UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

DANIELLA MAIA MARQUES

**Biomateriais com aplicabilidade na ortopedia: avanços e desafios
na área da infectologia**

Ribeirão Preto
2018

DANIELLA MAIA MARQUES

**Biomateriais com aplicabilidade na ortopedia: avanços e desafios
na área da infectologia**

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre de Ciências, Programa de Pós-Graduação Enfermagem Fundamental.

Linha de pesquisa: Fundamentação teórica, metodológica e tecnológica do processo de cuidar.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Watanabe.

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Marques, Daniella Maia

Biomateriais com aplicabilidade na ortopedia: avanços e desafios na área da infectologia

76 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental.

Orientador: Evandro Watanabe

1. Artroplastia de quadril. 2. Biofilmes. 3. Biovidro F18. 4. *Candida albicans*. 5. Microscopia de fluorescência. 6. Prótese de quadril. 7. *Staphylococcus epidermidis*.

MARQUES, Daniella Maia

Biomateriais com aplicabilidade na ortopedia: avanços e desafios na área da infectologia. 2018. 76 f.

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação Enfermagem Fundamental.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Esta pesquisa recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio da concessão da bolsa de Mestrado.

DEDICATÓRIA

Ao Pai Celestial e Jesus Cristo que sempre me dão força para fazer todas as coisas que eu preciso!

Aos meus pais, Alexandre César de Farias Marques e Artemisa Rodrigues Maia Marques, que me dão o suporte e apoio para meu crescimento pessoal.

Às minhas irmãs, Alessandra Maia Marques Martinez Perez e Rosana Maia Marques Ferreira, que sempre foram bons exemplos para mim.

Aos meus cunhados, Caio Frederico Fonseca Martinez Perez e Murilo Alexandre Ferreira, que chegaram para alegrar minha família.

Às minhas lindas e amadas sobrinhas, Helena Marques Martinez Perez e Luísa Marques Martinez Perez, que são uma luz para mim.

Aos meus avós Pedro Jerônimo Rodrigues (*in memoriam*), Alice Maia Rodrigues, José de Souza Marques (*in memoriam*) e Dulcinéa Maria de Farias Marques, pois graças aos seus sacrifícios eu tenho uma família com princípios sólidos de integridade e amor.

À Eduvirgis, *in memoriam*, uma cliente muito especial que me inspirou a querer pesquisar na área de infecção em ortopedia, para que outras pessoas não precisem passar por aquilo que ela passou.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Evandro Watanabe por me orientar com paciência, dedicação e por me ajudar no meu crescimento acadêmico.

À Profa. Dra. Denise de Andrade por me acolher e orientar desde o início do meu mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da minha bolsa de mestrado.

À Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP (EERP-USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental da EERP-USP pela infraestrutura e todo o suporte no desenvolvimento da minha dissertação de mestrado.

À Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos e à Profa. Dr. Cláudia Helena Lovato da Silva, responsáveis pelo laboratório de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, por disponibilizarem as instalações e equipamentos para realização experimental desta pesquisa.

Aos integrantes do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da EERP-USP por todos os ensinamentos compartilhados.

À Viviane de Cássia Oliveira pelo tempo, paciência e disponibilidade no auxílio dos experimentos microbiológicos.

À Rachel Maciel Monteiro e à Dra. Lissandra Chaves de Sousa Santos pela ajuda em diversas ocasiões experimentais e de treinamento laboratorial.

À Profa. Dra. Paula Regina de Souza Hermann que, com sua experiência acadêmica, auxiliou, cientificamente, o meu percurso.

Ao Lucas Lazarini Bim, ao Felipe Lazarini Bim, à Marinila Buzanelo Machado, ao Pedro Castania Amadio Domingues e à Gisele Taís Roldão de Souza, que colaboraram para a solução de diversos desafios técnico-científicos do meu mestrado.

Ao Álvaro Francisco Lopes de Sousa e ao Artur Acelino Francisco Luz Queiroz pela disponibilidade em responder minhas dúvidas durante a minha jornada na pós-graduação.

À Dra. Marina Trevelin Souza e a todos os integrantes do Laboratório de Materiais Vítreos do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, que colaboraram para a confecção dos biomateriais, bem como esclarecimentos das dúvidas relacionadas ao biovidro F18.

À Dra. Ana Paula Macedo e ao Ricardo José Fagundes pelos auxílios laboratoriais na realização desta pesquisa.

À Miyeko Hayashida e ao Jonas Bodini Alonso pela realização da análise estatística dos meus dados.

Às minhas amigas Sara Soares dos Santos, Mirella Castelhana Souza, Natássia Condilo Pitta, Maria Rita Santana e Ana Paula Gobbo Motta pelas conversas e amizade, que tornaram esse período em minha vida mais feliz e divertido.

Aos meus amigos que de alguma forma colaboraram para a realização desta etapa em minha vida.

RESUMO

MARQUES, Daniella Maia. **Biomateriais com aplicabilidade na ortopedia: avanços e desafios na área da infectologia**. 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem Fundamental) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O controle na formação do biofilme em implantes e próteses ortopédicas continua sendo um dos grandes desafios acerca da infecção relacionada aos dispositivos na área da saúde. O objetivo desta pesquisa foi investigar biomateriais com aplicabilidade na ortopedia, visando os avanços e enfrentamentos dos desafios na área da infectologia. Uma revisão integrativa foi realizada a respeito da formação de biofilme em biomateriais de próteses de quadril com a finalidade de contribuir com as medidas de prevenção e controle aos agravos infecciosos. Além disso, a formação *in vitro* do biofilme em função dos biomateriais (titânio e titânio revestido com biovidro F18), microrganismos (*Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*) e tempos de incubação (2, 4 e 8 horas) foi avaliada por microscopia de fluorescência. A revisão integrativa foi realizada no portal *PubMed* da *National Library of Medicine*, bem como nas bases *Cochrane*, *Embase*, *Web of Science*, *CINAHL* e *LILACS* com a inclusão de estudos primários sobre a temática, publicados online até novembro de 2017, em português, inglês e espanhol. Na fase experimental / laboratorial, biofilmes de *S. epidermidis* (ATCC 12228) e *C. albicans* (ATCC 90028) foram formados em corpos de prova de titânio e titânio revestido com biovidro F18 após 2, 4 e 8 horas de incubação a 37°C sob agitação orbital. As áreas das imagens dos corpos de prova, em porcentagem, recobertas com biofilme (células vivas) foram avaliadas por microscopia de fluorescência. Os dados coletados foram submetidos à análise estatística empregando-se os testes de normalidade *Shapiro Wilk*, *U* de *Mann-Whitney* e *t* de *Student* por meio do software *IBM SPSS Statistics* (versão 25) e nível de significância $\alpha=5\%$. Na revisão integrativa, os resultados demonstraram que dos 16 estudos primários, 81,25% eram pesquisas experimentais *in vitro* e que novos biomateriais foram desenvolvidos para prevenir a formação de biofilme. Com relação à fase experimental / laboratorial, houve menor formação de biofilme por *S. epidermidis* e *C. albicans* ($p<0,001$) no titânio revestido com biovidro F18 do que no titânio, após 8 horas de incubação. Entretanto, houve maior formação de biofilme por *S. epidermidis* e *C. albicans* após 8 horas do que em 2 horas de incubação, tanto no titânio quanto no titânio revestido com biovidro F18 ($p<0,05$). Em suma, a revista da literatura mencionou o desenvolvimento de biomateriais novos para prevenir a formação de biofilme. Na fase laboratorial / experimental, o titânio revestido com biovidro F18 apresentou atividade antibiofilme em comparação com o titânio, e os tempos de incubação de 2 para 8 horas aumentaram a formação de biofilme em ambos os biomateriais. Ainda, pesquisas futuras acerca do biovidro F18 fundamentadas nos aspectos físico-químicos, bioquímicos e microbiológicos são importantes para a elucidação dos mecanismos de ação relacionados ao controle dos biofilmes.

Palavras-chave: Artroplastia de quadril. Biofilmes. Biovidro F18. *Candida albicans*. Microscopia de fluorescência. Prótese de quadril. *Staphylococcus epidermidis*.

ABSTRACT

MARQUES, Daniella Maia. **Biomaterials with applicability in orthopedics: advances and challenges in the infectology area.** 2018. 76 f. Dissertation (Master in Science) – School of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The control of biofilm formation on implants and orthopedic prostheses still is one of the major challenges concerning infection related to devices in the health field. The objective of this research was to investigate biomaterials with applicability in orthopedics, aiming for advances and facing challenges in the infectology area. An integrative review was performed regarding biofilm formation on hip prosthesis biomaterials in order to contribute to the preventive and infection control measures. Moreover, the *in vitro* biofilm formation according to biomaterials (titanium and titanium coated with F18 bioglass), microorganisms (*Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*) and incubation times (2, 4 and 8 hours) was evaluated by fluorescence microscopy. The integrative review was performed on *PubMed* portal from *National Library of Medicine* as well as on *Cochrane*, *Embase*, *Web of Science*, *CINAHL* and *LILACS* databases with the inclusion of primary studies about the topic, published online up until November 2017, in Portuguese, English and Spanish. In the experimental / laboratory step, *S. epidermidis* (ATCC 12228) and *C. albicans* (ATCC 90028) biofilms were formed on proof bodies of titanium and titanium coated with F18 bioglass after 2, 4 and 8 hours of incubation at 37°C under orbital shaking. The image areas of proof bodies, in percentage, coated with biofilm (living cells) were evaluated by fluorescence microscopy. The data collected were submitted to statistical analysis using normality tests *Shapiro Wilk*, *U* from *Mann-Whitney* and *t* from *Student* through *IBM SPSS Statistics* (version 25) software and significance level $\alpha=5\%$. In the integrative review, the results showed that among 16 primary studies, 81.25% were *in vitro* experimental studies and that new biomaterials were developed to prevent biofilm formation. Regarding experimental / laboratory step, there was less biofilm formation by *S. epidermidis* and *C. albicans* ($p<0.001$) on titanium coated with F18 bioglass than on titanium, after 8 hours of incubation. However, there was more biofilm formation by *S. epidermidis* and *C. albicans* after 8 hours than in 2 hours of incubation, both on titanium and on titanium coated with F18 bioglass ($p<0.05$). In sum, the literature review mentioned the development of new biomaterials to prevent biofilm formation. In laboratory / experimental step, titanium coated with F18 bioglass presented antibiofilm activity in comparison with titanium, and the incubation times of 2 to 8 hours increased biofilm formation on both materials. Besides, future studies about F18 bioglass based on physicochemical, biochemical and microbiological aspects are important for the elucidation of action mechanisms related to biofilms control.

Keywords: Arthroplasty, replacement, hip. Biofilms. *Candida albicans*. F18 bioactive glass. Hip prosthesis. Microscopy, fluorescence. *Staphylococcus epidermidis*.

RESUMEN

MARQUES, Daniella Maia. **Biomateriales con aplicabilidad en la ortopedia: avances y retos en el área de la infectología.** 2018. 76 h. Disertación (Maestría en Enfermería Fundamental) – Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

El control en la formación de la biopelícula en implantes y prótesis ortopédicas sigue siendo uno de los grandes retos sobre la infección relacionada con los dispositivos en el área de la salud. El objetivo de esta investigación fue investigar biomateriales con aplicabilidad en la ortopedia, mirando a los avances y enfrentamientos de los retos en el área de la infectología. Una revisión integradora fue efectuada con respecto a la formación de biopelícula en biomateriales de prótesis de cadera con la finalidad de contribuir con las medidas de prevención y control a los agravios infecciosos. Además, la formación *in vitro* de la biopelícula en función de los biomateriales (titanio y titanio recubierto con vidrio bioactivo F18), microorganismos (*Staphylococcus epidermidis* y *Candida albicans*) y tiempos de incubación (2, 4 y 8 horas) fue evaluada a través de microscopía de fluorescencia. La revisión integradora fue efectuada en el portal PubMed de la *National Library of Medicine*, así como en las bases *Cochrane*, *Embase*, *Web of Science*, *CINAHL* y *LILACS*, con la inclusión de los estudios primarios sobre la temática, publicados en línea hasta noviembre de 2017, en portugués, Inglés y español. En la fase experimental/de laboratorio, las biopelículas por *S. epidermidis* (ATCC 12228) y *C. albicans* (ATCC 90028) se formaron en cuerpos de prueba de titanio y titanio recubierto con vidrio bioactivo F18 después de 2, 4 y 8 horas de incubación a 37°C bajo agitación orbital. Las áreas de las imágenes de los cuerpos de prueba, en porcentaje, recubiertas con biopelícula (células vivas) fueron evaluadas a través de microscopía de fluorescencia. Los datos recogidos fueron sometidos al análisis estadístico, empleando las pruebas de normalidad *Shapiro Wilk*, *U* de *Mann-Whitney* y *t* de *Student* por medio del programa informático IBM SPSS Statistics (versión 25) y nivel de significación $\alpha=5\%$. En la revisión integradora, los resultados demostraron que de los 16 estudios primarios, el 81,25% eran investigaciones experimentales *in vitro* y que nuevos biomateriales fueron desarrollados para prevenir la formación de la biopelícula. Con respecto a la fase experimental/de laboratorio, hubo menor formación de biopelícula por *S. epidermidis* y *C. albicans* ($p<0,001$) en el titanio recubierto con vidrio bioactivo F18 que en el titanio, después de 8 horas de incubación. Sin embargo, hubo mayor formación de biopelícula por *S. epidermidis* y *C. albicans* después de 8 horas que en 2 horas de incubación, tanto en el titanio como en el titanio recubierto con vidrio bioactivo F18 ($p<0,05$). En síntesis, la revista de la literatura mencionó el desarrollo de biomateriales nuevos para prevenir la formación de biopelícula. En la fase de laboratorio/experimental, el titanio recubierto con vidrio bioactivo F18 presentó actividad antibiopelícula en comparación con el titanio, y los tiempos de incubación de 2 a 8 horas aumentaron la formación de biopelícula en ambos biomateriales. Además, investigaciones futuras sobre el vidrio bioactivo F18 fundamentadas en los aspectos físico-químicos, bioquímicos y microbiológicos son importantes para la aclaración de los mecanismos de acción relacionados con el control de las biopelículas.

Palabras clave: Artroplastia de reemplazo de cadera. Biopelículas. *Candida albicans*. Microscopía fluorescente. Prótesis de cadera. *Staphylococcus epidermidis*. Vidrio bioactivo F18.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Biomateriais e a Formação de Biofilme.....	12
1.2 Biovidro.....	14
2 REVISTA DA LITERATURA.....	17
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Justificativa da Relevância do Estudo.....	25
3.2 Objetivo Geral.....	25
3.3 Objetivos Específicos.....	25
3.3.1 Revisão Integrativa.....	25
3.3.2 Experimental / Laboratorial.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Fase I – Revisão Integrativa.....	27
4.2 Fase II – Experimental / Laboratorial.....	29
4.2.1 Local da Pesquisa.....	29
4.2.2 Delineamento da Pesquisa.....	29
4.2.3 Procedimentos Éticos em Pesquisa.....	30
4.2.4 Confeção dos Corpos de Prova.....	30
4.2.5 Esterilização dos Corpos de Prova.....	31
4.2.6 Processamento Microbiológico.....	31
4.2.6.1 Padronização dos Inóculos Microbianos.....	32
4.2.6.2 Formação dos Biofilmes.....	32
4.2.6.3 Avaliação dos Biofilmes por Microscopia de Fluorescência.....	33
4.2.7 Análise dos Dados.....	36
5 RESULTADOS.....	37
5.1 Fase I – Revisão Integrativa.....	37
5.2 Fase II – Experimental – Laboratorial.....	37
5.2.1 Comparação da Formação dos Biofilmes nos Biomateriais.....	37
5.2.2 Comparação da Formação dos Biofilmes nos Tempos de Incubação.....	46
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICES.....	59

1 INTRODUÇÃO

A artroplastia de quadril proporcionou qualidade de vida, mobilidade e alívio da dor em indivíduos com doenças osteoarticulares (LAMAGNI, 2014). Por outro lado, a elevada ocorrência de cirurgias para revisão é um fator preocupante, mesmo com o aperfeiçoamento das técnicas da cirurgia e avanço na composição e desenhos das próteses de quadril (BOZIC et al., 2015).

