizadas no seu controle, o uso indiscriminado de triclosan tem levado também ao

aparecimento de cepas com tolerância (COTTELL, *et al.*, 2009) ou com resistência a esta droga (CHEN, *et al.*, 2009).

Reconhecida como uma estratégia eficiente no controle da resistência antimicrobiana, o uso de uma combinação de duas ou mais drogas ativas com a finalidade de reduzir-se a probabilidade da emergência de sub-populações microbianas resistentes tem se tornado em uma prática comum em terapia. Este princípio é aplicado quando do uso clínico da combinação de diferentes classes de antibióticos que atuam separadamente com mecanismos de ação diferentes no tratamento das doenças infecciosas (TAVARES, 2001).

Stopek *et al.*(2009) apresentaram uma patente em 2009, com uma nova classe de sais resultantes da interação de prata e triclosan. Os autores relatam que estes sais exibem grande eficácia antimicrobiana contra microrganismos por períodos prolongados de tempo com perdas mínimas do agente antimicrobiano da superfície do material. Entretanto não há descrição precisa do princípio ativo nem uma caracterização da atividade antibacteriana.

Até o presente momento não foram encontradas na literatura citações sobre a utilização conjunta de triclosan e prata na composição de vidros bioativos. Ante ao exposto, acredita-se que o desenvolvimento de novos compostos resistentes às infecções associadas à biomateriais constitui-se em uma necessidade premente no atual estágio de desenvolvimento dos biomateriais de uso médico e odontológicos.

Assim, será apresentada a seguir uma revisão abordando aspectos relacionados a (i) vidros bioativos e bioatividade, (ii) infecções associadas a biomateriais, (iii) prata e seu uso em biomateriais (iv) e sobre o triclosan. Em seguida na metodologia será descrito os processos de síntese de vidros bioativos pela rota sol-gel, a dopagem inicial com prata e posteriormente com o triclosan, a caracterização físico-química dos produtos e a avaliação da cinética da atividade antimicrobiana frente a uma cepa padrão de *Escherichia coli*. Por fim os resultados obtidos, discutidos à luz dos conhecimentos contidos na literatura citada, as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecções associadas à biomateriais

Um dos maiores obstáculos no uso de implantes em ortopedia ou odontologia é a ocorrência de infecções associadas à biomateriais (GOTTENBOS, *et al.*, 2002; SCHIERHOLZ, *et al.*, 2004; GRISTINA & SHERK, 2004). A incidência deste tipo de infecção varia de 4% no caso de próteses de quadril (DANKERT, *et al.*, 1986) a 100% no caso de cateteres urinários com mais de 3 semanas de uso (DENSTEDT, *et al.*, 1998) e depende do tipo de material, local e tempo de implantação. Segundo Gottenbos *et al.* (2002), a incidência média de infecções varia acentuadamente entre os diferentes sítios de implante, conforme mostrado na tabela 1.

A instalação das infecções após o implante de biomateriais é um processo complexo e dependente de uma série de fatores intrínsecos interligados a superfície do material implantado, a resposta imunológica do hospedeiro e a capacidade de adaptação do microrganismo invasor. O processo de adesão bacteriana a superfícies de biomateriais é mediado por interações específicas entre as estruturas da superfície celular e grupos específicos na superfície do substrato (CHRISTENSEN, *et al.*, 1989) ou quando avaliado pelo ponto de vista físico-químico, por forças de interação não específicas, incluindo força Lifshitz-Van der Waals, forças eletrostáticas, interação ácido-base e forças de movimento Browniano (VAN OSS, 2003). Interações específicas ocorrem em regiões superficiais altamente localizadas com interações a distâncias menores que 5 nm, enquanto que forças de interação inespecíficas têm um caráter de maior espectro e originam-se de um conjunto de interações superficiais que ocorrem entre 10 a 50 nm.

Tabela 1 - Incidência de infecções associadas à biomateriais segundo o local de implantação, adaptado de Gottenbos, *et al.*(2002).

Local	Implante ou dispositivo	Incidência (%)
Trato urinário	Cateter urinário	10-20
	Percutâneo	Cateter venoso
Subcutâneo	Marca passo temporário	4
	Cateter de diálise peritonial	3-5
	Marca passo cardíaco	1
Sistema Circulatório	Lentes intra-oculares	0,1
	Válvula de prótese cardíaca	1,8
	Válvula múltipla cardíaca	3,6
Ossos	Coração artificial *	40
	Prótese de quadril	2,6-4
	Prótese total de joelho	3,5-4

(*) de experimentos em bovinos e ovinos.

A figura 1 mostra um esquema que representa as principais forças físico-químicas de atração que contribuem para a adesão bacteriana (GOTTENBOS, *et al.*, 2002). Quando um microrganismo se aproxima de uma superfície, poderá ser atraído ou repellido dependendo dos diferentes tipos de forças de interação inespecíficas. Portanto é grande a importância da superfície físico-química do material, com ou sem filme condicionante ou células epiteliais neste processo (BUSSCHER & WEERKAMP, 1987)

Na tentativa de reparar o trauma do implante o organismo responde ativamente mediando reações inflamatórias e histológicas para integrar ou isolar o corpo estranho encontrado. A integração tecidual de um biomaterial depende da habilidade das células teciduais ligarem-se quimicamente as entidades moleculares de suas membranas à superfície dos biomateriais. Além disso interações entre células bacterianas ou células de tecidos à superfície de um substrato dependem intensamente da natureza da superfície, sua estrutura atômica e da composição do biomaterial implantado (KASEMO & LAUSMAA, 1986).

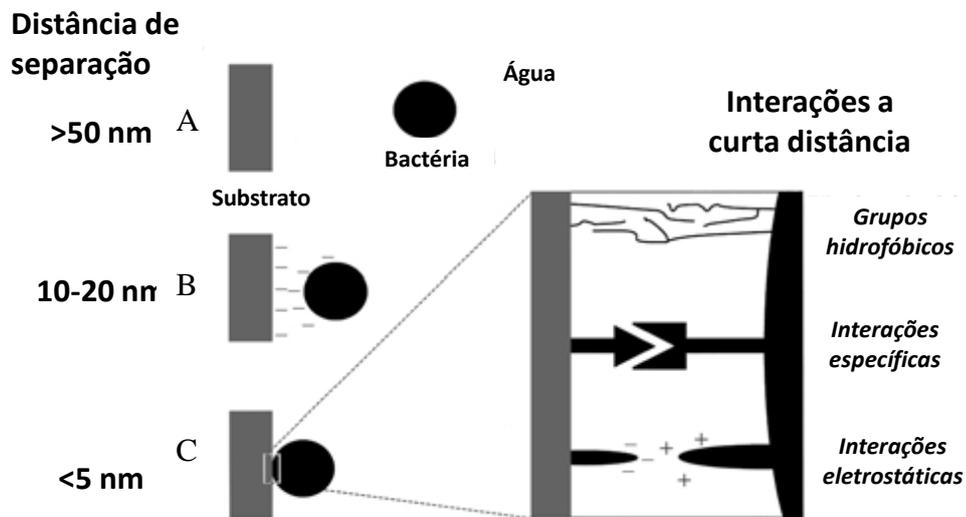


Figura 1 - Esquema representativo das forças de interação entre as superfícies de materiais e corpos bacterianos. Em (A) com > 50nm, forças de Van der Waals , em (B) com 10-20 nm, forças de Van der Waals e forças eletrostáticas repulsivas e em (C) com < 5 nm, interações a curta distância com ligação da bactéria á superfície do material. Adaptado de Gottenbos *et al.* (2002).

Gristina & Sherk (2004), sugerem que superfícies de biomateriais são disputadas entre as células de integração tecidual e as de colonização microbiana sendo que a perturbação das defesas imunológicas do hospedeiro constitui um fator vital. Se a disputa for vencida pelos tecidos adjacentes então a superfície é recoberta e defendida, portanto menor será a probabilidade de colonização bacteriana.

Em condições normais o hospedeiro interage ativamente com o biomaterial, principalmente quando este é implantado em seu interior. A coagulação e a ativação do sistema complemento conduzem a formação de uma rede de fibrina e a opsonização (REMES & WILLIAMS, 1992). Este processo irá atrair e ativar o sistema imune, quando macrófagos e células polimorfonucleadas levam a uma inflamação (MOLLNES, 1998). A resposta imune aguda pode desaparecer se o material for convenientemente encapsulado. Entretanto em alguns casos a região do implante permanece em um estado de inflamação crônica, o que leva a uma constante interação com o corpo estranho. As superfícies dos implantes passam a

sofrer processos de corrosão que levam a liberação de novas substâncias irritantes, realimentando a inflamação local (GRISTINA, 1987).

A principal causa de insucesso dos implantes durante os dois primeiros anos da intervenção é a inflamação persistente que impede o crescimento celular local e pode causar a dor crônica, (WIDMER, 2001; GIOE, *et al.*, 2004). O meio ao redor dos implantes de próteses pode constituir-se ainda numa região de depressão da resposta imune ou um “*locus minoris resistentiae*” freqüentemente referido como zona inflamatória imuno-incompetente que não é efetivamente incorporada à arquitetura dos tecidos normais. A estimulação crônica da resposta imune celular resulta na liberação de radicais superóxidos com conseqüente diminuição da atividade de opsonização, compromete a atividade de macrófagos reduzindo a produção de interferon gama e interleucina I, reduz a expressão do antígeno maior de histocompatibilidade II pelos neutrófilos, monócitos e linfócitos causando a imunossupressão local (SCHIERHOLZ, *et al.*, 2004).

Foi sugerido que íons metálicos podem aumentar a produção de fator de necrose tumoral e ativar a enzima proteína kinase C, bem como induzir a produção de stress protéico (STOHS & BAGCHI, 1995). Este mecanismo pode estar envolvido no desgaste oxidativo de implantes metálicos.

Conforme pode ser verificado até o presente momento a implantação de biomateriais induz respostas inflamatórias em diferentes intensidades, que mais cedo ou mais tarde podem propiciar condições para o surgimento de infecções.

O processo de colonização bacteriana em um biomaterial começa com uma modificação da sua superfície pela criação de um filme condicionante, a partir de fluídos corporais encontrado ao redor do implante. Estes fluídos podem ser a saliva, urina, lágrima, soro ou sangue dependendo da região. Este filme condicionante será composto de proteínas, que no caso do soro sanguíneo predomina a albumina o fibrinogênio e a fibronectina (GOTTENBOS, *et al.*, 2002).

Segundo Spijker *et al.* (1999), a composição dos filmes condicionantes depende das características físico-químicas da superfície dos biomateriais como composição, hidrofobicidade e carga. Quando em contato com o sangue inicialmente se ligam à superfície do biomaterial proteínas de baixo peso como, por exemplo, as albuminas, sendo posteriormente substituídas por proteínas de alto peso molecular como fibrinogênio e fibronectina.

A adsorção de proteínas a superfície de biomateriais parece estar relacionada a natureza química de sua superfície. A adsorção de albumina, fibronectina e imunoglobulina G na superfície de polímeros de polietileno atinge o máximo nas terminações hidrofílicas, onde predomina a albumina e diminui nas extremidades hidrofóbicas onde predomina a fibronectina (SPIJKER, *et al.*, 1999). A maioria das proteínas é capaz de diminuir a adesão de microrganismos. A albumina é a mais forte inibidora de adesão, por razões desconhecidas, embora a mudança na hidrofobicidade do material pareça estar implicada. Além de proteínas, as mucinas, oligossacarídeos de grande peso molecular encontradas primariamente nas mucosas, são componentes primários da estratégia anti-adesiva do organismo animal (PEREZ-VILAR & HILL, 1999). Em um ensaio de avaliação da adesividade de bactérias sobre proteínas, fibronectina e fibrinogênio permitiram a adesão de *Staphylococcus aureus* e de algumas cepas de *Staphylococcus epidermidis*, o que foi atribuído a estruturas específicas da parede celular bacteriana dirigidas contra estas proteínas (AN & FRIEDMAN, 1998).

As infecções associadas a corpos estranhos ou biomateriais estão relacionadas ainda a alta capacidade adaptativa das bactérias colonizarem superfícies “inertes”, tecidos adjacentes sadios ou danificados (AN & FRIEDMAN, 1998). Bactérias possuem numerosos mecanismos específicos e estruturas para esta finalidade. Lecitinas são citadas por mediar a ligação de bactérias à matriz epitelial extracelular através do reconhecimento específico de estruturas moleculares de carboidratos (PATTI & HOOK, 1994). Flagelos, pilis, fimbrias, e membranas protéicas externas também são requeridas para a adesão bacteriana (AZGHANI, *et al.*, 2002; CARNOY, *et al.*, 1994; DOIG, *et al.*, 1988; LEE, *et al.*, 1997; MERINO, *et al.*, 1997; YILMAZ, *et al.*, 2002). Muitas destas estruturas são proteínas filamentosas

atuando como adesinas, que mediam ligações de amplo espectro durante a colonização (SMYTH, *et al.*, 1996) por meio de interações químicas específicas. A expressão destas proteínas pode ser regulada pelas condições ambientais, o que têm importantes implicações em estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Segundo Dolan, (2001) as bactérias são seres complexos capazes de se comunicar e agir coordenadamente. Diversas espécies de bactérias produzem moléculas chamadas autoindutores, com as quais se comunicam entre si e com outras células. Esse sistema de comunicação é denominado de *quorum sensing* (FUQUA, *et al.*, 1994) e é utilizado para regular algumas características bacterianas desde aquelas ligadas a sobrevivência, até aquelas relacionadas à patogenicidade (SKINDERSOE, *et al.*, 2008; SWEM, *et al.*, 2009;). A adesividade de bactérias a substratos tem sido também associada a mecanismos controlados por *quorum sensing* (LABBATE, *et al.*, 2007; KOUTSOUDIS, *et al.*, 2006). Outra função regulatória mediada por *quorum sensing* é a expressão fenotípica do seu crescimento. Microrganismos na natureza podem crescer de duas formas: uma forma sésil de vida livre também conhecida como forma planctônica e outra como um biofilme aderida a superfície de substratos (DASGUPTA, *et al.*, 1987).

O termo “biofilme” surgiu para designar a forma de vida sésil que se caracteriza pela adesão de bactérias a suportes sólidos, formando uma rede gelatinosa de polímeros extracelulares que protegem e imobilizam os microrganismos. Com o tempo, pequenos agregados se desprendem do biofilme maduro e migram em meio líquido, podem passar a colonizar outros locais (DONLAN, 2001). A matriz polimérica extracelular produzida pelas bactérias é um material amorfo composto de uma variedade de polímeros de alto e baixo peso molecular, associado em grande parte a interações iônicas. Este complexo atua como uma resina de troca iônica, e interfere na fagocitose, influencia a resposta imunológica de produção de anticorpos e funciona em estágios tardios como superfície de adesão, agregação e interação polimicrobiana (DANKERT, *et al.*, 1986; GRISTINA, *et al.*, 1985).

Alguns pesquisadores sugerem ainda que a produção da matriz polimérica extracelular confere ao biofilme uma maior tenacidade na superfície de biomateriais e maior resistência a antibióticos (ARCIOLA, *et al.*, 2005; ARCIOLA, *et al.*, 2006) CAMPOCCIA, *et al.*, 2005; MA, *et al.*, 2004; SMITH, 2005; e resistência às defesas do organismo, e tendendo a persistirem até que o biomaterial seja removido (GOTTENBOS, *et al.*, 2002); KILGUS, *et al.*, 2002).

Além das bactérias, *Candida albicans*, uma levedura oportunista para o homem e para várias espécies animais pode, a exemplo das bactérias também formar biofilmes. O desenvolvimento dessa é caracterizado por três fases distintas: aderência das células a superfície do dispositivo (fase preliminar) formação de uma matriz com mudança da célula leveduriforme para a forma de pseudohifa, (fase intermediária) e aumento do material matricial tomando o aspecto tridimensional (fase de maturação) (KOJIC & DAROUICHE, 2004).

A ocorrência de biofilmes de microrganismos e a sua importância na natureza vêm sendo intensamente discutida pela comunidade científica. Observações microscópicas e técnicas de recuperação quantitativas demonstraram inequivocamente que 99,9% das bactérias crescem como comunidades sésseis agregadas e aderidas às superfícies, ao invés da forma planctônica flutuante e livre nos líquidos (COSTERTON, *et al.*, 1999).

O reconhecimento da ampla ocorrência dos biofilmes por microbiologistas clínicos e de saúde pública ajudou na descoberta de que numerosas doenças infecciosas tais como fibrose cística e a cárie dentária, que estão relacionadas com a presença de biofilmes nos tecidos vivos (COSTERTON, *et al.*, 1978), (SENADHEERA & CVITKOVITCH, 2008). Segundo o Centro de Controle de Doenças de Atlanta-EUA o número destas doenças tem crescido muito, com mais de 65% das infecções causadas por bactérias que crescem em biofilmes (HALL-STOODLEY, *et al.*, 2004). Biofilmes têm sido encontrados em doenças que afetam uma variedade de tecidos e estruturas incluindo, olhos, nariz, garganta, ouvido, pulmões, rins, vesícula biliar, pâncreas, sistema nervoso, pele, ossos, dentes bem como uma infinidade de implantes médicos e odontológicos (WOLCOTT &

EHRlich, 2008). Desta forma, pela compreensão atual da patogenia das infecções associadas à biomateriais, deve-se levar em consideração a presença dos biofilmes no foco infeccioso.

Por outro lado, a origem das infecções associadas a biomateriais é bastante variada e acredita-se existam vários mecanismos pelos quais os microrganismos possam alcançar o sítio de colonização. Os materiais que mantêm contato com o meio externo como cateteres endovenosos, cateteres urinários, ou de diálise peritoneal, são rapidamente alcançados pelos microrganismos colonizadores da pele e conseqüentemente tem as maiores taxas de incidência de infecção (DANKERT, *et al.*, 1986).

Durante o ato cirúrgico do implante do biomaterial, microrganismos do ar podem atingir o sítio cirúrgico e causar infecções imediatamente após a cirurgia alcançando, o implante por difusão (CHARNLEY, 1972; LIDWELL, *et al.*, 1982). As contaminações perioperatórias são as causas mais comuns das infecções associadas à biomateriais (AHLBERG, *et al.*, 1978).

Ao contrário das contaminações perioperatórias, as infecções por via hematogênica podem ocorrer a qualquer tempo após os implantes. Elas são ocasionadas por bacteremias transitórias ou crônicas associadas a infecções de pele, intervenções cirúrgicas ou dentárias, pneumonias, abscessos, ou bacteriúria (BENGTSON, *et al.*, 1987). As bacteremias transitórias possuem riscos relativos de ocorrência que vão de baixo para os procedimentos gastrointestinais, médio para os procedimentos genito-urinários e alto para os procedimentos odontológicos (HUBER & TEREZHALMY, 2005).

A tabela 2 apresenta uma coletânea de artigos que enfocaram a incidência de bacteremias transitórias associados à realização de procedimentos odontológicos, ou simplesmente atividades funcionais ou de higiene bucal (HUBER & TEREZHALMY, 2005). Observa-se que a inserção dos dentes é uma importante porta de entrada de microrganismos na corrente circulatória, particularmente por conta da sua rica vascularização bem como pela microbiota existente no sulco

gengival. Isso pode ser evidenciado pelo fato de que não somente os procedimentos odontológicos induzem bacteremias transitórias, mas também o simples ato da mastigação (HUBER & TEREZHALMY, 2005).

Em adição, microrganismos podem ainda translocar-se do trato gastrointestinal para várias partes do corpo (VANLEEUEWEN, *et al.*, 1994). Este fenômeno já havia sido descrito anteriormente e associado a implante de corpos estranhos no interior da cavidade abdominal de ratos, resultando em inflamação local e translocação de bactérias intestinais para os linfonodos regionais (GUO, *et al.*, 1993b). Neste mesmo modelo animal observou-se ainda que implantes intra-abdominais de biomateriais induzem um aumento do índice de fagocitose em macrófagos e a translocação bacteriana nos linfonodos mesentéricos, fígado, baço, pulmões, rins e sangue da veia porta e cava (GUO, *et al.*, 1993c).

Tabela 2 - Frequencia de bacteremias transitórias associadas à função, procedimentos de saúde bucal ou intervenções odontológicas. Adaptado de Huber & Terezhalmly (2005).

Procedimento ou função	Ocorrência de bacteremia (%)
Mastigação	0-55 %
Fio dental	5-86 %
Escovação	24-26 %
Remoção de tártaro	30-70 %
Extração	9-100%
Endodontia	0-54 %
Cirurgia periodontal	58%
Irrigação subgengival	19-30 %

Os mecanismos implicados nas translocações parecem ser o crescimento anormal de bactérias intestinais, a diminuição da imunidade local e o impedimento da função de barreira da mucosa intestinal (DEITCH, *et al.*, 1987a,b). Foi ainda sugerido como fatores importantes na translocação intestinal de bactérias, o

aumento da produção do fator de necrose tumoral (TNF α) induzido por corpos estranhos (CARDONA, *et al.*, 1992) e a liberação de hormônios intestinais que diminuem a motilidade intestinal, com conseqüente aumento da microbiota intestinal (WELLS, *et al.*, 1986).

Macrófagos podem ter grande importância no transporte de microrganismos para a superfície dos biomateriais (KRAUSE, *et al.*, 1990;MORA, *et al.*, 1991), visto que muitos destes podem sobreviver no interior das células fagocíticas, que por sua vez são atraídos aos focos de inflamação por quimiotaxia. Como os biomateriais estimulam uma resposta inflamatória nas primeiras semanas do implante ou mesmo de forma crônica, os macrófagos são especificamente atraídos à superfície dos biomateriais conduzindo microrganismos viáveis para o local (HUNT, *et al.*, 1996). Como as infecções hematógenas acontecem a qualquer momento após o ato cirúrgico, biomateriais implantados são considerados “bombas relógio microbianas” (GOTTENBOS, *et al.*, 2002).

Levantamentos sobre a etiologia destas infecções mostram que não são somente as bactérias tipicamente patogênicas como *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* as responsáveis pelo processo. Bactérias de colonização superficial como o *Staphylococcus epidermidis* podem transmudar-se de sapróbias para patogênicas em função da presença do biomaterial (GRISTINA, 1987).

A figura 2 ilustra a frequência das principais espécies de infecções de implantes ortopédicos e evidencia a predominância dos cocos Gram positivos, particularmente das duas espécies de estafilococos, que constituem-se nos principais agentes etiológicos deste tipo de infecção (CAMPOCCIA, 2005; CHRISTENSEN, *et al.*, 1989;GRISTINA & SHERK, 2004).

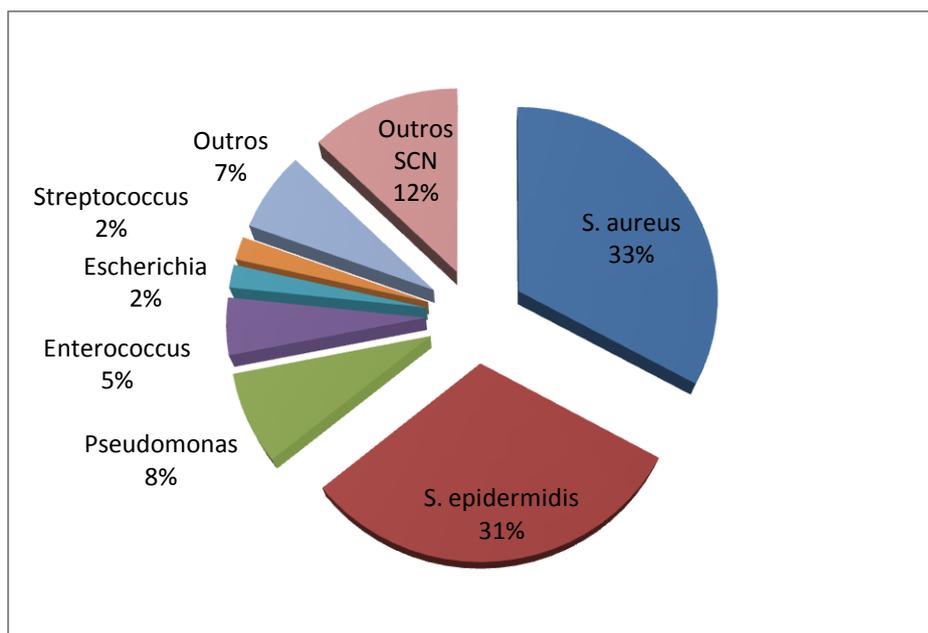


Figura 2 - Frequência das principais espécies bacterianas isoladas de infecções associadas a implantes ortopédicos. Adaptado de Campoccia *et al.* (2005).

Gristina & Sherk (2004), relataram que o *Staphylococcus epidermidis* está frequentemente envolvido quando a superfície do biomaterial é um polímero como em lentes de contato em uso excessivo, próteses vasculares, próteses articulares totais. Esta bactéria encontrada naturalmente na microbiota da pele e mucosas é ainda um fator que aumenta a incidência de infecções policrônicas associadas com outros substratos como metais, ossos ou tecidos comprometidos. Em estudos *in vitro*, *Staphylococcus epidermidis* adere preferencialmente a superfícies de polímeros enquanto que *Staphylococcus aureus* adere preferencialmente a superfícies metálicas.

Esta constatação é corroborada por outros autores (DANKERT, *et al.*, 1986; MCBRIDE, *et al.*, 2009). Em casos de osteomielites *Staphylococcus aureus* é a bactéria patogênica mais isolada quando o osso encontra-se morto ou danificado (GRISTINA, *et al.*, 1985). Nos casos de ceratites, *Pseudomonas aeruginosa* é identificada frequentemente como a causa e está associada com o uso prolongado de lentes de contato (TAM, *et al.*, 2010; FLEISZIG & EVANS, 2010).

Em odontologia as infecções de implantes dentários são uma complicação comum. Person *et al.* (2010), realizaram um estudo cego, longitudinal randomizado,

avaliando o efeito do debridamento mecânico das formações microbianas da região periférica de implantes dentários. Foi detectado por meio de técnicas de hibridização de DNA, a presença de 79 diferentes microrganismos periodontopatogênicos e da microbiota bucal. Os microrganismos mais freqüentemente isolados do sítio de infecção destes implantes foram *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus spp*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Helicobacter pylori*, *Tannerella forsythia*. A exceção de *Staphylococcus aureus* que é uma bactéria associada à colonização da pele, as demais podem ser encontradas na microbiota bucal e muitas estão associadas a doenças da cavidade oral. Em face das características intrínsecas da cavidade bucal e da riqueza de sua microbiota, parece que os implantes dentários estão submetidos a uma gama maior de agentes etiológicos capacitados a causar estes processos.

Estudos têm mostrado que em um terço dos casos as infecções são polimicrobianas. As bactérias mais frequentemente encontradas são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas spp*, *Streptococcus spp*, *Bacillus spp* e *Proteus spp* (SHEEHY, *et al.*, 2010; GENTRY, 1997). Infecções que apresentem polimicrobismo são provavelmente mais freqüentes do que o descrito, por causa das dificuldades no diagnóstico microbiológico, devendo ser consideradas de prognóstico ruim na revisão cirúrgica (GRISTINA, 1987).

Este quadro sucinto das infecções associadas a implantes de biomateriais evidencia a complexidade do problema e a importância destes processos no insucesso dos procedimentos cirúrgicos em ortopedia e odontologia. Fica evidente a necessidade do desenvolvimento de técnicas de controle que minimizem a sua incidência, bem como suas conseqüências.

2.2 A prata e seu uso em biomateriais.

A prata é um elemento químico metálico, levemente mais duro que o ouro e muito dúctil, maleável e de aspecto branco e reluzente que lhe conferiu adjetivo de

“*argentum*” do latim: brilhante. Possui número atômico 47, massa de 107,8682 g.mol⁻¹, densidade de 10.49 g.cm⁻³ e é um elemento de transição. Sua fase natural é o estado sólido, possuindo ponto de fusão em torno de 961,78 °C. Pode se apresentar em quatro estados de oxidação: Ag⁰, Ag⁺, Ag²⁺ e Ag³⁺. A segunda forma é a mais abundante na natureza e as duas últimas instáveis e encontradas em ambientes aquáticos (SMITH & CARSON, 1977).

Na natureza a prata pode ser encontrada no solo e retirada através de processos naturais, como o vento ou pelas chuvas até se depositarem no fundo de cursos d'água. Atividades humanas como a mineração, a manufatura de cimentos e a queima de combustíveis fósseis também a liberam para o meio ambiente. É encontrada como um cátion monovalente, que se combina com os ânions sulfeto, bicarbonato ou sulfato ou em complexos com cloretos e sulfatos, adsorvidos à matéria particulada em fase aquosa. A prata metálica é insolúvel em água, mas sais metálicos como nitrato e cloreto de prata são solúveis. Quando em baixas concentrações existe na forma de um sulfidrato (AgSH) ou como HS-Ag-S-Ag-SH, um simples polímero. Quando ela está presente em baixas concentrações em fase aquosa, é encontrada na forma de sulfeto de prata coloidal ou complexos de polisulfetos. A população em geral está exposta a prata primariamente pela ingestão de água e de comidas (ATSDR, 1990).

A prata possui a maior condutibilidade elétrica e térmica entre os metais e a menor resistência a corrente elétrica (NORDBERG & GEHARDSSON 1988, apud WIJNHOFEN, *et al.*, 2009), propriedades estas que a torna muito útil para as indústrias. A maior parte da produção mundial de prata é extraída na forma de um co-produto do refino do cobre, ouro, chumbo e zinco. Em 2008 os principais consumidores de prata no mundo foram as indústrias de aplicação (53,7%), as joalherias (19%), a indústria fotográfica (12,6%), a cunhagem de moedas e medalhas (7,8%) e a indústria de talheres (6,9%). O uso da prata em películas fotográficas vem sofrendo grande queda em função do desenvolvimento da tecnologia de imagem digital, entretanto o seu uso em medicamentos e em películas de filmes cinematográficos permanece estável segundo o *Gold Fields Mineral Services* (GFMS, 2009).

A prata metálica é considerada um metal precioso e foi muito utilizada na produção de ornamentos, utensílios domésticos como talheres, taças, bandejas, jóias e moedas. Hoje é usada na indústria em geral como contato de condutores elétricos, na elaboração de espelhos pela sua excelente capacidade reflectiva e na catálise de reações químicas (WIJNHOVEN, *et al.*, 2009). Alguns dos usos e aplicações atuais mais comuns para a prata estão listados na tabela 3.

Desde a antiguidade suas propriedades bactericidas são conhecidas (WIJNHOVEN, *et al.*, 2009). Registros históricos baseados em achados em tumbas Incas e pré-colombianas no Perú, dão conta da ocorrência de cirurgias de trepanação craniana sem infecções, com 50 a 70 % de sobrevivência dos pacientes feitas por cirurgiões dotados apenas de conhecimentos de anatomia, instrumentos rudimentares, medicamentos naturais como agentes hemostáticos e metais como o ouro e a prata (MARINO & GONZALES-PORTILLO, 2000).

Sua aplicação na prevenção de doenças foi citada na Grécia e Roma antiga. Hipócrates, “o pai da medicina” afirmou que a prata trazia benefícios à saúde e propriedades medicinais contra as doenças. Os Fenícios usavam-na para estocar água, vinho e vinagre em garrafas de prata para prevenir a sua deterioração durante longas viagens. Posteriormente suas propriedades foram redescobertas na Idade Média com seu uso como desinfetante e também em compressas no tratamento de queimaduras e feridas. No século IXX marinheiros colocavam moedas de prata em barris de água e vinho para conservar o líquido puro. Pioneiros na América usaram a mesma idéia nas jornadas de uma costa a outra costa (WIKIPEDIA, 2010).

Nos Estados Unidos o uso de soluções de prata foi aprovado em 1920 pelo *Food & Drug Administration* (FDA) como agente antibacteriano (WIJNHOVEN, *et al.*, 2009). Doenças infecciosas incluindo a sífilis e gonorréia já foram tratadas em algum momento da história com soluções de prata (MARSHALL & SCHNEIDER, 1977; SHELLEY, *et al.*, 1987; GULBRANSON, *et al.*, 2000).

Tabela 3 - Usos e aplicações mais comuns para a prata, adaptado de Wijnhoven, *et al.*, (2009).

Compostos diversos	Materiais metálicos
Películas fotográficas	Jóias
Baterias	Talheres
Filtros de água	Componentes eletrônicos
Purificadores de ar	Dispersores de calor
Catalisadores	Soldas
Medicamentos	Ligas metálicas
Lubrificantes	Supercondutores
Cobertura de lentes	Amálgamas dentárias
Preservativo para flores	Rolamentos
Sanitarizantes	Moedas e medalhas
	Espelhos

Como medicamento seu uso foi também prescrito na terapia de doenças mentais, epilepsia, tabagismo e gastroenterites. Soluções protéicas de prata coloidal já foram utilizadas no tratamento de resfriados (FUNG & BOWEN, 1996) e estão a cada dia ganhando popularidade como suplementos dietéticos para o tratamento profilático de certas doenças como as alergias (GULBRANSON, *et al.*, 2000).

