

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A STAPHYLOCOCCUS AUREUS E ESCHERICHIA COLI DE NOVOS BIOVIDROS À BASE DE LÍTIO

III Congresso Online de Engenharia de Materiais. inscrições encerradas, 4ª edição, de 27/04/2021 a 30/04/2021
ISBN dos Anais: 978-65-89908-00-5

POSSOLLI; Natália Morelli ¹, SOUZA; Hilária Mendes de ², MONTEDO; Oscar Rubem Klegues ³, ANGIOLETTO; Elidio ⁴, ARCARO; Sabrina ⁵

RESUMO

Resumo

Os biovidros têm sido amplamente utilizados em diversas especialidades biomédicas por sua biocompatibilidade e capacidade de regeneração de tecidos. Além disso, a atividade antimicrobiana de biovidros vem sendo investigada nos últimos anos. Este trabalho visa avaliar as propriedades antimicrobianas do biovidro LZS. Para isso, inicialmente, o biovidro foi obtido a partir da fusão das matérias primas (carbonato de lítio, quartzo e silicato de zircônio). O fundido foi vertido em água e as fritas obtidas foram moídas até d50 3 µm. O biovidro foi caracterizado química estrutural e morfologicamente. A atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* foi avaliada. Os biovidros mostraram eficiência na inibição dos dois tipos de microrganismos testados. Pôde-se analisar que em uma concentração de 200mg/L de LZS, houve ausência de unidades formadoras de colônias (UFCs) de *Escherichia coli*, e para *Staphylococcus aureus* já com 100mg/L de LZS, não foi detectada presença de UFC. Portanto, os biovidros antibacterianos produzidos possuem potenciais aplicações em regeneração óssea, em particular para regenerar pequenos defeitos ósseos em situações em que há preocupação com proliferação de bactérias.

Abstract

Bioglasses have been widely used in several biomedical expertise due to their biocompatibility and tissue regeneration capacity. The bioglass antimicrobial activity has been investigated in the last years. This work aims to evaluate the bactericidal properties of the LZS bioglass. Bioglass was obtained from raw materials' fusion (lithium carbonate, quartz, and zirconium silicate). The melt was poured into water, and the fries obtained were ground to d50 3 µm. The bioglass was chemically, structurally, and morphologically characterized. The antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* was evaluated. Bioglass showed efficiency in inhibiting the two tested microorganisms. It was possible to analyze that in a concentration of 200mg/L of LZS, there were no colony-forming units (CFUs) of *Escherichia coli*, and for *Staphylococcus aureus* already with 100mg/L of LZS, no presence of CFU was detected. Therefore,

¹ UNESC, nmpossolli@gmail.com

² UNESC,

³ UNESC,

⁴ UNESC, ean@unesc.net

⁵ UNESC, sarcaro@unesc.net

the antibacterial bioglass produced has potential applications in bone regeneration, remarkably regenerating small bone defects in situations where there is the concern with bacterial proliferation.

Introdução

Os vidros e vitrocerâmicos bioativos são atraentes para medicina e têm sido amplamente investigados nos últimos anos 1-3. O fator principal é que um número crescente de estudos demonstrou que regeneração do tecido ósseo pode ser estimulada por biovidros com diferentes composições químicas^{4, 5}. Dentre os diferentes íons, o lítio tem se destacado recentemente por melhorar o comportamento angiogênico, osteogênico e cementogênico dos biovidros⁶. Além disso, o menor raio iônico do Li⁺ ajuda a melhorar as propriedades mecânicas e reduzir as taxas de dissolução dos biovidros. Somado a aplicação em regeneração óssea, uma atenção especial tem sido dada às propriedades bactericidas potenciais dos vidros bioativos. Os vidros do sistema LZS (Li₂O-ZrO₂-SiO₂) são uma nova classe de biovidros que estão recentemente sendo estudadas⁷⁻⁹. Possuem propriedades mecânicas, elétricas e térmicas interessantes. Nestes materiais, a presença do lítio como íon bioativo pode acelerar deposição de hidroxiapatita, característica da regeneração óssea. Além disso, este mesmo íon pode auxiliar na atividade bactericida do biovidro¹⁰. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antimicrobiana do biovidro LZS frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Metodologia

As matérias-primas silicato de zircônio, carbonato de lítio e quartzo, tiveram suas massas devidamente determinadas em uma balança (Shimadzu BL200, Japão) para obter-se o biovidro de composição/formulação molar 19,58Li₂O.11,10ZrO₂.69,32SiO₂ ou seja, 9,56Li₂O.22,36ZrO₂.68,08SiO₂ (% em massa). A mistura foi homogeneizada em moinho rápido de laboratório (150 rpm, Servitech, CT-242, Brasil) com jarro de porcelana contendo bolas de alumina e então, introduzida em cadinhos de platina, (capacidade de 100 mL) e fundida a 1550 °C ± 5°C, em forno elétrico tipo elevador, (Jung, CPM45, Brasil), por 2 h. Em seguida, o fundido foi vazado em água destilada e as fritas obtidas foram secas em estufa (SP-100/100-A, SP Labor ®, Brasil) a 110 ± 5°C.

