

Liliana do Carmo Santos Grenho

**ESTUDO DA ADESÃO BACTERIANA A BIOMATERIAIS
NANOFÁSICOS**

Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2010

Liliana do Carmo Santos Grenho

**ESTUDO DA ADESÃO BACTERIANA A BIOMATERIAIS
NANOFÁSICOS**

Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2010

Liliana do Carmo Santos Grenho

**ESTUDO DA ADESÃO BACTERIANA A BIOMATERIAIS
NANOFÁSICOS**

Assinatura:

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Clínica sob a orientação da Professora Doutora Maria Pia Ferraz da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa e do Professor Doutor Fernando Jorge Monteiro da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

SUMÁRIO

A adesão bacteriana inicial à superfície de um biomaterial é uma etapa importante na patogénese das infecções protéticas que pode conduzir à formação do biofilme. As bactérias organizadas em biofilme são mais resistentes aos antibióticos e encontram-se menos acessíveis ao sistema imunitário do hospedeiro. Infelizmente, a falta de tratamentos adequados deixa, frequentemente, a extracção do dispositivo contaminado como a única opção viável para a eliminação do biofilme. A nanohidroxiapatite (nanoHA) é um fosfato de cálcio que tem sido estudada para o uso na regeneração óssea devido às suas similaridades com os tecidos duros do corpo.

Este trabalho teve como objectivo a avaliação da adesão inicial de estirpes bacterianas clinicamente importantes, pertencentes às espécies *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, a materiais de nanoHA sinterizados a 725°C e 1000°C. Para além da análise da contribuição do fenótipo bacteriano e da origem da estirpe para o processo de adesão, foi igualmente avaliada as repercussões que o tratamento térmico aplicado aos materiais teve na hidrofobicidade e rugosidade da superfície dos mesmos e, conseqüentemente, nos perfis de adesão bacteriana. Materiais de microhidroxiapatite (microHA) sujeitos aos mesmos tratamentos térmicos foram utilizados como material controlo. A adesão bacteriana inicial foi avaliada aos 30, 60 e 90 minutos de contacto após os quais as células aderidas foram observadas no microscópio electrónico de varrimento e libertadas do material por sonicação para quantificação por contagem das unidades formadoras de colónias. A hidrofobicidade e a rugosidade da superfície dos materiais foram determinadas através da medição do ângulo de contacto, utilizando a técnica da gota séssil, e por microscopia de força atómica, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstraram que a nanoHA sinterizada a 1000°C foi menos susceptível de adesão bacteriana comparativamente com nanoHA 725. Em relação ao fenótipo e origem bacteriana, as estirpes isoladas de infecções ósseas mostraram-se mais aptas para aderir apresentando maiores valores de adesão bem como maior capacidade de produção de *slime*. Quanto se procedeu à análise das propriedades da superfície dos materiais, verificou-se que o aumento da temperatura de sinterização resultou num aumento da hidrofobicidade e da rugosidade. Adesão bacteriana foi maior nos materiais mais hidrofílicos e não foi possível estabelecer uma relação entre a adesão e a rugosidade média da superfície analisada.

ABSTRACT

Initial bacterial adhesion to biomaterial surfaces is a crucial step in the pathogenesis of prosthetic infection that can lead to biofilm formation, which enhanced resistance of bacteria against host defense mechanisms and antibiotic treatments. Unfortunately, the lack of a suitable treatment often leaves extraction of the contaminated device as the only viable option for eliminating the biofilm. Nanohydroxyapatite (nanoHA) is a calcium phosphate that has been studied aiming at being used as bone regeneration material due to its chemical similarities to the inorganic component of the body's hard tissues.

This work aimed at evaluating the initial adhesion of several strains namely *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*, to nanoHA heat-treated at 725°C and 1000°C. The influences of bacterial phenotype and origin on bacterial adhesion were evaluated, as well as the impact of the heat-treatment on material surface hydrophobicity and roughness and, consequently, on the bacterial adhesion profiles. MicroHA subjected to the same heat-treatment was used as control. The evaluation of initial bacterial adhesion was performed for 30, 60 and 90 minutes after which adhering cells were observed by scanning electron microscopy and released by gentle sonication to be quantified by colony forming units. Materials surfaces hydrophobicity and roughness were determined through contact angle measurements via sessile drop technique and atomic force microscopy, respectively.

According to the results, nanoHA heat-treated at 1000°C showed, for all studied strains, the lowest adhesion values. In relation to bacterial phenotype and origin, the strains isolated from orthopedic infections presented increased ability to adhere to the materials as well as better capacity to produce slime. Concerning substrata surface properties, it was found that increasing the sintering temperature resulted in increased hydrophobicity and roughness. The bacterial adhesion was greater in the more hydrophilic materials and no relationship was found between bacterial adhesion and roughness.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Maria Pia Ferraz pela oportunidade, apoio, orientação e disponibilidade demonstradas durante todo o desenvolvimento deste mestrado.

Também gostaria de agradecer ao meu co-orientador Professor Doutor Fernando Jorge Monteiro pela sua disponibilidade e apoios que foram determinantes para a realização deste trabalho de investigação.

Um agradecimento à Professora Doutora Conceição Manso pela ajuda na análise estatística dos resultados.

À Dra. Ana Paula Pacheco que sem hesitar colaborou para este projecto com três importantes e interessantes estirpes bacterianas, e pertinentes conselhos.

À empresa Fluidinova S.A. por gentilmente ter fornecido o pó de nanoHA.

Aos colegas de laboratório agradeço a amizade, o companheirismo e o bom ambiente de trabalho. Um agradecimento especial à Nilza por me ter ensinado a preparar os materiais.

Aos professores coordenadores do mestrado agradeço a simpatia e a disponibilidade demonstrada durante estes dois anos, bem como as condições que criaram para o desenvolvimento de projectos de investigação em microbiologia.

Gostaria de agradecer aos técnicos do CEBIMED, INEB e CEMUP pelo apoio, paciência e conhecimento transmitido, não podendo deixar de mencionar o nome do Ricardo Silva.

Por fim gostaria de agradecer à minha família e ao Miguel pelo apoio incondicional que, mesmo percebendo pouco do que andava a fazer, contribuíram para o sucesso deste trabalho.

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
NOMENCLATURA	vii
I. INTRODUÇÃO	1
1. Adesão bacteriana a materiais	1
1.1. Infecções associadas a dispositivos médicos	2
1.2. Problemática das infecções associadas a dispositivos médicos	2
1.3. Mecanismos de adesão bacteriana	4
1.3.1. Interações físico-químicas	4
1.3.2. Interações moleculares e celulares	5
1.3.2.1. Formação do biofilme	6
1.4. Factores que influenciam a adesão bacteriana	8
1.5. Microrganismos	12
1.5.1. <i>Staphylococcus</i> spp.	13
1.5.1.1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	14
1.5.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
1.5.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2. Biomateriais	19
2.1. Tecido ósseo	21
2.2. Biocerâmicos	23
2.2.1. Hidroxiapatite	27
3. Estudo da adesão bacteriana a biomateriais	29
3.1. Procedimento experimental	29
3.2. Métodos utilizados na caracterização dos materiais	30
3.3. Métodos utilizados no estudo e quantificação de bactérias aderidas	31
3.3.1. Contagem das unidades formadoras de colónias	33
3.3.2. Microscopia electrónica de varrimento	33
II. MATERIAIS E MÉTODOS	35
1. Materiais	35
1.1. Síntese	35
1.2. Sinterização	35

1.3.	Esterilização.....	35
2.	Caracterização dos materiais.....	36
2.1.	Medição do ângulo de contacto	36
2.2.	Determinação da rugosidade e topografia	36
3.	Microrganismos.....	37
3.1.	Estirpes bacterianas	37
3.2.	Condições de armazenamento e cultura	37
4.	Estudo da adesão bacteriana inicial.....	38
4.1.	Contagem das unidades formadoras de colónias	38
4.2.	Microscopia electrónica de varrimento	39
5.	Análise estatística dos dados.....	40
III.	RESULTADOS.....	41
1.	Caracterização dos materiais.....	41
1.1.	Medição do ângulo de contacto	41
1.2.	Determinação da rugosidade e topografia	41
2.	Estudo da adesão bacteriana	44
2.1.	Contagem das unidades formadoras de colónias.....	44
2.2.	Microscopia electrónica de varrimento.....	48
IV.	DISCUSSÃO.....	58
V.	CONCLUSÃO	63
VI.	BIBLIOGRAFIA	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Factores que influenciam a adesão bacteriana (Katsikogianni <i>et al.</i> , 2004; An <i>et al.</i> , 1998)	8
Tabela 1.2. Classes de biomateriais sintéticos (Kawachi <i>et al.</i> , 2000; Ratner <i>et al.</i> , 2004)	20
Tabela 1.3. Classificação geral dos biocerâmicos (Kawachi <i>et al.</i> , 2000).....	26
Tabela 1.4. Técnicas utilizadas na caracterização dos materiais (Mateus <i>et al.</i> , 2008; Teixeira <i>et al.</i> , 2007; Weir <i>et al.</i> , 2008).....	30
Tabela 1.5. Métodos utilizados no estudo e quantificação de microrganismos aderidos a uma superfície (An <i>et al.</i> , 1997; Katsikogianni, <i>et al.</i> , 2004; Weir <i>et al.</i> , 2008)	31
Tabela 3.1. Ângulos de contacto (e respectivos desvios padrões) para os materiais de nanoHA e microHA sinterizados a 725°C e 1000°C.....	41
Tabela 3.2. Resultados de Ra para os materiais de nanoHA e microHA sinterizados a 725°C e 1000°C. Observações sobre áreas de 2×2 μm ² e 30×30 μm ²	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação esquemática da adesão bacteriana a um material ao longo do tempo. (Hetrick <i>et al.</i> , 2006).	4
Figura 1.2. Frequência dos principais patogênicos isolados de infecções ortopédicas associadas a dispositivos médicos (Campoccia <i>et al.</i> , 2006).	12
Figura 1.3. Representação esquemática dos constituintes da estrutura óssea. (International Osteoporosis Foundation 2009).	21
Figura 1.4. Representação esquemática da estrutura da hidroxiapatite (Vallet-Regí, 2001).	27
Figura 2.1. Definição da rugosidade média - Ra (Gadelmawla <i>et al.</i> , 2002).	36
Figura 3.1. Imagens de AFM da topografia da superfície dos materiais numa área de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$. a) nanoHA 725; b) nanoHA 1000; c) microHA 725; d) microHA 1000.	42
Figura 3.2. Imagens de AFM da topografia da superfície dos materiais numa área de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$. e) nanoHA 725; f) nanoHA 1000; g) microHA 725; h) microHA 1000. ...	43
Figura 3.3. Número de bactérias aderidas por mm^2 aos discos de nanoHA 725, nanoHA 1000, microHA 725 e microHA 1000 após 30, 60 e 90 minutos de contacto. A- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e B- <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (UFP).	44
Figura 3.4. Número de bactérias aderidas por mm^2 aos discos de nanoHA 725, nanoHA 1000, microHA 725 e microHA 1000 após 30, 60 e 90 minutos de contacto. C- <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (ORT) e D- <i>Staphylococcus aureus</i> MSSA (ORT).	45
Figura 3.5. Número de bactérias aderidas por mm^2 aos discos de nanoHA 725, nanoHA 1000, microHA 725 e microHA 1000 após 30, 60 e 90 minutos de contacto. E- <i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A e F- <i>Staphylococcus epidermidis</i> (UFP).	46
Figura 3.6. Número de bactérias aderidas por mm^2 aos discos de nanoHA 725, nanoHA 1000, microHA 725 e microHA 1000 após 30, 60 e 90 minutos de contacto. G- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ORT).	47

Figura 3.7. Imagens de SEM da adesão de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 aos discos de microHA. (a) microHA 725 aos 90 minutos de contacto e (b) microHA 1000 aos 30 minutos de contacto.	48
Figura 3.8. Imagens de SEM da adesão de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 aos discos de nanoHA 725 aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) minutos de contacto e aos discos de nanoHA 1000 aos 30 (d), 60 (e) e 90 (f) minutos de contacto.	49
Figura 3.9. Imagens de SEM da adesão de <i>S. aureus</i> MRSA (ORT) aos discos de microHA. (a) microHA 725 aos 30 minutos de contacto e (b) microHA 1000 aos 30 minutos de contacto.	50
Figura 3.10. Imagens de SEM da adesão de <i>S. aureus</i> MSSA (ORT) aos discos de microHA. (a) microHA 725 aos 30 minutos de contacto e (b) microHA 1000 aos 30 minutos de contacto.	50
Figura 3.11. Imagens de SEM da adesão de <i>S. aureus</i> MRSA (ORT) aos discos de nanoHA 725 aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) minutos de contacto, e aos discos de nanoHA 1000 aos 30 (d), 60 (e) e 90 (f) minutos de contacto.	51
Figura 3.12. Imagens de SEM da adesão de <i>S. aureus</i> MSSA (ORT) aos discos de nanoHA 725 aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) minutos de contacto e aos discos de nanoHA 1000 aos 30 (d), 60 (e) e 90 (f) minutos de contacto.	52
Figura 3.13. Imagens de SEM da adesão de <i>S. epidermidis</i> RP62A aos discos de microHA. (a) microHA 725 aos 60 minutos de contacto e (b) microHA 1000 aos 90 minutos de contacto.	53
Figura 3.14. Imagens de SEM da adesão de <i>S. epidermidis</i> (UFP) aos discos de microHA. (a) microHA 725 aos 60 minutos de contacto e (b) microHA 1000 aos 60 minutos de contacto.	53
Figura 3.15. Imagens de SEM da adesão de <i>S. epidermidis</i> RP62A aos discos de nanoHA 725 aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) minutos de contacto e aos discos de nanoHA 1000 aos 30 (d), 60 (e) e 90 (f) minutos de contacto.	54

Figura 3.16. Imagens de SEM da adesão de <i>S. epidermidis</i> (UFP) aos discos de nanoHA 725 aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) minutos de contacto e aos discos de nanoHA 1000 aos 30 (d), 60 (e) e 90 (f) minutos de contacto.	55
Figura 3.17. Imagens de SEM da adesão de <i>P. aeruginosa</i> (ORT) aos discos de microHA. (a) microHA 725 aos 60 minutos de contacto e (b) microHA 1000 aos 90 minutos de contacto.	56
Figura 3.18. Imagens de SEM da adesão de <i>P. aeruginosa</i> (ORT) aos discos de nanoHA 725 aos 30 minutos de contacto, com diferentes ampliações, (a) 50 000× e (b) 5 000×.....	56

NOMENCLATURA

AFM	Microscópio de força atómica
BHI	Infusão de cérebro e coração
CFU	Unidade formadora de colónia
CLED	Cistina lactose deficiente em electrólitos
CNS	Estafilococos coagulase negativo
EDX	Energia de dispersão de raios X
EPS	Substância polimérica extracelular
HA	Hidroxiapatite
microHA	Hidroxiapatite micrométrica
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
MRSE	<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente à metilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à metilina
NA	Agar nutriente
nanoHA	Hidroxiapatite nanométrica
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PIA	Adesina polissacarídica intercelular
Ra	Rugosidade média (nm)
SEM	Microscópio electrónico de varrimento
TSB	Caldo de soja tripticase

I. INTRODUÇÃO

1. Adesão bacteriana a materiais

O reconhecimento que as bactérias crescem, preferencialmente, nas superfícies surgiu há muitos séculos, quando os microbiólogos começaram a utilizar métodos directos para observar o crescimento destes organismos nas suas populações naturais, no ecossistema real (Costerton, 1999). Já no século XVII, Antonie van Leuwenhoek usou o seu primitivo, mas eficaz, microscópio para descrever agregados de “animáculos” que removeu da superfície dos seus dentes (Donlan *et al.*, 2002b).

Contudo, durante maior parte da história da microbiologia, as bactérias têm sido principalmente caracterizadas como formas de vida unicelular plantónica (livres em suspensão) (Donlan, 2002a). Esta caracterização está profundamente associada ao paradigma da cultura pura. A possibilidade das bactérias poderem, num sentido estrito, ser diluídas a uma única célula e estudadas em cultura em meio líquido permitiu e permite o estudo de muitas das actividades bacterianas. E embora este procedimento tradicional de cultura bacteriana em meio líquido tenha sido fundamental no estudo na patogénese e fisiologia bacteriana, o crescimento plantónico de bactérias em cultura pura raramente existe na natureza (Davey *et al.*, 2000).

Até recentemente, a falta de métodos para explorar as comunidades bacterianas *in situ* dificultou análises mais detalhadas. Felizmente, os recentes avanços em microscopia e técnicas moleculares tornaram possível a análise de tais comunidades *in situ* com maior pormenor, sem a necessidade de recorrer a culturas em meio líquido (Davey *et al.*, 2000).

Nestes últimos anos foram feitos grandes esforços para perceber quais os mecanismos moleculares de interacção das bactérias com receptores específicos do substrato. E existe um número elevado de semelhanças entre a adesão bacteriana a dispositivos médicos e a outros tipos de superfícies do mundo natural ou de ecossistemas criados pelo homem (Mittelman, 1996).

1.1. Infecções associadas a dispositivos médicos

As infecções associadas aos dispositivos médicos resultam da adesão das bactérias à superfície de um biomaterial, sendo uma das causas que impede o uso, a longo prazo, de implantes e dispositivos intravasculares como, próteses do joelho, válvulas cardíacas, cateteres vasculares, lentes de contacto, entre outros (Katsikogianni *et al.*, 2004).

Após a implantação existe uma competição entre a integração do material no tecido circundante e a adesão bacteriana à superfície do dispositivo. Para um implante de sucesso, a integração no tecido ocorre antes de uma considerável adesão bacteriana, prevenindo, desta forma, a colonização do implante. Contudo, frequentemente, as defesas locais do hospedeiro nos tecidos peri-implante encontram-se debilitadas não sendo capazes de prevenir colonizações se a adesão bacteriana ocorrer antes da integração no tecido. Tem sido identificado um “período decisivo” de 6 horas após a implantação, durante o qual a prevenção da adesão bacteriana é fundamental para o sucesso de um implante a longo prazo. Durante este período, um implante é particularmente susceptível à colonização da sua superfície. Em períodos mais prolongados, certas espécies bacterianas aderidas são capazes de formar um biofilme na interface tecido-implante. Os biofilmes são altamente resistentes tanto à resposta imune do hospedeiro quanto à terapia sistémica com antibióticos e, portanto, o seu desenvolvimento é a principal causa de infecção associada ao implante e um severo problema de saúde pública. Uma vez que a formação de um biofilme patogénico decorre da adesão bacteriana inicial à superfície do implante, inibir essa adesão é frequentemente considerada a etapa mais crítica para prevenir as infecções associadas a dispositivos médicos (Hetrick *et al.*, 2006; Campoccia *et al.*, 2006; Stobie *et al.*, 2008).

1.2. Problemática das infecções associadas a dispositivos médicos

Desde próteses ortopédicas até aos *shunts* ventriculares os procedimentos médicos modernos recorrem, cada vez mais, aos dispositivos internos, muitos dos quais residem no corpo por longos períodos de tempo. Infelizmente, as infecções associadas a estes dispositivos continuam a ser um grande desafio clínico.

Dos 2.6 milhões de implantes ortopédicos inseridos em seres humanos anualmente nos Estados Unidos, aproximadamente 112,000 (4.3%) tornam-se infectados. A taxa de

infecção anual para implantes cardiovasculares é ainda maior (7.4%). Ao considerar todos os dispositivos internos, o número de infecções associadas aos dispositivos médicos implantados aproxima-se do 1 milhão por ano (Hetrick *et al.*, 2006).

Igualmente preocupante, a administração de antibióticos sistemicamente tem mostrado menor eficácia contra este tipo de infecções. Como resultado, a remoção do implante e/ou amputação são cada vez mais prevalentes. Para além da dor e sofrimento humano, estas infecções representam um enorme fardo económico para a sociedade. Estima-se que os custos médicos directos associados a tais infecções excedam anualmente os 3 biliões apenas nos Estados Unidos (Hetrick *et al.*, 2006).

A maioria dos implantes são realizados em pacientes de 65 anos ou mais velhos mas, com o aumento da esperança média de vida em todo o mundo e os avanços na tecnologia médica, haverá uma maior procura de implantes médicos e consequentemente um aumento do número de infecções associadas a estes dispositivos (Hetrick *et al.*, 2006).

Uma vez que as infecções são frequentemente causadas pela flora normal ou por bactérias ubíquas Gram positivo e Gram negativo, que se encontram normalmente na pele e membranas mucosas do paciente, e que podem contaminar o dispositivo durante a inserção cirúrgica, faz com que um dos desafios do trabalho diário de diagnóstico seja distinguir as estirpes clinicamente importantes das estirpes contaminantes (Poelstra, 2002; Katsikogianni *et al.*, 2004; Ziebuhr *et al.*, 2006).

A acumulação de bactérias na superfície de determinados dispositivos, por exemplo em cateteres, pode levar ao seu bloqueamento mecânico, assim como provocar a degradação do material (Withener *et al.*, 1993). Alguns estafilococos coagulase negativos podem, inclusive, metabolizar alguns dos componentes de cateteres de plástico, na ausência de outros nutrientes, e usá-los para sustentar o seu crescimento na superfície do biomaterial (Pascual, 2002).

A combinação da diversidade e número de implantes usados juntamente com a dificuldade de tratar infecções a eles associadas torna pertinente o estudo exaustivo dos processos que conduzem à colonização das superfícies, bem como a necessidade de desenvolver novas estratégias de prevenção.

1.3. Mecanismos de adesão bacteriana

A adesão bacteriana à superfície de um biomaterial é um processo em que a bactéria se liga firmemente à superfície e pode ser descrita como um processo de duas fases, sendo a primeira, a fase física, instantânea e reversível e a segunda, a fase molecular e celular, dependente do tempo e irreversível (An *et al.*, 1998).

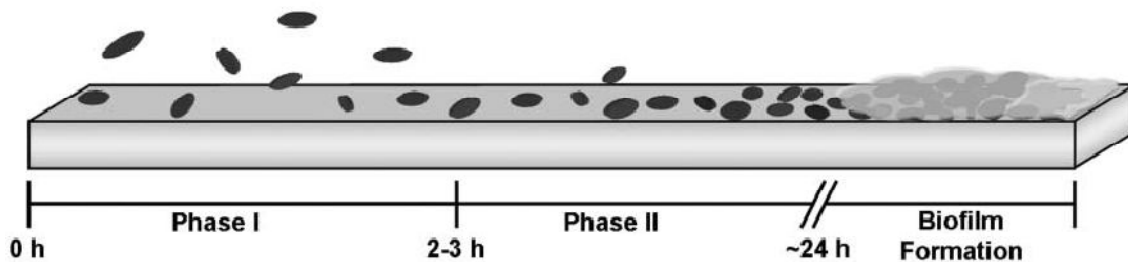


Figura 1.1. Representação esquemática da adesão bacteriana a um material ao longo do tempo (Hetrick *et al.*, 2006).

