ANA CRISTINA BASSO

ADERÊNCIA BACTERIANA: ESTUDO IN VITRO DE SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL E LIGA DE TITÂNIO-ALUMÍNIO-VANÁDIO DE USO ORTOPÉDICO

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: Profª. Drª. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

São Carlos,
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

B322a

Basso, Ana Cristina
Aderência bacteriana : estudo in vitro de superfície de aço inoxidável e liga de titânio-alumínio-vanádio de uso ortopédico / Ana Cristina Basso ; orientadora Elisabeth Loshchagin Pizzolitto. -- São Carlos, 2009.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração Interunidades em Bioengenharia) -- Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2009.

1. Aderência bacteriana. 2. Aço inoxidável. 3. Ti-6Al-4V. 5. *Staphylococcus aureus. 6. Staphylococcus epidermidis.* I. Título.

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

1934 | 2009 USP 75 ANOS

ANA CRISTINA BASSO
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: 24/06/2009

PROFA. DRA. ELISABETH LOSHCHAGIN PIZZOLITTO (ORIENTADORA)

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Julgamento: aprovada

Assinatura:

PROF. DR. ORIVALDO LOPES DA SILVA

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

Julgamento: aprovada

Assinatura:

PROF. DR. ADILSON CESAR ABREU BERNARDI

Centro Universitário de Araraquara - UNIARA

Julgamento: aprovada

Assinatura:

Av. Trabalhador São-carlense, 400 - Centro - São Carlos - SP - 13566-590
Telefone/Fax: (16) 3373-9586 - E-mail: bioeng@sc.usp.br

DEDICATÓRIA

Ao Rodrigo com amor, admiração e gratidão pela inesgotável paciência, compreensão, carinho e apoio durante a elaboração deste trabalho. Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Angelo e Rita, pelo incansável apoio nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos, Fábio e Luiz Fernando, pelas conversas descontraídas.

Às minhas queridas amigas, Poliani e Milena, que sempre compreenderam o meu estresse e me ajudaram a superar as dificuldades. Para conhecermos os amigos temos que passar por bons e maus momentos, nos bons vemos a quantidade e nos maus a qualidade.

Aos meus amigos Flávio, Bruna, Gabriella e Cássio, pelas experiências compartilhadas.

À minha querida Benê, por sua dedicação à microbiologia e com isso me apoiou muito na realização deste trabalho.

À Aline por sempre ceder um espaço no laboratório para que este trabalho se concretizasse.

À Janete, secretária da Bioengenharia, pela paciência que teve comigo nos momentos em que precisei de auxílio.

Ao Cláudio de Almeida Filho, do Instituto de Química – Unesp Campus de Araraquara, por medir os ângulos de contato das superfícies.

Ao Sebastião, também do Instituto de Química – UNESP Campus de Araraquara pela captura das imagens por meio de microscopia eletrônica de varredura.

Ao meu professor Anísio Storti pelo incentivo para que eu chegasse até aqui.

Ao LEMC da UNIFESP por ceder as cepas bacterianas utilizados neste trabalho.

Ao Engenheiro Tomaz Puga Leivas do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP-SP por ceder os corpos-de-prova utilizados neste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Profª. Drª. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto, pela transmissão dos conhecimentos, pela paciência e compreensão e, principalmente pelos ensinamentos válidos para meu crescimento profissional e pessoal.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

(Albert Einstein)

RESUMO

BASSO, A. C. **Aderência bacteriana: estudo in vitro de superfície de aço inoxidável e liga de titânio-alumínio-vanádio de uso ortopédico**. 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC-USP, São Carlos, 2009.

O uso de metais na fabricação de implantes ortopédicos iniciou-se nas primeiras décadas do século XX. O aumento do uso de biomateriais implantáveis aumentam também os casos de infecção. A colonização da superfície do biomaterial pode ter início no momento da inserção do corpo estranho no organismo e geralmente é causada por microrganismos da microbiota da pele ou região adjacente ao implante. Este estudo teve por objetivo avaliar por métodos microbiológicos e microscópio eletrônico de varredura (MEV), a aderência bacteriana à superfície de aço inoxidável e liga de titânio de uso médico, bem como a molhabilidade da superfície destes metais. As bactérias usadas foram *Staphylococcus epidermidis*-ATCC 12228 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os discos de aço inoxidável (15,0mm de diâmetro x 2,0mm de espessura) e de liga de titânio (12,0mm de diâmetro x 2,0mm de espessura) foram inseridos, asséptica e separadamente, em tubos contendo 15,0 mL de caldo Mueller Hinton e 200,0 µL de suspensão bacteriana da ordem de 10^8UFC/mL. Cada bactéria foi estudada individualmente. Os tubos foram incubados por 1, 6, 24, 48 e 72 horas sob agitação a 37ºC. Após os períodos de incubação, os discos foram retirados do caldo de cultura e submetidos ao banho de ultrassom em 5,0 mL de solução fisiológica 0,85% esterilizada. Deste líquido, foram realizadas diluições da ordem de 10^{-1} a 10^{-4} para a quantificação de células viáveis. Os valores foram expressos em UFC/mL. Para *S. epidermidis* sobre a liga de titânio, o número de células viáveis foi em 1 hora: 7,20 x 10^4; 6 horas: 3,90 x 10^6; 24 horas: 3,80 x 10^6; 48 horas: 9,70 x 10^6 e 72 horas: 1,00 x 10^7. Sobre o aço inoxidável, o número de células viáveis foi em 1 hora: 3,00 x 10^3; 6 horas: 2,90 x 10^6; 24 horas: 3,20 x 10^6; 48 horas: 1,41 x 10^7 e 72 horas: 1,88 x 10^7. Para *S. aureus* sobre a liga de titânio, o número de células viáveis foi em 1 hora: 2,00 x 10^3; 6 horas: 1,00 x 10^4; 24 horas: 3,10 x 10^4; 48 horas: 4,30 x 10^4 e 72 horas: 5,80 x 10^3. Sobre o aço inoxidável, o número de células viáveis foi em 1 hora: 6,00 x 10^3; 6 horas: 2,00 x 10^3; 24 horas: 1,50 x 10^4; 48 horas: 3,20 x 10^5 e 72 horas: 6,00 x 10^3. Ambas as superfícies metálicas foram caracterizadas como de média molhabilidade, onde a liga de titânio

teve média ± desvio padrão de 39,016 ± 11,267 e o aço inoxidável 58,083 ± 7,165. Tanto o *S. aureus* quanto o *S. epidermidis* aderiram às superfícies dos biomateriais estudados, como foi observado por meio de MEV. Com base nos resultados é possível concluir que os dois microrganismos são capazes de aderir a superfícies metálicas. Isto aumenta a preocupação quanto à patogênese das infecções relacionadas a implantes ortopédicos, uma vez que esses microrganismos estão presentes na pele humana e oferecem o risco de reações inflamatórias e infecção, promovendo a perda do implante para efetivar a cura.

Palavras-chave: Aderência bacteriana. Aço inoxidável. Ti-6Al-4V. *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus epidermidis*.

ABSTRACT

BASSO, A. C. **Bacterial adherence: an in vitro study of stainless steel and titanium-aluminium-vanadium alloy surfaces of orthopedic use.** 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC-USP, São Carlos, 2009.

The utilization of metals in the manufacture of orthopedic implants started in first decades of twentieth century. The increased use of implantable biomaterials increased also infection cases. Biomaterial surface colonization can start at the moment of foreign body insertion in the organism and is usually caused by microorganisms of skin microbiota or adjacent region to the implant. This study aimed to evaluate microbiological methods and scanning electron microscopy (SEM), the bacterial adhesion to surface of stainless steel and titanium alloy of medical use, as well as the surface wetability of these metals. The used bacteria were *Staphylococcus epidermidis*-ATCC 12228 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The stainless steel (15,0mm diameter x 2,0mm thick) and titanium alloy (12,0mm diameter x 2,0mm thick) discs were inserted, aseptic and individually, into tubes containing 15,0mL Mueller Hinton broth and 200,0 µL of bacterial suspension with 10^8CFU/mL concentration. Each bacterium was individually studied. The tubes were incubated for 1, 6, 24, 48 and 72 hours under agitation at 37ºC. After incubation periods, the discs were removed from culture broth and submitted to the ultrasound bath in 5,0mL of sterile saline. From this liquid were realized dilutions of 10^{-1} to 10^{-4} to quantify the viable cells. Values were expressed in CFU/mL. *S. epidermidis* over titanium alloy viable cells number was in 1 hour: 7,20x10^4; 6 hours: 3,90 x 10^6; 24 hours: 3,80 x 10^6; 48 hours: 9,70 x 10^6 and 72 hours: 1,00 x 10^7. Over stainless steel viable cells number was in 1 hour: 3,00 x 10^3; 6 hour: 2,90 x 10^6; 24 hour: 3,20 x 10^6; 48 hour: 1,41 x 10^7 and 72 hour: 1,88 x 10^7. To *S. aureus* over titanium alloy viable cells number was in 1 hour: 2,00 x 10^3; 6 hours: 1,00 x 10^4; 24 hours: 3,10 x 10^4; 48 hours: 4,30 x 10^4 and 72 hours: 5,80 x 10^3 and over stainless steel viable cells number was in 1 hour: 6,00 x 10^3; 6 hours: 2,00 x 10^3; 24 hours: 1,50 x 10^4; 48 hours: 3,20 x 10^5 and 72 hours: 6,00 x 10^3. Both metal surfaces were characterized as medium wetability, where the contact angle of titanium alloy was mean ± standard deviation 39,016 ± 11,267 and stainless steel 58,083 ± 7,165. Both *S. aureus* as *S. epidermidis* adhered to surfaces of biomaterials studied, as observed by SEM. Based

on the results we concluded that two microorganisms are able to adhere to metal surfaces. This increases the concern about the pathogenesis of infections related to orthopedic implants, since these microorganisms are present in human skin and provide the risk of infection and inflammatory reactions, furthering implant loss to effective cure.

Keywords: Bacterial adherence. Stainless steel. Ti-6Al-4V. *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus epidermidis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características dos corpos de prova de titânio alumínio vanádio 45

Figura 2 – Características dos corpos de prova de aço inoxidável 46

Figura 3 – Goniômetro 51

Figura 4 – Microscópio Eletrônico de Varredura 52

Figura 5 – Esquema da medida do ângulo de contato 55

Figura 6 – Esquema de diluição seriada para quantificação de células viáveis..... 57

Figura 7 – Micrografias com aumento de 1000 e 3500x, da superfície lisa do aço inoxidável antes da imersão em meio de cultura Mueller Hinton (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL – JSM-T330A – JAPAN)..... 61

Figura 8 – Micrografias com aumento de 1000 e 3500x, da superfície lisa do aço inoxidável antes da imersão em meio de cultura Mueller Hinton (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL – JSM-T330A – JAPAN)..... 61

Figura 9 – Micrografia de superfície lisa do aço inoxidável após incubação em Mueller Hinton inoculado com *S. epidermidis* e após banho ultrassônico. 64

Figura 10 – Micrografia de superfície do Ti-6Al-4V após incubação em caldo Mueller Hinton inoculado com *S. epidermidis* e após banho ultrassônico 65

Figura 11 – Micrografia de superfície do aço inoxidável após incubação em Mueller Hinton inoculado com *S. aureus* e submetido ao banho ultrassônico..... 66

Figura 12 – Micrografia de superfície da liga de titânio após incubação em Mueller Hinton inoculado com *S. aureus* e submetidos ao banho ultrassônico..... 67

Figura 13 – Representação da contagem de células viáveis de *Staphylococcus epidermidis* sobre liga de titânio-alumínio vanádio..... 71

Figura 14 – Representação da contagem de células viáveis de *Staphylococcus epidermidis* sobre aço inoxidável..... 73

Figura 15 – Representação da contagem de células viáveis de *Staphylococcus aureus* sobre liga de titânio-alumínio vanádio..... 75

Figura 16 – Representação da contagem de células viáveis de *Staphylococcus aureus* sobre aço inoxidável 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química da liga metálica titânio-alumínio-vanádio 45

Tabela 2 – Composição química do aço inoxidável 47

Tabela 3 – Medida do ângulo de contato da superfície lisa da liga Ti-6Al-4V 62

Tabela 4 – Medida do ângulo de contato da superfície de aço inoxidável 63

Tabela 5 – Distribuição da aderência do *S. epidermidis* em diferentes intervalos de tempo sobre superfície de liga de titânio (Ti6Al4V) 68

Tabela 6 – Distribuição da quantificação das células viáveis de *S. epidermidis* recuperadas dos discos de liga de titânio após banho ultrassônico (valores expressos em UFC/mL) 69

Tabela 7 – Distribuição da quantificação das células viáveis de *S. epidermidis* recuperadas dos discos de aço inoxidável após banho ultrassônico (valores expressos em UFC/mL) 70

Tabela 8 – Distribuição da aderência do *S. aureus* em diferentes intervalos de tempo sobre superfície de liga de titânio (Ti6Al4V) 72

Tabela 9 – Distribuição da quantificação das células viáveis de *S. aureus* recuperadas dos discos de liga de titânio após banho ultrassônico (valores expressos em UFC/mL) 72

Tabela 10 – Distribuição da quantificação das células viáveis de *S. aureus* recuperadas dos discos de aço inoxidável após banho ultrassônico (valores expressos em UFC/mL) 74

Tabela 11 – Distribuição das médias de células viáveis recuperadas das superfícies metálicas dos biomateriais de uso ortopédico cirúrgico 75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASTM: American Society for Testing and Materials

ATCC: American Type Culture Collection

FM: Faculdade de Medicina

HC: Hospital das Clínicas

IOT: Instituto de Ortopedia e Traumatologia

LEMC: Laboratório Especializado em Microbiologia Clínica

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

mL: mililitro

mm: milímetro

M: molar

S. aureus: Staphylococcus aureus

S. epidermidis: Staphylococcus epidermidis

Ti-6Al-4V: Liga de titânio-alumínio-vanádio

TSB: Tryptic Soy Broth

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônia por mL

USP: Universidade de São Paulo

ºC: graus Celsius

µL: microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
2 REVISÃO DA LITERATURA 23
3 OBJETIVOS 43
3.1 Objetivos Gerais 44
3.1 Objetivos Específicos 44
4 MATERIAIS E MÉTODOS 45
4.1 Materiais 46
4.1.1 Materiais metálicos 46
4.1.1.1 Liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) 46
4.1.1.2 Aço inoxidável 48
4.1.2 Microrganismos 49
4.1.3 Meios de cultura e soluções 49
4.1.3.1 Caldo Mueller Hinton (Difco) 50
4.1.3.2 Ágar Mueller Hinton (Difco) 50
4.1.4 Reagentes utilizados no preparo dos corpos-de-prova para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 51
4.1.4.1 Tampão Fosfato 0,2M (pH 7,1) 51
4.1.4.2 Solução A 51
4.1.4.3 Solução B 51
4.1.4.4 Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1) 51
4.1.4.5 Solução Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1) – Glutaraldeído a 2,5% 51
4.1.4.6 Solução de etanol a 15% 52
4.1.4.7 Solução de etanol a 30% 52
4.1.4.8 Solução de etanol a 50% 52
4.1.4.9 Solução de etanol a 70% 52
4.1.4.10 Solução de etanol a 95% 52
4.1.4.11 Etanol absoluto..... 53
4.1.5 Salina fisiológica a 0,85% 53
4.1.6 Equipamentos 53
4.1.6.1 Goniômetro 53
4.1.6.2 Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) 54

4.1.7 Análise estatística 54
4.2 Métodos 55
4.2.1 Análise da molhabilidade da superfície de aço inovidável e liga Ti-6Al-4V 55
4.2.2 Métodos microbiológicos 57
4.2.2.1 Preparo dos corpos de prova para análise microbiológica 57
4.2.2.2 Preparo das suspensões bacterianas 57
4.2.2.3 Aderência e produção de biofilme pelo *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em discos de liga de Ti-6Al-4V ASTM F-136 e aço inoxidável ASTM F-138 58
4.2.2.4 Avaliação quantitativa das células bacterianas viáveis recuperadas do biofilme 58
4.2.2.4.1 Procedimento de preparo da diluição seriada para quantificar células viáveis 59
4.2.3 Análise da aderência bacteriana aos corpos-de-prova por meio de microscopia eletrônica de varredura 61
4.2.6 Análise estatística 61
5 RESULTADOS 62
5.1 Resultado das topografias de superfícies de aço inoxidável e liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) observadas por MEV 63
5.1.1 MEV da superfície do aço inoxidável antes da imersão em meio líquido 63
5.1.2 MEV da superfície de Ti-6Al-4V antes da imersão em meio líquido 63
5.2 Da molhabilidade das superfícies de aço inoxidável e titânio-alumínio-vanádio 64
5.2.1 Liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) 64
5.2.2 Aço inoxidável 65
5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da aderência inicial e formação do biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre superfície lisa do aço inoxidável e de liga de titânio (Ti6Al4V) 65
5.3.1 MEV da aderência inicial e formação do biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre superfície lisa do aço inoxidável 66
5.3.2 MEV de aderência inicial e formação de biofilme em superfície lisa de liga de titânio (Ti6Al4V) 67

5.3.3 MEV da aderência inicial e formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre superfície lisa do aço inoxidável 68
5.3.4 MEV da aderência inicial e formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre superfície lisa da liga de titânio 69
5.3.5 Resultados da distribuição da aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de *S. epidermidis* na superfície lisa de liga Ti-6Al-4V 70
5.3.6 Da quantificação de células viáveis de *Staphylococcus epidermidis* recuperadas da superfície lisa da liga Ti-6Al-4V 70
5.3.7 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície da liga de titânio incubado com *S. epidermidis*..... 72
5.3.8 Da quantificação de células viáveis de *Staphylococcus epidermidis* recuperadas da superfície do aço inoxidável 72
5.3.9 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície lisa de aço inoxidável incubado com *S. epidermidis*..... 73
5.3.10 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície lisa de liga de titânio e de aço inoxidável incubado com *S. epidermidis* 73
5.3.11 Resultados da distribuição da aderência inicial e consequente formação de biofilme de *S. aureus* na superfície lisa de liga de titânio 74
5.3.12 Da quantificação de células viáveis de *S. aureus* recuperadas da superfície de liga de titânio 74
5.3.13 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas da superfície de liga de titânio incubado com *S. aureus*..... 75
5.3.14 Da quantificação de células viáveis de *S. aureus* recuperadas da superfície do aço inoxidável 75
5.3.15 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície de aço inoxidável incubado com *S. aureus*..... 76
5.3.16 Teste *t* aplicado para vários intervalos de tempo de contato de *S. aureus* com aço inoxidável 77
5.3.17 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície lisa de liga de titânio e de aço inoxidável incubado com *S. aureus* 77

5.3.18 Distribuição da média de células viáveis de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* recuperadas de superfície de aço inoxidável e de Ti-6Al-4V 77
6 DISCUSSÃO 79
7 CONCLUSÃO 89
REFERÊNCIAS 92

1 INTRODUÇÃO

O uso de metais na fabricação de implantes ortopédicos iniciou-se nos primórdios do século XX. Em 1926 o aço inoxidável denominado AISI 302 foi empregada pela primeira vez, enquanto que o AISI 316 começou a ser utilizado a partir de 1940. O uso de metais em implantes vem sendo estudado há mais de 80 anos (DAGA, RIVERA e BOERI, 2007).

Nos últimos anos, a superioridade das ligas de titânio na produção de implantes tornou-se evidente, uma vez que estas ligas possuem alta resistência, baixa densidade, resistência à corrosão e biocompatibilidade. O aço inoxidável é mais barato que as ligas de titânio e é amplamente utilizado em países onde os sistemas de saúde pública ou os pacientes não conseguem custear implantes de titânio por causa do seu preço elevado (DAGA, RIVERA e BOERI, 2007).

Com o aumento do uso de biomateriais implantáveis, aumentaram também, os casos de infecção relacionada a estes dispositivos (BARTH et al., 1989).