Posteriormente, a frita foi submetida a processos de moagens, os quais foram realizados em duas etapas, isto é, em moinho rápido de laboratório (150 rpm, Servitech, CT-242, Brasil) e, então, em moinho giratório com jarro de alumina contendo esferas também de alumina (250 rpm, CE-500/D, Cienlab, Brasil,) até obtenção de pós com 3 µm.

A análise química do biovidro foi realizada por meio da técnica de fluorescência de raios X (FRX, PW 2400, Philips, Holanda) com tubo de 3 kW e alvo de ródio. A fração de lítio foi determinada por absorção atômica (969, Unican, Reino Unido). Para determinar o tamanho de partícula do biovidro após o processo de moagem foi utilizada a difração laser (Mastersizer S, Malvern, Reino Unido). Para determinar a área superficial específica foi utilizado o método BET (Monosorb Surface Area Analyzer MS-13, Quantachrome, EUA). Os materiais foram desgaseificados a 150°C durante 2 h. Para investigar a natureza amorfa do biovidro LZS foi utilizado um difratômetro de raios X (X'Pert, Philips) acoplado a um tubo de cobre (radiação CuK α), potência de 40 kV e 30 mA. As condições de

¹ UNESC, nmpossolli@gmail.com

² UNESC,

³ UNESC,

⁴ UNESC, ean@unesc.net

⁵ UNESC, sarcaro@unesc.net

ensaio foram: passo de 0,02°, tempo de passo de 1s e intervalo de medida em 2θ, de 3 a 80°. Para avaliar características, morfológicas após o processo de moagem do biovidro LZS foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura MEV (JSM-6701F, Jeol, Japão).

Para avaliar o potencial antimicrobiano do biovidro, foram inicialmente ativados microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923TM) e *Escherichia coli* (ATCC® 25922TM). Todos os materiais utilizados no teste foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. Partindo de microrganismos congelados, foram retiradas alíquotas de 50µL e inseridas em um tubo de vidro contendo 5 mL de meio Luria Bertani (LB). O meio LB foi previamente preparado utilizando-se 10g de peptona (Peptone, bacteriological - Himedia), 5g de extrato de levedura (Autolysate of yeast cells - acumedia - NEOGEN) e 5g de NaCl (Cloreto de sódio cristal P.A ACS - Êxodo científica) para 1 litro de solução. Os tubos foram incubados por 24h em estufa a 37°C. Após com o uso de tubos contendo 9mL de salina 0,9% fez-se diluição seriada até 10⁻³. Com a massa de LZS previamente pesada de acordo com as concentrações definidas na Tabela 1, foi inserido 5 mL de meio LB. A seguir tomou-se uma alíquota de 100 µL dos microrganismos da diluição seriada de 10⁻³ e fez-se a inoculação. Os tubos foram incubados por 24h em estufa a 37°C.

Na sequência, foi feita diluição seriada até 10⁻³ de cada tubo de meio LB com material e microrganismo. De cada diluição (10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³) foram pipetados 100 µL e adicionados às placas de Petri com ágar nutriente, em triplicata. As placas ficaram a 37°C por 24h até a contagem das unidades formadoras de colônia. O número de bactérias / mL é obtido pela multiplicação entre o número de colônias e a diluição da amostra, dividindo-se pelo volume adicionado nas placas de Petri. Um esquema ilustrativo do processo é mostrado na Figura 1.

Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise da composição química do biovidro LZS. O biovidro apresenta composição majoritária de 68,02% de SiO₂, 22,20% de ZrO₂ e 8,63% Li₂O. A densidade real medida do biovidro LZS foi 2,70±0,05 g/cm³. O d₅₀ das partículas, medido por difração a laser, foi de 3 µm e a área superficial específica é de 2,5m²/g.

A Figura 2 mostra um difratograma de raios X do pó do biovidro LZS. O difratograma de raios X exibe uma elevação pronunciada do espectro de difração em torno de 23°, característica de fase amorfa.

A morfologia dos pós do biovidro podem ser observadas na Figura 3. Observa-se a presença de partículas com perfil angular e com valores de diâmetro médio variando entre 2 e 8 µm, o que está em bom acordo com as medidas de distribuição de tamanhos de partículas.

