FLÁVIO FERRAZ DE CAMPOS JÚNIOR

**FORMAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO SOBRE
POLIMETILMETACRILATO USADO COMO CIMENTO
ÓSSEO.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Bioengenharia.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto.

São Carlos,
2009

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

FLAVIO FERRAZ DE CAMPOS JUNIOR
MESTRADO EM BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA
EESC – FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 10/09/2009

PROFA. DRA. ELISABETH LOSHCHAGIN
PIZZOLITTO (ORIENTADORA)

Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho"

Julgamento: aprovado

Assinatura:

PROF. DR. ORIVALDO LOPES DA SILVA

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

Julgamento: aprovado

Assinatura:

PROF. DR. ADILSON CESAR ABREU
BERNARDI

Centro Universitário de Araraquara -
UNIARA

Julgamento: aprovado

Assinatura:

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Flávio e Lourdes, por todo apoio, dedicação, compreensão,
confiança e amor que sempre depositaram sobre meus sonhos.
Sem vocês, nada disso teria acontecido. Amo vocês. Obrigado por tudo.*

AGRADECIMENTOS

A minha irmã, Karen, por todo carinho, apoio, compreensão prestado durante estes 2 anos de mestrado.

Ao meu grande amigo e companheiro de trabalho, de pesquisa e viagens, Cássio Antonio Lanfredi dos Santos. O meu muito obrigado por todos os finais-de-semana que passamos juntos no Laboratório de Microbiologia Clínica desenvolvendo pesquisas. Conte sempre comigo.

Aos meus colegas de mestrado, Bruna de Arruda Leite, Ana Cristina Basso, Milena Mioralli, Gabriela de Souza Bettio que durante esses dois anos de trabalho, pesquisa e dedicação à microbiologia sempre me auxiliaram e me incentivaram a acreditar na pesquisa.

Aos funcionários do setor de Microbiologia Clínica do CRD/NAC: Benedita Reis de Abreu e Aline Raquel Voltan, pela colaboração profissional e pessoal dadas para a conclusão deste trabalho. “Ditinha, muito obrigado!!!”.

Ao Engenheiro Tomaz Puga Leivas, chefe da Comissão de Projetos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas, pelo apoio e dedicação durante todo desenvolvimento do projeto de mestrado.

Ao grande amigo, Paulo José Martins Bispo, que me auxiliou e cedeu as cepas ATTCs utilizadas na realização de toda parte prática do projeto.

Ao biólogo da Bioengenharia e amigo, Nelson Ferreira da Silva Júnior, pelos conselhos, incentivos e pelas horas de conversas.

Aos amigos da Bioengenharia: Alessandro, Uziel, Ana Elisa e Vitor.

Ao funcionário, Sebastião Anésio Dametto, pela colaboração prestada durante todo o processo de Microscopia Eletrônica de Varredura, realizada no Instituto de Química da UNESP, Araraquara/SP.

Ao professor e amigo, Adilson César de Abreu Bernardi, por todos os ensinamentos passados sobre microbiologia, e também, por ter acreditado em meu potencial.

As amigas do Hemonúcleo de Araraquara, Jamile, Cristina Marta e Cristiane Viola pelo incentivo e confiança.

Aos meus grandes amigos, Marcelo Cremonez, Jader Moreno, Assad Samour, Renan Sulaiman, Juliano Chaker, Fernanda Sanchez, Paulo Barreto Júnior, Luciane Loesch, Joice Soares, Fernando Cardoso, Fernando Portela, Thais Basílio, Victor Hugo Lollato e Carlos Mellaci Jr., pelo incentivo, confiança e carinho depositados a mim.

A Deus por me abençoar e iluminar minha vida.

Obrigado a todos que acreditaram em meu sonho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A professora Doutora Elisabeth Loshchagin Pizzolitto por todo apoio, incentivo, determinação, ensinamentos, paciência, calma e carinho para comigo. Obrigado por ter acreditado e lutado comigo durante esses anos. Lembrarei da senhora com muito carinho, respeito e admiração durante toda minha vida. Uma excelente profissional, excelente pesquisadora e um excelente ser humano. Obrigado por tudo.

Que o amor à pesquisa, à microbiologia, aos biofilmes e aos alunos NUNCA acabem!

Aprendi que se aprende errando.

*Que crescer não significa fazer aniversário, que o silêncio é a melhor resposta.
Aprendi que amigo a gente conquista mostrando o que somos e que os verdadeiros
amigos sempre ficam com você até o fim.*

*Que a natureza é a coisa mais bela da vida, que amar significa se dar por inteiro.
Que um só dia pode ser mais importante do que muitos anos.*

*Aprendi que se pode conversar com as estrelas, com a lua; que se pode viajar
além do infinito e que ouvir uma palavra de carinho faz bem à saúde.*

*Que dar um carinho também faz. Que sonhar é preciso. Que se deve ser criança
a vida toda. Que Deus não proíbe nada em nome do amor.*

E finalmente aprendi que não se pode morrer, para se aprender a viver.

Fernando Pessoa

RESUMO

CAMPOS JÚNIOR, F. F. **Formação de biofilme bacteriano em polimetilmetacrilato usado como cimento ósseo.** 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - EESC/FMRP/IQSC-USP, São Carlos, 2009.

A infecção bacteriana é a principal complicação que um procedimento de artroplastia de quadril ou joelho pode apresentar. Mesmo após a incorporação de antibiótico (gentamicina) ao cimento ósseo, as taxas de infecções após este procedimento cirúrgico continuam gerando sérios prejuízos para o hospital e para o paciente. As principais bactérias envolvidas nas infecções relacionadas aos implantes ortopédicos são *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aderência e formação de biofilme de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* sobre o cimento ósseo polimetilmetacrilato (PMMA) com e sem antibiótico (gentamicina), de procedência nacional e internacional, por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) e por cultura. Também, estimar quantitativamente as células viáveis recuperadas dos biofilmes formados. Foram produzidos discos de polimetilmetacrilato de 10,0mm de diâmetro e 3,0mm de espessura. Foram utilizadas cepas *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* – ATCC 12228 e *Staphylococcus aureus* – ATCC 25932. Para este estudo foram utilizados corpos-de-prova de cimento ósseo de procedência nacional (BAUMER, CMM e BIOMECHANICA) e internacional (BIOMET com gentamicina, BIOMET sem gentamicina e SIMPLEX). Biofilmes foram produzidos *in vitro* a partir da inoculação da suspensão bacteriana (10^8 Unidades Formadoras de Colônia/mL) em *Tryptic Soy Broth* e incubados nos períodos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas. Após os períodos de incubação os corpos-de-prova foram removidos do meio de cultura, lavados, sonificados e do sobrenadante realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}). A seguir, os corpos-de-prova foram preparados para observação por MEV. Os resultados de MEV mostraram bacilos e cocos aderidos e agrupados formando biofilme. Para *P. aeruginosa*: as contagens das células viáveis em média (UFC/mL) foram de $2,8 \pm 1,7 \times 10^6$ (BAUMER), $1,7 \pm 0,9 \times 10^6$ (BIOMECHANICA), $1,7 \pm 0,7 \times 10^6$ (CMM), $1,6 \pm 0,7 \times 10^6$ (BIOMET sem gentamicina), $6,0 \pm 5,5 \times 10^4$ (BIOMET com gentamicina) e $1,9$

$\pm 0,9 \times 10^6$ (SIMPLEX); para *S. epidermidis*: $1,3 \pm 0,1 \times 10^6$ (BAUMER), $1,5 \pm 0,2 \times 10^6$ (BIOMECANICA), $2,3 \pm 1,7 \times 10^6$ (CMM), $1,5 \pm 0,7 \times 10^6$ (BIOMET sem gentamicina), $1,5 \pm 0,2 \times 10^6$ (BIOMET com gentamicina) e $1,2 \pm 0,1 \times 10^6$ (SIMPLEX); para *S. aureus*: $1,7 \pm 0,8 \times 10^6$ (BAUMER), $1,6 \pm 0,7 \times 10^6$ (BIOMECANICA), $1,4 \pm 0,6 \times 10^6$ (CMM), $1,1 \pm 0,5 \times 10^6$ (BIOMET sem gentamicina), $3,0 \pm 6,0 \times 10^5$ (BIOMET com gentamicina) e $1,3 \pm 0,6 \times 10^6$ (SIMPLEX), respectivamente. Os dados obtidos mostraram que o cimento ósseo de polimetilmetacrilato com e sem gentamicina não evitaram a aderência da *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* e formação de biofilme, como demonstrado pela MEV. Em conclusão, isto é um fator de risco para infecções.

Palavra-chave: cimento ósseo; polimetilmetacrilato; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus aureus*; biofilme; gentamicina.

ABSTRACT

CAMPOS JÚNIOR, F. F. **Formation of bacterial biofilm on polymethylmetacrylate used as bone cement.** 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - EESC/FMRP/IQSC-USP, São Carlos, 2009.

The bacterial infection is the main complication of a procedure for hip or knee arthroplasty can present. Even after the addition of antibiotic (gentamicin) in the bone cement, the rates of infection after the surgical procedure continue causing serious damage to the hospital and the patient. The main bacteria involved in infections related to orthopedic implants are *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The objective of this study was to evaluate the adhesion and biofilm formation of the *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* on the bone cement polymethylmethacrylate (PMMA) with and without antibiotic (gentamicin) from national and international origin, by means scanning electron microscope (SEM) and by culture. Also, quantitatively estimate the viable cells recovered from biofilms formed. Discs of cement were produced from 10.0 mm in diameter and 3.0 mm thick. Strains used were *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* - ATCC 12228 and *Staphylococcus aureus* - ATCC 25932. For this study we used coupons cement of national origin (Baumer, CMM and biomechanics) and international (BIOMET with gentamicin, BIOMET without gentamicin and SIMPLEX). Biofilms were produced in vitro from the inoculation of bacterial suspension (10^8 Colony-Forming Units/mL) in Tryptic Soy Broth and incubated for the time periods of 1, 6, 24, 48 and 72 hours. After the incubation periods of the coupons they were removed from the medium culture, washed, sonicated and serial dilutions of supernatant taken (10^{-1} to 10^{-5}). Next, the coupons were prepared for observation by SEM. The results of SEM showed adherent cocci and bacilli, and adhered to each other form a biofilm. For *P. aeruginosa*: the counting of viable cells on average (CFU / mL) were $2.8 \pm 1,7 \times 10^6$ (BAUMER), $1,7 \pm 0,9 \times 10^6$ (BIOMECHANICA), $1,7 \pm 0,7 \times 10^6$ (CMM), $1,6 \pm 0,7 \times 10^6$ (BIOMET without gentamicin), $6,0 \pm 5,5 \times 10^4$ (BIOMET with gentamicin) and $1,9 \pm 0,9 \times 10^6$ (SIMPLEX), to *S. epidermidis*: $1,3 \pm 0,1 \times 10^6$ (BAUMER), $1,5 \pm 0,2 \times 10^6$

(BIOMECANICA), $2,3 \pm 1,7 \times 10^6$ (CMM), $1,5 \pm 0,7 \times 10^6$ (BIOMET without gentamicin), $1,5 \pm 0,2 \times 10^6$ (BIOMET with gentamicin) and $1,2 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ (SIMPLEX), to *S. aureus*: $1,7 \pm 0,8 \times 10^6$ (BAUMER), $1,6 \pm 0,7 \times 10^6$ (BIOMECANICA), $1,4 \pm 0,6 \times 10^6$ (CMM), $1,1 \pm 0,5 \times 10^6$ (BIOMET without gentamicin), $3,0 \pm 6,0 \times 10^5$ (BIOMET with gentamicin) and $1,3 \pm 0,6 \times 10^6$ (SIMPLEX), respectively. The data showed that of polymethylmethacrylate bone cement with and without gentamicin did not prevent the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* and formation of biofilms, as demonstrated by SEM. In conclusion, this is risk factor for infections.

Keywords: bone cement; polymethylmetacrylate; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus aureus*; biofilm; gentamicin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Preparo do Cimento ósseo durante procedimento cirúrgico. PMMA em pó.	28
Figura 2 – Adição do MMA líquido ao PMMA em pó.	28
Figura 3 – Homogeneização do PMMA ao MMA.	29
Figura 4 – Inserção da massa homogênea (PMMA + MMA) no componente de armazenamento da pistola retrógrada.	29
Figura 5 – Inserção da massa homogênea no canal do fêmur.	30
Figura 6 – Esquema demonstrativo da interface implante - cimento ósseo – osso.	30
Figura 7 – O ciclo de vida do biofilme	32
Figura 8 – Goniômetro	47
Figura 9 – Foto real de várias marcas do produto usado na fabricação do cimento ósseo.	48
Figura 10 – Foto real do corte de discos de cimento ósseo.	49
Figura 11 – Esquema mostrando a amostra do biomaterial inoculado em meio de cultura e o procedimento de diluição seriada.	52
Figura 12 – Representação do ângulo de contato.	55
Figura 13 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BAUMER após incubação com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em vários intervalos de tempo.	61
Figura 14 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina após incubação com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em vários intervalos de tempo.	62
Figura 15 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina após incubação com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em vários intervalos de tempo.	63
Figura 16 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMECANICA após incubação com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em vários intervalos de tempo.	64

Figura 17 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina após incubação com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em vários intervalos de tempo.	65
Figura 18 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca SIMPLEX após incubação com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em vários intervalos de tempo.	66
Figura 19 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BAUMER após incubação com <i>Staphylococcus epidermidis</i> em vários intervalos de tempo.	72
Figura 20 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina após incubação com <i>Staphylococcus epidermidis</i> em vários intervalos de tempo.	73
Figura 21 - Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina após incubação com <i>Staphylococcus epidermidis</i> em vários intervalos de tempo.	74
Figura 22 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMECANICA após incubação com <i>Staphylococcus epidermidis</i> em vários intervalos de tempo.	75
Figura 23 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca CMM após incubação com <i>Staphylococcus epidermidis</i> em vários intervalos de tempo.	76
Figura 24 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca SIMPLEX após incubação com <i>Staphylococcus epidermidis</i> em vários intervalos de tempo.	77
Figura 25 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BAUMER após incubação com <i>Staphylococcus aureus</i> em vários intervalos de tempo.	83
Figura 26 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina após incubação com <i>Staphylococcus aureus</i> em vários intervalos de tempo.	84
Figura 27 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina após incubação com <i>Staphylococcus aureus</i> em vários intervalos de tempo.	85

Figura 28 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMECANICA após incubação com <i>Staphylococcus aureus</i> em vários intervalos de tempo.	86
Figura 29 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca CMM após incubação com <i>Staphylococcus aureus</i> em vários intervalos de tempo.	87
Figura 30 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca SIMPLEX após incubação com <i>Staphylococcus aureus</i> em vários intervalos de tempo.	88
Figura 31 – Média das UFC/mL recuperadas das superfícies dos cimentos ósseos de diferentes procedências.	89
Figura 32 – Eletromicrografia de varredura da topografia da superfície do corpo-de-prova da marca BAUMER.	90
Figura 33 – Eletromicrografia de varredura da topografia da superfície do corpo-de-prova da marca BIOMET com gentamicina	90
Figura 34 – Eletromicrografia de varredura da topografia da superfície do corpo-de-prova da marca BIOMET sem gentamicina.	91
Figura 35 – Eletromicrografia de varredura da topografia da superfície do corpo-de-prova da marca BIOMECANICA.	91
Figura 35 – Eletromicrografia de varredura da topografia da superfície do corpo-de-prova da marca CMM.	92
Figura 36 – Eletromicrografia de varredura da topografia da superfície do corpo-de-prova da marca SIMPLEX.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aderência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aos cimentos ósseos com e sem gentamicina.	56
Tabela 2 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> formado sobre discos de cimento ósseo de diferentes marcas com e sem gentamicina.	57
Tabela 3 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre o cimento ósseo da marca BAUMER.	57
Tabela 4 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre o cimento ósseo da marca BIOMECANICA.	58
Tabela 5 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre o cimento ósseo da marca CMM.	58
Tabela 6 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre o cimento ósseo da marca SIMPLEX.	59
Tabela 7 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre o cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina.	59
Tabela 8 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre o cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina.	60
Tabela 9 – Distribuição das médias e desvio padrão das unidades formadoras de colônia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre diferentes marcas nacionais de cimento ósseo com e sem gentamicina de diferentes procedências.	60
Tabela 10 – Aderência de <i>Staphylococcus epidermidis</i> a cimentos ósseos com e sem gentamicina.	67

Tabela 11 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i> formado sobre discos de cimento ósseo de diferentes marcas com e sem gentamicina.	68
Tabela 12 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i> sobre o cimento ósseo da marca BAUMER.	68
Tabela 13 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i> sobre o cimento ósseo da marca BIOMECANICA.	69
Tabela 14 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i> sobre o cimento ósseo da marca CMM.	69
Tabela 15 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i> sobre o cimento ósseo da marca SIMPLEX.	70
Tabela 16 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i> sobre o cimento ósseo de procedência internacional.	70
Tabela 17 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i> sobre o cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina.	71
Tabela 18 – Distribuição das médias e desvio padrão das unidades formadoras de colônia de <i>Staphylococcus epidermidis</i> sobre diferentes marcas nacionais de cimento ósseo com e sem gentamicina.	71
Tabela 19 – Aderência de <i>Staphylococcus aureus</i> a cimentos ósseos com e sem gentamicina.	78
Tabela 20 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> formado sobre discos de cimento ósseo de diferentes marcas com e sem gentamicina.	79
Tabela 21 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> sobre o cimento ósseo da marca BAUMER.	79

Tabela 22 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> sobre o cimento ósseo da marca BIOMECANICA.	80
Tabela 23 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> sobre o cimento ósseo da marca CMM.	80
Tabela 24 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> sobre o cimento ósseo da marca SIMPLEX.	81
Tabela 25 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> sobre o cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina.	81
Tabela 26 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> sobre o cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina.	82
Tabela 27 – Distribuição das médias e desvio padrão das unidades formadoras de colônia de <i>Staphylococcus aureus</i> sobre diferentes marcas nacionais de cimento ósseo com e sem gentamicina.	82
Tabela 28 – Distribuição das médias dos ângulos de contato e desvio padrão dos cimentos ósseos com e sem gentamicina.	93