A prata apresenta baixa toxicidade ao organismo humano e o efeito adverso mais comum relacionado à sua ingestão indiscriminada em produtos é a argiria, uma descoloração permanente da pele que torna-se acinzentada a cinza-azulada. Quando ocorre apenas na região ao redor dos olhos é denominada argirose (DRAKE & HAZELWOOD, 2005; SHELLEY *et al.*, 1987; YANG, *et al.*, 2008).

Há relatos de casos mais graves de exposição crônica, quando ocorreram efeitos tóxicos no fígado, nos rins, irritação dos olhos, pele, trato respiratório e intestinal e mudanças nas células sanguíneas (DRAKE & HAZELWOOD, 2005). Em geral estes efeitos são atribuídos a forma iônica da prata visto que a metálica determina riscos mínimos à saúde (ANDREN & ARMSTRONG, 1999).

Após a ingestão ela é absorvida a nível intestinal, atinge a circulação e tende se acumular na epiderme, pelos, cabelos e unhas e no interior de órgãos em função de ser um metal pesado. Depósitos de sulfeto de prata acumulam-se no interior de lisossomos e de corpos residuais de fagócitos bem como na matriz conectiva, fora das células (JONAS, *et al.*, 2007).

Ions Ag^+ são altamente tóxicos para peixes. A toxicidade aguda parece ser causada pela interação do cátion com as brânquias inibindo a atividade basolateral da enzima ATPase. A quebra desta enzima inibe a entrada ativa de ions Na^+ e Cl^- e, portanto a osmorregulação do peixe (WOOD, *et al.*, 1999).

A toxicidade da prata aos microrganismos parece ser universal e está associada a diferentes mecanismos. Células bacterianas expostas a concentrações milimolares de Ag^+ sofrem mudanças morfológicas como encolhimento e destacamento da membrana da parede com vazamento de conteúdo celular, além de condensação de DNA (FENG, *et al.*, 2000; JUNG, *et al.*, 2008). Além das alterações morfológicas citadas também ocorrem mudanças fisiológicas. As células bacterianas entram em um estado em que os níveis fisiológicos podem ser medidos, mas a bactéria não está habilitada a crescer e replicar.

Em concentrações sub-micromolares íons ligam-se às enzimas respiratórias como a NADH desidrogenase, modificando-as e causando o esvaziamento do gradiente de prótons, o que determina a anulação da força proto-motora e completa desenergização da célula (DIBROV, *et al.*, 2002). A afinidade de Ag^+ a proteínas respiratórias e de transporte deve-se à finidade com grupo “tiol” presente nos resíduos de cisteína destas proteínas (HOLT & BARD, 2005; LIAU, *et al.*, 1997).

Ions Ag^+ inibem ainda a adsorção de fosfatos e causam o efluxo de fosfato intracelular (SCHREURS & ROSENBERG, 1982). Adicionalmente tem sido relatado que Ag^+ aumenta a frequência de mutações no DNA durante as reações de polimerase em cadeia (YANG, *et al.*, 2009). Estes fatos sugerem que a prata pode também perturbar os processos genéticos no interior de células.

Radicais reativos ao oxigênio são produtos do metabolismo respiratório e quando em pequenas quantidades podem ser controlados por antioxidantes naturais da célula como a glutatona e dissulfeto de glutadiona, que possuem forte ação redutora devido à presença de grupos tióis. O excesso de radicais reativos ao oxigênio, pode produzir stress oxidativo no interior das células (NEL, *et al.*, 2006), que conduz a danos nas membranas lipídicas e perturbações na função mitocondrial ou do DNA (MENDIS, *et al.*, 2005).

Metais de transição, como a prata podem catalisar a geração de radicais reativos ao oxigênio na presença deste (STOHS & BAGCHI, 1995). Estudos feitos com células eucarióticas sugerem que nano partículas de prata inibem os mecanismos de defesa antioxidantes por interagirem diretamente com a produção de glutatona, ligando-se a glutatona redutase ou outra enzima de que atua na sua manutenção (CARLSON, *et al.*, 2008).

A resistência bacteriana a metais pesados é um fenômeno bem estudado, dependente de energia, determinado não por detoxicação química, mas por efluxo iônico efetuado por proteínas transmembranarias que funcionam ou como ATPases ou como carreadoras quimiosmóticas, sendo codificadas por vários genes plasmidiais (SILVER, 1996).

A primeira linha de defesa é um sistema regulatório denominado *silRS*, um bi-componente de transcrição que governa a síntese de uma proteína periplasmática denominada SilE, que possui alta afinidade à Ag^+ . Posteriormente, duas bombas de efluxo, uma tipo próton ATPase denominada *silP*, e outra com um sistema quimiosmótico de troca, Ag^+/H^+ denominado *silC,B,A* que codificam três peptídeos de membrana, potencial-dependentes, da classe dos transportadores de cátion/próton RND. Nove genes parecem estar envolvidos no mecanismo de resistência bacteriana a prata, sendo que sete já foram nomeados e dois menos conhecidos são ainda chamados de ORFs: em ordem *silP*, *ORF105*, *silC*, *SilB*, *SilA*, *ORF96*, *silC*, *silRS*, *silE* (SILVER, 2003). Estes genes foram isolados de um plasmídeo denominado Pmg101, originário de uma cepa de *Salmonella* que resultou

na morte de vários pacientes e exigiu o fechamento do Hospital Geral de Queimados de Massachusetts, EUA (MCHUGH, *et al.*, 1975). A região de pMG101 que determina aumento da resistência a prata foi clonada e a seqüência depositada no *Gen Bank* com o código AF067954 (GUPTA, *et al.*, 1999).

A ocorrência da resistência a prata está associada a ambientes onde a sua concentração é alta, em particular em enfermarias para queimados (pelo uso de bandagens com prata), solos ao redor de minas, captação de água de estúdios de processamento fotográfico, sistemas de distribuição de águas onde a ação oligodinâmica da prata é usada para sanitização, ambiente bucal de indivíduos que tem amálgamas de prata nos dentes entre outros. Genes de resistência a prata foram encontrados em 10 % de uma coleção de bactérias entéricas em hospital de Chicago (SILVER, 2003). Bactérias com múltipla-resistência a antibióticos podem possuir também resistência cruzada a metais pesados visto que os mecanismos associados à resistência podem ser comuns (SILVER & PHUNG, 2005).

A nanotecnologia é uma ciência emergente que estuda partículas entre 1-100 nanômetros em pelo menos uma de suas dimensões. As nano formas resultam em características físico-químicas específicas que diferem daquelas das grandes estruturas. O efeito é atribuído principalmente a sua alta superfície em relação ao volume, o que resulta em alta reatividade (WIJNHOVEN, *et al.*, 2009).

Estas propriedades físico-químicas têm gerado grande preocupação quanto à segurança da administração de nano partículas em sistemas biológicos e seu impacto no meio ambiente. Nano partículas induzem a um estado pró-oxidativo no interior das células, causando desequilíbrio nos sistemas celulares dependentes do potencial de oxi-redução, portanto induzindo a conseqüências biológicas adversas que variam desde o início de uma inflamação até a morte celular (CARLSON, *et al.*, 2008). Não obstante a estas dúvidas, a nanotecnologia tem se expandido em várias áreas como o cuidado com a saúde, cosméticos, alimentos, saúde ambiental, e agricultura (BOUWMEESTER & SIPS, 2007; DEKKEERS 2007).

A toxicidade celular induzida por nano partículas depende das dimensões corpusculares destas e está associada ao stress oxidativo . Carlson et AL (2008). colaboradores estudando culturas de macrófagos alveolares expostos a diferentes doses de partículas de prata de 15, 30 e 55 nm, encontrou um aumento significativo da concentração de radicais livres e de mediadores químicos de inflamação, inversamente proporcional ao tamanho das partículas e dependente da dose, sugerindo que o principal mecanismo de ação envolvido seja o stress oxidativo (CARLSON,*et al.*, 2008).

A prata é bactericida mais eficiente na forma de nano partículas do que na forma de sais. Em geral os íons Ag^+ são muito reativos e combinam-se com aminoácidos como cisteína e outros compostos como tioglicolato de sódio contendo grupos tióis (LIAU,*et al.*, 1997), com cloretos e proteínas séricas, perdendo sua atividade bactericida (LYCZAK & SCHECHTER, 2005). Estes últimos autores mostraram a importância da liberação controlada de Ag^+ no efeito bactericida quando em presença de proteínas séricas. Partículas grandes de prata metálica (1 a 2 μm) ou nanométricas (70 nm) liberam em meio líquido íons Ag^+ muito lentamente e conseqüentemente estas são adsorvidas pelas proteínas e perdem atividade. Nitrato de prata em solução é altamente dissociável e libera Ag^+ rapidamente, que também forma complexos com proteínas após exibirem curto período de atividade antibacteriana. Ao contrário nano cristais de prata (<50 nm) não são complexados por proteínas séricas e podem ser absorvidos pelas células bacterianas, liberando Ag^+ no seu interior e nas proximidades das membranas celulares onde atuam. Desta forma exibem atividade antibacteriana por períodos prolongados mesmo em presença de altas concentrações de proteínas séricas.

Em razão da baixa toxicidade para o homem e excelente atividade antimicrobiana, a prata vem sendo incorporada a diferentes tipos de biomateriais para promover resiliência a infecções. Amálgamas dentários para restauração de cavidades são utilizadas há muitas décadas como material de preenchimento e continham aproximadamente 35% de prata e 50% de mercúrio. Seu uso vem sendo condenado em função da contaminação ambiental resultante da liberação de grandes quantidades de mercúrio nos esgotos urbanos (HILTZ, 2007).

Seu uso em bandagens no tratamento de queimaduras, associada a sulfadiazina é uma das formas mais bem conhecidas de utilização da prata na medicina (MONAFO & FREEDMAN, 1987; PRUITT, *et al.*, 1998). Bandagens sintéticas recobertas de formas ativas de prata vêm sendo utilizadas no tratamento de feridas de pele em pacientes diabéticos. Acticoat® é uma bandagem comercializada nos EUA, feita de polímero de polietileno em forma de tira que libera Ag^+ e nano partículas de prata (KLAUS, *et al.*, 1999).

Dispositivos médicos como cateteres e válvulas cardíacas a base de polímeros impregnados de prata tem sido amplamente usados para prevenir o crescimento de biofilmes bacterianos (GREENFELD, *et al.*, 1995; SAMPATH, *et al.*, 1995; DASGUPTA & COSTERTON, 1994; DE LA RIVIERE, *et al.*, 2000).

Bosetti *et al.* (2002b), recobriram pinos ortopédicos de aço para fixação externa com prata metálica por metalização a vácuo e concluíram que este material não apresentou genotoxicidade em estudos conduzidos *in vitro*.

Nano partículas de prata de 5-50 nm, foram incorporadas a polimetilmetacrilato, considerado o padrão ouro para a fixação de implantes de articulação, resultando em um produto ativo contra *Staphylococcus aureus* multiresistente e *Staphylococcus epidermidis* metilcilina resistentes (ALT, *et al.*, 2004).

Visando a obtenção de superfícies mais resistentes e resilientes a infecções, diferentes materiais poliméricos foram recobertas por deposição física de vapor de prata e titânio. Não foi observado nenhum efeito citotóxico sobre culturas de células de osteoblastos e de células epiteliais (EWALD, *et al.*, 2006).

Ante as excepcionais propriedades biológicas das biocerâmicas que as colocaram em posição de destaque na ciência dos biomateriais, numerosos trabalhos são citados incorporando prata em sua constituição visando à aquisição de propriedades antimicrobianas.

De e colaboradores em 1996, produziram filmes de sílica dopados de nitrato de prata, pela técnica sol-gel. A sinterização dos filmes de sílica foi feita com temperaturas entre 300 a 550°C e observou-se a formação de prata coloidal e de nanocristais de prata na rede de silicatos (DE, *et al.*, 1996).

Shirkhanzadeh & Azadegan (1998), incorporaram pequenas concentrações de íons prata a fosfato de cálcio, um material bioativo e demonstraram um forte efeito estimulatório na formação de hidroxiapatita carbonatada em SBF

Kawashita *et al.*(2000), produziram pela técnica sol-gel, um composto a base de sílica incorporado de alumínio e prata, e demonstraram que na proporção Al/Ag \geq 1 houve atividade bacteriana controlada contra *Streptococcus mutans* e ausência de escurecimento do material, condições consideradas importantes para sua incorporação em compósitos resinosos para a restauração dental.

Coube a Bellantone *et al.* (2000a,b), a proposição inicial da incorporação de prata a vidros bioativos. A adição de 3% mol de óxido de prata a um vidro no sistema ternário Si:Ca:P não interferiu na sua bioatividade, mas conferiu atividade antimicrobiana.

Clupper & Hench (2001), estabeleceram que o *Bioglass*® 45S5 obtido por fusão podia ser dopado de prata antes do tratamento térmico, adquirindo propriedades antimicrobianas sem perder sua bioatividade. O *Bioglass*® 45S5 foi ainda avaliado em estudo comparativo com outros vidros bioativos, no sistema Si:Ca:P2:Ag obtido por sol-gel , com e sem prata. Os resultados mostraram que *Bioglass*® 45S5 e o vidro bioativo sem prata, não apresentam atividade antimicrobiana para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e que quando presente esta atividade foi devida a dissolução de íons Ag⁺ e não a mudanças de pH ou a força iônica durante a dissolução (BELLANTONE, *et al.*, 2002).

Nishioka *et al.* (2003), produziram um compósito a base de fosfato de zirconium associado à hidroxiapatita, dopado de prata. Os resultados mostraram uma boa atividade antibacteriana, que aumenta na presença de íons Cl^- .

Jeon *et al.* (2003), incorporaram nitrato de prata à sílica pela técnica do sol-gel, demonstrando que após tratamento térmico a temperatura de $600^\circ C$ a prata se reduziu e pôde ser completamente incorporada a sílica na forma de nanopartículas. Filmes deste material apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Saravanapavan *et al.*(2003), estudaram o efeito do tamanho das partículas de um vidro bioativo em pó e da presença de prata na sua cinética de decomposição em SBF. Demonstraram que a incorporação de prata não compromete a bioatividade, e que as taxas de dissolução diminuem com a presença de prata e aumentam quanto menor for o tamanho das partículas.

Di Nunzio *et al.*(2004), propuseram a incorporação de prata na superfície de um vidro bioativo, utilizando-se de um banho para troca iônica com soluções diluídas de prata solúvel. O produto final manteve a sua bioatividade conforme observado pela formação de hidroxiapatita carbonatada em SBF.

Catauro *et al.*(2004),incorporaram óxido de prata a 0,5% a um vidro bioativo obtido por sol-gel no sistema Si;Ca;Na, sinterizado a $600^\circ C$ e obtiveram boa atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*, sem alterações na bioatividade.

Pratten *et al.*(2004), estudaram *in vitro* a habilidade do Bioglass 45S5 e de um vidro bioativo dopado com prata, prevenirem a colonização bacteriana em suturas cirúrgicas. O fio de sutura usado, Mersilk®, foi impregnado com os dois vidros bioativos e testados quanto a sua resiliência à colonização por *Staphylococcus epidermidis* em câmara de fluxo contínuo. Os resultados mostraram que o vidro bioativo dopado de prata impede a colonização bacteriana do fio.

Vidros bioativos a base de fosfato de cálcio no sistema 50P:30Ca:20Na incorporados de 0,3-5 mol% de óxido de prata e sinterizados entre 600 a 1200° C, apresentaram á análise física, nano *clusters* de prata dentro da matriz vítrea e mudanças estruturais na rede vítrea que foram atribuídas a distorção dos tetraedros de fosfatos (BAIA, *et al.*, 2006).

Balamurugan *et al.*(2008), avaliaram *in vitro* a atividade antibacteriana de um vidro bioativo dopado com 5% mol de prata no sistema Si:Ca:P:Ag, obtido por sol-gel, contra *Escherichia coli*. Concluíram que a atividade deve-se exclusivamente a liberação de íons Ag⁺ no meio e que concentrações de 0,02-0,20 mg.mL⁻¹ de vidro bioativo foram eficientes para inibir o crescimento das culturas. Postulam ainda o potencial de utilização desta biocerâmica, como material dental.

Raucci *et al.* (2010), avaliaram a biocompatibilidade de um vidro bioativo sistema Si:Ca:Na obtido por sol-gel, dopado de 0,5% prata em linhagem celular de osteoblastos humanos. Os resultados revelaram que o material foi citocompatível para esta linhagem celular.

A despeito da volta do interesse da utilização da prata como agente antimicrobiano, principalmente face ao avanço dos *Staphylococcus aureus* metilina resistentes e do controle da prescrição de antibióticos de primeira linha, no estágio atual não existe um consenso quanto aos procedimentos microbiológicos utilizados para delinear cepas sensíveis ou resistentes a compostos a base de prata. A maioria dos estudos têm produzido diferentes Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) para AgNO³ o que demonstra a falta de padronização existente. O resultado de dois estudos diferentes que avaliaram valores de CIM para *Staphylococcus aureus* (ao redor de 100 cepas) variou de 8 a 80 mg.L⁻¹(UGUR & CEYLAN, 2003; HAMILTONMILLER, *et al.*, 1993). Similarmente os dois maiores estudos que examinaram valores de CIM para íons prata com aproximadamente 100 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, encontraram valores ente 8 a 70 mg.L⁻¹ (VASISHTA, *et al.*, 1989; DEVICENTE, *et al.*, 1990). Ante ao exposto fica claro impossibilidade de comparação dos resultados de diferentes estudos de atividade antimicrobiana de compostos a base de prata, descritos na literatura.

2.3 Triclosan: descrição e usos em biomateriais.

Triclosan (2,4,4'-triclora-2'-hidroxidifenil éter), ou Irgasan DP 300, cuja fórmula espacial é representada na figura 3, é um produto sintético, não iônico que foi desenvolvido a mais de 40 anos e se constitui numa classe de produtos com largo espectro antimicrobiano, inicialmente utilizado na indústria têxtil e que possui centenas de patentes arquivadas com sua incorporação em diversos produtos (JUNGERMA & TABER, 1971). Seu uso tem se estendido a componente de desodorantes, sabões, preparações dermatológicas, colutórios, dentifícios e até incorporado em plásticos de brinquedos para crianças (REGOS, *et al.*, 1979)

Segundo Bhargava e Leonard (1996), trata-se de produto seguro, cujas propriedades farmacológicas e toxicológicas já se encontram bastante discutidas e são descritas a seguir. Suas características são a de um pó branco, sem odor, com peso molecular de 289,5 g/mol e ponto de fusão em torno de $57 \pm 1^\circ\text{C}$. É praticamente insolúvel em água, bem solúvel em solventes orgânicos não polares. Sua estabilidade térmica é em torno de 150°C ou até 200°C se não aquecido por mais de duas horas.

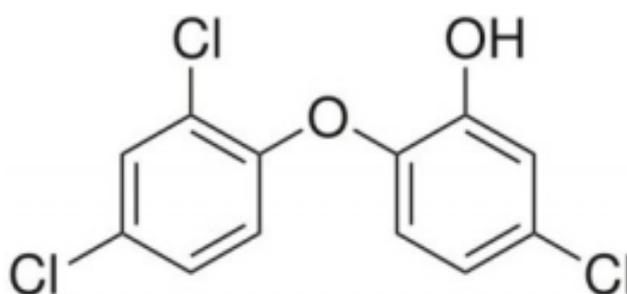


Figura 3 - Fórmula plana da molécula de triclosan ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_3\text{O}_2$).

Fonte: BHARGAVA, H. N.; LEONARD, P. A.
Triclosan: Applications and safety. *American Journal of Infection Control*, v. 24, n. 3, p. 209-218, Jun 1996.

Os dados de toxicidade aguda revelam que triclosan não é um intoxicante oral quando testado em animais. A toxicidade aguda para camundongo aferida pela Dose Letal 50% (DL50) é de 19 a 29 mg.Kg⁻¹ de peso por via endovenosa, 1090

mg.Kg⁻¹ quando pela via intraperitoneal (MARZULLI & MAIBACH, 1973). A toxicidade crônica variou conforme a espécie, rota de administração e tempo de observação. O mais significativo foi um ensaio em babuínos que receberam diariamente 100 a 300 mg.Kg⁻¹ por 52 semanas, somente mostrando episódios de eméese e diarréia como eventos adversos (KANETOSHI, *et al.*, 1992; BHARGAVA & LEONARD, 1996).

Não foram encontradas citações sobre efeitos de perturbação de reprodução, ou teratológicos em animais na literatura. O potencial mutagênico de triclosan foi testado em pelo menos 18 estudos até 1996. Dezesesseis mostraram resultados claramente negativos e dois apresentaram resultados duvidosos posto que quando reavaliados resultaram em negativos (BHARGAVA & LEONARD, 1996).

Em recente estudo com camundongos, ratos e hamsters, foram encontrados tumores associados à exposição crônica de triclosan, apenas no fígado de camundongos machos e fêmeas. A aplicação de um teste relevância (*Human Relevance Framework*) sugeriu existir pouco risco nesta condição já que estes tumores começaram pela ativação do receptor alfa de um proliferador peroxisoma, um modo de ação considerado irrelevante para humanos (RODRICKS, *et al.*, 2010). Este autor relata ainda que a margem de segurança obtida por bio-monitoramento á exposição crônica devida ao uso diário de produtos contendo triclosan em homens, mulheres e crianças, é boa e não foram observados efeitos adversos a saúde.

Queckenberg, *et al*(2010), avaliaram a farmacocinética e segurança do agente antimicrobiano triclosan depois de aplicações dérmicas de creme contendo triclosan a 2% em seis voluntários. A absorção percutânea calculada pela excreção da urina foi de 5,9% \pm 2,1% da dose administrada. A quantidade padrão absorvida sugere que a aplicação diária em adulto resulta em exposição sistêmica de 890 vezes menor do que a dose determinante de efeito adverso. Triclosan pode ser considerado seguro para uso em cremes hidrofóbicos.

Por outro lado, foram relatados na literatura dois casos confirmados de dermatite de contato a um fio de sutura de poliglactina denominado *Vicryl Plus*®

(Ethicon) que tem como princípio ativo contra infecções o triclosan. As aplicações mais freqüentes para este fio são cirurgias ortopédicas, cirurgias plásticas e boa porcentagem, aplicadas para fechar a pele (BHUTANI & JACOB, 2009).

Segundo Barghava e Leonad (1996), estudos não publicados pela Cyba revelaram que triclosan pode causar ainda irritação ocular. Concentrações de 10% ou menos instiladas na dose de 0,02 mL nos olhos de coelhos resultaram em hiperemia transitória da conjuntiva que passava após 24 h. Entretanto a instilação de suspensões de 20% resultam em intensa hiperemia ocular mesmo após 24 h.

Alguns autores têm relatado possíveis danos ambientais resultantes do acúmulo de triclosan no meio ambiente. Esta suspeita iniciou-se com os estudos que demonstraram que triclosan tem a capacidade de alterar a expressão e a forma dos receptores de hormônio tireoideano alfa e beta, conferindo uma diminuição de peso e atraso no processo de metamorfose (VELDHOEN, *et al.*, 2006).

Em estudo com larvas de *Xenopus laevis*, um anfíbio conhecido como “rã de unha africana”, Fort *et al.* (2010), demonstraram que concentrações ambientais relevantes de triclosan não alteram o curso normal da metamorfose mediado pela glândula tiróide neste modelo animal.

Por sua vez, Zorrilla *et al.* (2009), administraram doses orais de 0, 3, 30, 100, 200, e 300 mg.Kg⁻¹ a ratos Wistar machos desmamados e não encontraram alterações de peso em tecidos dependentes de andrógenos, entretanto a exposição à doses de 200 mg.Kg⁻¹ ou maiores tiveram impacto nas concentrações séricas de hormônios tireoideanos em ratos juvenis machos.

Quanto ao seu mecanismo de ação, inicialmente pensou-se que o triclosan rompia a membrana da parede celular bacteriana, impedindo-a de assimilar nutrientes. Assim atuaria de forma não específica, o que estimulou o seu uso de forma ampla e irrestrita, pois acreditava-se que a emergência de resistência seria algo incomum (VISCHER & REGOS, 1974).

Entretanto evidências do surgimento de bactérias resistentes a esta droga suscitaram a existência de um mecanismo de ação mais específico. Subsequentes comunicações científicas mostraram que o seu mecanismo de ação está ligado com o bloqueio de um alvo específico do metabolismo lipídico, a proteína carreadora enoil-acil redutase (*fabI*), componente do tipo II do sistema ácido graxo sintetase (HEATH, *et al.*, 1999).

Em um estudo conduzido no ano de 2005 na República Popular da China, foram testadas para resistência ao triclosan, 732 cepas de *Acinetobacter baumannii* provenientes de espécimes clínicos de 25 hospitais. Vinte cepas foram consideradas resistentes (CIM >1mg) por meio do teste da diluição em agar, onde os maiores níveis de resistência puderam ser atribuídos à mutação do gene *FabI* (CHEN, *et al.*, 2009; COTTELL, *et al.*, 2009).

A tolerância ao triclosan de algumas cepas bacterianas tem sido relacionada à maior resistência a antibióticos, particularmente aos aminoglicosídeos, o que sugere a existência de mecanismos de resistência cruzada (COTTELL, *et al.*, 2009).

Quanto à atividade antimicrobiana a literatura é unânime em afirmar que o triclosan é um agente antimicrobiano de largo espectro, agindo contra bactérias, fungos e até contra protozoários. Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram determinadas por Vischer e Regos (1974), para várias espécies de bactérias. As CIM variaram de 0,01 a 0,1 ppm (partículas por milhão) para *Staphylococcus aureus*; 3 ppm para *Streptococcus pyogenes*; 0,1 a 0,3 ppm para *Escherichia coli*; 0,3 ppm para *Klebsiella pneumoniae*; 256 ppm para *Burkholderia cepacia*; > 1000 ppm para *Pseudomonas aeruginosa*. A exceção desta última, as concentrações de uso mostram boa atividade antimicrobiana tanto para Gram Positivos como para Gram negativos.

Regos *et al.* (1979), comparou a atividade *in vitro* de triclosan com alguns agentes antimicrobianos tópicos como o hexaclorofeno, clioquinol, clorquinaldol, gentamicina, neomicina, nystatina, econazole, clotrimazol e ácido salicílico. Os seus resultados mostraram que triclosan é de 10 a 100 vezes mais potente do que

hexaclorofeno contra *Escherichia coli*, *Klebsiella edwardsii* e *Salmonella spp*, mas menos efetivo contra estreptococos, micrococos e *Propionibacterium acnes*.

O efeito antimicrobiano de triclosan foi demonstrado também contra bactérias produtoras de amônia, fungos, dermatófilos e certas bactérias residentes na pele (LILLY & LOWBURY, 1974). Segundo Imokawa *et al.*(1982), as propriedades bacteriostáticas de triclosan não foram perdidas contra cepas de *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, e *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina, estreptomicina e outros antibióticos de amplo espectro.

Um estudo com desodorantes tópicos mostrou que triclosan à concentração de 0,15% exibe efeito antibacteriano sinérgico com muitos agentes antimicrobianos como álcool e certos anti-transpirantes químicos (COX, 1987). O mesmo efeito foi observado quando triclosan foi avaliado *in vitro* concomitantemente com diversos antibióticos como amoxicilina, gentamicina, nitrofurantoínas contra bactérias uropatogênicas. Duas fluorquinolonas foram os únicos antibióticos ensaiados cuja ação foi prejudicada (WIGNALL, *et al.*, 2008).

Triclosan mostrou-se eficiente na proteção contra *Chlamydia trachomatis* em um modelo de infecção experimental em camundongos (PILIPENKO, *et al.*, 1999). Sua ação antimicrobiana contra protozoários pode ser evidenciada através do trabalho de McLeod *et al.* (2001), que demonstraram inibição do crescimento de *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*. Rao *et al.* (2003), demonstraram ainda o potencial do uso de triclosan no tratamento da malária. Um estudo *in vitro* demonstrou que triclosan destrói as formas próclicas e circulatórias de culturas de *Trypanosoma brucei*, com DL50 de 10 e 13 μM , respectivamente (PAUL, *et al.*, 2004).

A crescente preocupação com a rápida evolução do fenômeno da resistência bacteriana aos antibióticos fez com que alguns autores suscitasse a idéia da utilização sistêmica de triclosan como forma de proposição de um novo antimicrobiano de amplo espectro e baixa toxicidade. A sua eficácia contra infecções sistêmicas agudas em modelo animal foi demonstrada por Sharma *et al.* (2003).

Camundongos infectados experimentalmente com bactérias patogênicas tiveram, após aplicação terapêutica de triclosan, maior sobrevivência, o restabelecimento dos parâmetros sanguíneos e a recuperação das lesões hepáticas induzidas pela infecção bacteriana. Os autores acreditam ainda que estes achados qualificam o triclosan como uma droga com potencial para experimentos de tratamento de infecções bacterianas sistêmicas.

A grande experiência de sucesso da incorporação de triclosan em sabões, xampus, dentifrícios e utensílios domésticos tem levado alguns autores a testarem o seu efeito antimicrobiano em artefatos médicos. Mittelman *et al.* demonstraram *in vitro* que *stents* uretrais dopados de triclosan, liberam droga ativa durante um período equivalente ao da aplicação do dispositivo no paciente, minimizando possivelmente o risco de infecção (MITTELMAN, *et al.*, 2004).

Quitosana um biopolímero com boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioadesividade, foi utilizado na forma de gel com triclosan a 1% no tratamento de drenos cirúrgicos aplicados experimentalmente em camundongos. Após infecções experimentais com *Staphylococcus aureus* observou-se que os drenos de gaze embebidos com gel carregado de triclosan apresentaram um efeito preventivo contra infecções quando comparados com os controles (CAKMAK, *et al.*, 2009).

Em 2004, foi patenteado nos Estados Unidos um fio de sutura cirúrgica reabsorvível pelo organismo com a capacidade de prevenir infecções do sítio cirúrgico pela incorporação de triclosan aos polímeros. Este produto entrou no mercado e teve grande aceitação (JOHN, 2004). Em 2006, foi demonstrada *in vitro* a efetividade deste tipo de fio de sutura na redução das contagens de microrganismos aderidos experimentalmente ao material (EDMISTON, *et al.*, 2006).

Diante do exposto, parece-nos que o triclosan possui características desejáveis, como baixa toxicidade, estabilidade química, atividade antimicrobiana, mecanismo de ação distinto do da prata, capacidade de interagir sinergicamente com outros antimicrobianos e por fim possibilidade de incorporação a diferentes tipos de biomateriais, que o torna eletivo para esta pesquisa.

2.4 Vidros bioativos e bioatividade

A descoberta de Hench e colaboradores, há quase 40 anos atrás, de que uma gama variada de composições de vidros a base de fosfosilicatos tinham a habilidade de formar ligações químicas estáveis com os tecidos vivos (ossos, ligamentos e músculos) abriu um novo campo na medicina (HENCH *et al*, 1971). Desde então muitos materiais artificiais baseados nos vidros bioativos foram desenvolvidos e empregados com sucesso em aplicações clínicas para o reparo e substituição de partes do corpo humano.

O termo “bioativo” é definido como “um material que elícita uma resposta biológica específica resultando na formação de uma união na interface entre os tecidos e o material” (HENCH & WILSON, 1984). Diferentemente dos biomateriais inertes ou dos que se dissolvem em contato com tecidos vivos, os vidros bioativos em soluções orgânicas decompõem-se e formam uma camada de hidroxiapatita (HA) carbonatada, responsável pela ligação do material aos tecidos.

As apatitas são um grupo de fosfatos minerais, chamados genericamente de hidroxiapatita, quando altas concentrações de OH⁻ estão presentes no cristal. A fórmula mínima é a Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. A apatita é um dos poucos minerais que são produzidos e usados por sistemas biológicos, sendo a hidroxiapatita o principal constituinte do esmalte dentário e do tecido ósseo. Estudos histológicos mostraram que a camada desta substância que promove a integração do implante bioativo aos tecidos e protege a superfície contra futuras corrosões, possui entre 100 e 200 µm de espessura (GATTI, *et al.*, 1993).

O mecanismo da união histoquímica que acontece entre as cerâmicas de vidro bioativo e o tecido ósseo foi descrito em 1974 por Hench e envolve mecanismos celulares e iônicos (HENCH & PASCHALL, 1974). Em condições fisiológicas, nossos fluídos corporais são ricos em componentes iônicos da hidroxiapatita, de modo que uma vez que os núcleos cristalinos são formados, eles tendem a crescer espontaneamente. Adicionalmente, a dissolução de Ca²⁺ e PO₄³⁻

do vidro irá aumentar o grau de saturação do fluido corporal e aumentar a cinética de deposição de hidroxiapatita. A mineralização ocorre dentro da camada de maneira ectópica, produzindo cristais que fazem uma ponte entre a superfície do implante de VB e o osso maduro.