A colonização da superfície do implante por bactérias pode iniciar-se no momento da introdução do corpo estranho no organismo. Este é o primeiro passo para o desenvolvimento da infecção. A bactéria, uma vez aderida ao implante, inicia um processo de várias etapas para a formação do biofilme, que depois de formado é de difícil tratamento, pois as bactérias no interior do biofilme são protegidas da fagocitose e da ação de antibióticos. As bactérias que aderem à superfície estão agregadas em uma matriz polissacarídica sintetizada por elas mesmas para formar biofilme. A formação dessas comunidades sésseis e suas resistências a agentes antimicrobianos inatas são a raiz de muitas infecções bacterianas persistentes e crônicas. Os estudos do biofilme têm revelado propriedades distintas, como grupos estruturados de células com características de comunidade. Avanços recentes no conhecimento de genética e bases moleculares do comportamento da comunidade bacteriana apontam para o controle de infecções por biofilme (COSTERTON, STEWART e GREENBERG, 1999).

Implantes ortopédicos estão sujeitos a infecções crônicas associadas a biofilmes bacterianos, que só podem ser erradicados por remoção traumática do implante acompanhada por terapia com antibiótico intravenoso (EHRLICH et al., 2005).

A infecção relacionada ao implante médico tem cura após a remoção do dispositivo e recolocação de outro implante, a fim de evitar o desenvolvimento de complicação severa e letal. A remoção da prótese infectada e o tratamento adicional

aumentam para o paciente o desconforto, custo e mortalidade (DAROUICHE, 2004; ZHAO et al., 2007, 2008).

A infecção de dispositivos implantáveis requer frequentemente, a remoção e substituição a fim de evitar o desenvolvimento de complicações severas e até mesmo letais (BECK, KINZIL e BISCHOFF, 1999; DAROUICHE, 2004; LUCKE et al., 2003; SANDERSON, 1989; TAYLOR, BANNISTER e CALDER, 1990; WILDE, 1993; ZHAO et al., 2007, 2008).

Os microrganismos frequentemente envolvidos na perda de dispositivos médicos devido à infecção incluem: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, *S. aureus* está associado à infecção de biomateriais metálicos, osso-articulação e tecido mole. *S. epidermidis* está relacionado a infecções de polímeros como válvulas endocárdicas (BARTH et al., 1989; ZHAO, 2008) enquanto a *Pseudomonas aeruginosa* é responsável por um terço das infecções em lentes de contato (BRUINSMA et al., 2001; BRUINSMA, VAN DER MEI e BUSSCHER, 2001).

Os *Staphylococcus* estão amplamente distribuídos na natureza, e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa de mamíferos e aves. Em geral, os *Staphylococcus* apresentam uma relação benígna ou simbiótica com o hospedeiro, porém podem torna-se patogênicos quando atingem tecidos por interrupção da barreira cutânea, inoculação por agulhas, ou, também, por implantação direta por meio de próteses médicas (BERNARDI, 2005).

A infecção do osso é denominada osteomielite e é caracterizada pela colonização do osso por microrganismos que incluem *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens e Escherichia coli*. As infecções ósseas associadas a corpos estranhos, como próteses e dispositivos osteosintéticos são difíceis de tratar. O tratamento geralmente envolve avaliação, estadiamento, determinação da etiologia microbiana e sensibilidade, terapia antimicrobiana e se necessário, *debris*, gestão do espaço morto e estabilização do osso (CAREK, DICKERSON e SACK, 2001).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com o aumento do uso de biomaterais implantados, as infecções relacionadas ao biomaterial-implante emergiram como um problema sério. Estas infecções são de difícil erradicação e persistem até a remoção do corpo estranho (GRISTINA, 1987; LOWY e HAMMER, 1983; LUDWICKA et al., 1983; PETERS, LOCCI e PULVERER, 1982).

Barth et al. (1989) avaliaram por métodos bacteriológicos componentes de biomateriais usados para confeccionar implantes. Os testes foram realizados com 288 discos de polimetilmetacrilato-PMMA, polietileno de peso molecular ultra-alto (UHMWPWE) e liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V), de grau cirúrgico. A medida dos discos era de 5mm de diâmetro por 1,5mm de espessura. Os discos foram incubados a 37℃, separadamente, em tampão PBS inoculado com *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* por 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 48 horas. Os autores observaram que em 1 hora o agente colonizador em todas as superfícies, independemente do biomaterial colonizado, foi *S. aureus*, o qual após 8 a 24 horas era a bactéria presente em maior número em ligas metálicas e o *S. epidermidis* sobre polímeros.

Boyan et al. (1996) relataram que o titânio e suas ligas, particularmente, Ti-6Al-4V é extensivamente usado em implantes ortopédico e dentais, devido sua biocompatibilidade.

Wassal et al. (1997) relataram que a adesão bacteriana aos pinos ortopédicos de fixação externa banhados em prata foi comparada com controles de aço inoxidável em estudos *in vitro*. Usando cinco isolados bacterianos de ferida infeccionada, observaram que os pinos banhados em prata reduzem a aderência para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e duas cepas de *Staphylococcus aureus*, enquanto o inverso ocorreu para *Staphylococcus haemolyticus*. Quando colocado em soro humano, as duas superfícies foram condicionadas de forma similar com as proteínas do soro; este condicionamento reduziu a aderência bacteriana, logo, as duas superfícies apresentaram aderência bacteriana similar.

Hanssen e Rand (1998) relataram que *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* com frequência são associados com infecções de implantes e são o carro chefe dos agentes infectantes em próteses de articulações.

McKenney et al. (1999) relataram que *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais comum das infecções adquiridas em ambiente de hospital e é também a principal causa da osteomielite.

Costerton, Stewart e Greenberg (1999) e McKenney et al. (1999) notificaram que *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* podem produzir polissacarídeos extracelulares (*slime*), o qual media a aderência bacteriana e a formação do biofilme sobre várias superfícies.

Amorena et al. (1999) e Gristina (1994) mostraram que os biofilmes aderem aos implantes, em tecidos circunvizinhos e são difíceis de erradicar pela fagocitose ou tratamento com antibióticos e então induz a infecção crônica.

Bos, Van der Mei e Busscher (1999) relataram que a adesão inicial da bactéria não só depende das propriedades físico-quimicas da bactéria, mas também das propriedades de superfície do biomaterial.

Hudson Ramp e Frankenburg (1999) *Staphylococcus aureus* é a causa frequente das infecções ortopédicas em humanos. A bactéria expressa várias adesinas que facilitam a aderência bacteriana à matriz do biomaterial implantado no osso coberto com os constituintes do plasma do hospedeiro. As adesinas relevantes do S. aureus são chamadas de componentes microbianos de superfície que reconhecem a matriz de moléculas adesivas (MSCRAMMs) e MSCRAMMs específicas estão envolvida nas infecções do osso e articulações.

Li, Lundberg e Ljungh (2000) afirmam que estafilococos coagulase-negativo, em particular o *Staphylococcus epidermidis* está intimamente associado a infecções no sangue e outros espécimes clínicos. Infecções adquiridas na comunidade associadas a estafilocos coagulase-negativo geralmente envolvem pacientes com cateteres implantados há muito tempo, próteses articulares e outros dispositivos médicos. Apesar de ligarem-se uma gama de proteínas da matriz do hospedeiro (colágeno, vitronectina, fibrinogênio e laminina), os estafilococos coagulase-negativo

promovem interação direta com a superfície do biomaterial graças a uma adesina polissacarídica extracelular.

Darouiche (2001) notificou que após a implantação da prótese, uma camada de glicoproteína começa a cobrir a prótese e essa glicoproteína pode aumentar a aderência na superfície do implante. Os estafilococos são provavelmente o principal agente etiológico devido aos receptores que tem para estas proteínas.

O´Gara e Humpreys (2001) relataram que *Staphylococcus epidermidis* é o principal patógeno de infecções nosocomiais associadas a infecções de dispositivos médicos. A presença de *S. epidermidis* na microbiota da pele e mucosas dificulta o diagnóstico e o tratamento das infecções associadas a implantes. O fator de virulência determinante do *S. epidermidis* é uma adesina polissacarídica extracelular imprescindível para a formação do biofilme. Avanços na compreensão de eventos moleculares de controle da síntese desta adesina e implicações clínicas vêm sendo esclarecidos. O aprimoramento das pesquisas na área molecular pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de intervenção terapêutica. Além de impedir a colonização bacteriana com profilaxia antibiótica, estratégias preventivas para controlar as infecções de dispositivos médicos causadas por *S. epidermidis* e desenvolvimento de biomateriais resistentes à colonização.

Darouiche (2001) mostrou que o foco central da patogênese das próteses médicas infectadas depende da interação da bactéria com a prótese e hospedeiro. Os patógenos mais comuns associados com a infecção destas próteses incluem *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. e ocasionalmente *Candida* sp. A freqüência relativa da infecção depende da localização da prótese, mas *Staphylococcus epidermidis* é a bactéria mais isolada. *Staphylococcus epidermidis* é membro da microbiota da pele humana, então não é considerado patogênico, mas é freqüentemente isolado de próteses médicas infectadas. *Staphylococcus aureus* é também freqüentemente associado com infecção de próteses e além disso coloniza a boca, nariz e ouvido de grande parte de população sadia de maneira não patogênica. Contudo, é menos isolado de biomateriais do que *Staphylococcus epidermidis*, mas as toxinas, moléculas adesivas e outros fatores de virulência expressos pelo *S. aureus* contribuem para a

falha e morbidade do implante médico. O potencial patogênico dos estafilococos associados com a infecção de implantes está diretamente relacionado com a habilidade que este organismo tem de formar comunidades celulares dispostas em multicamadas ou biofilmes, sobre superfícies de corpos estranhos *in vivo*. As infecções por *S. epidermidis* tendem a ser crônicas e menos agudas, enquanto as infecções por *S. aureus* são mais agudas devido a presença dos fatores de virulência que danificam os tecidos do hospedeiro e ou induzem respostas imunes mais agudas no hospedeiro. As células sésseis no biofilme são fisiologicamente ativas, metabolicamente coordenadas e resistentes aos agentes antibacterianos na escala molecular (antibióticos peptídeos), particulados (bacteriófagos) e celular (amebas, fagócitos).O exame direto da superfície das próteses é método muito mais sensível para adetecção do biofilme do que o método tradicional de cultura. A bactéria pode adotar um fenótipo diferente quando adere a superfície e forma biofilme e ativa um grande número de novos genes que se somam àqueles necessários para a produção da matriz e heterogeneidade.

Donlan (2001) relatou que muitas bactérias, uma vez, aderidas ao implante desenvolvem um exopolissacarídeo fibroso (glicocálice) que forma um biofilme complexo. No interior do biofilme a bactéria vive e multiplica-se em diferentes fases de crescimento, planctônica e estacionária, para uma organizada e complexa comunidade com heterogeneidade estrutural e funcional, parecida com organismo multicelular e protegida de antibióticos e leucócitos.

Schierholz e Beuth (2001) relataram que a inserção de implantes emergiu como o mais comum e frequente procedimento para melhorar a qualidade de vida. Uma estimativa da taxa de substituição do quadril no mundo é de aproximadamente um milhão por ano e substituição de joelho mais de 250.000 por ano. Mais de 30% dos pacientes hospitalizados tem um ou mais cateter. Mais de 10% dos pacientes hospitalizados em um cateter urinário. Alguns pacientes requerem recolocação múltipla de articulações. Nos Estados Unidos, o custo anual da infecção hospitalar em aproximadamente dois milhões é de um bilhão de dólares. A exposição a procedimentos invasivos é um dos mais importantes fatores de risco. O implante predispõe a infecção por invasão ou dano da célula epitelial ou barreira mucosa e apoiando o crescimento de microrganismos, desta forma servindo como reservatório.

Os procedimentos médicos invasivos prejudicam os mecanismos de defesa e quando contaminados podem resultar em infecção crônica resistente ou necrose tissular, um dos principais problemas para uso estendido de implantes médicos. Estes implantes contam por aproximadamente 45% de todas as infecções hospitalares. As infecções relacionadas ao implante são extremamente resistentes aos antibióticos e defesas do hospedeiro e frequentemente persistem até a remoção do implante. O tecido danificado pela cirurgia e implantação do corpo-estranho aumenta a sensibilidade a infecção, ativa as defesas do hospedeiro e estimula a geração de mediadores inflamatórios; estes são aumentados pela atividade bacteriana e toxinas. A habilidade de bactérias como *Staphylococcus epidermidis*, os quais são virtualmente avirulentos, escapam das defesas do hospedeiro e antibioticoterapia, tem levado ao desenvolvimento de métodos alternativos para controlar materiais resistentes à infecção atuando como sistemas de liberação de medicamentos. Por estes métodos, existe uma liberação sustentável da droga antimicrobiana para dentro do micro-ambiente do implante, o qual previne efeitos colaterais. A bioengenharia de materiais para implantes é um campo que está em desenvolvimento rápido, é ela que adquire desempenho ótimo e previne a reação inflamatória desorganização da interface celular. O biomimetismo de materiais híbridos que lentamente liberam as drogas antimicrobianas podem reduzir a infecção do implante no futuro.

Beech et al. (2002) estudaram os vários estágios de formação do biofilme sobre superfícies metálicas como aço inoxidável e ligas de cobre em ambientes marinhos e água fresca usando microscópio de força atômica.

Donlan (2002) define biofilme como um grupo de microrganismos associados de forma irreversível a uma superfície e encobertos por uma matriz de polissacarídeo. Os organismos presentes em biofilmes diferem-se dos planctônicos (forma livre) com relação aos genes que são transcritos. A estrutura do biofilme compreende células e polissacarídeo extracelular, tem arquitetura definida e oferece um ambiente adequado para troca de material genético entre as células. Os biofilmes podem ser formados em diversas superfícies incluindo tecidos vivos, dispositivos médicos implantados, sistemas de água. A aderência é um processo

complexo regulado por diversas características do meio de crescimento, substrato e superfície da célula.

Phelan et al. (2002) relataram que bacilos Gram-negativos, enterococos e anaeróbios, estreptococos viridans, *Peptococcus* e *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., são recuperados de infecções tardias de articulações, de pacientes que tiveram infecção do trato geniturinário ou gastrintestinal, após tratamento dentário, gengival e infecções piogênicas da pele. Estas bactérias são disseminadas por via hematogênica. As infecções polimicrobianas não são comuns, *Mycobacterium* spp e fungos.

Monzón et al. (2002) relataram que a osteomielite causada por *Staphylococcus aureus* é o principal problema na cirurgia ortopédica e frequentemente envolve bactéria aderida ao implante formando biofilme que circunda osso e tecidos. A incapacidade terapêutica ou a vigilância imunológica encorajou estudos usando modelos animais, os quais simulam a infecção natural da osteomielite, assegurando o desenvolvimento da infecção e evitando a mortalidade. Foram avaliados quatro modelos de infecção (8 animais/modelo) em camundongos, implantando aço inoxidável na tíbia e uma cepa bacteriana altamente produtora de polissacarídeo extracelular (*slime*). Cada animal recebeu: um implante contaminado com biofilme de 12 horas com cerca de 10^6 UFC (modelo 1); um implante contendo este biofilme e uma suspensão bacteriana com cerca de 10^4 UFC (modelo 2); um implante estéril e uma suspensão bacteriana com cerca de 10^5 UFC (modelo 3); ou um implante estéril e uma suspensão bacteriana com cerca de 10^6 UFC (modelo 4). Sessenta e três dias após a cirurgia observaram que 100% dos animais sobreviveram, em alguns animais houve colonização do osso do implante pelo biofilme e colonização local, mas não infecção sistêmica. O modelo 1, mas não os modelos 2-4, reproduziram uma infecção em ambos, tíbia e implantes, este modelo foi o mais confiável (100% dos animais). O modelo 3 foi o menos confiável ($p<0,01$, 25% implantes infectados, 12% tíbias infectadas). Os autores concluíram que os modelos *in vitro* usados para estudar o biofilme ajudam a entender o processo envolvido na osteomielite, embora no modelo *in vivo* as mudanças produzidas no sitio da infecção são bactéria e hospedeiro dependentes. Estas mudanças afetam o

metabolismo, tamanho e densidade da bactéria, a natureza do produto bacteriano no biofilme e a consequência da infecção.

Arciola et al. (2003) relataram que *Staphylococcus epidermidis* é um patógeno freqüente nas infecções associadas com implantes ortopédicos. Foram estudadas 123 cepas *S. epidermidis* recuperadas de infecção de implantes ortopédicos, com relação as suas habilidades de expressar um fator de virulência, chamado *slime*, um polissacarídeo extracelular, que media a aderência ao implante e colonização bacteriana. A habilidade de produzir *slime* foi determinada por PCR para dectecção dos genes *ica*A e *ica*D responsáveis pela síntese do *slime* e por cultura em placas com ágar *Congo Red*, no qual as cepas produtoras de *slime* formam colônias negras, enquanto as não produtoras de *slime* desenvolvem colônias vermelhas. Os dados obtidos mostraram 56% dos isolados de *S. epidermidis* eram *ica*A-*ica*D positivos e tornaram-se colônias negras. Na avaliação da distribuição de cepas formadoras de *slime* em diferentes sítios e tipos de implantes, foi encontrado pequeno aumento estatisticamente não significante de cepas formadoras de *slime* na prótese de articulação total, onde o tecido próximo da face articular pode formar o foco no qual a bactéria amontoa-se protegida pelo *slime*. O dados confirmam o papel dos genes *ica* como marcador de virulência na patogênese da infecção associada ao implante ortopédico. Contudo, eles não mostram a existência de alta freqüência de cepas produtoras de *slime* em tipo de implante específico.

Costerton et al. (2003) alerta que o diagnóstico e as estratégias terapêuticas utilizados para erradicar infecções bacterianas planctônicas agudas não oferecem dados nem efeitos quando aplicados a infecções por biofilmes.

Barberán, Bouza e Aguado (2003) informaram que as infecções de articulações podem ser classificadas em relação ao tempo de ataque, após a cirurgia como: infecção recente (<1 mês); retardatária (2-6 meses), ou tardia (>6 meses). Cada tipo de infecção tem propriedades etiológicas e patogênicas que influenciam as opções terapêuticas. Assim, os agentes etiológicos isolados nas infecções recentes incluem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp.e bacilos Gram-negativos. Nas infecções retardatárias o *S. epidermidis* e na tardia, *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *S. epidermidis* e bacilos. Nas infecções recentes e tardias, o

tratamento indicado é que a prótese não seja removida e se a duração dos sintomas for menor do que um mês, a prótese é estável e o patógeno é sensível ao antibiótico oral com atividade contra os microrganismos aderidos à superfície.

Lentino (2003) relataram que a infecção relacionada ao implante de articulação ocorre em 1,5 a 2,5% de todas as artroplastias primárias de quadril e joelho. A taxa de mortalidade atribuída a estas infecções são de 2,5%. A morbidade está associada com a perda da mobilidade, embora temporária. Os custos associados com um único episódio são muito caros e o fator de risco que aumenta a ocorrência inclui a artroplastia de revisão, tempo na sala de cirurgia, infecção no sítio cirúrgico pós-operatório e malignidade. A dor é o sintoma mais comum. As espécies de estafilococos são os organismos mais isolados destas infecções.

Lucke et al. (2003) avaliaram por métodos microbiológicos próteses ortopédicas banhadas com gentamicina e gentamicina associada (PDLLA) para prevenir osteomielite relacionada ao implante. A cavidade medular da tíbia de camundongos foi contaminada com *S. aureus* (10^3 UFC) e simultaneamente foram implantados fios de titânio Kirschner, não banhados (grupo II), banhados com gentamicina (grupo III) e fios banhados com PDLLA+gentamicina 10% (grupo IV). Três implantes removidos do grupo IV foram submetidos a cultura, por método do rolamento e, foram negativas após 24 horas de incubação. Os resultados foram confirmados pela cultura dos implantes imersos em TSB. Os outros sete implantes do grupo IV revelaram colônias bacterianas na ponta dos fios e as culturas de confirmação em caldo TSB foram positivas. Os autores relataram que as infecções de feridas profundas e osteomielite ainda são complicações temidas.

Sheehan et al. (2003) relataram que os implantes metálicos são usados com frequência para reparar as articulações e fraturas na cirurgia ortopédica. A infecção relacionada ao metal é uma complicação catastrófica da cirurgia com a perda da mobilidade e independência dos pacientes, associado ainda com alta mortalidade e morbidade. A infecção ortopédica é crônica e baseada no biofilme. Os biofilmes são mais resistentes aos antibióticos do que as células planctônicas. A cura é realizada pela remoção do substrato infectado.