SUMÁRIO

	21
1 – INTRODUÇÃO	
2 – REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 – Cimento ósseo - polimetilmetacrilato (PMMA)	24
2.2 – Infecções relacionadas a implantes ortopédicos	31
3 – OBJETIVOS	42
4 – MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 – Material	43
4.1.1 – Cimento ósseo a base de polimetilmetacrilato (PMMA) de procedência nacional (CMM de baixa viscosidade, BIOMECANICA, BAUMER) e internacional (BIOMET com gentamicina, BIOMET sem gentamicina, SIMPLEX).	43
4.1.2 – Microrganismos	43
4.1.3 – Meios de Cultura	43
4.1.3.1. – Ágar Mueller-Hinton (DIFCO)	44
4.1.3.2 – <i>Tryptic Soy Agar</i> (TSA)	44
4.1.3.3 – Tryptic Soy Broth (TSB)	44
4.1.4 – Reagentes utilizados no preparo dos corpos-de-prova para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
4.1.4.1 – Tampão Fosfato 0,2M (pH 7,1)	45
4.1.4.2 – Solução A	45
4.1.4.3 – Solução B	45
4.1.4.4 – Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1)	45
4.1.4.5 – Solução Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1) – Glutaraldeído a 2,5%	45
4.1.4.6 – Solução de etanol a 15%	45
4.1.4.7 – Solução de etanol a 30%	45
4.1.4.8 – Solução de etanol a 50%	46
4.1.4.9 – Solução de etanol a 70%	46
4.1.4.10 – Solução de etanol a 95%	46

4.1.4.11 – Etanol absoluto	46
4.1.4.12 – Salina fisiológica a 0,85%	46
4.1.5 – Goniômetro	47
4.1.6 – Análise Estatística	47
4.2. MÉTODOS	48
4.2.1 – Corpos-de-prova de PMMA	48
4.2.2 – Preparo do inóculo bacteriano	50
4.2.3 – Formação de biofilme bacteriano sobre cimento ósseo autopolimerizante de polimetilmetacrilato com e sem antibiótico	50
4.2.4 – Diluições seriadas	51
4.2.5 - Método do espalhamento em placa (plaqueamento em superfície)	53
4.2.6 – Análise das superfícies de PMMA, após a aderência bacteriana inicial e formação do biofilme, por meio de microscópio eletrônico de varredura – MEV	53
4.2.7 – Análise da Molhabilidade	53
4.2.7 – Análise Estatística	55
5 – RESULTADOS	56
5.1 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
5.1.1 – Da aderência de <i>P. aeruginosa</i> sobre PMMA.	56
5.1.2 – Da quantificação de células viáveis de <i>P. aeruginosa</i> recuperadas das superfícies dos cimentos ósseos (PMMA).	56
5.1.3 – Resultados de células viáveis de <i>P. aeruginosa</i> , recuperadas do biofilme formado sobre PMMA de diferentes procedências.	57
5.1.3.1 – BAUMER	57
5.1.3.2 – BIOMECANICA	58
5.1.3.3 – CMM	58
5.1.3.4 – SIMPLEX	59
5.1.3.5 – BIOMET com gentamicina	59
5.1.3.6 – BIOMET sem gentamicina	60
5.1.4 – Média e desvio padrão	60

5.1.5 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do PMMA e <i>P. aeruginosa</i> .	61
5.1.5.1 – BAUMER	61
5.1.5.2 – BIOMET com gentamicina	62
5.1.5.3 – BIOMET sem gentamicina	63
5.1.5.4 – BIOMECANICA	64
5.1.5.5 – CMM	65
5.1.5.6 – SIMPLEX	66
 5.2 – <i>Staphylococcus epidermidis</i>	 67
5.2.1 – Da aderência de <i>S. epidermidis</i> sobre PMMA	67
5.2.2 – Da quantificação de células viáveis de <i>S. epidermidis</i> das superfícies dos cimentos ósseos.	67
5.2.3 – Resultados de células viáveis de <i>S. epidermidis</i> , recuperadas do biofilme formado sobre PMMA de diferentes procedências.	68
5.2.3.1 – BAUMER	68
5.2.3.2 – BIOMECANICA	69
5.2.3.3 – CMM	69
5.2.3.4 – SIMPLEX	70
5.2.3.5 – BIOMET com gentamicina	70
5.2.3.6 – BIOMET sem gentamicina	71
5.2.4 – Média e Desvio Padrão	71
5.2.5 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do PMMA e <i>S. epidermidis</i> .	72
5.2.5.1 – BAUMER	72
5.2.5.2 – BIOMET com gentamicina	73
5.2.5.3 – BIOMET sem gentamicina	74
5.2.5.4 – BIOMECANICA	75
5.2.5.5 – CMM	76
5.2.5.6 – SIMPLEX	77

5.3 – <i>Staphylococcus aureus</i>	78
5.3.1 – Da aderência de <i>S. aureus</i> sobre PMMA	78
5.3.2 – Da quantificação de células viáveis de <i>S. aureus</i> das superfícies dos cimentos ósseos.	78
5.3.3 – Resultados de células viáveis de <i>S. aureus</i> , recuperadas do biofilme formado sobre PMMA de diferentes procedências.	79
5.3.3.1 – BAUMER	79
5.3.3.2 – BIOMECANICA	80
5.3.3.3 – CMM	80
5.3.3.4 – SIMPLEX	81
5.3.3.5 – BIOMET com gentamicina	81
5.3.3.6 – BIOMET sem gentamicina	82
5.3.4 – Média e Desvio Padrão	82
5.3.5 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do PMMA e <i>S. aureus</i> .	83
5.3.5.1 – BAUMER	83
5.3.5.2 – BIOMET com gentamicina	84
5.3.5.3 – BIOMET sem gentamicina	85
5.3.5.4 – BIOMECANICA	86
5.3.5.5 – CMM	87
5.3.5.6 – SIMPLEX	88
5.4 – Média das UFC/mL recuperadas das superfícies dos cimentos ósseos de diferentes procedências.	89
5.5 – Superfície dos corpos-de-prova das marcas de cimento ósseo a base de PMMA: observação topográfica.	90
5.5.1 – BAUMER	90
5.5.2 – BIOMET com gentamicina	90
5.5.3 – BIOMET sem gentamicina	91
5.5.4 – BIOMECANICA	91
5.5.5 – CMM	92
5.5.6 – SIMPLEX	92

5.6 – Molhabilidade da superfície de PMMA com e sem gentamicina (medidas de ângulo de contato)	93
6 – DISCUSSÃO	94
7 – CONCLUSÕES	100
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
9 – APÊNDICE	113

1 – INTRODUÇÃO

Os materiais destinados a possuir uma interface com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (BOOTH; PRICE, 1989; AMARAL et al., 2003), foram denominados de biomateriais.

A evolução dos biomateriais é relativamente recente. No entanto, é possível dividi-la em 3 gerações: 1) primeira geração de biomateriais – implantes ósseos (primeira articulação artificial da anca desenvolvida em 1961); 2) segunda geração de biomateriais – dispositivos bioativos (iniciou-se nos anos 70); 3) terceira geração – engenharia de tecidos (até à atualidade).

A área de biomateriais engloba o conhecimento e a colaboração de diversas especialidades, desde o comportamento mecânico até às funções biológicas a nível molecular nos tecidos, passando pela engenharia de materiais, onde são desenvolvidos sistemas com propriedades adequadas a determinadas aplicações no organismo. A evolução atual dos biomateriais depende assim dos avanços das diversas áreas, nomeadamente da biotecnologia e da ciência dos materiais.

Desde épocas passadas, o homem tem se preocupado em restaurar ou substituir partes danificadas do tecido ósseo humano. Em meados do século XVII, Fallopius implantou uma placa de ouro para restaurar um defeito craniano e, a partir daí, tem-se usado os implantes para a substituição de partes danificadas do sistema ósseo (SANTOS, 2002).

Numerosos materiais têm sido utilizados, porém poucos apresentam resultados satisfatórios já que a maioria provoca, em maior ou menor grau, resposta imunológica do organismo receptor.

Uma definição importante é a de biocompatibilidade com o organismo, podendo ser definida como a capacidade do material ter uma resposta favorável numa aplicação específica, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos (HENCH, 1998).

Destes materiais, os enxertos autógenos são mais utilizados devido à falta de reação imunológica, pois, sendo sempre compatíveis, favorecem os processos de revascularização e reparação. O enxerto ósseo pode cooperar com três funções para o processo de consolidação: osteogênese, osteoindução e osteocondução. A procura por um material moldável para promover a reparação óssea tem sido a

busca de vários pesquisadores e cirurgiões interessados em acelerar a consolidação de fraturas ou reconstruir defeitos ósseos (SCHMITZ; HOLLINGER; MILAN, 1999). Essa busca levou ao conhecimento de biomateriais que podem ser definidos como substâncias de origens naturais ou sintéticas e que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos, dentre os mais importantes está o cimento ósseo.

O polimetilmetacrilato, conhecido também como cimento ortopédico ou acrílico, tem sido utilizado como biomaterial desde 1930 (WILTSE; HALL; STENEHJEM, 1957). Seu uso em ortopedia iniciou-se em 1940, como apoio interno da coluna vertebral e preenchimento de cavidades ósseas (CHANRLEY, 1970).

Utilizado principalmente na fixação de próteses, além do preenchimento e reconstrução de segmentos ósseos, o cimento ósseo é instalado como interface entre o implante e a superfície óssea endosteal, preenchendo os nichos vazios e agregando de forma resistente e definitiva essas partes. Sua facilidade de manipulação e rápido endurecimento permitem, além da firme agregação da prótese, um menor tempo de cirurgia, o que beneficia sobremaneira sua eficácia e a segurança do paciente. Outra importante propriedade desse material é sua facilidade de ocupar homogeneamente os espaços, proporcionando ótima distribuição das cargas e tensões incidentes à prótese, diminuindo assim suas possibilidades de fadiga e desgaste, o que amplia consideravelmente sua vida útil (KÜHN, 2000).

Várias outras aplicações foram introduzidas com o tempo, sendo que, a utilização do cimento como material de fixação de implantes no quadril deu-se principalmente devido à atividade de John Chanrley nas décadas de 1950 e 1960, quando foram desenvolvidos estudos mecânicos e clínicos. Sua utilização, nas cirurgias de artroplastia do quadril, joelho e ombro está plenamente estabelecida até os dias de hoje (CHOHFI; LANGLAIS, 1994).

O cimento deve suportar forças na aplicação "*in vivo*" sendo que as características mecânicas e de biocompatibilidade são vitais para o sucesso da fixação cirúrgica. Quando, porém, são impostas forças superiores à capacidade de resistência do cimento, podem ocorrer fraturas, fadiga do material ou falência da fixação. A sobrevida da prótese, portanto, deve ser considerada, também, como função das propriedades mecânicas do elemento de fixação (SAHA; PAL, 1984).

O afrouxamento asséptico é uma das complicações mais freqüentes das próteses cimentadas, e vários questionamentos sobre a resistência do cimento ósseo ou fatores a ele relacionados têm sido estudados (SCHURMANN et al., 1989; MULROY; HARRIS, 1990). Segundo Lewis e Nyman (2000), o afrouxamento é iniciado pela fragmentação do cimento que leva à osteólise. Predis põe à fragmentação a presença de cantos vivos nas próteses, camada de cimento fina ou incompleta e a presença de porosidade no cimento ósseo (MENDES, 2006).

A infecção na artroplastia é o principal agente causador de falhas ou insucessos deste procedimento cirúrgico. Bactérias contaminantes são capazes de aderir e colonizar a superfície do material implantado. Devido à essa problemática, Buchholz introduziu o primeiro antibiótico ao cimento ósseo a base de polimetilmetacrilato, com finalidade de combater e eliminar qualquer bactéria que entre em contato com o implante durante a cirurgia. O antibiótico incorporado ao cimento ósseo libera elevadas concentrações da droga, que por via sistêmica estes níveis não podem ser atingidos.

As propriedades mecânicas do cimento, entre outras, devem ser bem controladas, para se evitar falhas deste material que poderiam ocasionar a soltura de próteses (MARKOLF; AMSTUTZ, 1976; HOLM, 1980). A falha de uma prótese conduz inevitavelmente a novas cirurgias, denominadas revisões, para substituição do implante, acarretando vários e importantes riscos cirúrgicos para o paciente (DOHMAE et al., 1988; VINCE; HUNT; WILLIAMS, 1991).

Tratando-se tal material, de um componente de vital importância no sucesso de uma cirurgia ortopédica, principalmente de ordem articular, parâmetros mínimos de qualidade devem ser rigorosamente atendidos, garantindo segurança de manipulação, aplicabilidade e expectativa de resultados ao cirurgião, bem como pleno uso da eficácia e longevidade da prótese utilizada (MENDES, 2006).

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Cimento ósseo - polimetilmetacrilato (PMMA)

Atualmente, todos os cimentos ósseos no mercado são baseados quimicamente na mesma substância: metilmetacrilato (MMA). Quimicamente, o MMA é um éster do ácido metacrílico, substância que os cientistas iniciaram seu estudo, intensivamente, no começo do vigésimo século.

Em 1902, iniciaram-se estudos laboratoriais sobre polimerização do ácido acrílico na Alemanha e foi por volta de 1928 que ocorreu uma grande escala na produção do MMA. A produção das próteses totais (dentaduras) se deu logo após, em 1935 (KUHN, 2000).

Em 1936, com base em novos estudos, descobriu-se que uma massa poderia ser produzida misturando polimetilmetacrilato (PMMA) em pó e um monômero líquido, que endureceria quando o peróxido de benzofila (BPO) fosse adicionado e a mistura aquecida à 100°C em um molde de pedra. O primeiro uso clínico destas misturas de PMMA foi uma tentativa para fechar defeitos craniais em macacos, no ano de 1938. Quando estes experimentos tornaram-se conhecidos, os cirurgiões ficaram ansiosos para tentar estes materiais na cirurgia plástica em seres humanos (KUHN, 2000).

Quando os químicos descobriram que a polimerização de MMA ocorreria em temperatura ambiente se fosse adicionado um co-iniciador, as companhias Degussa e Kulzer, usaram aminas terciárias aromáticas, estabeleceram em 1943 um protocolo para a produção química de cimentos ósseos de PMMA; processo válido até hoje. Estes estudos devem ser considerados como o nascimento do cimento ósseo de PMMA (KUHN, 2000).

Ao fim da Segunda Guerra Mundial, muitas patentes alemãs no campo dos metacrilatos tiveram de ser entregues aos vencedores devido ao perigo de um possível rearmamento alemão. Após este acontecimento, o uso prático dos estudos de Otto Rohm pelo mundo ocorreu rapidamente. Os cimentos ósseos de PMMA (o qual está ainda no mercado até hoje) foram desenvolvidos independentemente em diversos países; estes cimentos incluem as marcas CMW, Palacos R e Simplex P (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1996).

As vantajosas propriedades de manipulação das misturas do polímero de MMA remanesceram o objeto de muitos projetos de pesquisa, isto porque os cimentos no mercado diferem consideravelmente neste respeito, mesmo que suas bases químicas sejam idênticas. Kiaer (1951) foi o primeiro a utilizar o material para fixar cápsulas de vidro acrílico na cabeça femoral, após ter removido a cartilagem (HABOUSH, 1953; HENRICHSEN et al. 1953).

Os estudos sobre o uso destes materiais em plásticas no crânio se iniciaram com a produção técnica em grande escala dos polímeros. As resinas de cura rápida foram usadas também para preenchimento dos defeitos dos ferimentos no esqueleto visceral (RAU, 1963).

Judet e Judet (1956) foram os primeiros a introduzir um método cirúrgico na artroplastia. Logo, entretanto, tornou-se aparente que a prótese de PMMA (Plexiglass) usada não poderia ser integrada ao corpo por razões biológicas e mecânicas. Isto pelo fato de que o Plexiglass é uma resina acrílica de PMMA para utilização industrial, preparado por aquecimento e sob pressão, o que confere grande resistência e aparência transparente. Existem diferenças, entretanto, entre Plexiglass, cimento dental e cimento ósseo (obtido por reação auto-polimerizável exotérmica). Embora sejam todos compostos pelo polimetilmetacrilato, constituem propriedades físicas e mecânicas diferentes (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1996).

Os pré-requisitos essenciais para a aceitação do cimento ósseo de PMMA na cirurgia foram os estudos da reação do tecido aos implantes. A boa biocompatibilidade dos implantes de PMMA em curto prazo era de importância vital (HENRICHSEN et al. 1953; WILTSE et al. 1957). Os estudos extensivos de Hullinger em 1962, provaram também a biocompatibilidade do PMMA endurecido.

Sir John Charnley, em 1958, tornou-se popular entre os cirurgiões ortopédicos (CHARNLEY, 1960; DANIELS et al. 1998), utilizando-o inicialmente para fixar implantes nas substituições articulares do quadril. A cirurgia de substituição articular do quadril é constituída de um componente femoral de aço inoxidável, onde é encaixada a cabeça femoral que se articula com o componente acetabular de polietileno, de alta densidade, fixado ao osso pelo cimento de polimetilmetacrilato. A técnica de cimentação envolve a mistura do monômero líquido e dos componentes de polímero em pó com uma espátula em gral ou cadinho. O cirurgião homogeneíza a massa pastosa resultante, antes de manusear e pressionar no local do implante.

Subseqüentemente a prótese é inserida e o cimento ósseo está pronto para polimerizar (KRAUSE et al., 1988; LEWIS, 1999; BARB et al., 1982; SAHA; PAL, 1984; BISHOP et al., 1996; WINSOX et al., 1987; DEB et al., 1997).

O conceito de artroplastia de baixo atrito, associado à cimentação por meio de polimetilmetacrilato, marcou o início da era moderna das artroplastias, descrita como técnicas de cimentação de primeira geração. A técnica preconizada por Charnley, em 1959, chamada de técnica de cimentação de primeira geração envolvia a mistura em ambiente cirúrgico, com a introdução manual do cimento em estado pastoso no canal femoral e no acetábulo. Os resultados iniciais foram estimulantes, mas com o passar do tempo, este procedimento cirúrgico começou a apresentar altos índices de complicações, como afrouxamento acetabular e femoral. Estas complicações aumentavam em grandes proporções, em pacientes jovens e nas cirurgias de revisão (MULROY; HARRIS, 1990; MULROY et al., 1995).

No fim de 1960, Buchholz e a companhia Kulzer foram os primeiros a adicionar um antibiótico aos cimentos ósseos (EGE, 1999). A adição do sulfato de gentamicina no cimento da marca Palacos R rendeu os primeiros resultados satisfatórios. Os estudos se iniciaram nos laboratórios da Endoklinik em Hamburgo, Alemanha e, resultaram no desenvolvimento do cimento do tipo Refobacin-Palacos R, o primeiro cimento ósseo com antibiótico introduzido no mercado, demonstrando a boa cooperação entre Merck e Kulzer (BUCHHOLZ; ENGELBRECHT 1970; BUCHHOLZ et al. 1981).

O aperfeiçoamento da técnica de cimentação, iniciado em 1972, chamada de técnica de cimentação de segunda geração, passa a utilizar cimentos de baixa viscosidade, introduzidos com uma pistola de injeção retrógada (da porção distal para a porção proximal do osso o fêmur) e utilização dos tampões de canal medular no lado femoral, enquanto outros instrumentos pressionam o cimento no lado acetabular. A técnica de cimentação de segunda geração procura produzir ao redor do implante uma manta uniforme e completa de cimento, sem falhas, o que é pressionado de modo a interagir com o osso (SCHURMAN et al., 1989; MULROY e HARRIS, 1990; MULROY et al. 1995).