Infecção, deslocamento e afrouxamento são as complicações mais recorrentes. Elas restringem os resultados clínicos da artroplastia e diminuem sua durabilidade (BOZIC et al., 2009). Além disso, a infecção relacionada ao implante é um difícil desafio enfrentado pela equipe multiprofissional e pelo cliente, sendo descrita a aderência microbiana à superfície da prótese como a primeira etapa na patogênese dessas infecções (HETRICK; SCHOENFISCH, 2006; RIBEIRO; MONTEIRO; FERRAZ, 2010, 2012).

As infecções relacionadas ao implante têm início pela aderência microbiana seguida da formação de biofilme, o qual dificulta o diagnóstico microbiológico, bem como seu controle (COSTERTON, 2005; DEL POZO; PATEL, 2009). O biofilme é um aglomerado microbiano estruturado numa matriz polimérica autoproduzida que tem a capacidade de aderir às superfícies bióticas e abióticas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

As primeiras seis horas após a cirurgia são conhecidas como a fase crítica para prevenir a infecção, pois nesse período os microrganismos permanecem metabolicamente inativos (POELSTRA et al., 2002). Depois desse período, o biofilme poderá estar relacionado a infecções recorrentes, pois apresenta elevada resistência antimicrobiana, sendo assim um obstáculo para a reabilitação pós-alta do cliente (KUREK et al., 2011).

Diante do elucidado, é mais vantajoso prevenir a aderência microbiana nos estágios iniciais do que tentar sem sucesso eliminar o biofilme, visto que depois que ele é formado, os microrganismos estão organizados em uma estrutura mais complexa e resistente aos agentes físicos e químicos (LI et al., 2008).

1.1 Biomateriais e a Formação de Biofilme

Pesquisas experimentais evidenciaram que biomateriais distintos permitem

processos diferentes de aderência microbiana e subsequente formação de biofilme, o que explicaria a substituição de componentes em determinados casos de infecção aguda de prótese articular.

O titânio (Ti), que é considerado um material inerte, apresentou aplicabilidade na área da saúde desde meados do século XX. As ligas de Ti são utilizadas em larga escala como substitutos ósseos, materiais implantáveis no corpo humano, placas e parafusos, bem como em cirurgias reconstrutivas (VAN NOORT, 1987).

Experimento com ligas de Ti demonstrou que elas têm menor suscetibilidade à infecção comparadas às ligas de cobalto-cromo (CoCr) – (CORDERO; MUNUERA; FOLGUEIRA, 1996). Ainda, Cordero, Munuera e Folgueira (1994) verificaram que ligas de Ti polidas apresentaram menor probabilidade de infecção do que ligas de Ti rugosas. Destaca-se que os resultados de Lass et al. (2014) ratificaram a baixa aderência bacteriana ao Ti. Por outro lado, pesquisa realizada por Petty et al. (1985) revelou que o polimetilmetacrilato (PMMA) apresentou maior aderência microbiana em relação às ligas de CoCr, polietileno (PE) e aço inoxidável.

Pesquisa clínica realizada por Lass et al. (2014) quantificou a carga microbiana aderida aos componentes individuais da prótese total de quadril de diferentes biomateriais em clientes com infecção. Os componentes de prótese de quadril eram constituídos de: titânio puro, titânio-alumínio-nióbio, polietileno e cerâmica. As cargas microbianas nos revestimentos foram de: 1.805 unidades formadoras de colônias (UFC) – (titânio-alumínio-nióbio - Ti6Al7Nb), 5.007 UFC (Ti puro), 5.746 UFC (cerâmica) e 10.180 UFC (PE). Além disso, *Staphylococcus epidermidis* (10.892 UFC), *Staphylococcus capitis* (3.147 UFC) e *Staphylococcus aureus* (2.072 UFC) apresentaram as maiores contagens de UFC.

Gómez-Barrena et al. (2012) mostraram que *S. epidermidis*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram as bactérias mais frequentemente isoladas nas próteses articulares de quadril e joelho.

Em 2012, Holinka et al. relataram o maior número de UFC, bem como de componentes com aderência bacteriana em próteses totais de joelho por *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente.

Com relação aos componentes utilizados nas artroplastias articulares, Gómez-Barrena et al. (2012) evidenciaram que houve maior contagem de UFC nas próteses totais de quadril do que nas de joelho.

1.2 Biovidro

O avanço na ciência e tecnologia resultou na terceira geração de biomateriais. Entre suas propriedades, ressalta-se a da ativação de genes, estimulação das respostas celulares e moleculares específicas e a regeneração dos tecidos vivos (HENCH; POLAK, 2002).

O biovidro, biomaterial sintético de terceira geração, apresentou o melhor resultado clínico na regeneração óssea. Hench, na década de 1960, desenvolveu o primeiro biovidro denominado *Bioglass*[®] 45S5, que é derivado da fusão dos componentes: 46,1% de SiO₂, 24,4% de Na₂O, 26,9% de CaO e 2,6% de P₂O₅, em mol. Esse biovidro é apontado como o padrão ouro dos materiais bioativos, visto que apresenta o maior índice de bioatividade (IB = 12,5). Ademais, diversas formulações de biovidro foram produzidas após o desenvolvimento do *Bioglass*[®] 45S5 (HENCH, 2006, 2013; HOPPE; GULDAL; BOCCACCINI, 2011; JONES, 2013; KAUR et al., 2014; RAHAMAN et al., 2011; XYNOS et al., 2000).

Quando o biovidro entra em contato com fluidos corporais, sofre reações que levam à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) em sua superfície. O desenvolvimento dessa camada de HCA no biomaterial é uma característica almejada em todos os materiais inorgânicos na substituição óssea, implantes ortopédicos e reparação de tecido ósseo. A camada de HCA é uma condição vista como necessária para a formação de uma ligação química entre o osso e o biomaterial (HENCH, 2013).

A osteogênese, osteoindução e osteocondução são mecanismos fundamentais na regeneração do tecido ósseo. A osteogênese acontece quando o material de enxerto é implantado com osteoblastos (células formadoras de osso) ou células precursoras dos osteoblastos para gerar centros de formação óssea. A osteoindução é a característica de estimular a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos. E a osteocondução ocorre quando o biomaterial de enxerto serve como arcabouço para a migração de células precursoras dos osteoblastos (LINDHE, 1999).

Segundo Jones et al. (2007), o material se ligará mais rápido ao osso se a taxa de formação de HCA for maior, aumentando a sua osteocondutividade. E o *Bioglass*[®] 45S5 apresenta tanto osteocondução como osteoindução. Oonishi et al. (1997) realizaram uma pesquisa *in vivo* que mostrou similaridade na propriedade de

regeneração óssea entre a hidroxiapatita (HA) e o biovidro. Entretanto, acerca dos períodos, o biovidro e a HA proporcionaram regeneração óssea total após duas e 12 semanas, respectivamente.

Com relação às desvantagens do biovidro, destacam-se as baixas resistências mecânica e à fratura, limitantes para algumas aplicabilidades clínicas (BLACK; HASTINGS, 1998).

Assim, apesar do *Bioglass*[®] 45S5 demonstrar alta bioatividade (característica de promover a osteocondução), outras formulações de biovidro foram desenvolvidas também com capacidade de resistência mecânica (HOLAND; BEALL, 2012).

O biovidro denominado Biosilicato[®] (BI) - (PI 0300644-1), o qual pertence ao sistema $\text{SiO}_2.\text{P}_2\text{O}_5.\text{Na}_2\text{O}.\text{CaO}$, 100% cristalino, foi desenvolvido no Laboratório de Materiais Vítreos do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (LaMaV – DEMa/UFSCar). De acordo com a literatura, o BI apresenta algumas propriedades importantes para a regeneração do tecido ósseo: é osteocondutor, osteoindutor, altamente bioativo, não é genotóxico nem citotóxico, além de apresentar atividades antibacterianas. É importante ressaltar que a bioatividade do BI *in vitro* e *in vivo* é comparável à do *Bioglass*[®] 45S5 (AZENHA; PEITL; BARROS, 2010; CROVACE et al., 2016; MOURA et al., 2007; RORIZ et al., 2010).

Martins et al. (2011) analisaram a atividade antimicrobiana do BI contra microrganismos anaeróbios facultativos, microaerófilos e anaeróbios estritos utilizando as seguintes técnicas: difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e contato direto. Dos vinte microrganismos utilizados na pesquisa, 14 foram inibidos por BI ao realizarem a técnica de difusão em ágar, sendo que os halos de inibição variaram de 9 ± 1 a 22 ± 2 mm.

A CIM do BI variou de $\leq 2,5$ a 20mg/mL. Os microrganismos mais resistentes ao biomaterial foram *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*. Por outro lado, os melhores resultados de CIM foram relatados para o *Enterococcus faecalis*, a *Candida albicans* e a *Kocuria rhizophila* (MARTINS et al., 2011).

A terceira técnica revelou atividade antimicrobiana do BI contra 19 microrganismos, porém não contra o *Staphylococcus aureus* (MARTINS et al., 2011).

O BI foi um precursor do biovidro F18, biomaterial que também foi desenvolvido no LaMaV – DEMa/UFSCar. O biovidro F18 é mais versátil devido a sua fabricação na forma de fibras, peças tridimensionais (3D) e *scaffolds* (estruturas extremamente porosas que servem de suporte para enxertos ósseos). Porém, a atividade antibiofilme deste biomaterial ainda é uma lacuna na literatura (SOUZA et al., 2017).

Então, a articulação das ciências básicas com a área da saúde pode propiciar o avanço na biofabricação de estruturas que possam auxiliar as intervenções clínicas e terapêuticas com aplicabilidade simultânea em diversos contextos da ortopedia, infectologia dentre outras. Assim, esta proposta visa aglutinar diversos domínios do conhecimento em biomateriais com a finalidade de impactar nas medidas de prevenção e controle dos agravos infecciosos na ortopedia.

2. REVISTA DA LITERATURA

Esta revista da literatura foi desenvolvida a partir dos artigos incluídos na revisão integrativa que objetivou responder a seguinte questão: “quais são as evidências científicas a respeito da prevenção da formação de biofilme em biomateriais de próteses de quadril?” (Apêndice A). Além disso, dois artigos acerca do biovidro foram incluídos e selecionados após uma busca realizada no portal *PubMed* da *National Library of Medicine* em dezembro de 2017.

Ramage et al. (2003) avaliaram a formação de biofilme *in vitro* por *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* em três ligas de titânio (LT) e em cimento ósseo de polimetilmetacrilato (PMMA) para determinar se havia correlação entre a superfície do biomaterial e a formação do biofilme. As LT apresentavam rugosidades diferentes, as quais foram baseadas nas distintas áreas da superfície do componente femoral da prótese de quadril. A LT2 era a mais polida (menor rugosidade), seguida da LT1 e da LT3. Após 18 horas de incubação, a aderência do biofilme por *S. epidermidis* na LT1 foi maior do que nos outros três biomateriais. De maneira semelhante, a aderência de *P. acnes* foi maior na LT1 do que nos outros biomateriais decorrido o período de incubação de 8 e 18 horas. Entretanto, não houve diferença na aderência de *S. aureus* nas LT. Assim, a formação de biofilme nas LT foi influenciada pela rugosidade do material e pela cepa bacteriana.

Em 2004, Parvizi et al. desenvolveram uma tecnologia capaz de ligar de forma covalente a vancomicina à superfície do titânio (Ti), o qual não interferiu na atividade bactericida do antibiótico. Para a avaliação da manutenção das propriedades da vancomicina ligada ao Ti - (VAN-Ti), o corante *Live/Dead BacLight* foi empregado para a análise da viabilidade de *S. aureus* em cultura estática. Além disso, a carga bacteriana na superfície de VAN-Ti foi determinada pela quantificação do número de unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados mostraram que no controle (Ti sem vancomicina) houve o predomínio de bactérias coradas em verde (células vivas), no entanto na VAN-Ti houve predomínio de bactérias coradas em vermelhas (células mortas). Ainda, a carga bacteriana foi reduzida em 80% após 1 hora de incubação. Em conclusão, essa tecnologia pode permitir o

desenvolvimento de implantes com atividade antimicrobiana, visando o controle da formação de biofilme e da infecção relacionada ao implante.

Tomáš, Nachtnebl e Otiepka (2007) avaliaram clinicamente a relação entre o biomaterial utilizado e o desenvolvimento de infecção. A pesquisa foi desenvolvida no período de 1986 a 2004, e comparou 91 clientes que apresentaram infecção relacionada ao implante (prótese total de quadril) com 7432 clientes que não. Os clientes com próteses cimentadas apresentaram maior susceptibilidade à infecção do que aqueles com próteses não cimentadas e híbridas. Outro resultado revelado foi que os implantes de aço e os de Ti com coríndon foram mais propensos à infecção do que os implantes com revestimento plasmático de Ti e os de aço com Ti. Então, os diferentes tipos de biomateriais podem influenciar na infecção relacionada ao implante.

Em 2009, Hosman et al. analisaram a atividade dos íons de cobalto e cromo (Co-Cr) no crescimento bacteriano e na formação de biofilme. As concentrações dos íons Co-Cr foram de: 2/0,93; 20/9,3; 20.000/9.300; 200.000/93.000µg/L. As concentrações de 2/0,93 e 20/9,3µg/L foram incluídas na pesquisa, visto que a literatura revela essas concentrações séricas de Co presentes nos clientes. Ademais, as concentrações de Cr foram calculadas de acordo com as de Co-Cr obtidas da maioria das próteses metal-metal na Europa (aproximadamente 61% de Co e 29% de Cr). As concentrações de 20.000/9.300 e 200.000/93.000µg/L de íons de Co-Cr foram incluídas nesta pesquisa, provavelmente, em virtude dos valores (íons de Co-Cr) nos fluidos sinoviais serem superiores aos presentes na corrente sanguínea. Cinco cepas de *Staphylococcus aureus* e oito de *Staphylococcus coagulase-negativa* foram utilizadas neste experimento. Como resultado, observou-se que o crescimento bacteriano na forma planctônica e desenvolvimento do biofilme foram reduzidos nas concentrações de íons de Co-Cr a 200.000/93.000µg/L. Em suma, os íons de Co-Cr podem interferir na formação de biofilme e, subsequentemente, na infecção relacionada às artroplastias articulares.

Henriques et al. (2009) avaliaram a citotoxicidade e a formação de biofilme por *Staphylococcus epidermidis* em revestimentos com diferentes concentrações de titânio, silício, carbono, oxigênio e nitrogênio (Ti-Si-C-O-N). O biofilme foi formado

sob agitação orbital (100rpm) a 37°C por 48 horas. A biomassa total do biofilme foi determinada por coloração com cristal violeta. A amostra com a maior porcentagem de Ti apresentou a maior citotoxicidade e a menor quantidade de biomassa de biofilme. Em conclusão, esta pesquisa demonstrou a viabilidade do emprego de revestimentos de Ti-Si-C-O-N em dispositivos médicos com propriedades biológicas (baixa citotoxicidade e atividade antibiofilme).

Lewis et al. (2010) mensuraram o crescimento de biofilme em revestimentos de diamante nanocristalino em um ambiente de perfusão contínua. O reator de biofilme CDC foi utilizado para determinar a formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* no revestimento de diamante nanocristalino em comparação com o aço inoxidável (controle). Verificou-se que o revestimento de diamante nanocristalino não impediu o desenvolvimento do biofilme por *P. fluorescens* após 24 horas de incubação e perfusão contínua. Assim, revestimentos de diamante nanocristalino com agentes antimicrobiano e/ou antibiofilme devem ser pesquisados para a avaliação do controle da formação de biofilme.