Após a inserção de um dispositivo, a adesão bacteriana é precedida pela adsorção à superfície de uma película de pequenos compostos orgânicos e macromoléculas, incluindo proteínas do plasma e tecidos como a fibronectina, fibrinogénio, fibrina, albumina e colagénio, entre outras (Hetrick *et al.*, 2006; Safdar *et al.*, 2001).

1.3.1. Interações físico-químicas

Na primeira fase as bactérias plânticas movem-se ou são movidas para a superfície do material através e por efeito de forças físicas ou pelo movimento activo da bactéria (Katsikogianni *et al.*, 2004; An *et al.*, 1998).

Após o transporte até à superfície, a adesão tem início com a interacção entre a bactéria e a superfície a uma distância de aproximadamente 50 nm. Estas interacções físicas são classificadas como forças de longo ou curto alcance.

As forças de longo alcance (não específicas, distâncias >50 nm) entre as células e a superfície do material são descritas por forças mútuas que, por sua vez, são função da distância e energia livre, inclui forças gravitacionais, forças de atracção de van der Waals, e interacções electrostáticas. As forças de curto alcance tornam-se efectivas quando a célula e a superfície entram em contacto estreito (<5 nm), estas podem ser separadas em ligações químicas (como pontes de hidrogénio), interacções iónicas e dipolares e interacções hidrofóbicas (Hetrick *et al.*, 2006; Katsikogianni *et al.*, 2004; An *et al.*, 1998).

Em suma, as bactérias são transportadas para a superfície através das interacções de longo alcance e mediante um contacto mais próximo, as interacções de curto alcance tornam-se mais importantes. Esta ligação inicial da bactéria à superfície do material é a parte inicial do processo de adesão, e que vai tornar possível a fase molecular e celular da adesão (Katsikogianni *et al.*, 2004; An *et al.*, 1998).

1.3.2. Interacções moleculares e celulares

Na segunda fase da adesão, reacções moleculares específicas entre as estruturas da superfície bacteriana e o substrato da superfície do material tornam-se predominantes. Isto implica uma firme adesão da bactéria a uma superfície através de estruturas poliméricas na superfície bacteriana. Estas estruturas incluem cápsulas, fímbrias, pili e a camada mucóide (*slime*). As adesinas constituem parte destas estruturas, a parte funcional das mesmas (Katsikogianni *et al.*, 2004). As bactérias podem apresentar múltiplas adesinas para diferentes superfícies (diferentes receptores) (An *et al.*, 1998).

A cápsula bacteriana constitui um componente extracelular diferente da camada mucóide. Delimita a parede celular e é uma estrutura que pode ser visualizada, em preparações coradas ou não coradas, como uma zona clara em volta da célula bacteriana, e ocorre tanto em bactérias Gram negativo como em Gram positivas. A maior parte das cápsulas são compostas por polissacarídeos e proteínas, que podem actuar como adesinas (An *et al.*, 1998).

1.3.2.1. Formação do biofilme

Algumas estirpes bacterianas, depois de firmemente aderidas à superfície do material, começam a multiplicar-se formando microcolónias e segregam substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que cimentam a adesão e constituem uma matriz estrutural de aspecto mucóide, designada *slime*. A acumulação de biomassa de bactérias e *slime* numa superfície sólida constitui o biofilme (An *et al.*, 1998; Donlan, 2002a).

As estirpes bacterianas não produtoras de *slime* são, em geral, menos aderentes e, conseqüentemente, menos patogénicas. (Katsikogianni *et al.*, 2004).

As propriedades físicas e químicas do *slime* podem variar, mas é principalmente constituído por polissacarídeos e trata-se de uma estrutura altamente hidratada porque pode incorporar grandes quantidades de água na sua organização prevenindo a dissecação letal (Donlan, 2002a; Sutherland, 2001).

Os biofilmes podem ser compostos por uma única espécie ou por múltiplas espécies bacterianas dependendo do dispositivo e do seu tempo de implantação no paciente (Donlan, 2001; Davey *et al.*, 2000).

Em geral, as bactérias organizadas em biofilme são mais resistentes aos antibióticos e podem lidar muito melhor com condições externas desfavoráveis do que as suas análogas plânticas. Além disso, o biofilme protege a bactéria do sistema imunitário inato do hospedeiro. Em geral, a presença de biofilme permite que as bactérias colonizem as superfícies inertes dos dispositivos médicos e resistam a uma ampla gama de condições externas (Ziebuhr *et al.*, 2006).

A formação do biofilme é um processo multifactorial que se inicia quando, por exemplo, oxigénio e iões de ferro se tornam limitados, quando concentrações subletais de certos antibióticos estão presentes ou em outras situações de stress para o microrganismo (Götz, 2002). Um outro factor relevante na formação do biofilme é o fenómeno designado *quorum-sensing*. Trata-se de um mecanismo de comunicação célula-célula usado pelas bactérias para regular diferentes processos, incluindo a formação do biofilme (Pascual, 2002).

No que respeita aos agentes antimicrobianos, existe uma dramática diferença na susceptibilidade dos microrganismos plânticos daqueles que se encontram no

biofilme, sejam eles antibióticos, desinfetantes ou germicidas. Os mecanismos responsáveis pela resistência podem estar relacionados com a demora na penetração do agente antimicrobiano através da matriz do biofilme, com a alteração da taxa de crescimento dos organismos ou com outras alterações fisiológicas devido ao modo de crescimento no biofilme, que resulta numa susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos (Donlan *et al.*, 2002b). A proximidade das microcolónias que constituem o biofilme pode fornecer as condições ideais para a troca de plasmídios que codificam resistências aos agentes antimicrobianos (Donlan, 2002a). Em alguns casos, verificou-se que para eliminar bactérias num biofilme são necessárias doses de cerca de 1000 vezes superiores à dose de antibiótico usada para alcançar os mesmos resultados com células em suspensão (Hetrick *et al.*, 2006; Costerton, 1999).

Após o estabelecimento do biofilme, tanto as células que não aderiram como as células jovens que escapam da camada de *slime*, quer por paragem da produção do EPS através de mecanismos de modelação fenotípica, quer por exaustão das condições que suportam a sua produção, encontram-se então, livres na corrente sanguínea podendo originar bacteriemias bem como colonizar novos locais repetindo todo o processo de colonização (Katsikogianni *et al.*, 2004; Mack *et al.*, 2007).

1.4. Factores que influenciam a adesão bacteriana

A adesão bacteriana é um processo complexo que é afectado por inúmeros factores incluindo características do material alvo, factores ambientais e algumas características da bactéria em questão (Katsikogianni *et al.*, 2004; An *et al.*, 1998).

Tabela 1.1. Factores que influenciam a adesão bacteriana (Katsikogianni *et al.*, 2004; An *et al.*, 1998)

Propriedades do material	Factores ambientais	Características da célula bacteriana
Rugosidade	Condições de fluxo	Hidrofobicidade da superfície
Hidrofobicidade	pH	Carga da superfície
Carga da superfície	Temperatura	Flagelos
Composição química	Tempo de exposição	Fímbrias
Configuração física	Concentração bacteriana	EPS
	Presença de antibióticos	
	Características do meio	

▪ Factores ambientais

As condições de fluxo são consideradas factores dominantes que influenciam fortemente o número de bactérias aderidas assim como a estrutura e performance do biofilme. Existem estudos que demonstraram que o número de *S. aureus* aderidos a diversos substratos diminui com o aumento da taxa de fluxo. Porém, existe uma taxa de fluxo óptima para a adesão reflectindo o equilíbrio entre a taxa de adesão e a de libertação bacteriana (Katsikogianni *et al.*, 2006).

A concentração de electrólitos (KCl, NaCl), CO₂ e os valores de pH do meio de cultura são igualmente factores que influenciam a adesão bacteriana (Katsikogianni *et al.*, 2004; An *et al.*, 1998).

A presença de antibióticos pode reduzir a adesão bacteriana dependendo da susceptibilidade da bactéria e da concentração de antibiótico (Katsikogianni *et al.*,

2004). Por exemplo, um cateter ventricular de silicone revestido com uma combinação de rifampicina e trimetoprim reduz a adesão de *S. aureus*, *in vitro* (Götz, 2002).

Todos estes factores podem influenciar a adesão bacteriana quer por alteração das interações físicas da primeira fase de adesão quer por alteração das características da superfície da bactéria ou do material (An *et al.*, 1998).

- **Características do material**

As características do material que influenciam a adesão bacteriana à sua superfície incluem a composição química do material, a carga da superfície, hidrofobicidade, configuração física ou simplesmente a rugosidade da superfície (Katsikogianni *et al.*, 2004; An *et al.*, 1998).

A composição química da superfície influencia a adesão e proliferação bacteriana porque materiais com diferentes grupos funcionais apresentam diferente hidrofobicidade e carga (Katsikogianni *et al.*, 2004).

Relativamente à rugosidade foi constatado que a colonização microbiana e consequente deposição do biofilme aumenta com o aumento da rugosidade da superfície, isto porque a área de superfície é maior em superfícies rugosas, oferecendo mais locais favoráveis à colonização (Donlan, 2002a). Em oposição, as superfícies ultra-lisas não favorecem a adesão bacteriana (Katsikogianni *et al.*, 2004).

Quanto à configuração da superfície, verificou-se que as taxas de infecção no local do implante são diferentes entre os materiais porosos e os densos, sendo os materiais porosos aqueles que apresentam taxas mais elevadas. Além disso, as bactérias aderem mais nas ranhuras comparativamente com os materiais planos, devido ao aumento da área de superfície. Contudo, as bactérias aderem preferencialmente às irregularidades que correspondem ao seu tamanho uma vez que maximiza área bactéria-superfície (Katsikogianni *et al.*, 2004).

Muitos investigadores mostraram que os microrganismos se ligam mais rapidamente a uma superfície hidrofóbica apolar, por exemplo plástico, do que a materiais hidrofílicos, tais como vidros ou metais (Donlan, 2002a). Mas dependendo da hidrofobicidade da bactéria e da superfície do material, a bactéria adere diferentemente a materiais com

diferentes hidrofobicidades sendo que, os materiais hidrofílicos são mais resistentes à adesão bacteriana que materiais hidrofóbicos (An *et al.*, 1998).

Em todo o caso, a superfície do material quando exposta a um meio aquoso será, inevitavelmente e quase imediatamente, revestida por polímeros do meio e as modificações químicas resultantes irão afectar a taxa e extensão da adesão bacteriana (Donlan, 2002a).

▪ **Características da célula bacteriana**

Para uma determinada superfície, diferentes espécies e estirpes bacterianas aderem de forma diferente uma vez que apresentam diferentes características físico-químicas (Katsikogianni *et al.*, 2004).

A hidrofobicidade da superfície bacteriana é um importante factor físico de adesão. A hidrofobicidade da bactéria varia de acordo com a espécie bacteriana e é influenciada pelo meio de crescimento, idade da bactéria e estrutura da superfície bacteriana (An *et al.*, 1998). Geralmente, bactérias com características hidrofóbicas preferem materiais com superfícies hidrofóbicas, e aquelas que têm características hidrofílicas preferem superfícies hidrofílicas (Mitik-Dineva *et al.*, 2009). Contudo, foi demonstrado que os materiais com superfícies hidrofóbicas desempenham um papel mais importante na adesão do que a hidrofobicidade da superfície bacteriana (Katsikogianni *et al.*, 2004).

A presença de estruturas na superfície bacteriana como fímbrias e flagelos ou mesmo a produção de EPS influencia a hidrofobicidade da superfície celular e, consequentemente, a taxa e extensão da adesão. As interacções hidrofóbicas tendem a aumentar com o aumento da natureza apolar de uma ou de ambas as superfícies envolvidas. (i.e. superfície da célula microbiana e superfície do substrato) (Donlan, 2002a).

As fímbrias contêm em geral uma grande proporção de aminoácidos hidrofóbicos que contribuem para a hidrofobicidade da superfície celular e para o processo de adesão, superando a barreira de repulsão electrostática inicial que existe entre a célula e o substrato (Katsikogianni *et al.*, 2004).

As células que apresentam flagelos aderem em maior número e são capazes de se ligar contra o fluxo mais rapidamente do que as bactérias não móveis. Os flagelos desempenham um papel importante nos primeiros momentos de ligação da bactéria uma vez que, tal como as fímbrias, podem superar as forças repulsivas associadas ao substrato mais do que actuar como adesinas (Donlan, 2002a).

O componente antigénio O dos lipopolissacarídeos presente nas bactérias Gram negativo e o EPS são estruturas importantes no processo de adesão a materiais hidrofílicos (Donlan, 2002a).

Relativamente à carga da superfície, as bactérias em suspensões aquosas encontram-se carregadas negativamente, devido à ionização dos seus grupos de superfície. A carga da superfície da bactéria varia de acordo com a espécie e é influenciada pelo meio de crescimento, o pH e a força iónica da suspensão tampão, idade da bactéria e estrutura da superfície bacteriana. Contudo, a contribuição relativa da carga da superfície bacteriana para o processo de adesão ainda não foi totalmente compreendida (Katsikogianni *et al.*, 2004).

A adesão dos microrganismos à superfície de um material é um processo muito complexo, com muitas variáveis a afectar o resultado. Em geral, a adesão irá ocorrer mais facilmente nas superfícies que são mais rugosas, hidrofóbicas e revestidas pela película inicial. Um aumento da velocidade de fluxo, temperatura da água ou concentração de nutrientes também pode conduzir a um aumento da adesão, se estes parâmetros não excederem os níveis críticos. As características da superfície celular, especialmente a presença de fímbrias, flagelos e polissacarídeos, também são importantes e podem proporcionar uma vantagem competitiva para um organismo quando envolvido numa comunidade polimicrobiana (Donlan, 2002a).

1.5. Microrganismos

A grande maioria das infecções associadas a dispositivos médicos é causada por estafilococos (cerca de quatro em cada cinco casos) sendo que dois dos três isolados identificados deste género incluem as espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Em termos absolutos, representam os principais agentes causadores de infecção em ortopedia, enquanto outras espécies de estafilococos coagulase negativa (CNS) para além de *S. epidermidis*, em especial *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus haemolyticus*, contribuem para um acréscimo de 13% das infecções. Em termos de prevalência seguem-se a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Enterococcus faecalis*. (Campoccia *et al.*, 2006).

Outros microrganismos podem também ser isolados, nomeadamente *Escherichia coli*, *Streptococcus viridans*, *Klebsiella pneumoniae* e bactérias pertencentes ao grupo *Proteus* (Hetrick *et al.*, 2006, Donlan, 2001). Para além das bactérias, em algumas infecções podem ser isoladas espécies de *Candida* (Katsikogianni *et al.*, 2004). Em 16% dos casos as infecções são de origem polimicrobiana (Campoccia *et al.*, 2006).

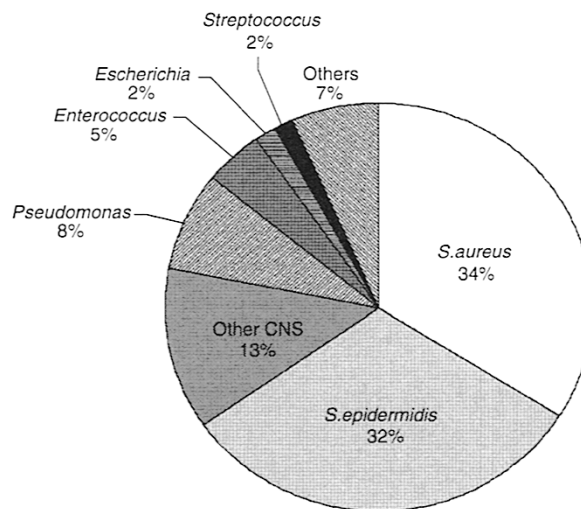


Figura 1.2. Frequência dos principais patogénicos isolados de infecções ortopédicas associadas a dispositivos médicos (Campoccia *et al.*, 2006).

As bactérias infecciosas podem provir do ar da sala de cirurgia, do equipamento cirúrgico, das mãos e vestuário usado pelos profissionais de saúde, da pele e membranas mucosas do paciente ou de uma infecção distal ao local do implante (Donlan, 2001; Katsikogianni *et al.*, 2004). Embora o uso de técnicas de esterilização e assepsia reduza em muito o número de bactérias encontradas no ambiente hospitalar, microrganismos patogénicos são ainda isolados em, aproximadamente, 90% de todos os locais dos implantes (Hetrick *et al.*, 2006).

Os pacientes colonizados podem contaminar superfícies do ambiente hospitalar e equipamento médico que acabam por servir como reservatórios para a disseminação. A exposição a vários esquemas de antibióticos selecciona e incentiva a proliferação de patogénicos resistentes (Lim *et al.*, 2005) bem como a proximidade de microrganismos comensais e patogénicos hospitalares vai permitir a disseminação clonal e horizontal de genes que codificam resistências a antibióticos bem como de outros factores de virulência (Campoccia *et al.*, 2006).

Nas secções seguintes serão abordados com maior detalhe os microrganismos utilizados no trabalho prático.

1.5.1. *Staphylococcus spp.*

O género *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae* e a sua designação resulta da morfologia característica de cocos em cacho. São bactérias Gram positivo, anaeróbias facultativas e elaboram catalase. A cápsula é uma estrutura importante deste género, é de natureza polissacarídica tendo um papel relevante como agente antifagocitário e facilitador da adesão a materiais sintéticos (Cristino, 2000).

Das variadas enzimas produzidas por estafilococos, uma assume particular importância, a coagulase. De entre as espécies patogénicas para o Homem, só uma, *S. aureus*, a produz. Todas as restantes são designadas por coagulase-negativas ou não produtoras de coagulase (Cristino, 2000).

Os estafilococos são bactérias que vivem em contacto íntimo com o Homem, numa relação habitual de comensalismo ou mutualismo. Só em condições particulares, quando há quebra do equilíbrio habitual ou acesso a áreas estéreis podem tornar-se patogénicos.

Muitas das espécies constituem parte importante da população microbiana indígena da pele e mucosas (Cristino, 2000).

No entanto, tem-se verificado um aumento dramático da incidência de infecções por *Staphylococcus* no ambiente hospitalar. A propagação deste género de bactérias está associada ao aumento do número de pacientes imunodeprimidos que oferecem aos microrganismos um novo e susceptível hospedeiro. Além disso, o uso de dispositivos médicos, temporariamente inseridos ou permanentemente implantados, no curso dos tratamentos, representa um adequado habitat para colonizar. Por fim, as bactérias no ambiente hospitalar estão sujeitas a uma elevada pressão selectiva devido ao uso extensivo de antibióticos e desinfectantes. A ocupação deste nicho ecológico por microrganismos requer pré-requisitos especiais que obviamente são preenchidos pelos *Staphylococcus*, nomeadamente mecanismos de adesão, capacidade para adquirir resistência aos antibióticos e uma forte variabilidade fenotípica e genotípica (Ziebuhr *et al.*, 2006).

A expressão heterogénea dos genes é normalmente observada nas estirpes clínicas de *S. aureus* e *S. epidermidis* e presume-se que esta habilidade é uma vantagem para a adaptação dos estafilococos a mudanças nas condições ambientais (Ziebuhr *et al.*, 2006).

1.5.1.1. *Staphylococcus epidermidis*

O *Staphylococcus epidermidis* é sobretudo um habitante normal da microflora da pele e membranas mucosas de humanos saudáveis, e como bactéria comensal apresenta baixo potencial patogénico. De facto, *S. epidermidis* raramente causa doenças em indivíduos imunocompetentes. No entanto, nas últimas décadas, esta bactéria tem emergido como causa comum de numerosas infecções nosocomiais, principalmente associadas aos dispositivos médicos (Ziebuhr *et al.*, 2006), representando 80% das células envolvidas (Götz, 2002), sendo actualmente considerado o membro mais importante dos CNS.

O *S. epidermidis* está envolvido em muitas infecções nosocomiais devido ao seu fácil acesso da pele do paciente às feridas e implantes (Götz, 2002), afectando preferencialmente pacientes imunocomprometidos, hospitalizados por longos períodos de tempo e severamente doentes (Ziebuhr *et al.*, 2006). Ao contrário da infecção por *S.*

aureus que progride rapidamente e é geralmente mais severa a infecção por *S. epidermidis* é normalmente crónica e persistente (Hetrick *et al.*, 2006; Mack *et al.*, 2007).

Apesar de não produzir muitos factores de virulência como toxinas ou enzimas, o sucesso como patogénico deve-se à sua capacidade de aderir às superfícies e aí permanecer (Katsikogianni *et al.*, 2004). Mas ao contrário do *S. aureus*, *S. epidermidis* exhibe fracas interações com as proteínas do hospedeiro, e menor número de adesinas sendo as interações hidrofóbicas um factor importante para a adesão inicial (Pascual, 2002). Após a fase inicial de adesão bacteriana, ocorre a acumulação do biofilme (Ziebuhr *et al.*, 2006) que resulta da formação de múltiplas camadas de células na superfície do biomaterial revestidas por uma matriz heterogénea extracelular (Götz, 2002).

O principal componente do biofilme desta bactéria é uma adesina polissacarídica intercelular (PIA) que se encontra localizada principalmente na superfície celular. Contudo, existem outros factores independentes de PIA que participam na formação e acumulação do biofilme, tais como, as proteínas associadas à superfície Aap – proteína associada à acumulação (*accumulation-associated protein*) que interfere na agregação celular e Bap/Bhp – proteína associada ao biofilme (*biofilme-associated protein*) responsável pelo contacto célula-célula, entre outras (von Eiff *et al.*, 1998; Mack *et al.*, 2007; Ziebuhr *et al.*, 2006).

A PIA pode também contribuir significativamente para a protecção contra a fagocitose por leucócitos polimorfonucleares (Vuong *et al.*, 2004) assim como estar envolvida na hemaglutinação de eritrócitos (Götz, 2002).

Além da formação do biofilme, isolados nosocomiais de *S. epidermidis* são caracterizados pela sua pronunciada resistência a muitos dos antibióticos usados actualmente, incluindo a meticilina. Em contraste com os *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), pouca atenção tem sido dada aos *S. epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE) nos hospitais e como resultado, tem vindo a ser observada em todo o mundo uma alta prevalência de isolados resistentes. Aproximadamente 80% dos *S. epidermidis* isolados de infecções associadas a dispositivos médicos são resistentes à meticilina, bem como multirresistentes, contrariamente às estirpes comensais obtidas da comunidade que são principalmente sensíveis aos antibióticos. Por conseguinte, é

necessário considerar seriamente a multi-resistência de *S. epidermidis* e outros CNS (Campoccia *et al.*, 2006) como reservatórios para a disseminação de genes de resistência dentro das comunidades microbianas, sendo necessário adoptar medidas de higiene adequadas para o seu controlo, de forma semelhante à feita para os MRSA (Ziebuhr *et al.*, 2006).

1.5.1.2. *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é dos agentes mais frequentes de infecções adquiridas, tanto na comunidade como no ambiente hospitalar. Cerca de 30 a 50% da população adulta saudável é portadora nasal de *S. aureus*. No pessoal hospitalar a percentagem de portadores é maior, podendo atingir valores superiores a 60% (Lim *et al.*, 2005; Cristino, 2000).

O *S. aureus* está entre os patogénicos mais temidos devido aos inúmeros factores de virulência que apresenta assim como à crescente resistência aos antibióticos que tem vindo a desenvolver.