Com a finalidade de criar uma base uniforme para reproduzir e testar os cimentos ósseos de PMMA iniciou-se em 1976 o desenvolvimento de um padrão nos Estados Unidos, onde a American Society for Testing and Materials (ASTM) publicou a norma F-451-76 – Standard Specifications for Acrylic Bone Cements, em 1978.

Na mesma base, foi desenvolvido o protocolo ISO 5833/1 um pouco tempo depois, em 1979. Atualmente, todos os cimentos ósseos devem obedecer ao padrão ISO 5833/2 (2002). No Brasil, ela é representada pela publicação da Associação Brasileira de Normas Técnicas, denominada ABNT NRB ISO 5833 – Implantes para cirurgia – Cimentos de resina acrílica (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1996).

A eliminação do cimento ósseo e a utilização das próteses não cimentadas, na década de 1980, foram marcadas pela discussão entre próteses cimentadas e não-cimentadas; no que diz respeito a osteólise, os componentes não cimentados demonstraram reabsorção óssea mais precoce, mais freqüente, mais intensa e progressiva em relação à prótese cimentada. Cai, portanto, a teoria que tenta provar que, eliminando-se o cimento ósseo, elimina-se a osteólise, chamada também, inicialmente, doença da prótese não-cimentada (BARROS, 2001).

Vários estudos comparativos de cimentos ósseos foram freqüentemente publicados no mundo. Recentemente, Lewis (1997) publicou uma revisão detalhada das propriedades de seis cimentos, principalmente produtos no mercado dos Estados Unidos. Uma comparação atual, abrangente e detalhada entre cimentos do mundo inteiro pode ser encontrada na publicação de Kühn (2000).

No Brasil, Marconcini publicou em 1996 um estudo comparativo sobre as propriedades físico-químicas de 08 marcas de cimento ósseo, entre nacionais e importadas, comercializadas no país naquela época (algumas já não mais existem ou sofreram alterações). Naquela ocasião, utilizou-se a primeira edição da norma, onde o único teste mecânico incluso era o de força de compressão. Apenas na última revisão da norma, em 2002, foi concordado em também incluir testes de flexão e módulo de flexão (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1996).

Em 2001, Pascotini analisou comparativamente as propriedades mecânicas do cimento nacional CMM preparado manualmente e centrifugado, em diferentes temperaturas. No mesmo ano, Barros comparou a resistência à compressão do cimento ósseo nacional Baumer Osteo-Class, e do irlandês Howmedica Simplex P, preparados manualmente e a vácuo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1996).

Diferentes técnicas foram pesquisadas na tentativa de melhorar a qualidade da cimentação, desenvolveram-se equipamentos sofisticados, e dentre estas técnicas denominadas de terceira geração, destaca-se a mistura a vácuo do cimento ósseo (WIXSON et al., 1987) e a centrifugação (BURKE et al., 1984). O afrouxamento asséptico dos componentes é a causa mais freqüente de

complicações a longo prazo das artroplastias cimentadas (SCHURMAN et al., 1989; MULROY; HARRIS, 1990).

O cimento ósseo é usado na ortopedia em três funções principais: como massa para modelamento, sujeito a baixa tensão; no preenchimento de cavidades ósseas, que, dependendo da localização, como em articulações, fica sujeito a cargas elevadas; na fixação de próteses, em que o cimento forma uma interface entre a prótese e o osso e atua como homogeneizador e amortecedor de altas tensões, principalmente de compressão para fixação nas substituições articulares (HAAS et al., 1975; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1996).

As figuras abaixo demonstram o modo de preparo do cimento ósseo durante o procedimento cirúrgico de artroplastia.

Figura 1 – Preparo do Cimento ósseo durante procedimento cirúrgico. PMMA em pó.
(http://millots.blogspot.com/2007_09_01_archive.html)

Figura 2 – Adição do MMA líquido ao PMMA em pó.
(http://millots.blogspot.com/2007_09_01_archive.html)

Figura 3 – Homogeneização do PMMA ao MMA.
(http://millots.blogspot.com/2007_09_01_archive.html)

Figura 4 – Inserção da massa homogênea (PMMA + MMA) no componente de armazenamento da pistola retrógrada. (http://millots.blogspot.com/2007_09_01_archive.html)

Figura 5 – Inserção da massa homogênea no canal do fêmur.

(http://millots.blogspot.com/2007_09_01_archive.html)

Figura 6 – Esquema demonstrativo da interface implante - cimento ósseo – osso.

(http://www.eorthopod.com/images/ContentImages/hip/hip_hemiarthroplasty/hip_hemiarth_surgery04.jpg)

A durabilidade das cirurgias de substituição articular, principalmente nas articulações de suporte de carga, depende da combinação de vários fatores, os quais incluem: o peso e a atividade do paciente, o modo como os componentes são apoiados pelo cimento ósseo ou osso, o desenho, o tipo e a posição anatômica dos componentes e o tipo de metal utilizado (DANIELS et al. 1998).

2.2 - Infecções relacionadas a implantes ortopédicos

Os implantes ortopédicos tornaram-se essenciais componentes da medicina moderna. Menos de 10% dos pacientes apresentam complicações quando utilizados estes dispositivos devido a sua segurança e a biocompatibilidade que os mesmo apresentam (STECKELBERG; OSMON, 1994).

A artroplastia tem se tornado um tratamento de escolha para pacientes com idade maior ou igual a 55 anos, que apresenta fortes dores e alguma deficiência no quadril ou no joelho (MORAN; HORTON, 2000). O maior problema que esta cirurgia apresenta são as infecções relacionadas aos dispositivos ortopédicos (JAHODA et al., 2003; HARRIS, 2004; KREBEC et al., 2004; WRIGHT et al., 2004; GALLO et al., 2005).

Entre todas as artroplastias de quadril e de joelho realizadas, 1-5% sofrem complicações devido à infecção desta articulação e estas porcentagens são muito maiores após a revisão dos procedimentos (STECKELBERG; OSMON, 2000).

Estratégias de prevenção são usadas para minimizar o risco de complicações infecciosas no material implantado. Exemplos incluem fluxo laminar com ar ultra-limpo (SANZEN et al., 1988), profilaxia antimicrobiana de rotina (NICHOLS, 1995), curto tempo de operação, uso de cimento ósseo contendo antibiótico (PRICE et al., 1996) e camada antimicrobiana (STRACHAN, 1995; FRANCOIS et al., 1996). Houve uma diminuição na incidência das infecções relacionadas a implantes ortopédicos devido a treinamentos que o próprio hospital oferece aos cirurgiões (SPANGEHL et al., 1998).

A cooperação entre cirurgiões, microbiologistas, e patologistas são de grande importância para o diagnóstico e um possível tratamento destas infecções relacionadas a implantes ortopédicos (ZIMMERLI et al., 1998).

A não realização do procedimento cirúrgico ou uma cirurgia que apresenta um método menos invasivo é atraente tanto para o paciente como para o médico, especialmente devido à maioria dos pacientes com articulações protéticas serem idosos que apresentam comorbidez (estado patológico causado, agravado ou cujo tratamento/controle é dificultado pela presença do excesso de peso ou que apresente cura/controle com perda de massa corporal). Porém, quando o tratamento destas infecções é realizado de modo apropriado, dados revelam que não há remoção do implante em mais de 80% dos casos, reduzindo assim a mortalidade,

morbidade, e o custo do tratamento das infecções relacionadas a implantes. Além do mais, melhorando a qualidade de vida do paciente (WIDMER, 2001).

A maioria das infecções de articulação protética são biofilmes dependentes, mas certas cepas bacterianas altamente virulentas não contam com esta estratégia e podem ser detectadas muito antes do curso da infecção (STECKELBERG; OSMON, 2000).

A figura abaixo demonstra o esquema didático da formação de biofilme bacteriano sobre uma superfície abiótica:

Figura 7 - O ciclo de vida do biofilme: A formação de biofilme é um processo de múltiplos estágios que envolvem (1) adesão reversível das células à superfície, (2) secreção de adesinas e EPS resultando na adesão irreversível do biofilme e proliferação celular, (3) formação de microcolônias e maturado do biofilme, e (4) morte celular nas microcolônias e desprendimento das células que retornam para um a fase planctônica, completando o ciclo de vida do biofilme (REHM, 2008).

Em ambas infecções de articulação protética, aguda ou crônica, o *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus coagulase-negativa* são isolados como agentes causadores. Além disso, existem também algumas cepas de *Staphylococcus aureus* chamadas de “pequenas colônias variantes” que podem estar presentes no complexo “quebra-cabeça” do diagnóstico, mimetizando outros microrganismos com baixa virulência, como o *Staphylococcus epidermidis* (von EIFF et al., 2002).

Os *Staphylococcus* spp. são os patógenos mais importante em infecções protéticas. E do ponto de vista clínico, contribuem para a maioria das infecções hospitalares (FRÈRE et al., 1999; HUEBNER; GOLDMANN, 1999).

Segundo HANSSEN e RAND (1998), o diagnóstico da infecção pós-operatória de uma articulação total de quadril causada pelo *Staphylococcus aureus* não traz grandes complicações, pois é evidente o sintoma clínico que a cepa causa ao paciente. Em contraste, o *Staphylococcus epidermidis*, dificulta o diagnóstico, quando agente causador de uma infecção de articulação protética não produz sintomas clínicos de uma infecção e aumenta a probabilidade da prótese implantada ser removida.

O *Staphylococcus epidermidis* como agente causador de infecção de articulação protética tem maior preferência por polímeros, e entre eles: o polimetilmetacrilato, aço inoxidável, liga de cromo-cobalto e polietileno, enquanto o *Staphylococcus aureus* apresenta uma maior incidência de infecção de articulação protética em implantes metálicos (BARTH et al., 1989; GRACIA et al., 1997; GRISTINA et al., 1987; HANSSEN; RAND, 1998).

Dentre os microrganismos Gram-negativos, a *Pseudomonas aeruginosa* é a principal bactéria responsáveis por falha ou troca de implantes relacionados a infecção em artroplastias de quadril ou joelho (NEUT et al., 2005).

Um biofilme pode ser definido como uma comunidade de bactérias que estão aderidas a uma superfície envolvidas em uma matriz de substância extrapolimérica. Esta matriz é composta por uma mistura de componentes, como polissacarídeo extracelular (PES), proteínas, ácidos nucleicos, e outras substâncias (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

Dahinsen et al. (1983) notificaram que toda superfície do material implantado entra em contato com fluidos biológicos do hospedeiro, primeiramente com proteínas do soro e plaquetas. A albumina, como o maior constituinte do soro, é rapidamente depositada no material “estranho” e impede a ativação não específica do neutrófilo e a deposição da matriz protéica na superfície.

Gristina (1987) relatou que todos os implantes passam por alterações fisiológicas após a implantação e nesse processo, o passo mais importante é a “corrida para superfície”, uma competição entre a integração das células do tecido e adesão bacteriana pela mesma superfície.

A bactéria tem diversas vantagens quando reside dentro de um biofilme: (a) elas apresentam certo grau de proteção contra biocidas, antibióticos, anticorpos, surfactantes, bacteriófagos e organismos predadores (DUNNEY, 2002); (b) este microambiente permite o fornecimento de nutrientes do meio para algumas cepas (BRYANT et al., 1967; STOODLEY et al., 1997); e (c) transmissão (troca) de elementos genéticos das diferentes espécies bacterianas envolvidas no biofilme pelo contato direto entre estas bactérias (LEBARON et al., 1997; ROBERTS et al., 1999).

Muitas espécies têm mostrado diferentes passos no desenvolvimento da formação do biofilme, os quais incluem: (a) adesão inicial à superfície, (b) formação de microcolônias e finalmente (c) maturação das microcolônias e formação do biofilme maduro (DAVEY; O'TOOLE, 2000). A estrutura e a formação de biofilme são afetadas por diversas condições como: propriedades da superfície (CERCA et al., 2005), disponibilidade de nutrientes (CERCA et al., 2004), hidrodinâmicas (STOODLEY et al., 1997) e composição da comunidade microbiana (STOODLEY et al., 1998).

Os biofilmes são comunidades hidrodinâmicas em constante evolução. As células bacterianas em um biofilme têm diferentes atividades metabólicas, dependendo em especial da posição que esta bactéria se apresenta dentro do biofilme (POULSEN et al., 1993).

A adesão microbiana à superfícies tem mostrado ser um processo complexo, envolvendo fatores físico-químicos, protéicos, produção de polissacarídeo e a deposição de proteínas do hospedeiro sobre a superfície abiótica. Do ponto de vista geral dos fatores físico-químicos, a adesão microbiana pode ser mediada pelas interações não-específicas, com características de longo alcance, incluindo as forças de Lifshitz-van der Waals, forças eletrostáticas, interações ácido-base, e forças de movimento browniano (van OSS, 1995). Logo que os microrganismos alcançam uma superfície, eles serão atraídos ou repelidos, dependendo de uma soma de diferentes interações não-específicas (FONSECA et al., 2001). Em sistemas biológicos as interações hidrofóbicas são comumente mais fortes de todas as forças não-covalentes de longo alcance, e a adesão à superfície é freqüentemente mediada por estes tipos de interações (TEIXEIRA; OLIVEIRA, 1999). Foi demonstrado que a hidrofobicidade desempenha um papel importante nas infecções relacionadas à biomateriais (DOYLE, 2000). De acordo com Doyle (DOYLE, 2000), o melhor

método para determinar a hidrofobicidade de um biomaterial ou de uma bactéria é através da medida de ângulo de contato pelo método da gota.

A rugosidade do substrato é outra propriedade importante envolvida no fenômeno de adesão bacteriana. As irregularidades aumentam a área de superfície, e promovem um maior favorecimento e surgimento de sítios adicionais para colonização bacteriana, tal como rachaduras que protegem as células bacterianas da ação do sistema imune do hospedeiro (VERRAN et al., 1991; SCHEUERMANN et al., 1998)

Shiro et al. (1994) relataram que a aderência dos estafilococos à superfície de biomateriais relacionados com próteses é mediada por adesinas, como fibronectina, fibrina, colágeno, laminina, vitronectina, trombospondina, sialoproteína óssea, elastina e a proteína construtora da matriz. Algumas proteínas do hospedeiro promovem a ligação dos estafilococos com polímeros ou superfícies metálicas por receptores específicos. A aderência e a acumulação dos microrganismos na superfície do corpo estranho formam um biofilme. Como colônias maduras, bactérias sésseis se desprendem da periferia e se dispersam como bactérias planctônicas. Este processo pode conduzir para uma infecção clinicamente sintomática, mas que raramente leva a bacteremia.

Davies et al. (1998) relataram que os sinais emitidos célula-à-célula, são responsáveis pelo desenvolvimento do biofilme bacteriano, podendo fornecer uma nova estratégia para o controle da formação de biofilme.

Proctor and Peters (1998) relataram que os mecanismos estabelecidos clinicamente englobam a aderência bacteriana, produção de polissacarídeo extracelular e uma lenta velocidade de crescimento bacteriano. As bactérias tornam-se sésseis no biofilme, e suas características fenotípicas mudam consideravelmente. Elas tornam-se resistentes através de diversos mecanismos que ainda são os principais tópicos de pesquisa. O segundo mecanismo clinicamente importante é a falha dos agentes microbianos de penetrarem o biofilme e a fase estacionária de crescimento. Além disso, algumas bactérias, como os *S. aureus*, formam as pequenas colônias variantes, caracterizado pela baixa taxa de crescimento, diminuindo a produção do exopolissacarídeo, diminuindo a susceptibilidade aos aminoglicosídeos, e a possível persistência intracelular.

Buchholz et al. (1970) relataram uma taxa de infecção maior do que 7% nas artroplastias, por conta disso, propuseram a incorporação de um antibiótico ao

cimento ortopédico como tratamento preventivo das infecções operatórias. Os aminoglicosídeos provaram ser os melhores e mais práticos antibióticos, não somente no seu espectro de atividade, mas também nas propriedades químicas.

Diferentes antibióticos têm sido adicionados ao cimento ósseo para prevenir as infecções articulares protéticas. Heck et al. (1995) relataram que 90% das cirurgias ortopédicas realizadas nos EUA utilizam cimento ósseo contendo antibiótico.

Kuechle et al. (1996) relataram que nenhum dos antibióticos utilizados ao cimento ósseo libera mais do que 15% do que está incorporado. Pouco se sabe sobre a concentração do antibiótico ao redor do implante. Em 88% dos pacientes que apresentaram uma infecção total de quadril, na qual foi utilizado, primariamente, um cimento ósseo contendo gentamicina, ao menos uma cepa de estafilococos era resistente a gentamicina (HOPE et al., 1989). Assim, existe um risco ao longo do tempo com a baixa concentração de gentamicina ao redor do implante que pode induzir uma cepa se tornar resistente ao antibiótico (van DE BELT et al., 1999).

Os testes experimentais de inoculação de microrganismos patogênicos em ossos de animais mostraram que o uso concomitante do cimento acrílico associado a um antibiótico foi capaz de impedir o desenvolvimento do quadro infeccioso (WELCH, 1978; FITZGERALD, 1983).

Buchholz et al. (1979), apresentaram os primeiros resultados de reoperações de artroplastias infectadas de quadril, com substituição da prótese num único tempo operatório, empregando cimento com antibiótico e sem utilização de antibiótico sistêmico, obtendo a cura em 71% dos casos após uma única cirurgia. A retomada cirúrgica de alguns casos de insucesso aumentou a percentagem de cura para 86%.

Josefsson et al. (1981) notificaram que o cimento associado a antibióticos foi também preconizado como preventivo das infecções operatórias nas artroplastias primárias, mostrando, num estudo comparativo com o tratamento de antibiótico profilático, ser mais efetivo na redução dos índices de infecções em artroplastias primárias.

A resistência aos antibióticos é relatada porque as bactérias aderidas à prótese são capazes de produzir um polissacarídeo extracelular (biofilme), que as protegem dos mecanismos de defesa do hospedeiro e impede a ação do antibiótico (NAYLOR et al., 1988; ARIZONO et al., 1992).

Embora, a gentamicina seja o antibiótico mais efetivo e usado na combinação do PMMA devido sua alta solubilidade, estabilidade após o aquecimento no momento do preparo, excelente atividade antimicrobiana mesmo em baixa concentração, atualmente, outro antibiótico esta sendo incorporado ao cimento ósseo de PMMA, a vancomicina, que apresenta características químicas similares a gentamicina, e tem sido considerada a droga de escolha nas infecções relacionadas com *Staphylococcus aureus* metilicina resistente e *S. epidermidis*, demonstrando níveis de concentração mínima inibitória (MIC) de 1µL para cepas de *Staphylococcus aureus* (TOMA et al., 2006)

Logo após a incorporação do sulfato de gentamicina ao cimento ósseo, muitos estudos sobre resistência bacteriana aos antibióticos, aderência bacteriana e formação de biofilme foram realizados com o intuito de compreender o motivo de algumas cirurgias ortopédicas falharem devido a uma infecção persistente.