Em 2011, Nuryastuti et al. avaliaram a expressão do gene *ica* e a susceptibilidade à gentamicina de biofilme formado por *Staphylococcus epidermidis* em biomateriais de aço inoxidável, polimetilmetacrilato (PMMA) e polietileno (PE). Três cepas clínicas e uma cepa padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *S. epidermidis* foram utilizadas na pesquisa. O biofilme foi formado a 37°C por 24h, e a quantificação da biomassa total foi realizada por coloração com cristal violeta. O RNA total foi extraído dos biofilmes incubados por 24h. A susceptibilidade à gentamicina foi determinada apenas para duas cepas clínicas (*S. epidermidis* 64 e 236). Além disso, o corante *Live/Dead BacLight* foi adicionado ao biofilme formado por *S. epidermidis* 64 e a leitura realizada por microscopia confocal de varredura a laser na presença e ausência de 16 e 32µL/mL de gentamicina. Concluiu-se que os biofilmes em polietileno apresentaram menor susceptibilidade à gentamicina. Porém, não houve relação entre a expressão do gene *ica* induzida pelo biomaterial e a quantidade de biofilme formado. Além disso, os resultados sugerem que as infecções relacionadas ao PE podem ser mais difíceis de serem controladas do que ao aço inoxidável e ao PMMA.

Hosman et al. (2011) compararam a atividade dos íons e partículas de Co-Cr contra biofilmes em dois modelos: estático e dinâmico. Para a formação dos biofilmes foram utilizadas três cepas de *S. aureus*, uma cepa de *S. epidermidis* e uma de *Staphylococcus* coagulase-negativa. Os biofilmes foram incubados a 37°C por 24h e cresceram em condições estáticas e dinâmicas (150rpm). A leitura das bactérias vivas e mortas foram realizadas por microscopia confocal de varredura à laser após coloração com *Live/Dead BacLight* e o biovolume viável calculado pelo programa COMSTAT por meio da análise das imagens geradas pela microscopia confocal de varredura à laser. Além disso, as análises dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de fotoelétrons de raios X foram realizadas. Em suma, houve redução da formação de biofilme de uma das cepas de *S. aureus* (7388) em condições dinâmicas na presença de partículas de Co-Cr em comparação aos íons metálicos.

Gómez-Barrena et al. (2012) isolaram e quantificaram microrganismos presentes nas próteses de quadril e joelho de clientes de dois hospitais da Espanha. O objetivo foi avaliar a diferença da aderência microbiana nos tipos de biomaterial e componentes das próteses. Foram incluídos na pesquisa 32 clientes (20 com próteses de quadril e 12 com próteses de joelho) com diagnóstico de infecção relacionada ao implante. No total, 87 componentes foram reportados, sendo que 10 eram de liga de titânio, 17 de hidroxiapatita, 27 de polietileno de ultra-alto peso molecular e 33 de liga de Co-Cr. Após sonicação e cultura microbiana dos componentes das próteses, 65 apresentaram microrganismos, dos quais 12 estavam relacionados a mais de um tipo microbiano. Além disso, os microrganismos mais isolados foram o *S. epidermidis* (23 componentes de 9 clientes) e *S. aureus* (11 componentes de 5 clientes). Em conclusão, não houve uma maior aderência microbiana entre os diferentes tipos de biomateriais e componentes.

Em 2012, Neut et al. investigaram a atividade antibacteriana do Ti revestido com gentamicina em inibir o crescimento bacteriano. Trinta cepas clínicas e duas cepas bioluminescentes de *Staphylococcus aureus*: *S. aureus* Xen29 e *S. aureus* Xen36 foram empregadas na pesquisa. Hastes em miniatura de próteses de quadril revestidas ou não (controle) com gentamicina foram submetidas à avaliação antibacteriana. A incubação das amostras foi realizada a 37°C por 60 horas.

Decorrido o período de incubação, a leitura da bioluminescência nas hastes foi documentada e avaliada com auxílio de câmera CCD. Assim, houve inibição do crescimento bacteriano somente nas hastes revestidas com gentamicina.

Lass et al. (2014) quantificaram e avaliaram a aderência bacteriana de 80 componentes de próteses de quadril removidos de 24 clientes, no período de setembro de 2007 a fevereiro de 2011. Os componentes eram de titânio-alumínio-nióbio (Ti6Al7Nb), cerâmica, polietileno de ultra-alto peso molecular (UHMWPE) e titânio puro. Após sonicação, realizou-se a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) nos componentes protéticos. Das 80 amostras, 68 apresentaram crescimento bacteriano, sendo que 10 foram excluídas da pesquisa devido à contaminação externa, resultando em 58 componentes para análise microbiológica. A maior quantidade de amostras (n=16), bem como com carga bacteriana (10.892UFC) foram relatadas com *S. epidermidis*. Ademais, *Staphylococcus capitis* (3.147UFC) e *S. aureus* (2.072UFC) foram a segunda e terceira bactérias mais isoladas das amostras, respectivamente. Concluiu-se que o biomaterial que apresentou maior aderência bacteriana foi o UHMWPE (10.180UFC), seguido pela cerâmica (5.746UFC), titânio puro (5.007UFC) e Ti6Al7Nb (1.805UFC).

Neut et al. (2015) desenvolveram um novo revestimento de hidroxiapatita (HA) contendo gentamicina em ligas de titânio com uma camada protetora e biodegradável de poli(ácido lático-co-glicólico) - (PLGA), o qual teria a propriedade de prevenir a aderência bacteriana de forma semelhante ao cimento com gentamicina. Para avaliação da atividade antibacteriana do revestimento, experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados. Utilizaram-se quatro cepas clínicas (duas cepas de *S. aureus* e duas de *S. epidermidis* resistentes à gentamicina) e duas cepas padrão (uma cepa de *S. aureus* e uma cepa bioluminescente de *S. aureus*). No experimento *in vitro*, a atividade antibacteriana foi realizada pela mensuração da zona de inibição do crescimento bacteriano ao redor das amostras em placas de Petri com *tryptic soy agar*. Para o experimento *in vivo*, a prevenção da infecção foi avaliada em modelo animal (n=14 coelhos) com a implantação de pinos revestidos com PLGA-gentamicina-HA e HA (controle) em canais medulares contaminados com inóculo bacteriano. De acordo com os resultados, a inibição do

crescimento bacteriano *in vitro* foi evidenciada para todas as cepas nas primeiras 24 horas. No entanto, o revestimento de PLGA-gentamicina-HA foi degradado completamente após quatro dias. Além disso, os animais com pinos revestidos com PLGA-gentamicina-HA e HA (controle) apresentaram taxas de infecção de 0% (0 de 7 coelhos) e 100% (7 de 7 coelhos), respectivamente. Então, o novo revestimento com gentamicina em liga de titânio demonstrou atividade antibacteriana, bem como prevenção de infecção.

Segundo Ferreri et al. (2015), um revestimento de prata-carbonitreto de zircônio (Ag-ZrCN) com atividade antimicrobiana foi desenvolvido por meio do processo de deposição física de vapor em aço inoxidável. Duas amostras foram produzidas: uma com 11% de prata (Ag 11) e outra sem prata (Ag 0). As amostras foram imersas em hipoclorito de sódio a 5% durante 5 minutos para melhorar a oxidação da prata (processo de ativação da prata). Cinco áreas diferentes da superfície de cada amostra foram avaliadas de acordo com a composição química dos revestimentos com auxílio da técnica de microanálise de sonda eletrônica. Além disso, determinou-se o perfil de composição dos revestimentos de Ag-ZrCN antes e após a ativação da prata por espectroscopia de emissão óptica em descarga luminescente. A atividade antibacteriana foi realizada em triplicata pela mensuração da zona de inibição do crescimento bacteriano (cepa clínica de *S. epidermidis*) ao redor das amostras em placas de Petri com *tryptic soy agar*. A incubação das placas foi efetuada a 37°C por 24 horas. Três amostras foram analisadas: Ag 11 após ativação da prata, Ag 11 antes da ativação da prata e Ag 0 após o processo de ativação. Em síntese, somente o revestimento com Ag 11, após ativação da prata, apresentou atividade antibacteriana.

Em 2015, Kyomoto et al. avaliaram as atividades antimicrobiana e antibiofilme de um revestimento de polietileno reticulado combinado com vitamina E e uma camada de poli(2-metacrilóiloietil fosforilcolina) - (HD-CLPE(VE) com PMPC). Duas cepas de *S. aureus* foram empregadas para realização do experimento de aderência bacteriana e da formação de biofilme. As seguintes amostras foram comparadas: discos de polietileno reticulado; polietileno reticulado combinado com vitamina E; HD-CLPE(VE) com PMPC. No experimento de aderência, as células bacterianas foram inoculadas nas amostras e incubadas a

37°C por 1 hora. Depois do período de incubação, as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), bem como coradas com ácido nucleico fluorescente verde SYTO 9 (*Live/Dead*) durante 30 minutos. A análise das células vivas e mortas foi efetuada por microscopia de fluorescência. Além disso, realizou-se a determinação da carga bacteriana aderida, após raspagem, semeadura em meio de cultura e incubação a 37°C por 48 horas. Para o experimento da formação de biofilme, a incubação das amostras com os inóculos bacterianos foi efetuada a 37°C por 24 horas sob agitação orbital (100rpm). De acordo com o experimento anterior, as análises por MEV, microscopia de fluorescência e carga bacteriana também foram feitas. Os resultados mostraram que o revestimento de HD-CLPE(VE) com PMPC evitou a aderência bacteriana e a formação de biofilme. Concluiu-se que a carga bacteriana aderida no revestimento foi reduzida em 100 vezes ou mais em decorrência da camada de PMPC. Entretanto, a presença da vitamina E não inibiu a aderência bacteriana.

Grover et al. (2016) investigaram a atividade antibiofilme de revestimentos de poliuretano contendo acilase. A acilase I de *Aspergillus melleus* foi utilizada como enzima reguladora do processo de *quorum sensing* (QS). Realizou-se a caracterização da atividade e estabilidade da enzima. Além disso, a avaliação antibiofilme contra duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* em condições de cultura estática (37°C por 24h) por carga bacteriana (cultura) e MEV (revestimentos com acilase e sem acilase - controle). Os pesquisadores revelaram que os revestimentos com acilase catalisaram a hidrólise das seguintes moléculas reguladoras de QS: N-hexanoil-L-homoserina lactona; N-butil-L-homoserina lactona; N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona. Quanto à atividade antibiofilme, houve a redução de cerca de 60% na formação de biofilme do revestimento com acilase. Então, o revestimento de poliuretano contendo acilase causou a hidrólise de moléculas reguladoras de QS, redução de piocianina produzida pelas cepas de *P. aeruginosa* e inibição da formação de biofilme.

Conforme Harrison et al. (2017), o objetivo da pesquisa foi avaliar a atividade antibiofilme do tântalo. Cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram empregadas para formação do biofilme nas amostras de tântalo e titânio (controle). A incubação foi realizada sob rotação orbital (180rpm) a 37°C por 24 horas. Decorrido o período de

incubação, a carga bacteriana em UFC foi determinada. Em conclusão, não houve diferença entre a carga bacteriana nas amostras de tântalo e titânio, o que evidenciou a inatividade antibiofilme do tântalo.

Em 2017, Galarraga-Vinueza et al. avaliaram a atividade antibiofilme do biovidro 58S com 5 e 10% de brometo de cálcio (CaBr_2) em um ambiente que simulou as condições bucais. As amostras de biovidro foram avaliadas contra um biofilme multiespécies formado por 10 cepas: *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces viscosus* e *Veillonella parvula*. O biofilme foi cultivado em um biorreator sob condições anaeróbicas, agitação de 300rpm e a 37°C por 24 horas. As amostras foram analisadas por densidade óptica, MEV e PCR em tempo real. Em suma, o biovidro com 5% de CaBr_2 demonstrou atividade antibiofilme contra *P. gingivalis*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *S. gordonii*, *V. parvula* e *S. mitis*.

Bari et al. (2017) modificaram a estrutura do biovidro mesoporoso por meio da adição de íons de cobre (Cu) na forma de nanopartículas esféricas e determinaram as suas propriedades bioativas. A atividade antibacteriana foi avaliada contra *Escherichia coli*, *S. epidermidis* e *S. aureus*, e a atividade antibiofilme contra *S. epidermidis*. Os resultados evidenciaram que o biovidro inibiu e reduziu a síntese da matriz de substâncias poliméricas extracelulares do biofilme. Ademais, os íons de Cu tiveram um papel fundamental na atividade antimicrobiana, visto que houve diminuição da viabilidade bacteriana nas amostras com dissolução do extrato iônico. Em síntese, o biomaterial desenvolvido apresentou atividades antibacteriana e antibiofilme contra as cepas avaliadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Justificativa da Relevância do Estudo

O projeto de pesquisa apresenta relevância científica e é justificável pela:

- ✓ Geração de conhecimento subsidiada na área da microbiologia acerca de biomateriais com aplicabilidade na ortopedia;
- ✓ Abordagem multidisciplinar, articulando conhecimentos nas áreas das ciências básicas e da saúde;
- ✓ Possibilidade do uso de biomateriais em sistemas biológicos com ênfase na ortopedia, que sejam biocompatíveis, biodegradáveis, com atividades antimicrobiana e antibiofilme, bem como custo competitivo para produção.

3.2 Objetivo Geral

Após este percurso exposto, no sentido de fundamentar a proposta desta pesquisa, estabeleceu-se como objetivo geral:

- ✓ Investigar biomateriais com aplicabilidade na ortopedia, visando os avanços e enfrentamentos dos desafios na área da infectologia.

3.3 Objetivos Específicos

3.3.1 Revisão Integrativa

- ✓ Elaborar uma revisão integrativa a respeito da formação de biofilme em biomateriais de próteses de quadril com a finalidade de contribuir com as medidas de prevenção e controle aos agravos infecciosos.

3.3.2 Experimental / Laboratorial

- ✓ Avaliar *in vitro* a formação do biofilme em função dos biomateriais (titânio e titânio revestido com biovidro F18), microrganismos (*Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*) e tempos de incubação (2, 4 e 8 horas) por microscopia de fluorescência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia foi apresentada em duas fases, em atendimento aos objetivos propostos:

- ✓ Fase I - Revisão integrativa;
- ✓ Fase II - Experimental / Laboratorial.

4.1 Fase I – Revisão Integrativa

Para a busca dos artigos científicos para elaboração da revisão integrativa, formulou-se a seguinte questão norteadora: quais são as evidências científicas a respeito da prevenção da formação de biofilme em biomateriais de próteses de quadril?

A busca dos estudos primários foi realizada no portal *PubMed* da *National Library of Medicine* e nas bases *Cochrane*, *Embase*, *Web of Science*, *Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature* (CINAHL) e Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS). A estratégia de busca baseou-se no uso de descritores controlados “Biofilms”, “Hip Prosthesis” e “Arthroplasty, Replacement, Hip”, e os operadores booleanos AND e OR.

Os descritores controlados (*MeSH terms*, Títulos CINAHL, DeCS e *Emtree terms*) e as palavras-chave utilizados de acordo com o portal e as bases de dados estão reunidos no Quadro 1.