A versatilidade e gravidade das infecções potencialmente causadas por *S. aureus* devem-se a uma notável gama de toxinas e enzimas produzidas pelo microrganismo que podem originar pneumonia, bacteriemia e sepsia, infecções superficiais ou profundas na pele e tecidos moles, osteomielites, endocardites e síndrome do choque tóxico, entre outras (Lim *et al.*, 2005; Mack *et al.*, 2007).

A emergência de estirpes com resistência múltipla aos antibióticos, particularmente o aumento da incidência de estirpes MRSA tem despertado preocupações sobre o desenvolvimento de estirpes resistentes a todos os antibióticos disponíveis (Joosten *et al.*, 2005). Actualmente, na maioria dos hospitais dos EUA e da Europa, os MRSA representam cerca de 30% de todos os *S. aureus* isolados. Contudo, podem ser encontradas taxas até 55% em algumas unidades de cuidados intensivos (Lim *et al.*, 2005).

O *S. aureus* é especialmente capaz de aderir a uma larga variedade de componentes para dar início à colonização. Esta adesão é frequentemente mediada por adesinas que, em

muitos casos, estão covalentemente ancoradas no peptidoglicano da parede celular (Götz, 2002).

Até há pouco tempo, não se sabia muito sobre a capacidade do *S. aureus* formar biofilme. Muitos *S. aureus* isolados foram descritos como biofilme e PIA negativos, contudo verificou-se que o operão *ica* responsável pela produção da PIA estava presente em quase todas as estirpes testadas, permitindo concluir, com estudos auxiliares, que se trata de um operão estritamente regulado, comparativamente ao de *S. epidermidis*. A anaerobiose é um importante estímulo para a expressão do operão *ica* e explica o fenótipo de biofilme negativo observado nos primeiros ensaios realizados em condições de aerobiose (Götz, 2002).

1.5.2. *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram negativo em forma de bastonete, aeróbia, pertencente à família *Pseudomonadaceae*. Trata-se de um microrganismo com exigências nutricionais simples e com uma versatilidade metabólica muito elevada capaz de tolerar uma ampla variedade de condições físicas, o que lhe permite colonizar vários habitats na natureza, nomeadamente a água, solo, plantas e animais incluindo o Homem. (Lim *et al.*, 2005; Sá-Correia, 2000).

Esta bactéria raramente causa doença em indivíduos saudáveis contudo, é um patogénico oportunista nosocomial extremamente importante devido à sua frequência, ubiquidade e resistência intrínseca a muitos antibióticos. Nos hospitais, tem sido isolado de alimentos, flores, lavatórios, esfregões, equipamento respiratório e de diálise e outros ambientes húmidos, sendo estes importantes reservatórios para a bactéria. Pode ainda contaminar água considerada “esterilizada”, soro fisiológico ou mesmo desinfetantes e anti-sépticos. À semelhança de outros organismos oportunistas, a *P. aeruginosa* pode causar uma grande variedade de infecções em doentes com condições predisponentes tais como queimaduras, feridas abertas ou dispositivos médicos internos (Lim *et al.*, 2005; Sá-Correia, 2000; Boyd *et al.*, 1995).

Foram identificadas várias estruturas e compostos extracelulares que constituem o arsenal de virulência desta bactéria. É o caso de toxinas, proteases e hemolisinas, que a *P. aeruginosa* excreta para o meio circundante e que são capazes de danificar os tecidos

e destruir as defesas do hospedeiro (Sá-Correia, 2000). Um outro factor importante de virulência é o EPS que algumas estirpes sintetizam abundantemente, em resposta a condições ambientais, designado de alginato (Boyd *et al.*, 1995).

O alginato sintetizado serve para proteger a bactéria das adversidades que a rodeiam (falta de nutrientes, presença de agentes antimicrobianos, altas pressões osmóticas, entre outros) assim como melhorar a adesão a superfícies sólidas. A transcrição dos genes responsáveis pela biossíntese do alginato é induzida após a ligação da bactéria ao substrato e tal conduz ao aumento da produção de alginato. Como resultado, há o desenvolvimento do biofilme que é vantajoso para a sobrevivência e crescimento da bactéria, nomeadamente, aumento da resistência aos agentes antimicrobianos por impedimento da passagem destes compostos até à bactéria, por ligação e/ou por inactivação. A capacidade do sistema imune do hospedeiro para atacar a infecção também está inibida pela presença do EPS em torno das células (Boyd *et al.*, 1995; Stapper *et al.*, 2004; Donlan *et al.*, 2002b).

Em certas circunstâncias, a *P. aeruginosa* produz a enzima alginato liase que cliva o polímero em pequenos oligossacarídeos, que anula as propriedades de ligação do alginato e resulta no aumento do desprendimento das bactérias da superfície do material, permitindo que se disseminem e colonizem novos locais. Assim, tanto as enzimas da biossíntese como as da degradação do alginato são importantes para o desenvolvimento, manutenção e propagação dos biofilmes de *P. aeruginosa* (Boyd *et al.*, 1994).

2. Biomateriais

Um biomaterial foi inicialmente definido como sendo “um material não vivo, utilizado como dispositivo médico, projectado para interactuar com sistemas biológicos”. Porém, esta definição apresentava alguma controvérsia e, assim, em 1991, na conferência Consenso nas Definições em Biomateriais, o termo biomaterial foi redefinido como sendo “um material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo” (Ratner *et al.*, 2004).

Uma definição complementar, essencial para perceber o objectivo da ciência dos materiais, é a de biocompatibilidade. No *Consensus Conference of the European Society for Biomaterials* a biocompatibilidade foi definida como sendo “a capacidade de um material desencadear uma resposta adequada do hospedeiro numa aplicação específica” (Ratner *et al.*, 2004). Ou seja, a biocompatibilidade é a aceitação e interacção de um biomaterial no tecido circundante (Park e Lakes, 2007).

As características mais importantes para seleccionar um material para utilização médica são a já referida biocompatibilidade, a ausência de efeitos tóxicos ou nocivos para o organismo nomeadamente não-alérgico, não-imunogénico e não-carcinogénico; estabilidade química (degradação não dependente do tempo) e propriedades mecânicas capazes de responder às solicitações dinâmicas e estáticas a que estará sujeito durante a sua vida útil, em particular adequada força mecânica, resistência à fadiga, peso e densidade. Um aspecto igualmente importante é que o material seja relativamente barato, reprodutível, fácil de fabricar e produzir a uma larga escala (Park e Lake, 2007).

Os biomateriais dividem-se em materiais naturais ou sintéticos. Os biomateriais de origem sintética como metais, cerâmicos ou polímeros são classificados de biomédicos, os biomateriais de origem natural (animal, vegetal ou humana) são classificados de biológicos (Vallet-Regí, 2001). Os biomateriais podem ainda ser classificados sob o ponto de vista do comportamento biológico (resposta orgânica após a implantação do biomaterial) ou da sua composição química (propriedades intrínsecas). Na tabela 1.2 estão descritas algumas das vantagens, desvantagens e aplicações clínicas dos quatro grupos de materiais sintéticos.

Tabela 1.2. Classes de biomateriais sintéticos (Kawachi *et al.*, 2000; Ratner *et al.*, 2004)

Materiais	Vantagens	Desvantagens	Aplicações Clínicas
Polímeros (Polietileno, Poliéster, Poliuretano, PMMA, Silicone...)	Elasticidade, fácil de fabricar, baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação e deformação dependente do tempo, respostas patológicas	Substituição de articulações, suturas, próteses vasculares, sistemas de liberação de fármacos, oftalmologia
Metais (Aço inoxidável, Titânio e respectivas ligas, Liga de cromo-cobalto...)	Propriedades mecânicas, alta resistência à tração, média resistência ao desgaste, alta energia de deformação	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, potencial toxicidade, perda das propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles, alta densidade, rigidez	Substituição óssea e de articulações, fixação de fracturas, implantes dentários e válvulas cardíacas
Cerâmicos (Alumina, Zircônia, Carbono, Fosfatos de cálcio, Porcelana, Vidros bioativos...)	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, inércia, química, alta resistência à compressão, estabilidade, alta resistência ao desgaste	Baixa resistência à tração, baixa resistência à flexão e à fadiga, baixa elasticidade, alta densidade	Substituição de articulações, implantes dentários, substituição, aumento e reconstituição óssea, revestimento de engenhos hemocompatíveis
Compósitos (Fibra de carbono-resina termofixa, Fibra de carbono-termoplástico, Carbono-carbono, Fosfato de cálcio-colagénio...)	Boa biocompatibilidade, inércia, resistência à corrosão, alta resistência à tração	Material de mais difícil produção	Reconstituição dentária, reconstituição óssea

2.1. Tecido ósseo

A estrutura óssea caracteriza-se por ser um dos tecidos mais resistentes e duros do organismo humano. Para além das funções de suporte estrutural, protecção de órgãos vitais e auxílio no movimento, o osso é um importante reservatório de minerais, especialmente de iões de cálcio e fósforo (Carroll, 2007).

O tecido ósseo é do tipo conjuntivo constituído por células ósseas (cerca de 2%) e por tecido mineralizado que constitui a matriz extracelular. Esta matriz mineralizada permite diferenciá-lo dos restantes tecidos conjuntivos (Kawachi *et al.*, 2000; Jacob *et al.*, 1990).

O osso contém três tipos de células: os osteoblastos que têm como principal função a produção da matriz óssea durante o desenvolvimento ou reparação do tecido ósseo. Fazem a síntese de proteínas colagénicas ou não-colagénicas e são responsáveis pelo processo de mineralização do tecido osteóide, isto é, catalisam a síntese de cristais de fosfato de cálcio na malha de colagénio. Os osteócitos são células que suportam o osso e estão localizadas na matriz óssea. Por fim, os osteoclastos reabsorvem células ósseas danificadas ou velhas, durante períodos de crescimento ou de remodelação óssea. São também cruciais na libertação de Ca^{2+} do osso para a corrente sanguínea. A actividade coordenadora destas células permite que o osso cresça, se auto-repare e modifique a sua forma (Carroll, 2007). O tecido ósseo é ainda um tecido vascularizado e enervado. Nos ossos longos existe a medula óssea onde se localizam células estaminais responsáveis pelo seu comportamento hematopoiético bem como células estaminais capazes de se diferenciarem originando osteoblastos (Jacob *et al.*, 1990).

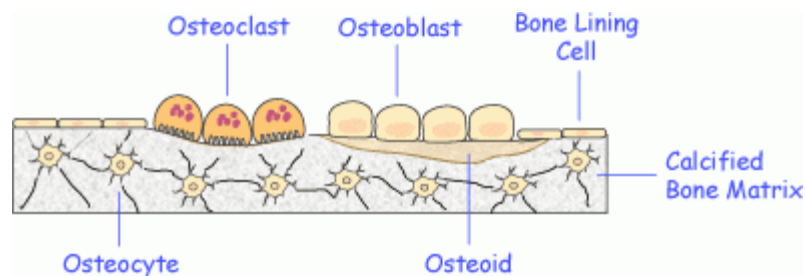


Figura 1.3. Representação esquemática dos constituintes da estrutura óssea (International Osteoporosis Foundation 2009).

A matriz extracelular do osso é composta por substâncias orgânicas e inorgânicas. O componente inorgânico contribui para aproximadamente 65% do peso húmido do osso, o componente orgânico usualmente contribui com pouco mais que 20% e a água com aproximadamente 10% do peso húmido. A matriz óssea também contém factores de crescimento que podem influenciar a função das células ósseas (Buckwalter *et al.*, 1995; Clarke, 2008).

O componente orgânico, principalmente o colagénio, dá ao osso a sua forma e contribui para a sua elasticidade, flexibilidade e resistência quando se aplica uma tensão (Kawachi *et al.*, 2000; Jacob *et al.*, 1990). O colagénio constitui cerca de 90% da matriz orgânica e os restantes 10% são constituídos por glicoproteínas não-colagêneas e proteoglicanos específicos do osso (Buckwalter *et al.*, 1995).

A matriz inorgânica, ou mineral, do osso desempenha duas funções essenciais: serve como reservatório de iões e confere ao osso rigidez e dureza. Aproximadamente 99% do cálcio, 85% do fósforo e entre 40 a 60% do sódio e magnésio total do corpo humano estão associados aos cristais minerais do osso, sendo a principal fonte destes iões de e para o fluído extracelular. Ao servir de reservatório para estes iões, a matriz inorgânica do osso ajuda a manter as suas concentrações no fluído extracelular dentro de um intervalo necessário para as funções fisiológicas críticas, incluindo condução nervosa e contracção muscular, assim como para a maioria das reacções bioquímicas importantes (Buckwalter *et al.*, 1995).

Os iões de cálcio e fósforo formam o principal composto mineral do osso, a hidroxiapatite (HA), $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. A estrutura da HA apresenta variações durante os estágios de remodelação óssea, resultado de substituições catiónicas e aniónicas que ocorrem com grande facilidade. O Ca^{2+} pode ser substituído por Mg^{2+} , Ba^{2+} , Na^+ , K^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , entre outros; os grupos fosfatos, por exemplo, por carbonatos e vanadatos e os grupos hidroxil por carbonatos, fluoreto (fluoroapatite) e cloreto (cloroapatite). Estas substituições podem alterar os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da estrutura da HA. Em geral, os cristais de HA são relativamente pequenos, podendo atingir tamanhos inferiores a 200 Å, traduzindo-se numa elevada superfície específica (Cao *et al.*, 1996; Clarke, 2008; Vallet-Regí, 2001).

Na maioria das pessoas, o osso parece manter-se inalterado por décadas, mas esta aparência é enganosa. Em resposta a sinais mecânicos e hormonais, o osso está em constante remodelação, resultante de processos naturais de destruição do tecido ósseo existente e formação de tecido novo, e da substituição do osso primário por osso secundário. Num indivíduo saudável, o equilíbrio destes dois processos naturais conduz à homeostasia do osso e conservação da massa óssea. Porém, com o processo natural de envelhecimento ou devido a patologias este equilíbrio altera-se, prevalecendo o processo de destruição face ao de renovação (Buckwalter *et al.*, 1995; Clarke, 2008).

Como referido, o osso não é um material homogêneo, inerte como o plástico ou os metais a partir dos quais a maioria dos implantes ortopédicos são feitos. A matriz óssea é composta por componentes orgânicos e inorgânicos, e as suas superfícies, externa e interna, são cobertas por células e processos celulares (Buckwalter *et al.*, 1995). A pesquisa de potenciais soluções para os problemas ósseos cria uma forte procura de materiais capazes de substituir ou reparar os ossos (Vallet-Regí, 2001).

2.2. Biocerâmicos

Os materiais cerâmicos para aplicações médicas foram introduzidos num cenário (1970s) em que as falhas nos biomateriais então mais utilizados, como o aço, as ligas de cobalto/crómio e o polimetacrilato de metilo (PMMA), começaram a ser detectadas. No entanto, a aplicação de implantes cerâmicos de forma controlada remonta ao século XVIII no campo dentário e um século mais tarde no campo da ortopedia (Vallet-Regí, 2001; Chevalier *et al.*, 2009).

No século XX os avanços na tecnologia dos cerâmicos e a necessidade de fornecer tratamentos clínicos a um grande número de pacientes permitiram um impulso no uso e desenvolvimento de materiais cerâmicos principalmente nos países desenvolvidos. O aumento da esperança média de vida e a obrigação social de proporcionar melhor qualidade de vida também têm sido factores cruciais para este progresso, e associado ao aumento da esperança média de vida, aumenta, de forma dramática, o número de pacientes com problemas de osteoporose (Vallet-Regí, 2001; Chevalier *et al.*, 2009).

Os cerâmicos são geralmente definidos como materiais inorgânicos, não-metálicos caracterizados por ligações iónicas ou covalentes fortes (Chevalier *et al.*, 2009). Em termos físico-químicos, pode dizer-se que os materiais cerâmicos são frágeis, duros e resistentes ao desgaste, altamente resistentes a ataques ácidos e estáveis a altas temperaturas. As principais características que os tornam favoráveis para aplicações médicas são o facto de serem tolerados pelo organismo, apresentarem superfícies susceptíveis de serem polidas, boa adesão celular e tecidual, alta tensão superficial, alto grau de humidade e elevada resistência à compressão. A rigidez (elevado módulo elástico) e fragilidade surgem como duas importantes desvantagens destes materiais (Vallet-Regí, 2001).

De acordo com o tipo de interacção com o tecido hospedeiro, isto é, o comportamento biológico, os biocerâmicos podem ser classificados como bioinertes (alumina e zircónia) ou bioactivos (fosfatos de cálcio). Os cerâmicos bioactivos podem ser reabsorvíveis ou não reabsorvíveis (Best *et al.*, 2008).

O termo bioinerte deve ser usado com cuidado, uma vez que é claro que todo o material introduzido num ambiente fisiológico irá induzir uma resposta, no entanto, para o propósito de implantes biomédicos, o termo pode ser definido como a resposta mínima do tecido hospedeiro, no qual o implante torna-se revestido numa fina camada fibrosa que é não aderente. Além disso, estes materiais não apresentam em geral sinais de degradação, depois de colocados em ambiente fisiológico (Best *et al.*, 2008).

Por outro lado, um material bioactivo é aquele que reage com o ambiente hospedeiro, podendo dissolver-se lentamente, sem que os produtos de degradação provoquem danos no paciente, e permite uma resposta biológica específica na sua interface, possibilitando a formação de ligações directas e firmes entre os tecidos e a superfície do material, criando um ambiente compatível com a osteogénese (crescimento ósseo) (Vallet-Regí, 2001; Cao *et al.*, 1996). Em oposição, se o cerâmico for inerte, o osso será substituído por um material que o organismo pode tolerar, mas que não pode substituir por meio de regeneração óssea (Vallet-Regí, 2001).

Os cerâmicos bioinertes são, então, fortemente utilizados em preenchimento de defeitos ósseos, enquanto a aplicação mais importante dos cerâmicos bioactivos tem sido nos componentes de próteses articulares ou noutras (próteses dentárias, onde o esforço de

resistência ao desgaste e o baixo atrito são condições essenciais) (Chevalier *et al.*, 2009).

Uma das desvantagens dos biocerâmicos é a reduzida resistência mecânica, que restringe o seu uso a regiões que não requeiram sustentação de carga. Uma forma de contornar tal restrição é a utilização de metais revestidos com cerâmicos, como referido anteriormente (Kawachi *et al.*, 2000). Embora o revestimento de material metálico com os cerâmicos se trate de um processo complexo que determina consideravelmente o sucesso clínico, esta associação permite aliar as vantagens intrínsecas dos biocerâmicos com a resistência do metal. Um benefício adicional obtido é que a libertação de iões metálicos da liga metálica é muito reduzida. O cerâmico vai actuar como uma eficaz barreira que retarda a cinética de difusão dos iões metálicos para o organismo (Vallet-Regí, 2001).

Relativamente às aplicações dentárias é necessário acrescentar as exigências estéticas (cor, translucidez) às especificações mecânicas. Do branco ao marfim existe uma clara vantagem dos cerâmicos comparativamente aos metais, sendo a razão porque as investigações e os desenvolvimentos estão actualmente direccionados para a restauração protética livre de metal. Além disso, os cerâmicos não sofrem corrosão como pode ser observado nos metais. A procura clínica para todos os cerâmicos para restauração está a aumentar e os cerâmicos estão a tornar-se importantes materiais para a restauração dentária (Chevalier *et al.*, 2009).

Os biocerâmicos podem ser utilizados na forma densa e na forma porosa. Apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, a existência de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento de tecido através deles, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, por consequência, a resistência do material *in vivo* (Vallet-Regí, 2001). O crescimento de tecido no interior dos poros é designado de fixação biológica. Uma boa fixação biológica requer poros de dimensões superiores a 100-150 μm de diâmetro para que haja um bom fornecimento de sangue aos tecidos hospedeiros (Cao *et al.*, 1996).

Os já mencionados implantes reabsorvíveis são cerâmicos bioactivos projectados para se degradarem gradualmente ao longo do tempo e serem substituídos por tecidos

naturais do hospedeiro. Um aspecto importante é que a taxa de reabsorção deve acompanhar a taxa de reparação dos tecidos do corpo (Cao *et al.*, 1996).

Tabela 1.3. Classificação geral dos biocerâmicos (Kawachi *et al.*, 2000)

Tipo de biocerâmico	Interacções com os tecidos	Exemplos
Inerte	Não há interacções químicas nem biológicas – Fixação morfológica (ligação mecânica)	Alumina, Zircónia
Bioactivo	Ocorre uma forte ligação na interface osso-implante – Fixação bioactiva	Biovidros, HA e vitrocerâmicos
Poroso	Ocorre o crescimento dos tecidos no interior dos poros – Fixação biológica	Aluminatos e HA porosa
Reabsorvível	Os biocerâmicos são degradados e substituídos pelos tecidos naturais	Fosfatos de cálcio

A maioria dos cerâmicos bioactivos é baseada em materiais de fosfato de cálcio (CaP), devido à semelhança com o osso mineral (Chevalier *et al.*, 2009).

Os CaP têm merecido lugar de destaque entre os denominados biocerâmicos por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistémica, baixa resposta inflamatória, ausência de fibrose ou reacção imunológica e aparente capacidade em se ligar ao tecido hospedeiro (Vallet-Regí, 2001). Tais características devem-se à natureza química destes materiais que, por serem formados basicamente por iões de cálcio e fosfato, participam activamente do equilíbrio iónico entre o fluído biológico e o cerâmico (Kawachi *et al.*, 2000).

Até à data, os biomateriais de CaP têm sido amplamente usados na área clínica na forma de pó, grânulos, blocos densos ou porosos, revestimentos e com várias composições (Ferraz *et al.*, 2004; Vallet-Regí, 2010). Devido à sua excelente biocompatibilidade, os CaP são hoje utilizados numa variedade de aplicações abrangendo todas as áreas do esqueleto, incluindo fusão da espinal medula, reconstrução crâniomaxilofacial, tratamento de defeitos ósseos ou fracturas, cirurgia de revisão e como revestimento de

próteses metálicas, para assegurar a ligação não cimentada ao osso hospedeiro. Porém, nem todos os compostos de CaP são úteis para implantação no corpo, compostos com uma razão Ca/P menor que 1 não são adequados para implantação biológica devido à sua alta solubilidade (Best *et al.*, 2008; Jakubowski *et al.*, 2008).

Contudo, os CaP para substituição óssea não oferecem total satisfação. A macro e micro porosidade e o seu efeito nas propriedades biológicas nem sempre são tidos em conta, o que resulta numa grande variabilidade de propriedades físico-químicas entre os actuais substitutos comercializados. Outra forte limitação é a sua fragilidade associada à baixa resistência à fractura, que restringe o seu uso a aplicações de baixa carga. Por último, mas não menos importante, a sua bioactividade deve ser aumentada de forma a promover uma reconstrução óssea mais rápida e mais efectiva (Chevalier *et al.*, 2009).

De entre os cerâmicos de CaP a HA, por ser o principal componente presente na fase mineral do osso, é, sem dúvida, a mais estudada e mais utilizada para finalidades clínicas (Kawachi *et al.*, 2000).