Gracia et al. (1997) relataram que a aderência de *S. aureus* aos biomateriais usados na cirurgia ortopédica (polimetilmetacrilato, osso, aço e liga de titânio) e o vidro foram estudados *in vitro* em 1, 2, 6, 24 e 48 horas de incubação. Foram usadas as cepas não produtoras de *slime* e as variantes produtoras de *slime* destas cepas. A viabilidade celular foi determinada pelo método da bioluminescência do ATP. A mais baixa aderência correspondeu ao polimetilmetacrilato e osso e a mais alta aos metais. Aderência significativa foi detectada em todos os casos após 6 horas e foi cepa dependente, diminuindo em 72 horas. Na maioria dos casos a aderência das variantes não produtoras de *slime* não foi significativa, quando comparada com os controles e as produtoras de *slime* foram mais aderentes do que as variantes não produtoras de *slime*. Estas diferenças atingiram o pico máximo em 6 ou 48 horas, dependendo da cepa e o material. Os dados sugerem que o aparecimento de células produtoras de *slime* dentro de uma população bacteriana não produtora de *slime* pode colocar em perigo o sistema imune após cirurgia e a eficácia do antibiótico como consequência da formação de biofilme sobre os implantes e próteses.

van de Belt et al. (2000) mediram a formação de biofilme de *S. aureus* *in vitro* sobre cimento ósseo (CMW₃ e Palacos R) com e sem gentamicina e relacionaram a formação do biofilme com a taxa de liberação de antibiótico. O crescimento microbiano sobre o cimento com gentamicina ocorreu apesar da liberação do antibiótico. A formação do biofilme sobre o cimento ósseo CMW₃ com gentamicina

foi de um quarto a um quinto menos do que o cimento ósseo sem gentamicina, enquanto que a formação do biofilme sobre o cimento ósseo Palacos R não foi significativamente afetado pelo antibiótico. A gentamicina foi mais liberada do cimento ósseo CMW₃ (79mg) do que do Palacos R (70mg), mas a porcentagem de gentamicina liberada após uma semana relativa a quantidade total incorporada foi significativamente mais baixa para CMW₃ (4,7%) do que para Palacos R (8,4%). Após um dia, concentrações subnibitórias de antibióticos foram eluidos dos cimentos. Os autores concluíram que o cimento ósseo com antibiótico não inibe a formação de biofilme infeccioso *in vitro*.

Konig et al. (2001) relataram que a resistência bacteriana do *Staphylococcus epidermidis*, um sério patógeno de infecção relacionada ao implante, ao antibiótico está relacionado com a produção de glicocálix ou *slime* que atrapalha o acesso ao antibiótico e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Os estudos *in vitro* de diferentes cimentos ósseos com antibiótico, desenvolvidos para a prevenção da infecção associada ao biomaterial, não pode sempre demonstrar completa erradicação da bactéria aderente ao biomaterial. Os autores investigaram quatro diferentes cimentos ósseos em relação ao acúmulo bacteriano de uma cepa RP62A produtora de *slime* e sua mutante isogênica M7 que perdeu a habilidade de produzir polissacarídeo extracelular usando o teste da adesão bacteriana e técnica modificada de Kirby Bauer. Os autores demonstraram o efeito significativo da produção de polissacarídeo extracelular para o acúmulo bacteriano sobre o cimento ósseo. O cimento ósseo gentamicina/clindamicina foi o único biomaterial testado que produziu uma grande zona de inibição bacteriana na área inoculada adjacente ao biomaterial. A adesão bacteriana não foi reduzida significativamente e não houve correlação entre as zonas de inibição sobre placas de ágar sangue e o teste de adesão quantitativo. A eficácia clínica do cimento ósseo com gentamicina/clindamicina deve ser provada *in vivo*.

van de Belt et al. (2001) relataram que a formação de biofilme de *S. aureus* sobre seis cimentos ósseos com gentamicina (CMW1, CMW3, CMW Endurance, CMW2000, Palacos e Palamed) foi determinada em período de 3 dias usando equipamento Robins modificado, para medir a cinética de liberação de antibiótico por estas marcas de cimento ósseo. A influência da liberação da gentamicina sobre a formação do biofilme foi quantificada pela expressão de unidades formadoras de colônia sobre cimento com gentamicina relacionado ao número de organismos

viáveis sobre cimento sem gentamicina da mesma marca. Os biofilmes formados sobre todos os cimentos com gentamicina, apesar de liberar antibiótico, seguido de um padrão de tempo consistente com o número máximo de unidades formadoras de colônia por unidade de área do cimento encontrado entre 24 e 30 horas após a inoculação. Nenhum dos cimentos com gentamicina mostraram redução na formação do biofilme em relação ao cimento sem gentamicina em 6 horas após a inoculação, considerando que somente as marcas CMW1 e Palacos com gentamicina reduziram a formação do biofilme 24 horas após a inoculação. Alternativamente, CMW Endurance, CMW2000 e Palamed não exibiram redução inicial na formação do biofilme, mas efeitos começaram após 72, 48 e 72 horas, respectivamente. A mais longa redução do biofilme pela gentamicina liberada do cimento ósseo CMW3 durou de 24 a 72 horas. Cada cimento pareceu ter uma diferente janela de efetividade com relação a redução de formação de biofilme que não estava relacionado com a cinética de liberação de gentamicina. Os autores concluíram que embora o cimento ósseo com gentamicina reduza a formação de biofilme, o *S. aureus* é capaz de crescer sobre cimento ósseo com gentamicina.

Thornes et al. (2002) compararam taxas de infecções e resistência em um modelo animal de um procedimento ortopédico no qual foi contaminado com uma baixa dose de inóculo bacteriana de *Staphylococcus epidermidis*. Foram escolhidos aleatoriamente 44 ratos da linhagem *Sprague-Dawley* e cimento ósseo com gentamicina ou salina (usado como controle) foram implantados subcutaneamente. A ferida foi inoculada com uma suspensão diluída de *Staphylococcus epidermidis* sensível a gentamicina. Após duas semanas o cimento ósseo foi removido e avaliado microbiologicamente. No grupo que recebeu o cimento com gentamicina os autores observaram baixa taxa de infecção, mas, existiu uma taxa significativamente alta de infecção resistente a gentamicina neste grupo (teste de Fisher exato $p < 0,01$). O cimento ósseo impregnado com antibiótico apresentou uma superfície ótima para colonização e a prolongada exposição ao antibiótico permitiu ocorrer uma resistência mutacional. Os autores concluíram que o cimento ósseo com gentamicina pode não ser apropriado para a cirurgia de revisão se já fora usado na primeira cirurgia.

Gallo et al. (2005) relataram que a sepse é uma temida complicação da artroplastia total de articulação. A chave para questão é como prevenir a aderência bacteriana perioperatória e as complicações de infecção. Neste trabalho os autores estudaram a capacidade emergente do estafilococos sobreviver em materiais

protéticos e analisaram os efeitos *in vitro* do cimento ósseo de polimetilmetacrilato carregado com gentamicina e vancomicina na aderência e crescimento bacteriano. Estafilococos adquiridos de ambiente hospitalar foram sistematicamente inoculados em quatro materiais ortopédicos (polietileno de alto peso molecular, polimetilmetacrilato sem antibiótico, polimetilmetacrilato comercialmente produzido com gentamicina, e polimetilmetacrilato misturado e carregado com gentamicina e vancomicina). Os estafilococos foram identificados usando cultura e testes bioquímicos. O material testado foi inoculado em caldo de cultura e subsequente preparado para microscopia eletrônica de varredura e quantificação do crescimento bacteriano. Os materiais sem antibiótico mostraram evidencia de crescimento do estafilococo. No polimetilmetacrilato somente com gentamicina cresceu o *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente, enquanto que o polimetilmetacrilato carregado de gentamicina e vancomicina inibiu completamente o crescimento bacteriano. Os autores concluíram que o PMMA com dose baixa de gentamicina e vancomicina previne melhor a colonização estafilocócica do que o polimetilmetacrilato com gentamicina comercial. Os autores recomendam a combinação gentamicina-vancomicina em procedimentos de alto-risco e cirurgias de revisão que requerem o uso de cimento ósseo.

Neut et al. (2005) relataram que a infecção é infrequente mas uma séria complicação da cirurgia de articulação. Estas infecções não são claras até que o implante ser removido e o re-implante tem alta taxa de perda, especialmente quando está envolvida *Pseudomonas aeruginosa*. Neste trabalho os autores estudaram a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* sobre cimento ósseo com sem gentamicina por meio de microscópio de varredura a laser (CSLM). Duas diferentes cepas foram usadas a fim de visualizar e quantificar a distribuição das células bacterianas e substância polimérica extracelular (*slime*) da superfície ao topo do biofilme. A viabilidade celular diferenciada com o corante LIVE/DEAD entre bactéria viva e morta dentro do biofilme e produção de *slime* foi avaliada após aplicação Calcofluor branco. As observações por meio de microscópio de varredura confocal a laser mostrou que o biofilme era uma estrutura não uniforme de espessura variável, com diferenças na célula bacteriana local e na densidade do polissacarídeo extracelular. A incorporação de gentamicina no cimento ósseo resultou na redução de 44% na viabilidade celular, enquanto a densidade do polissacarídeo extracelular aumentou significativamente. Também, a contagem convencional de unidades

formadoras de colônia em placa mostrou o desenvolvimento de variantes de pequenas colônias sobre o cimento ósseo carregado com gentamicina com uma diminuição na sensibilidade à gentamicina (MIC: 8 mg/L), quando comparado com tamanho normal das colônias removidas da superfície do cimento ósseo com e sem gentamicina (MIC: 3 mg/L). A aumentada produção de polissacarídeo extracelular no cimento ósseo carregado com gentamicina, junto com a formação das variantes pequenas colônias, resultou na diminuição da sensibilidade ao antibiótico – provavelmente, concomitantemente com a manifestação da infecção persistente e recidivante.

Dunne et al. (2007) relataram que a infecção continua uma complicação severa após a artroplastia total. Quando existe a suspeita de infecção na cirurgia de revisão a gentamicina é adicionada ao cimento ósseo com o objetivo de reduzir o risco de infecção recorrente. O objetivo desta investigação foi determinar o efeito da incorporação da gentamicina sobre as propriedades mecânicas do cimento ósseo Palacos R, também, o grau de liberação da gentamicina do cimento e a extensão do biofilme do isolado clínico *Staphylococcus* spp. formado *in vitro* sobre este cimento. Quando a gentamicina foi adicionada ao cimento (1-4g) houve uma redução significativa na performance mecânica do cimento com gentamicina comparado ao cimento sem gentamicina. O significativo aumento na liberação da gentamicina não resultou na redução da colonização bacteriana inicial, mas em 72 horas houve o efeito da gentamicina, sobre a formação do biofilme de estafilococos, apesar dos altos níveis de gentamicina liberados. Os autores concluíram que a adição de altas doses de gentamicina não erradica a bactéria presente e pode resultar na perda do implante devido a redução da performance mecânica do cimento ósseo.

3 – OBJETIVOS

3.1- Avaliar a aderência e formação de biofilme de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* sobre o cimento ósseo polimetilmetacrilato (PMMA) com e sem antibiótico (gentamicina) por meio de microscópio eletrônico de varredura e por cultura.

3.1.1 – Avaliar quantitativamente a viabilidade das células recuperadas de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*, formado sobre superfície de PMMA com e sem gentamicina.

3.1.2 – Avaliar qualitativamente a aderência bacteriana e formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* sobre a superfície de PMMA com e sem gentamicina por meio de microscopia eletrônica de varredura.

3.1.3 – Avaliar por microscópio eletrônico de varredura a topografia da superfície do cimento ósseo com e sem gentamicina.

3.2 – Avaliar a molhabilidade da superfície do PMMA com e sem gentamicina através da medida do ângulo de contato.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Material

4.1.1 – Cimentos ósseos a base de polimetilmetacrilato (PMMA) de procedência nacional (CMM de baixa viscosidade, BIOMECANICA, BAUMER) e internacional (BIOMET sem gentamicina, BIOMET com gentamicina, SIMPLEX).

Os corpos-de prova de PMMA eram em forma de discos 10,0mm de diâmetro e 3,0mm de espessura e foram cedidos pelo Engenheiro Tomaz Puga Leivas, da Comissão de Projetos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas de São Paulo-USP, São Paulo.

4.1.2 – Microrganismos

- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25932;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;

As cepas ATCC foram cedidas pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica – LEMC, da Faculdade Paulista de Medicina – UNIFESP, com autorização do Professor Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari.

4.1.3 - Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados foram: caldo Mueller Hinton (*Mueller Hinton broth*-MHb, ágar soja tríptica (*Tryptic Soy Agar*-TSA), caldo soja tríptica (*Tryptic Soy Broth*-TSB).

4.1.3.1. - Ágar Mueller-Hinton (DIFCO)

Infusão de carne bovina.....	300,0 g
Peptona ácida.....	17,5 g
Amido.....	1,5 g
Água destilada.....	1000,0mL

Hidratar de acordo com as especificações do fabricante em água MiliQ, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C e dispensar como desejar.

4.1.3.2 - *Tryptic Soy Agar (TSA)*

Peptona de Caseína.....	15,0 g
Peptona de soja.....	5,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000,0mL

Hidratar de acordo com as especificações do fabricante em água MiliQ, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C e dispensar como desejar.

4.1.3.3 - *Tryptic Soy Broth (TSB).*

Peptona de Caseína.....	17,0 g
Peptona de soja.....	3,0 g
Glicose.....	2,5 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Fosfato de potássio.....	2,5 g
Água destilada.....	1000,0mL

Hidratar de acordo com as especificações do fabricante em água MiliQ, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C e dispensar como desejar.

4.1.4 - Reagentes utilizados no preparo dos corpos-de-prova para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

4.1.4.1 - Tampão Fosfato 0,2M (pH 7,1)

Solução33,00mL

A

Solução67,00mL

B

4.1.4.2 – Solução A

Fosfato monossódico 1-hidratado (MERCK).....2,76g

Água destilada.....qsp.....100,0mL

4.1.4.3 – Solução B

Fosfato dissódico 12-hidratado (MERCK).....7,17g

Água destilada.....qsp.....100,0mL

4.1.4.4 – Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1)

Tampão fosfato 0,2M (pH 7,1).....50,00mL

Água destilada.....50,00mL

4.1.4.5 – Solução Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1) – Glutaraldeído a 2,5%

Tampão fosfato 0,1M (pH 7,1).....48,50mL

Glutaraldeído 50% solução aquosa (FLUKA).....2,50mL

4.1.4.6 – Solução de etanol a 15%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....15,00mL

Água destilada.....85,00mL

4.1.4.7 – Solução de etanol a 30%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....30,00mL

Água destilada.....70,00mL

4.1.4.8 – Solução de etanol a 50%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....50,00mL

Água destilada.....50,00mL

4.1.4.9 – Solução de etanol a 70%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....70,00mL

Água destilada.....30,00mL

4.1.4.10 – Solução de etanol a 95%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....95,00mL

Água destilada.....5,00mL

4.1.4.11 – Etanol absoluto

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....100,0mL

4.1.4.12 – Salina fisiológica a 0,85%

Cloreto0,85g

de sódio

Água100,00mL

destilada

4.1.5 – Goniômetro

O goniômetro é o instrumento usado para medir o ângulo de contato. Consiste de um instrumento automatizado com câmara digital de alta resolução e software para captura e análise do ângulo de contato. O goniômetro utilizado foi OCA-20 Contact Angle System (DataPhysics Instruments), equipamento instalado no Departamento de Físico-Química do Instituto de Química - UNESP.

Figura 8 – Goniômetro – OCA-20 Contact Angle System (DataPhysics Instruments)

4.1.6 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando software OriginPro (version 5.0) em intervalo de confiança a nível de 95%.

4.2. Métodos

4.2.1. – Corpos-de-prova de PMMA

Os corpos-de-prova na forma de discos foram fabricados com produto nacional de várias marcas que incluíram: BAUMER, BIOMET com gentamicina, BIOMET sem gentamicina, BIOMECANICA, CMM de baixa viscosidade e SIMPLEX, como apresentado na figura 9 e 10.

Figura 9 – Foto real de várias marcas do produto usado na fabricação do cimento ósseo.

A figura 10 ilustra a produção de discos de cimento ósseo após a mistura do polimetilmetacrilato (PMMA), conforme as instruções do fabricante e colocados entre duas placas de vidro, cortados, armazenados em local escuro e em condições estéreis em temperatura ambiente.

Figura 10 – Foto real do corte de discos de cimento ósseo.

4.2.2 – Preparo do inóculo bacteriano

As cepas *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* foram armazenadas em freezer à -21°C com *Tryptic Soy Broth* (TSB) suplementado de glicerol. Antes de realizar o procedimento de preparo do inóculo, os tubos foram retirados do freezer e deixados descongelar a temperatura ambiente.

Após o descongelamento, as cepas foram semeadas, individualmente, em ágar de Soja Tríptica e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica $\pm 35^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, para reativar as células bacterianas. Com auxílio de agulha, cerca de quatro unidades formadoras de colônias foram transferidas para 10,0mL de TSB.

O meio TSB contido em tubos foi homogeneizado em vortex por 15 segundos, a seguir a turvação monitorada por espectrofotômetro com comprimento de onda de 625nm. O branco foi o caldo TSB esterilizado e ausente de bactéria.

Ao atingir a absorbância entre 0,08 - 0,12 (10^8 Unidades Formadoras de Colônia/mL) a suspensão bacteriana foi inoculada em caldo TSB.

4.2.3 – Formação de biofilme bacteriano sobre cimento ósseo autopolimerizante de polimetilmetacrilato com e sem antibiótico

O experimento foi realizado de acordo com Tunney et al. (2006)

Do caldo TSB inoculado com a suspensão bacteriana da ordem de 10^8 UFC/mL, uma alíquota de 10,0mL foi distribuída aos tubos de ensaio esterilizado (18x180mm) que continham o corpo-de-prova de cada marca de cimento ósseo com e sem antibiótico. Os testes foram realizados separadamente para cada marca de cimento ósseo com e sem antibiótico.

Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 1, 6, 24, 48 e 72 horas. Após o período de incubação, com o auxílio de uma pinça esterilizada, os corpos-de-prova foram removidos de seus respectivos tubos e lavados três vezes com tampão salina fosfato (PBS), para remover bactérias não-aderidas. Após o processo de lavagem, os corpos-de-prova referentes a cada hora de incubação foram colocados em um novo tubo contendo 5,0 ml de PBS e submetidos a uma sonicação branda por 8 minutos a 80W, seguido de rápida homogeneização (30s) por vortex. Estudos de Ramage et al. (2003) relataram que estas condições eram ótimas para assegurar o máximo desalojamento da bactéria sem comprometer sua

viabilidade. Após esses procedimentos foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} – 10^{-6}) para cada bactéria recuperada da superfície do cimento ósseo de polimetilmetacrilato com e sem antibiótico.