Trampuz et al. (2003) informaram que o critério para diagnóstico da infecção relacionada ao implante, ainda não está bem estabelecido. As culturas coletadas com *swab* tem sensibilidade baixa e deveria ser evitada. A coloração de Gram do fluido sinovial e do tecido em volta do implante tem sensibilidade baixa (25 a 30%). As culturas de aspirado do fluido sinovial e tecido periprótese fornecem o meio mais confiável para detectar patógenos. A culturas podem dar resultados falso negativos por várias razões: aderência da bactéria e formação de biofilme sobre a prótese antes da exposição ao antibimicrobiano; baixo número de organismos; meio de cultura inapropriado; organismos fastidiosos ou transporte prolongado ao laboratório de microbiologia.

Zimmerli e Ochsner (2003) mostraram que na cirurgia de implantes ortopédicos a infecção é rara, mas é difícil de erradicar. Nem o diagnóstico nem o tratamento destas infecções é padronizado. Os microrganismos causam a infecção relacionada ao implante por três rotas, podem colonizar o implante por inoculação direta no momento da implantação, alcançar o implante por via hematogênica durante a bacteriemia ou por disseminação direta de um foco de infecção adjacente. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativa são os agentes infectantes mais freqüentes. Os autores concluíram que as infecções relacionadas as articulações implantadas são ainda de difícil diagnóstico e tratamento. Os melhores procedimentos diagnósticos incluem o corte histológico e os estudos microbiológicos. A amplificação por PCR do material desalojado por banho ultrassônico do biofilme aderente ao implante pode melhorar o diagnóstico.

Hall-Stoodley, Costerton e Stoodley (2004) notificaram que o biofilme corresponde ao crescimento microbiano embutido em uma matriz que adere a superfícies biológicas e não biológicas e representam o modo de crescimento da bactéria não entendido completamente. A formação do biofilme é um componente antigo e integral do ciclo de vida das células procarióticas e é o fator chave para a sobrevivência em diversos ambientes. Avanços recentes mostraram que os biofilmes são estruturalmente complexos, sistemas dinâmicos com atributos para organismos multicelulares e ecossistemas de faces múltiplas. A formação de biofilme representa um modo protegido de crescimento que permite a sobrevivência das células em ambientes hostis e também dispersa para colonizar novos nichos. A implicação

deste mecanismo de sobrevivência e reprodução no contexto do ambiente natrural e doenças infecciosas.

Katsikogianni e Missirlis (2004) estudaram os mecanismos da adesão bacteriana a superfície dos biomateriais, o fator que afeta a adesão, as técnicas usadas para estimar a interação bactéria-material e o modelo que foi desenvolvido a fim de predizer a adesão. O processo de adesão bacteriana inclui uma fase inicial de interação físico-química e fase molecular e celular. É um processo complicado influenciado por muitos fatores, incluindo as propriedades bacterianas, as características de superfície do material, os fatores do meio ambiente, comoo a presença das proteínas do soro e as condições associadas ao fluxo. Duas categorias de técnicas usadas para estimar as interações bactéria-material foram descritas pelo autor, aquela que utiliza o fluxo do fluido contra a bactéria aderida e a contagem da percentagem da bactéria que se desaloja e aquela que manipula bactérias únicas em várias configurações as quais acrescentam-lhes a aplicação de forças mais específicas e fornece a base para análise teórica da interação ligante-receptor. Os autores estudaram a teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), o caminho da termodinâmica e a teoria DLVO extendida. No passar dos anos, estudos significantes foram realizados para investigar o processo da adesão bcteriana sobre a superfície do biomaterial, contudo, muitas questões ainda permanecem sem resposta.

Katti (2004) cita os critérios gerais para a seleção de materiais para implantes ósseos, são eles: 1) ser biocompatível, pois não causa resposta inflamatória ou tóxica além dos níveis aceitáveis; 2) ter propriedades mecânicas semelhantes a do osso; 3) os métodos de fabricação e processamento serem economicamente viáveis. Os metais mais utilizados na fabricação de implantes ortopédicos são: aço inoxidável, ligas de Cromo-Cobalto e as ligas de titânio. As últimas são materiais preferidos para confecção de implantes ortopédicos por possuírem boas propriedades mecânicas. Contudo, o titânio não se une diretamente ao osso, o que muitas vezes causa afrouxamento do implante. Movimentos indesejáveis na interface tecido-implante podem resultar em quebra do implante.

Sheehan et al. (2004) avaliaram a adesão do biofilme a metais ortopédicos em 48 horas usando implante femural como modelo. Os metais estudados foram titânio e aço inoxidável, os quais foram expostos ao inóculo de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* para colonização e formação de biofilme. O método de lavagem com ultrassom e de diluição seriada semeada em placas de Petri foram usados para avaliar a bactéria do biofilme aderida ao implante. Os autores observaram que *Staphylococcus epidermidis* mostrou baixa habilidade de adesão aos metais e os biofilmes foram mais formados sobre aço inoxidável do que sobre titânio.

Sheehan et al. (2004) mostraram que os implantes podem ser fabricados com diferentes materiais e de diferentes formas e tamanhos. Uma grande variedade de implantes tem sido usada para estudar infecção em biomaterial como: cilindro, fio metálico, placa, pregos intramedulares e componentes de próteses tem sido usados em vários modelos. Dentro deste grupo, existe também a variável das propriedades de superfície do material. As superfícies podem variar de lisas para porosas com cobertura.

Arciola et al. (2005) relataram que o patógeno oportunista *Staphylococcus epidermidis* é capaz de produzir biofilme e causar infecções associada ao implante. E passou a exibir uma aumentada resistência aos antimicrobianos. Os autores investigaram a resistência de 16 antibióticos em 342 cepas *S. epidermidis* isolados de implantes ortopédicos infeccionados. Os isolados foram feno e genotipados para produção de polissacarídeo extracelular, relevante para a formação de biofilme estafilocócico, a fim de acertar possíveis associações com a resistência aos antibióticos. Aproximadamente 10% dos isolados foram sensíveis para todos os antibióticos avaliados. Em todos, 37-38% foram resistentes aos beta-lactâmicos como oxacilina e imipenen, enquanto a resistência a penicilina, ampicilina, cefazolina, cefamandole, foi consistentemente observada em 80% das cepas. A resistência a clindamicina foi de 41% e a eritromicina 16%. Dos isolados, 10% foram resistentes ao cloranfenicol, 23% ao sulfametoxazol e 26% a ciprofloxacina. A resistência a vancomicina nunca foi observada. O interessante é que as cepas produtoras de polissacarídeo extracelular exibiram significantemente prevalência alta de resistência a quatro aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina, netilmicina e

tobramicina). Os isolados não produtores de polissacarídeos foram resistentes ao sulfametoxazol e ciprofloxacina. Além disso, a resistência múltipla aos antibióticos foi mais freqüente entre as cepas produtoras de polissacarídeo extracelular.

Kourbatova et al. (2005) investigaram clínica e molecularmente a epidemiologia de um grupo de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes em 95 artroplastias totais de joelho e quadril, e relacionaram essas infecções aos *Staphylococcus aureus*, isolado da microbiota nasal de médicos residentes, atendentes, enfermeiros e técnicos do centro cirúrgico que cuidaram desses pacientes. Por um período de 13 meses (janeiro de 2003 a janeiro de 2004) 9,5% pacientes desenvolveram infecção na articulação. O tempo médio de desenvolvimento da infecção foi de 20 dias. Cinco infecções foram causadas por *Staphylococcus aureus* meticilina resistente associado a comunidade e três por *Staphylococcus aureus* meticilina sensível, para uma infecção a cultura foi negativa. Todos isolados *Staphylococcus aureus* meticilina resistente associado a comunidade tiveram antibiograma idêntico (resistentes aos beta-lactâmicos e eritromicina; sensíveis a clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, rifampim, gentamicina, levofloxacina e vancomicina). A tipagem molecular de dois isolados revelaram que eram o clone USA300.

Lennox (2005) mostrou que os microrganismos, assim como outros organismos, vivem em grupos ou comunidades, onde acontecem várias interações como mutualismo, comensalismo, antagonismo e saprofitismo. Estas são apenas algumas das interações que ocorrem entre microrganismos e organismos multicelulares.

Bernardi (2005) relata que atualmente os *Staphylococcus* coagulase-negativa igualam-se ao *Staphylococcus aureus* e em alguns casos superam-no como, por exemplo, em relatos de doenças infecciosas hospitalares ou como causa primária de infecções de feridas externas.

Ehrlich et al. (2005) relataram que os implantes infectados requerem cirurgias e intervenções médicas extensas e dispendiosas e o tratamento pode levar meses. Estas prescrições são necessárias porque infecções bacterianas crônicas são

associadas à formação de biofilmes bacterianos na superfície de tecidos do hospedeiro e do implante. Em primeiro lugar, a melhor estratégia para combater infecções associadas a implantes ortopédicos é prevenir que elas ocorram. Isso deve ser possível, pois, a infecção bacteriana é inicialmente planctônica e somente após uma fase aguda a bactéria adere e elabora uma matriz de biofilme. Para alcançar este objetivo é necessário formar equipes multidisciplinares com microbiologistas, cirurgiões e engenheiros para desenvolver dispositivos que evitem a formação de biofilme.

Costerton (2005) mostraram por observações diretas das superfícies de próteses ortopédicas que falharam e o osso foi afetado por osteomielite, que as bactérias que causaram estas infecções viviam em biofilmes. As células dentro destas comunidades embutidas em uma matriz são protegidas das defesas do hospedeiro e antibióticos e a experiência clínica mostrou que as próteses devem ser removidas para a infecção ser resolvida. A etiologia do biofilme destas doenças demanda novos métodos diagnósticos porque a célula do biofilme tipicamente não crescem em placas de ágar quando recuperadas por raspagem ou *swab*. Costerton recomenda novos métodos imunológicos e moleculares de diagnóstico úteis para outras infecções por biofimes. Estas doenças passam por períodos de latência alternado com exacerbações agudas. A antibioticoterapia pode controlar a fase aguda, mas não resolve o foco básico da infecção. Está bem estabelecido que as infecções ortopédicas são causadas por patógenos bacterianos formadores de biofilme.

Barberán (2006) relatou que as infecções de articulações em próteses não são complicações comuns da cirurgia de reposição, mas estão associadas com significante morbidade e custos. Os cocos Gram-positivos, em particular, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* são os microrganismos mais recuperados (≥50% de todos os isolados). Cerca de 60% das infecções de articulações em próteses provavelmente ocorrem pela contaminação direta durante o procedimento operatório. O tratamento de uma articulação infectada envolve o uso de antibióticos sistêmicos e intervenção cirúrgica. Nas infecções estafilocócicas relacionadas a prótese o uso de rifampicina associado com quinolonas e cotrimoxazol, ácido fusídico e linezolida, tem dado bons resultados.

Brady et al. (2006) relataram que *Staphylococcus aureus* causa infecção persistente e recorrente, exemplo, osteomielite pela formação do biofilme. Para avaliar a resposta imune mediada por anticorpo e identificar as proteínas que são imunogênicas em uma infecção por biofilme de *S. aureus*, tíbias de coelhos foram infectadas com *S. aureus* meticilina resistentes para produzir osteomielite crônica. Antes da infecção o soro foi coletado e aos 14, 28 e 42 dias após a infecção. O soro foi usado para fazer o *Western blot* sobre as proteínas totais a partir do crescimento do biofilme *in vitro* e separado por eletroforese em gel bi-dimensional. As proteínas reconhecidas pelos anticorpos do hospedeiro no soro colhido foram identificadas. Das amostras de proteínas do biofilme foram identificados 26 e 22 imunógenos, respectivamente, que incluíram beta-lactamase associada à superfície da célula bacteriana, lipoproteína, lípase, autolisina e transportadores ABC de lipoproteínas. Os estudos também foram feitos usando análise *microarray* e foi confirmada a regulação específica do biofilme da maioria destes genes. Embora, os antígenos do biofilme são reconhecidos pelo sistema imune, o biofilme infecção persiste. No entanto, estas proteínas quando liberadas como vacinas, podem ser importantes no direcionamento do sistema imune em direção a uma resposta imediata por anticorpo efetiva para prevenir infecção crônica de *S. aureus*. Estudos anteriores identificaram proteínas de *S. aureus* que são imunogênicas durante infecções agudas, como a sepse. Contudo, este é o primeiro trabalho para identificar estes imunógenos durante a infecção crônica por biofilme de *S. aureus* e simultaneamente mostra a relação global entre o antígeno expresso durante uma infecção in vivo e os níveis correspondentes *in vitro* da expressão gênica transcriptômica e proteômica.

Campoccia, Montanaro e Arciola (2006) observaram que nos últimos 15 anos com o advento das normas padrão de controle de esterilidade na sala de cirurgia e protocolos adequados de antibiótico profilaxia, a incidência de infecções associadas aos implantes ortopédicos tornou-se baixa. No entanto, o evento da infecção ainda representa uma das mais sérias e devastadoras complicações a qual envolve o implante. Na ortopedia o enorme número de procedimentos cirúrgicos invasivos envolvem materiais de implantes, mesmo raras as infecções tem impacto em termos de morbidade, mortalidade e custos médicos. A difícil batalha para prevenir e combater a infecção bacteriana associada ao material de implante deve ser

observada em vários graus. Uma estratégia é conhecer a patogênese e a epidemiologia das infecções relacionadas ao implante com especial atenção sobre o alarmante fenômeno da antibiótico resistência. Em relação a resistência aos antibióticos os estafilococos são os patógenos mais importantes envolvidos com as infecções relacionadas ao implante ortopédico e desta forma, o pior inimigo. Os autores concluíram que na ortopedia e em muitos outros campos a grande maioria das infecções pós-cirúrgicas estão associadas com a presença de materiais de implante, o qual representam um sitio de ponto fraco para a defesa do hospedeiro onde mesmo a bactéria com baixo poder de virulência pode facilmente estabelecer-se. O surgimento de novas estratégias na redução da intrínseca vulnerabilidade dos materiais de implante a colonização do implante e inovação tecnológica representa o principal objetivo no campo da ortopedia, pelo menos igualmente importante no melhoramento em termos de biocompatibilidade dos materiais de implantes. O desenvolvimento de superfícies anti-infectivas está ainda no primeiro estágio e em um futuro próximo os esforços e investimentos multiplicarão.

Mercuri (2006) relata que o cirurgião que faz a reconstrução maxilofacial e usa próteses abióticas, como por exemplo, implantes dentais, chapas e parafusos, articulação temporo mandibular parcial e total, é essencial conhecer a existência dos biofilmes, entender sua microbiologia e sua atividade.

Saginur et al. (2006) avaliaram agentes antimicrobianos e suas combinações contra isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* (meticilina resistentes e meticilina sensíveis) recuperados de infecções associada a implantes. Os isolados cresceram no modo planctônico e como biofilme. As bactérias e crescidas em biofilme foram muito mais resistentes aos efeitos inibitórios e bactericidas do antibiótico único e combinado do que culturas planctônicas ($p<0,001$). A rifampicina foi o constituinte mais comum de antibióticos combinados ativos contra o biofilme estafilocócico. Outros antimicrobianos freqüentemente efetivos foram a vancomicina e o ácido fusídico. O teste de sensibilidade envolvendo a bactéria associada ao biofilme sugere novas opções para a terapia antimicrobiana combinada.

Adachi et al. (2007) desenvolveram um método quantitativo para comparar a diferença na resistência do aço inoxidável e do titânio contra biofilme formado por três cepas de *S. aureus* (uma cepa Seattle 1945 e duas cepas clínicas) e a eficácia de antibióticos contra biofilmes. Para isso, anilhas imersas em TSB inoculado com as cepas bacterianas foram incubadas a 37ºC por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas com salina e coradas com cristal violeta 3% para, então serem analisadas por um microscópio ótico digital. Os autores observaram que a taxa de cobertura das anilhas por *S.aureus* Seattle 1945 aumentou de acordo com o tempo de incubação em ambas as superfícies. Não sendo notadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois biomateriais após 24 e 48 horas de incubação. Entretanto, a faixa de cobertura sobre o aço inoxidável foi maior que sobre o titânio após 72 horas. Quando avaliada a extensão de cobertura pela cepa clínica (denominada pelos autores) nº 7 sobre as duas superfícies metálicas, as médias foram significativamente diferentes após 24 e 48 horas e não apresentaram diferença significativa em 72 horas. As faixas de cobertura pela cepa clínica nº 8 das superfícies de aço inoxidável e titânio apresentou diferenças significativas após 24 e 72 horas e não houve diferença estatística após 48 horas. A cefazolina, antibiótico avaliado quanto a eficácia contra as cepas clínicas (nº 7 e 8), diminuiu significativamente a extensão de cobertura da cepa nº 8 sobre ambas as superfícies, o mesmo não aconteceu com a cepa nº 7.

Popat et al. (2007) relataram que a infecção bacteriana é um dos problemas mais comuns após a cirurgia do implante. Se não houver prevenção da infecção bacteriana pode resultar em complicações sérias para a qualidade de vida, como a osteomielite.

Rohde et al. (2007) observaram que as infecções estafilocócicas relacionadas a corpos estranhos e associadas a formação de biofilme demandam novas terapias e estratégias preventivas. A formação do biofilme foi detectada em todas as cepas *S. aureus* e 69% das cepas *S. epidermidis*. No biofilme de *S. aureus* a formação de proteínas são muito importantes e o foco central de estudos futuros deveria ser a identificação destas moléculas de funcionalidade ativa.

Van der Borden et al. (2007) relataram que as infecções de pinos de fixadores externos usados em cirurgia de osso na ortopedia reconstrutiva são complicações sérias que eventualmente levam a periostite e osteomielite. *In vitro* experimentos tem demonstrado que a bactéria aderente ao aço inoxidável em modo de biofilme desaloja-se sobre a influência de pequena corrente elétrica, enquanto que a bactéria remanescente torna-se menos viável. Pinos foram infectados com *Staphylococcus epidermidis* e a infecção desenvolveu-se em 89% dos pinos controles.

Antoci Jr. et al. (2008) relataram que as infecções peri-implantes são de difícil tratamento porque o biomaterial do implante é ideal para adesão bacteriana e formação de biofilme, resultando na diminuição da sensibilidade ao antibiótico. Os autores estudaram o efeito da superfície de titânio banhado em vancomicina sobre Staphylococcus epidermidis, um organismo Gram-positivo prevalente na infecção ortopédica. Observaram que a colonização de *S. epidermidis* foi inibida nos implantes de titânio banhados com vancomicina. Concluíram que o antibiótico que deriva do implante pode resultar em uma superfície que resiste a colonização bacteriana.

Brady et al. (2008) mostraram que o entendimento do mecanismo implicado na aderência inicial, desenvolvimento e maturação do biofilme fenótipo é de fundamental importância para fins médicos, industrial e saúde pública. Os autores estudaram a natureza do biofilme e o impacto que a interação molecular entre a própria bactéria , bem como, entre a bactéria e hospedeiro, podem ter o desenvolvimento do biofilme e do fenótipo usando como exemplo, coco Gram-positivo não móvel *Staphylococcus aureus*.

Vila, Soriano e Mensa (2008) mostraram que a aderência de um microrganismo a uma superfície é o passo inicial na formação da maioria dos biofilmes. A aderência pode ser em superfície abiótica ou sobre material recoberto de proteínas provenientes do hospedeiro. A importância destes mecanismos depende do tipo de implante. Os autores estudaram as bases moleculares da aderência bacteriana sobre material inerte, bem como a implicação da aderência na formação do biofilme e as vantagens de produção do biofilme por bactérias que causam as infecções associadas a biomateriais de implantes.