Clark *et al.* (1976), afirmaram que o mecanismo de formação de hidroxiapatita é independente do contato com os tecidos orgânicos e ocorre em água destilada, soluções de tampão TRIS ou ainda em SBF. Eles descreveram-no em cinco fases:

- I. Rápida troca iônica controlada dos ions modificadores de rede, Ca^{2+} e Na^+ do vidro com íons H_3O^+ do fluido corporal. Esta fase aumenta o pH na interface do implante com o osso.
- II. O aumento do pH local promove a quebra de ligações superficiais de Si-O-Si, formação de grupos silanóis (Si-OH) e liberação de sílica solúvel para a solução.
- III. Alguns dos grupos silanóis superficiais formados nas fases (i) e (ii) se condensam para formar uma camada superficial rica em sílica hidratada (silicato de cálcio amorfo).
- IV. Dissolução de íons HPO_4^{2-} e Ca^{2+} através da camada de sílica, para o fluido corporal, para formar uma camada de fosfato de cálcio amorfo com aumento da saturação do fluido corporal.
- V. Incorporação de íons carbonato e cristalização da camada de fosfato de cálcio amorfo em um equivalente biológico da hidroxiapatita.

Este mecanismo é semelhante ao que ocorre no interior do organismo humano. Nos tecidos ósseos a continuidade da reparação do osso danificado segue com a participação de mecanismos celulares do hospedeiro (GERHARDT & BOCCACCINI, 2010) cuja seqüência de eventos é mostrada a seguir:

- I. Adsorção bioquímica de fatores de crescimento na camada de hidroxiapatita.
- II. Ação de Macrófagos

- III. Fixação de células tronco
- IV. Diferenciação de células tronco em osteoblastos
- V. Geração da matriz
- VI. Cristalização da matriz
- VII. Proliferação e crescimento do osso.

OGINO, *et al.*, (1980), demonstraram que a camada de hidroxiapatita além de dar suporte para fixação tecidual serve também de camada protetora contra a erosão da superfície. Eles correlacionaram ainda a velocidade da sua formação com a capacidade de ligação ao osso. Uma taxa de formação excessivamente lenta resulta em nenhuma ligação aos tecidos. É o que acontece com os vidros bioativos de Hench que apresentam concentrações de sílica acima de 60% mol e não formam a superfície de hidroxiapatita, comportando-se como materiais bioinertes com nenhuma ligação aos tecidos ósseos. Por outro lado quando a velocidade de formação é alta, como no caso do *Bioglass*® 45S5, que possui 45% mol de sílica, cristais de hidroxiapatita formam-se em poucas horas após o implante, ligando-se a ambos, tecidos moles e duros em aproximadamente 1 semana (GATTI, *et al.*, 1993; HENCH, 1998b).

Por motivos práticos e éticos, a bioatividade destes vidros é freqüentemente avaliada pela taxa de cristalização da hidroxiapatita *in vitro*, em uma solução artificial que simula a concentração iônica dos fluídos corpóreos, ao invés da habilidade de ligar-se ao tecido ósseo *in vivo*, por ser esta última técnica pouco elegante, de difícil realização e que exige o sacrifício de animais (OGINO, *et al.*, 1980; PEREIRA, *et al.*, 1994; CHO, *et al.*, 1996; PEITL, *et al.*, 2001, KOKUBO, *et al.*, 2003).

Kokubo *et al.* (1990), propuseram uma solução aquosa tamponada com TRIS hidroximetil-amino-metano denominada de "*Simulated Body Fluid*" (SBF) para testes de bioatividade contendo concentrações de íons semelhantes às aquelas presentes no plasma humano (tabela 4). Esta solução é acelular, livre de proteínas, vitaminas e compostos orgânicos e apresenta pH 7.4, sendo capaz de induzir mudanças químicas na superfície de materiais bioativos semelhantes às apresentadas *in vivo*.

O procedimento atualmente mais usado para teste de bioatividade *in vitro* consiste em imergir o material a ser testado em solução SBF por períodos de tempo entre 3 h a 15 dias e verificar se houve formação de HA na superfície do material. Materiais com diferentes graus de bioatividade são classificados de acordo com o tempo necessário para aparecimento da camada de HA. Análises de Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (IVTF), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS) são as mais usadas para averiguar a formação de hidroxiapatita.

Tabela 4 - Concentração iônica do plasma sanguíneo humano e SBF segundo Kokubo, *et al.*(1990).

	Concentração iônica (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	CL ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma Humano	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Outro aspecto importante da composição dos VBs é que os produtos de dissolução ativam genes do hospedeiro que promovem a osteogênese e controlam a reparação celular. Isto pode estar relacionado à liberação de quantidades específicas de íons de Si, P, Na e Ca, cujas concentrações locais em ambiente fisiológico podem alcançar os valores críticos necessários para estimular a atividade celular (XYNOS, *et al.*, 2000; HENCH, *et al.*, 2002; JELL & STEVENS, 2006). Isto explica porque os VBs possuem uma taxa de formação óssea maior em comparação a outras cerâmicas inorgânicas como a hidroxiapatita (GHOSH, *et al.*, 2008).

A rota de síntese dos vidros bioativos também exerce grande efeito sobre a bioatividade, pois interfere diretamente na organização físico-química de seus componentes bem como nas suas propriedades. Os vidros bioativos obtidos por fusão, resultam do aquecimento a altas temperaturas de uma mistura precursora de óxidos e sais (SiO₂, Na₂CO₃, CaCO₃ e Na₃PO₄) seguido de rápido resfriamento dos componentes de modo que a cristalização não ocorra e o material torne-se rígido em virtude do aumento de sua viscosidade. Na sua constituição estão presentes os elementos formadores de rede (por ex. as cadeias de silício) interconectados em

formação quase randômica por cargas negativas de oxigênios formadores de pontes (OFP), balanceadas por coordenação com cátions do grupo I e ou II, chamados de “modificadores de rede” como o sódio e o cálcio (figura 4). Oxigênios não formadores de pontes (ONFP) formam grupos silanóis (Si-OH) que tornam a superfície destes vidros reativas. A presença cátions modificadores de rede tem a capacidade de reduzir as temperaturas necessárias para a fusão ao abrirem as redes de silicato pela quebra de grupos Si-O-Si. Mesmo assim temperaturas da ordem de 1300°C são necessárias, o que torna mais difícil a sua obtenção (GREAVES, 1985; GREAVES & SEN, 2007).

HENCH & WILSON, (1984) demonstraram que a composição relativa dos componentes destes vidros tem reflexo direto na bioatividade. A figura 5 mostra os comportamentos de vidros quaternários obtidos por fusão, compostos de concentrações variáveis de SiO₂, CaO, Na₂O com 6% mol de P₂O₅. Nela observa-se que a área de bioatividade está restrita a uma pequena região central, enquanto que a maior parte da superfície do triangulo é destinada a composições em que não há formação de vidro.

Uma rota alternativa de síntese é a técnica sol-gel, introduzida inicialmente na década de 80, principalmente como um meio de se produzir não somente filmes amorfos, mas também monólitos e fibras de vidro sendo posteriormente utilizada para síntese de vidros bioativos (LI, *et al.*, 1991). O processo é baseado em reações de polimerização inorgânica de precursores ou alcóxidos metálicos $M(OR)_n$, onde M representa o elemento formador de rede tal como o silício ou o fósforo, e R é um grupo alquil $C_xH_{(2x+1)}$. Esses precursores sofrem reações de hidrólise e condensação quando dissolvidos, para formar hidróxidos metálicos solúveis, os quais levam a formação de uma ligação contínua entre Metal-O-Metal como em uma rede inorgânica que se estende por todo o solvente (SARAVANAPAVAN, 2001).

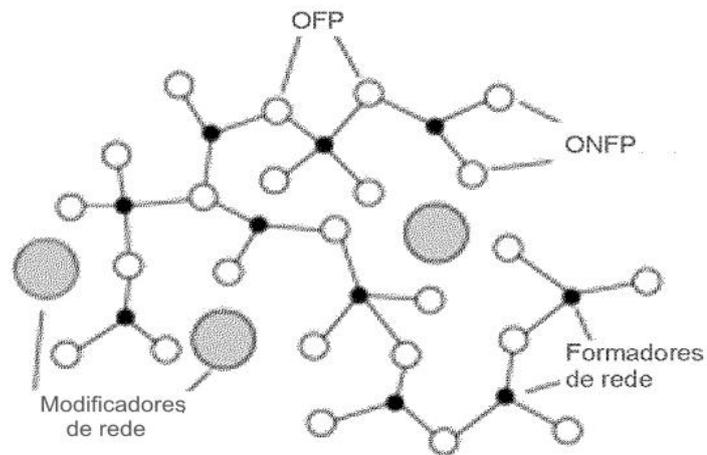


Figura 4 - Representação esquemática da estrutura vitro-cerâmica mostrando os átomos de silício (●), oxigênio (○) e os cátions modificadores de rede (●) OFP= Oxigênios Formadores de Pontes e ONFP = Oxigênios Não Formadores de Pontes. Adaptado de Coleman & Nicholson (2006).

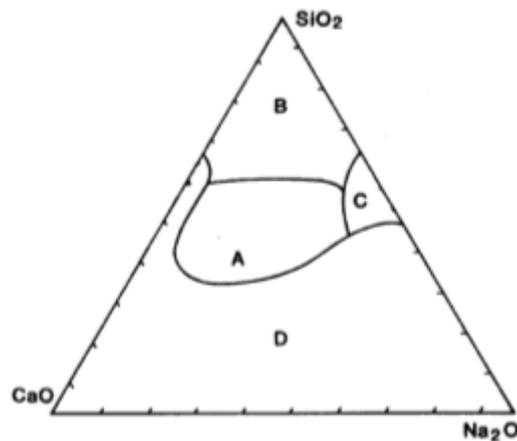


Figura 5 - Comportamento de vidros bioativos obtidos por fusão com diferentes composições relativas. Regiões (A) de ligação ao osso, (B) de encapsulação fibrosa, (C) de dissolução e (D) de não formação do vidro. Todas composições tem uma composição constante de 6% mol P2O5.

Fonte: HENCH, L. L. & WILSON, J. Surface active biomaterial. *Science*, v. 226, n. 4675, p. 630-636, 1984.

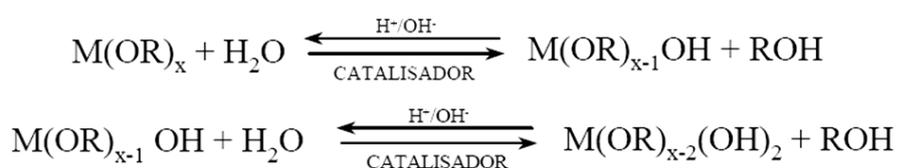
A principal prerrogativa do processo sol-gel de multicomponentes é a formação de uma solução homogênea antes da polimerização e o processamento em temperaturas mais baixas do que em métodos de fusão. Conseqüentemente não

há somente melhoria da homogeneidade química (PEREIRA, 1994), mas também o controle sobre a composição final e das características superficiais do produto. Também podem ser evitadas a separação de fases, a cristalização e a decomposição química dos componentes (SARAVANAPAVAN & HENCH, 2001).

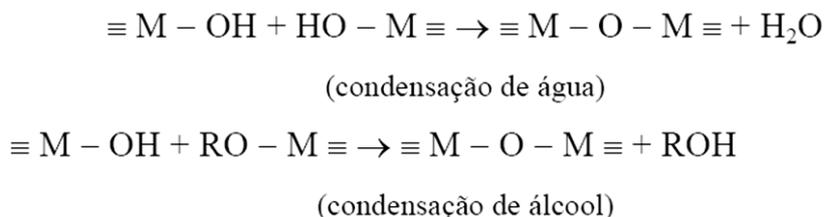
No que se refere aos mecanismos químicos de síntese, dois tipos de sol-gel são referenciados: tipo alcóxido (ou polimérico) e o tipo coloidal. No primeiro faz-se uso de um solvente orgânico, como um álcool, que atua dissolvendo o precursor metálico e a água de hidrólise (PAUL, 1990). No segundo tipo usa-se o princípio da química coloidal para gerar partículas de tamanho coloidal a partir de espécies iônicas em um meio aquoso. Apresenta-se aqui de forma mais detalhada a rota alcóxido que foi a utilizada na síntese do VB objeto deste estudo.

As equações seguintes descrevem as reações fundamentais, hidrólise e condensação, que permitem a conversão de precursores organometálicos em géis e posteriormente em vidros ou cerâmicas.

Hidrólise



Condensação



Onde M é um metal e pode ser Si, Al, Ti, Zr, Cr ou outro e R representa o grupo alquil. A condensação promove também a reação entre compostos de diferentes elementos o que propicia acriação de sistemas multicomponentes. Todas as reações

são de equilíbrio e o seu grau depende das espécies envolvidas e as condições sob as quais elas ocorrem. O catalisador das reações de hidrólise pode ser uma base ou um ácido, que atuarão também nas reações de condensação. As taxas relativas dessas reações são funções de diversos parâmetros, tais como temperatura, pH, natureza e concentração do precursor do íon metálico e a concentração de água. A hidrólise inicial ocorre mais rapidamente em condições de pH ácido enquanto que a condensação é mais acelerada em pH alcalino (SARAVANAPAVAN, 2001).

Além das menores temperaturas de processamento, a técnica sol-gel também permite expandir a faixa relativamente estreita de bioatividade dos vidros obtidos por fusão; enquanto estes não são bioativos com mais de 60% de sílica na constituição, os obtidos por sol-gel, são bioativos com até 90% de sílica (MARTINEZ, *et al.*, 2000). Este fato deve-se a uma área superficial muito maior, devido à presença de poros na estrutura hidratada, o que resulta numa maior taxa de deposição de hidroxiapatita e a adesão de biomoléculas à superfície do vidro (LEVY, *et al.*, 2007). Pelo contrário, nos vidros obtidos por fusão a baixa área superficial da SiO_2 pouco porosa e a ausência de grupos Si-OH limitam a taxa de dissolução deste material em meio fisiológico. É por esta razão que os vidros obtidos por fusão com composições maiores que 60 % mol de SiO_2 não possuem bioatividade. Como a área total da superfície reativa dos VBs, interfere diretamente na sua velocidade de dissolução é possível que os VBs usados na forma de um pó fino, apresentem maior superfície e conseqüentemente maior velocidade de dissolução que os mesmos compostos na forma de monólitos.

Felipe *et al.* (2009), mostraram que partículas de VB com 300 a 355 nm de diâmetro médio foram mais rapidamente absorvidas e resultaram em melhor reparação em defeitos intra-ósseos criados cirurgicamente em mandíbulas de cães, do que partículas com diâmetro de 90 até 710 nm e que os defeitos regenerados possuíam propriedades biomecânicas equivalentes ao osso saudável.

Saravanapavan *et al.* (2003), demonstraram que quanto menores as partículas do vidro bioativo 58S5 obtido por sol-gel, maior era a sua velocidade de dissolução em SBF. Entretanto, face aos resultados inconclusivos de alguns estudos

disponíveis na literatura, ainda não há suporte conclusivo para esta afirmação (THOMAS, *et al.*, 2005).

A incorporação de pequenas quantidades de outros elementos químicos em materiais bioativos, pode proporcionar importantes modificações a nível estrutural, bem como adicionar propriedades á aquelas já conhecidas, promover o melhor controle destas ou ainda criar novas propriedade não conhecidas (LAO, *et al.*, 2008). Desta forma a introdução de alguns elementos químicos aos constituintes dos vidros bioativos pode interferir nataxa de bioatividade, na citotoxicidade e aindaproduzir efeitos antiinflamatórios e antimicrobianos.

Segundo a literatura, entre os principais elementos incorporados na composição dos VBs, há grande predominância de metais. Branda *et al.* (2002), estudaram os efeitos da incorporação de diferentes concentrações de gálio, alumínio e índio em substituição ao CaO, na bioatividade de um vidro bioativo binário composto de CaO:SiO₂. Foi observado que em geral, estas substituições reduzem progressivamente a habilidade de formar a camada de fosfato de cálcio nas superfícies expostas ao SBF.

A presença de estrôncio em biocerâmicas possui efeitos positivos na reparação óssea. Lao *et al.* (2008), estudaram um vidro ternário obtido por sol-gel, baseado no sistema SiO₂:CaO:SrO e demonstraram que este vidro possuía a capacidade de formar uma camada de fosfosilicato em SBF com aumento da cinética da reação e que vidros dopados com estrôncio podem liberar quantidades controladas deste metal para o meio biológico. A presença de estrôncio no *Bioglass* 45S5 não interfere na osteocondutividade de implantes em medula óssea da tíbia de ratos, nem na mineralização óssea em termos de razão cálcio\fósforo (GORUSTOVICH, *et al.*, 2010).

A incorporação de hematita a um vidro bioativo obtido por fusão no sistema SiO:CaO:P₂O₅:MgO:CaF₂:Fe₂O₃, em concentrações variando de 5 a 20%, confere ao material propriedades magnéticas mas interferem negativamente na sua bioatividade *in vitro* (SHARMA, *et al.*, 2009).

Por outro lado, a incorporação de magnésio produz efeito contrário. Em um vidro bioativo no sistema ternário $\text{SiO}_2\text{:CaO:P}_2\text{O}_5$ a substituição do CaO por magnésio, alterou a sua organização pela diminuição da razão entre os grupos Si-O-NFP / Si-O-Si, aumentando a taxa de deposição de hidroxiapatita (MA, *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram obtidos por Erolet *et al.* (2010), que demonstraram ainda que enquanto o magnésio aumenta a bioatividade o zinco a reduz.

AINA *et al.* (2009), mostraram que a incorporação de 5% de zinco ao vidro bioativo 45S5 determina uma redução na taxa de formação de hidroxiapatita em tampão TRIS (hidroximetil aminometano) e em meio Dulbeco, mas que não apresenta citotoxicidade em células endoteliais.

Um dos metais mais estudados em aplicações de biocerâmicas é a prata em função das suas propriedades antimicrobianas. Se por um lado há unanimidade que a sua incorporação aos vidros bioativos induz um efeito antibacteriano em ensaios *in vitro*, associado à baixa ou nenhuma citotoxicidade, por outro os seus efeitos sobre a bioatividade são contraditórios. A tabela 5 apresenta uma coletânea de trabalhos com incorporação de prata à biocerâmicas e os efeitos notados sobre a bioatividade. A dopagem normalmente é feita pela rota sol-gel ou por troca iônica em solução, nos casos de vidros obtidos por fusão. Esta última permite a incorporação de menor quantidade de prata que se concentra mais na superfície das partículas. De um modo geral a bioatividade é pouco afetada pela adição de prata na composição até um limite de 2% do peso, dependendo da constituição do material. Maiores concentrações promovem alterações da organização do VB e podem ter reflexos na velocidade de formação da camada de apatita em SBF.

Tabela 5 – Relação de biocerâmicas com diferentes fontes e concentrações de prata, incorporadas e efeito sobre a bioatividade avaliada *in vitro*, de segundo vários autores.

Biocerâmica	Fonte	Conc. (*)	Técnica	Efeito	Referências
Fosfato cálcico	NO ₃ Ag	-	Troca-iônica	>	(SHIRKHZANZADEH, &col, 1998)
SiO ₂ :CaO:P ₂ O ₅	Ag ₂ O	2%	Sol-gel	≈	(BELLANTONE & HENCH, 2001)
45S5	Ag ₂ O	0,1M	Troca-iônica	≈	(CLUPPER & HENCH, 2001)
58S e S70C30	Ag ₂ O	2%	Sol-gel	≈	(SARAVANAPAVAN, <i>et al.</i> , 2003)
SiO ₂ :CaO:NaO	Ag ₂ O	0,5%	Sol-gel	≈	(CATAURO, <i>et al.</i> , 2004)
SiO ₂ :CaO:Na ₂ O	NO ₃ Ag	-	Troca-iônica	<	(DI NUNZIO, <i>et al.</i> , 2004)
SiO ₂ :CaO:P ₂ O ₅	NO ₃ Ag	5%	Sol-gel	nt	(BALAMURUGAN, <i>et al.</i> , 2008)
SiO ₂ :CaO:P ₂ O ₅	NO ₃ Ag	2%	Sol-gel	≈	(BLAKER, <i>et al.</i> , 2004)
Si:Ca:F:N:K:P:Mg	NO ₃ Ag	-	Troca-iônica	≈	(VERNE, <i>et al.</i> , 2008)

Legenda: (>) estimulante, (≈) semelhante, (<) prejudicial, (nt) não testado, (-) indeterminado, (*) concentração % ou Molar

Nos últimos anos com um maior conhecimento e controle das variáveis que regem a bioatividade e a reabsorção das biocerâmicas, um grande número de pesquisadores começaram a desenvolver vidros bioativos a base de silicatos altamente porosos, com estrutura esponjosa tridimensional que mimetizam as trabéculas dos tecidos ósseos (HENCH & POLAK, 2002), ou ainda compósitos de VB e biopolímeros diversos, para reparos ósseos (VATS, *et al.*, 2003).

Estas aplicações compreendem a terceira geração de biomateriais, iniciada no começo dos anos 90 visando promover respostas celulares específicas a nível molecular a fim de atender a medicina regenerativa na restauração dos tecidos doentes e danificados. Do ponto de vista conceitual destaca-se por fim a convergência entre os conceitos de bioatividade e absorção. Materiais bioativos estão sendo feitos reabsorvíveis e polímeros reabsorvíveis estão sendo feitos bioativos (HENCH & POLAK, 2002). Estes avanços tem tornado a engenharia de tecidos uma das mais promissoras áreas das ciências multidisciplinares.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral: Sintetizar por sol-gel vidros bioativos multicomponentes, no sistema 60Si:36Ca:4P, dopados com diversos teores de prata e triclosan e avaliar o seu potencial antibacteriano.

3.2 Específicos:

3.2.1 Caracterizar físico-quimicamente vidros bioativos multicomponente obtidos por sol-gel no sistema 60Si:36Ca:4P, com 1, 3 e 5 mol % de prata (VB-Ag) em excesso.

3.2.2 Avaliar *in vitro* a bioatividade dos VB-Ag e a respectiva intensidade da atividade antibacteriana.

3.2.3 Definir qual dos VB-Ags sintetizados apresenta melhor compatibilidade entre bioatividade e atividade antibacteriana.

3.2.4 Promover a dopagem de VB e de VB-Ag com triclosan e caracterizá-los físico-quimicamente.

3.2.5 Avaliar a intensidade da atividade antibacteriana dos produtos do item 3.2.4

3.2.6 Avaliar a atividade antibacteriana de VB-Ag-triclosan frente a bactérias isoladas de infecções em pacientes hospitalizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A complexidade dos sistemas vivos torna praticamente impossível a simulação *in vitro* das condições fisiológicas do organismo animal, o que dificulta a avaliação das propriedades biológicas dos biomateriais. Desta forma muitos resultados microbiológicos encontrados em nossa revisão de literatura carecem de relevância, pois seus autores primaram apenas pela determinação qualitativa ou quantitativa da presença de agentes antimicrobianos incorporados nos biomateriais, ou quando muito, atestaram a atividade biológica sem caracterizar a sua cinética de liberação a partir do biomaterial. Em se considerando a natureza iônica dos processos químicos de lixiviação dos VBs em líquidos que simulam a concentração iônica plasmática do sangue e a existência de variáveis intervenientes que interferem nos resultados, resolvemos por inovar em alguns aspectos metodológicos, como por exemplo, na técnica de amostragem, na titulação da atividade antibacteriana em sistemas fechados e abertos (sujeitos a reposição de fluido), na fixação da temperatura para a condução dos ensaios de bioatividade e antibacterianos em 35°C, por ser a temperatura basal do organismo humano e na criação de uma nova microtécnica de avaliação da atividade antimicrobiana, diferente dos padrões convencionais adotados para antibióticos e quimioterápicos.

A conveniência destes métodos deverá ser comprovada experimentalmente com estudos em animais e a comparação dos resultados com os de outros estudos deverá ser feita com parcimônia levando em consideração a distinção da metodologia adotada. Estes procedimentos serão descritos a seguir.

4.1 Síntese do vidro bioativo pela técnica sol-gel e dopagem com prata.

A síntese dos VBs foi conduzida no laboratório de materiais do Departamento de Física da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, segundo Coelho (2003) e obedeceu as seguintes etapas: (i) mistura dos precursores, (ii) hidrólise, (iii) gelatização, (iv) envelhecimento, (v) secagem e estabilização. Entre cada adição de compostos, a mistura foi homogeneizada por meio de um agitador

magnético (marca FANEM) por uma hora. As amostras foram preparadas no sistema $60\text{SiO}_2:36\text{CaO}:4\text{P}_2\text{O}_5$ como descrito a seguir:

- (1) Em um Becker foram adicionados seqüencialmente: 103,5ml de água deionizada, 90 mL de Etanol e 5,76 mL de Ácido Nítrico 2M.
- (2) A seguir foram adicionados 29,7ml de Tetraetilortosilicato (TEOS), 3,03ml de Tetraetilfosfato, (TEP) e 21,408g de Nitrato de Cálcio.
- (4) A prata foi adicionada em excesso na forma de nitrato de prata à composição molar, sendo dissolvida nas quantidades de 0,1307 g, 0,3920 g, e 0,6533 g o que corresponde a 1, 3 e 5 mol%.
- (5) Hidróxido de Amônia 98% foi adicionado em gotas (aproximadamente 2,5 mL) sob agitação até o início da geleificação.
- (6) Após a gelatização as amostras foram secas a $130\text{ }^\circ\text{C}.24\text{h}^{-1}$, tratadas a $600^\circ\text{C}.4\text{h}^{-1}$ sob aeração para a eliminação dos resíduos da reação, compostos orgânicos, hidroxilas e estabilização da estrutura vítrea. As seguintes composições relativas foram alcançadas:
 - ✓ $\text{SiO}_2 = 60\%$ em mol
 - ✓ $\text{CaO} = 36\%$ em mol
 - ✓ $\text{P}_2\text{O}_5 = 4\%$ em mol
- (7) A desaglomeração dos aglomerados de partículas primárias em partículas menores de VB foi obtida por trituração e filtração em peneiras de aço inox com trama 12 mesh que permite a passagem de partículas com diâmetros menores de $120\text{ }\mu\text{m}$.

O produto final foi um pó fino, branco e inodoro que quando acrescido de prata torna-se acinzentado dependendo da quantidade deste metal e que foi guardado em ambiente escuro e seco para evitar a redução da prata.

4.2 Dopagem do VB com triclosan

A dopagem com triclosan foi feita por meio da adsorção do produto à superfície dos VBs. Face as suas características químicas como fusão a 57°C e perda da estabilidade por aquecimento entre 150 a 200°C, promoveu-se a incorporação do triclosan após o tratamento térmico do VB. A alta porosidade do VB e reatividade por troca-iônica favorecem a dopagem de VBs obtidos pela rota sol-gel. O método proposto é descrito a seguir:

- (1) *Cinco g de triclosan (Galena) e mantidas em Banho Maria em um Becker a 57° C por 15 minutos até a sua fusão;*
- (2) *A seguir 0,5 g de VB ou VB-Ag foi acrescida ao triclosan e mantido por mais 7 horas a 57° C.*
- (3) *Terminado o tempo de adsorção, o precipitado foi lavado três vezes com 50 mL de etanol 95% (Labsynth) para eliminação do triclosan não adsorvido.*
- (4) *O produto restante foi seco em estufa a 50°C por uma noite e reduzido mecanicamente a um pó fino.*

Os componentes usados, procedência, grau de pureza e quantidades utilizadas na síntese do VB, bem como na dopagem com prata e triclosan estão relacionados na tabela 6.

4.3 Caracterização físico-química dos VB

Visando a caracterização dos VBs as amostras sintetizadas no item anterior foram caracterizadas visualmente e submetidas à microscopia ótica, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectrometria de Energia Dispersiva (EDS), Análise Termogravimétrica (TG), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) e Difractometria de Raios-X.

4.3.1 Caracterização morfológica do VB

Os Vbs foram fotografados diretamente com o auxílio de uma câmara fotográfica digital marca Kodac modelo AF3x e ampliados 60 X com o auxílio de um microscópio de transmissão Carll Zeis modelo Jenamed 2, sob campo escuro.

Tabela 6 - Relação dos componentes utilizados na síntese e dopagem de VBs, procedência, pureza e quantidades

Componente	Fabricante	Pureza	Quantidade
Água deionizada	-	-	103,5 mL
Ácido nítrico	Merck	66,0 %	5,76ml (2M)
TEOS	Sigma-Aldrich	99,9%	29,7 mL
Etanol absoluto	Labsynth	99,9%	90 mL
TEP	Sigma-Aldrich	99,9%	3,03 mL
Nitrato de cálcio	Cinética Química	99,9%	21,408 g
Hidróxido de amônia	Merck	98,0%	2,5 mL
Nitrato de prata	Merck	99,9%	(1%) 0,1307 g (3%) 0,3920 g (5%) 0,6533 g
Triclosan	Galena	99,9%	5 g
Etanol 96°	Labsynth	95%	150 mL

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

O microscópio eletrônico de varredura é um equipamento que permite análises qualitativas e morfológicas da superfície de materiais. Face ao pequeno comprimento de onda do feixe de elétrons, imagens com magnificações da ordem de 300.000 aumentos associadas a um grande poder de resolução, podem ser obtidas o que não seria possível em equipamentos óticos que fazem uso de luz visível. As amostras devem sofrer um pré-tratamento antes de serem observadas, visando sua desidratação e recobrimento com material condutor para escoamento dos elétrons, a fim de evitar o acúmulo de cargas que repelem o feixe de elétrons incidentes

inviabilizando a formação de imagem. A aplicação desta técnica permitiu a avaliação do grau aglomeração dos grãos (porosidade e coalescência) de VB de diferentes amostras e do tamanho das partículas primárias. Foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura marca JEOL modelo 6830 LV. Após o recobrimento das amostras por carbono ou ouro, para avaliação da composição química e ouro para obtenção de imagens com maior resolução, foram obtidas micrografias com magnificações de 500 e 10.000 aumentos para a caracterização da morfologia dos grãos de VB bem como de sua superfície. Análises de avaliação do tamanho das partículas primárias bem definidas (e independente de *clusters*) foram realizadas com auxílio do software gráfico *ImageJ* 1.43u e os resultados analisados estatisticamente através do teste paramétrico ANOVA para um critério e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

4.3.3 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

A espectroscopia de energia dispersa está fundamentada na identificação das radiações emitidas quando da excitação dos átomos de uma amostra por um feixe de elétrons. A radiação é identificada conforme sua energia e contada por um detector localizado dentro da câmara de vácuo. Um software acoplado ao sistema gera um espectro relativo ao número de contagens em função da energia de excitação (KeV), identificando os elementos. Trata-se, portanto de técnica qualitativa ou semi-quantitativa que gera mapas de distribuição dos elementos da imagem em estudo. As análises de EDS foram realizadas concomitantemente às caracterizações morfológicas da MEV.

4.3.4 Análise Termogravimétrica (TG)

Análises termogravimétricas são baseadas no estudo da variação de massa de uma amostra em função da temperatura. Este método de caracterização identifica as transformações físico-químicas envolvendo mais comumente evaporação e desorção de água livre, ligadas (hidroxilas) ou decomposições envolvendo perda de água de estrutura, descarbonatação, decomposição de nitratos e sulfatos. Pode-se inferir a respeito da estabilidade térmica de compostos, da

composição, e estabilidade de compostos intermediários e da composição do resíduo. Neste estudo avaliamos as perdas d'água e de compostos orgânicos das amostras. As amostras foram analisadas em equipamento marca Shimadzu modelo TA50H, equipado com cadinho de platina sob fluxo de $100\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ de nitrogênio com taxa de aquecimento de 5°C por minuto.

4.3.5 Espectroscopia de Adsorção no Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (IVTF).

A espectroscopia no infravermelho se baseia no fato de que as moléculas possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de *níveis vibracionais*). Tais frequências dependem, da geometria molecular (orientações e distâncias), das massas dos átomos e ligações químicas. Portanto, a espectroscopia de Infra-vermelho por transformada de Fourier fornece informações sobre a estrutura molecular a partir de espectros vibracionais obtidos da quantidade de energia absorvida para o estiramento (deformação axial) e flexão (deformação angular) das ligações entre átomos de diferentes grupos funcionais. Esta técnica é rápida e não-destrutiva, não necessita de vácuo e amostras de dimensões variadas (dependendo do tamanho do porta-amostra) e mesmo pós podem ser analisados. Com esta técnica pode-se verificar mudanças em composição, bem como modificações estruturais. A absorvância das amostras ao Infra-Vermelho foi avaliada como uso de um espectrofotômetro marca Nicolet modelo NEXUS 670, com resolução de $8,0\text{ cm}^{-1}$. As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr, grau espectroscópico.