2.2.1 Hidroxiapatite

A hidroxiapatite é um dos fosfatos de cálcio sintéticos mais largamente usados e isso deve-se à sua semelhança química com o componente inorgânico dos tecidos duros. A HA, com a fórmula química $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, sendo mais tipicamente representada como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para indicar que a célula unitária compreende duas moléculas de cristal, tem uma composição teórica de 39.68 wt% Ca, 18.45 wt% P; razão Ca/P wt de 2.151 e razão molar Ca/P de 1.667 (Best *et al.*, 2008).

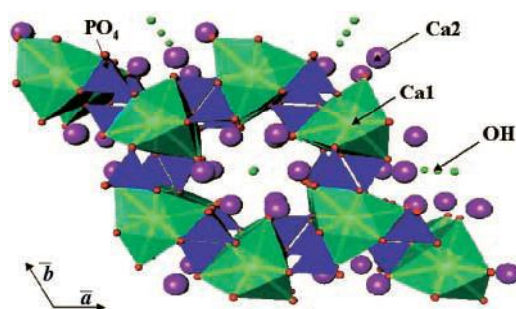


Figura 1.4. Representação esquemática da estrutura da hidroxiapatite (Vallet-Regí, 2001).

A compreensão detalhada das diferenças entre a apatite biológica e a HA sintética pura é importante para a produção, design e uso deste biomaterial como implante. Estas diferenças verificam-se ao nível da composição química resultado das substituições iónicas anteriormente referidas (Cao *et al.*, 1996). Existe também uma grande diferença na microestrutura entre a apatite biológica e o cerâmico sintético HA sendo que os cristais naturais de HA são de dimensões nanométricas, enquanto a maioria dos substituintes ósseos sintéticos em uso clínico são constituídos por grãos de dimensões micrométricas (Chevalier *et al.*, 2009). Por fim, a apatite biológica encontra-se associada a materiais orgânicos, no caso do osso principalmente o colagénio, que tem uma enorme influência nas propriedades físico-químicas e biológicas da apatite (Cao *et al.*, 1996).

Deve-se manter em mente que os cerâmicos com estrutura nanométrica podem oferecer algumas melhorias específicas em comparação com aqueles com estrutura micrométrica nomeadamente uma melhoria na troca de iões com o ambiente fisiológico, maior adsorção de proteínas e melhor resposta celular, uma vez que exibem elevada superfície específica e características físico-químicas similares às dos nanocristais do osso (Chevalier *et al.*, 2009; Drouet *et al.*, 2009).

Actualmente as aplicações da HA focam-se principalmente no preenchimento de defeitos ósseos resultantes da remoção de vastas áreas de osso (por exemplo remoção de cancros ósseos, defeitos decorrentes de traumas ou acidentes) ou em situações em que há a necessidade de aumento ósseo (reconstruções maxilofaciais ou aplicações dentárias). Nestas situações a HA actua como suporte, promovendo o rápido preenchimento das cavidades com novo osso fazendo parte da estrutura óssea entretanto originada, pelo que reduz consideravelmente os tempos de recuperação comparativamente a situações nas quais não é usada como preenchimento ósseo. A HA está também a ser usada para melhorar as próteses articulares da anca, devido às suas extraordinárias propriedades biológicas. Estudos mais recentes avaliam a capacidade da HA poder servir como veículo para o transporte de factores bioquímicos utilizados na engenharia de tecidos bem como o transporte de fármacos ou drogas para o tratamento de cancro graças à capacidade da HA adsorver e/ou absorver moléculas acoplada à libertação gradual da droga num local específico do organismo (Vallet-Regí, 2001; Mateus *et al.*, 2008).

3. Estudo da adesão bacteriana a biomateriais

Quando se projecta um modelo *in vitro* para o estudo da adesão bacteriana vários factores devem ser tidos em consideração nomeadamente, selecção das bactérias, preparação e caracterização dos materiais, condução das experiências de adesão bacteriana e preparação das amostras para avaliação (An *et al.*, 1997).

3.1. Procedimento experimental

De acordo com a finalidade específica do trabalho, a selecção e preparação das bactérias deve ser cuidadosa de forma a atingir-se o melhor resultado. Deve ter-se em consideração que podem ocorrer mudanças significativas com isolados clínicos quando cultivados em laboratório nomeadamente, a produção de polímeros na superfície celular pode ser fortemente influenciada pelas condições de crescimento; as centrifugações e lavagens podem remover a cápsula e o *slime* bacteriano; assim como a adesão bacteriana pode ser influenciada pela presença de outras espécies (An *et al.*, 1997).

Relativamente aos meios de incubação existem dois aspectos importantes que devem ser considerados: a composição do líquido e o seu movimento sobre o material. As variáveis que dizem respeito à composição do meio incluem os materiais dissolvidos e em suspensão, particularmente iões, proteínas, detergentes e gases atmosféricos. Electrólitos e sobretudo catiões multivalentes, como o cálcio e o magnésio, podem promover a adesão através da ligação cruzada de grupos aniónicos da superfície bacteriana e do material. A concentração dos electrólitos pode também influenciar as interacções hidrofóbicas, podendo a adesão bacteriana ser condicionada pelo pH. O controlo adequado para a experimentação consiste no uso de soluções salinas de referência preparadas com água bi-distilada (Christensen *et al.*, 1989). O posicionamento da amostra na suspensão bacteriana é um aspecto relevante, uma vez que a superfície a ser estudada deve estar em contacto constante com a suspensão. As condições de fluxo da suspensão são igualmente importantes e influenciam o fluxo de bactérias e as forças físicas na superfície do material, devendo ser consistentes para cada amostra (An *et al.*, 1997). Nos sistemas estáticos a gravidade desempenha um papel dominante, por isso a agitação lenta do tubo de ensaio constitui uma forma de manter as bactérias em suspensão (Christensen *et al.*, 1989).

A lavagem é um passo importante no estudo da adesão bacteriana que tem como objectivo a remoção das bactérias que não aderiram ou que se encontram fracamente aderidas à superfície do material. Os líquidos comumente utilizados para a lavagem incluem água estéril, soro fisiológico ou solução tampão de fosfato (An *et al.*, 1997).

Nas experiências em que se pretende estudar a adesão bacteriana (em oposição à proliferação) os períodos de incubação vão até duas horas e são utilizadas suspensões bacterianas densas (10^6 - 10^8 CFUs/mm² material) assim como a ausência de nutrientes (Christensen *et al.*, 1995; An *et al.*, 1998).

3.2. Métodos utilizados na caracterização dos materiais

A caracterização dos materiais, em particular das suas superfícies, é uma etapa fundamental no estudo da adesão bacteriana inicial porque permite comparações e análises adequadas. Na tabela 1.4 estão descritas algumas técnicas utilizadas nesta caracterização e o respectivo objectivo.

Tabela 1.4. Técnicas utilizadas na caracterização dos materiais (Mateus *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2007; Weir *et al.*, 2008)

Técnica analítica	Objectivo
Medição do ângulo de contacto	Determinação da hidrofobicidade da superfície
Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	Caracterização química e identificação dos grupos funcionais na superfície
Espectroscopia de dispersão de energia (EDS)	Caracterização química semi-quantitativa superficial e localizada
Espectroscopia de UV-visível	Confirmação da presença de partículas em solução
Difracção de raios X (XRD)	Identificação da estrutura cristalina e fases presentes
Porosimetria de mercúrio	Determinação da área de superfície e porosidade
Microscopia electrónica de transmissão (TEM)	Determinação do tamanho, forma e arranjo das partículas
Microscopia electrónica de varrimento	Análise da morfologia da superfície das amostras
Microscopia de força atómica (AFM)	Análise da topografia da superfície das amostras

3.3. Métodos utilizados no estudo e quantificação de bactérias aderidas

A quantificação das bactérias constitui uma etapa fundamental para compreender a adesão bacteriana. Os métodos usados para avaliar e contar microrganismos em superfícies estão indicados na tabela 1.5, assim como as respectivas vantagens e desvantagens.

Tabela 1.5. Métodos utilizados no estudo e quantificação de microrganismos aderidos a uma superfície (An *et al.*, 1997; Katsikogianni, *et al.*, 2004; Weir *et al.*, 2008)

Métodos	Vantagens	Limitações
Microscópio óptico	Rápido. Exige pouca instrumentação. Permite a visualização de estruturas da superfície bacteriana	Sem um método automático associado a contagem pode ser morosa. Pouco sensível. Requer material transparente e liso
Microscópio de epifluorescência	Possível diferenciar bactérias vivas e mortas. Associado a programas de análise de imagem permite contagens rápidas das células aderidas. Rápido e fácil na caracterização de biofilmes. Uso com materiais opacos.	Necessidade de recorrer a fluorocromos para visualizar as bactérias. Apenas imagens bidimensionais. Limitado à investigação macroscópica das interações bactéria-superfície.
Microscópio confocal de varrimento a laser (CSLM)	Imagens tridimensionais do biofilme. Permite a visualização de bactérias e biofilmes <i>in situ</i> na forma hidratada. As células viáveis podem ser rapidamente contadas recorrendo a programas de análise de imagem. O desenvolvimento e a estrutura interna do biofilme podem ser monitorizados sem que haja perturbação do mesmo.	As bactérias necessitam de ser coradas ou marcadas com sondas oligonucleotídeas para visualização. Equipamento dispendioso.

(*Continua*)

Tabela 1.5 (Continuação). Métodos utilizados no estudo e quantificação de microrganismos aderidos a uma superfície (An *et al.*, 1997; Katsikogianni, *et al.*, 2004; Weir *et al.*, 2008)

Métodos	Vantagens	Limitações
Microscópio electrónico de transmissão (TEM)	Amostras biológicas podem ser observadas na forma hidratada. Fornece informações sobre detalhes da estrutura interna da bactéria ou biofilme. Determinação da composição química da amostra recorrendo ao EDX.	Pequeno campo de visualização. Impossível diferenciar bactérias vivas e mortas. Não permite a visualização de amostras biológicas em meio aquoso. Demora na preparação das amostras uma vez que necessitam de ser finas.
Microscópio de força atómica (AFM)	Imagens tridimensionais a alta resolução. Sem necessidade de preparação prévia das amostras. Não destrutiva. Podem ser visualizadas <i>in situ</i> bactérias vivas. Mapeamento das forças bactéria-superfície.	Campo de visualização limitado. Impossível diferenciar bactérias vivas e mortas. A recolha de imagens pode ser morosa.
Coloração bacteriana	Contagem directa. Determinação da actividade metabólica. Avaliação das bactérias aderidas <i>in situ</i> . Método simples.	Sem um método automático associado a contagem pode ser morosa. Meio residual e ácidos nucleicos podem dificultar a contagem por ligação aos corantes.
Marcação radioactiva	Útil no estudo da adesão a materiais irregulares. Sensível e preciso. Permite a rápida análise de um grande número de amostras.	Materiais radioactivos. Requer equipamento e espaço no laboratório especializado. Potencial risco para o operador.
Técnicas de biologia molecular	Método sensível. Uma espécie bacteriana pode ser visualizada numa comunidade heterogénea por marcação fluorescente. Pode identificar e quantificar a totalidade de uma comunidade bacteriana aderida a uma superfície. Alternativa ao cultivo em placa.	A marcação pode alterar o comportamento bacteriano.

Os métodos: contagem das unidades formadoras de colónias e microscopia electrónica de varrimento são igualmente utilizados no estudo e quantificação da adesão bacteriana, sendo abordados em maior detalhe nas secções seguintes uma vez que foram os métodos utilizados no trabalho prático.

3.3.1 Contagem das unidades formadoras de colónias

A contagem das unidades formadoras de colónias (CFUs) de bactérias aderidas à superfície de um material é um dos métodos mais utilizados para contagem celular. Após a incubação com a bactéria em estudo, o material é lavado para eliminar as bactérias que não aderiram. A remoção das células aderidas da superfície do material é, geralmente, realizada por sonicação, homogeneização ou raspagem do material num volume de líquido conhecido. Dependendo da concentração celular nesse volume de líquido, as células podem ser adicionadas directamente para placas de Petri ou diluídas em série. Pelo método de incorporação, um volume de 1 ou 0.1 ml do líquido é misturado com uma quantidade apropriada de agar diluído em placas estéreis. Pelo método de espalhamento, são efectuadas uma série de diluições da solução original, e um volume de 0,1 ml de cada diluição é pipetado para a superfície das placas com agar solidificado sendo a gota depois espalhada por toda a superfície. Após incubação a contagem do número de células viáveis é conduzida por contagem manual das CFUs. Existem desvantagens neste método, nomeadamente: só são contadas as células viáveis (vivas) não se tem em consideração a presença de células debilitadas. Neste método existem muitas variáveis nas condições de crescimento que podem afectar a reprodutibilidade dos resultados, a considerar: temperatura, tempo de incubação ou mesmo tipo de biomassa, não esquecendo que nem todas as espécies bacterianas são passíveis de cultivo em laboratório. Além disso, trata-se de um procedimento moroso que requer uma considerável quantidade de equipamento comparativamente com outras formas de contagem (Weir *et al.*, 2008; An *et al.*, 1997).

3.3.2 Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento (SEM) é um método bem estabelecido que pode ser utilizado para a caracterização dos materiais, para o estudo da adesão e

formação de biofilmes bacterianos, para a observação da relação que se estabelece entre a bactéria e o material ou para a determinação da composição química recorrendo ao EDX (energia de dispersão de raios X). As bactérias aderidas podem ser visualizadas por imagens de SEM devido à alta resolução do equipamento permitindo a análise da morfologia celular. Para visualização procede-se à fixação das células na superfície do material que pode ser feito recorrendo a glutaraldeído ou por exposição do material a soluções de etanol com concentrações crescentes, ou ambos. Se o material não for condutor, uma camada de ouro é depositada na superfície por pulverização (o recurso a microscopia electrónica de varrimento ambiental (ESEM), com utilização de câmaras de baixo vácuo podem eliminar a necessidade de recobrimento condutor). O SEM tem sido referido como um método de contagem das células bacterianas aderidas, contudo esta não é uma opção prática uma vez que o campo de análise é muito pequeno e o processo moroso. Note-se que durante a preparação das amostras o processo de desidratação é considerado causa de retracção celular podendo agravar outros factores indesejáveis, como danos ou distorções no biofilme, nomeadamente perda da matriz de EPS. Uma das principais desvantagens do uso do SEM, para além de não permitir a visualização do interior do biofilme, é que o procedimento para a preparação das amostras pode ser moroso e trabalhoso (Weir *et al.*, 2008; An *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1995).

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

Os materiais utilizados neste estudo foram a hidroxiapatite nanométrica (nanoHA) (nanoXIM-HAp202), cedida em pó pela empresa Fluidinova S.A. (Maia, Portugal) (Fluidinova 2005), e a hidroxiapatite micrométrica (microHA) (Plasma Biotal, UK, ref. P120) cedida pelo INEB (Instituto de Engenharia Biomédicas, Portugal), utilizada como material de controlo.

1.1. Síntese

Conforme descrito por Ribeiro *et al.* (2009), foram preparados discos de agregados de nanoHA e microHA com 10 mm de diâmetro. Para isso, foram pesados, para cada disco, 75 mg do respectivo pó e utilizado um molde em aço inoxidável, para a compactação. O molde contendo o pó foi comprimido uniaxialmente a uma pressão de 40 bar numa prensa manual (Prensa Mestra Snow, P3, Talleres Mestraitua).

1.2. Sinterização

Os discos, depois de preparados, foram submetidos a um ciclo de sinterização no forno Commodore II (VPF, Jelenko). Conforme utilizado por Ribeiro *et al.* (2009), as temperaturas de sinterização foram de 725°C e 1000°C durante 15 minutos, com uma velocidade de aquecimento de 20°C por minuto. O ciclo de sinterização ficou completo com um processo de arrefecimento no interior do forno (9°C/min).

O aquecimento do material a altas temperaturas (sinterização) leva à fusão superficial parcial das partículas do pó, fazendo com que elas se aglomerem e formem um bloco sólido e denso (Kawachi *et al.*, 2000).

1.3. Esterilização

Para evitar a incorporação de vapor de água nos materiais durante o processo de autoclavagem, a esterilização dos discos foi feita por calor seco, em estufa (FP115, Binder) a 180°C, durante duas horas à pressão atmosférica (Eginton *et al.*, 1995).

2. Caracterização dos materiais

2.1. Medição do ângulo de contacto

A hidrofobicidade da superfície dos materiais foi determinada através da medição do ângulo de contacto (θ) pela técnica da gota séssil, utilizando um aparelho de medição automatizado (Dataphysics Instruments GmbH, model OCA 15). O líquido utilizado nesta análise foi a água ultra pura e todas as medições (pelo menos 30 para cada material) foram realizadas à temperatura e humidade ambiente. A deposição de uma gota de 2 μl em cada superfície foi registada em vídeo e analisada de forma a obter o valor do ângulo de contacto (Katsikogianni *et al.*, 2006).

2.2. Determinação da rugosidade e topografia

A rugosidade e a topografia da superfície dos materiais em estudo foram determinadas por microscopia de força atómica (AFM) recorrendo ao NanoScope IVa (Veeco Multimode) no modo *tapping* (intermitente), com pontas de silicone (Veeco RTESP). As medições efectuaram-se em dois campos de cada material, escolhidos aleatoriamente, com áreas de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ e $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ (Katsikogianni *et al.*, 2008).

As rugosidades das superfícies foram analisadas através do valor da rugosidade superficial média (R_a) ou seja, o valor aritmético médio de todos os desvios e perfis a partir da linha média, ao longo do comprimento em que é efectuada a medição, como representado na figura 2.1 (Gadelmawla *et al.*, 2002).

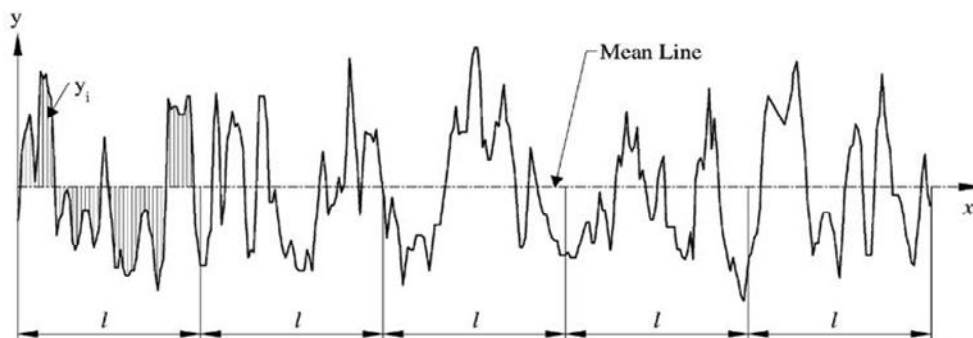


Figura 2.1. Definição da rugosidade média - R_a (Gadelmawla *et al.*, 2002).

3. Microrganismos

3.1 Estirpes bacterianas

Neste estudo foram utilizadas 4 estirpes de *Staphylococcus aureus*. Uma estirpe de colecção, ATCC 25923, e um isolado clínico com fenótipo MRSA, ambos cedidos pelo CEBIMED (Centro de Estudos em Biomedicina, Universidade Fernando Pessoa, Portugal), os dois outros isolados clínicos utilizados no presente estudo foram gentilmente cedidos pela Dra. Ana Paula Pacheco, e foram isolados de infecções ósseas apresentando o fenótipo MRSA e MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina).

Da espécie *Staphylococcus epidermidis* foram utilizadas a estirpe de referência RP62A (ATCC 35984) produtora de *slime* (Götz, 2002) e um isolado clínico fornecido pelo CEBIMED. Por fim, foi utilizada uma estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de uma infecção óssea cedida pela Dra. Ana Paula Pacheco.

Os isolados clínicos fornecidos pelo CEBIMED surgem associados à designação – UFP, e os isolados de infecções ósseas associados à designação – ORT.

3.2 Condições de armazenamento e cultura

A manutenção das estirpes utilizadas neste estudo foi feita em caldo de soja tripticase (TSB, *Tryptic Soy Broth*, Difco, EUA) com 30% de glicerol (Fluka, Alemanha), a -20°C (Katsikogianni *et al.*, 2008).

Sempre que necessário, as suspensões bacterianas congeladas foram inoculadas em meio apropriado. No caso das estirpes de *S. aureus* foram repicadas para o meio agar nutriente (NA, *Nutrient Agar*, Liofilchem, Itália), as estirpes de *S. epidermidis* para o meio de agar de infusão de cérebro-coração (BHI agar, *Brain Heart Infusion agar*, Liofilchem, Itália) e a estirpe de *P. aeruginosa* para o meio de agar de cistina lactose deficiente em electrólitos (CLED agar, *Cystine Lactose Electrolyte Deficient agar*, Liofilchem, Itália) e incubadas durante 24 horas a 37°C.

Todos os meios foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

4 Estudo da adesão bacteriana inicial

Para os ensaios de adesão bacteriana inicial aos materiais em estudo, as várias estirpes foram inoculadas em 15 ml de TSB e colocadas a incubar durante 24 horas a 37°C. Após as 24 horas, 50 µl da cultura foi transferido para um tubo contendo 30 ml de TSB estéril e colocado novamente a incubar num banho (GFL 1083) a 37°C com agitação moderada durante 18 horas. As suspensões bacterianas foram depois centrifugadas (Labofuge 400R, Heraeus) durante 5 minutos a 1050 g. As células bacterianas foram lavadas duas vezes e ressuspensas em soro fisiológico (Cerca *et al.*, 2005). A densidade das suspensões bacterianas foi ajustada à concentração final de, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ CFUs/ml (Fonseca *et al.*, 2001), recorrendo a um densitómetro (Densimat, BioMérieux, França) e respectiva escala McFarland (Katsikogianni *et al.*, 2008).

Os vários materiais foram colocados em tubos de vidro com 2 ml da suspensão bacteriana, anteriormente preparada, e incubaram-se num banho a 37°C com agitação moderada durante 30, 60 e 90 minutos (Fonseca *et al.*, 2001; Papaioannou *et al.*, 2007). Os controlos negativos foram obtidos colocando os materiais em soro fisiológico estéril. Cada ensaio foi realizado em triplicado.

Após cada tempo de adesão, procedeu-se a duas lavagens cuidadosas das amostras com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, Sigma, EUA), de forma a remover as células que não aderiram e as que se encontravam fracamente aderidas ao material (Katsikogianni *et al.*, 2008).

4.1. Contagem das unidades formadoras de colónias

Após as lavagens, as amostras foram transferidas para tubos de vidro contendo 5 ml de PBS estéril. De seguida, as amostras foram sonicadas (Sonopuls HD 2200, Bandelin, Alemanha) durante um segundo a uma frequência de 20 kHz, com a sonda MS 73. Após a libertação das células aderidas efectuaram-se diluições decimais a partir da solução sonicada em PBS e procedeu-se ao respectivo plaqueamento pelo método de espalhamento (Fonseca *et al.*, 2001; Katsikogianni *et al.*, 2008).