4.2.4 – Diluições seriadas (BLACK, 1999)

Célula viável é definida como aquela capaz de dividir-se e proliferar. A maneira usual de realizar a contagem individual é determinar o número de células, na amostra, capaz de formar colônias sobre um ágar adequado. Por esta razão, a contagem viável é freqüentemente chamada de contagem de colônias e o procedimento de contagem é que cada célula viável possa produzir uma colônia.

Um dos métodos para fazer a contagem de colônias é o método do espalhamento na superfície de placa com ágar. O volume apropriado de uma cultura diluída, para ser espalhado, geralmente, não é maior do que 0,1mL. A placa é então incubada até que as colônias apareçam e o número de colônias é contado. É essencial que o número de colônias, não seja muito baixo, para ter valor estatístico. Na prática, o valor mais válido estatisticamente é a contagem de colônias realizada em placas com crescimento bacteriano entre 30 e 300 colônias.

Para obter-se o número apropriado de número de colônias, a amostra a ser contada deve se sempre diluída. Para fazer diluições seriadas a bactéria deve estar em meio líquido.

Enumerou-se oito tubos (18x180mm) de número 1 até 8. Encher os tubos de número 2 a 8 com 9,0mL de água. O tubo nº1 corresponde ao da amostra a ser contada, ou seja, após o procedimento de sonicação e vortex dos corpos-de-prova metálicos, 1,0mL da suspensão bacteriana foi transferido para os tubos seguintes, da seguinte forma:

A partir da amostra contida no tubo nº1, transferir 1,0mL para o tubo nº2, diluição de 1:10 ou 10^{-1} ; homogeneizar e do tubo nº2 transferir 1,0mL para o tubo nº3, diluição 1:100 ou 10^{-2} , homogeneizar e do tubo nº3 transferir 1,0mL para o tubo nº4, diluição 1:1000 ou 10^{-3} , homogeneizar e do tubo nº4 transferir 1,0mL para o tubo nº5, diluição 1:10.000 ou 10^{-4} , homogeneizar e do tubo nº5, transferir 1,0mL para o tubo nº6, diluição 1:100.000 ou 10^{-5} .

O número de bactérias por mL da cultura original é calculado multiplicando-se o número de colônias contadas pelo fator de diluição:

Número de células por mL=número de colônias x fator de diluição

Exemplo: colônias por placa=50

Fator de diluição: $1:1 \times 10^5$ ($1:100.000$)

Volume da diluição adicionado a placa = 0,1mL

$50 \times 100.000 = 5.000.000$ (5×10^6) células/0,1mL

$5.000.000$ (5×10^6) $\times 10 = 50.000.000$ (5×10^7) células/mL

A figura 11 mostra um esquema de diluição seriada.

4.2.5 - Método do espalhamento em placa (plaqueamento em superfície)

Após a diluição seriada da suspensão bacteriana, pipetou-se 0,1mL (100 μ L) em placas de Petri (90x15mm) contendo o meio sólido *Tryptic Soy Agar* (TSA). O inóculo foi espalhado sobre toda a superfície da placa com alça de Drigalsky. As placas de Petri tampadas foram invertidas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C. Após 24 horas de incubação as colônias crescidas foram contadas e o resultado da diluição foi registrado e multiplicado pelo fator da diluição.

4.2.6 - Análise das superfícies de PMMA, após a aderência bacteriana inicial e formação do biofilme, por meio de microscópio eletrônico de varredura - MEV usando técnicas sugeridas por Sabatini et al. (1963); Santos (1992); Videla et al. (1995) e modificadas por Pizzolitto (1997).

Os corpos-de-prova removidos do caldo de cultura inoculado com bactéria e lavados com salina fisiológica foram imersos em glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato 0,1M (pH 7,1), durante 15 minutos; desidratados em solução de etanol (15, 30, 50, 75, 95 e 100%) 15 minutos, cada um; secos em estufa a 37°C, colados em suportes metálicos próprios do equipamento; metalizados com ouro (1KV, 15mAp, 2 minutos, no aparelho Edwards S150 B) e encaixados em câmara a vácuo do microscópio e prontos para análise de varredura eletrônica por meio do microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM-T330A).

4.2.7 – Análise da molhabilidade da superfície dos corpos-de-prova de PMMA

A medida de ângulo de contato foi realizada por meio de goniômetro após depósito de uma gota de água pura (MiliQ) sobre a superfície do PMMA (em estudo).

O método direto mais utilizado para medidas de ângulo de contato consta da medida do perfil da gota do líquido ou de uma bolha depositada sobre uma superfície sólida. Estas técnicas se referem ao método da gota séssil.

No método da gota séssil, uma gota de um líquido purificado, é depositada sobre a superfície de um sólido por meio de uma seringa. A gota é observada com uma lente de baixo aumento e o ângulo de contato é medido por meio de um goniômetro. Este tipo de medida é chamado de estático. O valor do ângulo de contato de uma gota de líquido depende de energia livre de superfície da amostra e da tensão superficial do líquido. Se a gota se esparramar por toda a superfície do material seu ângulo de contato será de aproximadamente zero, mas se o espalhamento for parcial o ângulo de contato variará de 0 a 180 graus (Figura 12).

O líquido selecionado determina o grau de molhabilidade e de interação com a superfície do substrato. Este líquido deve reunir as seguintes propriedades: baixa volatilidade, baixa viscosidade, ser estável e não atacar ou reagir com a superfície do substrato. Um líquido molha um substrato quando o ângulo de contato formado entre o líquido e o sólido é menor do que 65° . O ângulo menor do que 65° caracteriza uma superfície como hidrofílica e maior do que 65° hidrofóbica. (VOGLER, 1998).

O líquido mais adequado para o estudo é a água, devido à molhabilidade e não polaridade da superfície do substrato. Quando as interfaces sólido/líquido e líquido/vapor se encontram formam um vértice e o ângulo formado entre as interfaces é referido como ângulo de contato. A tangente do ângulo entre o sólido e o líquido é conhecida como ângulo de contato.

A gota com ângulo de contato grande é hidrofóbica. Esta condição é exemplificada pela molhabilidade pobre, pouca adesividade e a energia livre de superfície do sólido é baixa.

Uma gota com pequeno ângulo de contato é hidrofílica. Esta condição reflete a melhor molhabilidade, melhor adesividade e energia de superfície alta.

O ensaio da molhabilidade do PMMA (com e sem gentamicina) foi realizado em goniômetro usando um sistema óptico de captura do perfil de gota de água pura sobre um substrato sólido. A imagem do ângulo de contato formado entre a superfície da amostra e a tangente ao líquido foi medida pela elipse e por meio da equação Laplace–Young do *software* SCA22.

As medidas foram realizadas em três diferentes pontos de cada superfície e calculada a média aritmética.

Figura 12 – Representação do ângulo de contato em (a) maior do que 65° , em (b) menor do que 65° e em (c) espalhamento total (VOGLER, 1998).

4.2.8 - Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (sd) para $n=5$. Foi usada a técnica de um único fator de análise de variância (One way-ANOVA) para avaliar a significância estatística dos resultados entre os grupos. A análise estatística foi realizada com o software OriginPro (versão 6.0) em intervalo de confiança de 95%.

O t-teste foi para comparar os dados de dois grupos independentes.

5 – RESULTADOS

5.1 - *Pseudomonas aeruginosa*

5.1.1 – Da aderência de *P. aeruginosa* sobre PMMA de procedência internacional (BIOMET com gentamicina, BIOMET sem gentamicina e SIMPLEX) e nacional (BAUMER, BIOMECANICA e CMM).

Tabela 1 – Aderência de *Pseudomonas aeruginosa* aos cimentos ósseos com e sem gentamicina.

Procedência Nacional e Internacional de Cimento Ósseo	UFC/mL nos diferentes períodos de incubação em horas				
	1	6	24	48	72
BAUMER *	+	+	+	+	+
BIOMET com gentamicina **	+	+	+	+	+
BIOMET sem gentamicina **	+	+	+	+	+
BIOMECANICA *	+	+	+	+	+
CMM *	+	+	+	+	+
SIMPLEX **	+	+	+	+	+

Legenda + = houve aderência bacteriana; * Procedência nacional; ** Procedência internacional.

5.1.2 – Da quantificação de células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas das superfícies do cimento ósseo (PMMA).

A quantificação das células viáveis recuperadas das superfícies de PMMA estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* formado sobre discos de cimento ósseo de diferentes marcas com e sem gentamicina.

Cimento Ósseo	UFC/mL nos diferentes períodos de incubação em horas				
	1	6	24	48	72
BAUMER *	$2,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$8,3 \times 10^5$
BIOMET com gentamicina **	$5,3 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$	$1,3 \times 10^5$	$9,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
BIOMET sem gentamicina **	$2,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$8,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$
BIOMECANICA *	$3,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$6,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$
CMM *	$2,4 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$	$9,9 \times 10^5$
SIMPLEX **	$3,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$7,2 \times 10^5$

Legenda: * Procedência nacional; ** Procedência internacional.

5.1.3 – Resultados de células viáveis de *P. aeruginosa*, recuperadas do biofilme formado sobre PMMA de diferentes procedências.

5.1.3.1 – BAUMER

A tabela 3 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência nacional.

Tabela 3 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* sobre o cimento ósseo da marca BAUMER.

Período de incubação em horas do cimento da marca BAUMER *	Células viáveis UFC/mL
1	$2,6 \times 10^6$
6	$4,3 \times 10^6$
24	$1,4 \times 10^6$
48	$4,9 \times 10^6$
72	$8,3 \times 10^5$

5.1.3.2 – BIOMECANICA

A tabela 4 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência nacional.

Tabela 4 - Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* sobre o cimento ósseo da marca BIOMECANICA.

Período de incubação em horas do cimento da marca BIOMECANICA *	Células viáveis UFC/mL
1	$3,0 \times 10^6$
6	$1,1 \times 10^6$
24	$2,4 \times 10^6$
48	$6,1 \times 10^5$
72	$1,4 \times 10^6$

5.1.3.3 – CMM

A tabela 5 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência nacional.

Tabela 5 - Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* sobre o cimento ósseo da marca CMM.

Período de incubação em horas do cimento da marca CMM *	Células viáveis UFC/mL
1	$2,4 \times 10^6$
6	$2,1 \times 10^6$
24	$2,2 \times 10^6$
48	$9,2 \times 10^5$
72	$9,9 \times 10^5$

5.1.3.4 – SIMPLEX

A tabela 6 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência internacional.

Tabela 6 - Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* sobre o cimento ósseo da marca SIMPLEX.

Período de incubação em horas do cimento da marca SIMPLEX **	Células viáveis UFC/mL
1	$3,4 \times 10^6$
6	$1,7 \times 10^6$
24	$2,1 \times 10^6$
48	$1,8 \times 10^6$
72	$7,2 \times 10^5$

5.1.3.5 – BIOMET com gentamicina

A tabela 7 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência internacional.

Tabela 7 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* sobre o cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina.

Período de incubação em horas do cimento da marca BIOMET com gentamicina **	Células viáveis UFC/mL
1	$5,3 \times 10^4$
6	$3,3 \times 10^3$
24	$1,3 \times 10^5$
48	$9,4 \times 10^4$
72	$1,4 \times 10^4$

5.1.3.6 – BIOMET sem gentamicina

A tabela 8 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência internacional.

Tabela 8 - Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* sobre o cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina.

Período de incubação em horas do cimento da marca BIOMET sem gentamicina **	Células viáveis UFC/ml
1	$2,7 \times 10^6$
6	$1,0 \times 10^6$
24	$2,1 \times 10^6$
48	$8,7 \times 10^5$
72	$1,2 \times 10^6$

5.1.4 – Média e desvio padrão.

A média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia de células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de superfície de cimento ósseo de diferentes marcas com e sem antibiótico, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Distribuição das médias e desvio padrão das unidades formadoras de colônia de *Pseudomonas aeruginosa* sobre diferentes marcas nacionais de cimento ósseo com e sem gentamicina de diferentes procedências.

Cimentos Ósseos	Média $\pm$ Desvio Padrão (SD)
BAUMER *	$2,8 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^6$
BIOMET com gentamicina **	$6,0 \times 10^4 \pm 5,5 \times 10^4$
BIOMET sem gentamicina **	$1,6 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$
BIOMECANICA *	$1,7 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$
CMM *	$1,7 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$
SIMPLEX **	$1,9 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$

Legenda: * Procedência nacional; ** Procedência internacional.

5.1.5 -Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do PMMA e *P. aeruginosa*.

5.1.5.1 – BAUMER: procedência nacional

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *P. aeruginosa* sobre cimento ósseo da marca BAUMER incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados nas figura 13.

Figura 13 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BAUMER após incubação com *Pseudomonas aeruginosa* em vários intervalos de tempo: A) 5000x após 1 hora de incubação; B) 5000x após 6h; C) 5000x após 24h; D) 5000x após 48h; E) 2000x após 72h. Observar bacilos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.1.5.2 – BIOMET com gentamicina: procedência internacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *P. aeruginosa* sobre cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 14.

Figura 14 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina após incubação com *Pseudomonas aeruginosa* em vários intervalos de tempo: A) 3500x após 1 hora de incubação; B) 5000x após 6h; C) 5000x após 24h; D) 5000x após 48h; E) 5000x após 72h. Observar bacilos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.1.5.3 – BIOMET sem gentamicina: procedência internacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *P. aeruginosa* sobre cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 15.

Figura 15 - Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina após incubação com *Pseudomonas aeruginosa* em vários intervalos de tempo: A) 3500x após 1 hora de incubação; B) 5000x após 6h; C) 5000x após 24h; D) 5000x após 48h; E) 5000x após 72h. Observar bacilos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.1.5.4 – BIOMECANICA: procedência nacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *P. aeruginosa* sobre cimento ósseo da marca BIOMECANICA incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 16.

Figura 16 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMECANICA após incubação com *Pseudomonas aeruginosa* em vários intervalos de tempo: A) 3500x após 1 hora de incubação; B) 5000x após 6h; C) 5000x após 24h; D) 5000x após 48h; E) 5000x após 72h. Observar bacilos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.1.5.5 – CMM: procedência nacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *P. aeruginosa* sobre cimento ósseo da marca CMM incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 17.

Figura 17 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina após incubação com *Pseudomonas aeruginosa* em vários intervalos de tempo: A) 5000x após 1 hora de incubação; B) 5000x após 6h; C) 2000x após 24h; D) 5000x após 48h; E) 5000x após 72h. Observar bacilos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.1.5.6 – SIMPLEX: procedência internacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *P. aeruginosa* sobre cimento ósseo da marca SIMPLEX incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 18.

Figura 18 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca SIMPLEX após incubação com *Pseudomonas aeruginosa* em vários intervalos de tempo: A) 5000x após 1 hora de incubação; B) 5000x após 6h; C) 5000x após 24h; D) 5000x após 48h; E) 5000x após 72h. Observar bacilos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.2 – *Staphylococcus epidermidis*

5.2.1 – Da aderência de *S. epidermidis* sobre PMMA de procedência internacional (BIOMET com gentamicina, BIOMET sem gentamicina e SIMPLEX) e nacional (BAUMER, BIOMECHANICA e CMM).

Tabela 10 – Aderência de *Staphylococcus epidermidis* a cimentos ósseos com e sem gentamicina.

Cimento Ósseo	Aderência bacteriana nos diferentes períodos de incubação em horas				
	1	6	24	48	72
BAUMER *	+	+	+	+	+
BIOMET com gentamicina **	+	+	+	+	+
BIOMET sem gentamicina **	+	+	+	+	+
BIOMECHANICA *	+	+	+	+	+
CMM *	+	+	+	+	+
SIMPLEX **	+	+	+	+	+

Legenda: + houve aderência bacteriana; * Procedência nacional; ** Procedência internacional.

5.2.2 – Da quantificação de células viáveis de *Staphylococcus epidermidis* das superfícies do cimento ósseo (PMMA).

A quantificação das células viáveis recuperadas das superfícies de PMMA estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* formado sobre discos de cimento ósseo de diferentes marcas com e sem gentamicina.

Cimentos Ósseo	UFC/mL nos diferentes períodos de incubação em horas				
	1	6	24	48	72
BAUMER *	$1,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
BIOMET com gentamicina **	$1,5 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
BIOMET sem gentamicina **	$4,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$
BIOMECANICA *	$8,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
CMM *	$7,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
SIMPLEX **	$1,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$

Legenda = * Procedência nacional; ** Procedência internacional.

5.2.3 – Resultados de células viáveis de *S. epidermidis*, recuperadas do biofilme formado sobre PMMA de diferentes procedências.

5.2.3.1 – BAUMER

A tabela 12 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência nacional.

Tabela 12 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre o cimento ósseo da marca BAUMER.

Período de incubação em horas do cimento da marca BAUMER	Células viáveis UFC/mL
1	$1,1 \times 10^6$
6	$1,4 \times 10^6$
24	$1,2 \times 10^6$
48	$1,6 \times 10^6$
72	$1,4 \times 10^6$

5.2.3.2 – BIOMECANICA

A tabela 13 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência nacional.

Tabela 13 - Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre o cimento ósseo da marca BIOMECANICA.

Período de incubação em horas do cimento da marca BIOMECANICA	Células viáveis UFC/mL
1	$1,5 \times 10^6$
6	$1,7 \times 10^6$
24	$1,8 \times 10^6$
48	$1,5 \times 10^6$
72	$1,1 \times 10^6$

5.2.3.3 – CMM

A tabela 14 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* formado sobre discos de cimento ósseo da marca nacional.

Tabela 14 - Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre o cimento ósseo da marca CMM.

Período de incubação em horas do cimento da marca CMM	Células viáveis UFC/mL
1	$7,4 \times 10^5$
6	$1,5 \times 10^6$
24	$3,3 \times 10^6$
48	$4,8 \times 10^6$
72	$1,2 \times 10^6$

5.2.3.4 – SIMPLEX

A tabela 15 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência internacional.

Tabela 15 - Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre o cimento ósseo da marca SIMPLEX.

Período de incubação em horas do cimento da marca SIMPLEX	Células viáveis UFC/mL
1	$1,2 \times 10^6$
6	$1,4 \times 10^6$
24	$1,5 \times 10^6$
48	$1,1 \times 10^6$
72	$1,1 \times 10^6$

5.2.3.5 – BIOMET com gentamicina

A tabela 15 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência internacional.

Tabela 16 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre o cimento ósseo de procedência internacional.

Período de incubação em horas do cimento da marca BIOMET com gentamicina	Células viáveis UFC/mL
1	$1,5 \times 10^6$
6	$1,7 \times 10^6$
24	$1,8 \times 10^6$
48	$1,5 \times 10^6$
72	$1,1 \times 10^6$

5.2.3.6 – BIOMET sem gentamicina

A tabela 17 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência internacional.

Tabela 17 - Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre o cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina.