4.3.6 Difractometria de Raios-X (DRX)

O princípio da difratometria de raios-X consiste na interação um feixe de raios-X monocromático e colimado originados de um alvo de cobre do qual se utiliza a radiação cobre K alfa ($\text{CuK}\alpha$), com os planos de átomos de uma amostra. Devido à proximidade do comprimento de onda de raios-X e das distâncias interplanares (d) do sólido, este último atua como grade de difração. Dependendo do ângulo de incidência, diferentes planos refletem os raios iniciais e as diferenças de caminho

ótico das reflexões em planos paralelos geram um padrão de interferência (destrutiva ou construtiva) característico de cada distância. O padrão de difração vai caracterizar a estrutura cristalina do composto. Estes dados permitem calcular os parâmetros da rede cristalina e identificar as fases cristalinas através de uma base de dados. Os difratogramas das amostras foram determinadas em um equipamento marca Rigaku–Rotaflex modelo RU200B com radiação CuK α operado a 50kV e 100mA. Os padrões de difração foram analisados usando-se dados do “*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*” (JCPDS), atualmente denominado “*International Centre for Diffraction Data*”(ICDD).

4.4 Avaliação *in vitro* da bioatividade dos VBs.

A bioatividade foi avaliada *in vitro* por imersão do VB em SBF conforme descrito por Kokubo *et al.* (1990). A solução de SBF foi preparada conforme descrito no anexo 1 e o teste de bioatividade descrito a seguir:

- (1) *Em cinco tubos de ensaio, foi adicionado 1,0 mL de SBF e 10mg de VB.*
- (2) *As amostras foram então incubadas a 35° C por um período de 0 a 7 dias.*
- (3) *A cada intervalo de 0, 1, 2, 3, 4, e 7 dias de bioatividade um tubo foi esgotado e o precipitado lavado com água destilada.*
- (4) *Cada amostra foi a seguir seca a 50°C em estufa por 24 h e armazenada para posterior detecção das fases cristalinas.*

4.5 Avaliação da atividade antibacteriana.

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Optou-se pela modificação de procedimentos descritos para as técnicas de microdiluição (CLSI) , baseado na quantificação da inibição do crescimento bacteriano.

As amostras sintetizadas foram submetidas a imersão em SBF e avaliadas por meio de um teste que correlaciona a atividade antibacteriana presente nas fases da solução com o tempo de imersão. Desta forma considerando-se a natureza bioativa do material buscou-se avaliar o efeito da bioatividade *in vitro* na liberação e disponibilização dos princípios ativos contidos nas amostras.

Em um segundo momento, o produto final deste estudo foi testado *in vitro* frente a 36 cepas de bactérias variadas, isoladas de infecção de pacientes hospitalizados por meio da técnica da diluição em Agar.

O ponto de partida foi a preparação de uma solução mãe contendo 100mg de VB em 10 mL de SBF, ou seja, uma concentração inicial de $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esta solução foi mantida em frasco fechado para evitar evaporação, a 35°C para os ensaios de dissolução do VB. As amostras foram retiradas diariamente segundo os critérios estabelecidos a seguir.

As amostras foram retiradas dos tubos sob agitação por meio de um Mixer. Este procedimento garantiu que cada amostra fosse composta de uma fração líquida e outra sólida, proporcionais à da solução mãe. Ajustou-se o sistema de modo que 1 mg de VB fosse transferido a cada volume de suspensão retirado. Para tal uma micropipeta volumétrica de $100\mu\text{L}$ foi calibrada exclusivamente para esta finalidade. O peso médio da fração sólida das amostras de uma série de 20 repetições, aferido por pesagem após evaporação da parte líquida em estufa a 50°C foi de $1,0\text{ mg} \pm 0,2$ (Anexo 2).

Outra questão delimitada foi a manutenção do sistema de dissolução. Considerando-se que a velocidade de dissolução de sais em meio iônico é afetada por fatores como temperatura, grau de saturação da solução e da solubilidade dos componentes, optamos por adotar dois sistemas denominados “sistema fechado” e “sistema aberto”. No primeiro, não houve nenhuma reposição do diluente entre a remoção das alíquotas durante o período de dissolução que foi de 7 a 9 dias de modo que o sistema tendesse a saturação. Nele os resultados das titulações

realizadas expressavam a capacidade antibacteriana conjunta da fase sólida e líquida no momento da coleta da amostra.

Como alternativa, o sistema aberto, foi concebido para avaliar a liberação diária de antimicrobianos dos VBs para a fase líquida. Neste caso, a cada alíquota de 100 µl da fase líquida (sem o VB), removida diariamente, renovou-se completamente o SBF dos tubos restituindo-se o seu volume original (isto equivale a aproximadamente 60% do volume total da suspensão). Desta forma, a cada 24 h, após a amostragem e substituição do volume líquido de diluente, reiniciava-se o ciclo de liberação dos antimicrobianos em solução renovada. Em cada alíquota titulada, a atividade antibacteriana era atribuída à apenas a fração solúvel ou em suspensão fina presente da amostra.

4.5.1 Titulação pelo Número de Unidades Inibitórias.

O ensaio de avaliação da atividade antibacteriana foi baseado na menor quantidade de VB capaz de inibir a atividade metabólica de um inóculo padrão e é descrito a seguir:

(1) Foi utilizada uma cepa padrão de Escherichia coli ATCC25922 de nossa bacterioteca. Todos os meios de cultivo são produtos comerciais de composição definida, preparados e esterilizados conforme as recomendações dos fabricantes.

(2) As amostras dos VBs foram submetidas a diluição seriada em volume de 100µl de SBF, sobre microplacas de poliestireno (TPP®) de fundo chato e 96 poços, em triplicata. As transferências de volumes foram efetuadas com auxílio de uma pipeta multicanal calibrada conforme descrito anteriormente, com troca de ponteira entre os poços, obtendo-se as diluições de 1 / 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 e além quando necessário. A cada diluição e antes das transferências, cinco sucções do volume de cada série de poços foram feitas a fim de garantir uma boa homogeneização da suspensão. Após as diluições, as microplacas foram secas a 50° C por 12 h e a seguir guardadas em geladeira e em ambiente escuro, até o momento da realização dos testes.

(3) Para o preparo do inóculo padrão, a cultura de *Escherichia coli* ATCC25922 foi inicialmente semeada em um tubo com 5 mL de Caldo Brucela (BBL®) e incubada por 12 h a 35°C. Um ml desta cultura ativada foi semeado em 100 mL do mesmo meio, incubado a 35°C até que suficiente turvação fosse percebida. Esta cultura teve a sua concentração ajustada por turbidimetria ao equivalente ao tubo 0,5 da escala Mc Farland. Este processo foi facilitado pelo uso de um espectrofotômetro de luz visível, Marca Metrolab ajustado para 625 nm de comprimento de onda. O mesmo meio sem crescimento foi usado como “branco” para normalizar o aparelho. A absorbância da suspensão bacteriana a 625 nm foi ajustada na faixa de 0,08 a 0,1 unidades, o que corresponde à concentração 1 a 2 .10⁸ bactérias.mL⁻¹ (GARCIA, 2007). Uma vez ajustada a concentração bacteriana, foi adicionado ao meio 1 mL de uma solução estéril de azul de bromotimol (Sigma®) a 0,5% como indicador de pH. Desta solução, 100 µL foram utilizados como inóculo em todos os testes de atividade antibacteriana, o que corresponde a uma concentração de 1 a 2 .10⁷ bactérias.

(4) Aos precipitados secos de VB, formados no fundo dos poços obtidos no item 2 adicionou-se 100 µL do inóculo de *Escherichia coli* ATCC 25922, preparado conforme descrito no item 3. Controles positivos e negativos do crescimento bacteriano e do diluente foram respectivamente realizados. A microplaca foi então incubada a 35°C por 24 h em uma cuba plástica fechada para evitar-se evaporação. O protocolo completo com a seqüência dos procedimentos, diluições, volumes processados, títulos obtidos e meios utilizados encontra-se no anexo III.

(5) Todos os ensaios foram realizados em triplicata, a temperatura de 35°C. Foi definido como Unidade Inibitória (UI) a **maior diluição** do VB que inibiu a atividade metabólica (mais especificamente a fermentação da glicose do meio) do inóculo em 100% das repetições, o que é evidenciado pela manutenção da cor do indicador de pH, azul de bromotimol (verde) conforme ilustrado na figura 28. A cor amarela dentro de um período de 24 h indica acidificação do meio por atividade metabólica presente e conseqüentemente a viabilidade do inóculo. A fim de se evitar confusão com os testes clássicos de Concentração Inibitória Mínima (CIM), embora a concepção do nosso teste seja a mesma, resolvemos por bem, adotar a sigla UI_n. (Unidade

Inibitória) e os títulos foram expressos em número de UIn por mg de VB, (UIn.mg^{-1}), já que o volume inicial testado ($100\mu\text{L}$) continha aproximadamente 1 mg de VB para o sistema fechado e em número de $\text{UIn.}100\mu\text{L}^{-1}$ para o sistema aberto, posto que a reação foi desenvolvida em volumes de $100\mu\text{L}$.

4.5.2 Avaliação da atividade antibacteriana de pela técnica da difusão em Agar.

O produto final desta pesquisa, ou seja uma amostra de VB dopada de prata e triclosan, foi testado frente a 36 culturas de bactérias isoladas de casos de infecções de pacientes hospitalizados, provenientes do laboratório de análises clínicas do Hospital Regional de Campo Grande-MS, conforme procedimento descrito a seguir:

(1), *As culturas criopreservadas em glicerina tamponada foram descongeladas, semeadas em Caldo Brucela e incubadas a 35°C por 24 h para reativação e crescimento inicial.*

(2) *Uma vez ativadas, elas foram plaqueadas em Agar Muller Hinton (DIFCO) para avaliação da pureza. Culturas puras obtidas dos crescimentos por 12 h a 35°C foram novamente semeadas em 5 mL de Caldo Brucela por 6 h a 35°C e a concentração bacteriana ajustada por turbidimetria para aproximadamente 1 a 2.10^8 bactérias .mL^{-1} , conforme descrito anteriormente no item 4.4.1(3).*

(3) *A 20 mL de Agar Muller Hinton fundidos em um tubo de ensaio mantido a 50°C, foi adicionado 40 mg.mL^{-1} do produto final e a seguir dispensado após homogeneização em uma placa de Petri estéril de 100 mm de diâmetro. Uma placa contendo o mesmo meio como vidro bioativo sem antimicrobianos foi preparada como controle. Após a solidificação, as placas foram mantidas em frascos fechados para evitar-se a desidratação, protegidas da luz e em geladeira até o momento do teste.*

(4) *Os inóculos foram diluídos a 1:10 (equivalente a 1 a $2.10^7.\text{mL}^{-1}$) e aplicados na superfície das placas com um replicador de Sterrs (de construção própria) com*

seção transversal metálica de 3 mm, que permite a transferência de volumes de 1 a 2 µL. Desta forma cada ponto de inóculo continha aproximadamente 1 a 2 .10⁴ bactérias (GARCIA, 2007). Após 24 h de incubação a 35° C, as placas foram lidas para presença ou ausência de crescimento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização ótica do VB.

As fotografias na figura 6 mostram o aspecto visual dos grãos em (i) sob observação direta, em (ii) e (iv) com aumento ótico da câmara fotográfica e em (iii) sob aumento de microscópio ótico com condensador de campo escuro. Nota-se nos menores aumentos (i), (ii) e (iv) a estrutura granular amorfa e homogênea do pó. Ao maior aumento em (iii), por microscopia ótica percebe-se o aspecto vítreo translúcido e reflectivo da superfície das partículas de cor branca.

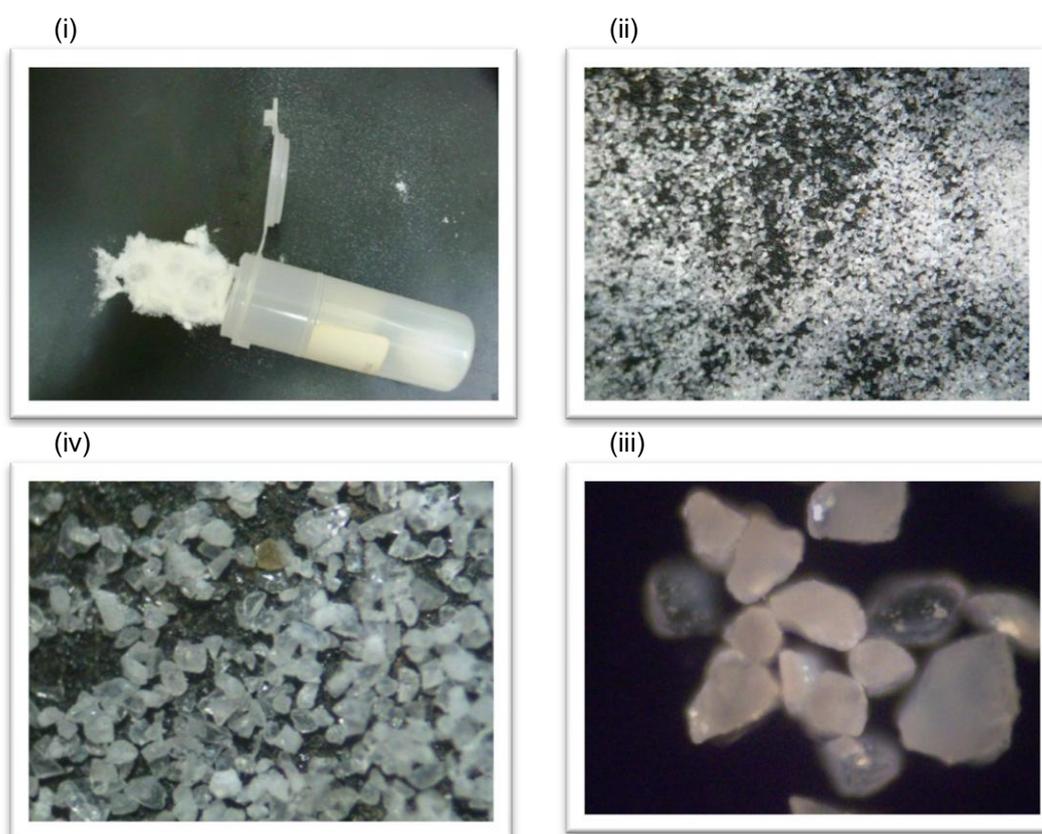


Figura 6 - Aspecto visual (i) e sob ampliação ótica (ii, iii, iv) do VB em pó, obtido por sol-gel no sistema $\text{SiO}_2:\text{CaO}:\text{P}_2\text{O}_5$, sinterizado a 600°C .

5.2 Caracterização físico-química dos VBs dopados com prata.

5.2.1 Caracterização pela MEV.

As imagens da microscopia eletrônica de varredura das amostras obtidas de VB-Ag com 0, 1, 3 e 5 mol % de prata, estão apresentadas nas figuras 7 a 14. Os campos foram escolhidos para mostrar os aspectos mais comuns. Nas figuras pares as imagens foram obtidas com diferentes aumentos e denotam estruturas granulares de tamanho variado e aspecto amorfo com superfície irregular e microporosa. Em alguns grãos observamos a coalescência de grânulos menores de forma e tamanho irregulares, distribuídos pela sua superfície como que aderidos (figura 7 região central a direita e a esquerda). Os grãos possuem de 10 a 150 μm e se constituem de aglomerados de *partículas primárias nanométricas* com diâmetro médio de 300 nm conforme avaliado por morfometria. Entre as partículas primárias encontram-se poros em grande quantidade, facilmente visíveis nas figuras ímpares sob aumento de 10.000 vezes (figura 8 região central superior e inferior, e figura 10, idem). A incorporação de prata nos níveis propostos não causou alteração significativa na morfologia dos grãos muito embora tenha determinado uma redução aparente no diâmetro das partículas primárias. A análise morfométrica das partículas primárias revelou um diâmetro médio em nm de: $(32\pm 5).10$; $(20\pm 3).10$; $(27\pm 5).10$ e $(18\pm 3).10$ para as amostras com 0, 1, 3 e 5 mol% de prata respectivamente. A análise de variância das médias (ANOVA) mostrou haver diferença estatística significativa ($P < 0,01$) entre o diâmetro das partículas primárias dos grãos sem prata em relação aos grãos que possuem diferentes concentrações de prata (anexo IV), muito embora entre estas últimas as diferenças na redução das partículas primárias não sejam proporcionais a quantidade de prata incorporada. Isso mostra que a presença de prata nos VBS, em geral reduziu o diâmetro das partículas primárias e provavelmente, conforme constatação visual (figuras 8 e 14) inferiu também na quantidade de poros nas amostras o que é compatível com uma compactação da estrutura.

Segundo Hench (1998) a área superficial dos vidros bioativos obtidos por sol-gel relaciona-se com as altas taxas de bioatividade (HENCH, *et al.*, 1998). Uma

grande área superficial associada à estrutura dos microporos facilitam o estágio inicial de troca iônica, resultando em uma liberação de íons cálcio na solução bem como um aumento do pH, que mais alcalino, favorece a repolimerização dos grupos silanol e a cristalização de HA na superfície (LI, 1991a). Os poros presentes na estrutura do vidro agem como sítios de nucleação. A superposição de potenciais de superfície dentro dos poros aumenta a concentração iônica e o grau de supersaturação dos íons Ca e P. Portanto, a precipitação de HA é mais provável de ocorrer dentro dos poros.

A taxa de nucleação é então controlada pelo número de sítios disponíveis, isto é, volume de poros, e pela difusão de íons dentro dos mesmos sendo que ambos os fatores dependem da textura do material (PEREIRA, 1996). Desta forma uma densificação do material resultante da adição de prata poderá ter reflexos nas taxas de formação de HA.

5.2.2 Caracterização por EDS

Os espectros de raios-x de energia dispersiva das amostras de VB-Ag com 0,1,3,e 5 mol % são apresentados na figura 15. Observa-se a predominância das linhas Si K α e Ca K α , que estão bem resolvidas em todos os espectros. Além delas observam-se as linhas Ca L α 1 e O K α com menores intensidades. O P foi detectado na linha PK α de forma tênue. O mapeamento dos principais elementos mostra que eles estão distribuídos em conformidade com as proporções dos elementos Si, Ca e P na fórmula final, o que comprova a composição da amostra. Os espectros mostram ainda que, como previsto a prata foi incorporada aos VB, e sua detecção foi possível na posição de 3 KeV, linha Ag L α 1. Nota-se uma sobreposição da linha Ca L α 1 com Ag ζ que é outra linha da prata de baixa intensidade. À concentração de 1mol % de prata o seu sinal não foi capturado pelo detector, entretanto com o aumento da sua concentração, na faixa entre 3 e 5 mol % a sua presença foi detectada no espectro.

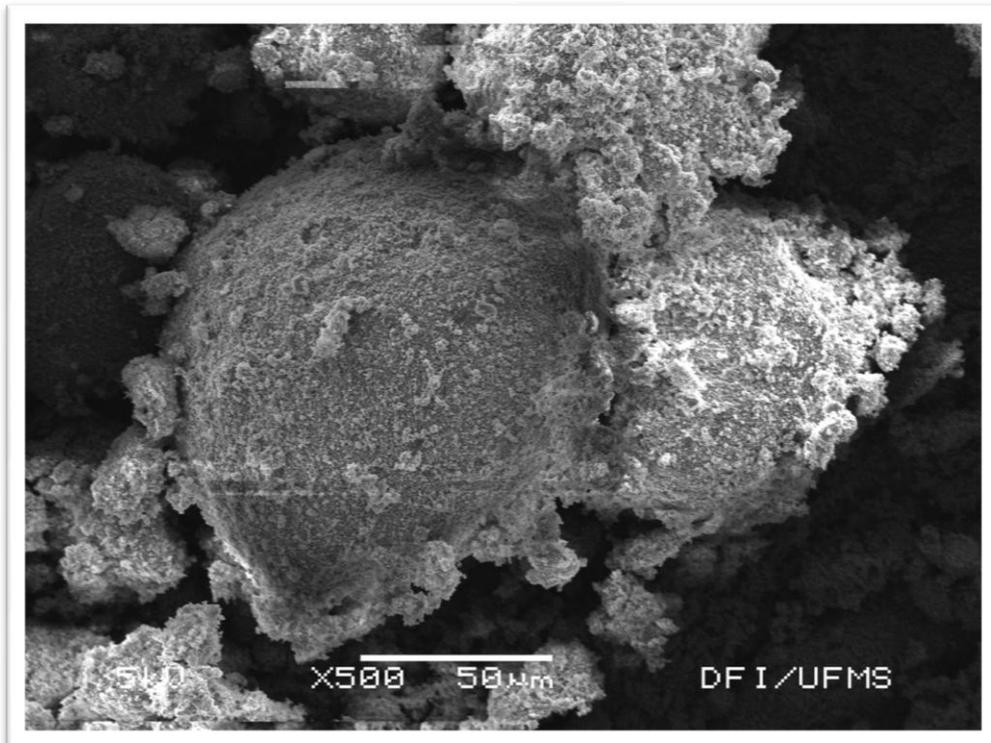


Figura 7 - Fotomicrografia da MEV de grânulos de VB sem prata. Aumento x 500.

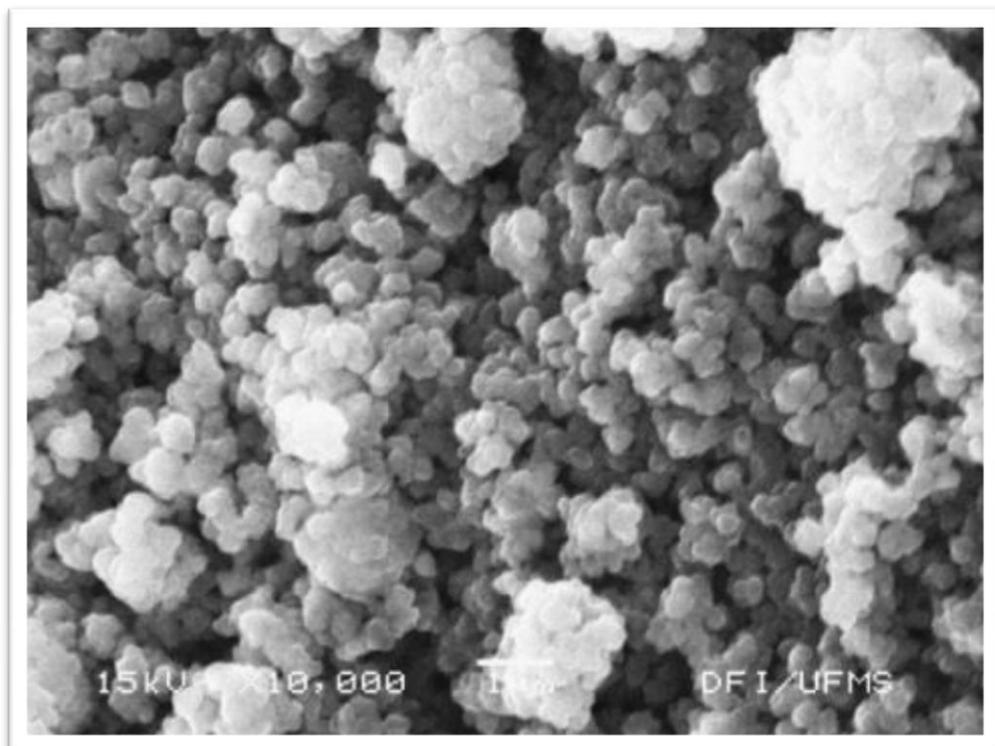


Figura 8 -Fotomicrografia da MEV das partículas primárias de VB sem prata.
Aumento x 10.000.

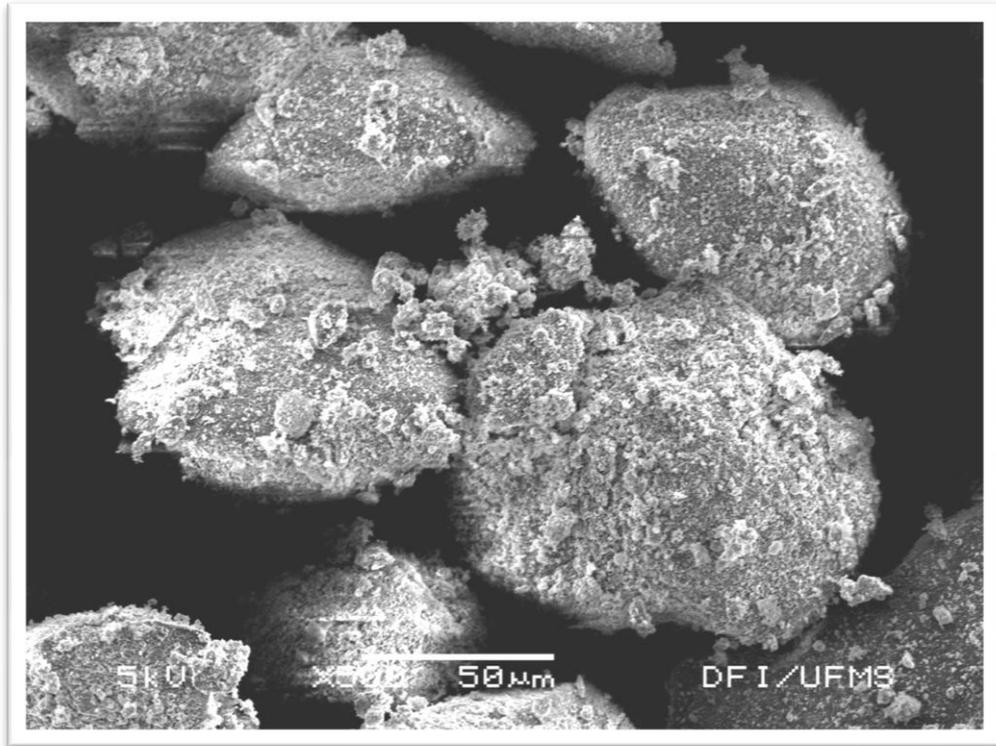


Figura 9 - Fotomicrografia da MEV de grânulos de VB com 1 mol% de prata. Aumento x 500.

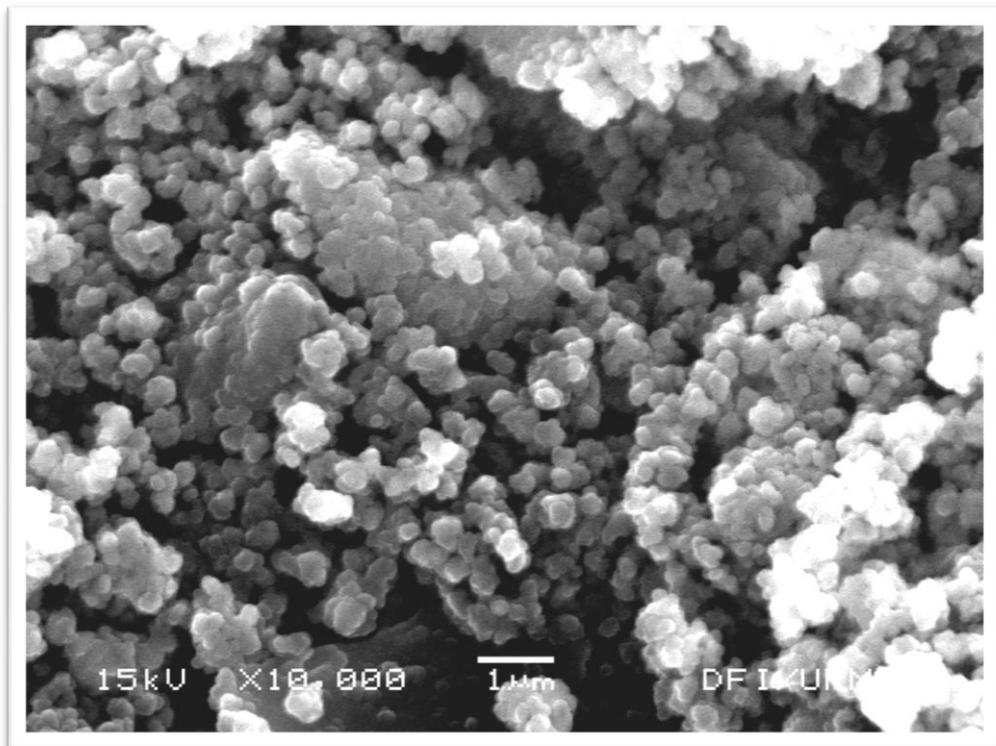


Figura 10-Fotomicrografia da MEV de partículas primárias de VB com 1 mol % de prata. Aumento x10.000.

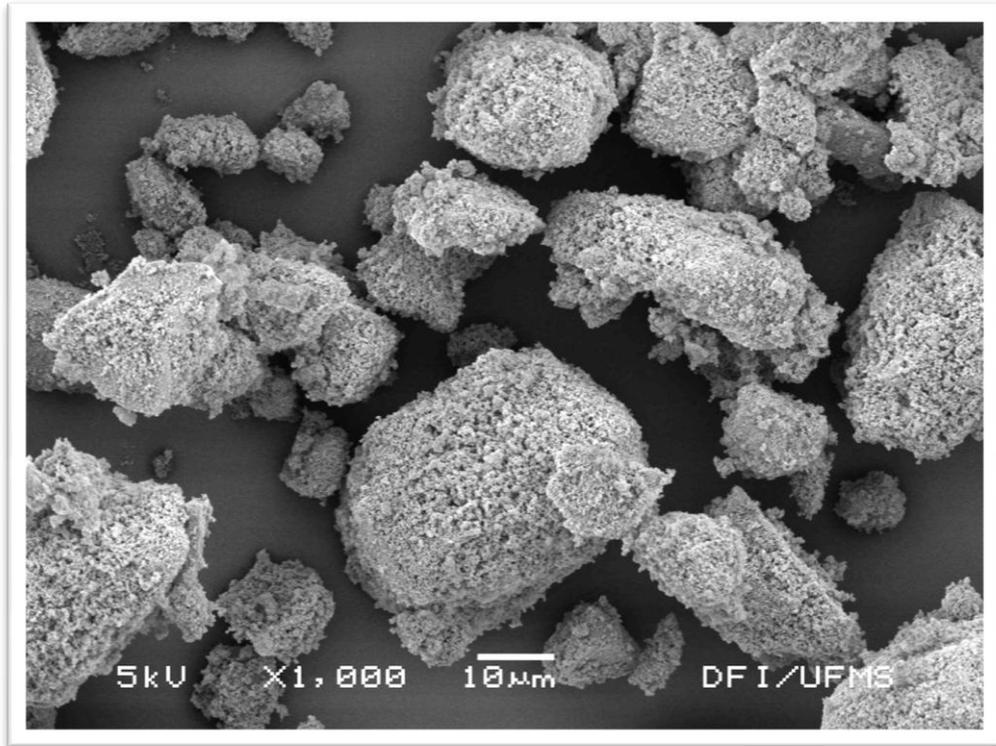


Figura 11 -Fotomicrografia da MEV de grânulos de VB com 3 mol % de prata.
Aumento x 500.

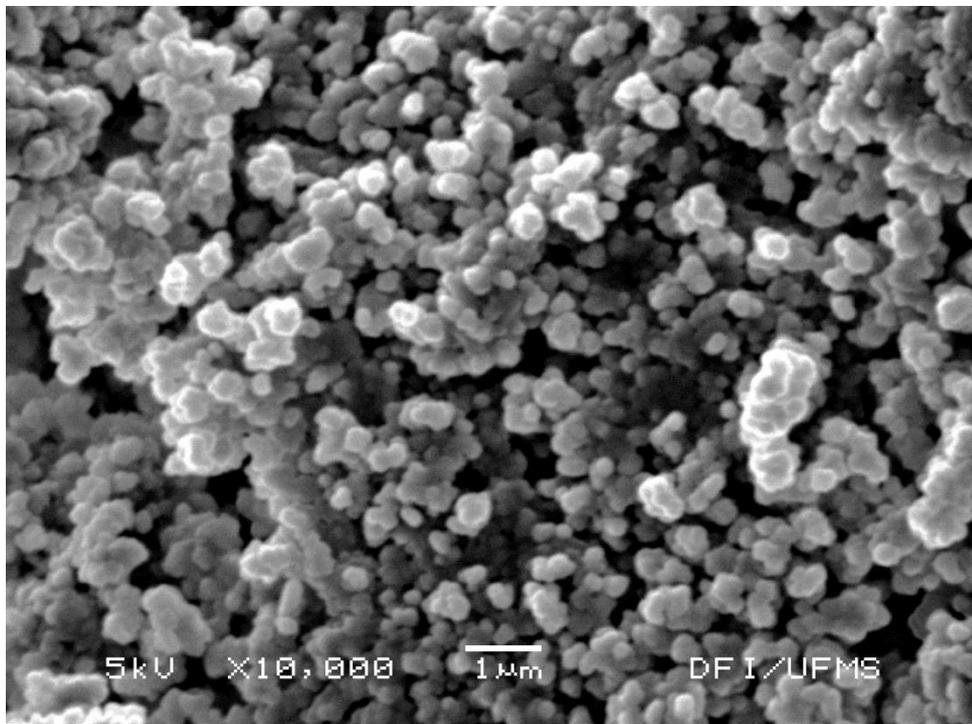


Figura 12-Fotomicrografia da MEV de partículas primárias de VB com 3 mol %
de prata. Aumento x10.000.