Quadro 1 - Combinação dos descritores controlados e palavras-chave segundo portal e bases de dados utilizadas na busca dos estudos primários. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Portal e bases de dados	Descritores controlados e palavras-chave
<i>PubMed</i> <i>Web of Science</i> <i>Cochrane</i>	"Biofilms" OR "Biofilm" AND "Hip Prosthesis" OR "Hip Prostheses" OR "Prostheses, Hip" OR "Prosthesis, Hip" OR "Femoral Head Prosthesis" OR "Femoral Head Prostheses" OR "Prostheses, Femoral Head" OR "Prosthesis, Femoral Head" AND "Arthroplasty, Replacement, Hip" OR "Arthroplasties, Replacement, Hip" OR "Arthroplasty, Hip Replacement" OR "Hip Prosthesis Implantation" OR "Hip Prosthesis Implantations" OR "Implantation, Hip Prosthesis" OR "Implantations, Hip Prosthesis" OR "Prosthesis Implantation, Hip" OR "Prosthesis Implantations, Hip" OR "Hip Replacement Arthroplasty" OR "Replacement Arthroplasties, Hip" OR "Replacement Arthroplasty, Hip" OR "Arthroplasties, Hip Replacement" OR "Hip Replacement Arthroplasties" OR "Hip Replacement, Total" OR "Replacement, Total Hip" OR "Hip Replacements, Total" OR "Replacements, Total Hip" OR "Total Hip Replacements" OR "Total Hip Replacement"
CINAHL	"Biofilms" OR "Biofilm" AND "Arthroplasty, Replacement, Hip" OR "Hip Prosthesis" OR "Arthroplasties, Replacement, Hip" OR "Arthroplasty, Hip Replacement" OR "Hip Prosthesis Implantation" OR "Hip Prosthesis Implantations" OR "Implantation, Hip Prosthesis" OR "Implantations, Hip Prosthesis" OR "Prosthesis Implantation, Hip" OR "Prosthesis Implantations, Hip" OR "Hip Replacement Arthroplasty" OR "Replacement Arthroplasties, Hip" OR "Replacement Arthroplasty, Hip" OR "Arthroplasties, Hip Replacement" OR "Hip Replacement Arthroplasties" OR "Hip Replacement, Total" OR "Replacement, Total Hip" OR "Hip Replacements, Total" OR "Replacements, Total Hip" OR "Total Hip Replacements" OR "Total Hip Replacement" OR "Hip Prostheses" OR "Prostheses, Hip" OR "Prosthesis, Hip" OR "Femoral Head Prosthesis" OR "Femoral Head Prostheses" OR "Prostheses, Femoral Head" OR "Prosthesis, Femoral Head"
LILACS	"BIOFILME" AND "PROTESE DE QUADRIL" OR "ARTROPLASTIA DE QUADRIL"
<i>Embase</i>	"Biofilm" OR "Biofilms" AND "Hip Prosthesis" OR "Hip Prostheses" OR "Prostheses, Hip" OR "Prosthesis, Hip" OR "Femoral Head Prosthesis" OR "Femoral Head Prostheses" OR "Prostheses, Femoral Head" OR "Prosthesis, Femoral Head" AND "Hip Arthroplasty" OR "Arthroplasty, Replacement, Hip" OR "Arthroplasties, Replacement, Hip" OR "Arthroplasty, Hip Replacement" OR "Hip Prosthesis Implantation" OR "Hip Prosthesis Implantations" OR "Implantation, Hip Prosthesis" OR "Implantations, Hip Prosthesis" OR "Prosthesis Implantation, Hip" OR "Prosthesis Implantations, Hip" OR "Hip Replacement Arthroplasty" OR "Replacement Arthroplasties, Hip" OR "Replacement Arthroplasty, Hip" OR "Arthroplasties, Hip Replacement" OR "Hip Replacement Arthroplasties" OR "Hip Replacement, Total" OR "Replacement, Total Hip" OR "Hip Replacements, Total" OR "Replacements, Total Hip" OR "Total Hip Replacements" OR "Total Hip Replacement"

Incluíram-se estudos primários sobre a temática em inglês, espanhol e português, publicados online até novembro de 2017. Foram excluídos os artigos que caracterizaram a morfologia do biofilme e sua natureza, tratamento / diagnóstico da infecção, realizados com pérolas / cimento ósseo, artigos de revisão e estudo de caso (Apêndice A).

4.2 Fase II – Experimental / Laboratorial

4.2.1 Local da Pesquisa

A pesquisa experimental / laboratorial foi desenvolvida no laboratório de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FORP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil e no laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (EERP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil em parceria com o Laboratório de Materiais Vítreos do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (LaMaV – DEMa/UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

4.2.2 Delineamento da Pesquisa

Com a finalidade de avaliar a formação de biofilme nos diferentes biomateriais, três variáveis da pesquisa foram definidas (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma do delineamento experimental / laboratorial. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

Fonte: elaborado pela autora.

✓ **Biomateriais**, em dois níveis:

- 1) Titânio (controle);
- 2) Titânio revestido com biovidro F18.

✓ **Microrganismos**, em dois níveis:

- 1) *Staphylococcus epidermidis*;
- 2) *Candida albicans*.

✓ **Tempos**, em três níveis:

- 1) 2 horas;
- 2) 4 horas;
- 3) 8 horas.

4.2.3 Procedimentos Éticos em Pesquisa

De acordo com a Resolução nº 466/2012, o projeto de pesquisa foi dispensado da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, uma vez que não envolveu seres humanos.

4.2.4 Confeção dos Corpos de Prova

Os corpos de prova circulares (1,0cm de diâmetro) de titânio (controle) e titânio revestido com biovidro F18 foram confeccionados e lixados no LaMaV – DEMa/UFSCar – (Figura 2). Vale ressaltar, que o biovidro F18 pertence ao sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$ e foi desenvolvido no LaMaV – DEMa/UFSCar, o qual apresenta a patente BR10 INPI 20130209619.

Figura 2 – Vista panorâmica dos corpos de prova de: titânio (A) e titânio revestido com biovidro F18 (B). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

Fonte: elaborado pela autora.

4.2.5 Esterilização dos Corpos de Prova

Todos os corpos de prova foram acondicionados em placas de Petri (90x15mm) de vidro e expostos ao processo de esterilização em forno de *Pasteur* a 160°C por 2 horas.

Três amostras de cada tipo de biomaterial (titânio e titânio revestido com biovidro F18) foram submetidas ao teste de esterilidade.

O teste de esterilidade consistiu em avaliar se os corpos de prova estavam esterilizados após o processo de esterilização. Para isso, as amostras foram transferidas com auxílio de pinças esterilizadas para frascos reagentes em vidro incolor com tampa azul (500mL) - (*Boeco Germany*, Hamburgo, Alemanha) com 200mL de *Tryptic Soy Broth* (BD Difco, Sparks, MD, EUA). A incubação foi realizada a 37°C por 14 dias. Diariamente, as amostras foram homogeneizadas e a presença de turvação (crescimento microbiano) no meio de cultura avaliada.

4.2.6 Processamento Microbiológico

Todo o experimento microbiológico foi realizado em Cabine de Segurança Biológica Classe II tipo A1 (VECO, Campinas, SP, BR) de acordo com os princípios básicos de assepsia.

4.2.6.1 Padronização dos Inóculos Microbianos

Inicialmente, as cepas padrão de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Candida albicans* (ATCC 90028) foram descongeladas, semeadas em tubos de ensaio com *Tryptic Soy Broth* (BD Difco, Sparks, MD, EUA) e incubadas a 37°C por 24 horas. Decorrido o período de incubação, as células foram centrifugadas a 4.200g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas (*pellet*) foram ressuspensas em 10mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em seguida, novamente, realizou-se a centrifugação a 4.200g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensado em 10mL de PBS.

A padronização do inóculo (10^8 UFC/mL) de *S. epidermidis* foi realizada em comprimento de onda de 625nm e a leitura da absorbância entre 0,08 e 0,100, por meio de espectrofotômetro (*Multiskan GO*, Thermo Scientific, MA, EUA) – (Figura 3), enquanto que a padronização do inóculo (10^8 células/mL) de *C. albicans* foi efetuada com auxílio da câmara de *Neubauer* (Figura 3).

Figura 3 – Vista panorâmica de espectrofotômetro (A) e câmara de *Neubauer* (B).
Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

Fonte: elaborado pela autora.

4.2.6.2 Formação dos Biofilmes

Os corpos de prova de titânio e titânio revestido com biovidro F18 foram transferidos com auxílio de pinças esterilizadas, individualmente, para placas de

poliestireno (24 poços) de fundo chato esterilizadas (*Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça*).

Alíquotas com 1,5mL de meio de cultura inoculado com microrganismo (10^6 UFC/mL) foram transferidas para os poços das placas de poliestireno contendo os corpos de prova dos biomateriais. Desta maneira, os biofilmes de *S. epidermidis* e *C. albicans* foram formados em *Brain Heart Infusion Broth* (*HiMedia Laboratories Pvt. Ltda.* Mumbai, Índia) e *Sabouraud Dextrose Broth* (*BD Difco*, Sparks, MD, EUA), respectivamente (Figura 4). A incubação das placas foi efetuada a 37°C por duas, quatro e oito horas sob agitação orbital (90rpm) em incubadora *Shaker, Mod. CE-320* (*CienLab*, Campinas, SP, Brasil).

Figura 4 – Vista panorâmica da placa de poliestireno (24 poços) de fundo chato esterilizada (A) com meio de cultura inoculado com microrganismo e corpo de prova de titânio revestido com biovidro F18 (linha A e coluna 1); e vista ampliada de dois poços, linhas A e B da placa: com e sem o biomaterial, respectivamente (B). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

Fonte: elaborado pela autora.

Todo o experimento foi realizado em triplicata para cada tipo de biomaterial (titânio e titânio revestido com biovidro F18), microrganismo (*S. epidermidis* e *C. albicans*) e tempo de incubação (duas, quatro e oito horas) - (n=36).

4.2.6.3 Avaliação dos Biofilmes por Microscopia de Fluorescência

Para a avaliação das células vivas e mortas aderidas (biofilme) nos corpos de prova dos biomateriais foi utilizado o *FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit*

(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EUA). Alíquotas de 2,5µL de cada um dos corantes A e B (fluoróforos) foram diluídos em 15mL de água purificada do tipo II - osmose reversa (Quimis, Diadema, SP, Brasil) esterilizada para corar de verde as células viáveis (vivas) e em vermelho as células com danos na membrana (mortas). Ainda, a solução foi preparada diariamente antes do seu uso, sendo a mesma protegida da exposição pela luz e calor durante todos os procedimentos.

Após a formação dos biofilmes, os corpos de prova foram lavados com 1,0mL de PBS e corados com 750µL da solução diluída dos corantes A e B por 15 minutos a temperatura ambiente e sob a proteção da exposição da luz. Decorrido esse período, os corpos de prova foram lavados, novamente, com PBS e o seu excesso e dos corantes retirados, delicadamente, com auxílio de papel absorvente.

Lamínulas individuais foram posicionadas sobre a superfície dos corpos de prova para análise em microscópio de fluorescência invertido *Observer. A1* (Carl Zeiss® Microscopy Ltd., Oberkochen, Alemanha) com filtros apropriados e aumento de 630x. O software *ZEN 2.3 lite* (Carl Zeiss® Microscopy Ltd., Oberkochen, Alemanha) foi utilizado para realizar a captura das imagens das superfícies dos corpos de provas dos biomateriais (Figura 5).

Figura 5 – Vista panorâmica do microscópio de fluorescência invertido durante a captura das imagens em um corpo de prova (biomaterial): filtro FS43HE – vermelho e emissão de luz verde (A); filtro FS43HE – verde e emissão de luz azul (B). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

Fonte: elaborado pela autora.

Em cada corpo de prova dos biomateriais, 20 campos distintos selecionados, aleatoriamente, serviram para as tomadas de 20 imagens. Considerando que a área de cada imagem é de $13.733,82\mu\text{m}^2$, as 20 imagens representaram, aproximadamente, 5,55% da área total de um corpo de prova.

As imagens originais dos biofilmes (Figura 6) foram transformadas e analisadas no software *ImageJ*® (*National Institutes of Health, Madison, WI, USA*), que permitiu a quantificação das áreas das imagens, em porcentagens, recobertas com biofilmes (Figura 7). No total, 720 imagens foram analisadas, sendo que 360 de cada tipo de microrganismo (*S. epidermidis* e *C. albicans*).

Figura 6 – Imagens por microscopia de fluorescência de corpos de prova de titânio submetidos à formação de biofilme por: *C. albicans* após 2 horas (A) e *S. epidermidis* após 8 horas (B). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 7 – Imagens de corpos de prova de titânio transformadas pelo software *ImageJ*® para a quantificação das áreas das imagens, em porcentagens, recobertas com *C. albicans* após 2 horas (A) e *S. epidermidis* após 8 horas (B). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

Fonte: elaborado pela autora.

4.2.7 Análise dos Dados

Os dados coletados foram submetidos à análise estatística empregando-se os testes de normalidade *Shapiro Wilk*, *U* de *Mann-Whitney* e *t* de *Student* por meio do software *IBM SPSS Statistics* (versão 25) e nível de significância $\alpha=5\%$.

5 RESULTADOS

5.1 Fase I – Revisão Integrativa

A busca inicial recuperou 237 artigos, sendo 75 estudos duplicados, resultando em 162 estudos primários, sendo 94 do portal *PubMed*, e 68 das bases de dados: *Embase* (n=42), *Web of Science* (n=22), *CINAHL* (n=3) e *Cochrane* (n=1). Foi realizada a leitura dos títulos e resumos para análise desses estudos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Assim, 16 estudos primários foram incluídos na revisão integrativa da literatura: 9 artigos da *PubMed*, 5 da *Web of Science* e 2 da *Embase*.

A análise dos estudos foi realizada de acordo com o ano de publicação, delineamento da pesquisa, estratégias / recursos utilizados e principais resultados. Segundo o ano de publicação, houve concentração de artigos publicados em 2015 (3/18,75%). De acordo com o delineamento, 81,25% das pesquisas foram experimentais / laboratoriais *in vitro*, ou seja, estudos que simulam condições biológicas em laboratório e não envolvem seres humanos e animais (Apêndice A).

5.2 Fase II – Experimental / Laboratorial

5.2.1 Comparação da Formação dos Biofilmes nos Biomateriais

Em relação a quantificação das áreas dos biomateriais com células vivas e mortas, somente as células dos biofilmes coradas de verde (vivas) foram avaliadas, visto que o biovidro F18 interferiu na análise das células coradas de vermelho (mortas), pois emitiu fluorescência no mesmo comprimento de onda desse corante.

Os valores da mediana, do intervalo e do p demonstraram que as áreas, em porcentagens, das imagens dos corpos de prova de titânio revestido com biovidro F18 recobertos com biofilme de *S. epidermidis* foram menores do que do titânio, após 8 horas de incubação ($p < 0,001$) – Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação entre as áreas, em porcentagens, das imagens dos corpos de prova do titânio (Ti) e titânio revestido com biovidro F18 (F18) recobertos com biofilme por *S. epidermidis* (Se) nos períodos de duas (2h), quatro (4h) e oito horas (8h). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

	Mediana (Intervalo)	Média (DP)	Valor de p
TiSe2h	0,09 (0,06 – 0,79)	0,12 (0,09)	p=0,291*
F18Se2h	0,10 (0,07 – 0,17)	0,11 (0,02)	
TiSe4h	0,11 (0,06 – 1,44)	0,18 (0,23)	p=0,757*
F18Se4h	0,11 (0,08 – 0,19)	0,12 (0,03)	
TiSe8h	0,15 (0,08 – 0,95)	0,20 (0,15)	p<0,001*
F18Se8h	0,12 (0,06 – 0,42)	0,13 (0,06)	

Legenda: DP, desvio-padrão; *Teste U de Mann-Whitney.

Nas Figuras 8 a 13 e Apêndices B e C, as imagens por microscopia de fluorescência dos corpos de prova de titânio e titânio revestido com biovidro F18 exibiram a formação de biofilme por *S. epidermidis* após diferentes tempos de incubação (duas, quatro e oito horas).

Figura 8 – Imagem por microscopia de fluorescência do titânio submetido à formação de biofilme por *S. epidermidis* após 2 horas.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 9 – Imagem por microscopia de fluorescência do titânio revestido com biovidro F18 submetido à formação de biofilme por *S. epidermidis* após 2 horas.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 10 – Imagem por microscopia de fluorescência do titânio submetido à formação de biofilme por *S. epidermidis* após 4 horas.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 11 – Imagem por microscopia de fluorescência do titânio revestido com biovidro F18 submetido à formação de biofilme por *S. epidermidis* após 4 horas.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 12 – Imagem por microscopia de fluorescência do titânio submetido à formação de biofilme por *S. epidermidis* após 8 horas.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 13 – Imagem por microscopia de fluorescência do titânio revestido com biovidro F18 submetido à formação de biofilme por *S. epidermidis* após 8 horas.

Fonte: elaborado pela autora.