Período de incubação em horas do cimento da marca BIOMET sem gentamicina	Células viáveis UFC/ml
1	$4,2 \times 10^5$
6	$1,4 \times 10^6$
24	$2,2 \times 10^6$
48	$1,2 \times 10^6$
72	$2,3 \times 10^6$

5.2.4 – Média e Desvio Padrão

A média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia de células viáveis de *S. epidermidis* recuperadas de superfície de cimento ósseo de diferentes marcas com e sem antibiótico, estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Distribuição das médias e desvio padrão das unidades formadoras de colônia de *Staphylococcus epidermidis* sobre diferentes marcas nacionais de cimento ósseo com e sem gentamicina.

Marcas Nacionais de Cimento Ósseo	Média $\pm$ Desvio Padrão (SD)
BAUMER *	$1,3 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$
BIOMET com gentamicina **	$1,5 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
BIOMET sem gentamicina **	$1,5 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$
BIOMECHANICA *	$1,5 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
CMM *	$2,3 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^6$
SIMPLEX **	$1,2 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$

Legenda: * Procedência nacional; ** Procedência internacional.

5.2.5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do PMMA e *S. epidermidis*.

5.2.5.1 – BAUMER: procedência nacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre cimento ósseo da marca BAUMER incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 19.

Figura 19 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BAUMER após incubação com *Staphylococcus epidermidis* em vários intervalos de tempo: A) 7500x após 1 hora de incubação; B) 7500x após 6h; C) 5000x após 24h; D) 7500x após 48h; E) 7500x após 72h. Observou cocos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.2.5.2 – BIOMET com gentamicina: procedência internacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 20.

Figura 20 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina após incubação com *Staphylococcus epidermidis* em vários intervalos de tempo: A) 10000x após 1 hora de incubação; B) 5000x após 6h; C) 7500x após 24h; D) 7500x após 48h; E) 5000x após 72h. Observou cocos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.2.5.3 – BIOMET sem gentamicina: procedência internacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 21.

Figura 21 - Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina após incubação com *Staphylococcus epidermidis* em vários intervalos de tempo: A) 5000x após 1 hora de incubação; B) 7500x após 6h; C) 10000x após 24h; D) 10000x após 48h; E) 7500x após 72h. Observou cocos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.2.5.4 – BIOMECANICA: procedência nacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre cimento ósseo da marca BIOMECANICA incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 22.

Figura 22 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMECANICA após incubação com *Staphylococcus epidermidis* em vários intervalos de tempo: A) 5000x após 1 hora de incubação; B) 7500x após 6h; C) 7500x após 24h; D) 10000x após 48h; E) 7500x após 72h. Observou cocos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.2.5.5 – CMM: procedência nacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre cimento ósseo da marca CMM incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 23.

Figura 23 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca CMM após incubação com *Staphylococcus epidermidis* em vários intervalos de tempo: A) 5000x após 1 hora de incubação; B) 7500x após 6h; C) 7500x após 24h; D) 10000x após 48h; E) 7500x após 72h. Observou cocos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.2.5.6 – SIMPLEX: procedência internacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre cimento ósseo da marca SIMPLEX incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 24.

Figura 24 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca SIMPLEX após incubação com *Staphylococcus epidermidis* em vários intervalos de tempo: A) 5000x após 1 hora de incubação; B) 5000x após 6h; C) 7500x após 24h; D) 5000x após 48h; E) 7500x após 72h. Observou cocos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.3 - *Staphylococcus aureus*

5.3.1 – Da aderência de *S. aureus* sobre PMMA de procedência internacional (BIOMET com gentamicina, BIOMET sem gentamicina e SIMPLEX) e nacional (BAUMER, BIOMECANICA e CMM).

Tabela 19 – Aderência de *Staphylococcus aureus* a cimentos ósseos com e sem gentamicina.

Cimento Ósseo	Aderência bacteriana nos diferentes períodos de incubação em horas				
	1	6	24	48	72
BAUMER *	+	+	+	+	+
BIOMET com gentamicina **	+	+	+	+	+
BIOMET sem gentamicina **	+	+	+	+	+
BIOMECANICA *	+	+	+	+	+
CMM *	+	+	+	+	+
SIMPLEX **	+	+	+	+	+

Legenda: + houve aderência bacteriana; * Procedência nacional; ** Procedência internacional.

5.3.2 – Da quantificação de células viáveis de *Staphylococcus aureus* recuperadas das superfícies do cimento ósseo (PMMA).

As quantificações das células viáveis recuperadas das superfícies de PMMA estão apresentadas na tabela 20.

Tabela 20 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus aureus* formado sobre discos de cimento ósseo de diferentes marcas com e sem gentamicina.

Marcas Nacionais de Cimento Ósseo	UFC/mL nos diferentes períodos de incubação em horas				
	1	6	24	48	72
BAUMER *	$1,4 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$9,8 \times 10^5$
BIOMET com gentamicina **	$8,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$	$8,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
BIOMET sem gentamicina **	$1,2 \times 10^6$	$9,8 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$7,7 \times 10^5$	$9,4 \times 10^5$
BIOMECANICA *	$2,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$8,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$
CMM *	$1,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$9,8 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$
SIMPLEX **	$1,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$9,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$6,8 \times 10^5$

Legenda: * Procedência nacional; ** Procedência internacional.

5.3.3 – Resultados de células viáveis de *S. aureus*, recuperadas do biofilme formado sobre PMMA de diferentes procedências.

5.3.3.1 – BAUMER

A tabela 21 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Staphylococcus aureus* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência nacional.

Tabela 21 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre o cimento ósseo da marca BAUMER.

Período de incubação em horas do cimento da marca BAUMER	Células viáveis UFC/mL
1	$1,4 \times 10^6$
6	$2,1 \times 10^6$
24	$3,1 \times 10^6$
48	$1,4 \times 10^6$
72	$9,8 \times 10^5$

5.3.3.2 - BIOMECANICA

A tabela 22 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Staphylococcus aureus* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência nacional.

Tabela 22 - Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre o cimento ósseo da marca BIOMECANICA.

Período de incubação em horas do cimento da marca BIOMECANICA	Células viáveis UFC/mL
1	$2,2 \times 10^6$
6	$1,6 \times 10^6$
24	$2,5 \times 10^6$
48	$8,9 \times 10^5$
72	$1,1 \times 10^6$

5.3.3.3 - CMM

A tabela 23 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Staphylococcus aureus* formado sobre discos de cimento ósseo da marca CMM.

Tabela 23 - Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre o cimento ósseo da marca CMM.

Período de incubação em horas do cimento da marca CMM	Células viáveis UFC/mL
1	$1,8 \times 10^6$
6	$1,5 \times 10^6$
24	$2,3 \times 10^6$
48	$9,8 \times 10^5$
72	$7,4 \times 10^5$

5.3.3.4 - SIMPLEX

A tabela 24 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Staphylococcus aureus* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência internacional.

Tabela 24 - Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre o cimento ósseo da marca SIMPLEX.

Período de incubação em horas do cimento da marca SIMPLEX	Células viáveis UFC/mL
1	$1,3 \times 10^6$
6	$2,4 \times 10^6$
24	$9,6 \times 10^6$
48	$1,2 \times 10^6$
72	$6,8 \times 10^5$

5.3.3.5 – BIOMET com gentamicina

A tabela 25 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Staphylococcus aureus* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência internacional.

Tabela 25 – Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre o cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina.

Período de incubação em horas do cimento da marca BIOMET com gentamicina	Células viáveis UFC/mL
1	$8,0 \times 10^3$
6	$3,5 \times 10^4$
24	$1,4 \times 10^6$
48	$8,2 \times 10^4$
72	$1,0 \times 10^4$

5.3.3.6 – BIOMET sem gentamicina

A tabela 26 mostra os resultados da recuperação de células viáveis de biofilme de *Staphylococcus aureus* formado sobre discos de cimento ósseo de procedência internacional.

Tabela 26 - Distribuição das células viáveis recuperadas de biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre o cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina.

Período de incubação em horas do cimento da marca BIOMET sem gentamicina	Células viáveis UFC/ml
1	$1,2 \times 10^6$
6	$9,8 \times 10^5$
24	$2,1 \times 10^6$
48	$7,7 \times 10^5$
72	$9,4 \times 10^5$

5.3.4 – Média e Desvio Padrão.

A média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia de células viáveis de *Staphylococcus aureus* recuperadas de superfície de cimento ósseo de diferentes marcas com sem antibiótico, estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27 - Distribuição das médias e desvio padrão das unidades formadoras de colônia de *Staphylococcus aureus* sobre diferentes marcas nacionais de cimento ósseo com e sem gentamicina.

Marcas Nacionais de Cimento Ósseo	Média $\pm$ Desvio Padrão (SD)
BAUMER *	$1,7 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$
BIOMET com gentamicina **	$3,0 \times 10^5 \pm 6,0 \times 10^5$
BIOMET sem gentamicina **	$1,1 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$
BIOMECHANICA *	$1,6 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$
CMM *	$1,4 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$
SIMPLEX **	$1,3 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$

Legenda: * Procedência nacional; ** Procedência internacional.

5.3.5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do PMMA e *S. aureus*.

5.3.5.1 – BAUMER: procedência nacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre cimento ósseo da marca BAUMER incubado nos intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 25.

Figura 25 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BAUMER após incubação com *Staphylococcus aureus* em vários intervalos de tempo: A) 5000x após 1 hora de incubação; B) 3500x após 6h; C) 5000x após 24h; D) 7500x após 48h; E) 5000x após 72h. Observou cocos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.3.5.2 – BIOMET com gentamicina: procedência internacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 26.

Figura 26 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina após incubação com *Staphylococcus aureus* em vários intervalos de tempo: A) 5000x após 1 hora de incubação; B) 3500x após 6h; C) 3500x após 24h; D) 5000x após 48h; E) 3500x após 72h. Observou cocos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.3.5.3 – BIOMET sem gentamicina: procedência internacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 27.

Figura 27 - Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina após incubação com *Staphylococcus aureus* em vários intervalos de tempo: A) 1500x após 1 hora de incubação; B) 3500x após 6h; C) 3500x após 24h; D) 5000x após 48h; E) 5000x após 72h. Observou cocos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.3.5.4 – BIOMECANICA: procedência nacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre cimento ósseo da marca BIOMECANICA incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 28.

Figura 28 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina após incubação com *Staphylococcus aureus* em vários intervalos de tempo: A) 3500x após 1 hora de incubação; B) 5000x após 6h; C) 5000x após 24h; D) 3500x após 48h; E) 3500x após 72h. Observou cocos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.3.5.5 – CMM: procedência nacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre cimento ósseo da marca CMM incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 29.

Figura 29 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca CMM após incubação com *Staphylococcus aureus* em vários intervalos de tempo: A) 3500x após 1 hora de incubação; B) 5000x após 6h; C) 2000x após 24h; D) 2000x após 48h; E) 3500x após 72h. Observou cocos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.3.5.6 – SIMPLEX: procedência internacional.

Os resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre cimento ósseo da marca SIMPLEX incubado em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 30.

Figura 30 – Micrografia de superfície do cimento ósseo da marca SIMPLEX após incubação com *Staphylococcus aureus* em vários intervalos de tempo: A) 3500x após 1 hora de incubação; B) 5000x após 6h; C) 2000x após 24h; D) 5000x após 48h; E) 5000x após 72h. Observou cocos aderidos e agrupados. Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL-JSM, modelo T330A.

5.4 – Média das UFC/mL recuperadas das superfícies dos cimentos ósseos de diferentes procedências.

As médias das UFC/mL recuperadas das superfícies dos cimentos ósseos de procedência nacional (BAUMER, BIOMECHANICA e CMM) e de procedência internacional (BIOMET com gentamicina, BIOMET sem gentamicina e SIMPLEX), dos diferentes períodos de incubação (1, 6, 24, 48 e 72 horas) estão representadas na Figura 31.

Figura 31 – Média e desvio padrão das UFC/mL recuperadas da *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *S. aureus* das superfícies dos cimentos ósseos testados, após os períodos de incubação.

5.5 – Superfície dos corpos-de-prova das marcas de cimento ósseo a base de polimetilmetacrilato: Observação topográfica.

5.5.1 – BAUMER

Figura 31 – Eletromicrografia de varredura da topografia da superfície do corpo-de-prova da marca BAUMER.

5.5.2 – BIOMET com gentamicina

Figura 32 – Eletromicrografia de varredura da topografia da superfície do corpo-de-prova da marca BIOMET com gentamicina.

5.5.3 – BIOMET sem gentamicina

Figura 33 – Eletromicrografia de varredura da topografia da superfície do corpo-de-prova da marca BIOMET sem gentamicina.

5.5.4 – BIOMECANICA

Figura 34 – Eletromicrografia de varredura da topografia da superfície do corpo-de-prova da marca BIOMECANICA.

5.5.5 – CMM

Figura 35 – Eletromicrografia de varredura da topografia da superfície do corpo-de-prova da marca CMM.

5.5.6 – SIMPLEX

Figura 36 – Eletromicrografia de varredura da topografia da superfície do corpo-de-prova da marca SIMPLEX.

5.6 – Molhabilidade da superfície de PMMA com e sem gentamicina (medidas de ângulo de contato)

A distribuição das medidas dos ângulos de contato da superfície dos discos de cimento ósseo PMMA com e sem gentamicina está apresentada na tabela 28.

Tabela 28 – Distribuição das médias dos ângulos de contato e desvio padrão dos cimentos ósseos com e sem gentamicina.

Marcas de cimento ósseo	Média $\pm$ desvio padrão (sd)
BAUMER	78,4 ^o $\pm$ 6,7
BIOMET com gentamicina	77,9 ^o $\pm$ 0,7
BIOMET sem gentamicina	80,8 ^o $\pm$ 1,8
BIOMECANICA	76,9 ^o $\pm$ 1,6
CMM	86,5 ^o $\pm$ 6,4
SIMPLEX	85,7 ^o $\pm$ 0,5

Os dados obtidos das medidas de ângulo de contato da superfície do PMMA com e sem gentamicina mostram que são hidrofóbicas ($> 65^{\circ}$).

6 – DISCUSSÃO

A presente pesquisa mostra a aderência e formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* sobre cimento ósseo a base de polimetilmetacrilato em seis diferentes marcas, sendo três nacionais (BAUMER, BIOMECANICA e CMM) e três internacionais (BIOMET sem gentamicina, BIOMET com sulfato de gentamicina, SIMPLEX).

O presente estudo mostra o número da contagem das unidades formadoras de colônia recuperadas da superfície dos corpos-de-prova de cimento ósseo com e sem gentamicina (Tabelas 2, 11, 20). De acordo com as tabelas, o número das UFC/mL aderidas a superfície dos corpos-de-prova aumentaram durante as primeiras horas de incubação (1 e 6 horas), e após 24 horas (pico máximo), houve uma queda na contagem de células viáveis recuperadas, dados estes concordantes com os estudos de van de Belt et al, (2000) e van de Bel et al. (2001) que realizaram aderência e formação de biofilme bacteriano de *S. aureus* em diferentes marcas de cimento ósseo contendo gentamicina, e observaram um aumento na contagem de UFC/cm² no período de incubação de 6 e 24 horas, e após as 24 horas diminuição de UFC/cm² recuperada dos corpos-de-prova de cimento ósseo.

Quando comparados a aderência e formação de biofilme das três bactérias testadas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*) sobre as seis diferentes marcas de cimento ósseo a base de polimetilmetacrilato (BAUMER, BIOMET com gentamicina, BIOMET sem gentamicina, CMM, BIOMECANICA e SIMPEX) no presente estudo, observamos que para o cimento ósseo da marca BAUMER, a *P. aeruginosa* foi a cepa que mais aderiu e formou biofilme, sendo o pico máximo de aderência em 48 horas ($4,9 \times 10^6$ UFC/mL) e o mínimo em 72 horas ($9,8 \times 10^5$ UFC/mL); da marca BIOMET com gentamicina, o *S. epidermidis* foi o que mais aderiu e formou biofilme, sendo o pico máximo em 24 horas ($1,8 \times 10^6$ UFC/mL), após, demonstrou-se queda de UFC/mL em 48 e 72 horas ($1,1 \times 10^6$ UFC/mL); da marca BIOMET sem gentamicina, o *S. epidermidis* foi o que mais aderiu e formou biofilme, sendo o pico máximo em 48 horas de incubação ($1,2 \times 10^6$ UFC/mL) e o mínimo em 1 hora ($8,8 \times 10^5$ UFC/mL); da marca BIOMECANICA, o *S. epidermidis* mostrou dados similares a marca BIOMET sem gentamicina, demonstrando o pico máximo em 48 horas de incubação ($2,8 \times 10^6$ UFC/mL) e o mínimo em 1 hora ($7,4 \times 10^5$ UFC/mL); da marca CMM, a cepa que apresentou maior aderência e

formação de biofilme foi o *S. epidermidis*, que apresentou pico máximo em 48 horas ($4,8 \times 10^6$ UFC/mL) e mínimo em 1 hora ($7,4 \times 10^5$ UFC/mL), dados similares ao BIOMET sem gentamicina e BIOMECANICA; da marca SIMPLEX, a cepa que apresentou maior aderência e formação de biofilme foi a *P. aeruginosa*, demonstrando pico máximo em 1 hora de incubação ($3,4 \times 10^6$ UFC/mL) e mínimo em 72 horas ($7,2 \times 10^5$ UFC/mL), respectivamente.

De acordo com os resultados do presente estudo, todas as marcas de cimento ósseo apresentaram aderência e formação de biofilme bacteriano desde a primeira hora de incubação para todas as três cepas testadas, dados estes representados nas Tabelas 1, 10 e 19.

O presente estudo demonstrou aderência e formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* para todas as marcas de cimento ósseo testadas e para todos os períodos de incubação, dados concordantes com o estudo realizado por NEUT et al. (2005) que observaram a aderência e formação de biofilme da *P. aeruginosa* em cimento ósseo com e sem antibiótico nos períodos de incubação de 24 e 48 horas.

Em relação à contagem de células viáveis da *P. aeruginosa*, observou-se macroscopicamente o desenvolvimento de duas diferentes colônias recuperadas dos discos de cimento ósseo com gentamicina (Tabela 7). Algumas colônias eram de tamanho grande, bordas irregulares e opacas, enquanto outras colônias (aproximadamente 42% do total) eram pequenas colônias variantes com bordas rugosas. Drenkard e Ausubel (2002) encontraram pequenas colônias de *P. aeruginosa* com bordas rugosas em pacientes com fibrose cística e foram chamadas de pequenas colônias variantes. O termo pequenas colônias variantes refere-se ao fenômeno onde certas bactérias apresentam variações no crescimento, ou seja, crescem vagarosamente em meios de cultura de rotina e produzem pequenas colônias em comparação ao crescimento das cepas parentais e isto, de acordo com Roggenkamp et al. (1998) esta modificação não implica em reversão genética. Em média o número de unidades formadoras de colônia recuperadas de discos de cimento ósseo com gentamicina foram $6 \times 10^4 \pm 5,5 \times 10^4$ e sem gentamicina foram $1,6 \times 10^6 \pm 7,9 \times 10^6$. Observou-se uma redução de 100 vezes no crescimento bacteriano devido a incorporação de gentamicina.