Zhao et al. (2008) relataram que a alta incidência de infecção causada pelo uso de próteses médicas tem um impacto severo na saúde humana. Os autores avaliaram a adesão de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*, bactérias que causam com frequência infecção associada ao implante, sobre superfície de aço inoxidável com propriedades de superfície modificadas. Também, avaliaram a composição química desta superfície, rugosidade, topografia, molhabilidade e energia superficial livre. O experimento foi realizado com corpos-de-prova de aço inoxidável 316L em forma de discos com 10mm de diâmetro. A fim de investigar a influência do tempo de contato sobre a quantidade de bactéria aderente sobre a superfície de aço inoxidável o experimento foi realizado em 1, 5, 18 e 24 horas em salina tamponada (PBS) com uma concentração bacteriana da ordem de 10^7UFC/ml. A análise estatística foi realizada pelo teste *t*, que é o método mais usado para comparar os dados de dois grupos independentes. O efeito do tempo de contato (1, 5, 18 e 24 horas) da adesão sobre o aço inoxidável 316L de superfície não modificada e modificada, mostrou que em 1 hora foram recuperadas de superfície não modificada 6 x 10^6 UFC/ml de *Staphylococcus epidermidis* e 1,8 x 10^6 UFC/ml de *Staphylococcus aureus* e que a análise estatística pelo t-teste, mostrou uma diferença estatística significante entre a superfície modificada e não modificada na redução da adesão de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em vários intervalos de tempo ($p<0,05$). Os dados obtidos mostraram que a adesão bacteriana diminuiu com a diminuição da rugosidade da superfície e energia superficial livre ou com aumento do ângulo de contato. O número de *Staphylococcus* epidermidis aderente aumentou significantemente com o tempo de contato, aumentando nas primeiras 5 horas e diminuindo gradualmente com o aumento do tempo de contato. Para *Staphylococcus aureus* o número de bactéria aderente aumentou com o tempo de contato aumentando dentro do período teste. O número de bactéria aderente de *Staphylococcus aureus* é maior do que para *Staphylococcus epidermidis*. A diferença entre o comportamento da adesão dos dois tipos de bactérias pode ser causado por suas diferentes características de virulência. Os autores concluíram que para *Staphylococcus* epidermidis o número de bactéria aderente aumentou significativamente com o tempo de contato aumentando nas primeiras 5 horas e diminuindo gradualmente com o aumento do tempo de contato. Para *Staphylococcus aureus* o número de bactéria aderente aumentou com o tempo de contato aumentando em 24 horas no período do teste.

Gunther et al. (2009) relataram que a bactéria organizada em biofilme é a causa comum de infecção persistente, particularmente em pacientes que receberam implante médico como tubos de ventilação, cateter venoso central, válvulas cardíacas, endopróteses ou materiais de osteosíntese. A bactéria em biofilme é relativamente resistente aos antibióticos e biocidas e sistema imune de defesa. Os autores estudaram a interação dos neutrófilos polimorfonucleares (PMN), a primeira linha de defesa do corpo humano contra a infecção bacteriana, com biofilmes de *Staphylococcus aureus* gerados *in vitro*, usaram microscópio confocal a laser e observaram a migração dos PMN em direção aos biofilmes, bem como a limpeza dos biofilmes pelos fagócitos. Concluíram que o biofilme de *S. aureus* não está totalmente protegido contra as defesas do hospedeiro.

Jain e Agarwal (2009) relataram que o biofilme é um dos fatores de virulência dos estafilococos, patógeno humano e animal e comensal. Algumas cepas tornam-se invasivas sob condições favoráveis enquanto outras não causam doença. A detecção precoce e o tratamento dos estafilococos potencialmente patogênicos são os passos essenciais para prevenir a infecção associada ao implante. Os autores estudaram as potenciais diferenças de cepas comensais, colonizantes e invasivas de *Staphylococcus* spp. na produção de biofilme. Para detectar a produção de biofilme foi utilizado um método qualitativo (Ágar vermelho Congo) e outro quantitativo (microtitulação em placa). Foram usadas cepas de estafilococos de cateter venoso central, do local da inserção deste cateter e da mucosa nasal de pacientes internados em um hospital da Índia. Foram avaliados 200 isolados clínicos, 100 invasivos, 50 colonizantes e 50 comensais. Os autores observaram que 74% dos isolados invasivos, 68% dos colonizantes e 32% dos comensais foram positivos para a produção de biofilme. O biofilme é um conhecido fator de virulência dos estafilococos, que é um patógeno humano, animal e às vezes comensal. Algumas cepas tornam-se invasivas sob condições favoráveis enquanto outras não causam doença. A detecção precoce e o gerenciamento correto de estafilococos potencialmente patogênicos é um passo essencial para prevenir infecções associadas a dispositivos médicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais:

Avaliar por métodos microbiológicos e microscopia eletrônica de varredura a superfície dos materiais metálicos de uso médico, liga de titânio e aço inoxidável, antes e após a aderência de microrganismos.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1. Por meio da microscopia eletrônica de varredura, fazer uma avaliação qualitativa da aderência bacteriana e a formação de biofilme sobre superfícies polidas da liga titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) e do aço inoxidável F-138.

3.2.2. Por cultura em caldo bacteriológico avaliar quantitativamente a viabilidade das células recuperadas do biofilme formado sobre as superfícies polidas da liga titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) e do aço inoxidável F-138.

3.2.3. Avaliar a molhabilidade da superfície da liga Ti-6Al-4V e do aço inoxidável F-138.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação dos reagentes e meios de cultura

Os reagentes e meios de cultura foram preparados segundo metodologia clássica. Os meios de cultura, vidrarias, ponteiras (resistentes a ação do calor e pressão), corpos-de-prova de liga metálica foram esterilizados em autoclave a 121℃, durante 15 minutos. Os reagentes e meios de cultura, após a autoclavagem foram distribuídos em câmara de fluxo laminar (Veco), em recipientes previamente esterilizados e estocados em refrigerador a 4℃. As placas de Petri de tamanho 90x15 (Pleion), os tubos de poliestireno tinham capacidade para 15,0 e 50,0mL e copos de béquer capacidade para 25,0mL.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Materiais metálicos

Os materiais metálicos utilizados nesta pesquisa são de uso médico autorizados para implantes ortopédicos no mercado nacional: aço inoxidável F-138 e liga de titânio (Ti-6Al-4V) F-136-02a.

Para o experimento esses materiais metálicos foram confeccionados na forma de discos e cedidos pelo engenheiro Tomaz Puga Leivas do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-USP).

O acabamento superficial dos materiais metálicos é semelhante àquele empregado nas próteses ortopédicas.

4.1.1.1 Liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V)

Os discos de liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) foram confeccionadas conforme normas Ti-6Al-4V ELI ISO5832-3 (1996) e ASTM F-136-02a e apresentam superfície polida, lisa e de cor amarela.

Os corpos-de-prova apresentavam a forma de disco com as seguintes características: 12,0mm de diâmetro por 2,0mm de espessura (Figura 1).

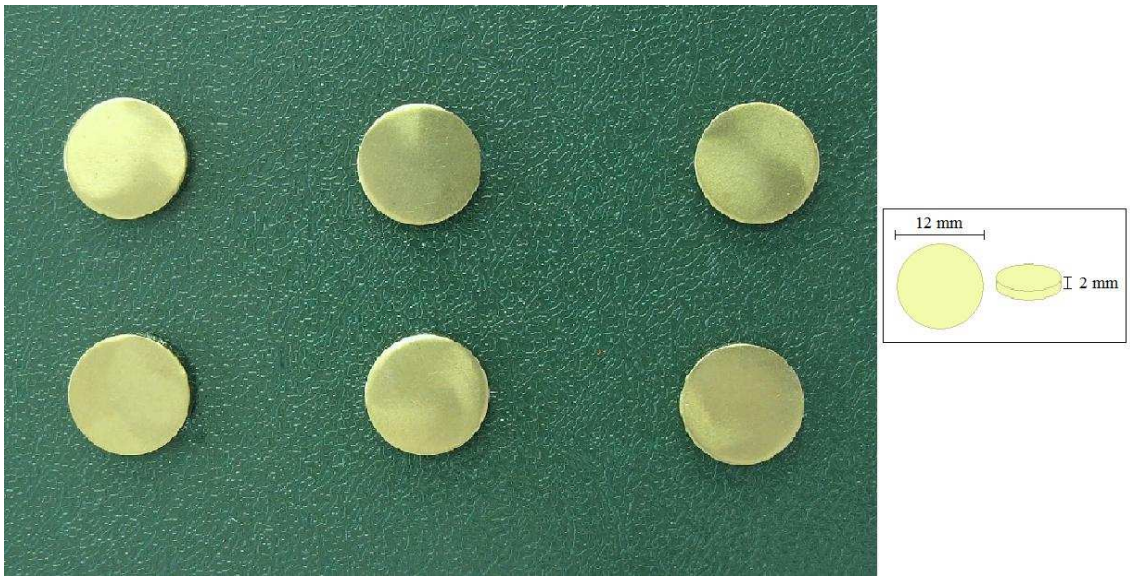


Figura 1 – Características dos corpos-de-prova de titânio-alumínio-vanádio.

A composição química da liga titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V), de acordo com as especificações do fabricante está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química da liga metálica titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V)

Elemento químico	Faixa (%p/p)
Carbono	0,003
Vanádio	3,97
Alumínio	6.08
Ferro	0,15
Nitrogênio	0,004
Oxigênio	0,11
Titânio	Restante

4.1.1.2 Aço inoxidável

Os discos de aço inoxidável F-138 foram confeccionados conforme normas ISO 5832-1 (1997) e ASTM F-138 e apresentam superfície polida, lisa e brilhante.

Os corpos-de-prova apresentavam a forma de disco com as seguintes características: 15,0mm de diâmetro por 2,0mm de espessura (Figura 2).

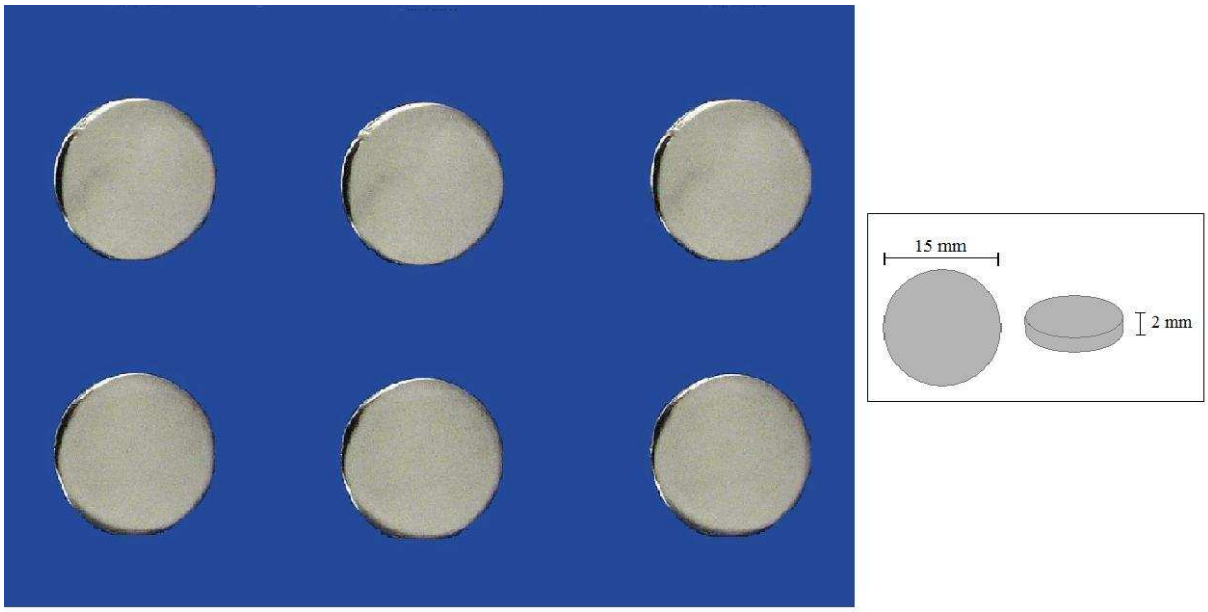


Figura 2 – Características dos corpos-de-prova de aço inoxidável.

A composição química do aço inoxidável, de acordo com as especificações do fabricante está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química do aço inoxidável

Elemento químico	Faixa (%p/p)
Carbono	0,016
Silício	0,25
Manganês	1,69
Fósforo	0,017
Enxofre	0,0003
Cromo	17,39
Molibdênio	2,72
Níquel	14,51
Cobre	0,11
Nitrogênio	0,088

4.1.2 Microrganismos

Os microrganismos utilizados para esta pesquisa foram cepas bacterianas produtoras de polissacarídeo extracelular: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, provenientes da coleção de culturas do Laboratório Especializado em Microbiologia Clínica-LEMC, UNIFESP, São Paulo, SP. As cepas foram estocadas em caldo *Tryptic Soy* – TSB, acrescido de 20% de glicerol.

4.1.3 Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura utilizados foram: caldo Mueller Hinton (*Mueller Hinton broth*) e ágar Mueller Hinton (Mueller Hinton Agar)

4.1.3.1 Caldo Mueller Hinton (Difco)

Infusão de carne bovina.....300,0g
Ácidos de casamino, técnico.....17,5g
Amido.....1,5g
Água destilada.....1000,0mL

pH 7,3 ± 0,2 a 25℃

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

4.1.3.2 Ágar Mueller Hinton (Difco)

Infusão de carne bovina.....300,0g
Ácidos de casamino, técnico.....17,5g
Amido.....1,5g
Ágar.....1,5g
Água destilada.....1000,0mL

pH 7,3 ± 0,2 a 25℃

Hidratar, de acordo com as especificações do fabricante, em água MiliQ, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121℃ 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)

Solução A 33,00mL
Solução B 67,00mL

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

4.1.5 Salina fisiológica a 0,85%

Cloreto de sódio 0,85g
Água destilada 100,00mL

4.1.6 – Equipamentos

4.1.6.1 – 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 3).

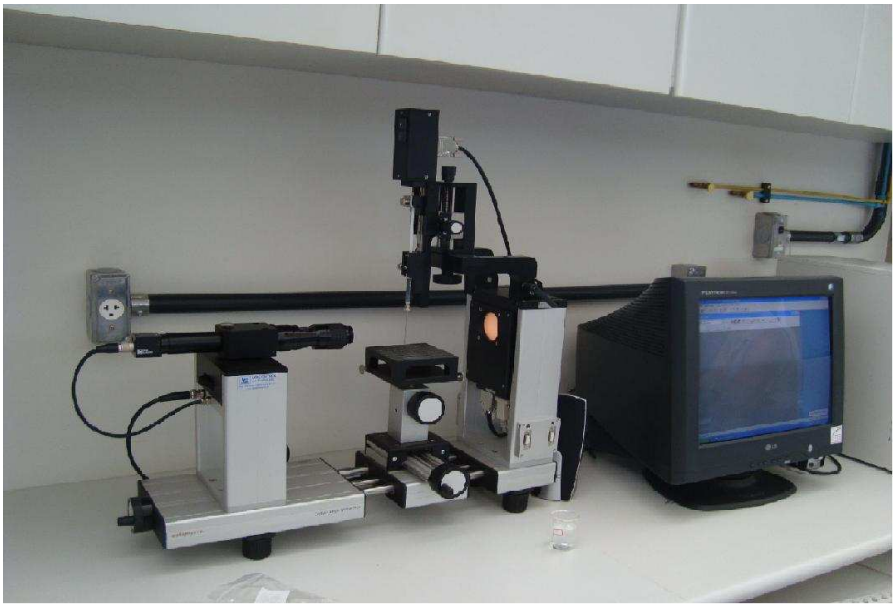


Figura 3 – Goniômetro – Modelo OCA-20 Contact Angle System (DataPhysics)

4.1.6.2 – Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi JEOL – JSM modelo T330A, instalado no Instituto de Química – Unesp de Araraquara (Figura 4).

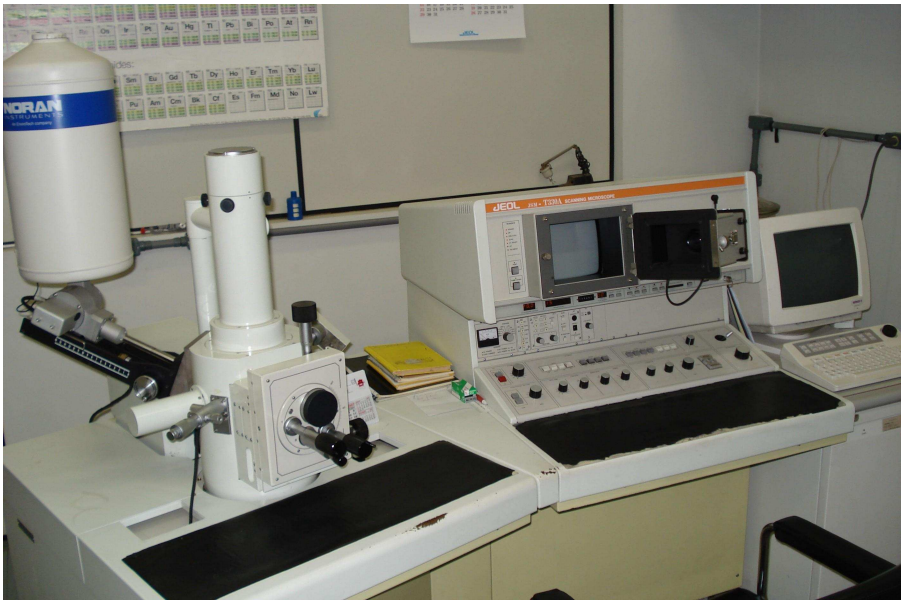


Figura 4 – Microscópio eletrônico de varredura (JEOL – JSM-T330A)

4.1.7 - Análise Estatística

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

4.2 MÉTODOS

Resumo do experimento prático para atingir os objetivos:

Os corpos-de-prova de liga de titânio-alumínio-vanádio e aço inoxidável F-138, utilizados neste estudo, foram provenientes do IOT-HC- USP/São Paulo. Os corpos-de-prova apresentavam superfície lisa e polida. Antes da análise bacteriológica e teste físico-químico foram lavados com detergente neutro e esterilizados em autoclave a 121ºC por 15 minutos.

As superfícies metálicas foram avaliadas quanto à molhabilidade, por meio da medida do ângulo de contato da água com a superfície realizada em equipamento denominado goniômetro e também foram avaliadas topograficamente por meio de microscópio eletrônico de varredura.

A seguir foram realizados os testes bacteriológicos representados por contato destas superfícies com meio de cultura líquido inoculado com suspensões bacterianas da ordem de 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. A avaliação da viabilidade das células aderidas e recuperadas após o contato destas superfícies foi realizada por semeadura do sobrenadante após banho ultrassônico dos corpos-de-prova removidos do meio Mueller Hinton em placas de Petri contendo ágar sólido.

O exame físico-químico das superfícies metálicas após a incubação em meio líquido foi realizado por meio de microscópio eletrônico de varredura.

A seguir serão descritos cada passo do experimento:

4.2.1 – Análise da molhabilidade da superfície de aço inovidável e liga Ti-6Al-4V

A medida de ângulo de contato foi realizada por meio de goniômetro após depósito de uma gota de água pura (MiliQ) sobre a superfície metálica (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. A imagem foi capturada por uma câmera digital acoplada ao equipamento e a imagem analisada por um software instalado em um computador ligado ao equipamento.

Foram utilizados três corpos-de-prova de cada biomaterial e três gotas de água MiliQ foram dispensadas em pontos diferentes da superfície do disco metálico. O software SCA22 calculou o ângulo de contato pelo método elíptico e utilizando a equação de Laplace-Yong. Para os valores do ângulo de contato foram calculadas médias ± desvio padrão com o software Origin®Pro 5.0.

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.

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. Forças atraentes de amplo alcance são detectadas entre superfícies exibindo um ângulo de contato com a água maior 65º (figura 5), definidas como superfícies hidrofóbicas. Forças repulsivas são detectadas entre superfícies que exibem um ângulo de contato com a água menor que 65º (figura 5), caracterizadas como superfícies hidrofílicas (Vogler, 1998).

O líquido mais adequado para o estudo é a água, devido à molhabilidade e não polaridade da superfície do substrato. A tangente do ângulo entre o sólido e o líquido é conhecida como ângulo de contato.