O biovidro foi eficiente com os dois microrganismos testados, Para *Escherichia coli* na terceira diluição feita com 100mg/mL de LZS, na qual percebeu-se inibição de crescimento, foram contadas 2,57 UFC/mL (média aritmética dos resultados da triplicata) e ausência de UFCs foi percebida

¹ UNESC, nmpossolli@gmail.com

² UNESC,

³ UNESC,

⁴ UNESC, ean@unesc.net

⁵ UNESC, sarcaro@unesc.net

com 200 mg/mL. O teste com *Staphylococcus aureus* utilizando concentrações de 100, 150 e 200 mg/mL de LZS apresentaram ausência de UFC. Crescimento incontável de colônias ocorreu com 25 e 50 mg/mL. A partir dos resultados, pôde-se determinar a concentração inibitória mínima (CIM), na qual há inibição de crescimento de microrganismo, não necessariamente ausência do mesmo, e a concentração bactericida mínima (CBM), cujo crescimento do microrganismo é impedido totalmente, apresentadas na tabela 3. Portanto, a CIM do LZS para *Staphylococcus aureus* não pôde ser definida, visto que não foi possível realizar a contagem de UFC em nenhuma placa de Petri (UFC incontáveis ou ausentes).

Conclusões

O biovidro produzido de composição 68,02% de SiO₂, 22,20% de ZrO₂ e 8,63% Li₂O apresentou eficiência na inibição dos dois tipos de microrganismos testados. Na concentração de 200mg /L de LZS, não houve unidades formadoras de colônias (UFC) de *Escherichia coli*, e para *Staphylococcus aureus* já com 100mg / L de LZS, não foi detectada a presença de UFC. Deste modo, os biovidros antibacterianos produzidos possuem potenciais aplicações em regeneração óssea, em particular para regenerar pequenos defeitos ósseos em situações em que há preocupação com proliferação de bactérias.

Referências Bibliográficas

1. De Aza PN, De Aza AH, Pena P, De Aza S. Bioactive glasses and glass-ceramics. Bol la Soc Esp Ceram y Vidr. 2007;46(2):45-55. [https://doi.org/10.1016/0267-6605\(93\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0267-6605(93)90038-9)
2. Hench LL. The story of Bioglass®. J. Mater. Sci. Mater. Med. 2006 <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>
3. Prasad S, Kumar Vyas V, Ershad, Pyare R. Crystallization and mechanical properties of (45S5-HA) biocomposite for biomedical implantation. Ceram - Silikaty. 2017;61(4):378-384. <https://doi.org/10.13168/cs.2017.0039>
4. Hench LL. The future of bioactive ceramics. J Mater Sci Mater Med. 2015;26(2). <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5425-3>
5. Rahaman MN, Liu X, Bal BS, Day DE, Bi L, Bonewald LF. Bioactive glass in bone tissue engineering. Ceram Trans. 2012;237(6):73-82. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.016>
6. Verrier S, Blaker JJ, Maquet V, Hench LL, Boccaccini AR. PDLLA/Bioglass® composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: An in vitro cell biology assessment. Biomaterials. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.081>
7. Arcaro S, Moreno B, Chinarro E, et al. Properties of LZS/nanoAl₂O₃ glass-ceramic composites. J Alloys Compd. 2017;710. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.03.299>
8. Arcaro S, Nieto M, Moreno R, International A de O-C, 2016 U. The influence of nano alumina additions on the coefficient of thermal expansion of a LZS glass-ceramic composition. Ceram Int. 2016;42(7):8620-8626. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.02.093>
9. Arcaro S, Isabel Nieto M, Rodrigues Neto JB, Novaes de Oliveira AP, Moreno R. Al₂O₃ Nanoparticulate LZS Glass-Ceramic Matrix Composites for Production of Multilayered Materials. J Am Ceram Soc. 2016.

¹ UNESC, nmpossolli@gmail.com

² UNESC,

³ UNESC,

⁴ UNESC, ean@unesc.net

⁵ UNESC, sarcaro@unesc.net

<https://doi.org/10.1111/jace.14418>

10. Passos TF, Souza MT, Zanotto ED, de Souza CWO. Bactericidal activity and biofilm inhibition of F18 bioactive glass against *Staphylococcus aureus*. *Mater Sci Eng C*. 2021;118:111475. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111475>

Agradecimentos

Os autores são muito gratos a Universidade do Extremo Sul Catarinense (PIBIC/UNESC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; process n. 161197/2020-5; 307761/2019-3), por apoiar este trabalho.

PALAVRAS-CHAVE: LZS, Biovidro, Antimicrobiano, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

¹ UNESC, nmpossolli@gmail.com

² UNESC,

³ UNESC,

⁴ UNESC, ean@unesc.net

⁵ UNESC, sarcaro@unesc.net