Os valores da mediana, do intervalo e do p mostraram que as áreas, em porcentagens, das imagens dos corpos de prova de titânio revestido com biovidro F18 recobertos com biofilme de *C. albicans* foram maiores do que do titânio puro, após 4 horas de incubação ($p < 0,007$). Por outro lado, as áreas, em porcentagens, das imagens dos corpos de prova de titânio revestido com biovidro F18 recobertos com biofilme de *C. albicans* foram menores do que do titânio, após 8 horas de incubação ($p < 0,001$) – Tabela 2.

Tabela 2 – Comparação entre as áreas, em porcentagens, das imagens dos corpos de prova do titânio (Ti) e titânio revestido com biovidro F18 (F18) recobertos com biofilme por *C. albicans* (Ca) nos períodos de duas (2h), quatro (4h) e oito horas (8h). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

	Mediana (Intervalo)	Média (DP)	Valor de p
TiCa2h	4,54 (0,87 – 17,74)	5,34 (3,68)	$p=0,188^*$
F18Ca2h	5,60 (1,06 – 14,33)	5,77 (3,15)	
TiCa4h	9,90 (4,11 – 38,84)	12,22 (6,71)	$p=0,007^*$
F18Ca4h	14,40 (4,86 – 34,79)	14,94 (6,21)	
TiCa8h	32,89 (7,36 – 76,63)	33,77 (17,33)	$p < 0,001^*$
F18Ca8h	17,25 (5,44 – 32,31)	18,34 (6,14)	

Legenda: DP, desvio-padrão; *Teste U de Mann-Whitney.

Conforme as Figuras 14 a 19 e Apêndices D e E, as imagens por microscopia de fluorescência dos corpos de prova de titânio e titânio revestido com biovidro F18 demonstraram a formação de biofilme por *C. albicans* após diferentes tempos de incubação (duas, quatro e oito horas).

Figura 14 – Imagem por microscopia de fluorescência do titânio submetido à formação de biofilme por *C. albicans* após 2 horas.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 15 – Imagem por microscopia de fluorescência do titânio revestido com biovidro F18 submetido à formação de biofilme por *C. albicans* após 2 horas.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 16 – Imagem por microscopia de fluorescência do titânio submetido à formação de biofilme por *C. albicans* após 4 horas.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 17 – Imagem por microscopia de fluorescência do titânio revestido com biovidro F18 submetido à formação de biofilme por *C. albicans* após 4 horas.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 18 – Imagem por microscopia de fluorescência do titânio submetido à formação de biofilme por *C. albicans* após 8 horas.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 19 – Imagem por microscopia de fluorescência do titânio revestido com biovidro F18 submetido à formação de biofilme por *C. albicans* após 8 horas.

Fonte: elaborado pela autora.

5.2.2 Comparação da Formação dos Biofilmes nos Tempos de Incubação

Os resultados revelaram que as áreas, em porcentagens, das imagens dos corpos de prova de titânio recobertas com biofilme de *S. epidermidis* foram maiores em 8 horas do que 4 horas ($p<0,001$) e 2 horas ($p<0,001$). Quanto ao titânio revestido com biovidro F18, houve maior formação de biofilme por *S. epidermidis* em 8 horas quando comparado com 2 horas ($p=0,010$) – (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação entre as áreas, em porcentagens, das imagens dos corpos de prova do titânio (Ti) ou titânio revestido com biovidro F18 (F18) recobertos com biofilme por *S. epidermidis* (Se) nos períodos de duas (2h), quatro (4h) e oito horas (8h). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

	Mediana (Intervalo)	Média (DP)	Valor de p
TiSe2h	0,09 (0,06 – 0,79)	0,12 (0,09)	p=0,086*
TiSe4h	0,11 (0,06 – 1,44)	0,18 (0,23)	
TiSe2h	0,09 (0,06 – 0,79)	0,12 (0,09)	p<0,001*
TiSe8h	0,15 (0,08 – 0,95)	0,20 (0,15)	
TiSe4h	0,11 (0,06 – 1,44)	0,18 (0,23)	p<0,001*
TiSe8h	0,15 (0,08 – 0,95)	0,20 (0,15)	
F18Se2h	0,10 (0,07 – 0,17)	0,11 (0,02)	p=0,074*
F18Se4h	0,11 (0,08 – 0,19)	0,12 (0,03)	
F18Se2h	0,10 (0,07 – 0,17)	0,11 (0,02)	p=0,010*
F18Se8h	0,12 (0,06 – 0,42)	0,13 (0,06)	
F18Se4h	0,11 (0,08 – 0,19)	0,12 (0,03)	p=0,353*
F18Se8h	0,12 (0,06 – 0,42)	0,13 (0,06)	

Legenda: DP, desvio-padrão; *Teste U de Mann-Whitney.

Com relação ao biofilme formado por *C. albicans* nos diferentes biomateriais (titânio e titânio revestido com biovidro F18), houve diferença nas áreas recobertas entre todos os tempos ($p<0,001$). No entanto, a menor diferença foi evidenciada no titânio revestido com biovidro F18 em 8 horas quando comparado com 4 horas ($p=0,003$) – (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação entre as áreas, em porcentagens, das imagens dos corpos de prova do titânio (Ti) ou titânio revestido com biovidro F18 (F18) recobertos com biofilme por *C. albicans* (Ca) nos períodos de duas (2h), quatro (4h) e oito horas (8h). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

	Mediana (Intervalo)	Média (DP)	Valor de p
TiCa2h	4,54 (0,87 – 17,74)	5,34 (3,68)	p<0,001*
TiCa4h	9,90 (4,11 – 38,84)	12,22 (6,71)	
TiCa2h	4,54 (0,87 – 17,74)	5,34 (3,68)	p<0,001*
TiCa8h	32,89 (7,36 – 76,63)	33,77 (17,33)	
TiCa4h	9,90 (4,11 – 38,84)	12,22 (6,71)	p<0,001**
TiCa8h	32,89 (7,36 – 76,63)	33,77 (17,33)	
F18Ca2h	5,60 (1,06 – 14,33)	5,77 (3,15)	p<0,001*
F18Ca4h	14,40 (4,86 – 34,79)	14,94 (6,21)	
F18Ca2h	5,60 (1,06 – 14,33)	5,77 (3,15)	p<0,001*
F18Ca8h	17,25 (5,44 – 32,31)	18,34 (6,14)	
F18Ca4h	14,40 (4,86 – 34,79)	14,94 (6,21)	p=0,003**
F18Ca8h	17,25 (5,44 – 32,31)	18,34 (6,14)	

Legenda: DP, desvio-padrão; *Teste U de Mann-Whitney; **Teste t de Student.

6 DISCUSSÃO

Em 1894, o primeiro procedimento de artroplastia relatado na literatura foi realizado em Paris (França) pelo cirurgião Jules Emile Péan. A implantação de uma prótese total de ombro confeccionada em platina e borracha em um cliente, que havia tido sua articulação destruída pela tuberculose, infelizmente, resultou em uma fístula, após um ano da realização do procedimento cirúrgico. Na tentativa de eliminar a infecção, quatro procedimentos de drenagem da fístula foram realizados sem sucesso e decorrido 2 anos com uma infecção persistente, a opção para o controle da sepse foi a retirada da prótese do cliente (PÉAN, 1894).

Atualmente, devido ao aumento do número de artroplastias, as infecções relacionadas aos implantes e próteses representam uma problemática crescente na área da saúde. Nessa perspectiva, há relatos do desenvolvimento de biomateriais com atividades antimicrobiana e/ou antibiofilme avaliadas por meio de diferentes técnicas: cultura (carga microbiana), zona de inibição do crescimento microbiano, biomassa total do biofilme, morfologia do biofilme (microscopia eletrônica de varredura) e quantificação do volume (microscopia confocal de varredura à laser) e do número (microscopia de fluorescência) de células vivas e mortas no biofilme (RAMAGE et al., 2003; PARVIZI et al., 2004; HOSMAN et al., 2009, 2011; HENRIQUES et al., 2009; LEWIS et al., 2010; NURYASTUTI et al., 2011; NEUT et al., 2012, 2015; FERRERI et al., 2015; KYOMOTO et al., 2015; GROVER et al., 2016; HARRISON et al., 2017).

Nesta pesquisa, os corpos de prova dos biomateriais (titânio e titânio revestido com biovidro F18) foram corados como *FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit* e as leituras das áreas das imagens, em porcentagens, recobertas com biofilmes (células vivas) foram analisadas por microscopia de fluorescência.

Em referência aos períodos de formação do biofilme nos biomateriais, pesquisas reportaram tempos de 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 18, 24 e 48 horas (RAMAGE et al., 2003; PARVIZI et al., 2004; HOSMAN et al., 2009, 2011; HENRIQUES et al., 2009; LEWIS et al., 2010; NURYASTUTI et al., 2011; KYOMOTO et al., 2015; GROVER et al., 2016; HARRISON et al., 2017).

No presente estudo, os tempos de 2, 4 e 8 horas de incubação foram utilizados para comparar a formação de biofilme nos biomateriais.

Segundo Thein; Samaranayake; Samaranayake (2007), a agitação orbital é empregada, experimentalmente, para proporcionar condições dinâmicas adequadas para o desenvolvimento do biofilme, com velocidades referidas por pesquisadores de 100, 150 e 180rpm (HENRIQUES et al., 2009; HOSMAN et al., 2011; KYOMOTO et al., 2015; HARRISON et al., 2017).

Neste trabalho, empregou-se agitação orbital de 90rpm para formação dos biofilmes nos biomateriais.

Com relação aos meios de cultura, *Mueller Hinton Broth* e *Tryptic Soy Broth* foram utilizados para o desenvolvimento de biofilmes em biomateriais de próteses de quadril (RAMAGE et al., 2003; HOSMAN et al., 2009, 2011; HENRIQUES et al., 2009; NURYASTUTI et al., 2011; KYOMOTO et al., 2015; HARRISON et al., 2017).

O *Brain Heart Infusion Broth* e o *Sabouraud Dextrose Broth* foram empregados, nesta pesquisa, para a formação de biofilme por *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*, respectivamente.

Diferentes microrganismos foram selecionados para avaliação da atividade antibiofilme de biomateriais e íons: *Propionibacterium acnes*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativa, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* (RAMAGE et al., 2003; PARVIZI et al., 2004; HOSMAN et al., 2009, 2011; HENRIQUES et al., 2009; LEWIS et al., 2010; NURYASTUTI et al., 2011; NEUT et al., 2012, 2015; FERRERI et al., 2015; KYOMOTO et al., 2015; GROVER et al., 2016; HARRISON et al., 2017).

Neste trabalho, duas cepas padrão foram usadas: *S. epidermidis* (ATCC 12228) e *C. albicans* (ATCC 90028). O *S. epidermidis* é uma bactéria, que faz parte da microbiota normal da pele dos seres humanos e está relacionado, principalmente, às infecções decorrentes do uso de dispositivos médicos aplicados e/ou implantados (OTTO, 2009). Ademais, a *C. albicans* é um fungo leveduriforme, que também faz parte da microbiota normal, porém da boca e do trato geniturinário dos seres humanos, com característica relevante para formação de biofilme em substratos bióticos e abióticos (KENNEDY; VOLZ, 1985; KUMAMOTO, 2002, 2011; ACHKAR; FRIES, 2010; GANGULY; MITCHELL, 2011).

Conforme a literatura científica, diversos biomateriais, revestimentos e íons foram avaliados quanto à atividade antibiofilme: titânio (Ti), tântalo, titânio ligado covalentemente à vancomicina, filmes de titânio-silício-carbono-oxigênio-nitrogênio, partículas e íons de cobalto-cromo (Co-Cr), filmes de diamante nanocristalino,

polietileno, polimetilmetacrilato (PMMA), aço inoxidável, ligas de Co-Cr, polietileno de alto peso molecular, hidroxiapatita, revestimentos bioativos de gentamicina, cerâmica, revestimentos biodegradáveis de gentamicina-hidroxiapatita, revestimentos de polietileno reticulado com vitamina E e uma camada de poli(2-metacriloxietil fosforilcolina) – (HD-CLPE(VE) com PMPC), filmes de prata-carbonitreto de zircônio e revestimentos de poliuretano com acilase (RAMAGE et al., 2003; PARVIZI et al., 2004; HOSMAN et al., 2009, 2011; HENRIQUES et al., 2009; LEWIS et al., 2010; NURYASTUTI et al., 2011; GÓMEZ-BARRENA et al., 2012; NEUT et al., 2012, 2015; LASS et al., 2014; FERRERI et al., 2015; KYOMOTO et al., 2015; GROVER et al., 2016; HARRISON et al., 2017).

Na presente pesquisa, o titânio revestido com o biovidro F18 foi o biomaterial utilizado para avaliação da atividade antibiofilme, em comparação com o titânio puro. O biovidro F18 apresenta propriedades extremamente vantajosas para dispositivos médicos e odontológicos, devido a sua elevada bioatividade, estabilidade contra cristalização (processo que geralmente degrada as propriedades mecânicas e diminui a bioatividade), além de ser um biomaterial flexível e bioabsorvível (SOUZA et al., 2017).

Estudo realizado por Souza et al. (2017) analisou a reação dos componentes do biovidro F18 ($\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$) ao entrar em contato com uma substância que simulava o plasma sanguíneo humano. As imagens por espectroscopia de infravermelho mostraram a formação de uma camada de hidroxicarbonato apatita (HCA) após 4 e 12 horas, condição favorável à regeneração óssea.

Outra pesquisa avaliou a degradação do biovidro F18 após 15, 30 e 60 dias em ratos submetidos à cirurgia para implantação subcutânea do biovidro na forma de *scaffold*. A análise histopatológica revelou que o biomaterial foi quase totalmente bioabsorvido após 60 dias (GABBAI et al., 2017).

Desta forma, a atividade do biovidro F18 ocorre à medida que ele é degradado ao entrar em contato com os fluidos corporais. Além disso, uma característica que deve ser estudada é a duração da sua atividade antibiofilme, visto que o biovidro pode estar presente no corpo humano até cerca de 60 dias.

Ramage et al. (2003) avaliaram a diferença da formação de biofilme por *P. acnes*, *S. epidermidis* e *S. aureus* nos períodos de 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 18 horas nos seguintes biomateriais: PMMA e três ligas de titânio (LT) com rugosidades

distintas. A LT2 era a mais lisa, seguida da LT1 e LT3. Em relação ao biofilme por *P. acnes*, houve maior formação de biofilme no PMMA após 4 e 6 horas, porém após 3, 8 e 18 horas a aderência bacteriana foi maior na LT1 em comparação aos outros biomateriais. De modo semelhante, a LT1 apresentou a maior formação de biofilme por *S. epidermidis* no período de 18 horas. Entretanto, no PMMA em comparação às ligas de titânio houve maior formação de biofilme por *S. aureus*.

No presente trabalho, em cada corpo de prova dos biomateriais, 20 campos distintos selecionados, aleatoriamente, serviram para as tomadas de 20 imagens, que representaram, aproximadamente, 5,55% da área total de um corpo de prova.

A quantificação das áreas dos biomateriais com células vivas e mortas foi um desafio nesta pesquisa, pois o biovidro F18 interferiu na análise das células coradas de vermelho (mortas) ao emitir fluorescência no mesmo comprimento de onda desse corante. Desta forma, somente as células dos biofilmes coradas de verde (vivas) foram avaliadas.

Então, nesta pesquisa, houve menor formação de biofilme por *S. epidermidis* e *C. albicans* ($p < 0,001$) no titânio revestido com biovidro F18 do que no titânio, após 8 horas de incubação (Tabelas 1 e 2). Entretanto, houve maior formação de biofilme por *S. epidermidis* e *C. albicans* após 8 horas do que em 2 horas de incubação, tanto no titânio quanto no titânio revestido com biovidro F18 ($p < 0,05$) – (Tabelas 3 e 4). Esses resultados permitiram inferir que a formação de biofilme foi dependente dos biomateriais, microrganismos e tempos de incubação. Ademais, os biofilmes formados por *S. epidermidis* recobriram áreas muito menores nos biomateriais (Figuras 8 a 13 e Apêndices B e C) do que aquelas formadas por *C. albicans* (Figuras 14 a 19 e Apêndices D e E), devido às características morfológicas (tamanho) e às propriedades bioquímicas e metabólicas dos diferentes microrganismos.