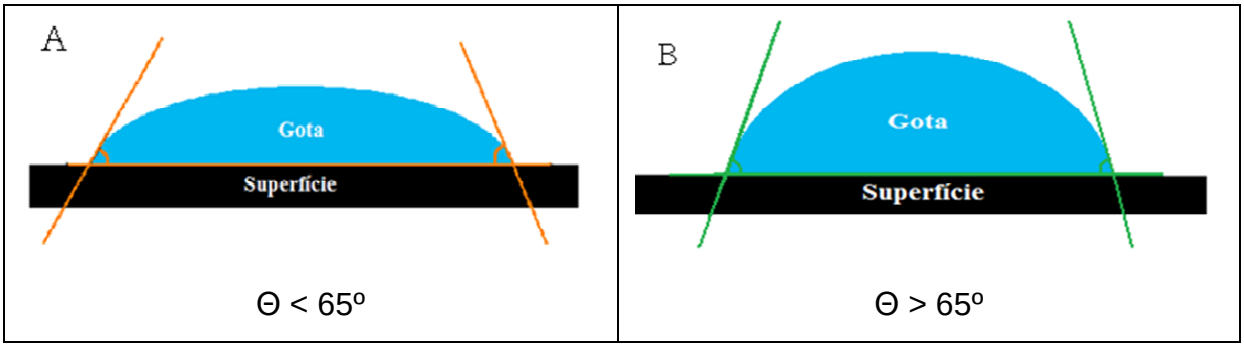


Figura 5 – Esquema da medida do ângulo de contato. Em A o ângulo de contato com a superfície é menor que 65º caracterizando uma superfície hidrofílica; em B o ângulo de contato com a superfície é maior que 65º caracterizando uma superfície hidrofóbica.

4.2.2 – Métodos microbiológicos

A metodologia usada, para verificar a aderência bacteriana e gerar biofilmes, foi realizada segundo padronização estabelecida durante um experimento piloto.

4.2.2.1 – Preparo dos corpos de prova para análise microbiológica

Os corpos-de-prova foram lavados com detergente neutro e enxaguados com água destilada. Em seguida, foram colocados individualmente, imersos em água destilada, dentro de tubos cônicos de poliestireno (Falcon) e esterilizados em autoclave a 121ºC por 15 minutos.

4.2.2.2 - Preparo das suspensões bacterianas (Montville e Schaffner, 2003)

As cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) conservadas em caldo nutriente e armazenadas em freezer foram reativadas separadamente inoculando-as em 5,0mL de caldo Mueller

Hinton e incubadas a 37ºC sob agitação constante de 150rpm em agitador orbital (Marconi®) por 24 horas.

Após as 24 horas de incubação a cultura foi centrifugada a 3500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a biomassa obtida lavada três vezes com 5,0mL de salina tamponada com fosfato (PBS – pH7,2). Em seguida, a biomassa foi ressuspensa em 3,0mL de tampão PBS. A turvação da suspensão bacteriana foi monitorada por densidade óptica (DO) de 1,0 a 540nm em espectrofotômetro (FEMTO), obtendo-se cerca de 10^8UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia/mL).

4.2.2.3 – Aderência e produção de biofilme pelo *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em discos de liga de Ti-6Al-4V ASTM F-136 e aço inoxidável ASTM F-138 (Pizzolitto et al.,2001)

Da suspensão bacteriana da ordem de 10^8 UFC/mL, uma alíquota de 0,2 mL de cada suspensão bacteriana foi transferida individualmente para tubos cônicos de poliestireno (Falcon), esterilizados, contendo 15mL de caldo Mueller Hinton e um corpo-de-prova foi introduzido assepticamente em cada tubo com o inóculo bacteriano.

Os tubos foram incubados a 37℃ sob agitação const ante de 100 rpm por cinco períodos de incubação (1, 6, 24, 48 e 72 horas). Após cada período de incubação, o corpo-de-prova foi retirado, lavado com solução salina 0,85% esterilizada e preparado para análise por MEV.

4.2.2.4 Avaliação quantitativa das células bacterianas viáveis recuperadas do biofilme (MIYANO, OIE e KAMIYA, 2003)

O corpo-de-prova lavado foi colocado em um tubo de vidro (18x180mm) e imerso em 5 mL de salina 0,85%. Cada tubo continha um disco de aço inoxidável ou de liga de titânio-alumínio-vanádio. Os tubos foram levados a lavagem por

ultrassom, a uma frequência de 40 kHz por 8 minutos, para a recuperação das células bacterianas aderidas sobre a superfície dos corpos-de-prova.

4.2.2.4.1 Procedimento de preparo da diluição seriada para quantificar células viáveis.(TORTORA, FUNKE e RAMALHO, 2000)

Foram enumerados cinco tubos e em cada tubo distribuídos 9,0 mL de salina 0,85%. Do tubo que continha a suspensão bacteriana recuperada por lavagem ultrassônica do biofilme formado sobre o corpo-de-prova, transferiu-se com pipeta 1,0 mL, para o tubo nº 1. Descartar a pipeta. A cultura foi diluída 10 vezes (10^{-1}). Homogeneizar.

Do tubo nº 1 transferir 1,0 mL, com pipeta, para o tubo nº 2. Descartar a pipeta. A cultura foi diluída 100 vezes (10^{-2}). Homogeneizar.

Do tubo n° 2 transferir 1,0 mL, com pipeta, para o tubo n° 3. Descartar a pipeta. A cultura foi diluída 1.000 vezes (10^{-3}).

Do tubo n° 3 transferir 1,0 mL, com pipeta, para o tubo n° 4. Descartar a pipeta. A cultura foi diluída 10.000 vezes (10^{-4}). Homogeneizar.

Do tubo n° 4 transferir 1,0 mL, com pipeta, para o tubo n° 5. Descartar a pipeta. A cultura foi diluída 100.000 vezes (10^{-5}). Homogeneizar. Do quinto tubo desprezar 1,0 mL da diluição.

A seguir, uma alíquota de 0,1mL (100µl) de cada diluição foi semeada por espalhamento, com alça bacteriológica descartável, em placas de Petri (90x15mm) com ágar Mueller Hinton e foram incubadas a 35-37ºC em estufa bacteriológica por 24 horas. As colônias crescidas foram contadas, multiplicadas pelo valor da diluição e o número total de colônias expresso em UFC/mL. Conforme padronização do método foram enumeradas e contadas as colônias na placa que apresentou entre 30 e 300 colônias. A figura 5 ilustra as diluições e quantificação da viabilidade celular.

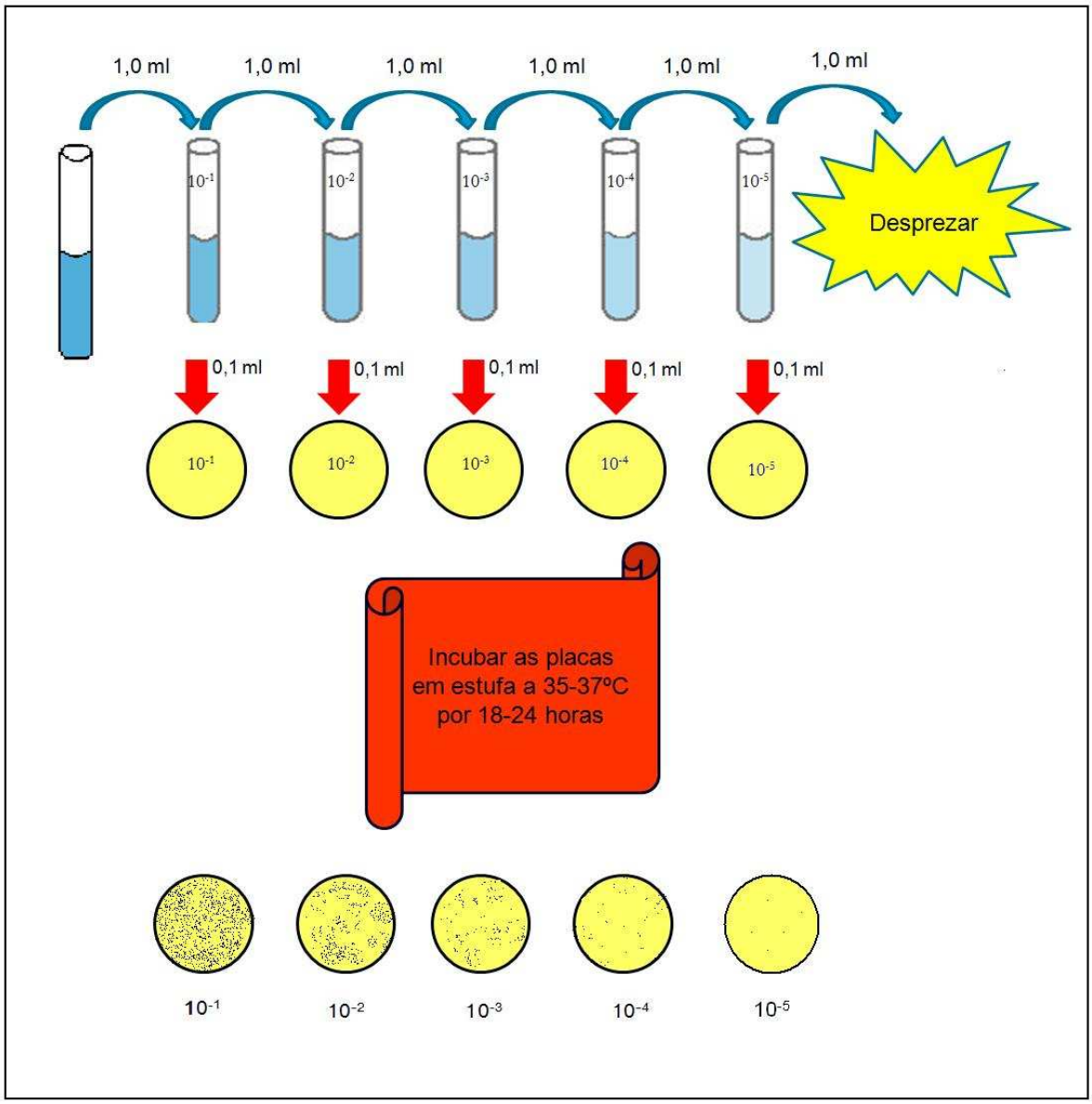


Figura 6 – Esquema de diluição seriada para quantificação de células viáveis

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 x 10^5 = 1:100.000

Volume da diluição adicionado a placa = 0,1 mL

50 x 100.000 = 5.000.000 = 5 x 10^6 células/mL

5.000.000 (5 x 10^6) x 10 = 50.000.000 = 5 x 10^7 células/mL

4.2.3 – Análise da aderência bacteriana aos corpos-de-prova por meio de microscopia eletrônica de varredura

Para esta análise os corpos-de-prova foram preparados conforme técnicas sugeridas por Sabatini, Bensch e Barrnett (1963); Santos (1992); Videla et al. (1995) e modificadas por Pizzolitto (1997).

Após serem submetidos à lavagem ultrassônica os corpos-de-prova foram imersos, separadamente, em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,1), durante 15 minutos. Desidratados em etanol nas diluições (15, 30, 50, 75, 95 e 100%) por 15 minutos cada um e secos em estufa a 37℃. Sobre suporte específico do microscópio foram colados e metalizados com ouro (1KV, 15mAP, 2 minutos) no aparelho Edwards S150B, para tornar a amostra condutora e a seguir o suporte com os corpos-de-prova foi introduzido na câmara a vácuo e para observação por meio de microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM – T330A-Japan).

4.2.6 – Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± 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 5.0) em intervalo de confiança de 95% (p=0,05).

Também foi aplicado o teste *t* para comparar os dados de dois grupos independentes.

5 RESULTADOS

5.1 Resultado das topografias de superfícies de aço inoxidável e liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V observadas por MEV:

Em uma análise microscópica ambas as superfícies lisas e polidas apresentaram fendas, ranhuras e *pits* (buracos).

5.1.1 MEV da superfície do aço inoxidável antes da imersão em meio líquido

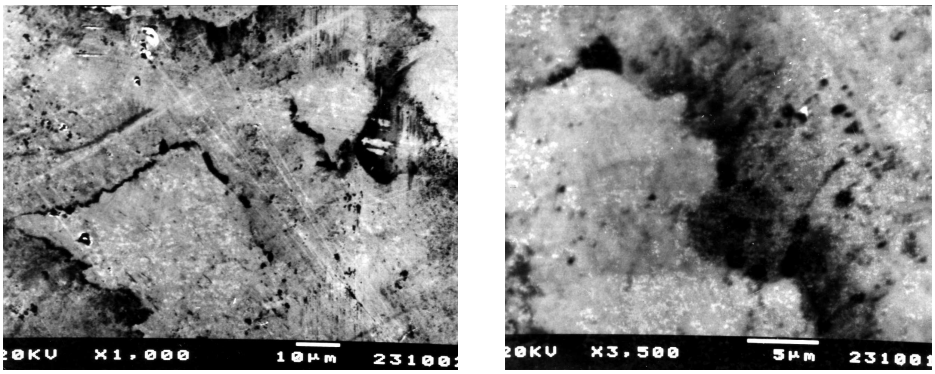


Figura 7 – Micrografias, com aumentos de 1000 e 3500X, da superfície lisa do aço inoxidável antes da imersão em meio de cultura Mueller Hinton (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A-JAPAN)

5.1.2 MEV da superfície de Ti-6Al-4V antes da imersão em meio líquido

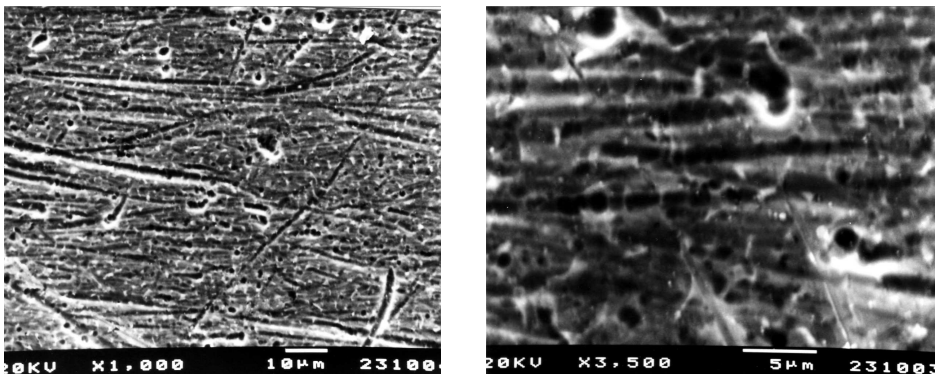


Figura 8 – Micrografias, com aumentos de 1000 e 3500X, da superfície de liga de Titânio-alumínio-vanádio antes da imersão em meio de cultura Mueller Hinton (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A-JAPAN)

5.2 Da molhabilidade das superfícies de aço inoxidável e Ti-6Al-4V.

A molhabilidade da superfície de um biomaterial usado na ortopedia é um dos inúmeros parâmetros que interferem na osseointegração de um implante. Ela permite um maior ou menor espalhamento de líquido sobre as superfícies metálicas. Como o sangue tem na sua composição 90% de água, esta capacidade de absorção de água pela superfície conhecida como molhabilidade é fundamental para o sucesso na adesão celular e conseqüentemente osseointegração. A molhabilidade foi avaliada por meio de medida do ângulo de contato da água sobre superfície do metal.

5.2.1 Liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V)

A medida do ângulo de contato realizado sobre a superfície lisa do corpo-de-prova da liga de titânio está apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Medida do ângulo de contato da superfície lisa da liga Ti-6Al-4V

Característica da superfície Ti-6Al-4V	Medida do ângulo de contato - θ (^{o}) (média $\pm$ desvio padrão)	Molhabilidade
Lisa	39,016 $\pm$ 11,267	Média molhabilidade (Hidrofílica)

No presente estudo, o ensaio da molhabilidade foi realizado em superfície lisa de liga de titânio-alumínio-vanádio, o ângulo de contato da gota de água formado sobre a superfície lisa da liga de titânio era menor do que 65°, ou seja, o espalhamento da gota de água foi pouco (média molhabilidade) e a superfície pode ser chamada de hidrofílica.

5.2.2 Aço inoxidável

Os resultados da medida do ângulo de contato de superfície de aço inoxidável estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Medida do ângulo de contato da superfície de aço inoxidável

Característica da superfície de aço inoxidável	Medida do ângulo de contato - θ (^{o}) (média ± desvio padrão)	Molhabilidade
Lisa	58,083 ± 7,165	Média molhabilidade (Hidrofílica)

O ângulo de contato na interface superfície/água, na superfície de aço inoxidável foi menor do que 65° e pode ser chamada de hidrofílica (média molhabilidade).

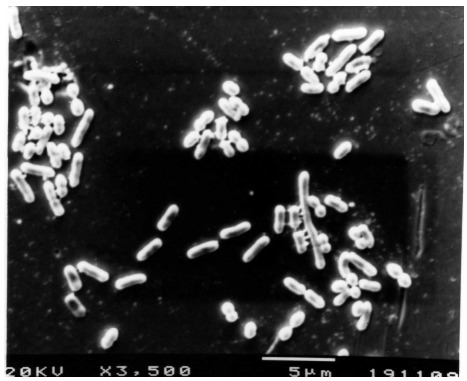
Os dados obtidos mostraram que ambas as superfícies são hidrofílicas, tanto a superfície lisa da liga de titânio como a do aço inoxidável permitiram o espalhamento parcial da gota de água (média molhabilidade).

5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da aderência inicial e formação do biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre superfície lisa do aço inoxidável e de liga de titânio (Ti6Al4V).

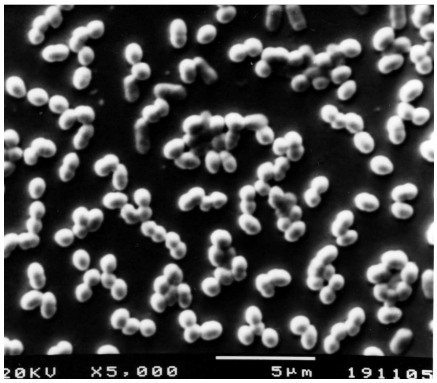
Em todos os intervalos de tempo de incubação foi observada aderência e produção de polissacarídeo nas imagens capturadas pelo microscópio eletrônico de varredura.

5.3.1 MEV da aderência inicial e formação do biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre superfície lisa do aço inoxidável.

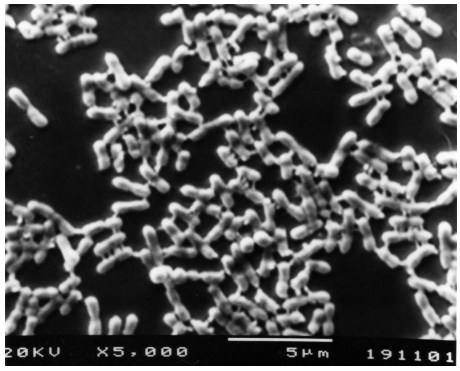
Os resultados de aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de *S.epidermidis* sobre superfície lisa de aço inoxidável em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 8.