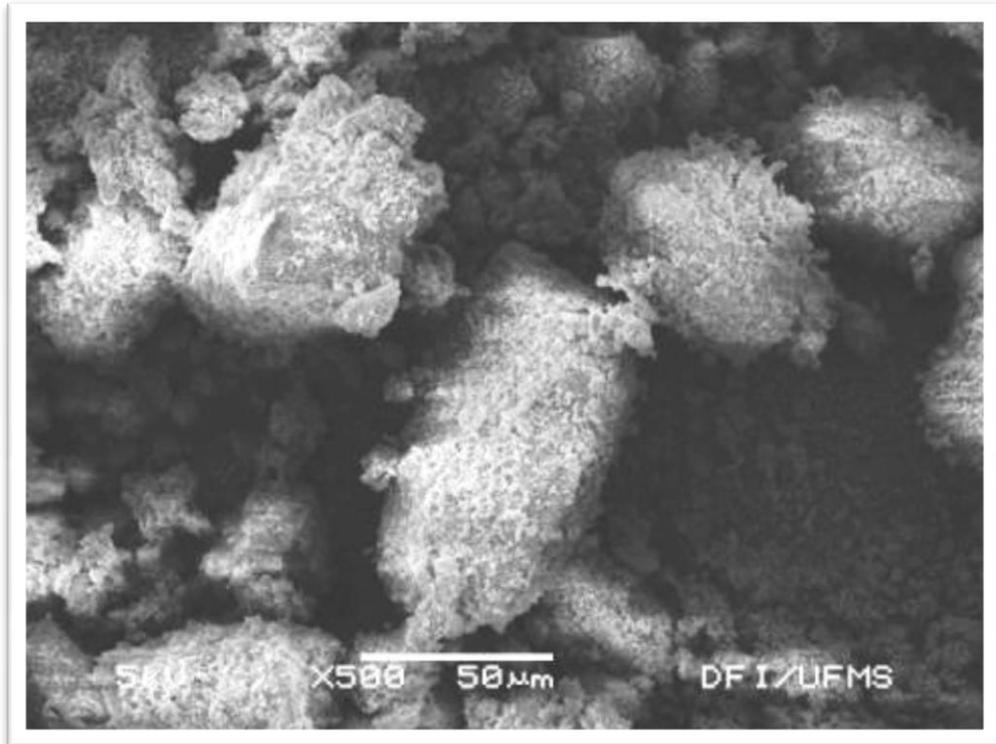


Figura 13 -Fotomicrografia da MEV de grânulos de VB com 5 mol % de prata.
Aumento x 500

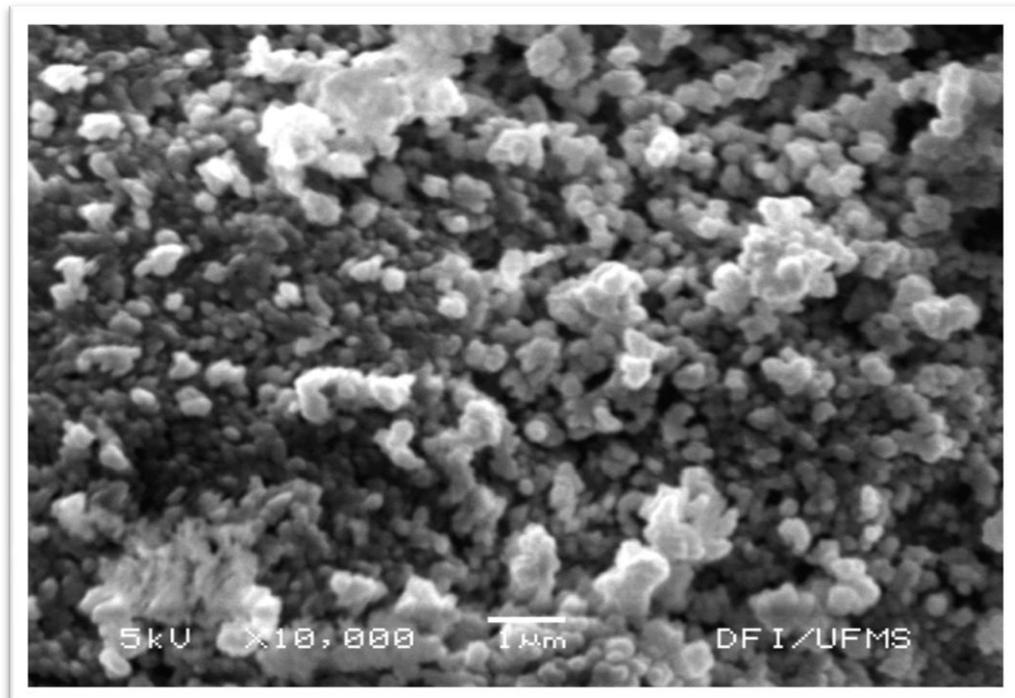


Figura 14- Fotomicrografia da MEV de partículas primárias de VB com 5 mol %
de prata. Aumento x10.000.

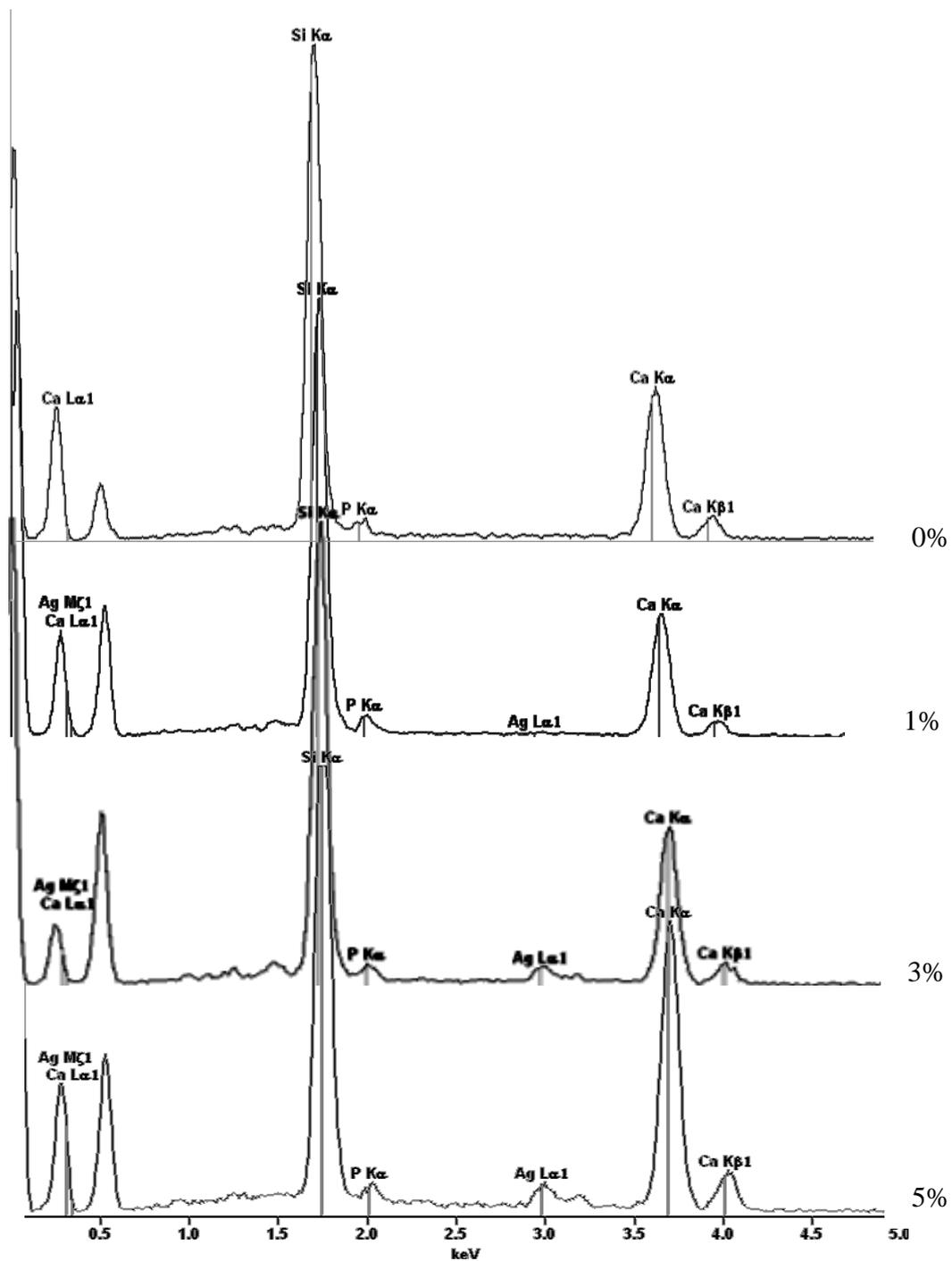


Figura 15- Espectro de Raios-X de Energia Dispersiva das amostras de VB sem e com 1, 3 e 5 % de prata

5.2.3 Comportamento termogravimétrico

As amostras de VB sem e com diferentes concentrações de prata, foram inicialmente pré-tratadas a 600°C por 4h e posteriormente mantidas por 30 dias em

atmosfera ambiente para hidratação. A figura 16 apresenta as curvas TG das amostras onde se pode verificar uma contínua perda de peso até 500°C em todas as curvas. De 70° C a aproximadamente 300°C esta perda esta associada à água livre e superficial adsorvida no VB durante a armazenagem e foi menor quanto maior a concentração de prata no material. Isto denota a natureza higroscópica (afinidade pela água) do VB.

Os vidros bioativos a base de sílica são estruturalmente baseados em unidades tetraédricas de SiO_4^{4-} e sua afinidade pela água esta relacionada à quantidade de oxigênios não formadores de pontes (ONFP) (AGUIARA, *et al.*, 2010). Portanto é possível assumir que o número destas ligações está sendo reduzido pela progressiva incorporação deste metal.

A perda de resíduos da reação sol-gel pelo gel seco ocorreu em torno de 550°C, quando então o peso se estabilizou. Desta forma a estabilização do VB foi ocorreu em torno de 600°C. Desta forma, a perda de massa que ocorre acima de 600°C é resultante da decomposição de carbonatos de estrutura formados durante a preparação dos VBs e não constituem mais que 2 a 3% da sua massa.

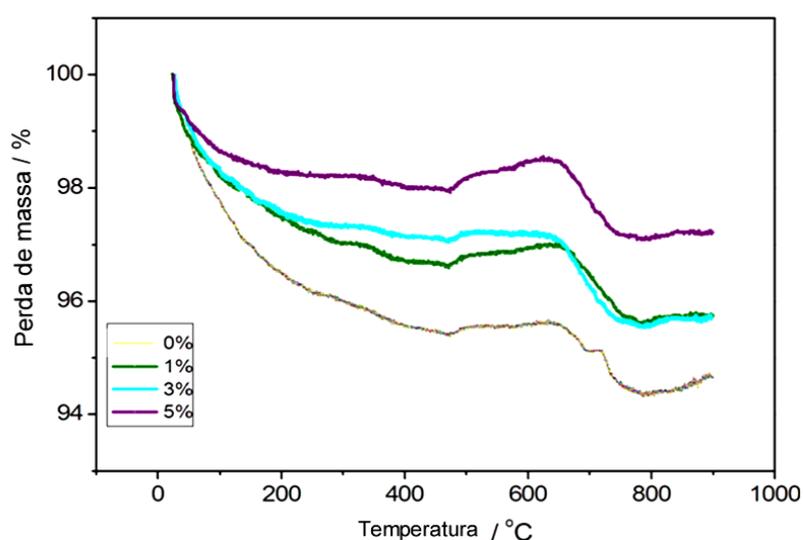


Figura 16 - Análise termo-gravimétrica (TG) de VBs com diferentes concentrações de prata. As amostras foram pré-tratadas a 600°C / 4 h.

5.2.4 Espectroscopia Infra-Vermelho por Transformada de Fourier.

Os grupos funcionais e os seus respectivos modos vibracionais foram identificados segundo Navarro *et al.*(2003), conforme demonstrado na Tabela 7. Os resultados da espectroscopia IVTF encontram-se na figura 17. Para as amostras tratadas a 600°C as bandas em 1000-1200 cm^{-1} e 500 cm^{-1} apresentaram maior intensidade e largura devido á densificação da estrutura vítrea com o aumento dos sítios de ligação comparado aos picos das amostras secas a 130°C. O aumento das bandas de PO_4^{-3} , testemunha a presença de sítios quase cristalinos e de estruturas de densificação estrutural (CIECINSKA, 2003).

A presença de cátions modificadores de rede possui efeito perturbador na matriz vítrea dos VBs, causa a ocorrência de oxigênios não formadores de pontes (ONFP) e conseqüentemente a diminuição da rede conforme ilustrado na figura 5. Estes grupos funcionais controlam a dissolução de sílica através da formação de grupos silanóis (Si-OH) em SBF (COLEMAN & NICHOLSON, 2006). Entretanto em nossos ensaios a prata pareceu ter um efeito contrário. As amostras de VB com 3% e 5% mol de prata apresentaram um aumento de intensidade das bandas associadas ao oxigênio formador de pontes (OFP).

Tabela 7 – Representação dos grupos funcionais e seus respectivos modos vibracionais, adaptado de Navarro, (2003).

Grupos	Modos vibracionais
Si-O-Si	1000-1200 cm^{-1}
Si-O-NFP	890-975 cm^{-1}
Si-O-Si	próximo a 750 cm^{-1}
PO_4^{-3} anti-simétrico associado ao fósforo em ambiente próximo ao cristalino	570-600 cm^{-1}

Segundo Coleman & Nicholson (2006), nos vidros obtidos por sol-gel, esta dissolução é mais intensa em relação aos vidros obtidos por fusão, por conta de sua

grande área superficial e pela presença de resíduos de grupos Si-OH nos poros do gel. Considerando-se ainda os picos de absorção no infravermelho da figura 17, observa-se que a energia de ligação de Si-O-Si diminui consideravelmente com o tratamento térmico e aumenta com a quantidade de prata, conforme melhor visualizado na figura 18. O tratamento térmico causa densificação da estrutura vítrea pela eliminação de carbonos, reduzindo a energia média de ligação.

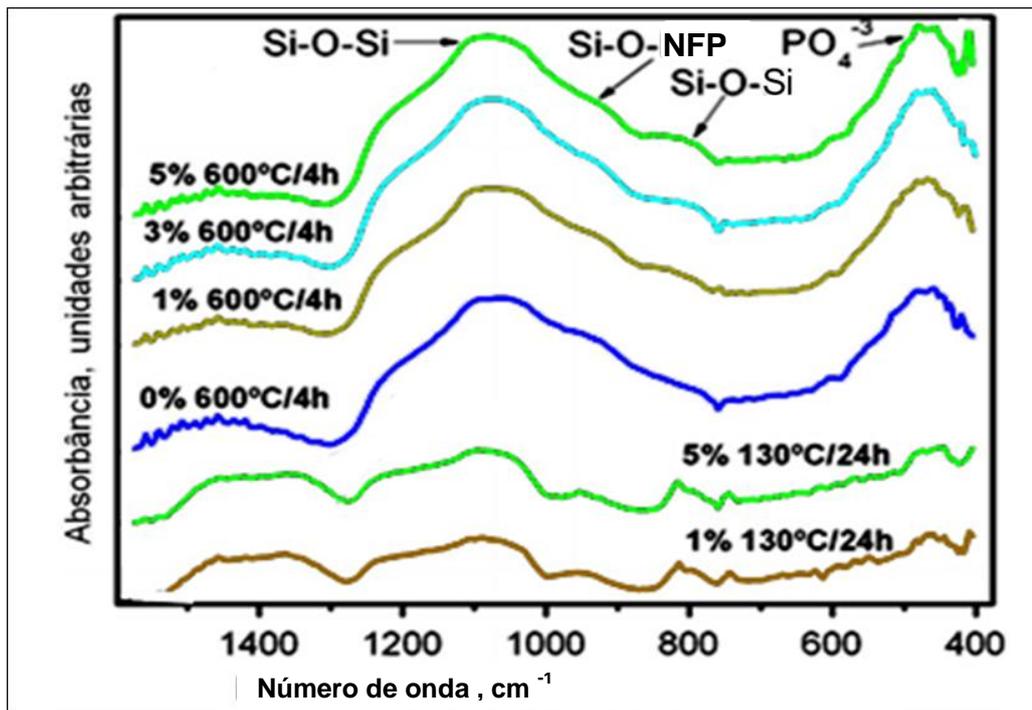


Figura 17- Curvas de absorção por IVTF de VB com diferentes concentrações de prata, para amostras secas a 130° C e a 600°C.

Clupper & Hench(2001), trabalhando com *Bioglass*® obtido por fusão, concluíram que a incorporação da prata aumentou a densificação do vidro. A adição de prata modifica a estrutura do VB aumentando sua densidade, entretanto o mecanismo não foi esclarecido.

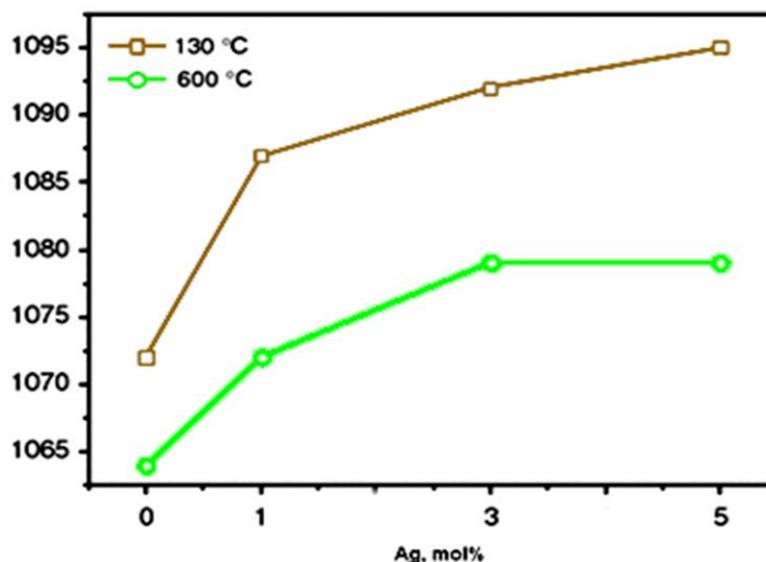


Figura 18 - Picos de absorção no infravermelho de VB com 0,1, 3 e 5% mol prata.

5.2.5 Difratomia de Raios-X

No difratograma de Raios-X da figura 19, as amostras contendo prata exibem predominantemente características amorfas correspondentes a vidro, mas mostram também cristalizações incipientes de quartzo, prata metálica e hidroxiapatita formada ainda durante a síntese do VB no período de secagem da amostra. Quantitativamente, o incremento de prata causou maior cristalização de quartzo e de prata metálica enquanto reduziu a cristalização de hidroxiapatita.

Alguns cations Ag^+ do VB foram reduzidos a prata metálica, o que é evidenciado por picos específicos no difratograma, sobretudo nas amostras com 3 e 5% de prata, enquanto outros entraram na formação da rede, visto que promoveram a condensação do material. A redução da prata em VB já havia sido descrita anteriormente em vidros à base de sílica (JEON, *et al.*, 2003). Segundo estes autores ela resulta da interação com componentes da matriz incluindo os resíduos orgânicos queimados na sinterização.

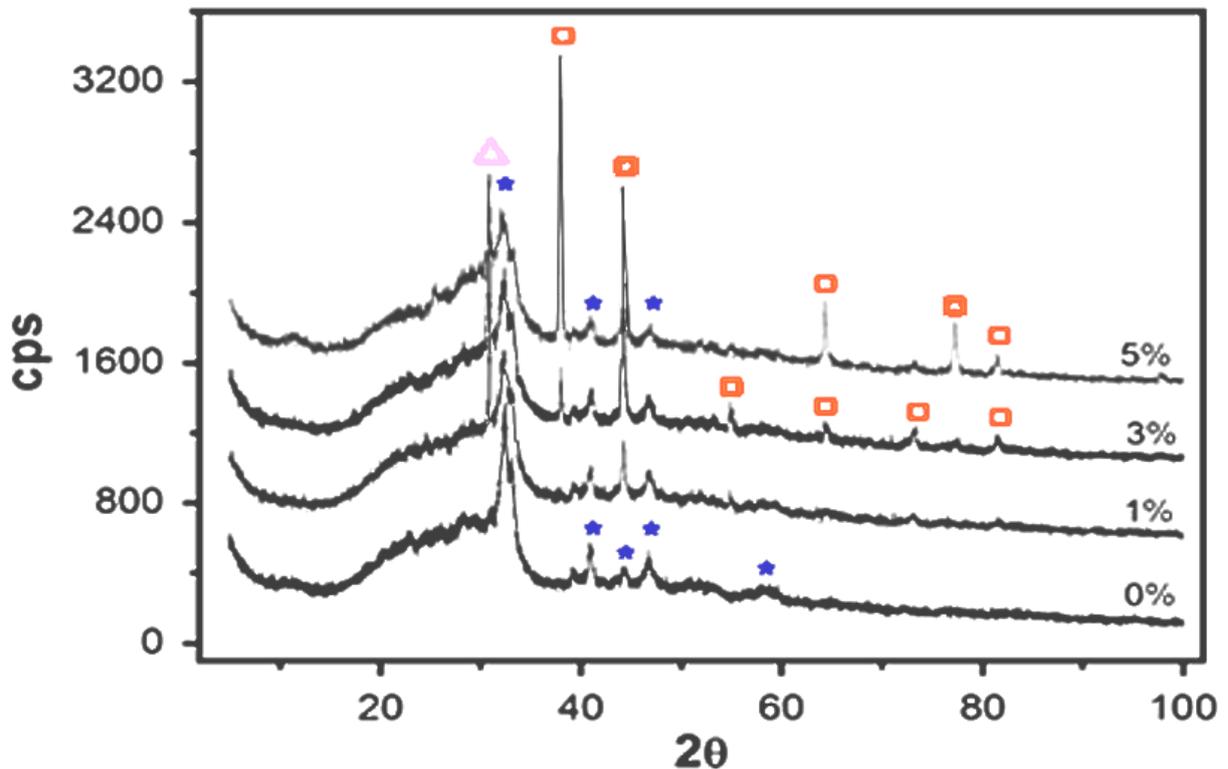


Figura 19 - Difratoograma de Raio-X de VB dopado com prata, e picos de cristalização de SiO₂ (▲), prata (◻) e hidroxiapatita (★), (cps = Contagens por segundo).

A complexação de cátions Ag⁺ é resultado da interação química com a matriz vítrea a temperatura de até 500°C e sua redução pode ser alcançada somente na temperatura de tratamento térmico de 600° C (EPIFANI, *et al.*, 2000).

Baia *et al.* (2006), estudando vidros a base de fosfatos incorporados com 1 e 3% de óxido de prata demonstraram a formação de nanopartículas de prata com temperaturas de sinterização entre 600 e 1200°C. Estas partículas tinham entre 10 e 100 nm de diâmetro e seu tamanho era inversamente proporcional a concentração de prata.

Apesar da pronunciada ressonância de plasma da prata entre 400 e 500 nm as transições eletrônicas envolvendo Ag⁺ dão lugar a bandas de absorção que ocorrem entre 200 e 230 nm, enquanto que as transições eletrônicas da Ag⁰ ocorrem entre 250 e 330 nm da faixa espectral (LU, *et al.*, 2005) na qual os aparelhos de FTIR possuem baixa resolução e sensibilidade. Isto explica porque a análise espectral no infravermelho (figura 17) não detectou prata metálica.

A presença de nanopartículas de prata no material é uma condição vantajosa do ponto de vista microbiológico. Vários autores têm demonstrado a efetividade da prata na forma de nanopartículas como biocida principalmente quando o seu diâmetro varia de 1 a 10 nm (SONDI & SALOPEK-SONDI, 2004; MORONES, *et al.*, 2005). Nanocristais de prata com diâmetro inferior a 50 nm possuem ação bactericida também sobre bactérias resistentes a desinfetantes e a antibióticos mesmo quando os testes são conduzidos em presença de soro sanguíneo. Entretanto nem nitrato de prata, nem nanopartículas metálicas >50 nm apresentaram efeito antibacteriano nestas condições (LYCZAK & SCHECHTER, 2005). Parece ainda que as formas iônicas de prata ao se ligarem a proteínas e ácidos nucleicos, têm a sua atividade antimicrobiana reduzida (BRETT, 2006). As nanopartículas ao contrário, apresentam grande área superficial em relação ao seu volume sendo fortemente reativas (WIJNHOFEN, *et al.*, 2009). Desta forma, sua escolha tem sido mais freqüente para incorporação em diversos materiais visando resiliência à colonização microbiana.

5.3 Caracterização do VB dopado com triclosan.

O aspecto pela MEV dos grãos de VB dopados de triclosan é apresentado na figura 20. Nota-se que o processo de dopagem com triclosan, alterou levemente a superfície dos grãos de VB, que passaram a apresentar um aspecto mais flocoso. Cabe lembrar que durante o processo de lavagem dos grãos para a remoção do triclosan em excesso, os mesmos são expostos à água presente no etanol 95%, o que pode dar início a um processo de troca iônica que altera a sua superfície.

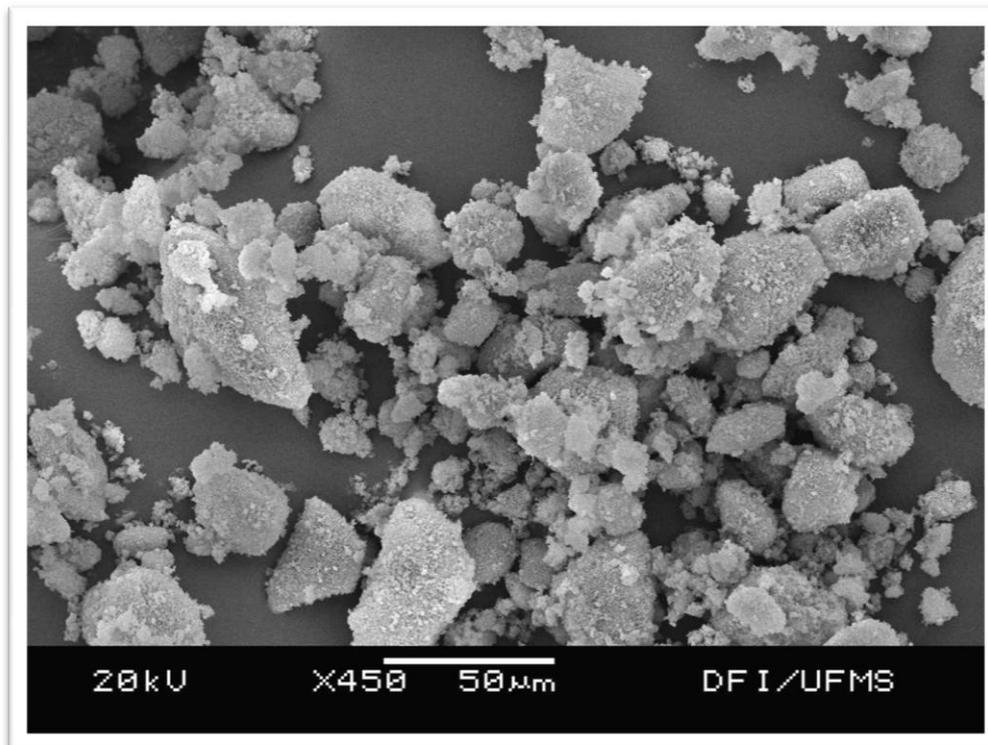


Figura 20 – Fotomicrografia da MEV de grãos de VB dopados de triclosan.

O espectro de Raio-X de energia dispersiva da amostra é apresentado na figura 21. Nele podemos observar a modificação do perfil original do VB pela incorporação de linhas de cloro. Conforme ilustrado na figura 3, o cloro faz parte da molécula do triclosan ou 2,4,4'-triclora-2'-hidroxidifenil éter. Desta forma, a sua presença denota que a superfície do VB reteve triclosan durante o processo de dopagem.

A fim de se verificar se o triclosan está adsorvido á superfície do VB obtido por sol-gel foi realizado na seqüência a análise termogravimétrica tendo como referência uma amostra de triclosan pura. Os resultados estão apresentados na figura 22.

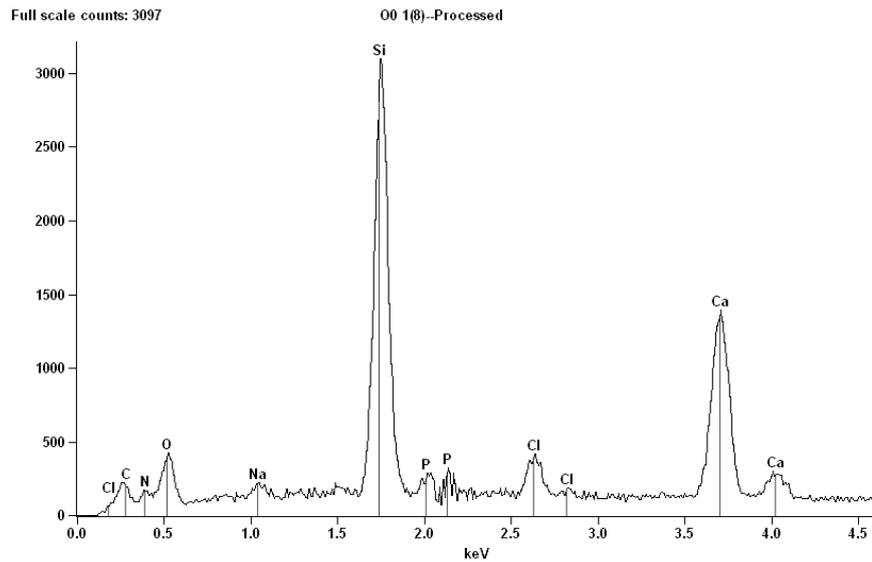


Figura 21 - Espectro de Raios-X Energia Dispersiva de uma amostra de VB dopado com triclosam.

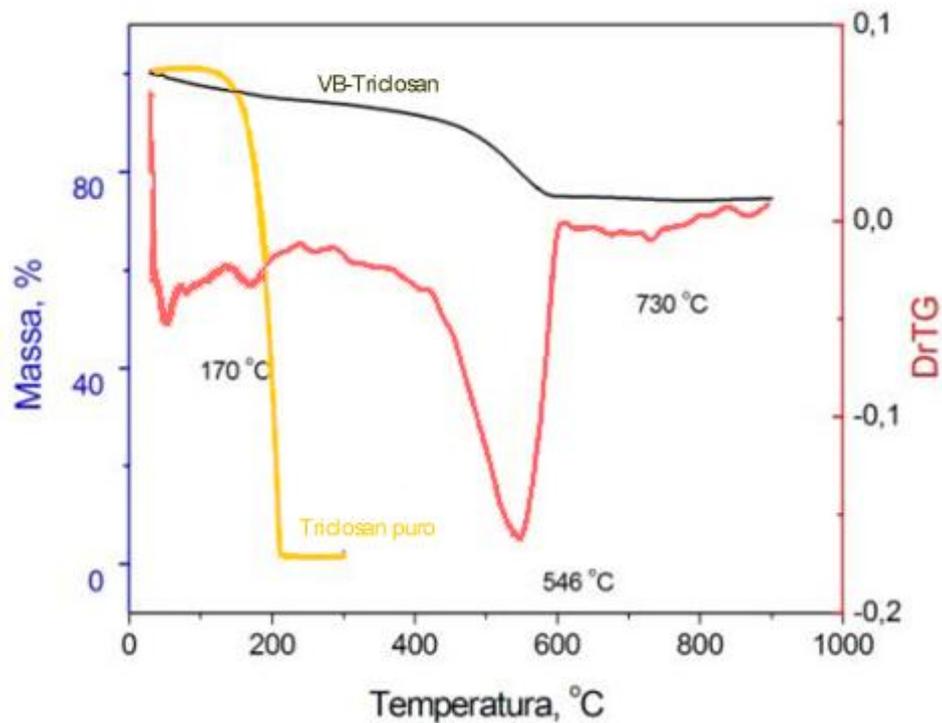


Figura 22 - Análise termogravimétrica de uma amostra de VB dopado de triclosan e de triclosan puro.