Neut et al. (2005) sugerem que o cimento ósseo contendo antibiótico estimularia a produção de polissacarídeo extracelular da *Pseudomonas aeruginosa*, diminuindo a eficácia da ação do antibiótico frente à bactéria.

De acordo com os resultados do estudo de von Eiff et al. (2000), os autores sugerem que o cimento ósseo contendo antibiótico também estimularia a formação de “pequenas colônias variantes” de *P. aeruginosa*, a qual, tais colônias apresentam menor sensibilidade a gentamicina. A ligação entre as pequenas colônias variantes e infecções persistentes e reincidentes tem se fortalecido ao longo das últimas décadas, especialmente em pacientes com osteomielite crônica e infecções em próteses de quadril e joelho.

De acordo com os resultados da presente pesquisa, a cepa *Staphylococcus epidermidis*, foi a que apresentou maior média de células viáveis recuperadas da superfície dos corpos-de-prova, quando comparadas as UFC/mL do *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Tabelas 9, 18, 27). Segundo estudos realizados por Vermont et al. (1998), o *S. epidermidis* é reconhecido ser um dos mais comuns causadores de sérias infecções nosocomiais e apresenta capacidade de aderir à dispositivos médicos e formar biofilme. Os biofilmes produzidos por esta cepa desempenham um papel importante nas infecções de implantes como cateteres, próteses e também em cimento ósseo.

A presente pesquisa demonstrou por microscopia eletrônica de varredura a aderência e formação de biofilme do *S. epidermidis* aos corpos-de-prova de todas as marcas testadas (Figuras 19-24), dados concordantes com o estudo realizado por Cerca et al. (2005) que observaram a formação de biofilme de *S. epidermidis* sobre o cimento ósseo em 12 e 72 horas de incubação, e com o estudo realizado por Gallo et al. (2005) que também observaram a aderência e formação de biofilme bacteriano de *S. epidermidis* e *S. aureus* sobre a superfície do cimento ósseo contendo gentamicina no período de 48 horas de incubação.

De acordos com os resultados obtidos no presente estudo, as cepas *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* testadas apresentaram capacidade de aderir e formar biofilme bacteriano sobre o cimento ósseo que continha o antibiótico sulfato de gentamicina. O antibiótico mostrou inibir mais as cepas *S. aureus* e *P. aeruginosa* do que a *S. epidermidis*, conforme mostrados nas Tabelas 7, 16, 25.

Segundo pesquisa realizada por Tunney et al. (2006) que testaram a aderência e formação de biofilme bacteriano de 10 isolados de *Staphylococcus spp.*

sobre cimento ósseo com e sem gentamicina nos períodos de incubação de 6, 24 48 e 72 horas, os cimentos ósseos que continham gentamicina preveniram a colonização de cepa de 2 cepas, reduziram a de 7 cepas e para 1 cepa, o antibiótico não apresentou efeito, e para o período de incubação de 72 horas, os cimentos ósseos com e sem gentamicina apresentavam formação de biofilme bacteriano similares. Os resultados obtidos das UFC/mL da presente pesquisa apresentam-se similares ao estudo realizado por Tunney et al. (2006), uma vez que, as UFC/mL recuperadas de *P. aeruginosa* e *S. aureus* mostraram que o antibiótico inibiu parcialmente a colonização bacteriana, porém, quando comparados tais resultados com o *S. epidermidis*, os dados são divergentes ao nosso estudo, uma vez que, desde a primeira hora de incubação o antibiótico não apresentou efeito sobre a cepa testada (Tabela 16).

De acordo com a contagem de UFC/mL do *S. epidermidis* (Tabela 16) e do *S. aureus* (Tabela 25), a ação do antibiótico ao *S. aureus* foi mais efetiva quando comparado ao *S. epidermidis*, porém para ambas cepas, conseguimos observar por MEV a aderência e formação de biofilme bacteriano sobre a superfície do corpo-de-prova contendo gentamicina para o *S. epidermidis* (Figura 20) e *S. aureus* (Figura 26), dados concordantes com estudos realizados por Neut et al. (2004) que observaram, por MEV, a aderência e formação de biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis* em cimento ósseo contendo gentamicina, e trabalho publicado por Gracia et al. (1997), que também observaram a presença de células bacterianas aderidas a superfície do substrato em todos os períodos de incubação de 1, 2, 6, 24 e 48 horas.

O presente estudo demonstrou através dos valores dos ângulos de contato da água, a hidrofobicidade das seis marcas de cimento ósseo (Tabela 28). Os resultados deste teste demonstraram ângulos de contato que variaram de 76° a 86°, sendo assim, a superfície dos corpos-de-prova foram caracterizada como hidrofóbicas (>65°), para todas as marcas de cimento ósseo. Estes resultados formam compatíveis aos estudos de Owens e Wendt (1969), Bruinsma et al. (2001) e Souza et al. (2009) que estudaram a hidrofobicidade da superfície do PMMA, e os ângulos variaram de 75 a 85°, com isso, os autores caracterizaram a superfície do PMMA como hidrofóbica.

Segundo Baker e Greenham (1988), Katsikogianni et al., (2006), a hidrofobicidade e a rugosidade do substrato são as propriedades mais importantes

envolvidas no fenômeno de adesão bacteriana. As irregularidades aumentam a área de superfície, e promovem um maior favorecimento e surgimento de sítios adicionais para colonização bacteriana, tal como rachaduras que protegem as células bacterianas, porém, nem sempre é confirmada uma relação linear entre adesão bacteriana e rugosidade superficial. Na presente pesquisa, ficou evidenciado, por microscópio eletrônico de varredura, as imperfeições das superfícies dos corpos-de-prova de todos os cimentos ósseos (Figuras 31, 32, 33, 34, 35, 36), sendo os corpos-de-prova que apresentaram maior quantidade de imperfeições (ou irregularidades) foi da marca BIOMET (com e sem gentamicina), como representados na figuras 32 e 33.

De acordo com as fotos registradas por microscopia eletrônica de varredura de cada período de incubação (Figura 13 – 30), para os cimentos ósseos com e sem gentamicina, foi possível observar células bacterianas aderidas à superfície do corpo-de-prova, e em algumas fotos conseguimos registrar o acúmulo celular bacteriano, produção de polissacarídeo extracelular e comunicação celular, fortes características de formação de biofilme bacteriano. Souza et al. (2008) observaram, por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica, aderência e formação de biofilme de *S. epidermidis* a partir de duas horas de incubação do corpo-de-prova.

De acordo com a Figura 31, que representa as médias de UFC/mL de *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *S. aureus* recuperadas das superfícies dos diferentes cimentos ósseos, para marca BAUMER a cepa que apresentou maior número de células recuperadas foi a *P. aeruginosa*; para as marca BIOMET com gentamicina, BIOMET, BIOMECANICA e CMM a cepa que apresentou maior número de células recuperadas foi o *S. epidermidis*; para a marca SIMPLEX, o *S. aureus* foi o que apresentou maior número de células recuperadas, respectivamente.

Segundo Cerca (2006), as infecções de materiais implantáveis por cepas *S. aureus* e *S. epidermidis*, são cada vez mais freqüentes. O *S. aureus* é considerado um patógeno clássico, causando sérias doenças em indivíduos saudáveis, enquanto o *S. epidermidis* é o principal patógeno bacteriano envolvido em infecções nosocomiais. Mesmo limitado de fatores de virulência, quando comparados ao *S. aureus*, a principal característica do *S. epidermidis* é a habilidade de formar biofilmes e causar infecções persistentes. Devido a este fato, observamos em nossos estudos uma prevalência de aderência e formação de biofilme da cepa *S. epidermidis* em

66,8% dos cimentos ósseos testados, sendo que dois cimentos ósseos eram de procedência internacional (33,4%) e dois de procedência nacional (33,4%). Segundo Gotz (2002), a cepa *S. epidermidis* lidera as espécies de estafilococos capazes de formar biofilme e causar infecções relacionadas a dispositivos implantáveis.

De acordo com os resultados da Figura 31, a cepa *S. epidermidis* foi a que mais aderiu e formou biofilme sobre a superfície do cimento ósseo que continha gentamicina (BIOMET com gentamicina), enquanto que para as outras cepas, a incorporação do antibiótico inibiu, em uma proporção maior quando comparados ao *S. epidermidis*, mas não eliminou as bactérias ou impediu que elas fossem capazes de aderir e formar biofilme sobre tal superfície. Dessa forma, o antibiótico mostrou não ser efetivo quando uma bactéria entra em contato com a camada condicionante do biomaterial, se adere e forma biofilme.

A interação entre bactéria e biomaterial continua sendo assunto para estudo detalhado, porque a infecção representa hoje um sério problema nas cirurgias que utilizam implantes (ex. artroplastias). As infecções acarretam ao paciente um maior período de tempo no hospital, desconforto, dor, e aumenta a chance de contaminação do sítio cirúrgico por uma infecção hospitalar, além do que, eleva os gastos gerados ao hospital.

As técnicas de análise da formação de biofilmes sobre biomateriais, como a empregada neste estudo, possibilitarão o desenvolvimento de tratamentos e recobrimentos superficiais e a preparação das superfícies dos biomateriais que compõem as diversas partes dos implantes, principalmente aqueles que ficarão implantados por períodos longos, como as próteses articulares (prótese total do quadril, do joelho, do ombro, etc) e as não convencionais (tumores), os cimentos e os adesivos cirúrgicos. Novas estratégias de prevenção da formação de biofilmes deverão ser propostas e avaliadas. A superfície ideal de um implante deverá ser seletiva e projetada de forma a impedir ou dificultar a formação de biofilmes bacterianos e, ainda assim, de possibilitar interação dos tecidos humanos específicos (osso, músculo, epitélio) sem desencadear o seu encapsulamento ou promover a formação de fibrose na interface implante-tecido hospedeiro. Essa tecnologia, imprescindível para os implantes articulares ortopédicos, também será importante para a análise e o desenvolvimento de dispositivos implantáveis de outras especialidades médicas (válvulas cardíacas, próteses mamárias, próteses penianas, implantes cocleares).

7 – CONCLUSÕES

1. A avaliação quantitativa das células viáveis (*P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. aureus*) recuperadas da superfície do PMMA com e sem gentamicina, mostrou unidades formadoras de colônias (UFC/mL) desde 1 até 72 horas de incubação;
2. A observação por meio de microscópio eletrônico de varredura mostrou formação de biofilme por *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *S. aureus*, em todas as marcas de cimento ósseo.
3. A observação por meio de microscópio eletrônico de varredura, mostrou que o PMMA com e sem gentamicina apresenta superfície irregular, porosa e com imperfeições.
4. A avaliação da molhabilidade do PMMA com e sem gentamicina, por meio da medida do ângulo de contato, mostrou ângulos que variaram de 76° a 86°, sugerindo que o biomaterial é hidrofóbico.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AMARAL, I. F.; BARBOSA, M. A.; BARRIAS, C. C.; CAVALHEIRO, J.; FERRAZ M. P.; GRANJA, P. L.; LOPES M. A.; MARTINS, M. C .L.; MONTEIRO, F. J.; RIBEIRO, C. C.; SANTOS, J. D.; SOUSA, S. R.; QUEIROZ, A. C. **Biomateriais**. In: Biotecnologia. Lima, N e Mota, M.(eds), Lidel, 377-397, 2003.

ARIZONO, T.; OGA, M.; SUGIOKA, Y. Increased resistance of bacteria after adherence to polymethylmethacrylate. An in vitro study. **Acta Orthop. Scand.**, v. 63, p. 661-664, 1992.

BAKER, A. S.; GREENHAM, L. W. Release of gentamicin from acrylic bone cement: elution and diffusion studies. **J. Bone Joint Surg.**, v. 70, n. 10, p. 1551-1557, 1988.

BARB, W.; PARK, J.B.; KENNER, G.H.; RECUM, A.F. Intramedullary fixation of artificial hip joints with bone cement-precoated implants. Interfacial strengths. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 16, p. 447-458, 1982.

BARROS, C.A.M. **Estudo comparativo da resistência à compressão do cimento ósseo nacional e do importado, preparados manualmente e a vácuo**. Tese de Mestrado. Programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2001.

BARTH, E.; MYRVIK, Q.W.; WAGNER, W.; GRISTINA, A.G. In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. **Biomaterial**. v. 10, p. 325-328, 1989.

BENGTON, S.; BLOMGREN, G.; KNUTSON, K.; NIGREN, A.; LIDGREN. L. Hematogens infection after knee arthroplasty. **Acta Orthop. Scand.**, v. 58, p. 529-534, 1987.

BERBARI, E. F.; HANSSEN, A. D.; DUFFY, M. C. Risk factors for prosthetic joint infections; case – control study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, p. 1247-1254, 1998.

BISHOP, N.E.; FERGUSON, S.; TEPIC, S. Porosity reduction in bone cement at the cement-stem interface. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 78-B, n.3, p. 349-356, 1996.

BLACK, J. G. **Microbiology principles and explorations**. 4ed., Wiley, New York, p. 786, 1999.

BOOTH, C.; PRICE, C. Polymers as biomaterials. In: Comprehensive polymer science – the synthesis, characterization, reaction and applications of polymers. **Pergamon Press**, p. 202-208, 1989.

BRYANT, M. P.; WOLIN, E. A.; WOLIN, M. J.; WOLFE, R. S. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of 2 species of bacteria. **Arch. Mikrobiol.**, v. 59, p. 20-31, 1967.

BRUINSMA, G. M.; ABBING, M. R.; van der MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Microbiol. Meth.**, v. 45, p. 95–101, 2001.

BUCHHOLZ, H. W.; ENGELBRECHT, H. Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. **Chirurg.**, v. 41(11), p. 511-515, 1970.

BUCHHOLZ, H.W.; ENGELBRECHT, H.; ROTTER, J.; SIEGEL, A.; LODENKÄMPER, H.; ELSON, R.A. The management of deep infection involving joint implants. **J. Bone Joint Surg. Br.**, v. 61: p. 118, 1979.

BUCHHOLZ, H.W.; ENGELBRECHT, H.; ROTTER, J.; SIEGEL, A.; LODENKÄMPER, H.; ELSON, R.A. The management of deep infection involving joint implants. **J. Bone Joint Surg. Br.**, v. 61: p. 118, 1981.

BURKE, D.W.; GATES, E.J.; HARRIS, W.H. Centrifugation as a method of improving tensile and fatigue properties of acrylic bone cement. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 66-A, n. 8, p. 1265-1273, 1984.

CERCA, N. M. D. **Virulence aspects of *Staphylococcus epidermidis*: biofilm formation and Poly-N-Acetyl-Glucosamine production.** Dissertação para grau de PhD. 214 f., Universidade do Ninho – Escola de Engenharia, Portugal, 2006.

CHARNLEY, J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 42-B, n.1, p. 28-30, 1960.

CHARNLEY, J. Acrylic cement in orthopaedic surgery. Edinburgh and London, E & S Livingstone, 1970.

CHOIFI, M.; LANGLAIS, F. O cimento ortopédico associado à vancomicina: comportamento mecânico e difusão do antibiótico. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 29, p. 363-370, 1994.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318–2, 1999.

DAHINDEN, C. A.; FEHR, J.; HUGLI, T. E. Role of cell surface contact in the kinetics of superoxide production by granulocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 72, p. 113–21, 1983.

DANIELS, A.U.; TOOMS, R.E.; HARKESS, J.W. Introduction and overview. *In*: CANALE, Terry (ed.) **Campbel's operative orthopaedics**. 9 ed. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, v.1, p. 212-227, 1998.

DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON J. W.; GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295–8, 1998.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DEB, S.; VASQUEZ, B.; BONFIELD, W. Effect of crosslinking agents on acrylic bone cements based on poly(methylmethacrylate). **Journal of Biomedical Materials Research** part A, n. 4, v. 37, p. 465-473, 1997.

DOHMAE, Y.; BECHTOLD, J. E.; SHERMAN, R.; PUNO, R.; GUSTILO, R. B. Reduction in cement-bone interface shear between primary and revision arthroplasty. **Clinical Orthopaedic**, v. 236, p. 214-220, 1988.

DRENKARD, E.; AUSUBEL, F. M. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. **Nature**, v. 416, p. 740-3, 2002

DUCHEYNE, P. Bioceramics - Material Characteristics Versus Invivo Behavior. **Journal of Biomedical Materials Research-Applied Biomaterials**, v. 21, p. 219-236, 1987.

DUNNE, W. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 155-166, 2002.

FITZGERALD, R.: Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v.65, p. 371-380, 1983.

FONSECA, P.; GRANJA, P.; NOGUEIRA, J.; OLIVEIRA, R.; BARBOSA, M. *Staphylococcus epidermidis* RP62A adhesion to chemically modified cellulose derivatives. **J. Mat. Science: Mat. Med.**, v. 12: p. 543-548, 2001.

FRANCOIS, P.; VAUDAUX, P.; NURDIN, N.; MATHIEU, H. J. ; DESCOUTS, P.; LEW D. P. Physical and biological effects of a surface coating procedure on polyurethane catheters. **Biomaterials**, v. 17, p. 667-78, 1996.

FRÈRE, J.M.; DUBUS, A.; FONZÉ, E. Pathogens old, new and revived. **Nat. Biotechnol.** n. 18, p. 17, 1999.

GALLO, J.; KOLÀR, M.; FLORSCHÜTZ, A.V.; NOVOTNY, R.; PANTUCEK, R.; KESSELOVÁ, M. *In vitro* testing of gentamicina-vancomycin loaded bone cement to prevent prosthetic joint infection. **Biomed. Papers**, n.149, v.1, p. 153-158, 2005.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. Microreview. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1367-1378, 2002.

GRACIA, E.; FERNANDEZ, A.; CONCHELLO, P.; LACLÉRIGA, A.; PANIAGUA, L.; SERAL, F.; AMORENA, B. Adherence of *Staphylococcus aureus* slime producing variants to biomaterials used in orthopaedic surgery. **Int. Orthop.**, v. 21, p. 46-51, 1997.

GRISTINA, A. G.; HOBGOOD, C. D.; BARTH, E. Biomaterial specificity, molecular mechanisms and clinical relevance of *S. epidermidis* and *S. aureus* infections in surgery. **Zbl. Bakt. Suppl.**, v. 16, p. 143-157, 1987.

HAAS, S.S.; DICKSON, G.; BRAUER, G.M. A proposed specification for acrylic bone cement. **J. Biomed. Mater. Res. Symposium**, n. 6, p. 105-177, 1975.

HABOUSH, E. J. A new operation for arthroplasty of the hip based on biomechanics, photoelasticity, fast-setting dental acrylic, and other considerations. **Bull. Hosp. Joint Dis.** v.14: p.242-77, 1953.

HANSEN, A.D.; RAND, J.A. Instructional course lectures, the American Academy of Orthopaedic Surgeons. Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty. **J. Bone Joint Surg. Am.** v. 80, p. 910-922, 1998.