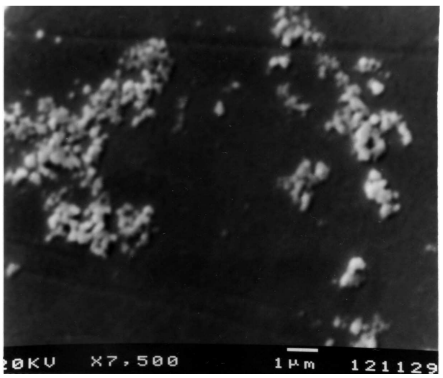
1 hora



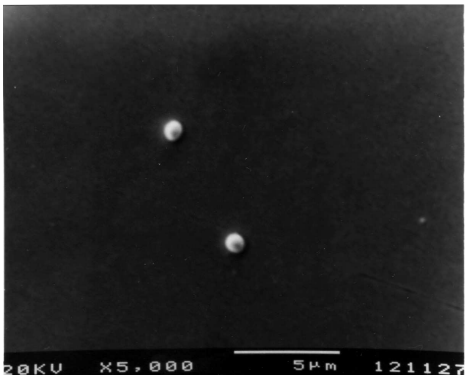
6 horas



24 horas



48 horas

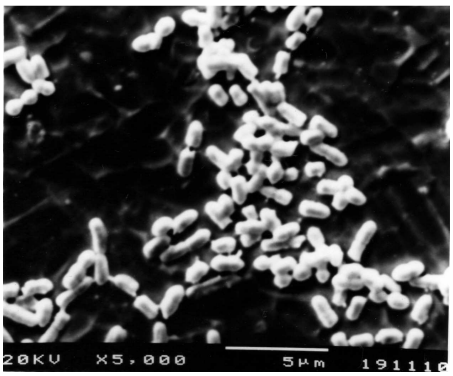


72 horas

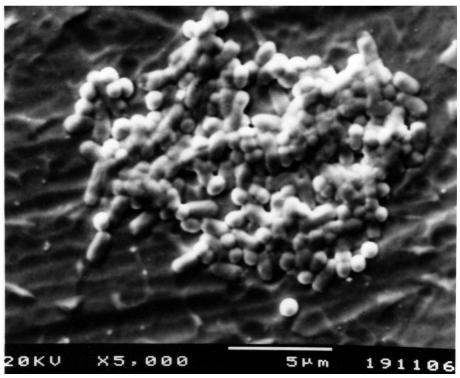
Figura 9 – Micrografia de superfície lisa do aço inoxidável após incubação em Mueller Hinton inoculado com *S. epidermidis* e após banho ultrassônico. Observou-se cocos isolados e agrupados aderidos à superfície do aço e entre si (adesão intercelular) e formação de biofilme (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

5.3.2 MEV de aderência inicial e formação de biofilme em superfície lisa de liga de titânio (Ti6Al4V).

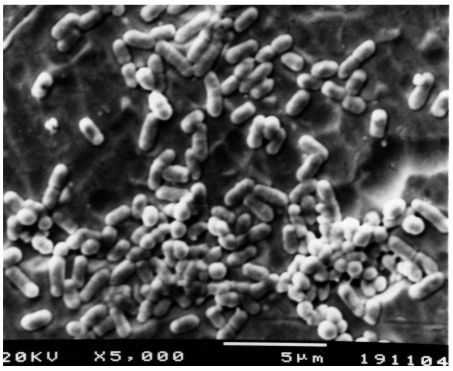
Os resultados de aderência inicial e formação de biofilme de *S. epidermidis* sobre superfície lisa de liga de titânio em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas, após banho ultrassônico estão apresentados na figura 9.



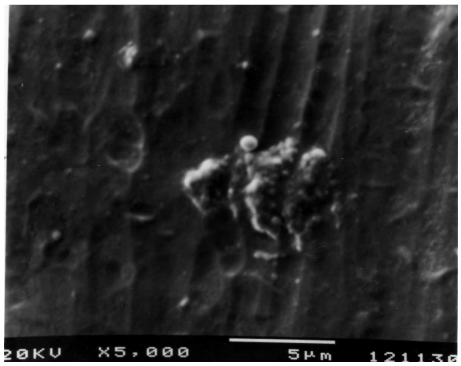
1 hora



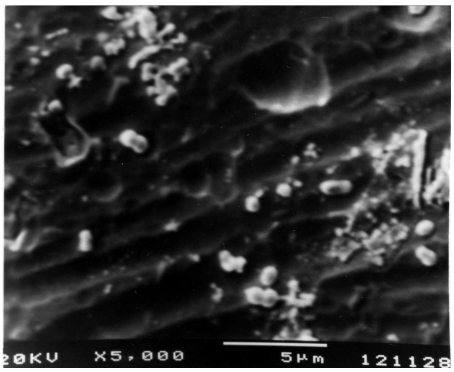
6 horas



24 horas



48 horas



72 horas

Figura 10 – Micrografia de superfície do Ti6Al4V após incubação em caldo Mueller Hinton inoculado com *S. epidermidis* e após banho ultrassônico. Observou-se cocos isolados e agrupados em camadas envoltas em massa amorfa. (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

5.3.3 MEV da aderência inicial e formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre superfície lisa do aço inoxidável.

Os resultados de aderência e formação de biofilme de *S.aureus* sobre superfície lisa de aço inoxidável em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 10.

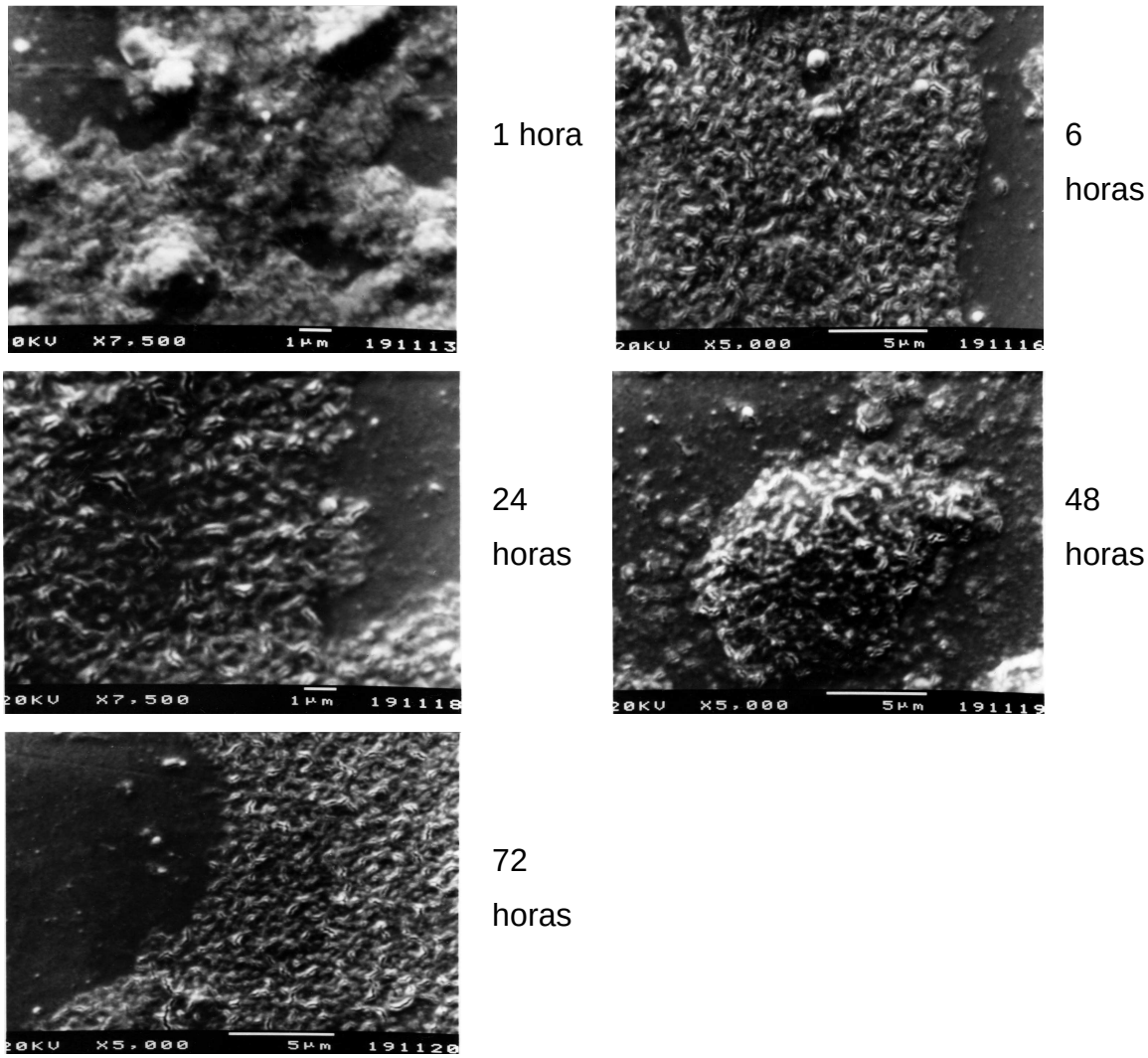
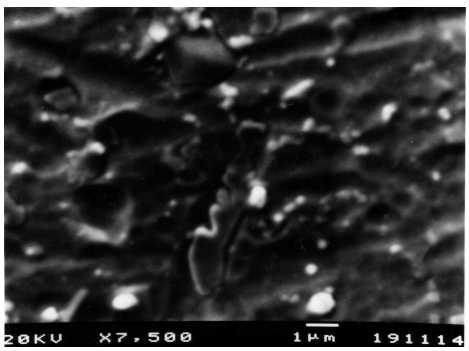


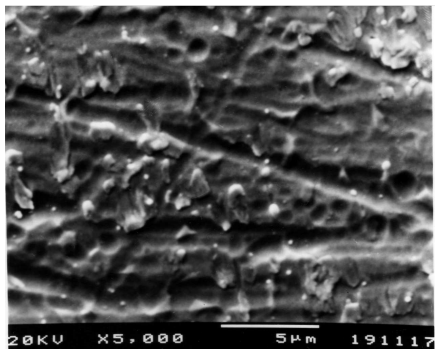
Figura 11 – Micrografia de superfície do aço inoxidável após incubação em Mueller Hinton inoculado com *S. aureus* e submetido ao banho ultrassônico. Observou-se a presença de cocos aderidos e acúmulo de bactérias formando biofilme. (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

5.3.4 MEV da aderência inicial e formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre superfície de Ti-6Al-4V.

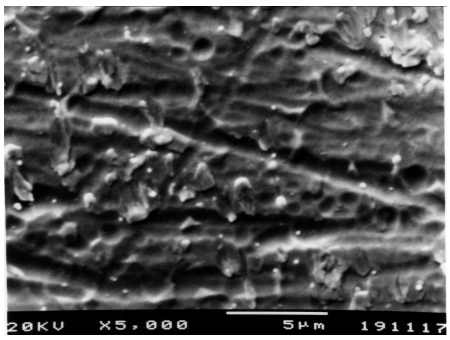
Os resultados de aderência e formação de biofilme de *S.aureus* sobre superfície lisa de liga de titânio em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na figura 11.



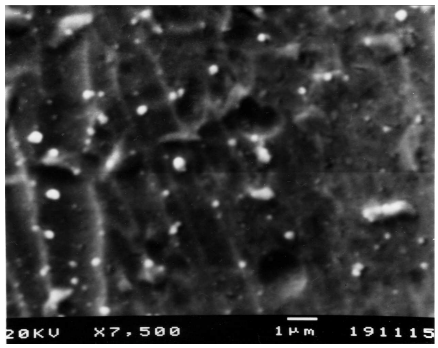
1 hora



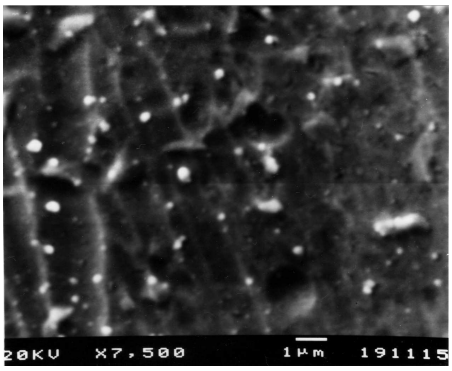
6 horas



24 horas



48 horas



72 horas

Figura 12 – Micrografia de superfície da liga de titânio após incubação em Mueller Hinton inoculado com *S. aureus* e submetidos ao banho ultrassônico. Observou-se cocos isolados aderidos a superfície metálica. (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

5.3.5 Resultados da distribuição da aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de *S. epidermidis* na superfície de Ti-6AL-4V.

Os resultados da distribuição da aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de *S. epidermidis* na superfície lisa de liga de titânio, em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição da aderência do *S. epidermidis* em diferentes intervalos de tempo sobre superfície de liga de titânio (Ti6Al4V)

Período de incubação (horas)	Aderência à superfície de liga de titânio
1	positivo
6	positivo
24	positivo
48	positivo
72	positivo

Legenda: positivo = houve aderência.

5.3.6 Da quantificação de células viáveis de *Staphylococcus epidermidis* recuperadas da superfície de Ti-6Al-4V.

As quantificações das células viáveis recuperadas da superfície de liga de titânio estão apresentadas na tabela 6 e figura 13.

Tabela 6 – Distribuição da quantificação das células viáveis de *S. epidermidis* recuperadas dos discos de liga de titânio após banho ultrassônico (valores expressos em UFC/mL)

Período de incubação (horas)	Contagem de células viáveis (UFC/mL)
1	$7,20 \times 10^4$
6	$3,90 \times 10^6$
24	$3,80 \times 10^6$
48	$9,70 \times 10^6$
72	$1,00 \times 10^7$

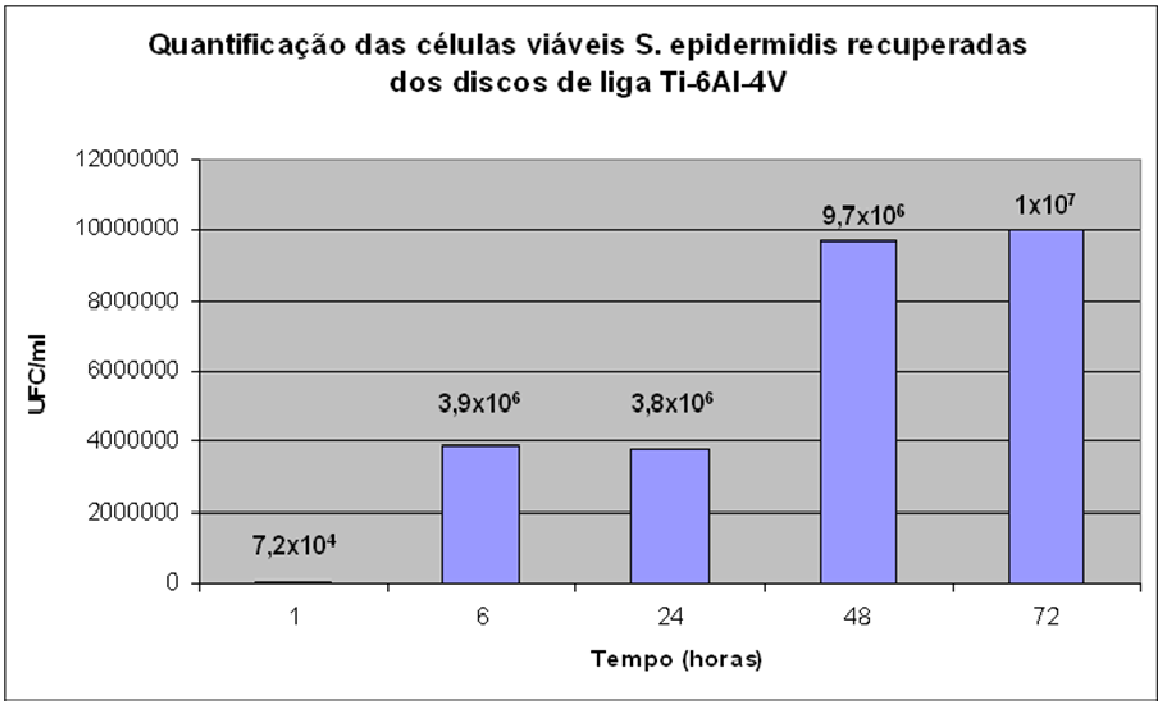


Figura 13 – Representação da contagem de células viáveis de *Staphylococcus epidermidis* sobre liga de titânio-alumínio vanádio.

5.3.7 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície da liga de titânio incubado com *S. epidermidis*.

Em média a contagem de células viáveis de *S. epidermidis* foi de $5{,}49 \pm 4{,}27 \times 10^6$, nos intervalos de tempo (1, 6, 24, 48 e 72h).

5.3.8 Da quantificação de células viáveis de *Staphylococcus epidermidis* recuperadas da superfície do aço inoxidável.

As quantificações das células viáveis recuperadas da superfície de aço inoxidável estão apresentadas na tabela 7 e na figura 14.

Tabela 7 – Distribuição da quantificação das células viáveis de *S. epidermidis* recuperadas dos discos de aço inoxidável após banho ultrassônico (valores expressos em UFC/mL)

Período de incubação (horas)	Contagem de células viáveis (UFC/mL)
1	$3{,}00 \times 10^3$
6	$2{,}90 \times 10^6$
24	$3{,}20 \times 10^6$
48	$1{,}41 \times 10^7$
72	$1{,}88 \times 10^7$

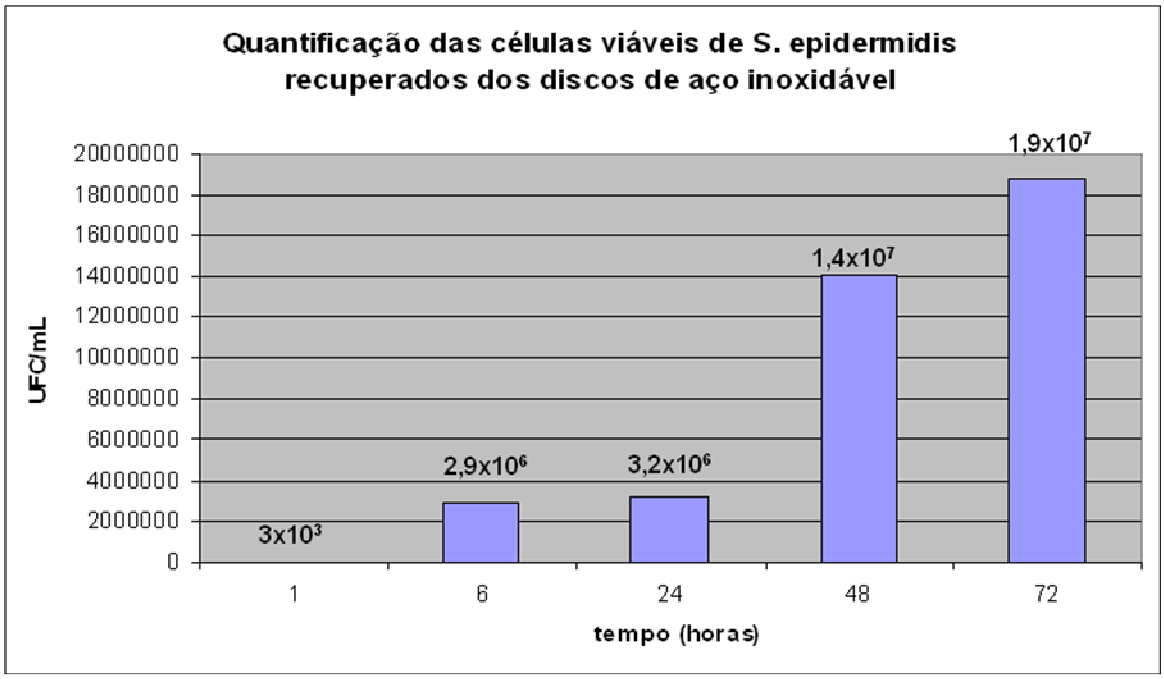


Figura 14 – Representação da contagem de células viáveis de *Staphylococcus epidermidis* sobre aço inoxidável.

5.3.9 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície lisa de aço inoxidável incubado com *S. epidermidis*.

Em média a contagem de células viáveis de *S. epidermidis* foi de $7{,}80 \pm 8{,}16 \times 10^6$, nos intervalos de tempo (1, 6, 24, 48 e 72h).

5.3.10 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície lisa de liga de titânio e de aço inoxidável incubado com *S. epidermidis*.

One-way Anova: A nível 0,05 as médias são significantemente diferentes.

5.3.11 Resultados da distribuição da aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de *S. aureus* na superfície lisa de liga de titânio

Os resultados da distribuição da aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de *S. aureus* na superfície lisa de liga de titânio, em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Distribuição da aderência do *S. aureus* em diferentes intervalos de tempo sobre superfície de liga de titânio (Ti6Al4V)

Período de incubação (horas)	Aderência à superfície de liga de titânio
1	positivo
6	positivo
24	positivo
48	positivo
72	positivo

Legenda: positivo = houve aderência.

5.3.12 Da quantificação de células viáveis de *S. aureus* recuperadas da superfície de liga de titânio.

A quantificação das células viáveis recuperadas da superfície de liga de titânio estão apresentadas na tabela 9 e na figura 15.