Pela análise da figura 22 observa-se que, uma primeira perda de massa do VB dopado de triclosan ocorre em 170° C aproximadamente e corresponde ao triclosam adsorvido na superfície dos grãos, já que sua estabilidade térmica gira em torno de 150 a 200°C. Portanto há triclosan na amostra. A segunda perda com

mínimo (máximo de velocidade de perda) em 546°C não possui correspondência com a curva do triclosan puro nem com a do VB, de onde se conclui ser o triclosan ligado à superfície na sua forma original ou na forma de alguma variante. Como o triclosan possui características levemente ácidas e a superfície do VB obtido por sol-gel é rica em grupos silanóis (COLEMAN & NICHOLSON, 2006), supõem-se ter ocorrido uma reação do tipo ácido-base, ligando-o à superfície do VB. A terceira perda é a decomposição de resíduos carbonatos do VB presente usualmente nos VB sem adição de Triclosan. Portanto ficou demonstrado que o método proposto permite a adsorção de triclosan à superfície de vidros bioativos porosos, obtido pela rota sol-gel.

5.4 Avaliação da bioatividade

O difractograma da amostra VB-Ag5% após 7 dias de dissolução em SBF bioatividade é apresentado na figura 23. Observamos a formação de apatitas de crescentes níveis de complexidade na superfície de todas amostras de VB. Isso demonstra que a incorporação da prata nas amostras não impede a dinâmica de formação de HÁ conforme detectado precocemente no difractogramas de RX após diferentes períodos de dissolução em SBF.

Observa-se que a estrutura das formas de apatita encontradas, evolui em função do tempo para formas mais complexas como resultado do progressivo distanciamento da camada de cristalização externa, da superfície do substrato de crescimento. Assim constata-se seqüencialmente a formação de CaCO_3 na forma de valerita à direita e calcita à esquerda em (a), hidroxiapatita sintética identificada de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS9-0432 em (b) e por fim hidroxiapatita (JCPDS 73-1731), hidroxiapatita artificial e o silicato de cálcio (JCPDS 02-0506) em (c).

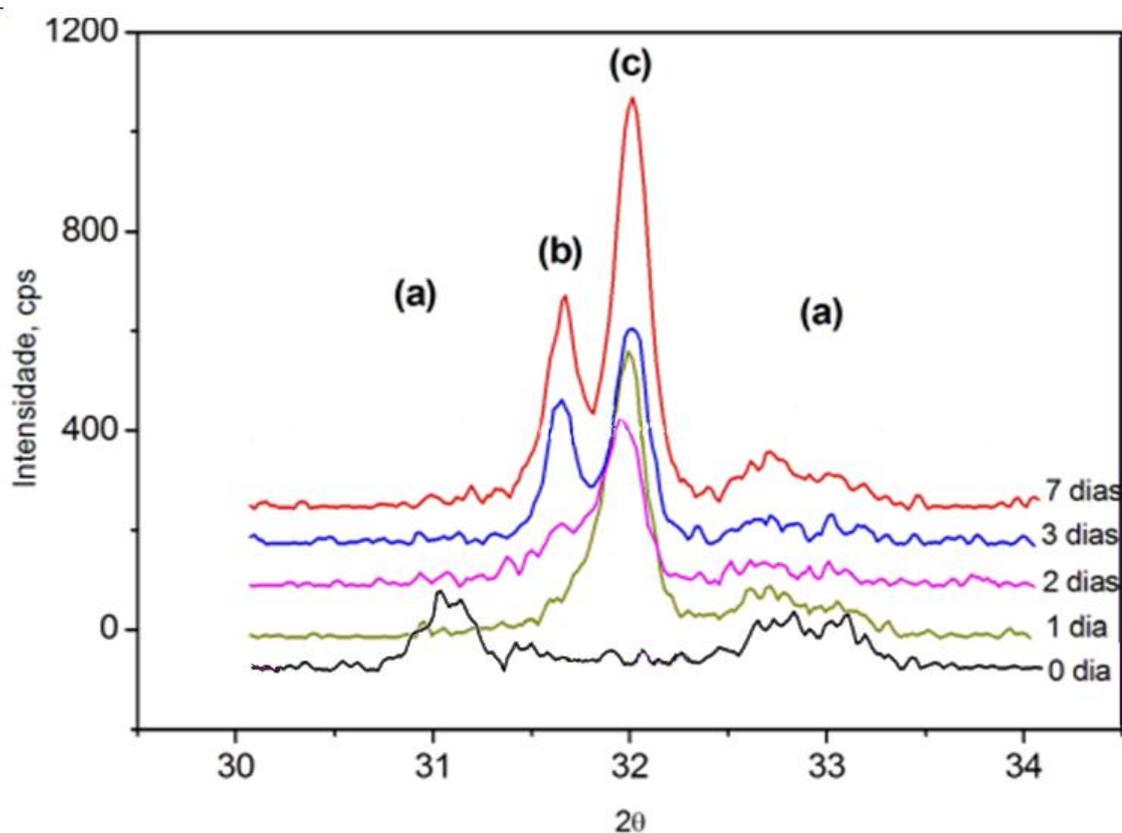


Figura 23 - DRX entre 30 e 34°, da amostra de VB-Ag 5 mol % durante 7 dias de dissolução em SBF mostrando a região dos picos principais da hidroxiapatita e carbohidroxiapatita. Onde (a) são os picos de CaCO_3 nas formas valerita à direita e calcita à esquerda; (b) é superposição de dois picos de hidroxiapatita sintética (**JCPDS9-0432**); e (c) superposição de picos de hidroxiapatita (**JCPDS73-1731**), hidroxiapatita artificial e silicato de cálcio (**JCPDS 02-0506**).

Por outro lado a incorporação da prata, dentro do limite de até 5% permitiu a detecção da presença de formas variadas de apatitas nos difractogramas de RX após diferentes períodos de dissolução em SBF (Figura 23). Mesmo que estruturalmente diferentes os fosfatos presentes têm composição química parecida. Os VBs a base de sílica são higroscópicos e depois do preparo, se mantidos por pouco tempo em condições atmosféricas normais, tendem a se hidratar rapidamente. Em água (ou umidade atmosférica) a tendência é formar carbonato de cálcio e sílica, enquanto que em SBF é formar fosfatos hidratados de cálcio e silicatos de cálcio.

A demonstração da presença de fosfatos sobre a superfície dos VBs também pode ser feita por EDS conforme apresentado na figura 24. Nela há

desdobramento e acentuação da linha do P $K\alpha$ em relação ao VB não exposto ao SBF (figura 15) e a presença da linha Ag $L\alpha_1$, denotando a presença de prata.

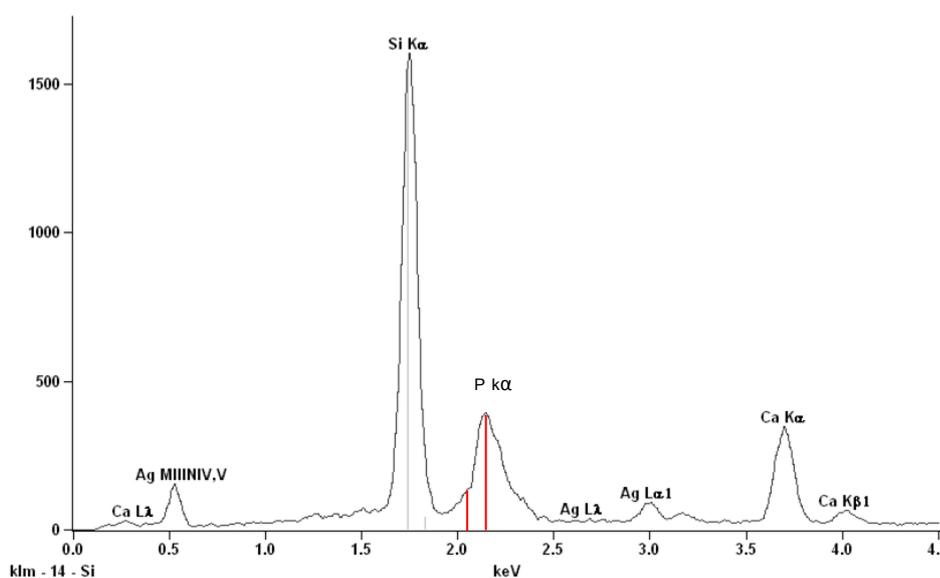


Figura 24 - Espectro de raios-X de energia dispersiva da amostra VB-Ag 5%, após 1 dia em SBF, com destaque para aumento da linha do P $K\alpha$

Estes resultados comprovam que a incorporação da prata aos VB até o limite de 5% não impede a bioatividade, resultado este corroborado por um grande número de autores tanto quando a incorporação é direta durante a síntese por sol-gel (BELLANTONE & HENCH, 2001; SARAVANAPAVAN, *et al.*, 2003; CATAURO, *et al.*, 2004; BLAKER, *et al.*, 2004), quanto ela é incorporada por troca iônica (CLUPPER & HENCH, 2001; DI NUNZIO, *et al.*, 2004; VERNE, *et al.*, 2008).

5.5 Avaliação da atividade antibacteriana

Considerando-se que em condições naturais a superfície de um VB implantado no organismo fica em contato com o meio fisiológico, que está em constante renovação, e dá início a uma série de reações a nível molecular (fases 1 e 2 da bioatividade), a resiliência à colonização bacteriana deve ser uma característica a ser buscada na superfície da fase sólida do biomaterial e na sua adjacência líquida, rica em produtos resultantes da sua dissolução. A técnica de amostragem proposta considera as particularidades acima descritas e possibilita o

acompanhamento da dinâmica de liberação de princípios ativos estudados. Os resultados são descritos a seguir.

5.5.1 Titulação da atividade antibacteriana pelo número de Unidades Inibitórias.

Conforme definido no item 4.4.1 uma unidade inibitória é a menor quantidade de VB que inibe a atividade metabólica fermentativa de uma cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 no volume da reação conforme verificado pela viragem de cor do indicador de pH do meio (figura 25).

5.5.1.1 Titulação do VB dopado com prata

A atividade antibacteriana em função do tempo de dissolução em SBF, das amostras estudadas de VB com 0, 1, 3 e 5mol % de prata, em sistema de amostragem fechado e aberto está representada na figuras 23 e 24 respectivamente.

Percebe-se que nas condições de nosso ensaio, somente as amostras com prata apresentam atividade antimicrobiana. Alguns autores têm relatado que diferentes formulações de VB podem por si só, apresentar atividade antimicrobiana mesmo sem a incorporação de agentes notadamente biocidas. Atribui-se á isso, a rápida alcalinização do meio durante a dissolução do VB nas soluções diluentes. Ainda é possível que nessas condições a concentração iônica possa interferir na viabilidade das culturas (LEE, 2003). Este fenômeno não foi observado no presente estudo, talvez pelo fato de que a concentração padrão usada nos ensaios de inibição foi de 1 a 2 $\cdot 10^7$ bactérias, que é relativamente alta quando comparada a concentração usada como desafio nos testes usuais que é de 1 a 2 $\cdot 10^4$ bactérias (GARCIA, 2007). Desta forma, pequenos efeitos inibitórios passaram despercebidos. Outra consideração importante é que a atividade antimicrobiana é proporcionalmente maior nas amostras com maiores concentrações de prata, mostrando que a atividade biológica está relacionada diretamente a presença deste metal.

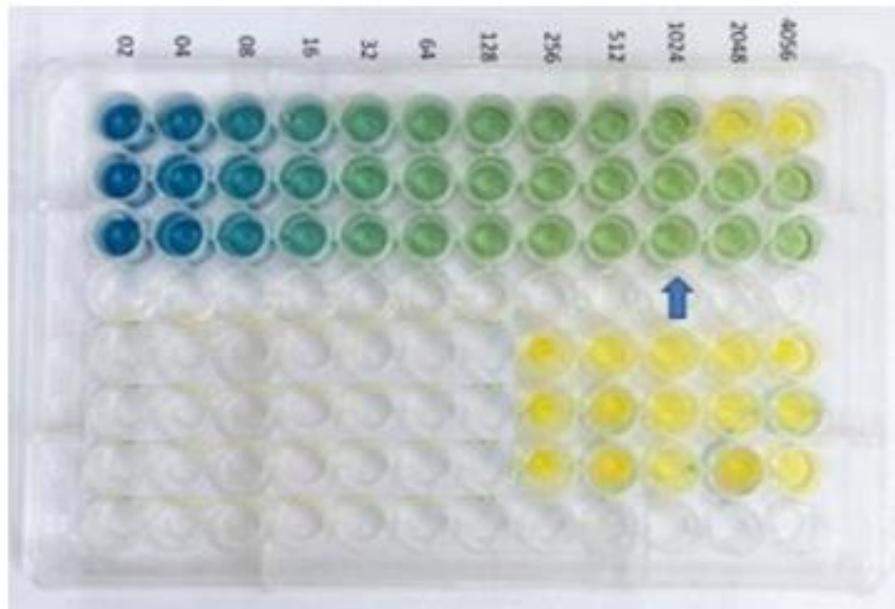


Figura 25 - Teste proposto para avaliação do número de Unidades Inibidoras (UI) através da técnica das diluições seriadas em microplaca. Após 24 h da aplicação do inóculo de *Escherichia coli*, a mudança de cor do verde para amarelo foi definido como a recíproca da maior diluição do VB expressa em número de UI.mg⁻¹ que inibiu a atividade metabólica do inóculo em 100% das repetições testadas (seta). A cor azul das primeiras diluições denota a alcalinização do meio.

A análise da figura 26 sugere que a dinâmica de produção de prata ativa no meio SBF em um sistema fechado, obedece 4 fases distintas independentemente da sua concentração inicial nos VBs. Em um primeiro momento observa-se uma fase de **latência** que dura 2 dias, quando o título antibacteriano é constante. Do segundo ao terceiro dia há uma fase de liberação **rápida** de prata ativa ao final da qual os títulos atingem o seu máximo. Do terceiro ao sexto dia observa-se uma fase de **declínio** da atividade antibacteriana na solução, onde os títulos mínimos são inferiores aos da fase de latência. A partir do sexto dia a solução entra em uma fase **estacionária** com manutenção da atividade antibacteriana por um período prolongado.

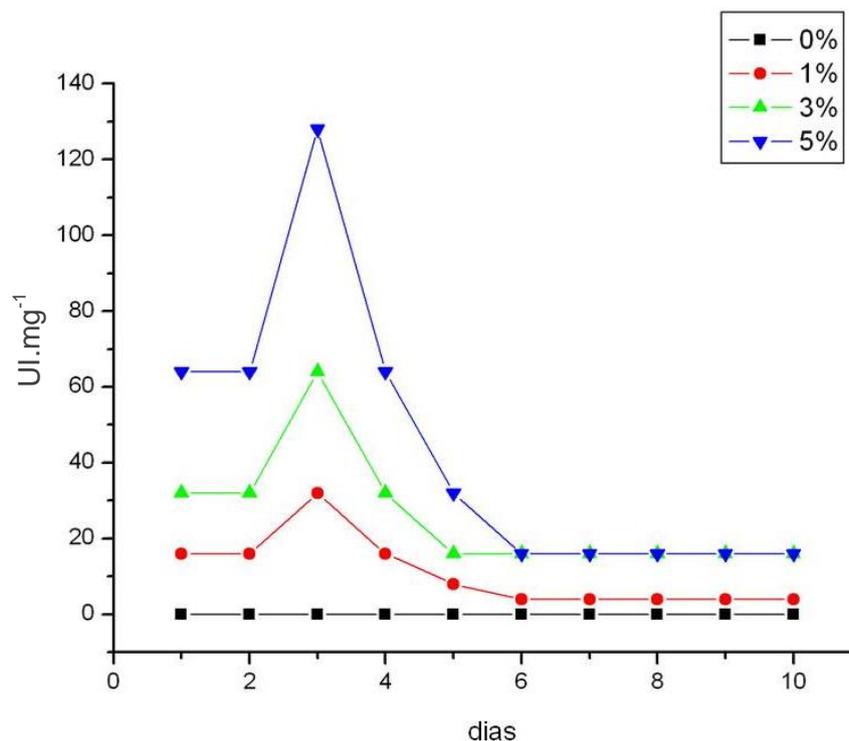


Figura 26 - Títulos de atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* em sistema de amostragem fechado, expressos em UI.n.mg⁻¹ (Unidades Inibitórias por mg) de VB com diferentes concentrações de prata, durante imersão em SBF por 10 dias a 35°C. A concentração inicial foi de 10 mg de VB.mL⁻¹ de SBF.

Embora comparações de resultados com outros trabalhos sejam difíceis devido à falta de padronização de procedimentos de titulação encontramos alguns trabalhos, em que as doses desafios são aproximadas à aquelas praticadas neste experimento. Bellantone *et al.* (2002), estimou que a concentração bactericida mínima para *Escherichia coli*, de um VB obtido por sol-gel, dopado com 3% de prata em aproximadamente 1000 µg.mL⁻¹. Balamurugan, *et al.* (2008), encontram também uma concentração bactericida mínima para *Escherichia coli* de 1000 µg.mL⁻¹ mas trabalhando com VB dopado com 5% de prata. Ambos utilizaram inóculos da ordem de 10⁸ células por mL. Os nossos resultados com VB dopado com 3% de prata apontam entre 310 µg.mL⁻¹ e 2500 µg.mL⁻¹ entre o pico máximo de atividade antibacteriana e a fase estacionária, respectivamente. Em se considerando o número de variáveis que podem interferir na titulação como, temperatura, constituição do meio de cultura, diluente, cepa de bactéria e por fim a técnica

utilizada, os resultados obtidos por nós parecem coerentes com os encontrados na literatura.

A análise da dinâmica da atividade antibacteriana sugere que a prata foi incorporada à estrutura do VB e que a sua liberação está condicionada aos mecanismos de troca iônica que acontecem na presença de SBF nas primeiras fases da bioatividade. Esta suspeita encontra reforço no fato de que amostras tituladas após permanência pelo mesmo período de tempo a 4°C de temperatura, não apresentam picos de atividade máxima, mantendo-se durante toda a titulação na fase de latência.

Como constatado anteriormente, a incorporação da prata resultou em perda da higroscopicidade do VB, de onde se inferiu que sua presença esteja relacionada diminuição dos oxigênios não formadores de pontes, responsáveis pela afinidade que a sílica possui com a água (AGUIARA, *et al.*, 2010). A prata também não apresentou comportamento de um cátion modificador de rede como o cálcio, pois se assim o fosse, sua presença contribuiria para a desorganização da matriz vítrea o que aumentaria o número de oxigênios não formadores de pontes. Portanto acredita-se que ela esteja incorporada a matriz vítrea na forma de Si-O-Ag, e que seja liberada da matriz como Ag^+ durante a fase inicial da bioatividade em que há quebra de ligações superficiais Si-O-Si (e provavelmente Si-O-Ag), pela alcalinização do meio com formação de grupos silanóis (-Si-OH) e liberação de Ag^+ . Esta hipótese é corroborada por vários autores que têm demonstrado que a atividade antibacteriana de VBs dopados de prata, esta associada à liberação de íons Ag^+ a partir da matriz vítrea para a solução (BELLANTONE & HENCH, 2001; SARAVANAPAVAN, *et al.*, 2003; CATAURO, *et al.*, 2004; BLAKER, *et al.*, 2004).

Portanto sugere-se que há correlação direta entre bioatividade e atividade antibacteriana *in vitro* pois a latência inicial e o subsequente aumento da atividade antibacteriana observada em todos os compostos de VB-Ag, estariam correlacionados aos mecanismos de troca iônica que ocorrem no início da bioatividade. E ainda é plausível admitir que a bioatividade influencia a liberação de

Ag⁺ e que maiores concentrações de prata influenciam reciprocamente, a bioatividade por mudanças na superfície reativa dos VBs.

A figura 27 apresenta a atividade antibacteriana em um sistema aberto sujeito a uma taxa de renovação diária de 60% do volume. Observa-se inicialmente que nenhuma atividade antibacteriana foi detectada para o composto VB-Ag 1 mol%. Isto sugere que a renovação do SBF eliminou a prata ativa da fase líquida, responsável pela atividade antibacteriana deste composto, observada anteriormente no sistema fechado. Por conseguinte é possível deduzir que a taxa liberação de prata no composto VB-Ag 1 mol%, após renovação diária de SBF, é insuficiente para produzir efeito antibacteriano detectável em nosso teste.

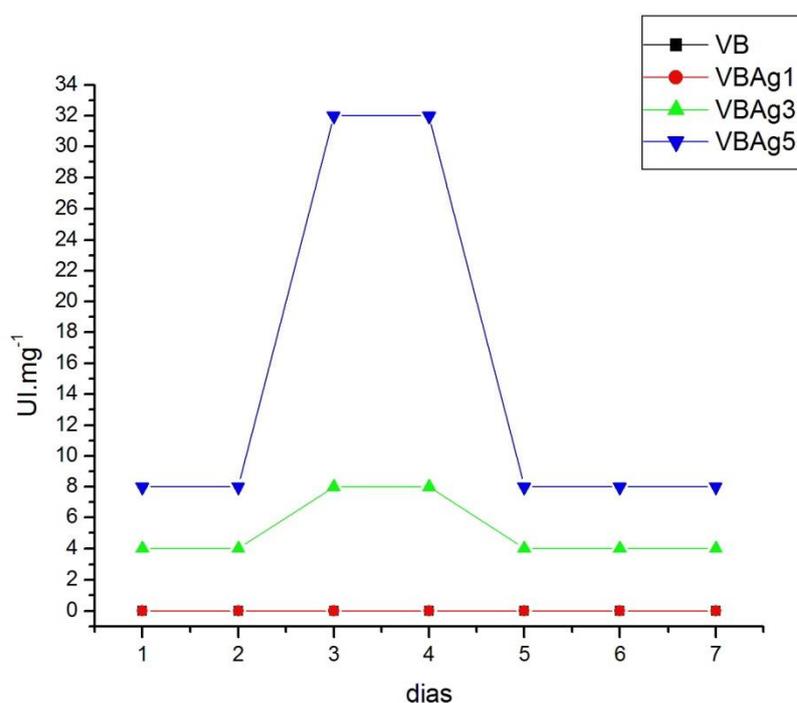


Figura 27 - Títulos de atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* em sistema aberto com uma taxa de renovação diária de 60% do volume total, expressos em UI.100µL⁻¹ (Unidades Inibitórias por 100 µL) das frações líquidas obtidas durante imersão em SBF por 6 dias a 35°C, de quatro compostos de VB com prata. A concentração inicial dos compostos foi de 10 mg. mL⁻¹ de SBF.

Outra característica observada na amostragem em sistema aberto com os VB 3 e 5 mol% de prata é o aumento da duração do pico máximo de atividade, de um para dois dias (figura 27). Isto sugere que a renovação diária do SBF favorece a manutenção do pico de máxima atividade antibacteriana por mais tempo, o que a princípio parece contraditório.

Uma possível explicação para este fato é encontrada no trabalho de Suzuki *et al* (1981), que estudando as propriedades superficiais da hidroxiapatita, verificaram que íons cálcio e de outros metais em solução aquosa são fortemente sorvidos por sua superfície, e que este comportamento não seria simplesmente devido a um mecanismo de troca iônica entre os cátions da solução e os íons Ca^{2+} das hidroxiapatitas. A seletividade da HA por cátions metálicos tem sido explicada considerando-se o raio iônico e a eletronegatividade dos íons. Conforme LeGeros & LeGeros (1984), cátions com raio iônico maior que o do cálcio, poderiam ser incorporados na estrutura da apatita mais facilmente do que os de menor raio iônico. Cabe lembrar que o raio iônico da prata é 1,13 Å em coordenação tetraédrica, comportando-se como o sódio que têm raio iônico 1,14Å e ao cálcio 1,08 Å, o que torna plausível a sua incorporação á HA.

Entretanto, como são necessárias concentrações iônicas de supersaturação para a formação e crescimento dos núcleos de cristalização de hidroxiapatitas, supõe-se que a renovação do SBF promova uma dessaturação iônica do ambiente, o que retarda a formação de hidroxiapatita preservando assim a atividade antibacteriana da prata dissolvida por mais tempo. Os nossos compostos formaram apatita sintética, artificial e hidroxiapatita entre 3 e 7 dias de dissolução em SBF com um sistema fechado, conforme demonstrado pela DRX da amostra VB-Ag3% , apresentada na figura 19 .

Conclui-se então que em nossos experimentos a diminuição da atividade antibacteriana em solução SBF, está associada à sorção da prata pelas camadas de hidroxiapatita que se formam na superfície do VB em função do aumento da concentração iônica do meio. Entretanto, a presença no SBF de ânions Cl^- que possuem alta afinidade por Ag^+ , também pode estar associado a queda de atividade

antibacteriana. Verné, *et al.* (2008), estudando um VB composto por SiO_2 ; CaO ; CaF_2 ; Na_2O ; K_2O ; P_2O_5 ; MgO , dopado com nitrato de prata por meio troca iônica, relataram que a prata liberada em SBF sofre um processo de complexação com formação de pequena quantidade de AgCl entre 24 e 72 h de dissolução. A solução de SBF é rica de íons, em particular de fosfatos, capazes de complexar íons Ag^+ e aumentar a solubilidade do AgCl . Entretanto, como os fosfatos são atraídos por íons Ca^+ no SBF, estes precipitam na forma de fosfato de cálcio, vindo a cristalizar como hidroxiapatita. Portanto durante a bioatividade, a depleção sofrida pelo SBF de íons fosfatos, permite a deposição de AgCl na superfície das amostras conforme os autores demonstraram por MEV.

O efeito residual observado em todos os compostos de VB-Ag estudados é do ponto de vista microbiológico muito interessante. Esta atividade em teoria, deveria se estender no mínimo, até a completa assimilação do biomaterial pelos tecidos vivos, protegendo-o contra a instalação de infecções associadas. Entretanto, isso não é fácil de ser previsto em estudos *in vitro* e deve ser objeto de futuras investigações em modelos animais.

Teoricamente, foi possível conceber dois mecanismos que podem estar envolvidos com o efeito residual observado em nosso estudo. No primeiro, a provável formação de apatitas de prata durante a bioatividade poderia garantir aos compostos, reservas de complexos argênteos com pequena atividade antibacteriana, mas passíveis de serem mobilizados, conforme os níveis mínimos observados na figura 26. No segundo, a presença de nanopartículas de prata nos compostos estudados, conforme apresentado no difractograma da figura 19, que é resultado da segregação da prata em VB-Ag 5%, poderiam suprir atividade antibacteriana residual face às características altamente reativas destas partículas. Lyczak & Schechter (2005), demonstraram que a presença de nanocristais de prata, são mais efetivos que sua forma iônica na manutenção da atividade antimicrobiana em presença de proteínas, isto porque as nano partículas sofrem menos os efeitos da inativação protéica por complexação. A grande relação área/volume destas determina alta reatividade mesmo em concentrações pequenas com melhores efeitos antibacterianos que as soluções iônicas.

A tabela 8 apresenta um resumo dos resultados relacionados á bioatividade e atividade antibacteriana dos VBs sem e com prata.

Tabela 8 - Comportamento de VB sem e com diferentes concentrações de prata em relação á bioatividade e pico máximo de atividade antibacteriana em sistema fechado (SF) e sistema aberto (SA) de dissolução, aferidas em Unidades Inibitórias (UIn).

PROVAS	VB	VB Ag1%	VB Ag3%	VB Ag 5%
Bioatividade (DRX)	++	+	+	+
UIn. mg ⁻¹ (SF)	0	32	64	128
UIn.100µL ⁻¹ (SA)	0	0	8	32

Em resumo, os resultados apresentados aqui demonstram que a intensidade da atividade antibacteriana nos VBs é diretamente proporcional concentração de prata, e a dinâmica de sua liberação depende da bioatividade, mas não da concentração de prata do composto. Considerando-se que a bioatividade foi demonstrada qualitativamente em todos os compostos estudados, e que o composto VB-Ag1%, não apresenta atividade antibacteriana quando testado pelo sistema aberto de amostragem, parece-nos que os compostos VB-Ag3% e VB-Ag5% são os que melhor associam as propriedades buscadas, sendo desta forma, eletivos para a associação com o triclosan. Entretanto, é importante ponderar que, conforme a literatura, a bioatividade (velocidade de liberação de íons e formação da camada de HÁ) é reduzida pelas maiores concentrações de Ag, por causa da redução da porosidade das partículas de VB. De fato não encontramos citações que estudaram a bioatividade em VBs com concentrações maiores que 2%. Desta forma optou-se pelo uso formulação Ag 3mol% para os processos de dopagem com triclosan.

5.5.1.2 Titulação do VB dopado com triclosan

A dopagem de VB com triclosan, conforme descrito no item 4.2 resultou em um composto com atividade antibacteriana contra a cepa padrão *Escherichia coli*

ATCC 25922 , cuja curva de titulação em função do tempo de dissolução em SBF é apresentada na figura 28.

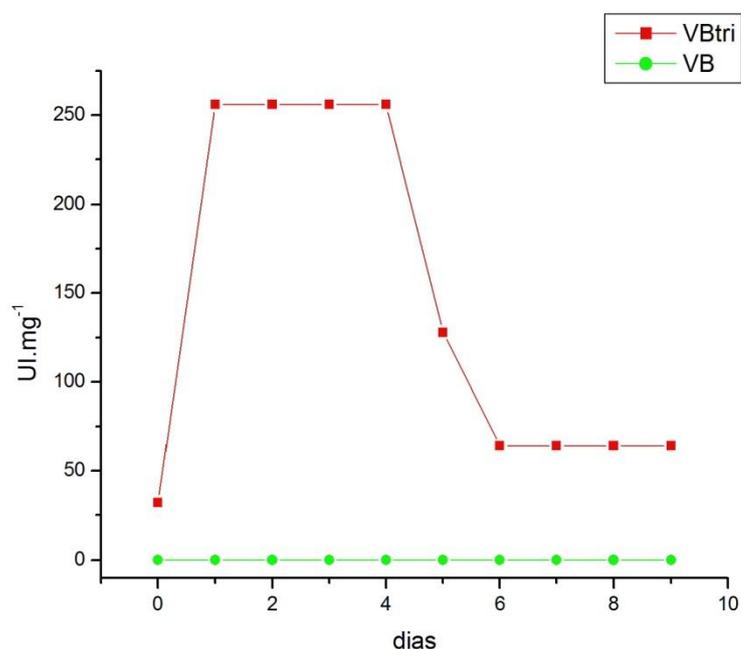


Figura 28 - Títulos de atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* em sistema fechado, expressos em número de U.I.mg⁻¹ de VB e VB dopado com triclosan, obtidos durante imersão em SBF por 9 dias a 35° C.

Nela observa-se a boa atividade antibacteriana deste composto, que foi duas vezes mais ativo do que a amostra VB-Ag 5% mol nas mesmas condições de ensaio. O patamar máximo de atividade bactericida permanece constante durante 4 dias quando, a exemplo do que acontece com os vidros dopados com prata, cai para depois estabilizar-se em torno do sexto dia. Uma possível explicação para a queda de atividade esta associada à solubilidade do triclosan em meio aquoso. Na presença de íons fosfatos do SBF, o triclosan apresenta-se mais solúvel em solução aquosa, com atividade antibacteriana mais intensa. Entretanto com o início da bioatividade, a precipitação de fosfatos do SBF leva a insolubilização do triclosan diminuindo sua biodisponibilidade. Desta forma ocorre acentuada queda da atividade antibacteriana a partir do 4º dia, para estabilização novamente em níveis mínimos, mas residuais no 6º dia.

Conforme demonstrado anteriormente por TG e EDS, o triclosan foi adsorvido à superfície do VB, e desta forma, sua liberação também ficou associada aos processos de troca iônica que envolve a bioatividade do composto em SBF.

Os nossos resultados nos permitem concluir que a técnica de dopagem proposta é eficaz e permite a adsorção de triclosan, aos vidros bioativos conforme demonstrado experimentalmente, e que o produto final apresenta excelente atividade antibacteriana quando comparado aos VBs dopados com prata. Ensaio complementares demonstraram ainda que a adsorção de triclosan não impede a bioatividade expressa pela formação da camada de hidroxiapatita na superfície das partículas após a imersão em SBF.

5.5.1.3 Titulação do VB dopado com prata e triclosan

Por fim, o produto final, foi sintetizado à partir da amostra de VB-Ag3%, obtida por sol-gel. A dopagem com triclosan foi feita conforme descrito no item 4.2. Depois de seco em estufa a 50° C, o pó foi triturado para degranulação, e titulado pelo sistema fechado, para quantificação da atividade antibacteriana contra a cepa padrão de *Escherichia coli*, tendo como referência, o VB puro, o VB-Ag3% e o VB-triclosan. O resultado das titulações diárias por um período de nove dias, expresso em UI.mg⁻¹, é apresentado na figura 29.