Em síntese, uma abordagem científica e multidisciplinar entre a microbiologia e a engenharia permitiu o avanço do conhecimento e o enfrentamento dos desafios na área da infectologia acerca dos biomateriais com aplicabilidade na ortopedia.

7 CONCLUSÃO

- ✓ De acordo com a revisão integrativa, há uma gama de biomateriais com características potenciais para prevenção da formação de biofilme em próteses de quadril e outros dispositivos médicos;
- ✓ O titânio revestido com biovidro F18 apresentou menor formação de biofilme que o titânio puro, após 8 horas de incubação;
- ✓ O *S. epidermidis* demonstrou menor capacidade para formação de biofilme nos biomateriais do que a *C. albicans*;
- ✓ Os tempos de incubação de 2 para 8 horas aumentaram a formação de biofilme em ambos os biomateriais;
- ✓ A técnica de microscopia de fluorescência com uso de corantes (fluoróforos) permitiu avaliar as áreas, em porcentagens, dos biomateriais com biofilmes (células vivas).

Então, há uma variedade de biomateriais com aplicabilidade na ortopedia, visando os avanços e enfrentamentos dos desafios na área da infectologia. Ainda, pesquisas futuras acerca do biovidro F18 fundamentadas nos aspectos físico-químicos, bioquímicos e microbiológicos são importantes para a elucidação dos mecanismos de ação relacionados ao controle dos biofilmes.

REFERÊNCIAS¹

ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 253-273, 2010.

AZENHA, M. R.; PEITL, O.; BARROS, V. M. R. Bone response to Biosilicates with different Crystal phases. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, n. 5, p. 383-9, 2010.

BARI, A. et al. Copper-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles as multifunctional agent for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 55, p. 493-504, 2017.

BLACK, J.; HASTINGS, G. **Handbook of Biomaterial Properties**. London, New York: Chapman & Hall, 1998.

BOZIC, K. J. et al. Comparative epidemiology of revision arthroplasty: failed THA poses greater clinical and economic burdens than failed TKA. **Clinical Orthopaedics and Related Research**[®], v. 473, n. 6, p. 2131–2138, 2015.

BOZIC, K. J. et al. The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the United States. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume**, v. 91, n. 1, p. 128–133, 2009.

CORDERO, J.; MUNUERA, L.; FOLGUEIRA, M. D. Influence of metal implants on infection. An experimental study in rabbits. **The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume**, v. 76, n. 5, p. 717–720, 1994.

CORDERO, J.; MUNUERA, L.; FOLGUEIRA, M. D. The influence of the chemical composition and surface of the implant on infection. **Injury**, v. 27, s. 3, p. S/C34–S/C37, 1996.

COSTERTON, J. W. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. **Clinical Orthopaedics and Related Research**[®], v. 437, p. 7–11, 2005.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 80, p. 1318–1322, 1999.

¹Segundo Diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses da USP. 3ª Edição. Revisada, ampliada e modificada. 2016. Parte I (ABNT) e ABNT NBR 6023.

CROVACE, M. C. et al. Biosilicate® – A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. *In vitro*, *in vivo* and clinical trials. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 432, p. 90-110, 2016.

DEL POZO, J. L.; PATEL, R. Infection associated with prosthetic joints. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 8, p. 787–794, 2009.

FERRERI, I. et al. Silver activation on thin films of Ag–ZrCN coatings for antimicrobial activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 55, p. 547-555, 2015.

GABBAI-ARMELIN, P. R. et al. Characterization and biocompatibility of a fibrous glassy scaffold. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 11, n. 4, p. 1141-1151, 2017.

GALARRAGA-VINUEZA, M. E. et al. Inhibition of multi-species oral biofilm by bromide doped bioactive glass. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 105, n. 7, p. 1994-2003, 2017.

GANGULY, S.; MITCHELL, A. P. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 380-385, 2011.

GÓMEZ-BARRENA, E. et al. Bacterial adherence to separated modular components in joint prosthesis: a clinical study. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 10, p. 1634–1639, 2012.

GROVER, N. et al. Acylase-containing polyurethane coatings with anti-biofilm activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 12, p. 2535-2543, 2016.

HARRISON, P. L. et al. Does tantalum exhibit any intrinsic antimicrobial or antibiofilm properties? **The Bone & Joint Journal**, v. 99-B, n. 9, p. 1153-1156, 2017.

HENCH, L. L. **An Introduction to Bioceramics**. 2 ed. London: Imperial College Press, 2013.

HENCH, L. L. The story of Bioglass®. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 11, p. 967–78, 2006.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Science**, v. 295, p. 1014–1017, 2002.

HENRIQUES, M. et al. Biological properties of Ti-Si- CON thin films. **Journal of Nano Research**, v. 6, p. 99-114, 2009.

HETRICK, E. M.; SCHOENFISCH, M. H. Reducing implant-related infections: active release strategies. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 9, p. 780–789, 2006.

HOLAND, W.; BEALL, G. **Glass-ceramic Technology**. 2 ed. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2012.

HOLINKA, J. et al. Differential bacterial load on components of total knee prosthesis in patients with prosthetic joint infection. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 35, n. 10, p. 735–741, 2012.

HOPPE, A.; GULDAL, N. S.; BOCCACCINI, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2757–2774, 2011.

HOSMAN, A. H. et al. Influence of Co-Cr particles and Co-Cr ions on the growth of *staphylococcal* biofilms. **International Journal of Artificial Organs**, v. 34, n. 9, p. 759-765, 2011.

HOSMAN, A. H. et al. Metal-on-metal bearings in total hip arthroplasties: Influence of cobalt and chromium ions on bacterial growth and biofilm formation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 88, n. 3, p. 711-716, 2009.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 1, p. 4457–4486, 2013.

JONES, J. R.; GENTLEMAN, E.; POLAK, J. Bioactive glass scaffolds for bone regeneration. **Elements**, v. 3, p. 393–399, 2007.

KAUR, G. et al. A review of bioactive glasses: their structure, properties, fabrication and apatite formation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 1, p. 254–274, 2014.

KENNEDY, M. J.; VOLZ, P. A. Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. **Infection and Immunity**, v. 49, n. 3, p. 654-663, 1985.

KUMAMOTO, C. A. *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 608-611, 2002.

KUMAMOTO, C. A. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 386-391, 2011.

KUREK, A. et al. New antibacterial therapeutics and strategies, **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 3–12, 2011.

KYOMOTO, M. et al. Prevention of bacterial adhesion and biofilm formation on a vitamin E-blended, cross-linked polyethylene surface with a poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) layer. **Acta Biomaterialia**, v. 24, p. 24-34, 2015.

LAMAGNI, T. Epidemiology and burden of prosthetic joint infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. suppl. 1, p. i5-i10, 2014.

LASS, R. et al. Bacterial adherence to different components of total hip prosthesis in patients with prosthetic joint infection. **International Orthopaedics**, v. 38, n. 8, p. 1597-602, 2014.

LEWIS, J. S. et al. Assessment of microbial biofilm growth on nanocrystalline diamond in a continuous perfusion environment. **Journal of Manufacturing Science and Engineering**, v. 132, n. 3, p. 030919, 2010.

LI, B. et al. Preparation and antibacterial effect of plasma sprayed wollastonite coatings loading silver. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 2, p. 452–454, 2008.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 665-688 p.

MARTINS, C. H. G. et al. Assessment of antimicrobial effect of Biosilicate[®] against anaerobic, microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 6, p. 1439–1446, 2011.

MOURA, J. et al. *In vitro* osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate[®]). **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 82, n. 3, p. 545-57, 2007.

NEUT, D. et al. A biodegradable gentamicin-hydroxyapatite- coating for infection prophylaxis in cementless hip prostheses. **European Cells & Materials**, v. 29, p. 42-56, 2015.

NEUT, D. et al. A gentamicin-releasing coating for cementless hip prostheses - Longitudinal evaluation of efficacy using *in vitro* bio-optical imaging and its wide-spectrum antibacterial efficacy. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100, n. 12, p. 3220-3226, 2012.

NURYASTUTI, T. et al. Ica-expression and gentamicin susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on orthopedic implant biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 96, n. 2, p. 365-371, 2011.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* — the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 555, 2009.

PARVIZI, J. et al. Frank Stinchfield Award: Titanium Surface with Biologic Activity against Infection. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 429, p. 33-38, 2004.

PEAN, J. E. Des moyens prosthétiques destinés a obtenir la preparation de parties ossueses. **Gazette des Hôpitaux Civils et Militaires de l'Empire Ottoman**, v. 67, p. 291, 1894.

PETTY, W. et al. The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume**, v. 67, n. 8, p. 1236–1244, 1985.

POELSTRA, K. A. et al. Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 60, n. 1, p. 206–215, 2002.

RAHAMAN, M. N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2355–2373, 2011.

RAMAGE, G. et al. Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. **Biomaterials**, v. 24, n. 19, p. 3221-3227, 2003.

RIBEIRO, M.; MONTEIRO, F. J.; FERRAZ, M. P. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. **Biomatter**, v. 2, n. 4, p. 176–194, 2012.

RIBEIRO, M.; MONTEIRO, F. J.; FERRAZ, M. P. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 227–238, 2010.

RORIZ, V. M. et al. Efficacy of bioactive glass-ceramic (Biosilicate®) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, n. 2, p. 148-55, 2010.

SOUZA, M. T. et al. New highly bioactive crystallization-resistant glass for tissue engineering applications. **Translational Materials Research**, v. 4, n. 1, p. 014002, 2017.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *In vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 8, p. 761-767, 2007.

TOMÁŠ, T.; NACHTNEBL, L.; OTIEPKA, P. The relation between implanted material and infection of the total joint replacement. **Orthopaedic Surgery**, v. 80, n. 3, p. 107-122, 2007.

VAN NOORT, R. Titanium: The implant material of today. **Journal of Materials Science**, v. 22, n. 11, p. 3801-11, 1987.

XYNOS, I. D. et al. 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. 461–5, 2000.

APÊNDICE A – Artigo de revisão integrativa a respeito dos biomateriais de próteses de quadril como um desafio na prevenção da formação de biofilme.

Biomateriais de próteses de quadril: um desafio na prevenção da formação de biofilme

Resumo

Objetivo: Identificar as evidências científicas a respeito da prevenção da formação de biofilme em biomateriais de próteses de quadril.

Método: Revisão integrativa da literatura, com vistas a responder a seguinte questão: quais são as evidências científicas a respeito da prevenção da formação de biofilme em biomateriais de próteses de quadril? Realizado no portal *PubMed* da *National Library of Medicine* e nas bases *Web of Science*, *Embase*, *Cochrane*, *CINAHL* e *LILACS*. Incluíram-se estudos primários sobre a temática, publicados online até novembro de 2017 em inglês, espanhol e português.

Resultados: Dos 16 estudos primários analisados, 81,25% foram pesquisas experimentais *in vitro*; polietileno demonstrou maior contagem de unidades formadoras de colônia do que materiais metálicos e polimetilmetacrilato. Dos estudos clínicos, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* foram isolados na maioria dos componentes das próteses articulares. Novos revestimentos constituídos de poliuretano contendo acilase, filmes de prata-carbonitreto de zircônio, gentamicina bioativa, gentamicina-hidroxiapatita biodegradável, vancomicina, filmes de titânio-silício-carbono-oxigênio-nitrogênio e polietileno reticulado combinado com vitamina E e uma camada de poli(2-metacrilóiloxietil fosforilcolina) foram desenvolvidos para prevenção da formação de biofilme. Além disso, íons de cobalto-cromo inibiram o crescimento bacteriano e houve uma tendência das partículas de cobalto-cromo diminuírem o desenvolvimento de biofilmes.

Conclusão: Revestimentos estão sendo desenvolvidos com a finalidade de prevenir a formação de biofilme em próteses de quadril e outros dispositivos médicos.

Palavras-chave: Biofilmes. Prótese de quadril. Artroplastia de quadril.

Introdução

A artroplastia de quadril possibilitou mobilidade, qualidade de vida e alívio da dor de pacientes com distúrbios musculoesqueléticos (LAMAGNI, 2014). Todavia, o aumento destas cirurgias para revisão, mesmo com a melhoria das técnicas e avanço nos desenhos e composição das próteses é um fator que tem gerado preocupação (BOZIC et al., 2015).

Apenas nos Estados Unidos o número de operações de artroplastia total de quadril (ATQ) dobrou em quatro anos, sendo realizadas cerca de 260.000 cirurgias em 2004 e 423.000 em 2008 (VON RECUM, 1998; PUCKETT et al., 2010; WU et al., 2011).

Esse procedimento é passível de complicações, sendo a infecção relacionada ao implante uma das principais, a qual está associada a resultados clínicos da artroplastia restringidos e durabilidade diminuída (BOZIC et al., 2009).

Por tratar-se de infecção em aparelhos médicos de uso prolongado a possibilidade de formação de biofilme é elevada. A formação do biofilme ocorre com a aderência microbiana à superfície e subsequente formação de uma camada extracelular polimérica composta por proteínas, polissacarídeos e outros produtos. Isso torna o biofilme resistente aos antibióticos e inacessível ao sistema imune em comparação aos microrganismos na forma planctônica. O devido controle e compreensão da aderência bacteriana pode prevenir a formação de biofilme, o que gera um menor risco de infecções, visto que o potencial reduzido da aderência significa menor probabilidade de formação de biofilme (LEONHARDT; OLSSON; DAHLEN, 1995; VON RECUM, 1998; DONLAN, 2001; WASELAU, 2002; CAMPOCCIA; MONTANARO; ARCIOLA, 2006; FRÖJD, 2010; PUCKETT et al., 2010; WU et al., 2011).

A infecção de articulação e possível formação de biofilme nos dispositivos médicos devem ser prevenidas, visto que as mesmas são complicações graves, podendo levar a imobilização do paciente, internações prolongadas, morbidade funcional e emocional, além de elevado custo ao sistema de saúde (KLOUCHE; SARIALI; MAMOUDY, 2010).

Nesse sentido, este estudo objetivou identificar as evidências científicas a respeito da prevenção da formação de biofilme em biomateriais de próteses de quadril com a finalidade de contribuir com as medidas de prevenção e controle aos agravos infecciosos, bem como na redução da remoção do dispositivo ortopédico.

Material e métodos

Trata-se de um estudo de revisão integrativa. A escolha do método, baseia-se na capacidade de sumarizar as publicações acerca de determinado assunto, obtendo um entendimento sobre o fenômeno a ser investigado. Para a busca, formulou-se a seguinte questão norteadora: quais são as evidências científicas a respeito da prevenção da formação de biofilme em biomateriais de próteses de quadril?

A busca dos estudos primários foi realizada no portal *PubMed* da *National Library of Medicine* e nas bases *Web of Science*, *Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature* (CINAHL), *Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde* (LILACS), *Embase* e *Cochrane*. A estratégia de busca baseou-se no uso de descritores controlados “Biofilms”, “Hip Prosthesis” e “Arthroplasty, Replacement, Hip”, e os operadores booleanos AND e OR.

Os descritores controlados (*MeSH terms*, Títulos CINAHL, DeCS e *Emtree terms*) e as palavras-chave utilizados de acordo com as bases de dados estão reunidos no quadro 1.

Quadro 1 – Combinação dos descritores controlados e palavras-chave segundo portal e bases de dados utilizadas na busca dos estudos primários.