Tabela 9 – Distribuição da quantificação das células viáveis de *S. aureus* recuperadas dos discos de liga de titânio após banho ultrassônico (valores expressos em UFC/mL)

Período de incubação (horas)	Contagem de células viáveis (UFC/mL)
1	$2,00 \times 10^3$
6	$1,00 \times 10^4$
24	$3,10 \times 10^4$
48	$4,30 \times 10^4$
72	$5,80 \times 10^3$

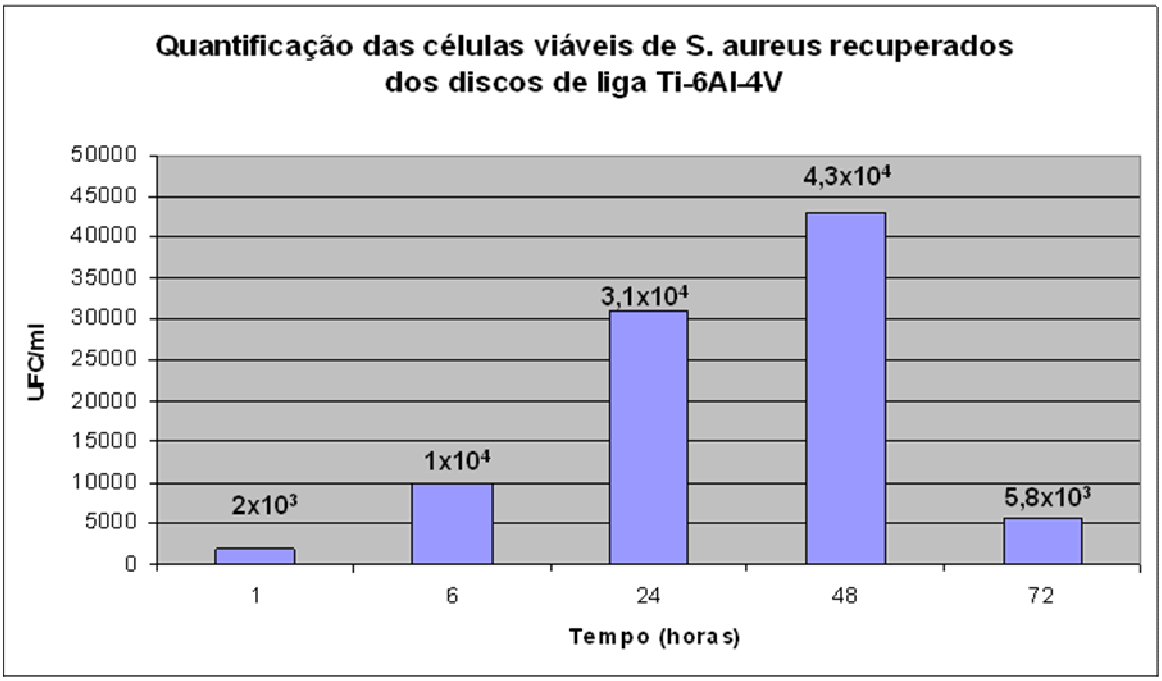


Figura 15 – Representação da contagem de células viáveis de *Staphylococcus aureus* sobre liga de titânio-alumínio vanádio.

5.3.13 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas da superfície de liga de titânio incubado com *S. aureus*.

Em média a contagem de células viáveis de *S. aureus* foi de $1{,}84 \pm 1{,}77 \times 10^4$ nos intervalos de tempo (1, 6, 24, 48 e 72h).

5.3.14 Da quantificação de células viáveis de *S. aureus* recuperadas da superfície do aço inoxidável.

A quantificação das células viáveis recuperadas da superfície de aço inoxidável está apresentada na tabela 10 e figura 16.

Tabela 10 – Distribuição da quantificação das células viáveis de *S. aureus* recuperadas dos discos de aço inoxidável após banho ultrassônico (valores expressos em UFC/mL)

Período de incubação (horas)	Contagem de células viáveis (UFC/mL)
1	$6,00 \times 10^3$
6	$2,00 \times 10^3$
24	$1,50 \times 10^4$
48	$3,20 \times 10^5$
72	$6,00 \times 10^3$

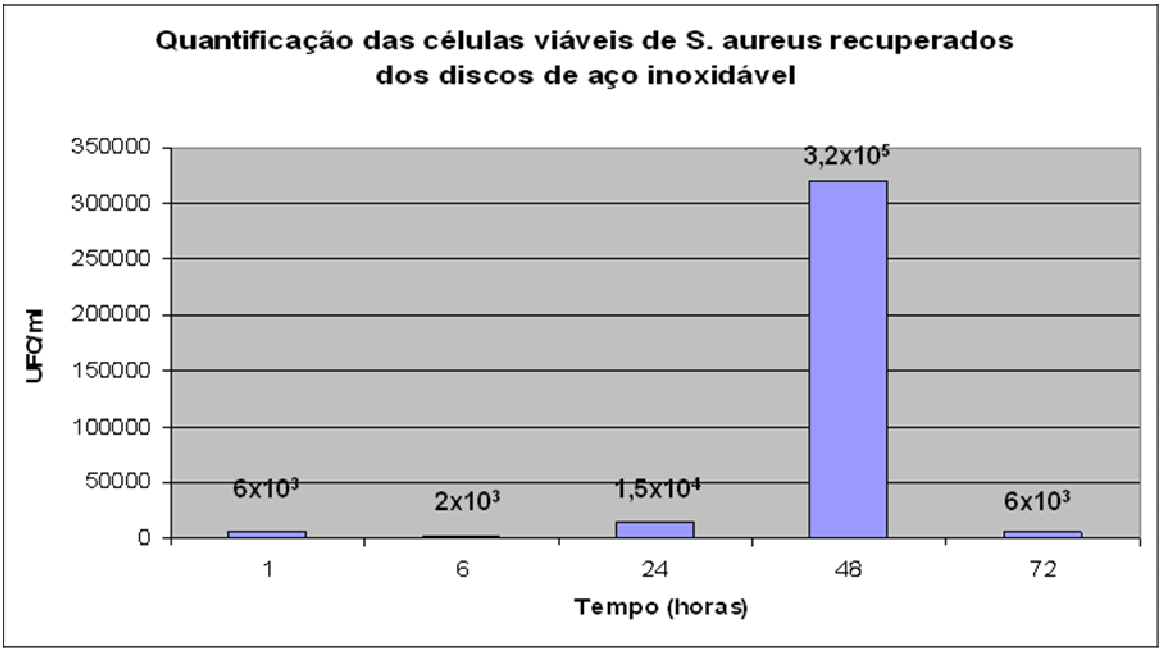


Figura 16 – Representação da contagem de células viáveis de *Staphylococcus aureus* sobre aço inoxidável.

5.3.15 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície de aço inoxidável incubado com *S. aureus*.

Em média a contagem de células viáveis de *S. aureus* foi de $6,98 \pm 13,99 \times 10^4$ nos intervalos de tempo (1, 6, 24, 48 e 72h).

5.3.16 Teste *t* aplicado para vários intervalos de tempo de contato de *S. aureus* com aço inoxidável.

A nível 0,05 as médias não são significantemente diferentes.

5.3.17 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície lisa de liga de titânio e de aço inoxidável incubado com *S. aureus*.

One-way Anova: A nível 0,05 as médias são significantemente diferentes.

5.3.18 Distribuição da média de células viáveis de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* recuperadas de superfície de aço inoxidável e de Ti-6Al-4V.

A distribuição das médias estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11 – Distribuição das médias de células viáveis recuperadas das superfícies metálicas dos biomateriais de uso ortopédico cirúrgico.

Biomaterial de uso ortopédico	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus epidermidis*
Aço inoxidável	$6,98 \pm 13,99 \times 10^4$	$7,80 \pm 8,16 \times 10^6$
Ti6 Al 4V	$1,84 \pm 1,77 \times 10^4$	$5,49 \pm 4,27 \times 10^6$

Staphylococcus aureus aderiu mais ao aço inoxidável do que à liga de titânio. Em nível de 0,05 as médias não têm diferença significativa quando aplicado o teste t para duas amostras pareadas.

Staphylococcus epidermidis aderiu mais ao aço inoxidável do que a liga de titânio. Em nível de 0,05 as médias não têm diferença significativa quando aplicado o teste t para duas amostras pareadas.

Os dados ora obtidos nas condições estudadas mostraram que as superfícies metálicas de aço inoxidável e da liga de titânio (Ti-6Al-4V) são suscetíveis a aderência de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* após o contato em meio aquoso e em diferentes intervalos de tempo.

As medidas do ângulo de contato baixas permitiram dizer que são superfícies hidrofílicas.

A análise estatística mostrou que *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, aderiram mais ao aço inoxidável do que a liga de titânio e em média as células viáveis recuperadas, em nível de 0,05 não têm diferença significativa quando aplicado o teste t para duas amostras pareadas.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram realizados *in vitro* testes bacteriológicos e físico-químicos para se conhecer a resistência de liga de titânio-alumínio-vanádio e aço inoxidável à adesão e conseqüente formação de biofilme de bactérias como *Staphylococcus aureus*, o mais significante patógeno na ortopedia, bem como *Staphylococcus epidermidis*.

A liga de titânio alumínio-vanádio e o aço inoxidável são freqüentemente usados como biomateriais na cirurgia ortopédica, devido à resistência à corrosão, boa biocompatiblidade e baixa toxicidade celular (ARENS, et al, 1996; ADACHI et al., 2007).

Existem alguns experimentos *in vivo* sobre a resistência à adesão bacteriana a vários biomateriais metálicos. Arens et al. (1996) usaram coelhos como modelo animal para estudar *in vivo* a suscetibilidade do titânio e aço inoxidável à infecção e relataram que a taxa de infecção para aço inoxidável foi significantemente mais alta do que para liga de titânio. Também, Sheenan et al. (2004) usaram o coelho como modelo de estudo e mostraram por inoculação direta que o biofilme aderiu muito mais ao aço inoxidável do que ao titânio.

No entanto, existem poucos estudos *in vitro* sobre a adesão bacteriana a biomateriais metálicos usados em cirurgia ortopédica, como aço inoxidável e titânio (ADACHI et al., 2007). Gracia et al. (1997) estudaram a aderência de *Staphylococcus aureus* aos biomateriais usados em cirurgia ortopédica, como polimetilmetcrilato (PMMA), osso, aço inoxidável e titânio, usando a técnica do ATP por bioluminescência. A menor aderência foi observada em PMMA e osso e a maior foi vista nos metais. Karlov et al. (2002) demonstraram em um estudo fotocolorimétrico *in vitro* que o grau de adesão de *Staphylococcus aureus* aos implantes diminuiu na seguinte ordem: discos de cerâmica banhados em fosfato de

cálcio, discos amorfos ao raio X banhados com fosfato de cálcio, discos não banhados em fosfato de cálcio e discos recobertos com cimento ósseo.

No presente estudo, os dados obtidos sobre a adesão de *Staphylococcus aureus* e formação de biofilme sobre aço inoxidável e liga de titânio mostraram que o aço inoxidável foi muito mais susceptível a adesão bacteriana e formação do biofilme do que a liga de titânio alumínio-vanádio. E, sobre a adesão de *Staphylococcus epidermidis* observou-se que aderiu muito mais ao aço inoxidável do que na liga de titânio alumínio-vanádio. Os dados obtidos sugerem que o aço inoxidável é muito mais suscetível à aderência bacteriana do que a liga de titânio alumínio-vanádio, apesar de que em nível de 0,05 as médias não têm diferença significativa quando aplicado o teste t para duas amostras pareadas (Tabela 11).

Os biomateriais metálicos estudados, o aço inoxidável e a liga de titânio são usados em cirurgias ortopédicas e esta pesquisa mostra a suscetibilidade destes materiais à adesão bacteriana. A contaminação de uma prótese médica ocorre com a inoculação de microrganismos oriundos da pele do paciente ou membrana mucosa durante a implantação, contudo, o patógeno, também, pode ser adquirido pelas mãos do cirurgião ou staff clínico (VON EIFF et al., 2005).

A habilidade da bactéria em aderir ao biomaterial de implante ortopédico é uma característica comum dos microrganismos que são patogênicos para implantes ortopédicos cirúrgicos (GRISTINA, NAYLOR e MYRVIK, 1991). A adesão da bactéria a superfície do biomaterial implantado é o primeiro passo para a infecção, como relatado por An e Friedman (1996). A infecção é iniciada por aderência da bactéria diretamente ao implante antes da cirurgia ou por aderência às proteínas do hospedeiro que banham a superfície do implante após a cirurgia (FOSTER e HOOK, 2000). A bactéria uma vez aderida começa a produzir uma substância extracelular

constituída de polissacarídeos, chamada de glicocálice ou *slime* (BRADY et al., 2008). A formação do biofilme sobre implante médico envolve quatro passos consecutivos (VAN LOOSDRECHT et al., 1990) começa com o transporte da bactéria infectante à superfície do implante; adesão inicial reversível, a seguir adesão irreversível por ancoramento devido à produção do polissacarídeo extracelular e crescimento. O crescimento bacteriano é o principal mecanismo de multiplicação, nesta seqüência, e leva á formação de biofilme espesso. A adesão inicial é de extrema importância, cria um elo entre a superfície do implante e o biofilme (BUSSCHER, BOS e VAN DER MEI, 1995; KOENER et al., 2002). Os biofilmes bacterianos são reconhecidos como a causa de infecção persistente (COSTERTON, STEWART e GREENBERG, 1999; PARSEK e SINGH, 2003; HALL-STOODLEY, COSTERTON e STOODLEY, 2004; LYNCH e ROBERTSON, 2008). A bactéria em biofilme é altamente resistente aos antibióticos e aos sistemas de defesa do hospedeiro, produzindo infecções persistentes e de difícil tratamento (BRADY et al., 2008, KWIECINSKI, SIGRUN e WOJCIK, 2009).

Após a implantação nos segundos iniciais a água, plasma, proteínas do tecido conectivo e íons dissolvidos banham a superfície do implante (KURELLA e DAHOTRE, 2005; VON EIFF et al., 2005). Após a deposição desta camada, as células alcançam a superfície e a camada adsorvida dita a forma de resposta celular. Com o passar do tempo, o tipo de células e suas atividades sobre a superfície mudam, resultando em integração tissular ou formação de cápsula fibrosa (LEMONS, 1996; KURELLA e DAHOTRE, 2005). Em analogia ao implante cirúrgico, a interação entre o tecido e a superfície do implante é um processo dinâmico.

No presente estudo os corpos-de-prova de aço inoxidável e liga Ti-6Al-4V foram incubados em meio líquido inoculado com bactéria e imediatamente as

superfícies entraram em contato com o fluido e foram banhados por uma película constituída por água, íons dissolvidos e proteínas constituintes do caldo Mueller-Hinton, esta película representa a camada condicionante, como divulgado por Schneider e Marshall (1994). Esta característica é consistente com Bruinsma et al. (2001), os quais relataram que a difusão da matéria orgânica é mais rápida do que a difusão da bactéria devido ao seu pequeno tamanho e, a bactéria vai aderir à camada adsorvida.

Em relação ao meio de cultura o caldo Mueller Hinton foi selecionado por ter composição relativamente simples, disponível no comércio, ser transparente e ter perfil catiônico definido: fósforo-3500,0ppm; ferro-6,0ppm; SiO_2-530,0ppm; potássio-8800,0ppm; sódio-7700,0ppm; magnésio-320,0ppm; cálcio-2,5ppm; cloretos-11200,0ppm; manganês-7,6ppm; chumbo-4,0ppm; arsênico-0,5ppm; cobre-10,0ppm; zinco-8,0ppm (Difco, 1984). Ainda o meio foi reidratado com água obtida em filtro MiLi-Q (Millipore) para evitar a introdução de traços de metais no meio de cultura (PIZZOLITTO, 1997).

Os testes bacteriológicos realizados no presente estudo mostram que houve adesão de *S. epidermidis* e *S. aureus* em 1 hora de contato com as superfícies de aço inoxidável e liga de titânio (Fig.1 e 2). O efeito do meio de cultura sobre a adesão bacteriana foi evidenciado quando as bactérias aderentes originaram células metabolicamente ativas capazes de produzir substância polimérica extracelular (*slime* ou glicocálice) mantendo as células aderidas ao substrato metálico e entre si. Este dado é consistente com Zhao et al. (2007) que estudaram o efeito do contato do meio de cultura *tryptic soy broth* (TSB) em 1 hora sobre a adesão de *S. epidermidis* e *S. aureus* sobre a superfície do aço inoxidável usando método estático e relataram que em meio de cultura a bactéria é capaz de produzir microrganismos

metabolicamente ativos e produzir polissacarídeo extracelular durante o crescimento, o qual fortalece as forças de ligação à superfície.

Ainda, no presente estudo, observou-se aumento gradual de células aderentes de *S. epidermidis* nos vários intervalos de tempo (1, 6, 24, 48 e 72h) e o pico máximo em 72 horas. Enquanto que, *S. aureus* aderiu em 1 hora, aumentou em 24 horas e o pico máximo de aderência foi em 48 horas de incubação. Estes dados mostram que o número de células aderentes de *S. epidermidis* é maior do que as células aderentes de *S. aureus*. Uma das razões pode ser devido as diferentes propriedades de virulência destas bactérias.

No presente estudo, os dados das medidas do ângulo de contato da água com aço inoxidável (58°) e com liga de titânio-alum ínio-vanádio (39°) foram baixas indicando que as superfícies lisas com polimento industrial são hidrofílicas (Tabelas 3 a 4). Contudo, a característica hidrofílica destas superfícies não impediu a adesão bacteriana, o que sugere que a característica físico-quimica da superfície do biomaterial não influenciou a adesão e formação de biofilme de *S. epidermidis* e *S. aureus*. Dados diferentes dos encontrados por Hogt et al. (1983) e Ludwicka et al. (1984) os quais relataram que materiais hidrofílicos são mais resistentes à adesão bacteriana do que os hidrofóbicos. Fletcher e Loeb (1979) investigaram a aderência de *Pseudomonas* spp. de origem marinha sobre várias superfícies e observaram que grande número da bactéria aderiram ao plástico hidrofóbico e, moderado número aderiu ao metal hidrofílico. Ainda que, An e Friedman (1998) relataram que as características hidrofóbicas e hidrofílicas da superfície de um biomaterial podem influir na aderência bacteriana, estas características podem ser rapidamente alteradas por adsorção de proteínas do soro e formação de biofilme. Rosenberg e Kjelleberg (1986) notificaram que o papel da hidrofobicidade como um parâmetro de

ligação não específico na adesão bacteriana é amplamente aceito. Everaert et al. (1997) notificaram que de um implante na laringe, de silicone, de superfície hidrofóbica foram obtidas menos células de biofilme do que do implante de superfície hidrofílica. Contudo, Zhao et al. (2007) relataram que na maioria dos casos a adesão bacteriana diminui sobre superfície lisa e com o aumento do ângulo de contato.

O presente estudo, mostra por micrografia eletrônica cocos agrupados, aderidos à superfície dos metais e entre si, formando o biofilme sobre a superfície dos biomateriais metálicos (Figs. 6 a 9) Os biofilmes associados com implantes médicos foram observados por Peters, Locci e Pulverer (1981) e Marrie, Nelligan e Costerton (1982) por microscópio eletrônico de varredura como bactérias depositadas sobre a superfície de cateteres intravenosos e marca-passo cardíaco.

Observou-se na presente pesquisa que *S. epidermidis* e *S. aureus* colonizaram as superfícies metálicas – aço inoxidável e liga de titânio alumínio-vanádio e formaram biofilme caracterizado por acúmulo das células bacterianas que cresceram e geraram agrupamentos de células bacterianas. Costerton (1995) relatou que bactérias comensais da pele humana como *S. epidermidis* podem causar infecções crônicas devastantes em hospedeiros comprometidos. Khoury et al. (1992) mostraram por meio de microscópio eletrônico de varredura, que a superfície de implantes médicos que foram focos de infecção relacionadas a próteses, a presença de grande número de bactérias embutidas em uma matriz de polissacarídeo extracelular (*slime*). De acordo com von Eiff et al. (2005) *S. epidermidis* e *S. aureus* são capazes de colonizar a superfície de um implante por formação de biofilme espesso e com camadas múltiplas.

De acordo com Akiyama, Torigoe e Arata (1993); Ziran (2007), Brady et al. (2008) *Staphylococcus* spp. podem produzir biofilme acumulado em multicamadas

embutido em glicálice ou camada de *slime*. O glicocálice desenvolve-se sobre osso e tecido desvitalizado ou sobre implantes cirúrgicos para produzir infecção. A presença do implante é um fator predisponente no desenvolvimento da infecção porque é banhado por proteínas do hospedeiro logo após a implantação e estas proteínas fornecem uma excelente fonte de aderência para qualquer bactéria introduzida ou remanescente após cirurgia de debridamento.