Pela sua análise podemos verificar que o produto final possui um pico de atividade antibacteriana máxima já no primeiro dia e que a intensidade de resposta evidencia uma reação sinérgica entre seus componentes. O título máximo de 1024 UI.n.mg⁻¹ de VB é no mínimo 4 vezes superior ao maior título dos componentes isolados. A dinâmizada atividade antibacteriana guarda semelhanças com aquela dos VB-Ag e do VB-triclosan o que denuncia também uma possível relação com a bioatividade do composto.

A questão do sinergismo entre triclosan com outros antimicrobianos já tinha sido relatada na literatura por Cox (1987) que relatou este efeito em presença de

álcool, e Wignall *et al.* (2008) que demonstraram que a sua associação com vários antibióticos como amoxicilina, gentamicina, nitrofurantoínas, também resulta em efeito potencializador.

A magnitude destes títulos de atividade antibacteriana torna-se relevante, face à utilização de uma técnica microbiológica alternativa à aquelas utilizadas para a aferição da atividade antibacteriana frente a antibióticos. Em nossos ensaios, a concentração do inóculo desafio foi de 1 a $2 \cdot 10^7$ bactérias, ou seja, aproximadamente 1000 vezes maior que a utilizada nos testes frente a antibióticos. Como as 1024 Unidades Inibitórias obtidas na titulação do produto final estão contidas em 1 mg do composto, podemos deduzir matematicamente que : 1 UI equivale a $1/1024 = 0,0009766$ mg ou 0,97 μg de VB por 100 μL (volume da reação). Desta forma 9,7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ seria a Unidade Inibitória ou o equivalente a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do produto final que inibe a atividade metabólica de 1 a $2 \cdot 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ células de *Escherichia coli*.

Para efeito de comparação, Vischer & Regos (1974) estudando a concentração inibitória mínima de triclosan para várias bactérias, relataram uma CIM 0,1 a 0,3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para *Escherichia coli*. Ressalta-se que nos ensaios padrões de CIM, os inóculos de bactérias são 1000 vezes menores, na ordem de 10^4 .

Stopek, *et al.* (2008) relatam que associações entre prata e triclosan resultam em uma nova classe de sais por interação química entre as moléculas. Os autores postulam um novo grupo de sais a base de triclosan-prata com excelente atividade bactericida para diversas aplicações, desde a indústria têxtil, farmacêutica, como em dispositivos médicos. O processo de formação destes sais passa por uma reação de alcalinização do triclosan, que pode ser realizada com vários hidróxidos ou sais alcalinos, como o carbonato de sódio, carbonato de cálcio, carbonato de potássio, bicarbonato de sódio ou bicarbonato de potássio. Uma vez alcalinizado o triclosan pode reagir com diversos compostos à base de prata, inclusive o cloreto de prata. Os autores atribuem ainda o efeito sinérgico da atividade antibacteriana ao aumento da solubilidade do triclosan.

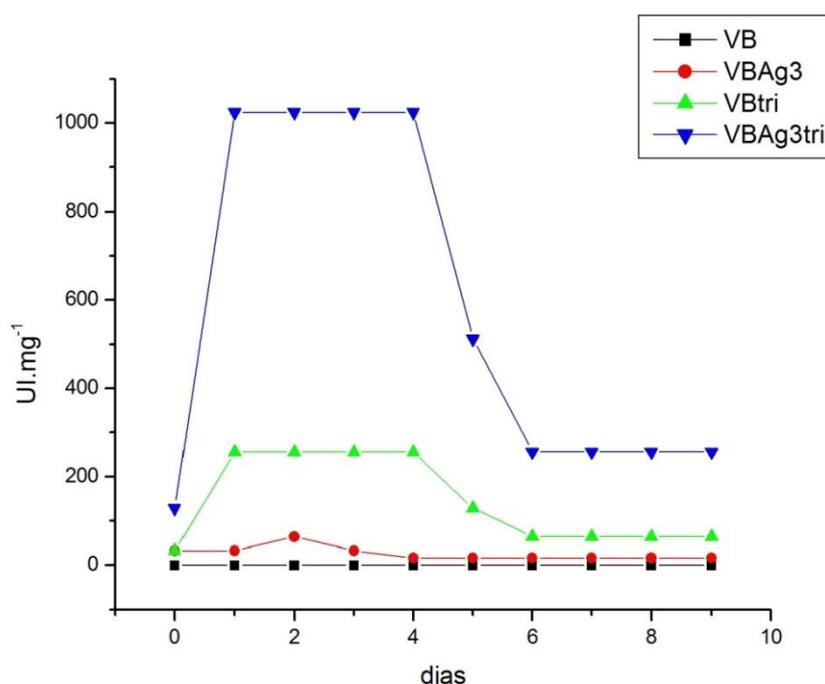


Figura 29 - Títulos de atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* em sistema fechado, expressos em número de UI.mg⁻¹ das amostras de VB, VB-dopado com 3 mol% de prata (VB-Ag3, VB-triclosan (VB-tri) e VB-dopado com 3 mol% de prata e com triclosan (VB-Ag3tri), obtidos durante imersão em SBF por 9 dias a 35° C.

Os resultados sugerem a formação de um composto à base de prata e triclosan durante o processo de adsorção, ou ainda durante as fases de troca iônica do VBF com o SBF. Cabe lembrar que tanto nos ensaios de bioatividade quanto nas titulações da atividade antimicrobiana, encontram-se todos os elementos descritos acima que concorrem para a formação de sais de prata-triclosan como a alcalinidade, presença de triclosan, cátions Ag⁺(do VB) e provavelmente sais de prata como o cloreto e fosfatos que se formam em contato com o SBF.

Em se considerando que VB é apenas um veículo para a dopagem dos princípios ativos, podemos concluir que os resultados obtidos denotam excelente atividade antibacteriana contra a cepa padrão utilizada. Entretanto, não encontramos na literatura informação alguma sobre a possível citotoxicidade deste composto.

5.5.2 Teste de Inibição em Ágar

Os resultados dos testes de inibição de 36 amostras de bactérias associadas a infecção hospitalar, sendo 15 Gram positivas e 21 Gram negativas, na superfície de Ágar estão evidenciados na figura 30. Nela fica evidenciada a capacidade de inibição do VB-Ag3%Tri sobre o crescimento das cepas Gram positivas e Gram Negativas associadas a infecções de pacientes hospitalizados. Embora não haja comprovação da origem nosocomial destas infecções, as espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* são as mais frequentemente envolvidas em infecções associadas à biomateriais (CAMPOCCIA, 2005). Em concentrações de 40 mg. mL⁻¹ de ágar houve inibição completa dos inóculos das 36 amostras testadas. O inóculo padrão foi de aproximadamente 10⁴ bactérias. Estes resultados demonstram a difusibilidade dos princípios ativos pelo ágar e confirmam os resultados anteriores observados em *Escherichia coli* ATCC 25922.

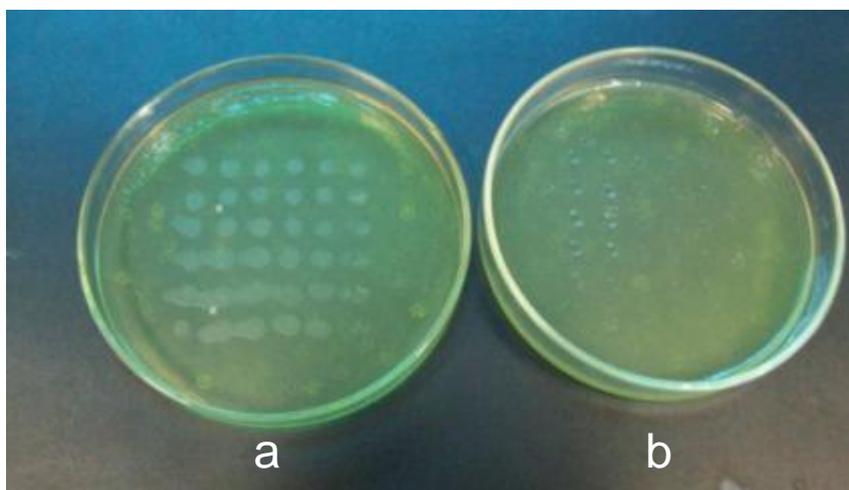


Figura 30 - Teste de inibição em ágar Agar Muller Hinton contendo 40mg.mL⁻¹ de VB (a) e VB-Ag3%-triclosan (b), semeadas com 36 cepas de bactérias isoladas de infecções em pacientes hospitalizados, após 24 horas de incubação a 35°C.

Ante ao exposto parece-nos que a sua utilização em aplicações relacionadas à prevenção de infecções relacionadas à biomaterias é muito promissora. As excelentes propriedades antibacterianas aferidas podem ser usadas não apenas na prevenção de infecções em implantes, pelo recobrimento da superfície do biomaterial com o composto, mas também no tratamento de infecções, como no caso das osteomielítes, face aos níveis de inibição alcançados aliados a presença de bioatividade.

E ainda, se levarmos em consideração, que no mecanismo de patogenicidade das infecções centradas em biomateriais, os macrófagos possuem um importante papel na condução de bactérias à superfície dos biomaterias (KRAUSE, *et al.*, 1990), (MORA, *et al.*, 1991) e que os macrófagos e monócitos também possuem capacidade de fagocitar partículas de vidro bioativos (BOSETTI, *et al.*, 2002b), vislumbramos a possibilidade de veiculação de micropartículas de até 20 µm de vidro bioativo dopadas de prata e triclosan para o interior de macrófagos e monócitos infectados. Esta prática poderia ter impacto no tratamento de doenças onde o parasitismo intracelular de células do sangue, cria um reduto de resistência à utilização de antibióticos e quimioterápicos.

Por outro lado, como já foi descrito na literatura, modificações da fórmula original do vidro bioativo e das técnicas de processamento, podem modular o tamanho da partícula, velocidade de liberação do princípio ativo e tipo de bioatividade desejada, de acordo com a conveniência da situação.

Por fim cabe o registro do relato inédito até o presente momento, da descoberta de um novo composto vitro-cerâmico dopado de prata e triclosan com excelentes propriedades antibacterianas, que desde já apresenta grande potencial de aplicabilidade na área da saúde.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho vidros bioativos foram sintetizados pela rota sol-gel no sistema Si:Ca:P, dopados com prata e triclosan. Os novos compostos foram caracterizados físico-quimicamente e avaliados quanto à bioatividade e atividade antibacteriana contra a cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922. A dinâmica da atividade antibacteriana foi elucidada com o uso de um procedimento microbiológico modificado. Os resultados nos permitiram concluir que:

- 6.1** A síntese de vidros bioativos pela rota sol-gel, no sistema 60Si:36Ca:4P, dopados com diferentes concentrações de prata e triclosan, foi realizada e caracterizada com sucesso.
- 6.2** A caracterização físico-química dos VBs evidenciou que após tratamento térmico a 600°C por 4 h a prata é incorporada a matriz vítrea até um limite de 1 a 3%, sendo reduzida á nano e micropartículas de prata metálica em concentrações superiores. Enquanto incorporada, não se comporta como um cátion modificador de rede e sua presença causa diminuição da higroscopia do material. As alterações em relação ao VB não dopado são compatíveis com uma densificação dos compostos.
- 6.3** Os VBs dopados com 1, 3 e 5 mol% de prata apresentam bioatividade conforme demonstrado pela formação *in vitro* de apatitas, bem como atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* ATCC 25922, que é diretamente proporcional á quantidade de prata incorporada.
- 6.4** O procedimento microbiológico proposto para a avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos estudados, por meio de uma microtécnica foi eficiente, prático e reprodutível. A dinâmica da atividade antibacteriana em função do tempo é influenciada pelas fases da bioatividade. Há um aumento de atividade durante a fase inicial de troca iônica do VB, seguido de uma queda

durante o período de formação de hidroxiapatita, e manutenção de um efeito residual duradouro. Esta dinâmica não depende da concentração de prata dos compostos e deve-se provavelmente a formas diferentes de prata ativa nos compostos.

- 6.5** Os compostos VB-Ag3% e VB-Ag5% apresentam compatibilidade entre atividade antibacteriana e bioatividade.
- 6.6** A técnica proposta permite a incorporação de triclosan á superfície dos grãos de VB. A intensidade da atividade antibacteriana do composto dopado, também sofre influencia da bioatividade e obedece a uma dinâmica semelhante , mas não idêntica aos VBs dopados com prata.
- 6.7** A dissolução dos VBs estudados em SBF, permitem a liberação progressiva dos princípios ativos, prata ou triclosan em meio de SBF.
- 6.8** O composto VB-Ag3%-triclosan possui excelente atividade antibacteriana, superior aos seus componentes ativos isolados (prata e triclosan), denotando efeito sinérgico entre ambos.
- 6.9** O composto VB-Ag3%-triclosan também foi eficiente na inibição “*in vitro*” do crescimento de 36 cepas de bactérias isoladas de pacientes hospitalizados.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

Ader F& Bernard L. Pathophysiology of infection on orthopedic biomaterials. *Presse Medicale*. v.34, n.7, p.533-536, 2005.

Aguiara H, Sollaa E, Serraa J, Gonzáleza P, Leóna B, Almeida N, *et al.* Orthophosphate nanostructures in SiO₂-P₂O₅-CaO-Na₂O-MgO bioactive glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* v.354, 2010.

Ahlberg A, Carlsson AS, Lindberg L. Hematogenous infection in total joint replacement. *Clinical Orthopaedics and Related Research*.n.137,p.69-75, 1978.

Aina V, Malavasi G, Pla AF, Munaron L, Morterra C. Zinc-containing bioactive glasses, surface reactivity and behaviour towards endothelial cells. *Acta Biomaterialia* v.5,n.4,p.1211-1222, 2009.

Alt V, Bechert T, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, *et al.* An *in vitro* assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* v.25, n.18, p.4383-4391, 2004.

An YH& Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* v.43,n.3,p.338-348, 1998.

Andren AW& Armstrong DE. The environmental chemistry and toxicology of silver. *Environmental Toxicology and Chemistry* v.18,n.1,p.1-2, 1999.

Antoci V, Adams CS, Parvizi J, Davidson HM, Composto RJ, Freeman TA, *et al.* The inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection. *Biomaterials* v.29, n.35, p.4684-4690, 2008.

Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Pirini V, Visai L, *et al.* Antibiotic

resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials* v.26, n.33, p.6530-6535, 2005.

Arciola CR, Campoccia D, An YH, Baldassarri L, Pirini V, Donati ME, *et al.* Prevalence and antibiotic resistance of 15 minor staphylococcal species colonizing orthopedic implants. *International Journal of Artificial Organs* v.29,n.4,p.395-401, 2006.

ATSDR - Agency for Toxic Substances Disease Registry. Toxicological profile for silver. ATSDR/TP-90/24. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia: U.S. Public Health Service, 1990.

Azghani AO, Idell S, Bains M, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microbial Pathogenesis* v.33,n.3,p.109-114, 2002.

Baia L, Baia M, Kiefer W, Popp J, Simon S. Structural and morphological properties of silver nanoparticles-phosphate glass composites. *Chemical Physics* v.327,n.1,p.63-69, 2006.

Balamurugan A, Balossier G, Laurent-Maquin D, Pina S, Rebelo AHS, Faure J, *et al.* An *in vitro* biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dental Materials* v.24, n.10, p.1343-1351, 2008.

Bayazit V, Bayazit M, Bayazit E. Evaluation of bioceramic materials in biology and medicine. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* v.5, n.1,p.267-278, 2010.

Bellantone M, Coleman NJ, Hench LL. A novel sol-gel derived bioactive glass featuring antibacterial properties. *Bioceramics* v.192-1,p.597-600, 2000a.

Bellantone M, Coleman NJ, Hench LL. Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass. *Journal of Biomedical Materials Research* v.51,n.3,p.484-490, 2000b).

Bellantone M & Hench L. Bioactive behaviour of sol-gel derived antibacterial bioactive glass. *Key Engineering Materials* v.192-195,p.617-620, 2001.

Bellantone M, Williams HD, Hench LL. Broad-spectrum bactericidal activity of Ag₂O-doped bioactive glass. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* v.46,n.6,p.1940-1945, 2002.

Bengtson S, Blomgren G, Knutson K, Wigren A, Lidgren L. Hematogenous infection after knee arthroplasty. *Acta Orthopaedica Scandinavica* v.58, n.5, p.529-534, 1987.

Bhargava HN & Leonard PA. Triclosan, Applications and safety. *American Journal of Infection Control* v.24,n.3,p.209-218, 1996.

Bhutani T & Jacob SE. Triclosan, a potential allergen in suture-line allergic contact dermatitis. *Dermatologic Surgery* v.35,n.5,p.888-889, 2009.

Blaker JJ, Nazhat SN, Boccaccini AR. Development and characterisation of silver-doped bioactive glass-coated sutures for tissue engineering and wound healing applications. *Biomaterials* v.25,n.7-8,p.1319-1329, 2004.

Bosetti M, Hench LL, Cannas M. Interaction of bioactive glasses with peritoneal macrophages and monocytes *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research* v.60,n.1,p.79-85, 2002a.

Bosetti M, Masse A, Tobin E, Cannas M. Silver coated materials for external fixation devices, *in vitro* biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials* v.23,n.3,p.887-892, 2002b.

Bouwmeester H & Sips A. Safety for consumers of application of nanotechnologies and nanoparticles in food production. *Toxicology Letters* v.172,p.191, 2007.

Branda F, Arcobello-Varlese F, Costantini A, Luciani G. Effect of the substitution of M₂O₃ (M = La, Y, In, Ga, Al) for CaO on the bioactivity of 2.5CaO center dot 2SiO₂ glass. *Biomaterials* v.23,n.3,p.711-716, 2002.

Brekke JH & Toth JM. Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *In*: [s.n.] [s.n] John Wiley & Sons Inc, 1980.

Brett DW. A discussion of silver as an antimicrobial agent, alleviating the confusion. *Ostomy Wound Management* v.52,n.1,p.34-41, 2006.

Busscher HJ&, Weerkamp AH. Specific and nonspecific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *Fems Microbiology Reviews* v.46,n.2,p.165-173, 1987.

Cakmak A, Cirpanli Y, Bilensoy E, Yorganci K, Calis S, Saribas Z, *et al.* Antibacterial activity of triclosan chitosan coated graft on hernia graft infection model. *International Journal of Pharmaceutics* v.381,n.2,p.214-219, 2009.

Campoccia D, Montanaro L, Baldassarri L, An YH, Arciola CR. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from implant orthopedic infections. *International Journal of Artificial Organs* v.28,n.11,p.1186-1191, 2005.

Cardona MA, Simmons RL, Kaplan SS. TNF and IL-1 generation by human monocytes in response to biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research* v.26,n.7,p.851-859, 1992.

Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, *et al.* Unique cellular interaction of silver nanoparticles, size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry B.* v.112,n.43,p.13608-13619, 2008.

Carnoy C, Scharfman A, Vanbrussel E, Lamblin G, Ramphal R, Roussel P. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane adhesins for human respiratory mucus glycoproteins. *Infection and Immunity* v.62,n.5,p.1896-1900, 1994.

Catauro M, Raucci MG, De Gaetano F, Marotta A. Antibacterial and bioactive silver-containing Na₂O center dot CaO center dot 2SiO₂ glass prepared by sol-gel method. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* v.15,n.7,p.831-837, 2004.

Charnley J. Postoperative infection after total hip replacement with special reference to air contamination in operating room. *Clinical Orthopaedics and Related Research*,v.87,p.167, 1972.

Chen YG, Pi BR, Zhou H, Yu YS, Li LJ. Triclosan resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Medical Microbiology* v.58,n.8,p.1086-1091, 2009.

Cho SB, Miyaji F, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, Nakamura T. Apatite-forming ability of silicate ion dissolved from silica gels. *Journal of Biomedical Materials Research* v.32,n.3,p.375-381, 1996.

Chou TGR, Petti CA, Szakacs J, Bloebaum RD. Evaluating antimicrobials and implant materials for infection prevention around transcutaneous osseointegrated implants in a rabbit model. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* v.92A,n.3,p.942-952, 2010.

Christensen GD, Baddour LM, Hasty DL, Lowrance JH, Simpson WA. Infections associated with indwelling medical devices, Vol. 1. Washington DC, ed. *American Society of Microbiology*, 1989.

Ciecinska M. Thermal analysis of gel-derived bioactive phospho-silicate glasses. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* v.72,n.1,p.199-207, 2003.

Clark DE, Dilmore MF, Ethridge EC, Hench LL. Aqueous corrosion of soda-silica and soda-lime silica glass. *Journal of the American Ceramic Society* v.59,n.1-2,p.62-65, 1976.

Clupper DC & Hench LL. Bioactive response of Ag-doped tape cast Bioglass 45S5 following heat treatment. *J Mater Sci Mater Med* v.12, n.10-12, p.917-921, 2001.

Coelho, MB. Desenvolvimento de metodologia para a produção de estruturas tridimensionais porosas de vidro bioativo para aplicação em engenharia de tecidos. [Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

Coleman NJ & Nicholson JW. Glass Bones. *Education in chemistry*. v.43, n.6. [on line]. 2006 [acesso em 15 de julho 2010]. Disponível em: [http://www.rsc.org/Education/EiC/issues/2006Nov/Glass Bones.aspx](http://www.rsc.org/Education/EiC/issues/2006Nov/Glass%20Bones.aspx)

Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick *Scientific American* v.238,n.1,p.86-, 1978.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP Bacterial biofilms. A common cause of persistent infections. *Science* v.284,n.5418,p.1318-1322, 1999.

Cottell A, Denyer SP, Hanlon GW, Ochs D, Maillard JY. Triclosan-tolerant bacteria, changes in susceptibility to antibiotics. *Journal of Hospital Infection* v.72, n.1, p.71-76, 2009.

Cox AR. Efficacy of antimicrobial agent triclosan in topical deodorant products - recent developments *in vivo*. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* v.38, n.4, p.223-231, 1987.

Dankert J, Hogt AH, Feijen J. Biomedical polymers - bacterial adhesion, colonization and infection. *Crc Critical Reviews in Biocompatibility* v.2, n.3, p.219-301, 1986.

Dasgupta MK, Ulan RA, Bettcher K, Lam K, Burns V, Tyrrell DL, *et al.* An extracorporeal model of biofilm bacterial-growth (BBG) in Tenckhoff catheter (TC) disks. *Clinical and Investigative Medicine-Medicine Clinique Et Experimentale* v.10, n.4, p.B103, 1987.

Dasgupta MK, Costerton JW. *Staphylococcus aureus* related catheter colonization is effectively reduced by silver catheters in peritoneal dialysis (PD). *Journal of the American Society of Nephrology* v.5, n.3, p.441-441, 1994.

De la Riviere AB, Dossche KME, Birnbaum DE, Hacker R. First clinical experience with a mechanical valve with silver coating. *Journal of Heart Valve Disease* v.9, n.1, p.123-129, 2000.

De G, Licciulli A, Massaro C, Tapfer L, Catalano M, Battaglin G, *et al.* Silver nanocrystals in silica by sol-gel processing. *Journal of Non-Crystalline Solids* v.194, n.3, p.225-234, 1996.

Deitch EA, Winterton J, Berg R. Effect of starvation, malnutrition, and trauma on the gastrointestinal tract flora and bacterial translocation. *Archives of Surgery* v.122, n.9, p.1019-1024, 1987a.

Deitch EA, Winterton J, Li M, Berg R. The gut as a portal of entry for bacteremia - role of proteins malnutrition *Annals of Surgery* v.205, n.6, p.681-692, 1987b.

Denstedt JD, Wollin TA, Reid G. Biomaterials used in urology, Current issues of biocompatibility, infection, and encrustation. *Journal of Endourology* v.12, n.6, p.493-

500, 1998.

Devicente A, Aviles M, Codina JC, Borrego JJ, Romero P. Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural waters. *Journal of Applied Bacteriology* v.68,n.6,p.625-632, 1990.

Di Nunzio S, Brovarone CV, Spriano S, Milanese D, Verne E, Bergo V, *et al.* Silver containing bioactive glasses prepared by molten salt ion-exchange. *Journal of the European Ceramic Society*. v.24,n.10-11,p.2935-2942, 2004.

Dibrov P, Dzioba J, Gosink KK, Hase CC. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.46,n.8,p.2668-2670, 2002.

Doig P, Todd T, Sastry PA, Lee KK, Hodges RS, Paranchych W, *et al.* Role of pilin in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells. *Infection and Immunity*. v.56,n.6,p.1641-1646, 1988.

Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*. v.7,n.2,p.277-281, 2001.

Drake PL& Hazelwood KJ. Exposure-related health effects of silver and silver compounds -A review. *Annals of Occupational Hygiene*. v.49,n.7,p.575-585, 2005.

Edmiston CE, Seabrook GR, Goheen MP, Krepel CJ, Johnson CP, Lewis BD, *et al.* Bacterial adherence to surgical sutures. Can antibacterial-coated sutures reduce the risk of microbial contamination? *Journal of the American College of Surgeons*. v.203,n.4,p.481-489, 2006.

Epifani M, Giannini C, Tapfer L, Vasanelli L. Sol-gel synthesis and characterization of Ag and Au nanoparticles in SiO₂, TiO₂, and ZrO₂ thin films. *Journal of the American Ceramic Society*. v.83,n.10,p.2385-2393, 2000.

Erol M, Ozyuguran A, Celebican O. Synthesis, characterization, and *in vitro* bioactivity of sol-gel-derived Zn, Mg, and Zn-Mg Co-doped bioactive glasses. *Chemical Engineering & Technology*. v.33,n.7,p.1066-1074, 2010.

Ewald A, Gluckermann SK, Thull R, Gbureck U. Antimicrobial titanium/silver PVD

coatings on titanium. *Biomedical Engineering Online*. v.5, 2006.

Felipe M, Andrade PF, Novaes AB, Grisi MFM, Souza SLS, Taba M, *et al.* Potential of bioactive glass particles of different size ranges to affect bone formation in interproximal periodontal defects in dogs. *Journal of Periodontology*. v.80,n.5,p.808-815, 2009.

Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.52,n.4,p.662-668, 2000.

Fleiszig SMJ, Evans DJ. Pathogenesis of Contact Lens-Associated Microbial Keratitis. *Optometry and Vision Science*. v.87,n.4,p.225-232, 2010.

Fort DJ, Rogers RL, Gorsuch JW, Navarro LT, Peter R, Plautz JR. Triclosan and anuran metamorphosis -no effect on thyroid-mediated metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences*. v.113,n.2,p.392-400, 2010.

Fung MC& Bowen DL. Silver products for medical indications, risk-benefit assessment. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology*. v.34,n.1,p.119-126, 1996.

Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. *Quorum sensing* in bacteria - the Lux-R family of cell density response transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*. v.176,n.2,p.269-275, 1994.

Garcia L. Antimicrobial Susceptibility Testing in: Clinical Microbiology Procedures Handbook, V.2. Ed. Garcia L. Washington, DC: ASM Press, 2007.

Gatti AM, Yamamuro T, Hench LL, Andersson OH. *In-vivo* reactions in some bioactive glasses and ceramics granules. *Cells and Materials*. v.3,n.3,p.283-291, 1993.

Gentry LO. Management of osteomyelitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.9,n.1,p.37-42, 1997.

Gerhardt LC& Boccaccini AR. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials*. v.3,n.7,p.3867-3910, 2010.

Ghosh SK, Nandi SK, Kundu B, Datta S, De DK, Roy SK, *et al.* *In vivo* response of

porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*. v.86B,n.1,p.217-227, 2008.

Gioe TJ, Killeen KK, Grimm K, Mehle S, Scheltema K. Why are total knee replacements revised? Analysis of early revision in a community knee implant registry. *Clinical Orthopaedics and Related Research*.n.428,p.100-106, 2004.

Gorustovich AA, Steimetz T, Cabrini RL, Lopez JMP. Osteoconductivity of strontium-doped bioactive glass particles, a histomorphometric study in rats. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. v.92A,n.1,p.232-237, 2010.

Gottenbos B, Busscher HJ, van der Mei HC. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. v.13,n.8,p.717-722, 2002.

Gottenbos B, van der Mei HC, Klatter F, Grijpma DW, Feijen J, Nieuwenhuis P, *et al*. Positively charged biomaterials exert antimicrobial effects on gram-negative bacilli in rats. *Biomaterials* v.24,n.16,p.2707-2710, 2003.

Greaves GN. Exafs and the structure of glass. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v.71,n.1-3,p.203-217, 1985.

Greaves GN & Sen S. Inorganic glasses, glass-forming liquids and amorphizing solids. *Advances in Physics*. v.56,n.1,p.1-166, 2007.

Greenfeld JI, Sampath L, Popilskis SJ, Brunnert SR, Stylianos S, Modak S. Decreased bacterial adherence and biofilm formation on chlorhexidine and silver sulfadiazine impregnated central venous catheters implanted in swine. *Critical Care Medicine*. v.23,n.5,p.894-900, 1995.

Gristina AG, Oga M, Webb LX, Hobgood CD. Adhesion bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. *Science*. v.228,n.4702,p.990-993, 1985.

Gristina AG. Biomaterial centered infection microbial adhesion versus tissue integration. *Science* v.237,n.4822,p.1588-1595, 1987.

Gristina A& Sherk HH. Biomaterial-centered infection - Microbial adhesion versus

tissue integration, (re-impresso de Science, v.237, p.1588-1595, 1987). *Clinical Orthopaedics and Related Research*,n.427,p.4-12, 2004.

Gulbranson SH, Hud JA, Hansen RC. Argyria following the use of dietary supplements containing colloidal silver protein. *Cutis* v.66,n.5,p.373-, 2000.

Guo W, Andersson R, Ljungh A, Wang XD, Bengmark S. Enteric bacterial translocation after intraperitoneal implantation of rubber drain pieces. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. v.28,n.5,p.393-400, 1993a.

Guo W, Wang X, Andersson R, Ljungh A, Bengmark S. Bacterial translocation and reticuloendothelial function after implantation of abdominal drainage in the rat. *Italian Journal of Gastroenterology*. v.25,n.4,p.161-167, 1993b.

Guo W, Willen R, Andersson R, Parsson H, Liu X, Johansson K, *et al.* Mophological response of the peritoneum and spleen to intraperitoneal biomaterial. *International Journal of Artificial Organs*. v.16,n.5,p.276-284, 1993c.

Gupta A, Matsui K, Lo JF, Silver S. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nature Medicine*. v.5,n.2,p.183-188, 1999.

Gupta R& Kumar A. Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. *Biomed Mater*. v.3,n.3,p.034005, 2008.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms, from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. v.2,n.2,p.95-108, 2004.

Hamiltonmiller JMT, Shah S, Smith C. Silver sulfadiazine - a comprehensive *in vitro* reassessment. *Chemotherapy*. v.39,n.6,p.405-409, 1993.

Heath RJ, Rubin JR, Holland DR, Zhang EL, Snow ME, Rock CO. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry*. v.274,n.16,p.11110-11114, 1999.

Hegyeli RJ. Limitations of current techniques for assessing biohazards and biocompatibility of new candidate materials - ORPL. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*.,p.1-, 1970.

Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research* v.5,n.6,p.117-141, 1971.

Hench LL& Paschall HA. Histochemical responses at a biomaterials interface. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.8,n.3,p.49-64, 1974.

Hench LL &Wilson J. Surface active biomaterials. *Science*. v.226,n.4675,p.630-636, 1984.

Hench LL. Bioactive materials, the potential for tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research* v.41,n.4,p.511-518, 1998a.

Hench LL. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society*. v.81, n.7, p.1705-1728, 1998b.

Hench LL, Wheeler DL, Greenspan DC. Molecular control of bioactivity in sol-gel glasses. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. v.13,n.1-3,p.245-250, 1998.

Hench LL& Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* v.295,n.5557,p.1014-, 2002.

Hench LL, Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Polak JM, Zhong JP, *et al.* Gene activating glasses. *Journal of Inorganic Materials* v.17,n.5,p.897-909, 2002.

Hiltz M. The environmental impact of dentistry. *Journal of the Canadian Dental Association*. v.73,n.1,p.59-?, 2007.

Holt KB& Bard AJ. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*, an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag. *Biochemistry*. v.44,n.39,p.13214-13223, 2005.

Huber M& Terezhalmay G. The patient with a transient bacteremia. *General dentistry*. v.52,n.2,p.13, 2005.

Hunt JA, Flanagan BF, McLaughlin PJ, Strickland I, Williams DF. Effect of biomaterial surface charge on the inflammatory response, evaluation of cellular infiltration and TNF alpha production. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.31,n.1,p.139-144, 1996.