O plaqueamento das estirpes de *S. aureus* foi feito em NA, de *S. epidermidis* em BHI agar e no caso da *P. aeruginosa* em CLED agar. O número de colónias de bactérias aderidas foi contado após 24 horas de incubação a 37°C. Efectuou-se uma leitura controlo às 48 horas para verificar se todas as células cresceram nas primeiras 24 horas.

Como controlo, após a sonicação, os discos foram levados ao SEM para avaliar a eficácia da sonicação aplicada e garantir que todas as células foram removidas do material.

Inicialmente, o número de células aderidas foi expresso em termos de CFUs/ml, calculado segundo a equação 1.

$$CFU/ml = \frac{N^{\circ} \text{ de colónias} \times \text{Factor de diluição}}{\text{Volume inoculado}} \quad (1)$$

De seguida, os valores de CFUs/ml foram ajustados à área dos discos de forma a serem expressos em CFUs/mm².

4.2. Microscopia electrónica de varrimento

Após as lavagens, as amostras foram transferidas para uma microplaca de poços onde se procedeu à fixação das células bacterianas com glutaraldeído 1.5% (Fluka, Alemanha) durante 20 minutos. Cada amostra foi de seguida desidratada por diversas passagens em soluções com concentrações crescentes de álcool (70, 80, 96 e 100% (v/v)) durante 10 minutos em cada solução (Katsikogianni *et al.*, 2006).

Nos ensaios em que se trabalhou com as estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis*, após desidratação, as amostras foram secas ao ar durante a noite. Nos ensaios em que se trabalhou com a espécie Gram negativa *P. aeruginosa*, as respectivas amostras foram levadas ao ponto crítico (Critical Point Drier, CPD 7501, Polaron Range), de modo a impedir o colapso das células bacterianas.

Uma vez que para análise em SEM as amostras têm que ser electricamente condutoras foi necessário colar as amostras numa fita de carbono num suporte de alumínio e, posteriormente, revesti-las por pulverização iónica com uma fina camada de liga de ouro/paládio no equipamento SPI – MODULE Sputter Coater (SPI supplies, EUA). A observação foi feita no microscópio FEI Quanta 400 FEG ESEM (FEI, EUA), com uma energia de aceleração de 15 kV.

A fim de avaliar o grau e extensão da adesão bacteriana em cada material, foram escolhidos aleatoriamente cinco campos e analisados com ampliação variável entre 5000× e 10000×. Sempre que necessário foram utilizadas ampliações maiores para avaliar as interacções entre bactérias contíguas assim como as interacções bactéria-material (Teixeira *et al.*, 2007; Mateus, *et al.*, 2008).

5. Análise estatística dos dados

Para a comparação dos valores de adesão bacteriana aos diferentes materiais, ao longo do tempo, utilizou-se o método estatístico *one-way analysis of variance* (One-way ANOVA) seguido de testes *post hoc* utilizando o teste de Tukey. Em todas as análises realizadas o intervalo de confiança utilizado foi de 95%. Estes testes foram realizados utilizando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Inc., EUA) (versão 17.0).

III. RESULTADOS

1. Caracterização dos materiais

1.1. Medição do ângulo de contacto

A hidrofobicidade dos materiais foi avaliada através da medição do ângulo de contacto (θ) pela técnica da gota séssil. O líquido utilizado foi água ultra pura e foram realizados pelo menos 30 ensaios para cada material.

Tabela 3.1. Ângulos de contacto (e respectivos desvios padrões) para os materiais de nanoHA e microHA sinterizados a 725°C e 1000°C

Material	θ (°)
nanoHA 725	11,9 \pm 1,4
nanoHA 1000	53,2 \pm 18,2
microHA 725	8,7 \pm 1,0
microHA 1000	10,1 \pm 1,2

De acordo com a Tabela 3.1 os valores dos ângulos de contacto obtidos foram, em geral, baixos indicando materiais com superfícies altamente hidrofílicas, à excepção dos discos de nanoHA sinterizados a 1000°C que apresentaram o valor mais elevado, revelando uma superfície moderadamente hidrofílica. O aumento da temperatura de sinterização resultou num aumento do valor de ângulo de contacto obtido, que se traduziu num aumento da hidrofobicidade, sendo essa diferença mais significativa nos materiais de nanoHA.

1.2. Determinação da rugosidade e topografia

O valor da Ra e as imagens da topografia da superfície dos materiais foram obtidos por AFM no modo *tapping* (intermitente).

Tabela 3.2. Resultados da Ra para os materiais de nanoHA e microHA sinterizados a 725°C e 1000°C. Observações sobre áreas de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ e $30 \times 30 \mu\text{m}^2$

Material	Ra (nm)	Ra (nm)
	($2 \times 2 \mu\text{m}^2$)	($30 \times 30 \mu\text{m}^2$)
nanoHA 725	9,17	136
nanoHA 1000	18,70	478,5
microHA 725	64,95	219
microHA 1000	70,30	178,5

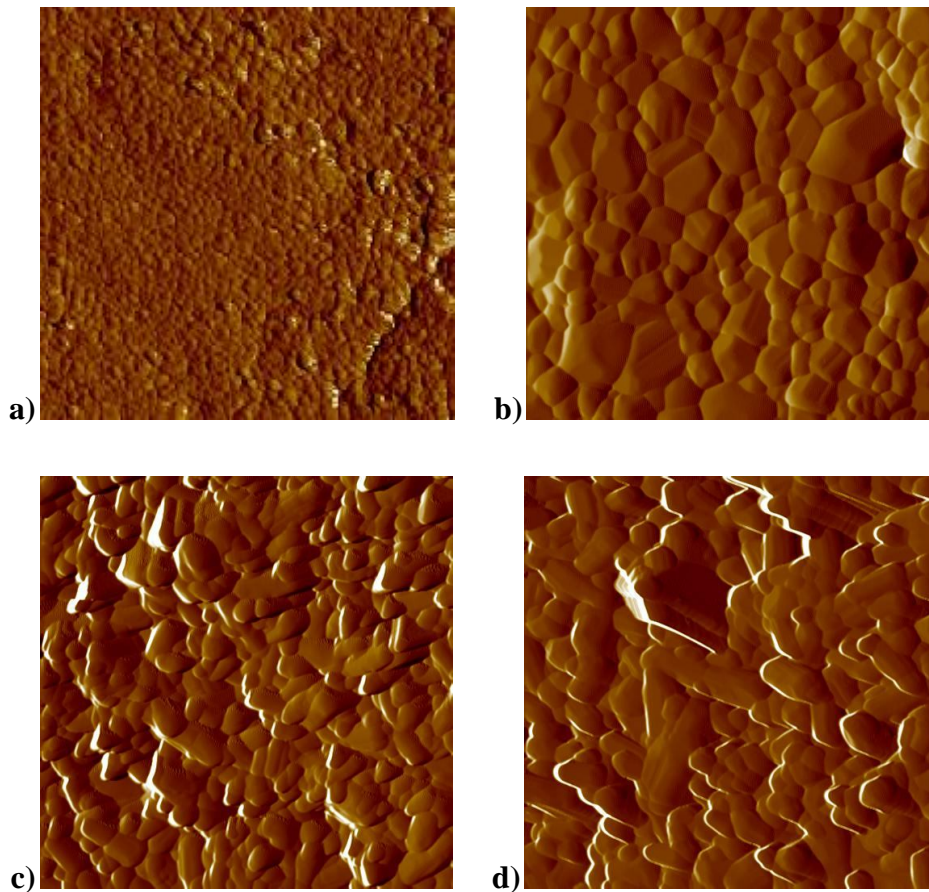


Figura 3.1. Imagens de AFM da topografia da superfície dos materiais numa área de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$. a) nanoHA 725; b) nanoHA 1000; c) microHA 725; d) microHA 1000.

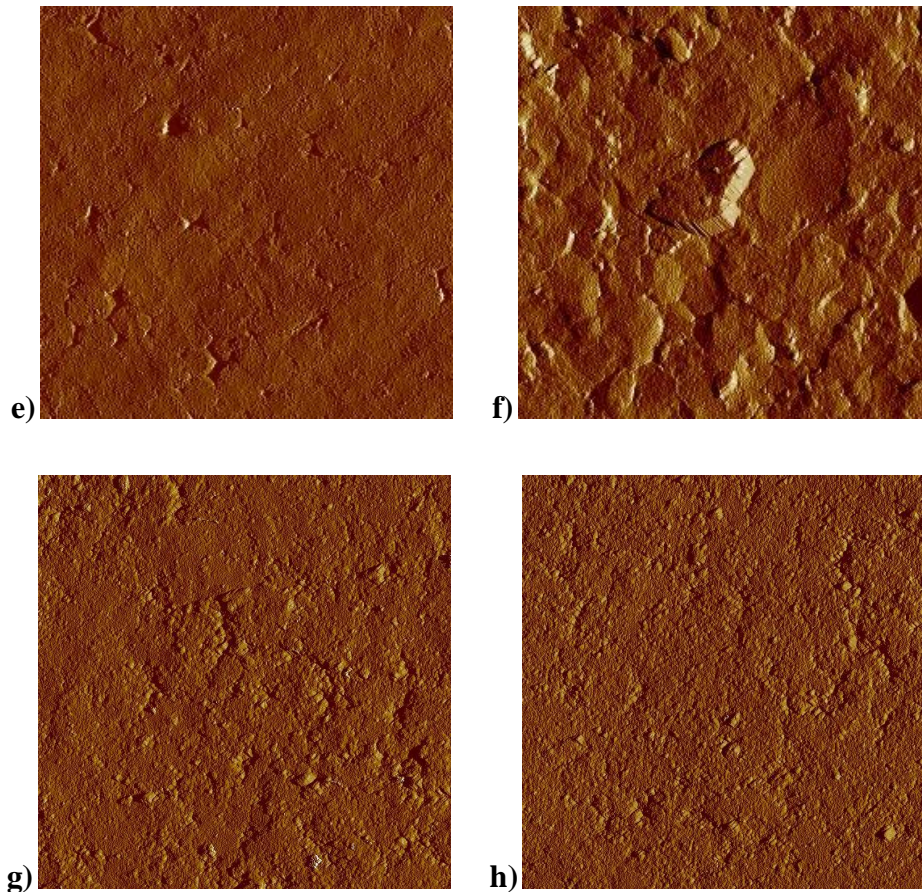


Figura 3.2. Imagens de AFM da topografia da superfície dos materiais numa área de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$. e) nanoHA 725; f) nanoHA 1000; g) microHA 725; h) microHA 1000.

As superfícies dos materiais de microHA apresentaram valores mais elevados de Ra, comparativamente com os materiais de nanoHA, à excepção dos discos de nanoHA 1000 quando a área de analisada foi de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$. O aumento da temperatura de sinterização resultou, para os discos de nanoHA, num aumento da Ra (Tabela 3.2).

As imagens da topografia das superfícies mostram que as superfícies dos discos de nanoHA são mais regulares sem as saliências proeminentes observadas nas superfícies de microHA (Figura 3.1). Quando se aumenta a área de análise essas diferenças deixam de ser tão evidentes, à excepção dos discos de nanoHA 1000 que apresentaram a superfície mais acidentada (Figura 3.2) e que, de facto, corresponde ao maior valor de Ra obtido.

2. Estudo da adesão bacteriana

2.1. Contagem das unidades formadoras de colónias

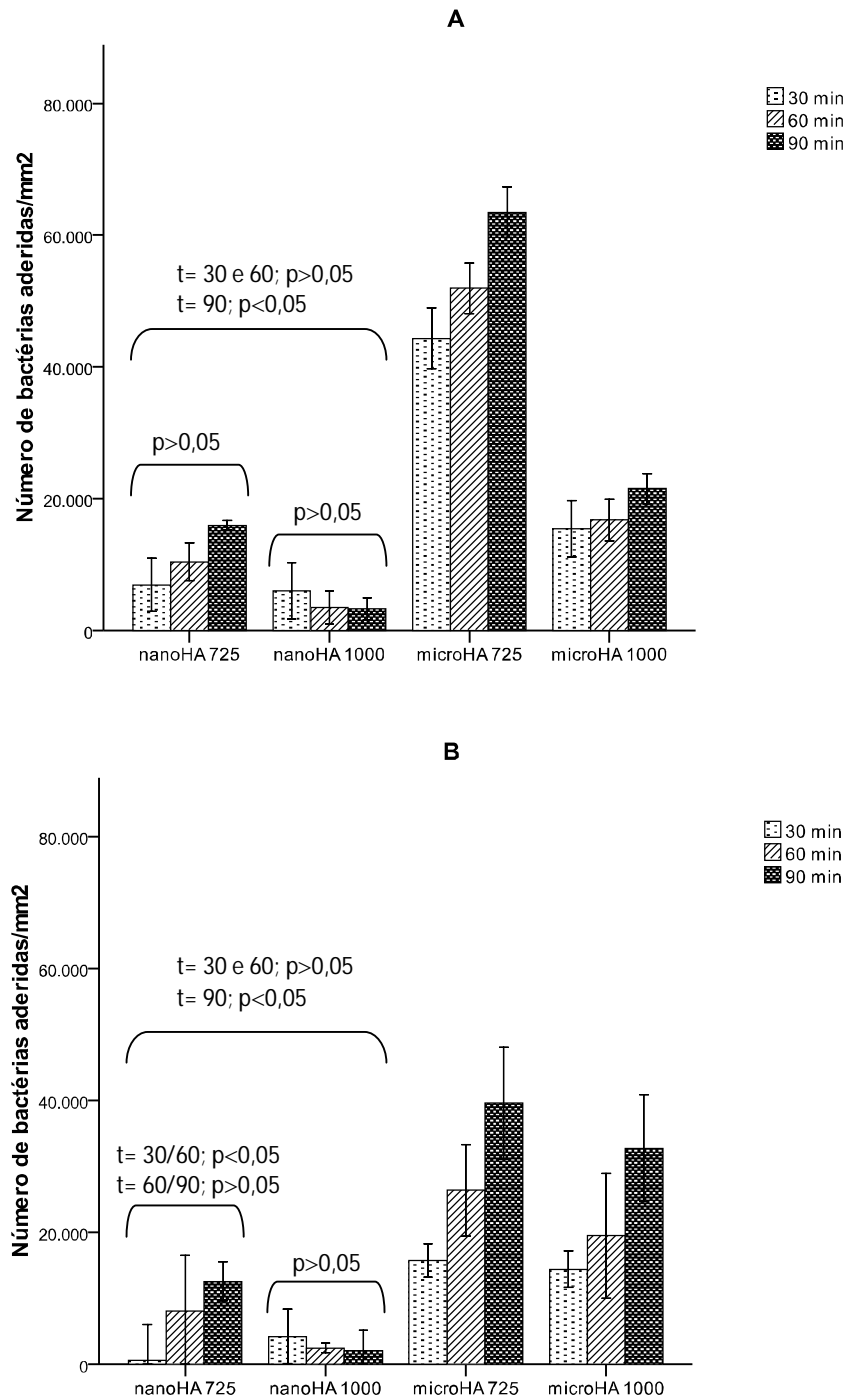


Figura 3.3. Número de bactérias aderidas por mm^2 aos discos de nanoHA 725, nanoHA 1000, microHA 725 e microHA 1000 após 30, 60 e 90 minutos de contacto. A- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e B- *Staphylococcus aureus* MRSA (UFP).

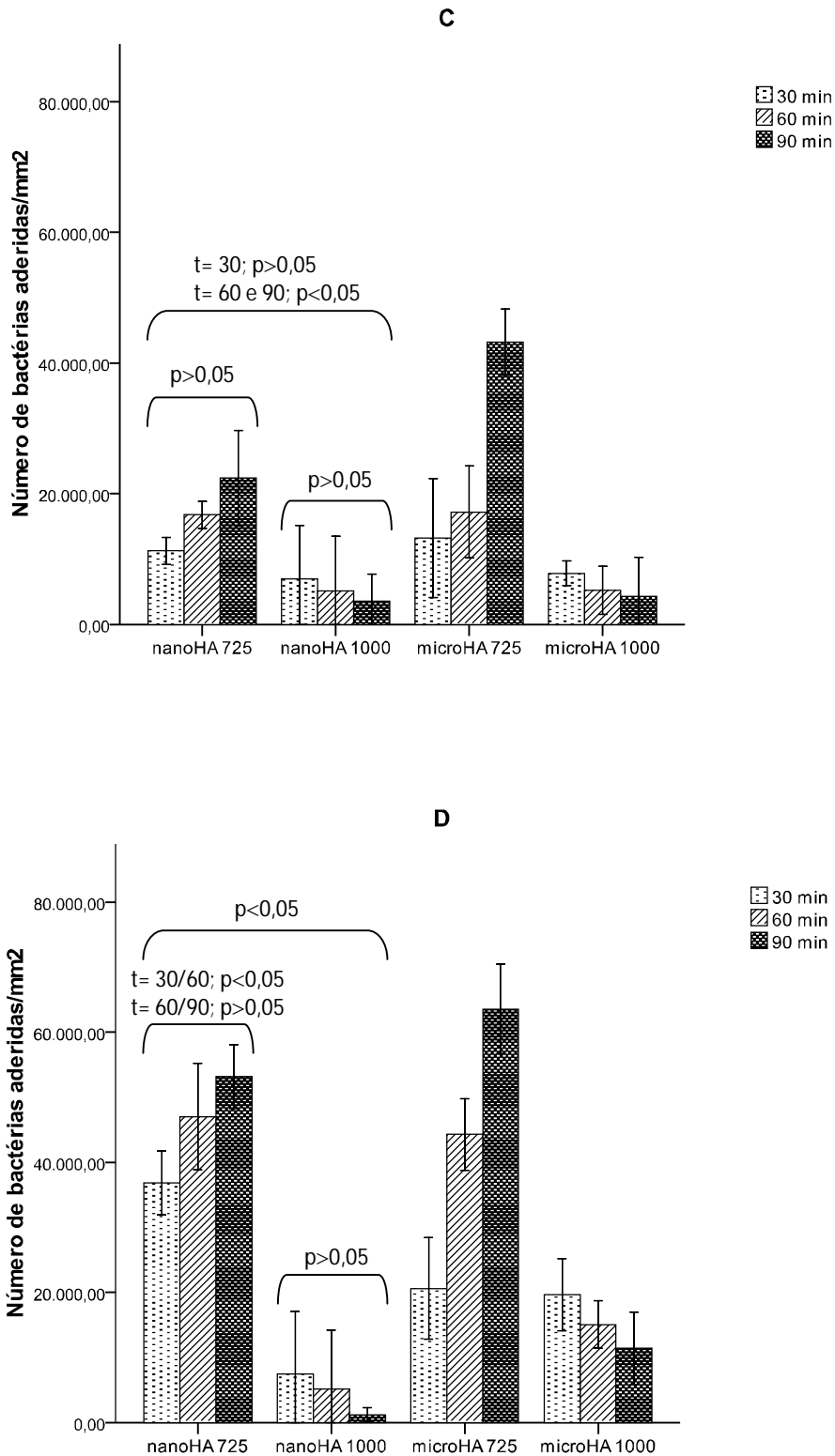


Figura 3.4. Número de bactérias aderidas por mm^2 aos discos de nanoHA 725, nanoHA 1000, microHA 725 e microHA 1000 após 30, 60 e 90 minutos de contacto. C- *Staphylococcus aureus* MRSA (ORT) e D- *Staphylococcus aureus* MSSA (ORT).

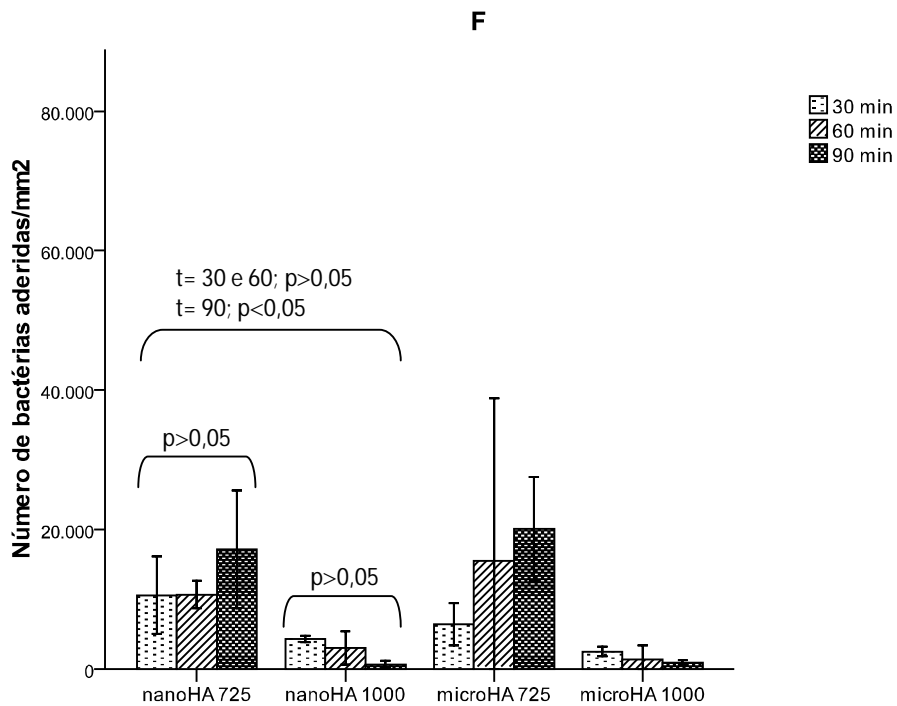
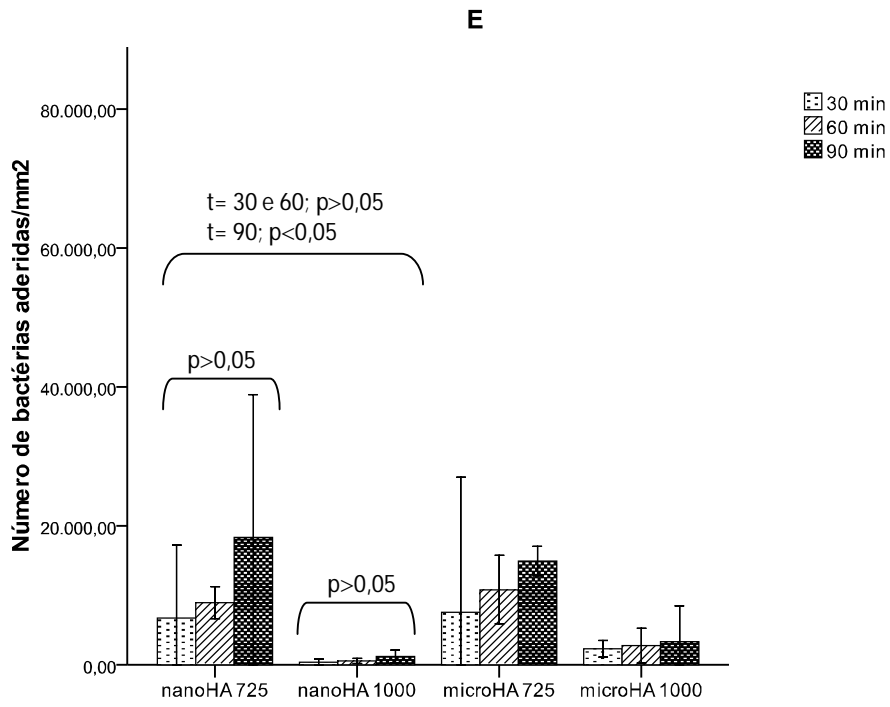


Figura 3.5. Número de bactérias aderidas por mm² aos discos de nanoHA 725, nanoHA 1000, microHA 725 e microHA 1000 após 30, 60 e 90 minutos de contacto. E- *Staphylococcus epidermidis* RP62A e F- *Staphylococcus epidermidis* (UFP).