Os estudos bacteriológicos e por microscopia eletrônica de varredura realizados com o aço inoxidável e liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) evidenciaram que estes biomateriais não são resistentes à aderência e formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, nas condições estudadas. Como relatado por Darouiche (2001) a sensibilidade do biomaterial à aderência bacteriana pode ser um dos fatores de risco para infecção associada às próteses ortopédicas cirúrgicas, porque a infecção resulta da interação da bactéria, implante e hospedeiro. Destes três fatores, o fator bacteriano é o mais importante na patogênese da infecção relacionada ao implante, enquanto os fatores do implante são menos preocupantes porque podem ser modificados com o objetivo de prevenir a infecção.

Costerton et al. (2004) relataram que milhões de implantes médicos são usados a cada ano e apesar dos muitos avanços em biomateriais ainda tornam-se colonizados por bactéria. Os implantes médicos podem ser colonizados no momento da cirurgia ou via hematogênica. O fator mais significante no desenvolvimento da infecção relacionada ao implante mostra que a prótese de quadril torna-se infectada em menos do que 0,2% dos casos em clínicas especializadas e 4% dos casos em outros centros de saúde. Geralmente os implantes médicos grandes e complexos que requerem cirurgias longas e complicadas para sua implantação correm o risco

da infecção bacteriana. A infecção relacionada ao implante pode ocorrer quase que imediatamente após a cirurgia ou pode ter um desenvolvimento muito lento com sintomas aparecendo meses ou mesmo anos após a implantação. A maioria, se não todas as características da infecção relacionada a implante pode ser explicada baseada nas características dos biofilmes (COSTERTON, STEWART e GREENBERG, 1999).

Costerton, Geesey e Cheng (1978) e Costerton et al. (1987) o conceito de biofilme foi desenvolvido na microbiologia de meio ambiente e notificam que a bactéria cresce preferencialmente em comunidades embutidas em uma matriz e aderidas a uma superfície. Quando o implante médico torna-se colonizado o biofilme inicia mudanças no tecido circunvizinho, mas os sintomas são de desenvolvimento lento. Os sintomas e outros indicadores de infecção como a contagem de leucócitos não correlaciona ‘a infecção com implante.

Costerton et al. (2004) a natureza assintomática e o lento desenvolvimento de muitas infecções relacionadas ao implante podem ser explicados pela observação de que a bactéria em biofilme produz poucas toxinas produz pouca resposta inflamatória. Em culturas de rotina as infecções relacionadas ao implante são negativas porque o biofilme libera somente um número limitado de células planctônicas, grande fragmentos de biofilme crescem como colônias únicas em placas de ágar e as células sésseis não crescem bem na superfície do ágar. A exacerbação da infecção relacionada ao implante é causada pela liberação de células planctônicas. Os antibióticos podem matar estas células livres e reverter os sintomas para infecção aguda, mas a infecção persiste porque o agente causador do biofilme é resistente aos antibióticos. O bom tratamento médico geralmente preconiza a remoção do implante colonizado ou infectado.

Darouiche (2007) notificou que a infecção é a mais séria complicação dos implantes cirúrgicos. Essas infecções são geralmente de difícil cura, tratamento caro e não existem estratégias ótimas para prevenir a infecção. Os antimicrobianos podem prevenir a infecção associada ao implante impedindo a aderência bacteriana à superfície do implante e ou reduzindo a concentração da bactéria na vizinhança do implante. As estratégias potencialmente protetoras incluem antibiótico sistêmico peri cirúrgico e profilaxia antimicrobiana local (usando antibióticos ou anti-sépticos). As duas causas mais comuns de infecção associada com implantes cirúrgicos são *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativa e ambos originários da pele dos pacientes, mãos da equipe de cirurgiões, equipamentos cirúrgicos ou sala de cirurgia. Os antibióticos administrados são geralmente escolhidos por sua forte atividade anti-estafilocócica.

7 CONCLUSÃO

Observações por microscópio eletrônico de varredura mostraram a aderência bacteriana (*S. epidermidis* e *S. aureus*) sobre as superfícies de aço inoxidável e liga de titânio (Ti-6Al-4V).

Em média a contagem de células viáveis de *S. epidermidis* aderentes ao aço inoxidável foi de $7{,}80 \pm 8{,}16 \times 10^6$, comparando os intervalos de tempo (1, 6, 24, 48 e 72 horas). E o t-test mostrou que em nível 0,05 as médias não são significantemente diferentes.

Em média a contagem de células viáveis de *S. epidermidis* aderentes a liga de titânio foi de $5{,}49 \pm 4{,}27 \times 10^6$, comparando os intervalos de tempo (1, 6, 24, 48 e 72 horas). E o t-test mostrou que em nível 0,05 as médias não são significantemente diferentes.

Em média a contagem de células viáveis de *S. aureus* aderentes ao aço inoxidável foi de $6{,}98 \pm 13{,}99 \times 10^4$, comparando os intervalos de tempo (1, 6, 24, 48 e 72 horas). E o t-test mostrou que em nível 0,05 as médias não são significantemente diferentes.

Em média a contagem de células viáveis de *S. aureus* aderentes a liga de titânio foi de $1{,}84 \pm 1{,}77 \times 10^4$, para os intervalos de tempo (1, 6, 24, 48 e 72 horas). E o t-test mostrou que em nível 0,05 as médias não são significantemente diferentes.

As superfícies metálicas de aço inoxidável e da liga de titânio (Ti-6Al-4V) são suscetíveis a aderência de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* após o contato em meio aquoso e em diferentes intervalos de tempo.

As medidas de ângulos de contato sugerem que ambas as superfícies (aço inoxidável e Ti-6Al-4V) são hidrofílicas (média molhabilidade).

Com isso, conclui-se que, ambas as superfícies permitiram a aderência dos microrganismos analisados nos cinco intervalos de tempo observados. O ângulo de contato das superfícies caracterizou-as como hidrofílicas de média molhabilidade.

Ambos os microrganismos foram capazes de produzir biofilme sobre as superfícies metálicas utilizadas neste estudo.

O grau de molhabilidade das superfícies interfere na aderência de microrganismos, pois, quanto mais hidrofóbica é a superfície maior é a chance do microrganismo aderir a ela.

Alguns estudos precisam ser feitos para avaliar o grau de suscetibilidade destas superfícies à aderência de microrganismos e por meio de modificação de superfície (com adição de antimicrobianos ou irradiação a laser, por exemplo) impedir ou diminuir os casos de remoção de implantes ortopédicos causados pela infecção destes dispositivos e, assim, diminuir custos aos sistemas de saúde público e privado.

REFERÊNCIAS

(De acordo com a ABNT. NBR 6023.)

ADACHI, K. et al. New quantitative image analysis of staphylococcal biofilms on the surfaces of nontranslucent metallic biomaterials. **Journal of Orthopaedic Science**, v.12, p. 178-184, 2007.

AKIYAMA, H.; TORIGOE, R.; ARATA, J. Interaction of *Staphylococcus aureus* cells and silk threads in vitro and in mouse skin. **Journal of Dermatological Science.**, v. 6, p. 247-257, 1993.

AMORENA, B. et al. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 43-45, 1999.

AN, Y. H.; FRIEDMAN, J. R. Prevention of infection in total joint arthroplasty. **Journal of Hospital Infection**, v. 33, p. 93-108, 1996.

_____. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. **Journal of Microbiological Methods**, v. 30, p. 141-152, 1997.

_____**.** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials,** v. 43, p. 338-348, 1998**.**

ANTOCI JR, V. et al. The inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection. **Biomaterials**, v. 29, n. 35, p. 4684-4690, dec. 2008.

ARCIOLA, C. R. et al. Ocurrence of ica genes for slime synthesis in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from orthopedic prosthesis infections. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 74, p. 617-621, 2003.

ARCIOLA, C. R. et al. Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. **Biomaterials**, v. 26, p. 6530–6535, 2005.

ARENS, S. et al. Influence of materials for fixation implants on local infections: an experimental study of steel versus titanium DCP in rabbits. **Journal of Bone and Joint Surgery British**, v. 78, p. 647-651, 1996.

BARBERÁN, J.; BOUZA, E.; AGUADO, J. M. Diagnóstico tratamiento y prevención en prótesis articulares. **Revista Española de Quimioterapia.**, v. 16, p. 467-478, 2003.

BARBERÁN, J. Management of infections of osteoarticular prosthesis. **Clinical Microbiology and infection**, v. 12, suplemento 3, p. 93-101, 2006.

BARTH, E. et al. In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. **Biomaterials**, v. 10, p. 325-328, 1989.

BECK, A.; KINZIL, L.; BISCHOFF, M. Antibiotic prophylaxis and therapy in trauma surgery. **Unfallchirurg**, v. 102, p. 955-966, 1999.

BEECH, I. B. et al. The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 23, p. 231-247, 2002 .

BERNARDI, A. C. A. **Estudo de amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa quanto a formação de biofilme.** 2005. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

BOYAN, B. D. et al. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials,** Guildford, v. 17, p. 137-146. 1996.

BOS, R.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 179-230, 1999.

BRADY, R. A. et al. Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 3415-3426, 2006.

BRADY, R. A. et al. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. **FEMS Immunology Medical Microbiol.**, v. 52, p. 13-22, 2008.

BRUINSMA, G.M. et al. Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion pf Pseudomonas aeruginosa. **Journal Microbiology Methods**, v. 45, p. 95-101, 2001.

BRUINSMA, G.M.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. **Biomaterials**, Guildford, v. 22, p. 3217-3224, 2001.

BUSSCHER, H. J.; BOS, R.; VAN DER MEI, H. C. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 229-234, 1995.

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

CAREK, P. J.; DICKERSON, L. M.; SACK, J. L. Diagnosis and management of osteomyelitis. **American Family Physician**, v. 63, p. 2413-2420, 2001.

COSTERTON, B. et al. Biofilms, biomaterials, and device-related infections. In: RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. [eds] Biomaterials Science, An introduction to Materials in Medicine. **Elsevier Academic Press**, San Diego, p. 345-354, 2004.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, p. 86-95, 1978.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review Microbiology**, v. 41, p. 435-464, 1987.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

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

COSTERTON, J. W. et al.The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 10, p. 1466-1477, 2003.

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

DAGA, B.; RIVERA, G.; BOERI, R. Review of the regulations for the use of stainless steel for orthopedic implants in implants in Argentina. **Journal of Physics**, v. 90, p. 1-6, 2007.

DAROUICHE, R. O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1567-1572, 2001.

_____. Treatment of infections associated with surgical implants. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 1422-1429, 2004.

DAROUICHE, R. O. Preventing infection in surgical implants. **US. Surgery**, p. 40-44, 2007.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiologic process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1387-1392, 2001.

_____. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

EHRLICH, G. D. et al. Engineering approaches for the detection and control of orthopaedic biofilm infections. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 437, p. 59-66, 2006.

EVERAERT, E. P. et al. A new method for in vivo evaluation of biofilms on surface-modified silicone rubber voice prostheses. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 254, p. 261-263, 1997.

FLETCHER, M.; LOEB, G. I. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. **Applied & Environmental Microbiology**, v. 37, p. 67-72, 1979.

FOSTER; T..J.; HOOK, M. Molecular basis of adherence of *Staphylococcus aureus* to biomaterials. In: WALDVOGEL, F.A.; BISNO, A. L. editors. **Infections associated with indwelling medical devices**. Washington DC: American Society for Microbiology; 2000. p. 27-39.

GRACIA, E. et al. Adherence of *Staphylococcus aureus* slime producing strain variants to biomaterials used in orthopaedic surgery. **Int. Orthop.**, v. 21, p. 46-51, 1997.

GRISTINA, A. G. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. **Science**, v. 237, p. 1588-1595, 1987.

_____. Implant failure and the immune-incompetent fibro inflammatory zone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 298, p. 106-118, 1994.

GRISTINA, A. G.; NAYLOR, P.T.; MYRVIK, Q. N. Mechanisms of musculoskeletal sepsis. **The Orthopedic Clinical of North America**, v. 22, p. 363-371, 1991.

GÜNTHER, F. et al. Host defense against Staphylococcus aureus biofilms infection: phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear neutrophils (PMN). **Molecular Immunology**, 2009. doi: 10.1016/j.molimm.2009.01.020.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HANSSEN, A. D.; RAND, J. A. Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty. **The Journal Bone Joint Surgery**, v. 80, p. 910-922, 1998.

HOGT, A. H. et al. Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. **Journal of General Microbiology**, v.129, p. 1959-1968, 1983.

HUDSON, M. C.; RAMP, W. K.; FRANKENBURG, K. P. *Staphylococcus aureus* adhesion to bone matrix and bone-associated biomarterials. **FEMS Microbiology Letters**. V. 173, p. 279-284, 1999.

JAIN, A.; AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, p. 88-92, 2009.

KARLOV, A. V. et al. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to implants with different physicochemical characteristics. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 3, 277-280, 2002.

KATSIKOGIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria material interactions. **European Cells and Materials**, v. 8, p. 37-57, 2004.

KATTI, K. Biomaterials in total joint replacement. **Colloids and Surfaces B**, v. 39, p. 133-142, 2004.

KHOURY, A. E. et al. Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. **American Society for Artificial Internal Organs Journal**, v. 38, p. 174-178, 1992.

KOERNER, R. J. et al. Bacterial adhesion to titanium-oxy-nitride (TiNOX) coatings with different resistivities: a novel approach for the development of biomaterials. **Biomaterials**, v. 23, p. 2835-2840, 2002.

KOURBATOVA, E. V. et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as a cause of health care-associated infections among patients with prosthetic joint infections. **American Journal of Infection Control**, v. 33, n. 7, p. 385-391, 2005.

KURELLA, A.; DAHOTRE, N. Surface modification for bioimplants: the role of laser surface engineering. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 20, p. 5-50, 2005.

KWIECINSKI, S. E.; SIGRUN, E.; WOJCIK, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 4, p. 343-347, 2009.

LEMONS, J. E. Ceramics: Past, Present and Future. **Bone**, v. 19, p. 121-128, 1996.

LENNOX, J. [ed.]: Biofilms On-line.com; **The Biofilms Institute**, Bozeman, Montana State University, 2005.

LENTINO, J. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 1157-1161, 2003.

LI, D. Q.; LUNDBERG, F.; LJUNGH, Å. Binding of von Willebrand factor by coagulase-negative staphylococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 217-225, 2000.

LOWY, E.D.; HAMMER, S. M. Staphylococcus epidermidis infections. **Annals of Internal Medicine**, v. 99, p. 834-839, 1983.

LUCKE, M. et al. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. **Bone**, v.32, p. 521-531, 2003.

LUDWICKA, A.; et al. Microbial colonization os prosthetic devices v. attachment of coagulase-negative staphylococci and “slime”-production on chemically pure synthetic polymers. **Zbl. Bakt. Hyg. B.**, v. 177, p. 527-532, 1983.

LUDWICKA, A. et al. Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. **Zbl. Bakt. Hyg.**, v. 256, p. 479-489, 1984.

LYNCH; S. A.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 415-428, 2008.

MARRIE, T. J.; NELLIGAN, J.; COSTERTON, J. W. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial lead. **Circulation**, v. 66, p. 1339-1341, 1982.

MCKENNEY, D. et al. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on *in vivo*-expressed antigen. **Science**, v. 284, p. 1523-1527, 1999.

MERCURI, L. G. Microbial biofilms: a potential source for alloplastic device failure. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, p. 1303-1309, 2006.

MIYANO, N.; OIE, S.; KAMIYA, A. Efficacy of disinfectantes and hot water against biofilm cells of Burkolderia cepacia. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.26, p.671-674, 2003.

MONTVILLE, R.; SCHAFFNER, D.W. Inoculum size influenzes bacterial cross contamination between surfaces. **Applied and Envrionmental Microbiology**, v.69, p.7188-7193, 2003.

MONZÓN, M. et al. Evaluation of four experimental osteomyelitis infection models by using precolonized implants and bacterial suspensions. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 73, p. 11-19, 2002.

O´GARA, J. P.; HUMPREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 582-587, 2001.

PARSEK; M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 677-701, 2003.

PETERS, G.; LOCCI, R.; PULVERES, G. Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.**, v. 173, p. 293-299, 1981.

_____. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci surfaces of intravenous catheters. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 42, p. 479-482, 1982.

PHELAN, D. M. et al. Delayed reimplantation arthroplasty for candidal prosthetic joint infection. A report of four cases and review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 930-938, 2002.

PIZZOLITTO, E.L. **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 *Streptoccus mutans* e**

***Streptococcus sobrinus*.** 1997. Tese (Doutorado) – Instituto de Quimica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C.; POZETTI, G. L. Chemical and Microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminium tubes both unlined and lined with expoxi resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p. 340-344, 2001.

POPAT, K. C. et al. Decreased *Staphylococcus epidermidis* adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. **Biomaterials**, v. 28, p. 4880-4888, 2007.

ROHDE, H. et al. Polysaccharide intercellular ashesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials,** v. 28, p. 1711-1720, 2007.

ROSEMBERG, M.; KJELLEBERG, S. Hydrophobic interactions: role on bacterial adhesion. **Microbial Ecology**, v. 9, p. 353-393, 1986.

SABATINI, D. D.; BENSCH, K.; BARRNETT, R. J. Cytochemitry and electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v.17, p.19-58, 1963.

SAGINUR, R. et al. Multiple combination bactericidal testing of Staphylococcal biofilms from implant associated infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 55-61, 2006.

SANDERSON, P. J. Preventing infection in orthopaedic implants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 24, p. 277-280, 1989.

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

SCHINERHOLZ, J. M.; BEUTH, J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. **The Journal of Hospital Infection**, v. 49, n. 2, p. 87-93, 2001.

SCHNEIDER, R. P.; MARSHALL, K. C. Retention of the Gram-negative marine bacterium SW8 on surfaces effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, v. 2, p. 387-396, 1994.

SHEEHAN, E. et al. An *in vitro* study of antibacterial silver coatings on orthopaedic implants. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 85-B, p. 3-b, 2003.

SHEEHAN, E. et al. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to orthopaedic metals, an *in vivo* study. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, p. 39-43, 2004.

SHENG, X.; TING, Y. P.; PEHKONEN, S. O. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. **Journal of Colloid and Interfaces Science**, v. 321, p. 256-264, 2008.

TAYLOR, G. J.; BANNISTER, G. C.; CALDER, S. Perioperative wound infection in elective orthopaedic surgery. **Journal of Hospital Infection**, v. 16, p. 241-247, 1990.

TORTORA, G.J; FUNKE, S.; RAMALHO, L.T.O. Microbiologia. **ArtMed**, ed. 8, p. 827, 2000.

TRAMPUZ, A. et al. Advances in the laboratory diagnosis of joint infection. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 14, p. 1-14, 2003.

VAN DER BORDEN, A. et al. Prevention of pin tract infection in external stainless fixator frames using eletric current in a goat model. **Biomaterials,** v. 28, p. 2122-221126, 2007.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M. et al. Influences of interfaces on microbial activity. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 75-87, 1990.

VILA, J.; SORIANO, A.; MENSA, J. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales prostésicos. Papel de lãs biocapas em las infecciones asociadas a los materiales protésicos.**Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica**, v. 26, p. 48-55, 2008.

VIDELA, H. A. et al. Biocidal activity of dissolved ozone on sessile and planktonic bacteria: effects on the corrosion behavior of cooling water systems structural materials. **Nace International**, 1995, p. 62/1-62/12.

VOGLER. E. A. Structure and reactivity of water at biomaterials surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 74, p. 60-117, 1998.

VON EIFF, C. et al. Modern strategies in the prevention of implant-associated infections. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 28, p. 1146-1156, 2005.

WASSALL, M. A. et al. Adhesion of bacteria to stainless steel and silver-coated orthopedic external fixation pins. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 36, p. 325-330, 1997.

WILDE, A. H. Management of infected knee and hip prostheses. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 5, p. 317-321, 1993.

ZHAO, Q. et al. Bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. **Applied Surface Science**, v. 256, p. 8674-8681, 2007.

_____. Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. **Medical Engineering & Physics**, v. 30, p. 341-349, 2008.

ZIMMERLI, W.; OCHSNER, P. E. Management of infection associated with prosthetic joints. **Infection**, v. 31, p. 99-108, 2003.

ZIRAN, B. H. Osteomielitis. **The Journal of Trauma,** v. 62, p. S59-S60.