Portal e bases de dados	Descritores controlados e palavras-chave
<i>PubMed</i> <i>Web of Science</i> <i>Cochrane</i>	“Biofilms” OR “Biofilm” AND “Hip Prosthesis” OR “Hip Prostheses” OR “Prostheses, Hip” OR “Prosthesis, Hip” OR “Femoral Head Prosthesis” OR “Femoral Head Prostheses” OR “Prostheses, Femoral Head” OR “Prosthesis, Femoral Head” AND “Arthroplasty, Replacement, Hip” OR “Arthroplasties, Replacement, Hip” OR “Arthroplasty, Hip Replacement” OR “Hip Prosthesis Implantation” OR “Hip Prosthesis Implantations” OR “Implantation, Hip Prosthesis” OR “Implantations, Hip Prosthesis” OR “Prosthesis Implantation, Hip” OR “Prosthesis Implantations, Hip” OR “Hip Replacement Arthroplasty” OR “Replacement Arthroplasties, Hip” OR “Replacement Arthroplasty, Hip” OR “Arthroplasties, Hip Replacement” OR “Hip Replacement Arthroplasties” OR “Hip Replacement, Total” OR “Replacement, Total Hip” OR “Hip Replacements, Total” OR “Replacements, Total Hip” OR “Total Hip Replacements” OR “Total Hip Replacement”
CINAHL	“Biofilms” OR “Biofilm” AND “Arthroplasty, Replacement, Hip” OR “Hip Prosthesis” OR “Arthroplasties, Replacement, Hip” OR “Arthroplasty, Hip Replacement” OR “Hip Prosthesis Implantation” OR “Hip Prosthesis Implantations” OR

	"Implantation, Hip Prosthesis" OR "Implantations, Hip Prosthesis" OR "Prosthesis Implantation, Hip" OR "Prosthesis Implantations, Hip" OR "Hip Replacement Arthroplasty" OR "Replacement Arthroplasties, Hip" OR "Replacement Arthroplasty, Hip" OR "Arthroplasties, Hip Replacement" OR "Hip Replacement Arthroplasties" OR "Hip Replacement, Total" OR "Replacement, Total Hip" OR "Hip Replacements, Total" OR "Replacements, Total Hip" OR "Total Hip Replacements" OR "Total Hip Replacement" OR "Hip Prostheses" OR "Prostheses, Hip" OR "Prosthesis, Hip" OR "Femoral Head Prosthesis" OR "Femoral Head Prostheses" OR "Prostheses, Femoral Head" OR "Prosthesis, Femoral Head"
LILACS	"BIOFILME" AND "PROTESE DE QUADRIL" OR "ARTROPLASTIA DE QUADRIL"
<i>Embase</i>	"Biofilm" OR "Biofilms" AND "Hip Prosthesis" OR "Hip Prostheses" OR "Prostheses, Hip" OR "Prosthesis, Hip" OR "Femoral Head Prosthesis" OR "Femoral Head Prostheses" OR "Prostheses, Femoral Head" OR "Prosthesis, Femoral Head" AND "Hip Arthroplasty" OR "Arthroplasty, Replacement, Hip" OR "Arthroplasties, Replacement, Hip" OR "Arthroplasty, Hip Replacement" OR "Hip Prosthesis Implantation" OR "Hip Prosthesis Implantations" OR "Implantation, Hip Prosthesis" OR "Implantations, Hip Prosthesis" OR "Prosthesis Implantation, Hip" OR "Prosthesis Implantations, Hip" OR "Hip Replacement Arthroplasty" OR "Replacement Arthroplasties, Hip" OR "Replacement Arthroplasty, Hip" OR "Arthroplasties, Hip Replacement" OR "Hip Replacement Arthroplasties" OR "Hip Replacement, Total" OR "Replacement, Total Hip" OR "Hip Replacements, Total" OR "Replacements, Total Hip" OR "Total Hip Replacements" OR "Total Hip Replacement"

A busca inicial recuperou 237 artigos, sendo 75 estudos duplicados, resultando em 162 estudos primários (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos artigos sobre as implicações do biofilme em biomateriais utilizados em próteses de quadril, excluindo-se os duplicados, segundo portal e bases de dados.

Portal e bases de dados	Quantidade de artigos
<i>PubMed</i>	94
<i>Web of Science</i>	22
CINAHL	3
LILACS	0
<i>Embase</i>	42
<i>Cochrane</i>	1
Total de artigos	162

O fluxograma apresenta as estratégias de busca utilizadas nas bases de dados para seleção dos artigos (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma para seleção dos artigos sobre as implicações do biofilme em biomateriais utilizados em próteses de quadril nas diferentes bases de dados.

Fonte: elaborado pela autora.

Incluíram-se estudos primários sobre a temática, publicados em inglês, espanhol e português publicados online até novembro de 2017. Foram excluídos os artigos que caracterizaram a morfologia do biofilme e sua natureza, tratamento/diagnóstico da infecção, realizados com pérolas/cimento ósseo, artigos de revisão e estudo de caso.

Resultados

Assim, 16 estudos foram selecionados. A partir da análise dos textos selecionados, tem-se quanto ao tipo de publicação 81,25% de pesquisas laboratoriais experimentais *in vitro*, ou seja, estudos que simulam condições biológicas em laboratório e não envolvem seres humanos e animais. De acordo com

o ano de publicação, houve concentração de artigos publicados em 2015 (3/18,75%). O quadro 2 apresenta um sumário das principais informações dos estudos.

Quadro 2 – Sinopse das publicações sobre as implicações do biofilme em biomateriais utilizados em próteses de quadril.

	Ano	Delineamento	Estratégias/recursos	Principais resultados
1	2003	Laboratorial experimental <i>in vitro</i>	Determinar se a superfície de três ligas de titânio (Ti) tem efeito na formação de biofilme	Há diferença do biofilme de <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> nos biomateriais
2	2004	Laboratorial experimental <i>in vitro</i>	Método de ligação da vancomicina à superfície do titânio	Uso de ligação covalente da vancomicina à superfície do titânio preservou a ação bactericida e não alterou a superfície do material
3	2007	Estudo descritivo analítico	Polietileno (PE), cerâmica, superfícies metálicas, cimentadas, híbridas e não cimentadas	As próteses com materiais poliméricos mostraram ser contaminados com mais facilidade. E as próteses não cimentadas com superfícies porosas são contaminadas com menos frequência
4	2009	Laboratorial experimental <i>in vitro</i>	Uso de íons Co-Cr	As concentrações de íons metálicos inibiram o crescimento bacteriano, porém não apresentaram ação bactericida
5	2009	Laboratorial experimental <i>in vitro</i>	Filmes de Ti-Si-C-O-N	A maior concentração de Ti demonstrou menor formação de biofilme, entretanto maior grau de citotoxicidade
6	2010	Laboratorial experimental <i>in vitro</i>	Uso de revestimento diamantado nanocristalino	Não inibiu o crescimento do biofilme por <i>Pseudomonas fluorescens</i> em ambiente de perfusão contínua
7	2011	Laboratorial experimental <i>in vitro</i>	Prótese de PMMA e aço inoxidável	Não há diferença dos biomateriais na formação de biofilme por <i>S. epidermidis</i>
8	2011	Laboratorial experimental <i>in vitro</i>	Íons e partículas de Co-Cr	Há tendência na redução da formação de biofilme por <i>S. aureus</i> na presença das partículas de Co-Cr em comparação com os íons

				metálicos
9	2012	Estudo descritivo analítico	Polietileno de alto peso molecular, hidroxiapatita, liga de titânio e liga de Co-Cr	Não houve diferença na aderência bacteriana nos diferentes biomateriais
10	2012	Laboratorial experimental <i>in vitro</i>	Revestimento bioativo de gentamicina	Evitou com sucesso o crescimento de estafilococos bioluminescentes, além de evidenciar amplo espectro de eficácia antibacteriana
11	2014	Estudo descritivo analítico	Componentes de polietileno de ultra-alto peso molecular, titânio-alumínio-nióbio (Ti6Al7Nb), cerâmica e titânio puro	O polietileno apresentou a maior carga bacteriana, mostrando diferença significativa na distribuição de unidades formadoras de colônia entre os componentes metálicos e de polietileno
12	2015	Laboratorial experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Revestimento biodegradável de gentamicina-hidroxiapatita	Demonstrou eficácia antibacteriana semelhante ao método tradicional (uso de cimento)
13	2015	Laboratorial experimental <i>in vitro</i>	Revestimento de Ag-ZrCN	A ativação da prata é responsável por efeito antimicrobiano nos revestimentos de Ag-ZrCN
14	2015	Laboratorial experimental <i>in vitro</i>	Revestimento de polietileno reticulado misturado com vitamina E enxertado em camada de poli(2-metacrilóiloxietil fosforilcolina)	Reduziu em 100 vezes ou mais o número de bactérias aderidas na superfície do biomaterial
15	2016	Laboratorial experimental <i>in vitro</i>	Revestimento de poliuretano contendo acilase	Inibiu o crescimento bacteriano
16	2017	Laboratorial experimental <i>in vitro</i>	Componente acetabular de tântalo (Ta)	Não apresentou atividade antibacteriana ou anti-biofilme

Relação entre biomateriais e microrganismos

Estudos clínicos realizados para analisar a aderência bacteriana nos diferentes biomateriais de próteses articulares evidenciaram que o polietileno (PE) apresentou maior contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) do que os materiais metálicos e o polimetilmetacrilato (PMMA). *Staphylococcus epidermidis* e

Staphylococcus aureus foram isolados na maioria dos componentes das próteses articulares, sendo *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus aureus* com maior contagem de UFC (TOMÁŠ; NACHTNEBL; OTIEPKA, 2007; NURYASTUTI et al., 2011; GÓMEZ-BARRENA et al., 2012; LASS et al., 2014).

Metais e a formação do biofilme

Em relação à rugosidade do titânio, realizou-se uma pesquisa que comparou a formação de biofilme em três ligas de Ti com rugosidades diferentes, posto que cada liga apresentava acabamento da superfície de acordo com uma determinada região da prótese de quadril. Os resultados revelaram que há diferença na formação de biofilme em biomateriais com rugosidades distintas (RAMAGE et al., 2003). Outro metal estudado foi o tântalo, porém este não apresentou ação antibiofilme em comparação ao titânio (HARRISON et al., 2017).

Revestimentos com antibióticos

Estudo desenvolveu tecnologia para ligação covalente de vancomicina ao titânio sem prejudicar as propriedades biológicas da superfície do metal, demonstrando ação antimicrobiana (PARVIZI et al., 2004). Outros estudos realizados com revestimento de gentamicina e revestimento de gentamicina com hidroxiapatita evidenciaram que os biomateriais desenvolvidos apresentaram amplo espectro antibacteriano (NEUT et al., 2012, 2015).

Influência dos íons na formação do biofilme

Pesquisa avaliou como os íons de cobalto-cromo (Co-Cr) influenciam o crescimento bacteriano e a formação de biofilme. As concentrações de 200.000/93.000 µg/L de Co-Cr reduziram a formação de biofilme em 15% nas amostras com *S. aureus* e 26% nas amostras com *Staphylococcus coagulase* negativa. Além disso, as imagens da microscopia confocal de varredura à laser revelaram que essa concentração de íons acarretou diminuição de 50% da espessura do biofilme (HOSMAN et al., 2009). Estudo semelhante concluiu que partículas de Co-Cr têm ação bacteriostática para *S. aureus* em condições de crescimento dinâmico (HOSMAN et al., 2011).

Novos revestimentos com ação antimicrobiana

Diversas pesquisas foram empreendidas para desenvolver e avaliar novos revestimentos com a capacidade de minimizar a colonização microbiana (PARVIZI et al., 2004; HENRIQUES et al., 2009; LEWIS et al., 2010; NEUT et al., 2012, 2015; FERRERI et al., 2015; KYOMOTO et al., 2015; GROVER et al., 2016). Filmes delgados de prata-carbonitreto de zircônio e revestimentos de polietileno reticulado com vitamina E e uma camada de poli(2-metacrilóiletil fosforilcolina) (HD-CLPE(VE) com PMPC) apresentaram ação antimicrobiana (FERRERI et al., 2015; KYOMOTO et al., 2015). Além disso, biomaterial desenvolvido com uma camada de poliuretano contendo acilase degradou os sinais de *quorum sensing* responsáveis pela comunicação e progressão da formação do biofilme (GROVER et al., 2016). Porém, revestimentos de diamante nanocristalino não evitaram o crescimento de biofilme, e revestimentos de titânio-silício-carbono-oxigênio-nitrogênio que tiveram menos quantidade de biomassa de biofilme apresentaram elevada citotoxicidade (HENRIQUES et al., 2009; LEWIS et al., 2010).

Discussão

Os biomateriais utilizados nas artroplastias de quadril foram estudados para identificar a possível influência dos mesmos na prevenção da formação de biofilmes em próteses de quadril. Evidenciamos a presença de fatores que interferem na formação de biofilme: rugosidade dos metais, ação de revestimentos com antibióticos, diferença na adesão do biofilme em biomateriais distintos, ação dos íons, concentrações diferentes de titânio e prata, ação de revestimentos de HD-CLPE(VE) com PMPC e ação da acilase na interrupção da detecção de *quorum sensing* (RAMAGE et al., 2003; PARVIZI et al., 2004; TOMÁŠ; NACHTNEBL; OTIEPKA, 2007; HENRIQUES et al., 2009; HOSMAN et al., 2009, 2011; NURYASTUTI et al., 2011; GÓMEZ-BARRENA et al., 2012; NEUT et al., 2012, 2015; LASS et al., 2014; FERRERI et al., 2015; KYOMOTO et al., 2015; GROVER et al., 2016).

A erradicação de biofilme após a sua formação é uma dificuldade reconhecida pelos pesquisadores e profissionais de saúde. Tem-se realizado intenso esforço na condução de estudos que visam à prevenção da infecção em próteses e outros dispositivos médicos (ARCIOLA et al., 2012).

Entre os fatores que influenciam na adesão do biofilme, destaca-se a

composição do biomaterial. Nesta revisão identificou-se que o polietileno foi o material com maior aderência do biofilme em relação ao PMMA e aos metais em próteses de quadril, uma vez que os componentes de polietileno apresentaram a maior contagem de UFC (TOMÁŠ; NACHTNEBL; OTIEPKA, 2007; NURYASTUTI et al., 2011; GÓMEZ-BARRENA et al., 2012; HOLINKA et al., 2012; LASS et al., 2014). As partículas e íons de cobalto-cromo liberados devido ao atrito gerado com a movimentação nas articulações artificiais também foram identificados como fatores que interferem na formação do biofilme, diminuindo o seu crescimento (HOSMAN et al., 2009, 2011). No entanto, não há consenso em relação à efetividade desse resultado, visto que em outro estudo partículas de Co-Cr favoreceram o crescimento bacteriano na forma planctônica (ANWAR et al., 2007).

Percebeu-se nos estudos tendência ao desenvolvimento de revestimentos visando à prevenção da formação do biofilme. Entre as estratégias utilizadas destaca-se a incorporação de antibióticos em cimento ortopédico utilizado para fixação. Porém, com o crescente avanço nos modelos de biomateriais que promovem melhor osteointegração, foi necessário o desenvolvimento de uma tecnologia capaz de ligar os antibióticos às próteses não cimentadas. Revestimentos com antibióticos que se ligam ao metal foram desenvolvidos para proporcionar efeito antimicrobiano sem perder as propriedades do biomaterial (PARVIZI et al., 2004; NEUT et al., 2012, 2015).

Além disso, estudos evidenciaram iniciativas de produção de novos biomateriais com ação antibiofilme, mas sem a incorporação de antibióticos. Esta revisão reuniu cinco desses novos revestimentos. Os revestimentos de polietileno reticulado combinado com vitamina E e uma camada de poli(2-metacrilóiletil fosforilcolina), filmes de prata-carbonitreto de zircônio, revestimentos de poliuretano contendo acilase e filmes de Ti-Si-C-O-N tiveram ação antibacteriana. Entretanto, os revestimentos de diamante nanocristalino não apresentaram o mesmo efeito (HENRIQUES et al., 2009; LEWIS et al., 2010; FERRERI et al., 2015; KYOMOTO et al., 2015; GROVER et al., 2016).

Os estafilococos são os patógenos isolados com maior frequência em infecções de próteses. O *Staphylococcus epidermidis* destacou-se como principal bactéria associada às infecções em implantes ortopédicos (NABLO; ROTHROCK; SCHOENFISCH, 2005; ARCIOLA et al., 2012). Os estudos da presente revisão confirmam esses resultados, visto que os microrganismos que apresentaram maior

contagem de UFC nas artroplastias de quadril foram *S. epidermidis*, *S. aureus* e *S. capitis* (TOMÁŠ; NACHTNEBL; OTIEPKA, 2007; NURYASTUTI et al., 2011; GÓMEZ-BARRENA et al., 2012; LASS et al., 2014).