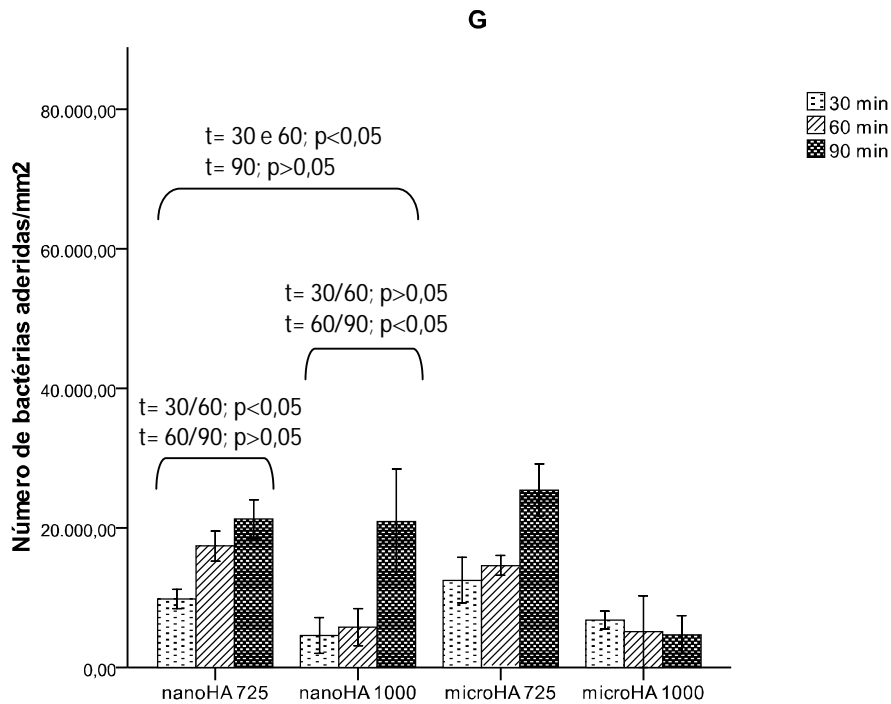


Figura 3.6. Número de bactérias aderidas por mm^2 aos discos de nanoHA 725, nanoHA 1000, microHA 725 e microHA 1000 após 30, 60 e 90 minutos de contacto. G- *Pseudomonas aeruginosa* (ORT).

Após a análise estatística dos valores de adesão obtidos para a estirpe *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 3.3A) verificou-se que para os materiais de nanoHA 725 e 1000 as diferenças observadas ao longo do tempo não são, estatisticamente, significativas e quando se compararam ambos os materiais, apenas aos 90 minutos se registaram diferenças significativas, sendo o material de nanoHA 1000 menos susceptível de adesão. Comparativamente com os materiais de microHA, os materiais de nanoHA são menos susceptíveis de adesão e a diferença de valores obtidos foram, estatisticamente, significativas. Relativamente à estirpe *S. aureus* MRSA (UFP) (Figura 3.3B) verificou-se que para o material de nanoHA 725 as diferenças significativas apenas se observaram entre o tempo de adesão 30 e 60 minutos. Para o material de nanoHA 1000 não se verificaram diferenças significativas nos valores de adesão obtidos ao longo do tempo. Quando comparados os dois materiais de nanoHA as diferenças significativas só foram observadas aos 90 minutos de adesão, sendo os materiais de nanoHA 1000 os menos

susceptíveis de adesão. Comparativamente com os controlos de microHA, e à semelhança do que ocorreu para a estirpe anterior, os materiais de nanoHA apresentaram valores de adesão significativamente mais baixos.

Relativamente aos isolados de infecções ósseas, a estirpe *S. aureus* MRSA (ORT) (Figura 3.4C) não apresentou diferenças significativas ao longo do tempo para ambos os materiais de nanoHA e quando se compararam os dois materiais as diferenças significativas observaram-se a partir dos 60 minutos de adesão. Comparativamente com os controlos, não se verificaram diferenças significativas à excepção dos materiais sinterizados a 725°C com 90 minutos de adesão onde os materiais de nanoHA 725 foram os menos susceptíveis de adesão. A estirpe *S. aureus* MSSA (ORT) (Figura 3.4D) apresentou diferenças significativas entre os tempos 30 e 60 minutos para o material de nanoHA 725, deixando estas de existir entre os 60 e 90 minutos de adesão. Para o material de nanoHA 1000 as diferenças observadas ao longo do tempo não foram significativas. Comparando os dois materiais de nanoHA, para todos os tempos verificaram-se diferenças significativas sendo os materiais de nanoHA 1000 menos susceptíveis de adesão bacteriana. Comparativamente com os controlos de microHA, para os materiais sinterizados a 725°C as diferenças significativas foram observadas aos 30 e 90 minutos. No caso dos materiais sinterizados a 1000°C para todos os tempos de adesão verificaram-se diferenças significativas. Em ambas as situações os materiais de nanoHA são os menos susceptíveis de adesão.

Relativamente à estirpe *S. epidermidis* RP62A (Figura 3.5E) não se verificaram diferenças ao longo do tempo para os dois materiais de nanoHA. Quando se compararam ambos os materiais apenas aos 90 minutos se observaram diferenças significativas entre os dois materiais. Comparativamente com os materiais de microHA, não se observaram diferenças significativas. Observações semelhantes foram assinaladas para o isolado clínico *S. epidermidis* (UFP) (Figura 3.5F) uma vez que para os materiais de nanoHA não se verificaram diferenças significativas entre os valores de adesão obtidos ao longo do tempo. Quando se compararam ambos os materiais apenas aos 90 minutos se observaram diferenças significativas e comparativamente com os materiais de microHA, não se registaram diferenças significativas.

Por fim, para a estirpe *P. aeruginosa* (ORT) (Figura 3.6G) isolada de uma infecção óssea verificaram-se, para o material de nanoHA 725, diferenças significativas entre os

tempos 30 e 60 minutos, deixando estas de existir entre os 60 e 90 minutos. Situação contrária obteve-se para o material de nanoHA 1000 em que apenas entre os 60 e 90 minutos se verificaram diferenças significativas. Quando se compararam ambos os materiais de nanoHA as diferenças significativas apenas se verificaram para os tempos de adesão de 30 e 60 minutos. Relativamente aos controlos, para ambas as temperaturas de sinterização, as diferenças significativas apenas foram observadas aos 90 minutos.

2.2. Microscopia electrónica de varrimento

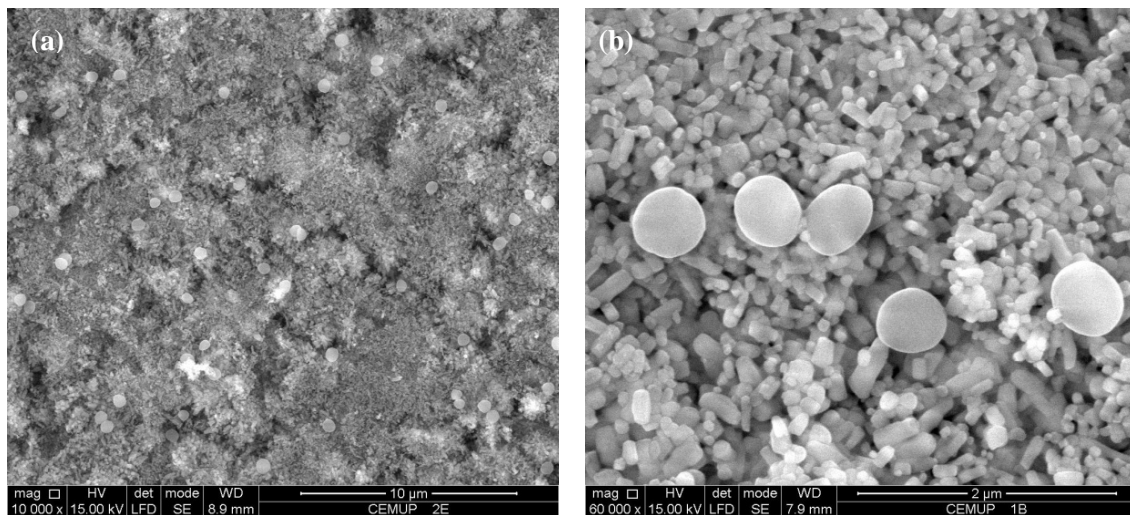


Figura 3.7. Imagens de SEM da adesão de *S. aureus* ATCC 25923 aos discos de microHA. (a) microHA 725 aos 90 minutos de contacto e (b) microHA 1000 aos 30 minutos de contacto.

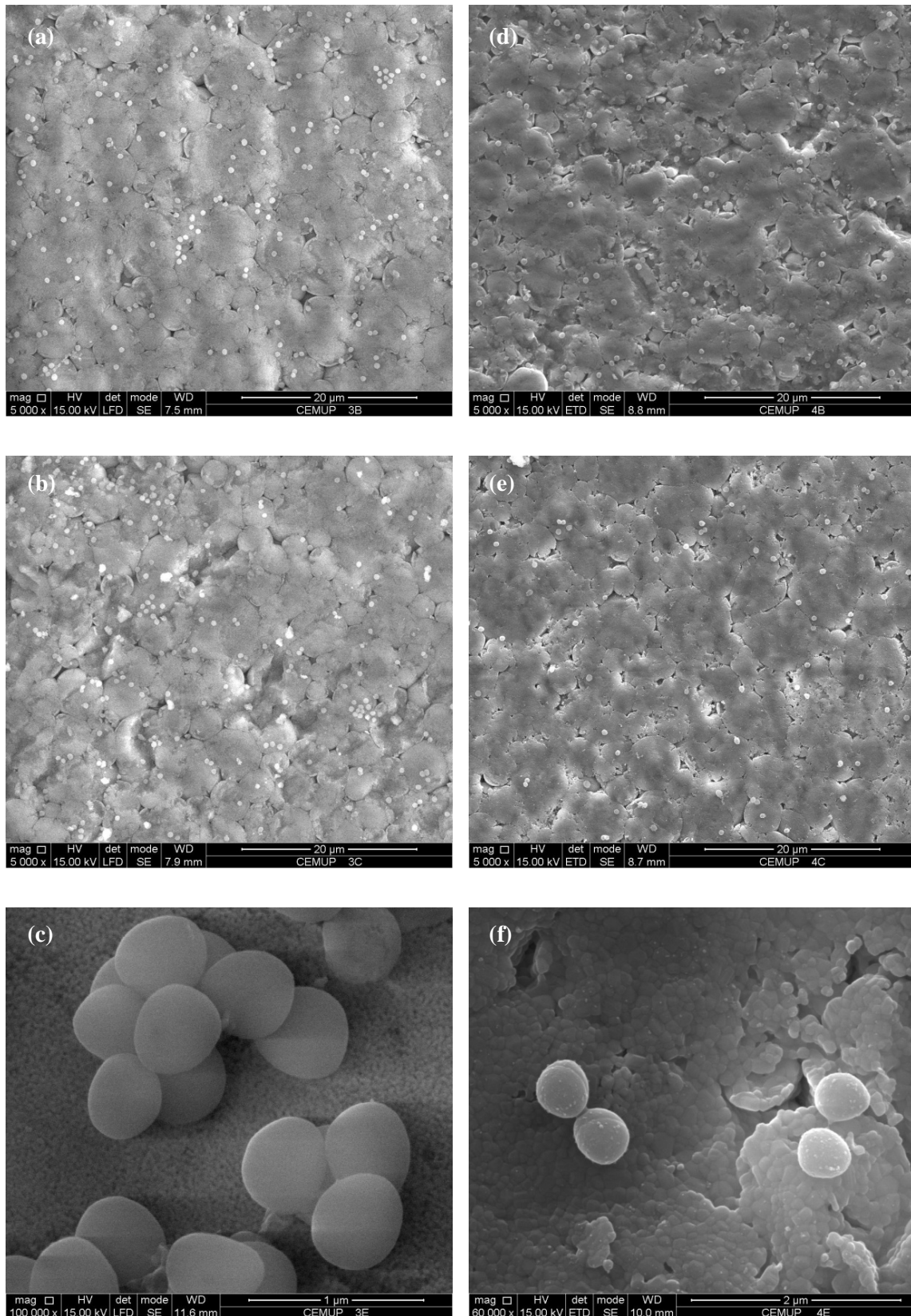


Figura 3.8. Imagens de SEM da adesão de *S. aureus* ATCC 25923 aos discos de nanoHA 725 aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) minutos de contacto e aos discos de nanoHA 1000 aos 30 (d), 60 (e) e 90 (f) minutos de contacto.

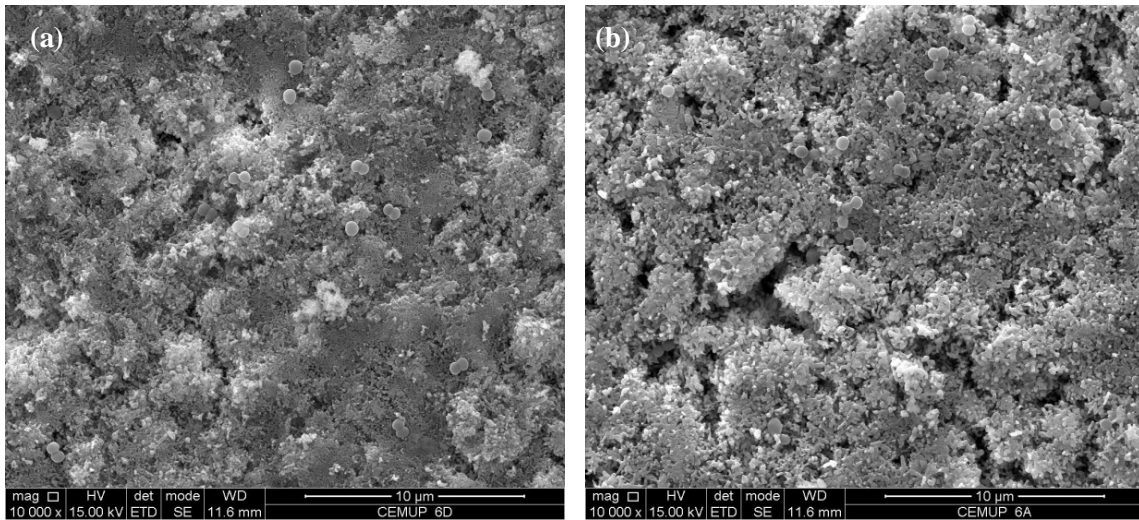


Figura 3.9. Imagens de SEM da adesão de *S. aureus* MRSA (ORT) aos discos de microHA. (a) microHA 725 aos 30 minutos de contacto e (b) microHA 1000 aos 30 minutos de contacto.

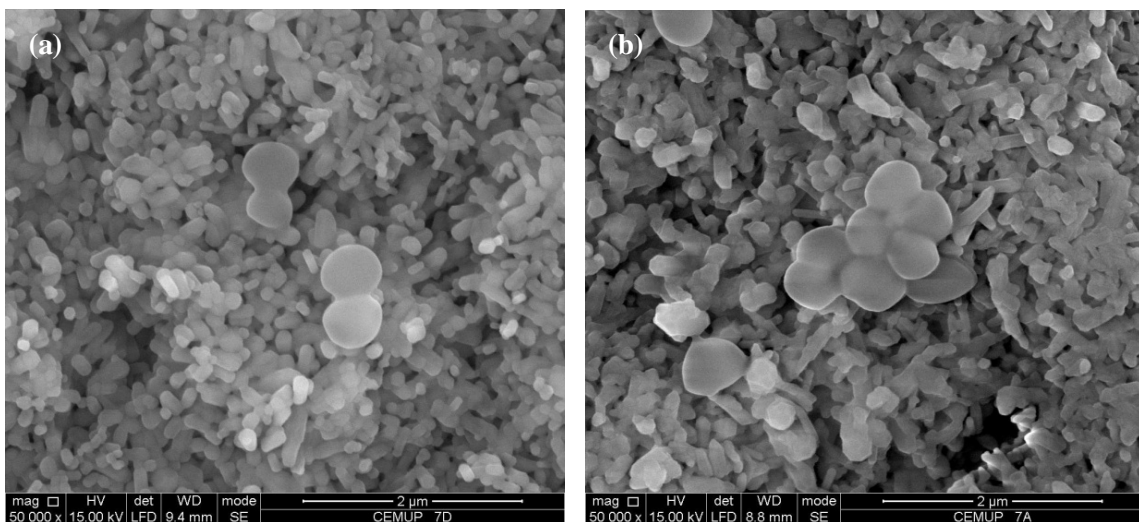


Figura 3.10. Imagens de SEM da adesão de *S. aureus* MSSA (ORT) aos discos de microHA. (a) microHA 725 aos 30 minutos de contacto e (b) microHA 1000 aos 30 minutos de contacto.

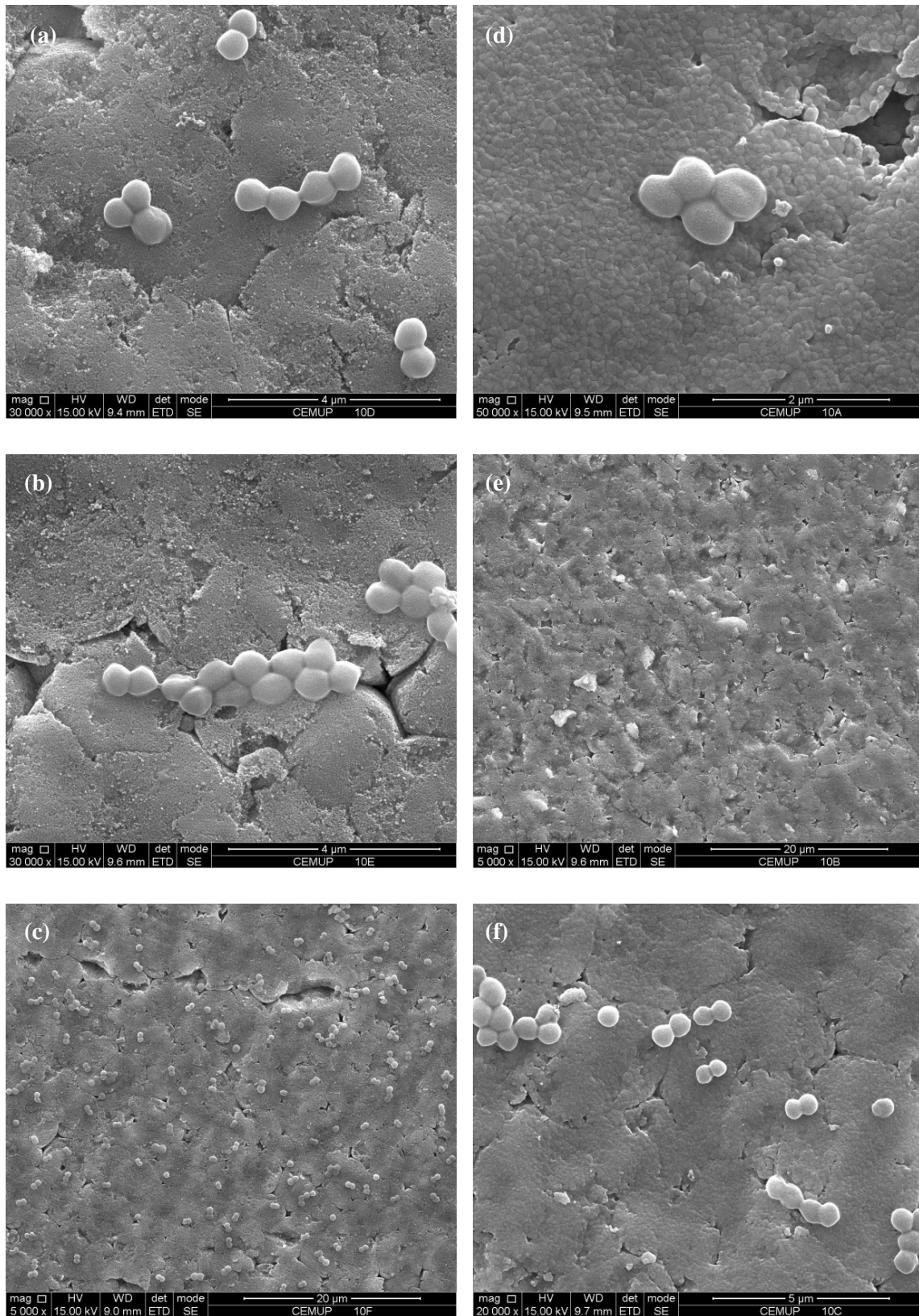


Figura 3.11. Imagens de SEM da adesão de *S. aureus* MRSA (ORT) aos discos de nanoHA 725 aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) minutos de contacto, e aos discos de nanoHA 1000 aos 30 (d), 60 (e) e 90 (f) minutos de contacto.