Imokawa G, Shimizu H, Okamoto K. Antimicrobial effect of zinc pyrithione *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. v.33,n.1,p.27-37, 1982.

Jell G & Stevens MM. Gene activation by bioactive glasses. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. v.17,n.11,p.997-1002, 2006.

Jeon HJ, Yi SC, Oh SG. Preparation and antibacterial effects of Ag-SiO₂ thin films by sol-gel method. *Biomaterials*. v.24,n.27,p.4921-4928, 2003.

John AT: Triclosan containing absorbable sutures, for delivering therapeutic agents at the site of medical or surgical intervention, prepared by incorporation of triclosan into absorbable polymers, in. (US2004185250-A1 US767304 30 Jan 2004). Edited by, John AT, 2004.

Jones JR, Tsigkou O, Coates EE, Stevens MM, Polak JM, Hench LL. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. *Biomaterials*. v.28,n.9,p.1653-1663, 2007.

Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* v.74,n.7,p.2171-2178, 2008.

Jungerma E & Taber D. New broad spectrum antibacterial soap.1-Generalproperties. *Journal of the American Oil Chemists Society*. v.48,n.7,p.318-, 1971.

Kanetoshi A, Katsura E, Ogawa H, Ohyama T, Kaneshima H, Miura T. Acute toxicity, percutaneous absorption and effects on hepatic mixed function oxidase activities of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether (Irgasan(R) DP300) and its chlorinated derivatives. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. v.23,n.1,p.91-98, 1992.

-
- Kasemo B & Lausmaa J. Surface science aspects on inorganic biomaterials. *Crc Critical Reviews in Biocompatibility*. v.2,n.4,p.335-380, 1986.
- Kawashita M, Tsuneyama S, Miyaji F, Kokubo T, Kozuka H, Yamamoto K. Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method. *Biomaterials*. v.21,n.4,p.393-398, 2000.
- Keong LC & Halim AS. *In vitro* models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan derivatives in wound management. *International Journal of Molecular Sciences*. v.10,n.3,p.1300-1313, 2009.
- Kilgus DJ, Howe DJ, Strang A. Results of periprosthetic hip and knee infections caused by resistant bacteria. *Clinical Orthopaedics and Related Research*.n.404,p.116-124, 2002.
- Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.96,n.24,p.13611-13614, 1999.
- Kojic EM& Darouiche RO. Candida infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews*. v.17,n.2,p.255-?, 2004.
- Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.24,n.6,p.721-734, 1990.
- Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. v.24,n.13,p.2161-2175, 2003.
- Koutsoudis MD, Tsaltas D, Minogue TD, von Bodman SB. *Quorum-sensing* regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii subspecies stewartii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.103,n.15,p.5983-5988, 2006.
- Krause TJ, Robertson FM, Liesch JB, Wasserman AJ, Greco RS. Differential production of interleukin-1 on the surface of biomaterials. *Archives of Surgery*. v.125,n.9,p.1158-1160, 1990.

Labbate M, Zhu H, Thung L, Bandara R, Larsen MR, Wilcox MDP, *et al.* Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *Journal of Bacteriology*. v.189,n.7,p.2702-2711, 2007.

Langer R & Vacanti J. Tissue engineering. *Science*. p.920-926, 1993.

Langer R. Tissue engineering. *Molecular Therapy*. v.1, n.1, p.12-15, 2000.

Lao J, Jallot E, Nedelec. JM. Strontium-delivering glasses with enhanced bioactivity, A new biomaterial for antiosteoporotic applications? *Chemistry of Materials*. v.20,n.15,p.4969-4973, 2008.

Lee SY, Yin Z, Ge R, Sin YM. Isolation and characterization of fish *Aeromonas hydrophila* adhesins important for *in vitro* epithelial cell invasion. *Journal of Fish Diseases*. v.20,n.3,p.169-175, 1997.

Lee Szifjuges, L. Bioactive Glasses, a potential new class of active ingredients for personal care products. *SOFW-Journal* v.129, n.9, p.6, 2003.

LeGeros RZ, Quirolgico G, LeGeros DJ. Effect of strontium on the dissolution properties of apatites. *Journal of Dental Research*. v.63,p.203-203, 1984.

Levy S, Van Dalen M, Agonafer S, Soboyejo WO. Cell/surface interactions and adhesion on bioactive glass 45S5. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. v.18,n.1,p.89-102, 2007.

Li R, Clark AE, Hench LL. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *Journal of Applied Biomaterials* v.2,n.4,p.231-239, 1991.

Liau SY, Read DC, Pugh WJ, Furr JR, Russell AD. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups, relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in Applied Microbiology*. v.25,n.4,p.279-283, 1997.

Lidwell OM, Lowbury EJL, Whyte W, Blowers R, Stanley SJ, Lowe D. Effect of ultraclean air in operating rooms on deep sepsis in the joint after total hip or knee replacement - a randomized study. *British Medical Journal* v.285,n.6334,p.10-14, 1982.

Lilly HA & Lowbury E JL. Disinfection of skin with detergent preparations of irgasan DP-300 and other antiseptics *British Medical Journal*. v.4,n.5941,p.372-374, 1974.

Lu JQ, Bravo-Suarez JJ, Takahashi A, Haruta M, Oyama ST. *In situ* UV-vis studies of the effect of particle size on the epoxidation of ethylene and propylene on supported silver catalysts with molecular oxygen. *Journal of Catalysis*. v.232, n.1, p.85-95, 2005.

Lyczak JB & Schechter PJ. Nanocrystalline silver inhibits antibiotic-antiseptic-resistant bacteria. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. v.77,n.2,p.60, 2005.

Ma ZK, Morris TW, Combrink KD. Therapeutic opportunities for the treatment of biofilm-associated infections. *In: Annual Reports in Medicinal Chemistry*, v.39. (Annual Reports in Medicinal Chemistry). [s.n.] p.197-210.2004.

Ma J, Chen CZ, Wang DG, Shi JZ. Textural and structural studies of sol-gel derived SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO glasses by substitution of MgO for CaO. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. v.30,n.6,p.886-890, 2010.

Makinen TJ, Veiranto M, Knuuti J, Jalava J, Tormala P, Aro HT. Efficacy of bioabsorbable antibiotic containing bone screw in the prevention of biomaterial-related infection due to *Staphylococcus aureus*. *Bone*. v.36, n.2, p.292-299, 2005.

Marinho A, Cardoso SD, de Almeida VV. Geographic disparities in organ transplantation in Brazil. *Cadernos de Saude Publica*. v.26, n.4, p.786-796, 2010.

Marino R & Gonzales-Portillo M. Preconquest peruvian neurosurgeons, a study of Inca and pre-Columbian trephination and the art of medicine in ancient Peru. *Neurosurgery*. v.47,n.4,p,940-950, 2000.

Marshall JP & Schneider RP. Systemic argyria secondary to topical silver nitrate. *Archives of Dermatology*. V.113,n.8,p.1077-1079, 1977.

Martinez A, Izquierdo-Barba I, Vallet-Regi M. Bioactivity of a CaO-SiO₂ binary glasses system. *Chemistry of Materials*. v.12,n.10,p.3080-3088, 2000.

Marzulli FN, Maibach HI. Antimicrobials - experimental contact sensitization in man *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. v.24,n.7,p.399-421, 1973.

McBride MC, Malcolm RK, Woolfson AD, Gorman SP. Persistence of antimicrobial activity through sustained release of triclosan from pegylated silicone elastomers. *Biomaterials* v.30,n.35,p.6739-6747, 2009.

McHugh GL, Moellering RC, Hopkins CC, Swartz MN. *Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol and threat in burn units. *Lancet*. v.1,n.7901,p.235-240, 1975.

McLeod R, Muench SP, Rafferty JB, Kyle DE, Mui EJ, Kirisits MJ, *et al.* Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of apicomplexan Fab I. *International Journal for Parasitology*. v.31,n.2,p.109-113, 2001.

Mendis E, Rajapakse N, Byun HG, Kim SK. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*. v.77,n.17,p.2166-2178, 2005.

Merino S, Rubires X, Aguilar A, Tomas JM. The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O₃₄ strains. *Fems Microbiology Letters*. v.151,n.2,p.213-217, 1997.

Mittelman MW, Bucay-Cuto W, Li J, Miller K, Schuermann J, Denstedt JD. *In vitro* antimicrobial release profile of a new triclosan-eluting ureteral stent. *Journal of Urology*. v.171,n.4,p.443-443, 2004.

Mollnes TE. Complement and biocompatibility. *Vox Sanguinis*. v.74,p.303-307, 1998.

Monafo WW & Freedman B. Topical therapy for burns. *Surgical Clinics of North America*. v.67,n.1,p.133-145, 1987.

Mora EM, Cardona MA, Simmons RL. Enteric bacteria and ingested inert particles translocate to intraperitoneal prosthetic materials *Archives of Surgery*. v.126,n.2,p.157-163, 1991.

Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. v.16,n.10,p.2346-2353, 2005.

Murugan R & Ramakrishna S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials*. v.25,n.17,p.3829-3835, 2004.

Nablo BJ, Rothrock AR, Schoenfisch MH. Nitric oxide-releasing sol-gels as antibacterial coatings for orthopedic implants. *Biomaterials*. v.26, n.8, p.917-924, 2005.

Navarro M, Ginebra MP, Clement J, Martinez S, Avila G, Planell JA. Physicochemical degradation of titania-stabilized soluble phosphate glasses for medical applications. *Journal of the American Ceramic Society*. v.86,n.8,p.1345-1352, 2003.

Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*. v.5,n.27,p.1137-1158, 2008.

Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. v.311,n.5761,p.622-627, 2006.

Neut D, van de Belt H, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials* v.24,n.10,p.1829-1831, 2003.

Nishioka M, Nishimura T, Ookubo A, Taya M. Improved bactericidal activity of silver-loaded zirconium phosphate in the presence of Cl⁻ by combining with hydroxyapatite. *Biotechnology Letters*. v.25,n.15,p.1263-1266, 2003.

Ogino M, Ohuchi F, Hench LL. Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films in bioglass *Journal of Biomedical Materials Research*. v.14,n.1,p.55-64, 1980.

Patti JM & Hook M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Current Opinion in Cell Biology*. v.6,n.5,p.752-758, 1994.

Paul, A. *Chemistry of Glasses*. London: Chapman and Hall; 1990.

Paul KS, Bacchi CJ, Englund PT. Multiple triclosan targets in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*. v.3,n.4,p.855-861, 2004.

Peitl O, Zanotto ED, Hench LL. Highly bioactive $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ glass-ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v.292,n.1-3,p.115-126, 2001.

Percival SL, Woods E, Nutekpor M, Bowler P, Radford A, Cochrane C. Prevalence of silver resistance in bacteria isolated from diabetic foot ulcers and efficacy of silver-containing wound dressings. *Ostomy Wound Management*. v.54,n.3,p.30, 2008.

Pereira MM, Clark AE, Hench LL. Calcium phosphate formation on sol-gel derived bioactive glasses *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research* v.28,n.6,p.693-698, 1994.

Perez-Vilar J, Hill RL. The structure and assembly of secreted mucins. *Journal of Biological Chemistry* v.274,n.45,p.31751-31754, 1999.

Persson GR, Samuelsson E, Lindahl C, Renvert S. Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis, a single-blinded randomized longitudinal clinical study. II. Microbiological results. *Journal of Clinical Periodontology*. v.37, n.6, p.563-573, 2010.

Pilipenko V, Stanberry LR, Reising SF, Bourne N. Protective efficacy of triclosan against vaginal *Chlamydia trachomatis* infection in a mouse model. *Faseb Journal*. v.13,n.5,p.805, 1999.

Pratten J, Nazhat SN, Blaker JJ, Boccaccini AR. *In vitro* attachment of *Staphylococcus epidermidis* to surgical sutures with and without Ag-containing bioactive glass coating. *J. Biomater Appl*. v.19,n.1,p.47-57, 2004.

Pruitt BA, McManus AT, Kim SH, Goodwin CW. Burn wound infections, current status. *World Journal of Surgery*. v.22,n.2,p.135-145, 1998.

Putnam AJ, Mooney DJ. Tissue engineering using synthetic extracellular matrices. *Nature Medicine*. v.2,n.7,p.824-826, 1996.

Queckenberg C, Meins J, Wachall B, Doroshenko O, Tomalik-Scharte D, Bastian B, *et al*. Absorption, pharmacokinetics, and safety of triclosan after dermal administration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.54,n.1,p.570-572, 2010.

Rao SPR, Surolia A, Surolia N. Triclosan, a shot in the arm for antimalarial

chemotherapy. *Molecular and Cellular Biochemistry*. v.253,n.1-2,p.55-63, 2003.

Rauci MG, Adesanya K, Di Silvio L, Catauro M, Ambrosio L. The biocompatibility of silver-containing $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{CaO}_2 \cdot \text{SiO}_2$ glass prepared by sol-gel method, *in vitro* studies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. v.92,n.1,p.102-110, 2010.

Regos J, Zak O, Solf R, Vischer WA, Weirich EG. Anti-microbial spectrum of triclosan, a broad spectrum antimicrobial agent for topical application - 2 comparison with some other antimicrobial agents. *Dermatologica*. v.158,n.1,p.72-79, 1979.

Remes A, Williams DF Immune response in biocompatibility. *Biomaterials*. v.13,n.11,p.731-743, 1992.

Rodricks JV, Swenberg JA, Borzelleca JF, Maronpot RR, Shipp AM. Triclosan - A critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. *Critical Reviews in Toxicology*. v.40,n.5,p.422-484, 2010.

Sampath LA, Chowdhury N, Caraos L, Modak SM. Infection resistance of surface modified catheters with either short lived or prolonged activity. *Journal of Hospital Infection*. v.30,n.3,p.201-210, 1995.

Saravanapavan P, Patel MH, Hench LL. Effect of particle size on the concentration and rate of Ag^+ release from antimicrobial $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ gel-glasses, *in: Bioceramics 15*, v.240-2. (Key Engineering Materials). Ed. BenNissan B, Sher D, Walsh W. Zurich-Uetikon, Trans Tech Publications Ltd, pp. 245-248,2003.

Saravanapavan P & Hench LL. Bioactive Sol-Gel Glasses in the CaO-SiO_2 System. *Key Engineering Materials*. v.192-195, p609-612, 2001

Schierholz JM & Beuth J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *Journal of Hospital Infection*. v.49, p87-93, 2001.

Schierholz JM, Morsczech C, Brenner N, Konig DP, Yucel N, Korenkov M, *et al*. Special aspects of implant-associated infection in orthopedic surgery. *Orthopade*. v.33,n.4,p.397, 2004.

Schreurs WJA, Rosenberg H. Effect of silver transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. v.152,n.1,p.7-13, 1982.

Senadheera D, Cvitkovitch DG. Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Bacterial Signal Transduction, Networks and Drug Targets*. v.631,p.178-188, 2008.

Sharma S, Ramya TNC, Surolia A, Surolia N. Triclosan as a systemic antibacterial agent in a mouse model of acute bacterial challenge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.47,n.12,p.3859-3866, 2003.

Sharma K, Dixit A, Singh S, Jagannath, Bhattacharya S, Prajapat CL, et al. Preparation and studies on surface modifications of calcium-silico-phosphate ferrimagnetic glass-ceramics in simulated body fluid. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. v.29, n.7, p.2226-2233, 2009.

Sheehy SH, Atkins BA, Bejon P, Byren I, Wyllie D, Athanasou NA, et al. The microbiology of chronic osteomyelitis, Prevalence of resistance to common empirical anti-microbial regimens. *Journal of Infection*. v.60,n.5,p.338-343, 2010.

Shelley WB, Shelley ED, Burmeister V. Argiria - The intradental photograph, a manifestation of passive photosensitivity. *Journal of the American Academy of Dermatology*. v.16,n.1,p.211-217, 1987.

Shirkhanzadeh M, Azadegan M. Formation of carbonate apatite on calcium phosphate coatings containing silver ions. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. v.9,n.7,p.385-391, 1998.

Silver S. Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. *Gene*. v.179,n.1,p.9-19, 1996.

Silver S. Bacterial silver resistance, molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *Fems Microbiology Reviews*. v.27,p.2-3,p.341-353, 2003.

Silver S & Phung LT. A bacterial view of the periodic table, genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* v.32,n.11-12,p.587-605, 2005.

Sivakumar R. On the relevance and requirements of biomaterials. *Bulletin of Materials Science*. v.22,n.3,p.647-655, 1999.

Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, Yang L, Jensen PO, Rasmussen TB, et al. Effects of antibiotics on *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.52,n.10,p.3648-3663, 2008.

Smith I& Carson B. *Trace metals in the environment v2. Silver*. Michigan: Ann Arbor Science Publisher, 1977.

Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy, Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.57, n.10, p.1539-1550, 2005.

Smyth CJ, Marron MB, Twohig J, Smith SGJ. Fimbrial adhesins, Similarities and variations in structure and biogenesis. *Fems Immunology and Medical Microbiology* v.16,n.2,p.127-139, 1996.

Sondi I & Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent, a case study on *E.coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* v.275,n.1,p.177-182, 2004.

Spijker HT, Bos R, van Oeveren W, de Vries J, Busscher HJ. Protein adsorption on gradient surfaces on polyethylene prepared in a shielded gas plasma. *Colloids and Surfaces Biointerfaces*. v.15,n.1,p.89-97, 1999.

Stohs SJ& Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. *Free Radical Biology and Medicine*. v.18,n.2,p.321-336, 1995.

Stopek J, Cuevas B, Belcheva N, Stopek JB: Salt used in pharmaceutical composition to treat medical devices, packaging materials, and textiles comprises triclosan and silver, in. (WO2008036377-A2 WOUS020422 20 Sep 2007 EP2063901-A2 EP838598 20 Sep 2007 AU2007297595-A1 AU297595 20 Sep 2007 CA2660961-A1 CA2660961 20 Sep 2007 JP2010504333-W JP529244 20 Sep 2007 US2010092530-A1 US440253 10 Dec 2009). Edited by, TYCO HEALTHCARE GROUP LP (COVI) STOPEK J B (STOP-Individual) CUEVAS B (CUEV-Individual), pp. 2063901-A2063902.

Suzuki T, Hatsushika T, Hayakawa, Y. Chem.synthetic hydroxyapatites employed as Inorganic cation-exchangers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, v. 77, p.1059-1062,1981.

Swem LR, Swem DL, O'Loughlin CT, Gatmaitan R, Zhao BX, Ulrich SM, *et al.* A *quorum-sensing* antagonist targets both membrane bound and cytoplasmic receptors and controls bacterial pathogenicity. *Molecular Cell*. v.35,n.2,p.143-153, 2009.

Tam C, Mun JJ, Evans DJ, Fleiszig SMJ. The Impact of Inoculation parameters on the pathogenesis of contact lens-related infectious keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. v.51, n.6, p.3100-3106, 2010.

Tavares W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos* 3^a Edição. Rio de Janeiro:Editora Atheneu. 2001.

Thomas MV, Puleo DA, Al-Sabbagh M. Bioactive glass three decades on. *J Long Term Eff Med Implants*. v.15,n.6,p.585-597, 2005.

Ugur A& Ceylan O. Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus spp.* *Archives of Medical Research*. v.34,n.2,p.130-136, 2003.

Vacanti JP& Langer R. Tissue engineering, the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*. v.354,p.32-34, 1999.

van Oss CJ.Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *Journal of Molecular Recognition*. v.16,n.4,p.177-190, 2003.

Vanleeuwen PAM, Boermeester MA, Houdijk APJ, Ferwerda CC, Cuesta MA, Meyer S, *et al.* Clinical significance of translocation. *Gut*. v.35,n.1,p.28-34, 1994.

Vasishta R, Chhibber S, Saxena M. Heavy metal resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiologica*. v.34,n.5,p.448-452, 1989.

Vats A, Tolley NS, Polak JM, Gough JE. Scaffolds and biomaterials for tissue

engineering, a review of clinical applications. *Clinical Otolaryngology*. v.28,n.3,p.165-172, 2003.

Veldhoen N, Skirrow RC, Osachoff H, Wigmore H, Clapson DJ, Gunderson MP, *et al.* The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology*. v.80, n.3, p.217-227, 2006.

Verne E, Ferraris S, Miola M, Fucale G, Maina G, Martinasso G, *et al.* Synthesis and characterisation of bioactive and antibacterial glass-ceramic Part 1-Microstructure, properties and biological behaviour. *Advances in Applied Ceramics*. v.107,n.5,p.234-244, 2008.

Vischer WA, Regos J Antimicrobial spectrum of triclosan, a broad spectrum antimicrobial agent for topical application. *Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene Series a-Medical Microbiology Infectious Diseases Virology Parasitology*. v.226,n.3,p.376-389, 1974.

Wells CL, Rotstein OD, Pruett TL, Simmons RL. Intestinal bacteria translocate into experimental intraabdominal abscesses *Archives of Surgery*. v.121,n.1,p.102-107, 1986.

Widmer AF. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clinical Infectious Diseases*. v.33,S94-S106, 2001.

Wignall GR, Goneau LW, Chew BH, Denstedt JD, Cadieux PA. The Effects of Triclosan on Uropathogen Susceptibility to Clinically Relevant Antibiotics. *Journal of Endourology*. v.22,n.10,p.2349-2356, 2008.

Wijnhoven SWP, Peijnenburg W, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW, *et al.* Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*. v.3,n.2,p.109, 2009.

Wikipedia - Silver. [homepage na internet] San Francisco: Wikipedia the free encyclopedia, 2010. [atualizado em 28.07.2010; acesso em 28.07.2010]. disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Silver>

Wolcott RD & Ehrlich GD Biofilms and chronic infections. *Jama-Journal of the American Medical Association*. v.299,n.22,p.2682-2684, 2008.

Wood CM, Playle RC, Hogstrand C. Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v.18,n.1,p.71-83, 1999.

Xynos ID, Edgar AJ, BATTERY LDK, HENCH LL, POLAK JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.276,n.2,p.461-465, 2000.

Yang CY, Chen YJ, Shen JL. Generalized argyria - A case report. *Dermatologica Sinica*. v.26, n.2, p.75-79, 2008.

Yang WJ, Shen CC, Ji QL, An HJ, Wang JJ, Liu QD, *et al*. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology*. v.20,n.8, 2009.

Yilmaz O, Watanabe K, Lamont RJ. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cellular Microbiology* v.4,n.5,p.305-314, 2002.

Zorrilla LM, Gibson EK, Jeffay SC, Crofton KM, Setzer WR, Cooper RL, *et al*. The Effects of Triclosan on Puberty and Thyroid Hormones in Male Wistar Rats. *Toxicological Sciences*. v.107, n.1, p.56-64, 2009.

ANEXOS

Anexo I - Protocolo para preparação de Fluido Simulado Corpóreo (SBF).

1. Lavar bem a parede de uma garrafa de polietileno e de um bastão de vidro com solução 1N-HCl, detergente neutro, e água destilada deionizada. Secar bem.
2. Colocar 500 mL de água destilada deionizada da garrafa de polietileno e fechá-la com tampa de vidro.
3. Com a agitação da água de um agitador magnético e dissolva os reagentes , um a um na ordem dada na tabela abaixo (um após o outro após totalmente dissolvido).

Tabela 9 - Reagentes para a preparação de SBF (pH7.40, 1L)

Ordem	Reagente	Quantidade
(1)	NaCl	7.996 g
(2)	NaHCO ₃	0.350 g
(3)	KCl	0.224 g
(4)	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.228 g
(5)	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.305 g
(6)	1M-HCl	40 mL
(7)	CaCl ₂	0.278 g
(8)	Na ₂ SO ₄	0.071 g
(9)	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6.057 g

1. Ajustar a temperatura da solução a 36,5°C em banho maria , e ajuste o pH da solução em pH 7,40 agitando-a e titulando com uma solução de HCl 1N gota a gota.
2. Transferir a solução da garrafa de polietileno para um frasco volumétrico de vidro. Adicione água usada para lavar a garrafa de polietileno ao frasco da solução.
3. Ajustar o volume total da solução a um litro pela adição de água destilada deionizada, e agite o frasco a 20°C.
4. Transferir a solução do frasco á garrafa de polietileno e estoque a garrafa no refrigerador a 5-10°C (se ocorrerem precipitados não use essas solução nem seu container novamente).

Anexo II – Técnica de calibragem da micropipeta para transferências de ± 1 mg de uma solução padrão.

1. À partir da solução mãe de 10 mg.mL^{-1} , retire sob agitação de um mixer, $100\mu\text{L}$ de suspensão de VB e deposite em folhas de papel alumínio previamente taradas.
2. Pese uma série de 20 amostras e seque-as em estufa a 50°C por 4 horas. Usar balança analítica com no mínimo 4 casas decimais (até 0,1mg).
3. Tabule os resultados e estabeleça a médiaaritmética (ex. tabela 10).
4. Ajuste a regulagem do cursor da micropipeta até atingir erro médio inferior a 5% do valor desejado (entre 0,95 e 1,05 mg).
5. Use esta pipeta para os processos de diluição seriada em microplaca.

Tabela 10 – Peso em mg, média e desvio padrão (dp) após secagem a 50°C por 12 horas de 20 amostras de $100\mu\text{l}$ cada de uma suspensão de SBF contendo 10 mg.mL^{-1} de VB.

Distribuição do peso em mg das amostras secas.										Média N=20	Dp
0,9	0,7	0,9	1,3	0,9	0,9	1,0	1,1	1,1	1,0		
1,0	0,7	0,9	1,2	0,8	1,0	0,9	1,2	0,8	1,0		
										1,0	$\pm 0,2$

- 6) Uma técnica alternativa é preparar soluções iniciais com quantidades crescentes de vidro bioativo, como 10, 11, 12, 13, 14 e 15 mg de VB.mL^{-1} .
- 7) repita as amostragens com micropipeta calibrada em $100\mu\text{L}$ e as pesagens do item 2 e escolha qual das concentrações iniciais é mais apropriada.

AnexoIII- Protocolo teste em microplaca de polipropileno de 96 poços para determinação do N^o de Unidades Inibitórias(UI)/mg⁻¹.

	Colunas da microplaca											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VB (μL) 1mg	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(C-)	(C+)
	+											
SBF (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Diluições seriadas												
Diluição Final	2 ⁻¹	4 ⁻¹	8 ⁻¹	16 ⁻¹	32 ⁻¹	64 ⁻¹	128 ⁻¹	256 ⁻¹	512 ⁻¹	1024 ⁻¹	-	-
	Secagem em estufa a 50°C por 12 horas											
E. coli*(μL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-	100
CB (μL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
	Incubação 24 horas a 35°C											
	<i>Leitura final</i>											

Legenda : (CB) Caldo Brucela
 (SBF) Flúido Simulado Corpóreo
 (C-) Controle Negativo
 (C+) Controle Positivo

Material:

- micropipeta calibrada para ± 1 mg para cada volume aproximado de 100μL de suspensão de VB conforme descrito no anexo 1.
- microplacas de poliestireno de 96 poços.
- ponteiras descartáveis.
- micropipeta multicanal regulável.
- solução de SBF.
- meio caldo Brucela (CB) com 0,005% de azul de bromotimol.
- Inóculo bacteriano de *E. coli* ATCC 25922 em CB, ajustado para concentração de 1 a 2 .10⁷ bactérias por 100μL .

Anexo IV. Morfometria das partículas primárias de VB sem e com 5, 3, 1 mol% de prata com imagens da MEV, e teste paramétrico ANOVA.

Tabela 11- Distribuição de frequências (N=20), média, desvio padrão e mediana de diâmetros (nm) de partículas primárias da superfície de amostras de VB sem (VB0) e com 1, 3, 5mol % de prata.

N	VB0	VB1	VB3	VB5
1	240	180	310	140
2	270	170	230	130
3	310	200	280	230
4	340	150	300	150
5	340	240	300	150
6	340	140	320	180
7	310	240	300	180
8	340	200	370	170
9	350	240	230	170
10	310	230	260	200
11	270	200	190	200
12	300	200	170	190
13	330	230	190	190
14	480	200	200	200
15	270	230	310	180
16	330	190	270	140
17	380	230	270	220
18	300	210	300	220
19	240	200	240	200
20	300	190	280	250
(M \pm dp).10	(32 \pm 5)	(20 \pm 3)	(27 \pm 5)	(18 \pm 3)

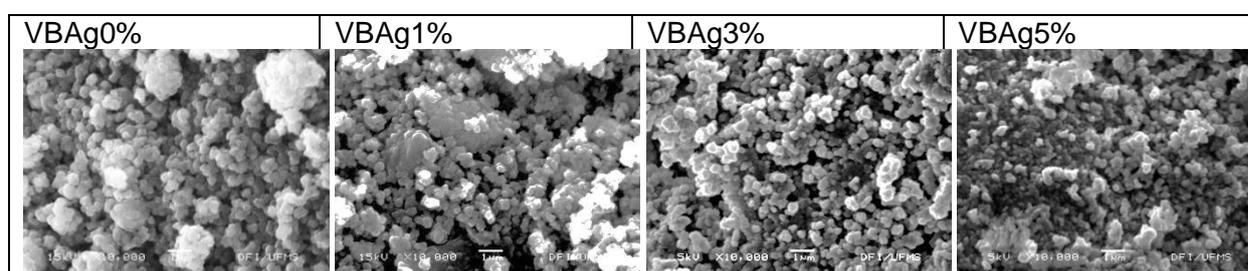


Figura 31 - Fotomicrografia de MEV das áreas dos grãos onde foram feitas as morfometrias das partículas primárias.

Teste paramétrico de ANOVA, para amostras independentes, uma variável (diâmetro) e dados numéricos.

FONTES DE VARIAÇÃO GL SQ QM

Tratamentos	3	22.1 e+04	73.7 e+03
Erro	76	14.0 e+04	18.4 e+02

F = 39.9742
(p) = < 0.0001

Média (VBAg0%) = 317.5000

Média (VBAg1%) = 203.5000

Média (VBAg3%) = 266.0000

Média (VBAg5%) = 184.5000

Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	114.0000	11.8698	< 0.01
Médias (1 a 3) =	51.5000	5.3623	< 0.01
Médias (1 a 4) =	133.0000	13.8481	< 0.01
Médias (2 a 3) =	62.5000	6.5076	< 0.01
Médias (2 a 4) =	19.0000	1.9783	ns
Médias (3 a 4) =	81.5000	8.4859	< 0.01

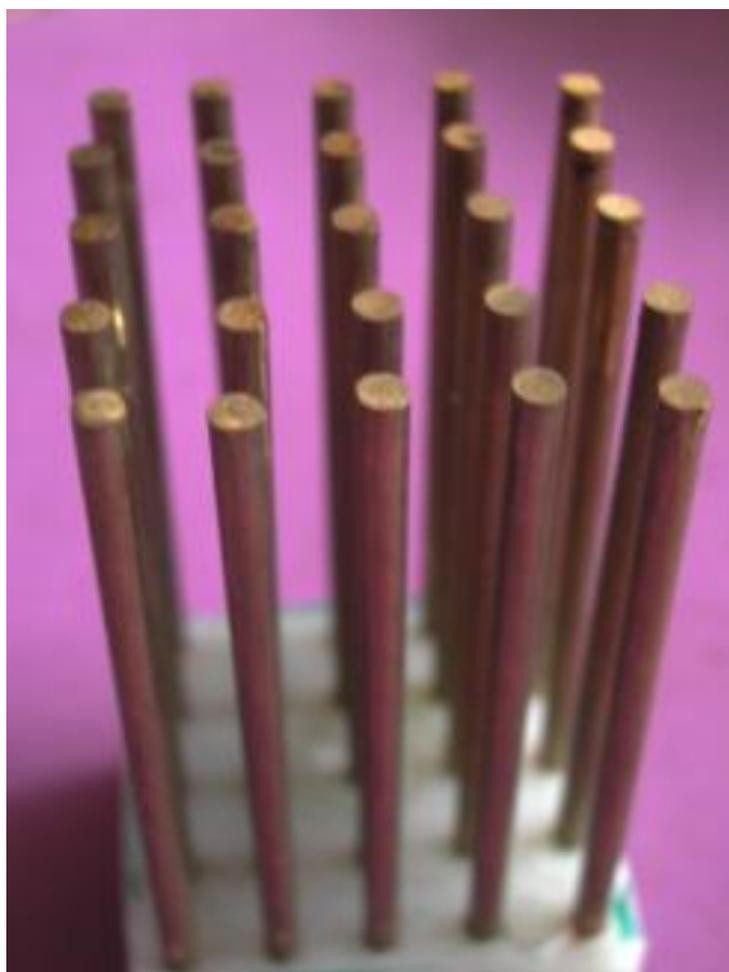
Anexo V.

Figura 32- Replicador de Stirrer de fabricação própria com seção transversal de 3 mm, para múltiplos inócuos na técnica de inibição em ágar.