Esta pesquisa apresenta limitações. Os resultados foram restringidos a manuscritos publicados nos idiomas português, espanhol e inglês. Adiciona-se também o fato de nem todos os estudos relatarem o cálculo ou randomização da amostra utilizada.

Conclusão

Percebemos na literatura que a prevenção da formação de biofilmes em próteses de quadril está centrada em iniciativas que buscam desenvolver revestimentos com ação antibiofilme, com a incorporação de antibióticos (gentamicina bioativa, gentamicina-hidroxiapatita biodegradável, vancomicina) ou não (poliuretano contendo acilase, polietileno reticulado combinado com vitamina E e uma camada de poli(2-metacrilóil etil fosforilcolina), filmes de prata-carbonitreto de zircônio e filmes de titânio-silício-carbono-oxigênio-nitrogênio). Além disso, destaca-se a composição do biomaterial, que pode interferir na formação do biofilme devido ao desprendimento de íons e partículas de cobalto-cromo pelo atrito.

Referências

ANWAR, H. A. et al. The effect of metal ions in solution on bacterial growth compared with wear particles from hip replacements. **Bone & Joint Journal**, v. 89, n. 12, p. 1655-1659, 2007.

ARCIOLA, C. R. et al. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 5967-5982, 2012.

BOZIC, K. J. et al. Comparative epidemiology of revision arthroplasty: failed THA poses greater clinical and economic burdens than failed TKA. **Clinical Orthopaedics and Related Research**®, v. 473, n. 6, p. 2131-2138, 2015.

BOZIC, K. J. et al. The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the United States. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume**, v. 91, n. 1, p. 128-133, 2009.

CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. **Biomaterials**, v. 27, n. 11, p. 2331-2339, 2006.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 277, 2001.

FERRERI, I. et al. Silver activation on thin films of Ag–ZrCN coatings for antimicrobial activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 55, p. 547-555, 2015.

FRÖJD, V. **On Ca²⁺ incorporation and nanoporosity of titanium surfaces and the effect on implant performance**. Thesis – Department of Prosthodontics, Malmö University, Malmö, 2010.

GÓMEZ-BARRENA, E. et al. Bacterial adherence to separated modular components in joint prosthesis: a clinical study. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 10, p. 1634-1639, 2012.

GROVER, N. et al. Acylase-containing polyurethane coatings with anti-biofilm activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 12, p. 2535-2543, 2016.

HARRISON, P. L. et al. Does tantalum exhibit any intrinsic antimicrobial or antibiofilm properties? **Bone Joint Journal**, v. 99, n. 9, p. 1153-1156, 2017.

HENRIQUES, M. et al. Biological properties of Ti-Si-CON thin films. **Journal of Nano Research**, v. 6, p. 99-114, 2009.

HOLINKA, J. et al. Differential bacterial load on components of total knee prosthesis in patients with prosthetic joint infection. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 35, n. 10, p. 735-741, 2012.

HOSMAN, A. H. et al. Metal-on-metal bearings in total hip arthroplasties: Influence of cobalt and chromium ions on bacterial growth and biofilm formation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 88, n. 3, p. 711-716, 2009.

HOSMAN, A. H. et al. Influence of Co-Cr particles and Co-Cr ions on the growth of *staphylococcal* biofilms. **International Journal of Artificial Organs**, v. 34, n. 9, p. 759-765, 2011.

KLOUCHE, S.; SARIALI, E.; MAMOUDY, P. Total hip arthroplasty revision due to infection: a cost analysis approach. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**, v. 96, n. 2, p. 124-132, 2010.

KYOMOTO, M. et al. Prevention of bacterial adhesion and biofilm formation on a vitamin E-blended, cross-linked polyethylene surface with a poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) layer. **Acta Biomaterialia**, v. 24, p. 24-34, 2015.

LAMAGNI, T. Epidemiology and burden of prosthetic joint infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. suppl_1, p. i5-i10, 2014.

LASS, R. et al. Bacterial adherence to different components of total hip prosthesis in patients with prosthetic joint infection. **International Orthopaedics**, v. 38, n. 8, p. 1597-1602, 2014.

LEONHARDT, A.; OLSSON, J.; DAHLEN, G. Bacterial colonization on titanium, hydroxyapatite, and amalgam surfaces *in vivo*. **Journal of Dental Research**, v. 74, n. 9, p. 1607-1612, 1995.

LEWIS, J. S. et al. Assessment of microbial biofilm growth on nanocrystalline diamond in a continuous perfusion environment. **Journal of Manufacturing Science and Engineering**, v. 132, n. 3, p. 030919, 2010.

NABLO, B. J.; ROTHROCK, A. R.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide-releasing sol-gels as antibacterial coatings for orthopedic implants. **Biomaterials**, v. 26, p. 917-924, 2005.

NEUT, D. et al. A biodegradable gentamicin-hydroxyapatite-coating for infection prophylaxis in cementless hip prostheses. **European Cells & Materials**, v. 2, n. 29, p. 42-55, 2015.

NEUT, D. et al. A gentamicin-releasing coating for cementless hip prostheses - Longitudinal evaluation of efficacy using *in vitro* bio-optical imaging and its wide-spectrum antibacterial efficacy. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100, n. 12, p. 3220-3226, 2012.

NURYASTUTI, T. et al. Ica-expression and gentamicin susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on orthopedic implant biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 96, n. 2, p. 365-371, 2011.

PARVIZI, J. et al. Frank Stinchfield Award: Titanium Surface with Biologic Activity against Infection. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 429, p. 33-38, 2004.

PUCKETT, S. D. et al. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 706-713, 2010.

RAMAGE, G. et al. Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. **Biomaterials**, v. 24, n. 19, p. 3221-3227, 2003.

TOMÁŠ, T.; NACHTNEBL, L.; OTIEPKA, P. The relation between implanted material and infection of the total joint replacement. **Orthopaedic Surgery**, v. 80, n. 3, p. 107-122, 2007.

VON RECUM, A. F. **Handbook of biomaterials evaluation: scientific, technical and clinical testing of implant materials**. 2. ed. Philadelphia: CRC Press, 1998.

WASELAU, M. **Aseptic loosening of titanium-aluminum-vanadium-implants**: a possible explanation at the level of clinical, histological and biochemical evaluations; preliminary *in vivo* study. Thesis – Zentralstelle der Studentenschaft, University of Zurich, Zurich, 2002.

WU, Y. et al. Differential response of *Staphylococci* and osteoblasts to varying titanium surface roughness. **Biomaterials**, v. 32, n. 4, p. 951-960, 2011.

APÊNDICE B – Áreas do titânio (Ti), em porcentagens, recobertas com biofilme de *S. epidermidis* (Se) após 2 (2h), 4 (4h) e 8 horas (8h) de incubação.

Amostras	TiSe2h	TiSe4h	TiSe8h
1	0,090	0,100	0,153
2	0,091	0,085	0,143
3	0,117	0,089	0,144
4	0,173	0,114	0,113
5	0,153	0,117	0,873
6	0,113	0,140	0,090
7	0,078	0,116	0,216
8	0,121	0,119	0,143
9	0,113	0,179	0,232
10	0,128	0,731	0,146
11	0,145	0,206	0,119
12	0,089	0,140	0,121
13	0,079	0,119	0,128
14	0,078	0,150	0,149
15	0,063	0,151	0,174
16	0,089	0,149	0,169
17	0,119	0,072	0,164
18	0,074	0,280	0,155
19	0,113	0,100	0,164
20	0,087	0,092	0,152
21	0,249	0,271	0,169
22	0,119	0,158	0,162
23	0,793	0,116	0,158
24	0,097	0,378	0,266
25	0,093	0,086	0,244
26	0,101	0,171	0,305
27	0,088	0,098	0,359
28	0,120	0,088	0,387
29	0,079	0,176	0,262
30	0,082	1,436	0,083
31	0,066	0,622	0,107
32	0,067	0,941	0,108
33	0,075	0,285	0,121
34	0,094	0,128	0,137
35	0,117	0,134	0,124
36	0,141	0,061	0,222
37	0,103	0,134	0,230
38	0,116	0,120	0,241
39	0,093	0,074	0,207
40	0,076	0,060	0,142
41	0,082	0,087	0,949
42	0,094	0,087	0,320
43	0,077	0,076	0,145
44	0,091	0,104	0,120
45	0,184	0,095	0,150
46	0,127	0,125	0,323
47	0,088	0,078	0,242
48	0,132	0,067	0,494
49	0,089	0,125	0,288
50	0,142	0,078	0,098
51	0,075	0,079	0,106
52	0,083	0,102	0,093
53	0,062	0,113	0,104
54	0,079	0,069	0,126
55	0,072	0,079	0,182
56	0,085	0,120	0,181
57	0,146	0,074	0,130
58	0,154	0,073	0,104
59	0,174	0,079	0,098
60	0,069	0,098	0,176

APÊNDICE C – Áreas do titânio revestido com biovidro F18 (F18), em porcentagens, recobertas com biofilme de *S. epidermidis* (Se) após 2 (2h), 4 (4h) e 8 horas (8h) de incubação.

Amostras	F18Se2h	F18Se4h	F18Se8h
1	0,098	0,121	0,117
2	0,137	0,119	0,084
3	0,121	0,114	0,098
4	0,124	0,100	0,097
5	0,067	0,097	0,179
6	0,088	0,100	0,135
7	0,123	0,175	0,158
8	0,125	0,148	0,147
9	0,119	0,163	0,134
10	0,119	0,126	0,230
11	0,102	0,149	0,204
12	0,118	0,086	0,069
13	0,128	0,092	0,104
14	0,120	0,094	0,206
15	0,117	0,089	0,177
16	0,120	0,079	0,177
17	0,171	0,091	0,207
18	0,087	0,118	0,182
19	0,113	0,130	0,166
20	0,111	0,085	0,168
21	0,104	0,107	0,148
22	0,087	0,144	0,062
23	0,066	0,115	0,073
24	0,077	0,169	0,111
25	0,068	0,192	0,083
26	0,129	0,165	0,096
27	0,109	0,155	0,162
28	0,073	0,128	0,090
29	0,092	0,104	0,125
30	0,082	0,151	0,110
31	0,106	0,100	0,126
32	0,080	0,093	0,193
33	0,090	0,114	0,165
34	0,080	0,180	0,121
35	0,090	0,106	0,091
36	0,115	0,133	0,136
37	0,116	0,115	0,079
38	0,137	0,097	0,113
39	0,116	0,077	0,066
40	0,108	0,102	0,091
41	0,092	0,099	0,074
42	0,108	0,107	0,080
43	0,075	0,094	0,145
44	0,166	0,142	0,130
45	0,105	0,089	0,112
46	0,093	0,099	0,142
47	0,099	0,094	0,092
48	0,113	0,117	0,133
49	0,116	0,135	0,105
50	0,104	0,112	0,141
51	0,104	0,103	0,091
52	0,121	0,107	0,423
53	0,083	0,120	0,129
54	0,112	0,096	0,082
55	0,104	0,099	0,134
56	0,111	0,113	0,166
57	0,095	0,102	0,087
58	0,104	0,134	0,108
59	0,098	0,129	0,081
60	0,098	0,087	0,101

APÊNDICE D – Áreas do titânio (Ti), em porcentagens, recobertas com biofilme de *C. albicans* (Ca) após 2 (2h), 4 (4h) e 8 horas (8h) de incubação.

Amostras	TiCa2h	TiCa4h	TiCa8h
1	2,583	7,257	20,052
2	2,673	6,469	50,242
3	2,209	7,847	49,605
4	0,875	7,206	28,430
5	4,687	8,390	33,008
6	2,128	9,764	34,669
7	1,089	8,614	33,487
8	6,261	5,838	36,645
9	4,774	7,126	34,136
10	3,428	6,060	27,694
11	2,307	6,224	24,704
12	1,587	5,980	71,853
13	7,347	9,133	7,432
14	7,591	6,147	17,568
15	3,447	5,916	7,364
16	4,746	7,897	9,652
17	4,503	6,983	7,902
18	3,440	6,124	9,439
19	2,205	7,863	12,599
20	1,961	8,147	8,963
21	2,173	15,429	48,917
22	3,141	11,764	23,105
23	5,052	14,526	22,322
24	6,746	15,494	36,646
25	4,585	12,615	28,643
26	6,751	22,242	74,908
27	3,262	27,932	57,256
28	7,259	14,446	34,142
29	3,202	14,504	34,306
30	4,324	22,605	18,660
31	4,572	10,034	28,904
32	6,728	20,488	33,106
33	4,802	24,525	21,767
34	2,895	18,445	25,280
35	3,269	5,609	33,188
36	2,236	11,490	37,982
37	4,625	14,697	41,445
38	1,822	8,080	34,378
39	3,293	13,053	32,764
40	3,134	7,622	71,398
41	13,830	13,860	50,289
42	11,797	16,375	44,818
43	7,656	6,330	76,635
44	7,949	17,860	63,114
45	5,416	10,049	17,277
46	17,738	9,654	25,258
47	16,264	20,067	26,819
48	13,466	4,111	35,095
49	11,715	10,664	52,044
50	6,645	38,845	26,573
51	5,362	20,209	44,694
52	3,290	23,877	16,033
53	7,273	15,724	23,812
54	9,578	10,988	31,254
55	6,114	19,362	23,590
56	10,453	9,747	30,756
57	1,958	5,612	17,047
58	3,640	7,611	43,790
59	2,863	13,892	66,220
60	3,875	7,750	46,718

APÊNDICE E – Áreas do titânio revestido com biovidro F18 (F18), em porcentagens, recobertas com biofilme de *C. albicans* (Ca) após 2 (2h), 4 (4h) e 8 horas (8h) de incubação.

Amostras	F18Ca2h	F18Ca4h	F18Ca8h
1	2,809	17,567	8,975
2	6,465	24,579	26,700
3	6,216	7,511	11,755
4	3,743	5,909	19,884
5	5,931	11,288	14,653
6	6,733	7,007	15,157
7	5,227	10,693	19,332
8	4,926	15,723	13,435
9	5,713	12,478	18,397
10	5,695	7,806	12,155
11	8,229	16,983	18,006
12	2,674	12,209	22,653
13	3,480	7,130	21,426
14	5,536	8,173	5,436
15	5,671	4,864	14,699
16	1,537	12,671	23,189
17	5,129	15,008	10,899
18	1,539	11,453	19,641
19	3,000	7,152	15,947
20	3,364	14,728	17,059
21	5,682	10,576	13,160
22	4,966	5,634	17,438
23	9,257	9,147	9,581
24	6,288	14,278	9,815
25	1,164	14,129	15,045
26	1,058	13,119	19,851
27	2,608	20,274	23,397
28	9,005	14,522	20,517
29	5,864	18,074	14,602
30	5,806	5,066	15,215
31	6,569	7,749	16,340
32	5,433	8,605	12,457
33	2,184	13,298	18,426
34	4,779	17,783	14,306
35	2,473	11,908	14,636
36	3,790	10,917	32,314
37	2,200	10,316	25,236
38	3,632	34,787	25,273
39	4,308	20,005	20,494
40	6,258	16,695	27,502
41	13,279	18,819	12,121
42	9,173	18,799	13,678
43	7,106	21,056	16,151
44	13,308	21,455	21,965
45	3,705	23,488	26,684
46	3,256	23,562	23,356
47	6,788	23,228	23,602
48	11,647	13,797	19,519
49	9,757	27,491	13,541
50	2,531	18,443	18,584
51	9,108	18,588	16,273
52	10,714	17,386	12,898
53	2,250	11,274	16,779
54	5,994	18,438	11,828
55	14,333	19,017	15,439
56	8,666	18,301	19,728
57	9,295	16,225	31,397
58	10,779	11,854	28,918
59	3,990	23,566	31,360
60	3,631	24,056	31,882