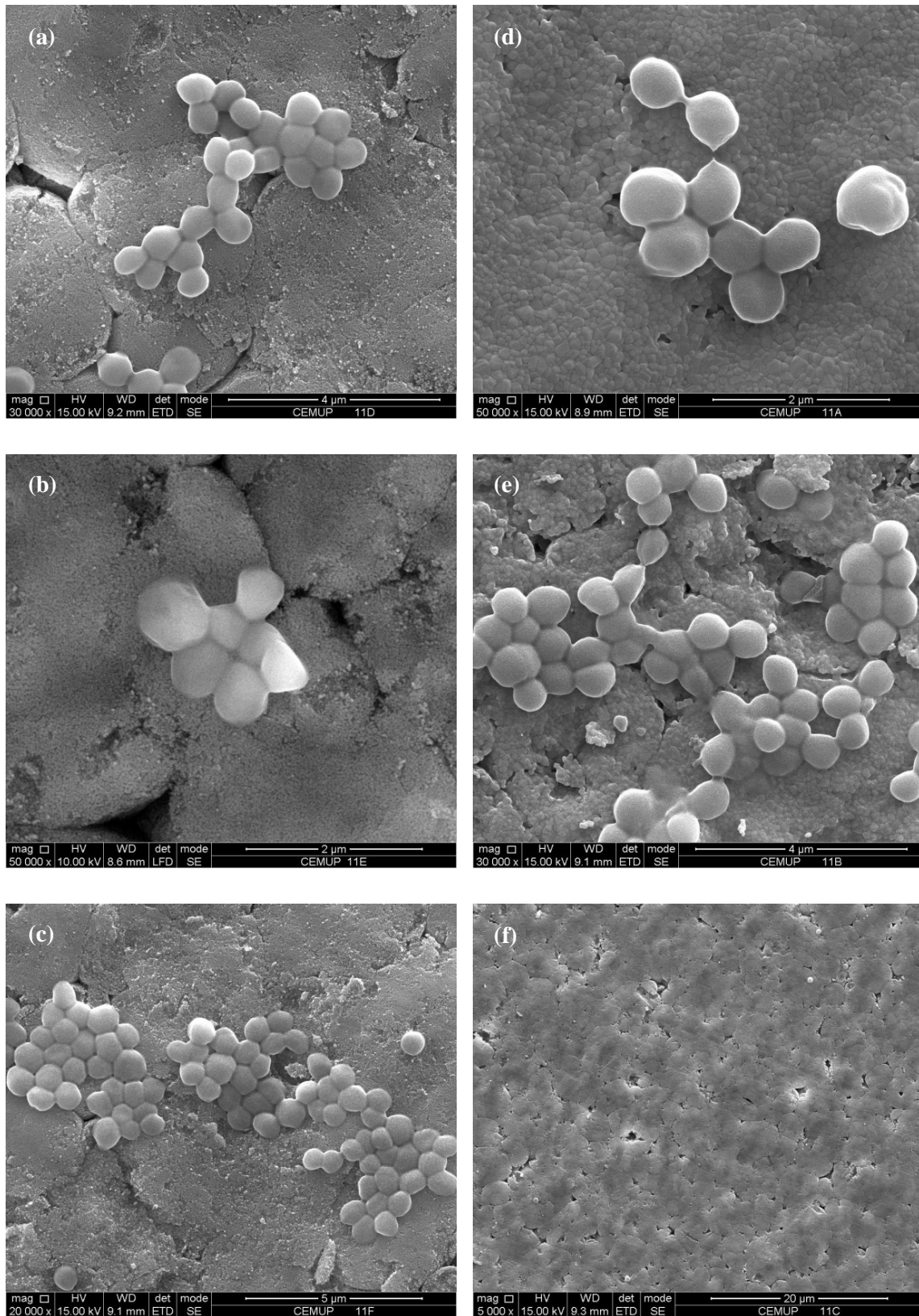


Figura 3.12. Imagens de SEM da adesão de *S. aureus* MSSA (ORT) aos discos de nanoHA 725 aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) minutos de contacto e aos discos de nanoHA 1000 aos 30 (d), 60 (e) e 90 (f) minutos de contacto.

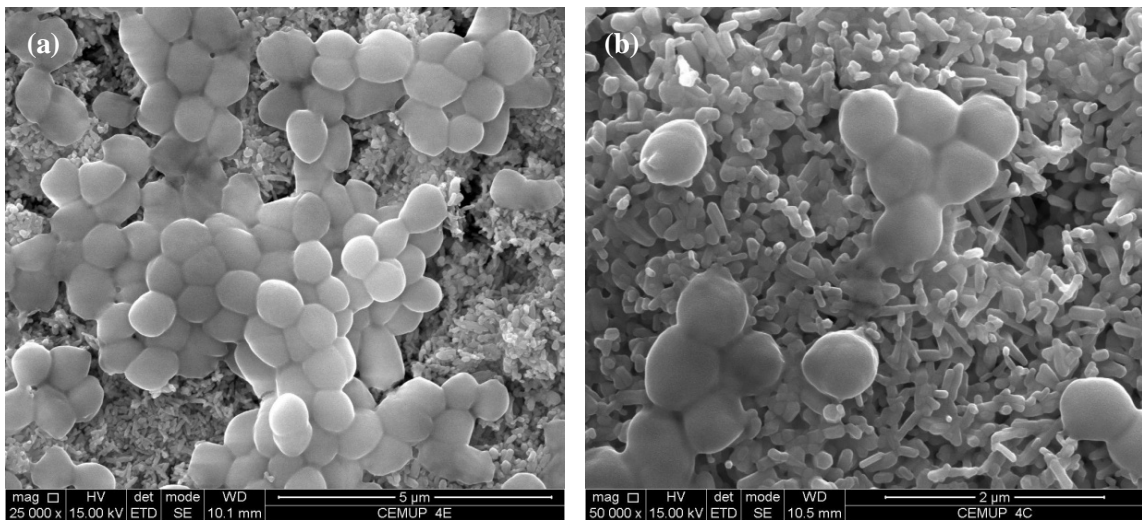


Figura 3.13. Imagens de SEM da adesão de *S. epidermidis* RP62A aos discos de microHA. (a) microHA 725 aos 60 minutos de contacto e (b) microHA 1000 aos 90 minutos de contacto.

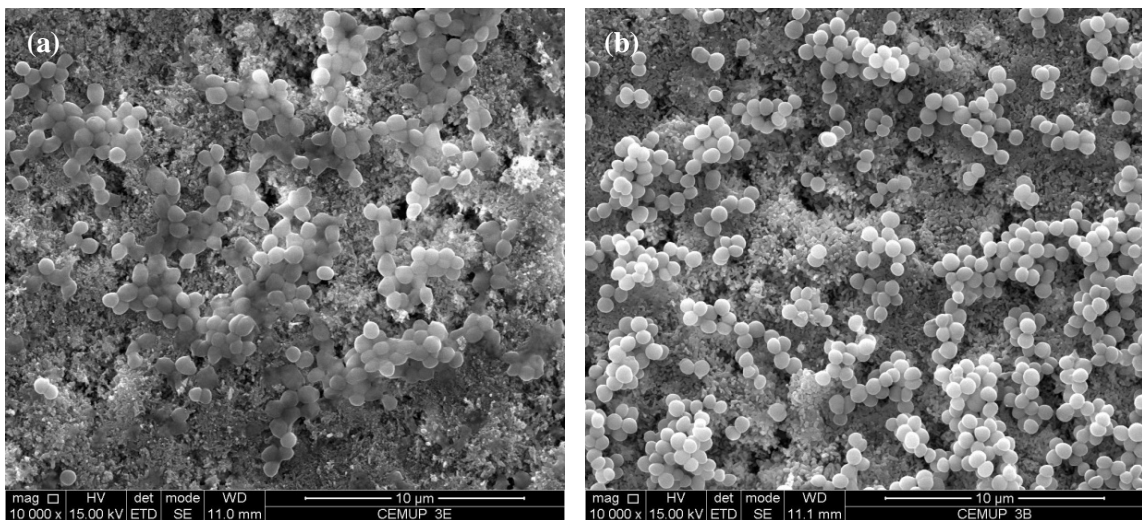


Figura 3.14. Imagens de SEM da adesão de *S. epidermidis* (UFP) aos discos de microHA. (a) microHA 725 aos 60 minutos de contacto e (b) microHA 1000 aos 60 minutos de contacto.

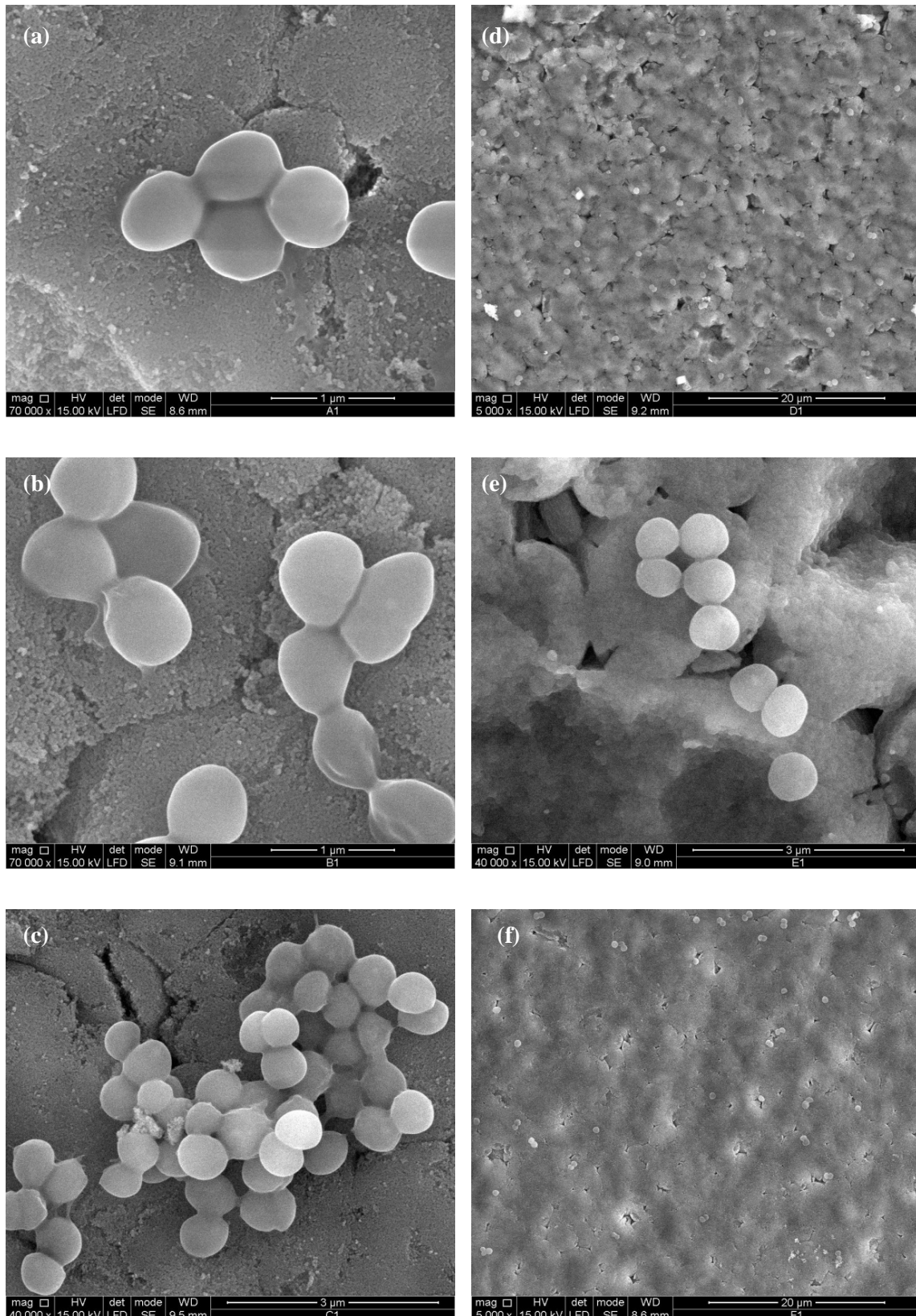


Figura 3.15. Imagens de SEM da adesão de *S. epidermidis* RP62A aos discos de nanoHA 725 aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) minutos de contacto e aos discos de nanoHA 1000 aos 30 (d), 60 (e) e 90 (f) minutos de contacto.

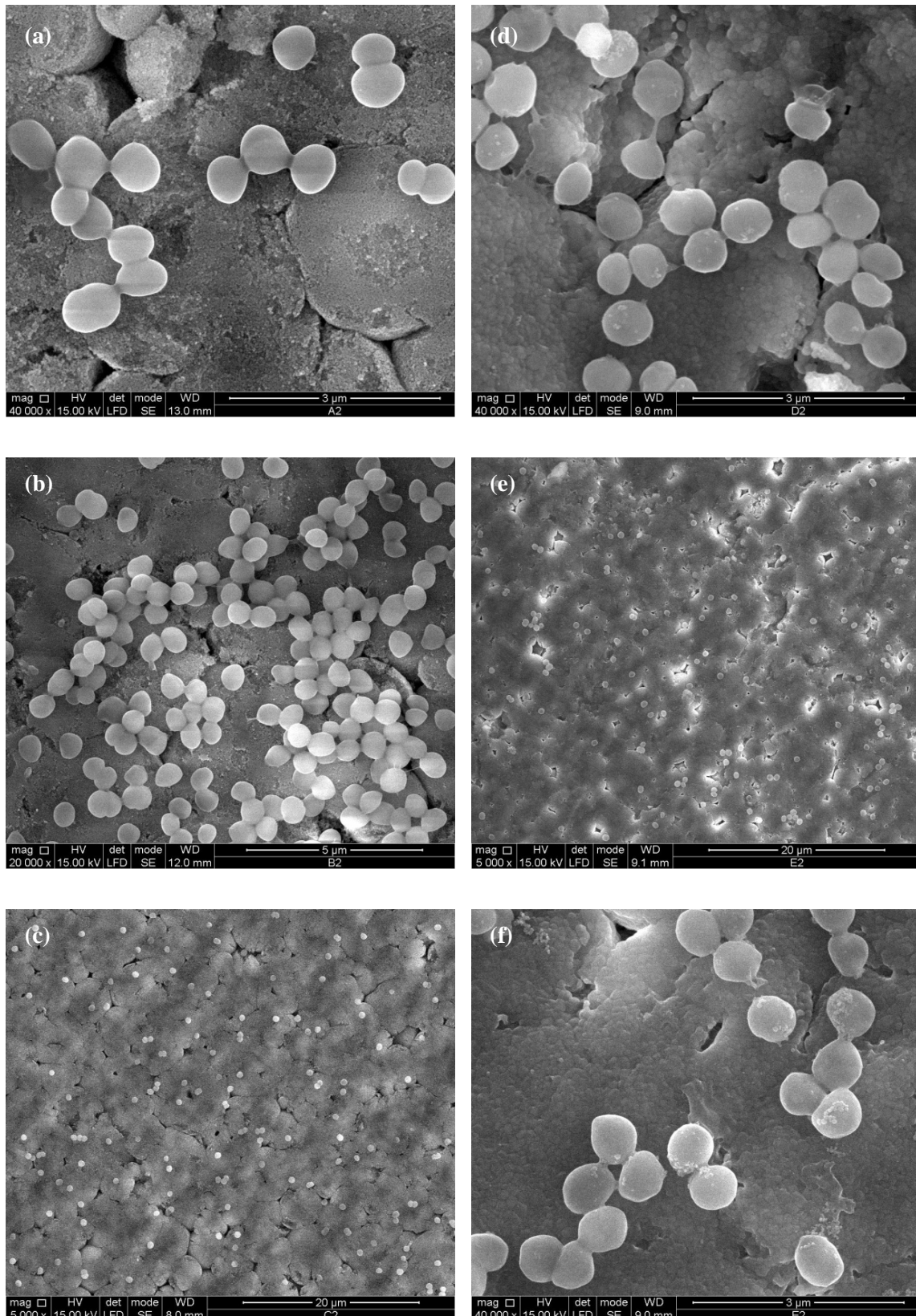


Figura 3.16. Imagens de SEM da adesão de *S. epidermidis* (UFP) aos discos de nanoHA 725 aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) minutos de contacto e aos discos de nanoHA 1000 aos 30 (d), 60 (e) e 90 (f) minutos de contacto.

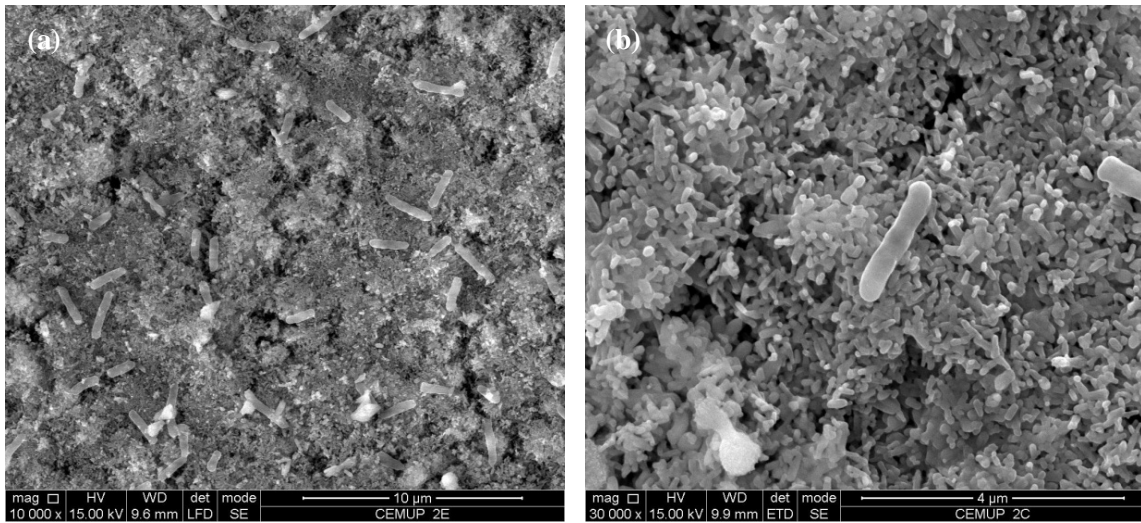


Figura 3.17. Imagens de SEM da adesão de *P. aeruginosa* (ORT) aos discos de microHA. (a) microHA 725 aos 60 minutos de contacto e (b) microHA 1000 aos 90 minutos de contacto.

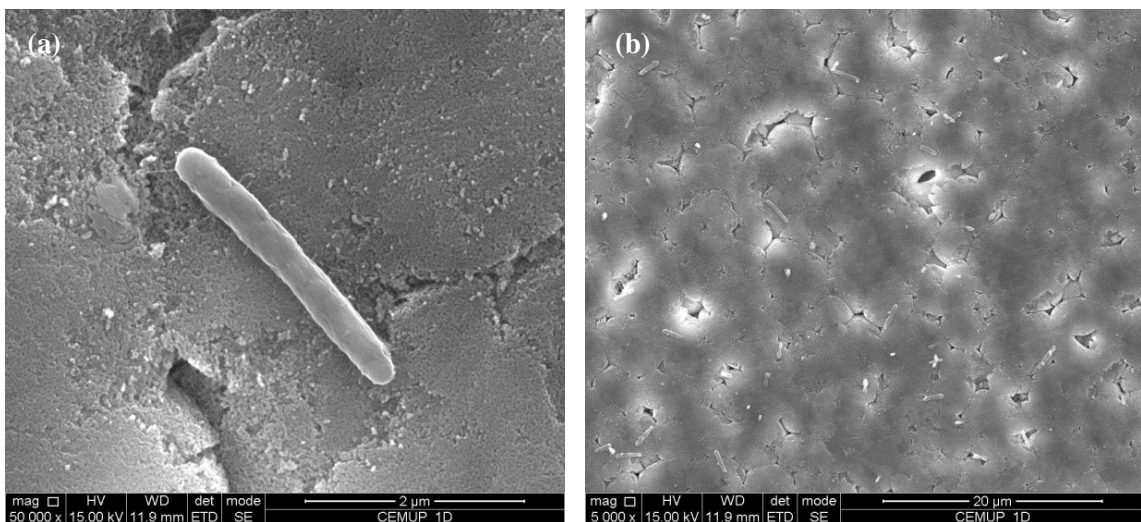


Figura 3.18. Imagens de SEM da adesão de *P. aeruginosa* (ORT) aos discos de nanoHA 725 aos 30 minutos de contacto, com diferentes ampliações, (a) 50 000× e (b) 5 000×.

As imagens recolhidas no SEM permitiram avaliar os perfis de adesão das bactérias aos materiais bem como a produção de EPS.

Quando se analisaram as imagens relativas à estirpe *S. aureus* ATCC 25923 (Figuras 3.7 e 3.8) verificou-se que inicialmente as bactérias surgiram dispersas por toda a superfície do disco, sem o estabelecimento de ligações entre as células bacterianas. Aos 60 e 90 minutos já se visualizaram alguns aglomerados, resultado de maior tempo de contacto, e o estabelecimento de ligações entre bactérias que se encontravam próximas. As imagens recolhidas permitiram reforçar os resultados obtidos pelo método de contagem das unidades formadoras de colónias (Figura 3.3A) uma vez que foi visível um maior número de bactérias aderidas aos discos de nanoHA 725, comparativamente com os discos de nanoHA 1000. Independentemente do material, não se observou a produção de EPS para esta estirpe bacteriana.

Relativamente aos isolados clínicos *S. aureus* MRSA (ORT) (Figura 3.9 e 3.11) e *S. aureus* MSSA (ORT) (Figura 3.10 e 3.12) verificou-se que após 30 minutos de adesão já era possível visualizar aglomerados de bactérias cobertas por uma camada mucóide, resultado da produção de EPS. Ao longo do tempo, esses aglomerados tenderam a aumentar de tamanho (Figura 3.11b e 3.12c) assim como a produção de EPS (Figura 3.12e) que reveste as bactérias e permite cimentar a adesão ao material.

Conforme o esperado, a estirpe de *S. epidermidis* RP62A (Figura 3.13 e 3.15) apresentou-se como uma boa produtora de EPS em especial nos discos de nanoHA 725 (Figura 3.15b, c). Nos discos de nanoHA 1000 embora se tenham verificado alguns agregados celulares, a produção de EPS foi menos activa (Figura 3.15e). O isolado clínico de *S. epidermidis* (UFP) (Figura 3.14 e 3.16) surgiu igualmente em agregados com ligações entre as bactérias e entre as bactérias e o material (Figura 3.16b, d) contudo, a produção de EPS pareceu menor comparativamente com a estirpe *S. epidermidis* RP62A ou com os isolados clínicos de *S. aureus*.

Relativamente ao isolado clínico de *P. aeruginosa* (ORT) (Figura 3.17 e 3.18), as imagens recolhidas não permitiram a visualização de EPS nem de agregados celulares. As bactérias surgiram dispersas pela superfície dos materiais.

IV. DISCUSSÃO

As infecções associadas aos dispositivos médicos resultam da adesão inicial das bactérias à superfície de um biomaterial, que pode originar a formação do biofilme. O biofilme torna as bactérias menos acessíveis ao sistema imune do hospedeiro e diminui significativamente a susceptibilidade aos antibióticos, sendo uma das causas que impede o uso, a longo prazo, de implantes e dispositivos intravasculares (Katsikogianni *et al.*, 2004; An, *et al.*, 1997).

No presente estudo avaliou-se a adesão inicial de espécies bacterianas clinicamente importantes, nomeadamente *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* (Campoccia *et al.*, 2006), a materiais de nanoHA, usados para regeneração óssea, sinterizados a 725°C e 1000°C. Para além da análise da contribuição do fenótipo bacteriano e da origem da estirpe para o processo de adesão, foi igualmente avaliada as repercussões que o tratamento térmico aplicado aos materiais teve na hidrofobicidade e rugosidade da superfície dos mesmos e, conseqüentemente, nos perfis de adesão bacteriana. A microHA sujeita aos mesmos tratamentos térmicos foi utilizada como material controlo (ainda que este material seja tipicamente utilizado com sinterizações acima dos 1250°C).

Os resultados de adesão obtidos indicam que as estirpes *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA (UFP) e *S. aureus* MSSA (ORT) aderiram significativamente menos aos materiais de nanoHA do que aos materiais de microHA. As restantes estirpes (*S. aureus* MRSA (ORT), *S. epidermidis* RP62A, *S. epidermidis* (UFP) e *P. aeruginosa* (ORT)) não apresentaram diferenças significativas na adesão a estes dois tipos de HA. Tal comportamento indistinto pode dever-se, acima de tudo, à origem destas estirpes uma vez que duas delas são isoladas de infecções ósseas e à presença de importantes factores de virulência nomeadamente produção de *slime*, que caracteriza, principalmente, a espécie *S. epidermidis*. Estes aspectos contribuíram para uma melhor adaptabilidade na adesão destas estirpes aos materiais em estudo.