HARRIS, W.H. Conquest of a world human disease: particle-induced periprosthetic osteolysis. **Clin. Orthop.**, n. 426, p. 39-42, 2004.

HECK, D.; RESENBERG, A.; SCHINK-ASCANI, M.; GARBUS, S.; KIEWITT, T. Use of antibiotic-impregnated cement during hip and knee arthroplasty in the United States. **J. Arthrop.**, v. 10, p. 470-475, 1995.

HENCH, L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, 19, 1419-1423, 1998.

HENRICHSEN E, JANSEN K, KROGH-PULSEN W. Experimental Investigation of the tissue reaction to acrylic plastics. **Acta Orthop. Scand.**, v.(22), p. 141-146, 1953.

HOLM, N. J. The formation of stress by acrylic bone cements during fixation of acetabular prosthesis. **Acta Orthop. Scand.**, v. 51, p. 719-826, 1980.

HOPE, P.G.; KRISTINSSON, K.G.; NORMAN, P.; ELSON, R.A. Deep infection of cemented total hip arthroplasties caused by coagulase-negative staphylococci. **J. Bone Joint Surg. Br.**, v. 71, p. 851-855, 1996.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D.A. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. **Annu. Rev. Med.** 50, p. 223-36, 1999.

HUNTER, G. A.; WELSH, R. P.; CAMERON, H. U.; BAILEY, W. H. The results of revision of total hip arthroplasty. **J. Bone Joint Surg. Br.**, v. 61, p. 419-421, 1979.

JAHODA, D.; SOSNA, A.; LANDOR, I.; VAVRIK, P.; POKORNY, D.; HUDEE, T. Two-stage reimplantation using spacers-the method of choice in treatment of hip joint prosthesis-related infections. Comparison with methods used from 1979 to 1998. **Acta Chir Orthop. Traumatol. Cech.**, n°70, p. 17-24, 2004.

JATSIKOGIANNI, M.; SPILIOPOULOU, I. DOWLING, D. P.; MISSIRLIS, Y. F. Adhesion of slime producing *Staphylococcus epidermidis* strains to PVC and diamond-like carbon/silver/fluorinated coatings. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 8, p. 679-689, 2006.

JOSEFSSON, G., LINDBERG, L. & WIKLANDER, B.: Systemic antibiotics and gentamicin-containing bone cement in prophylaxis of postoperative infections in total hip arthroplasty. **Clin. Orthop.** 159: 194-200, 1981.

JUDET, J.; JUDET, R. The use of an artificial femoral head for arthroplasty of the hip joint. **J. Bone Surg. Br.**, v.32, p.166, 1956.

KATSIKOIANNI, M.; SPILIOPOULOU, I.; DOWLING, D. P.; MISSIRLIS, Y. F. Adhesion of slime producing *Staphylococcus epidermidis* strains to PVC and diamond-like carbon/silver/fluorinated coatings. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 17, n. 8, p. 679-689, 2006.

KHOURY, A. E.; LAM, K.; ELLIS, B.; COSTERTON, J. W. Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. **ASAIO J.**, v. 38, p. M174–8, 1992.

KÖNIG, D.P.; SCHIERHOLZ, J.M.; HILGERS, R.D.; BERTRAM, C.; PERDREAU-REMINGTON, F.; RÜTT, J. In vitro adherence and accumulation of *Staphylococcus epidermidis* RP 62 A and *Staphylococcus epidermidis* M7 on four different bone cements. **Langenbeck's Arch Surg.**, v. 386, p.328-332, 2001.

KRAUSE, W.R.; GRIMES, L.W.; MATHIS, R.S. Fatigue testing of acrylic bone cements: statistical concepts and proposed test methodology. **J Biomed. Mater. Res.: Applied Biomaterials**, v. 22, n. A2, p. 179-190, 1988.

KREBEC, M.; CECH, O.; DZUPA, V.; PACOVSKY, V.; KLEZL, Z. Infection complications of total hip arthroplasty. **Acta. Chir. Orthop. Traumatol. Cech**, n. 71, p. 179-88, 2004.

KUECHLE, D.K.; LANDON, G.C.; MUSER, D.M.; NOBLE, P.C. Elution of vancomycin daptomycin and amikacin from acrylic bone cement. **Clin. Orthop.** v. 329, p. 273-280, 1996.

KÜHN, K-D. Bone Cements. Up-to-date comparison of physical and chemical properties of commercial materials. **Ed. Springer**, 2000.

LANGFORD, P. R.; ANWAR, H.; GONDA, I.; BROWN, M. R. Outer membrane proteins of gentamicin induced small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 52, p. 33-36, 1989.

LEBARON, P.; BAUDA, P.; LETT, M. C.; DUVAL-IFLAH, Y.; SIMONET P.; JACQ, E.; FRANK, N.; ROUX, B.; BALEUX, B.; FAURIE, G.; HUBERT, J. C.; NORMAND, P.; PRIEUR, D.; SCHMITT, S.; BLOCK, J. C. Recombinant plasmid mobilization between *E. coli* strains in seven sterile microcosms. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 534-540, 1997.

LEWIS, G. Properties of acrylic bone cement; states of the art review. **J. Biomed. Res.**, v. 38, p. 155-182, 1997.

LEWIS, G. Effect of mixing method and storage temperature of cement constituents on the fatigue and porosity of acrylic bone cement. **J Biomed. Mater. Res. Part B: Applied Biomaterials**, p. 143-149, 1999.

LEWYS, G.; NYMAN, J. S. Toward standardization of methods of determination of fracture properties of acrylic bone cement and statistical analysis of test results. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 53, p. 748-768, 2000.

LYMAN, D; ROWLAND, S. Biomaterials. In: Polymers: biomaterials and medical applications. **Kroschwitz, J.(eds)**, John Wiley and Sons, p. 52-71, 1989.

MARCONCINI, J. M. **Avaliação da qualidade dos cimentos ósseos encontrados no mercado nacional**. Projeto de iniciação científica – Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, 1996.

MARKOLF, K. L.; AMSTUTZ, H. C. Penetration and flow of acrylic bone cement. **Clinical Orthopaedic**, v. 121, p. 99-102, 1976.

MENDES, R. **Estudo experimental comparativo dos cimentos ósseos nacionais**. 2006. 156f. Tese (Mestrado em Engenharia Civil). Pontifícia Universidade Católica – PUC, Rio de Janeiro, 2006.

MORAN, C. G.; HORTON, T. C. Total knee replacement: the joint of the decade. **BMJ.**, v.820, p. 320, 2000.

MULROY JR., R.D.; HARRIS, W.H. The effect of improved cementing techniques on component loosening in total hip replacement. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 72-B, n. 5, p. 757-760, 1990.

MULROY, W.F.; ESTOK, D.M.; HARRIS, W.H. Total hip arthroplasty use of so-called second-generations cementing techniques. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, n. 12, v. 77A, p. 1845-1852, 1995.

NAYLOR, P.T.; JENNINGS, R.; WEBB, L.X.; GRISTINA, A.G. Antibiotic sensitivity of biomaterial-adherence *Staphylococcus epidermidis*. **Orthop. Trans.**, v. 12, p. 524-525, 1988.

NEUT, D.; GROOT, E. P.; KOWALSKI, R. S. Z.; van HORN, J. R.; van der MEI, H.; BUSSCHER, H. J. Gentamicin-loaded bone cement with clindamycin or fusidic acid added: Biofilm formation and antibiotic release. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 73, n. 2, p. 165-170, 2004.

NEUT, D.; HENDRIKS, J. G. E.; van HORN, J. R.; van der MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and slime excretion on antibiotic-loaded bone cement. **Acta Orthopaedica**, n. 76, v. 1, p. 109-114, 2005.

NICHOLS, R. L. Surgical antibiotic prophylaxis. **Med. Clin. North Am.**, v. 79; p. 509–22, 1995.

OWENS, D. K.; WENDT, R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 13, n. 8, p. 1741-1447, 1969.

PASCONTINI, M. R. **Análise comparativa das propriedades mecânicas do cimento acrílico com preparo manual ou centrifugado, em diferentes temperaturas.** Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, 2001.

PIZZOLITTO, EL. **Contribuição ao estudo *in vitro* da corrosão induzida por microrganismos sobre liga metálica a base de cobre, de uso na Odontologia – Modelo experimental com as cepas cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*.** 1997. 117f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 1997.

POULSEN, L. K.; BALLARD, G.; STAHL, D. A. Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 1354-1360, 1993.

POWERS, K. A.; TERPENNING, M. S.; VOICE, R. A.; KAUFFMAN, C. A. Prosthetic joint infection in the elderly. **Am. J. Med.**, v. 88, p. 94-134, 1990.

PRICE, J. S.; TENCER, A. F.; ARM, D. M.; BOHACH, G. A. Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 30, p. 281–6, 1996.

PROCTOR, R. A.; PETERS, G. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, p. 419-22, 1998.

RAMAGE, G.; TUNNEY, M. M.; PATRICK, S.; GORMAN, S. P. NIXON, J. R. Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. **Biomaterials**, v. 24, p. 3221-3227, 2003.

RAU, H. Plastische deckung deformierter Schädeldefekte. **Arch. Chir.**, v. 304, p. 926-929, 1963.

REHM, B. H. A. Pseudomonas: model organism, pathogen, cell factory. **Ed. Wiley-VCH**, p. 216, 2008.

ROBERTS, A. P.; PRATTEN, J.; WILSON, M.; MULLANY, P. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 177, p. 63-66, 1999.

ROGGENKAMP, A.; SING, A.; HORNEF, M.; BRUNNER, U.; AUTENRIETH, I. B.; HEESEMANN, J. Chronic prosthetic hip infection caused by a small-colony variant of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 2530-2534, 1998.

SABATINI, D. D.; BENSCH, K.; BARNETT, R. J. Cytochemistry and electron microscopy. *J. Cell Biol.*, v.17, p.19-58, 1963.

SAHA, S.; PAL, S. Mechanical properties of bone cement: a review. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 18, p. 435-462, 1984.

SANTOS, J. M. Microscopia eletrônica de varredura aplicada às Ciências Biológicas. Jaboticabal: FUNEP/CAVJ (UNESP), 1992, 27p. (Apostila).

SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica**. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, 2002.

SANZEN, L.; CARLSSON, A. S.; JOSEFSSON, G.; LINDBERG, L. T. Revision operations on infected total hip arthroplasties: two- to nine-year follow-up. *Clin. Orthop.*, v. 229, p.165-172, 1988.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O.; MILAN, S. B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cement: a critical review. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 57, p. 1122-1126, 1999.

SCHEUERMAN, T. R.; CAMPER, A. K.; HAMILTON, M. A. Effects of substratum topography on bacterial adhesion. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 208, n. 1, p. 23-33, 1998.

SCHURMANN, D.J.; BLOCH, D.A.; SEGAL, M.R.; TANNER, C.M. Conventional cemented total hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedic and Related Research*, n. 240, p. 173-180, 1989.

SHIRO, H.; MULLER, E.; GUTIERREZ, N.; BOISOT, S.; GROUT, M.; TOSTESON, T. D.; GOLDMANN, D.; PIER, G. B. Transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in elaboration of capsular polysaccharide/adhesin and slime are avirulent in a rabbit model of endocarditis. *J. Infect. Dis.*, v. 169, p. 1042-9, 1994.

SPANGEHL, M. J.; YOUNGER, A. S.; MASRI, B. A.; DUCAN, C. P. Diagnosis of infection following total hip arthroplasty. **Instr. Course Lect.**, v. 47, p. 285–95, 1998.

SOUZA, C.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R. Influence of surface properties on the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to acrylic and silicone. **International Journal of Biomaterials**, v. 2009, p. 01-09, 2009.

STECKELBERG, J. M.; OSMON, D. R. Prosthetic joint infections. In: Infections associated with indwelling devices. Edited by WALDVOGEL, F.A.; BISNO, A.L. Washington, **ASM Press**, p. 173-179, 2000.

STOODLEY, A. P.; BOYLE, D.; DODDS, I.; LAPPIN-SCOTT, H. Consensus model of biofilm structure *in* Biofilms: community interactions and controls, 1-9. BioLine, Cardiff, Uk, 1997.

STOODLEY, A. P.; BOYLE, D.; DODDS, I.; LAPPIN-SCOTT H. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. **J. Appl. Microbiol.**, v. 85, p. 19S-28S, 1998.

STRACHAN, C. J. L. The prevention of orthopaedic implant and vascular graft infections. **J. Hosp. Infect.**, v. 30, p. 54–63, 1995.

TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R. Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substrates. **J. Adhes. Science Tech.**, v. 13, p. 1287-1294, 1999.

THORNES, B.; MURRAY, P.; BOUCHIER-HAYES, D. Development of resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* on gentamicin-loaded bone cement in vivo. **J. Bone Joint Surg. [Br]**, v. 84-B, p. 758-760, 2002.

TOMA, M. B.; SMITH, K. M.; MARTIN, C. A.; et al. Pharmacokinetic considerations in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. **Orthopedics** 29:497–501, 2006.

TUNNEY, M. M.; DUNNE, N.; EINARSSON, G.; MCDOWELL, A.; KERR, A.; PATRICK, S. Biofilm Formation by Bacteria Isolated from Retrieved Failed Prosthetic Hip Implants in an In Vitro Model of Hip Arthroplasty Antibiotic Prophylaxis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 1, p. 2-10, 2006.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. FACULDADE DE MEDICINA. INSTITUTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA – HOSPITAL DAS CLÍNICAS. **Avaliação da**

qualidade dos cimentos ósseos encontrados no mercado nacional. Laboratório de Biomecânica LIM-41. São Paulo, p.133, 1996. (Apostila).

van de BELT, H.; NEUT, D.; VAN HORN, J.R.; VAN DER MEI, H.C.; SCHENK, W.; BUSSCHER, H.J. Antibiotic resistance-to treat or not to treat? **Nature Medicine**, v. 5, p. 358-359, 1999.

van de BELT, H.; NEUT, D.; SCHENK, W.; van HORN, J. R.; van der MEI, h. C.; BUSSCHER, J. H. Gentamicin release from polymethylmetacrylate bone cements and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Acta Orthop. Scand.**, n. 71, v. 6, p. 925-629, 2000.

van de BELT, H.; NEUT, D.; SCHENK, W.; van HORN, J. R.; van der MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. *Staphylococcus aureus* biofilm formation on different gentamicin-loaded polymethylmetacrylate bone cements. **Biomaterials**, v. 22, p. 1607-1611, 2001.

VERMONT, C.; HARTWIG, N.; FLEER, A.; DE MAN, P.; VERBRUGH, H.; VAN DER ANKER, J.; DE GROOT, R.; VAN BELKUN, A. Persistence of clones of coagulase-negative staphylococci among premature neonates in neonatal intensive care units: 2-center study of bacterial genotyping and patient risk factors. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2485-2490, 1998.

VERRAN, J.; LEES, G.; SHAKESPEARE, A. P. The Effect of surface roughness on the adhesion of *Candida albicans* to acrylic. **Biofouling**, v. 3, p. 183-192, 1991.

VINCE, G. D.; HUNT, J. A.; WILLIAMS, D. F. Quantitative assessment of tissue response to implanted biomaterials. **Biomaterials**, v. 12, p. 731-736, 1991.

VIDELA, H. A.; VIEIRA, M. R.; GUIAMET, P. S.; MELE, M. F. L.; ALAIS, J. C. S. Biocidal activity of dissolved ozone on sessile and planktonic bacteria: effects on the corrosion behavior of cooling water systems structural materials. **NACE INTERNATIONAL**, p.62/1-62/12, 1995.

von EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet. Infect. Dis.* 2, p. 677-685, 2002. WELCH, A.B.: Antibiotics in acrylic bone cement. In vitro studies. **J. Biomed. Mater. Res.** 12: 679-700, 1978.

von EIFF, PROCTOR, R. A., PETERS, G. *Staphylococcus aureus* small colony variants: formation and clinical impact. **Int. J. Clin. Pract. (Suppl.)**, v. 115, p. 44-49, 2000.

van OSS, C. Hydrophobicity of biosurfaces - origin, quantitative determination and interaction energies. **Colloids Surf. B. Biointerfaces**, v. 5, p. 91-110, 1995.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 74, p. 69-117, 1998.

WANG, C.J.; HUANG, T. W.; WANG, J. W.; CHEN, H. S. The often poor clinical outcome of infected total knee arthroplasty. **J. Arthroplasty**, v. 17, p. 608-614, 2002.

WIDMER, A. F. A new developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. **J. Clinical infectious diseases**, v. 33, sup2 (42p.), p., 94-106, 2001.

WILTSE, L. L.; HALL, R. H.; STENEHJEM, J. C. Experimental studies regarding the possible use of self-curing acrylic in orthopaedic surgery. **Journal Bone Joint Surg. Am.** v. 39-A(4), p. 961-72, 1957.

WINSOX, R. L.; LAUTENSCHLAGER, E. P.; NOVAK, M. A. Vacuum mixing of acrylic bone cement. **The Journal of Arthroplasty**, v. 2, n. 2, p. 141-149, 1987.

WRIGHT, R.J.; SLEDGE, C.B.; POSS, R.; EWALD, F.C.; WALSH, M.E.; LINGARD, E.A. Patient-reported outcome and survivorship after Kinemax total knee arthroplasty. **J. Bone Surg.**, 86A, p. 2464-70, 2004.

ZIMMERLI, W.; WIDMER, A. F.; BLATTER, M.; FREI, R.; OCHSNER, P. E. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. **JAMA**, v. 279, p. 1537-41, 1998.

Disponível em: < http://millots.blogspot.com/2007_09_01_archive.html >. Acesso em 05 de maio de 2009.

Disponível em:
http://www.eorthopod.com/images/ContentImages/hip/hip_hemiarthroplasty/hip_hemiarthroplasty04.jpg. Acesso em 16 de junho de 2009.

APÊNDICE

Médias das UFC/mL de *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *S. aureus*, para cada marca de cimento ósseo.

APÊNDICE A - BAUMER: procedência nacional.

Figura 38 – Média das células viáveis recuperadas da superfície do cimento ósseo da marca BAUMER.

APÊNDICE B - BIOMET com gentamicina: procedência internacional.

Figura 39 – Média das células viáveis recuperadas da superfície do cimento ósseo da marca BIOMET com gentamicina.

APÊNDICE C - BIOMET sem gentamicina: precedência internacional.

Figura 40 – Média das células viáveis recuperadas da superfície do cimento ósseo da marca BIOMET sem gentamicina.

APÊNDICE D - BIOMECANICA: procedência nacional.

Figura 41 – Média das células viáveis recuperadas da superfície do cimento ósseo da marca BIOMECANICA.

APÊNDICE E - CMM: procedência nacional.

Figura 42 – Média das células viáveis recuperadas da superfície do cimento ósseo da marca CMM.

APÊNDICE F - SIMPLEX: procedência internacional.

Figura 43 – Média das células viáveis recuperadas da superfície do cimento ósseo da marca SIMPLEX.