Relativamente aos materiais de nanoHA sinterizados a 725°C e 1000°C verificou-se que os materiais de nanoHA 1000 foram os menos susceptíveis de adesão para as estirpes em estudo. De mencionar que as diferenças significativas entre estes dois materiais apenas se verificaram aos 90 minutos de adesão. A única excepção foi a estirpe *P.*

aeruginosa (ORT) que apresentou diferenças significativas nos tempos iniciais (30 e 60 minutos) que deixaram de existir aos 90 minutos. Esta diferença observada para os materiais de nanoHA sinterizados a diferentes temperaturas pode estar relacionada com a área de superfície e porosidade dos mesmos. De acordo com as experiências conduzidas por Ribeiro *et al.* (2009), a área de superfície dos materiais de nanoHA 725 ($46,7\text{m}^2/\text{g}$) é superior à dos materiais de nanoHA 1000 ($0,5\text{m}^2/\text{g}$) bem como a porosidade total, tendo os materiais de nanoHA 725 uma porosidade total de 39% e os materiais de nanoHA 1000 de 3.1%. A maior área de superfície e porosidade observada pode justificar o maior número de bactérias aderidas aos discos de nanoHA 725, comparativamente com os materiais de nanoHA 1000.

Embora sem diferenças estatisticamente significativas, verificou-se uma relação directa entre o aumento do tempo de contacto bactéria-material e o aumento da adesão bacteriana, à excepção dos materiais de nanoHA 1000, com as estirpes pertencentes à espécie *S. aureus* e a estirpe *S. epidermidis* (UFP), em que se verificou um decréscimo no número de bactérias aderidas ao longo do tempo (Figura 3.3, 3.4 e 3.5F). De referir que este decréscimo ao longo do tempo também se observou para os materiais de microHA 1000, com todos os isolados clínicos em estudo (Figura 3.4, 3.5F, 3.6). Este decréscimo pode estar relacionado com o facto de a primeira fase do processo de adesão, na qual o presente trabalho se centra, se caracterizar de reversível (An *et al.*, 1998). Contudo, e uma vez que este decréscimo apenas se verificou para os materiais sinterizados a 1000°C , outros factores podem estar a impelir esta separação.

A análise das imagens recolhidas de SEM permite aferir sobre os perfis de adesão e produção de EPS, sendo esta produção particularmente importante na colonização de várias superfícies bem como para os acontecimentos seguintes à fase inicial de adesão, que incluem protecção contra a fagocitose, interferência com a resposta imune celular e redução dos efeitos dos antibióticos (Katsikogianni *et al.*, 2004). As estirpes bacterianas que não produzem EPS serão menos aderentes e menos patogénicas o que faz com que sejam rapidamente mortas pelo sistema imunológico (An *et al.*, 1998). No presente trabalho, verificou-se que a estirpe de colecção *S. aureus* ATCC 25923, apesar da capacidade para aderir aos materiais, não sintetizou EPS (Figura 3.8). Por outro lado, quando se analisaram os isolados clínicos *S. aureus* MRSA (ORT) e MSSA (ORT), recolhidos de infecções ósseas, estes apresentaram uma forte capacidade de produção de EPS (Figura 3.11 e 3.12). Estes resultados suportam o que anteriormente foi apontado

que estas bactérias, isoladas de infecções ósseas, se encontram de facto aptas para aderir às superfícies de materiais biológicos ou sintéticos, o que as torna mais patogénicas. Curiosamente, a estirpe com fenótipo MSSA foi a que apresentou valores mais elevados de adesão indicando que a estirpe MRSA não se encontra, necessariamente, mais apta para aderir. Porém, o tratamento de uma infecção causada por qualquer uma destas estirpes é, desde logo, difícil uma vez que as bactérias se encontram em microcolónias e envolvidas pela camada mucóide, o que as torna mais resistentes aos antibióticos (Götz, 2002).

A estirpe de *S. epidermidis* RP62A, de acordo com o esperado (Götz, 2002), apresentou-se forte produtora de *slime*, excepto na presença dos discos de nanoHA 1000 em que a produção de EPS diminui visivelmente (Figura 3.15e). De facto, em certas estirpes, como a *S. epidermidis* RP62A, a produção de EPS pode variar e existem estudos que identificaram vários factores que influenciam essa produção nomeadamente, glucose, anaerobiose, limitação de ferro, entre outras (Götz, 2002). Relativamente ao isolado clínico *S. epidermidis* (UFP) verificou-se a produção de EPS em todos os materiais, mas em menor extensão que nas estirpes anteriores referidas. De notar que a estirpe *S. epidermidis* (UFP), à semelhança da RP62A, apresentou-se produtora de EPS, uma característica que tem vindo a ser apontada como um importante factor de virulência desta espécie bacteriana, que nos últimos anos tem emergido como causa comum de numerosas infecções nosocomiais, principalmente associadas aos dispositivos médicos (Ziebuhr *et al.*, 2006).

Por fim, a estirpe de *P. aeruginosa* (ORT), isolada de uma infecção óssea, exibiu boa capacidade de adesão tendo sido a estirpe que aderiu em maior extensão aos discos de nanoHA 1000 (Figura 3.6). Pelas imagens recolhidas, a produção de EPS observada parece fraca ou inexistente. Os altos valores de adesão podem ser, em parte, resultado da dimensão e forma da bactéria (Figura 3.18) que, comparativamente com os cocos anteriormente mencionados, apresenta ao longo do bacilo mais pontos de contacto com os materiais, efectivando a adesão.

Quanto ao estudo da hidrofobicidade da superfície dos materiais, verificou-se que o aumento da temperatura de sinterização resultou numa ligeira diminuição da hidrofobicidade para os materiais de microHA e numa diminuição mais acentuada para os materiais de nanoHA (Tabela 3.1). A hidrofobicidade de um material tem inúmeras

implicações na adesão bacteriana, particularmente nas suas fases iniciais. Superfícies hidrofílicas tendem a ter um melhor desempenho contra a adesão bacteriana comparativamente com as superfícies hidrofóbicas logo, valores de ângulo de contacto baixos, são considerados um factor positivo no design de materiais (Weir *et al.*, 2008; An *et al.*, 1998). Porém, tal não se verificou no presente estudo, uma vez que os materiais mais hidrofílicos, nanoHA 725 e microHA 725 e 1000, nos quais seria de esperar menor adesão bacteriana, foram os materiais aos quais as bactérias aderiram mais. Por outro lado, os discos de nanoHA 1000, com valores de ângulos de contacto maiores ($53,2 \pm 18,2$), foram os que apresentaram menores valores de adesão bacteriana.

Em linha com os resultados obtidos, existem estudos que demonstraram que o aumento da hidrofobicidade da superfície de um material pode resultar numa diminuição do número de microrganismos aderidos (Eginton *et al.*, 1995), como se verificou nos discos de nanoHA 1000. Além disso, existem ainda estudos que sugerem que factores da superfície celular podem mediar a adesão inicial a superfícies hidrofílicas, tais como a produção de EPS, em especial a produção de PIA (Götz, 2002; Donlan, 2002a), que se verificou para quase todas as estirpes bacterianas em estudo.

Para além da hidrofobicidade, a rugosidade da superfície dos materiais é outro factor que tem sido apontado como capaz de influenciar a adesão bacteriana (An *et al.*, 1998). De acordo com vários estudos, a rugosidade da superfície do material incentiva a adesão bacteriana inicial devido ao aumento da área de superfície bem como de depressões que fornecem locais favoráveis à colonização, protegendo as bactérias de factores ambientais desfavoráveis (Katsikogianni *et al.*, 2004; Weir *et al.*, 2008; An *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos por AFM mostraram que de acordo com a área de superfície analisada os materiais apresentaram diferentes valores de rugosidade bem como topografias de superfície distintas. Para uma área de análise de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, todos os materiais surgem associados a uma topografia diferente (Figura 3.1), que corresponde a valores de Ra igualmente distintos entre si. A esta escala, o aumento da temperatura de sinterização resultou num ligeiro aumento da Ra para os materiais de microHA e um aumento para o dobro nos materiais de nanoHA. Para uma área de análise de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ observou-se um aumento dos valores de Ra para todos os materiais, sendo mais significativo para os materiais de nanoHA 1000, comparativamente com os discos de

nanoHA 725, ultrapassando inclusive os valores de Ra dos materiais de microHA. De facto, a esta escala, a topografia da superfície dos materiais de nanoHA 1000 destaca-se como sendo a mais irregular (Figura 3.2).

Quando se correlacionaram os valores de adesão bacteriana com os da Ra dos materiais de nanoHA e microHA verificou-se que os diferentes valores de Ra destes materiais podem estar associados aos diferentes valores de adesão bacteriana obtidos. Pela análise da figura 3.1 foi possível aferir que os materiais de microHA apresentaram uma superfície menos uniforme e com proeminentes saliências, comparativamente com as superfícies de nanoHA, podendo esta topografia ser um factor favorecedor da adesão bacteriana aos materiais de microHA. Contudo, essa relação directa entre a Ra e a adesão bacteriana inicial deixou de se observar quando se compararam as temperaturas de sinterização 725°C e 1000°C. Apesar de valores mais elevados de Ra, os materiais sinterizados a 1000°C foram aqueles aos quais as bactérias aderiram menos, comparativamente com os materiais sinterizados a 725°C, o que sugere que esta variação de rugosidade nestas áreas de análise, não é um factor influenciador da adesão bacteriana prevalecendo outros. Existem estudos que concluíram igualmente que nem sempre se verifica uma relação linear entre a rugosidade da superfície e a adesão bacteriana inicial (Boyd *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2001).

Uma razão subjacente aos resultados e em particular às diferenças encontradas entre os materiais de microHA e nanoHA, para além das diferentes dimensões dos respectivos cristais, pode residir no facto de as temperaturas de sinterização utilizadas de 725°C e 1000°C afectarem significativamente as estruturas de nanoHA, enquanto para microHA estas são, como é bem conhecido, claramente insuficientes.

V. CONCLUSÃO

No presente estudo os materiais de nanoHA mostraram-se menos susceptíveis de adesão bacteriana comparativamente com os materiais de microHA. Os discos de nanoHA sinterizados a 1000°C foram os que apresentaram valores mais baixos de adesão para todas as estirpes bacterianas em estudo. As bactérias não só aderiram menos aos discos de nanoHA 1000 como apresentaram maior dificuldade em permanecer aderidas. Houve também uma diminuição na produção de EPS por parte da estirpe *S. epidermidis* RP62A, uma forte produtora de *slime*, quando em contacto com os discos de nanoHA 1000.

Relativamente à contribuição do fenótipo bacteriano e da origem da estirpe para o processo de adesão concluiu-se que, comparativamente com as estirpes de colecção, em particular com a estirpe *S. epidermidis* RP62A, os isolados clínicos provenientes de infecções ósseas foram os que se mostraram mais aptos para aderir aos materiais, dado os valores obtidos bem como a produção de EPS observada, um importante factor de virulência para o processo de adesão que, conseqüentemente, contribui para a elevada patogenicidade destas estirpes.

Quanto às propriedades físicas da superfície dos materiais, a adesão bacteriana foi maior nos materiais mais hidrofílicos e menor nos de nanoHA 1000 que registaram maiores ângulos de contacto. Estes resultados permitem concluir que, neste caso, a hidrofobicidade da superfície dos materiais não tem um papel determinante no processo inicial de adesão bacteriana e que outros factores podem ser fundamentais para o processo nomeadamente a produção de EPS. No que respeita à rugosidade da superfície não foi encontrada uma relação linear entre este parâmetro e a adesão bacteriana inicial.

Em conclusão, os isolados clínicos provenientes de infecções ósseas foram as estirpes que se mostraram mais aptas para aderir aos materiais e, por outro lado, os materiais de nanoHA sinterizados a 1000°C foram os que melhor resistiram à adesão bacteriana e, conseqüentemente, os melhores candidatos para uso em aplicações médicas.

VI. BIBLIOGRAFIA

An, YH, Friedman, RJ 1997, 'Laboratory methods for studies of bacterial adhesion', *Journal of Microbiological Methods*, vol. 30, pp. 141-152.

An, YH, Friedman, RJ 1998, 'Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces', *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 43, no. 3, pp. 338-348.

Best, SM, Porter, AE, Thian, ES, Huang, J 2008, 'Bioceramics: past, present and for the future', *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 28, no. 7, pp. 1319-1327.

Boyd, A, Chakrabarty, AM 1994, 'Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 7, pp. 2355-2359.

Boyd, A, Chakrabarty, AM 1995, '*Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide', *Journal of Industrial Microbiology*, vol. 15, no. 3, pp. 162-168.

Boyd, RD, Verran, J, Jones, MV, Bhakoo, M 2002, 'Use of atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on bacterial adhesion', *Langmuir*, vol. 18, no. 6, pp. 2343-2346.

Buckwalter, JA, Glimcher, MJ, Cooper, RR, Recker, R 1995, 'Bone biology', *The Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 77A, no. 8, pp. 1256-1275.

Campoccia, D, Montanaro, L, Arciola, CR 2006, 'The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance', *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2331-2339.

Cao, W, Hench, LL 1996, 'Bioactive materials', *Ceramics International*, vol. 22, no. 6 pp. 493-507.

Carroll, RG 2007, *Fisiologia*, Elsevier, Rio de Janeiro.

Cerca, N, Pier, GB, Vilanova, M, Oliveira, R, Azeredo, J 2005, 'Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*', *Research in Microbiology*, vol. 156, no. 4, pp. 506-514.

Chevalier, J, Gremillard, L 2009, 'Ceramics for medical applications: a picture for the next 20 years', *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 29, no. 7, pp. 1245-1255.

Christensen, GD, Baddour, LM, Hasty, DL, Lowrance, GH, Simpson, WA 1989, 'Microbial and foreign body factors in the pathogenesis of medical device infections', in AL Bisno e FA Waldvogel (eds), *Infections associated with indwelling medical devices*, *American Society for Microbiology*, Washington DC, pp. 59-70.

Christensen, GD, Baldassami, L, Simpson, WA 1995, 'Methods for studying microbial colonization of plastics', in *Adhesion of microbial pathogens. Methods in enzymology*, Academic Press Inc., San Diego, pp. 447-500.

Clarke, B 2008, 'Normal bone anatomy and physiology', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 3, pp. S131-S139.

Costerton, JW 1999, 'Introduction to biofilm', *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 11, no. 3-4, pp. 217-221.

Cristino, JM 2000, '*Staphylococcus*', in WFC Ferreira e JCF Sousa (eds), *Microbiologia*, volume 2, 1ª edição, Lidel, Lisboa, pp. 39-49.

Davey, ME, O'Toole GA 2000, 'Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, no. 4, pp. 847-867.

Donlan, RM 2001, 'Biofilms and device-associated infections', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 7, no. 2, pp. 277-281.

Donlan, RM 2002a, 'Biofilms: microbial life on surfaces', *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, no. 9, pp. 881-890

Donlan, RM, Costerton, JW 2002b, 'Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms', *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 15, no. 2, pp. 167-193.

Drouet, C, Bosc, F, Banu, M, Largeot, C, Combes, C, Dechambre, G, Estournès, C, Raimbeaux, G, Rey, C 2009, 'Nanocrystalline apatites: from powders to biomaterials', *Powder Technology*, vol. 190, no. 1-2, pp. 118-122.

Eginton, PJ, Gibson, H, Holah, J, Handley, PS, Gilbert, P 1995, 'The influence of substratum properties on the attachment of bacterial cells', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 5, no. 3-4, pp. 153-159.

Ferraz, MP, Monteiro, FJ, Manuel, CM 2004, 'Hydroxyapatite nanoparticles: a review of preparation methodologies', *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*, vol. 2, no. 2, pp. 74-80.

Fluidinova 2005, *Engenharia de Fluidos*, visualizada em Outubro de 2009, <http://www.fluidinova.pt/main.php?id=46>

Fonseca, AP, Granja, PL, Nogueira, JA, Oliveira, DR, Barbosa, MA 2001, 'Staphylococcus epidermidis RP62A adhesion to chemically modified cellulose derivatives', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 12, no. 6, pp. 543-548.

Gadelmawla, ES, Koura, MM, Maksoud, TMA, Elewa, IM, Soliman, HH 2002, 'Roughness parameters', *Journal of Materials Processing Technology*, vol. 123, no. 1, pp. 133-145.

Götz, F 2002, 'Staphylococcus and biofilms', *Molecular Microbiology*, vol. 43, no. 6, pp. 1367-1378.

Hetrick, EM, Schoenfisch, MH 2006, 'Reducing implant-related infections: active release strategies', *Chemical Society Reviews*, vol. 35, no. 9, pp. 780-789.

International Osteoporosis Foundation 2009, *Basic bone biology*, visualizada em Junho de 2010, <http://www.iofbonehealth.org/health-professionals/about-osteoporosis/basic-bone-biology.html>.

Jacob, SW, Francone, CA, Lossow, WJ 1990, *Anatomia e Fisiologia*, 5ª edição, Guanabara, Rio de Janeiro.

Jakubowski, W, Slószarczyk, A, Paszkiewicz, Z, Szymanski, W, Walkowiak, B 2008, 'Bacterial colonization of bioceramic surfaces', *Advances in Applied Ceramics*, vol. 107, no. 4, pp. 217-221.

Joosten, U, Joist, A, Gosheger, G, Liljenqvist, U, Brandt, B, von Eiff, C 2005, 'Effectiveness of hydroxyapatite-vancomycin bone cement in the treatment of *Staphylococcus aureus* induced chronic osteomyelitis', *Biomaterials*, vol. 26, no. 25, pp. 5251-5258.

Katsikogianni, M, Missirlis, YF 2004, 'Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions', *European Cells and Materials*, vol. 8, pp. 37-57.

Katsikogianni, M, Spiliopoulou, I Dowling, DP, Missirlis, YF 2006, 'Adhesion of slime producing *Staphylococcus epidermidis* strains to PVC and diamond-like carbon/silver/fluorinated coatings', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 17, no. 8, pp. 679-689.

Katsikogianni, M, Amanatides, E, Mataras, D, Missirlis, YF 2008, '*Staphylococcus epidermidis* adhesion to He, He/O₂ plasma treated PET films and aged materials: Contributions of surface free energy and shear rate', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 65, no. 2, pp. 257-268.

Kawachi, EY, Bertran, CA, Reis, RR, Alves, OL 2000, 'Biocerâmicos: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar', *Química Nova*, vol. 23, no. 4, pp. 518-522.

Lim, SM, Webb, SAR 2005, 'Nosocomial bacterial infections in intensive care units. I: Organisms and mechanisms of antibiotic resistance', *Anaesthesia*, vol. 60, no. 9, pp. 887-902.

Mack, D, Davies, AP, Harris, LG, Rohde, H, Horstkotte, MA, Knobloch, JK-M 2007, 'Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 387, no. 2, pp. 399-408.

Mateus, AYP, Barrias, CC, Ribeiro, C, Ferraz, MP, Monteiro, FJ 2008, 'Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications', *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 86A, no. 2, pp. 483-493.

Mitik-Dineva, N, Wang, J, Truong, VK, Stoddart, P, Malherbe, F, Crawford, RJ, Ivanova, EP 2009, 'Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Staphylococcus aureus attachment patterns on glass surfaces with nanoscale roughness', *Current Microbiology*, vol. 58, no. 3, pp. 268-273.

Mittelman, MW 1996, 'Adhesion to biomaterials', in M Fletcher (ed), *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*, Wiley-Liss, New York, pp.89-127.

Papaioannou, W, Gizani, S, Nassika, M, Kontou, E, Nakou, M 2007, 'Adhesion of Streptococcus mutans to different types of brackets', *Angle Orthodontist*, vol. 77, no. 6, pp. 1090-1095.

Park, J, Lakes, RS 2007 *Biomaterials: an introduction*, 3ª edição, Springer, NY.

Pascual, A 2002, 'Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs', *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 8, no.5, pp. 256-264.

Poelstra, KA, Barekzi, NA, Rediske, AM, Felts, AG, Slunt, JB, Grainger, DW 2002, 'Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies', *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 60, no. 1, pp. 206- 215.

Ratner, BD, Hoffman, AS, Schoen, FJ, Lemons, JE 2004, 'Biomaterials science: a multidisciplinary endeavor', in BD Ratner, AS Hoffman, FJ Schoen and JE Lemons (eds), *Biomaterials Science*, 2ª edição, Academic Press, London, UK, pp. 1-9.

Ribeiro, N, Sousa, SR, Monteiro, FJ 2010, 'Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology', *Journal of Colloid and Interface Science*, doi:10.1016/j.jcis.2010.08.013

Sá-Correia, I 2000, 'Pseudomonadaceae. Pseudomonas', in WFC Ferreira e JCF Sousa (eds), *Microbiologia*, volume 2, 1ª edição, Lidel, Lisboa, pp. 123-136.

Safdar, N, Crnich, CJ, Maki, DG 2001, 'Nosocomial infections in the intensive care unit associated with invasive medical devices', *Current Infections Disease Reports*, vol. 3, pp. 487-495.

Stapper, AP, Narasimhan, G, Ohman, DE, Barakat, J, Hentzer, M, Molin, S, Kharazmi, A, Hoiby, N, Mathee, K 2004, 'Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation', *Journal of Medical Microbiology*, vol. 53, pp. 679-690.

Stewart, PS, Murga, R, Srinivasan, R, Beer, D 1995, 'Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods', *Water Research.*, vol. 29, no. 8, pp. 2006-2009.

Stobie, N, Duffy, B, McCormack, DE, Colreavy, J, Hidalgo, M, McHale, P, Hinder, SJ 2008, 'Prevention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating', *Biomaterials*, vol. 29, no. 8, pp. 963-969.

Sutherland, IW 2001, 'Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework', *Microbiology*, vol. 147, pp. 3-9.

Teixeira, S, Monteiro, FJ, Ferraz, MP, Vilar, R, Eugénio, S 2007, 'Laser surface treatment of hydroxyapatite for enhanced tissue integration: surface characterization and osteoblastic interaction studies', *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 81A, no. 4, pp. 920-929.

Vallet-Regí, M 2001, 'Ceramics for medical applications', *Journal of the Chemical Society*, pp. 97-108.

Vallet-Regí, M 2010, 'Evolution of bioceramics within the field of biomaterials', *Comptes Rendus Chimie*, vol. 13, no. 1-2, pp. 174-185.

von Eiff, C, Heilmann, C, Peters, G 1998, '*Staphylococcus epidermidis*: why is it so successful', *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 4, pp. 297-300.

Vuong, C, Voyich, JM, Fischer, ER, Braughton, KR, Whitney, AR, DeLeo, FR, Otto, M 2004, 'Polysaccharide intercellular adhesion (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system', *Cellular Microbiology*, vol. 6, no. 3, pp. 269-275.

Weir, E, Lawlor, A, Whelan, A, Regan F 2008, 'The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization', *Analyst*, vol. 133, no. 7, pp. 835-845.

Whitener, C, Caputo, GM, Weitekamp, MW, Karchmer AW 1993, 'Endocarditis due to coagulase-negative staphylococci, microbiologic, epidemiologic and clinical considerations', *Infectious Disease Clinics of North America*, vol. 7, no. 1, pp. 81-96.

Ziebuhr, W, Hennig, S, Eckart, M, Kränzler, H, Batzilla, C, Kozitskaya, S 2006, 'Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen', *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 28, pp. S14-S20.