

# Avaliação da formação de biofilme bacteriano em diferentes ligas metálicas ortopédicas

## Evaluation of the formation of bacterial biofilm in different orthopedic metallic alloys

Yasmin de Rezende Beiriz<sup>1</sup>, Amanda Grippa Piffer<sup>1</sup>, Rodrigo Moraes<sup>2</sup>, Rodrigo Pratte Santos<sup>3</sup>, Bil Randerson Bassetti<sup>4</sup>, Igor de Barcellos Zanon<sup>5</sup>, Igor Machado Cardoso<sup>5</sup>, Charbel Jacob Junior<sup>6</sup>, Igor Pecinalli<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Medicina. Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM). Vitória, ES, Brasil.

<sup>2</sup> Mestre em Microbiologia UFMG. Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM). Vitória, ES, Brasil.

<sup>3</sup> Doutor em Engenharia Ambiental. Faculdade PIO XII e Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, ES, Brasil.

<sup>4</sup> Infectologista. Hospital Santa Rita de Cássia, Vitória, ES, Brasil.

<sup>5</sup> Ortopedista. Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória. Vitória, ES, Brasil.

<sup>6</sup> Doutor em Medicina/Saúde da Criança. Professor do departamento de Ortopedia da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM). Vitória, ES, Brasil.

<sup>7</sup> Acadêmico de Medicina. Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM). Vitória, ES, Brasil.

### Resumo

Objetivo: Esse trabalho objetiva identificar e caracterizar o desenvolvimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* forte produtora de biofilme nos seguintes materiais ortopédicos: hastes de titânio e de cromo-cobalto. Método: A quantidade de biofilme formada nas amostras foi avaliada com base na quantidade de *Pseudomonas aeruginosa*, compondo o biofilme das amostras. Resultado: A formação de biofilme nas ligas de titânio foi significativamente maior do que o observado nas ligas cromo-cobalto, tanto no período de 17 horas quanto em uma semana. O cromo-cobalto possibilitou a formação de maior número de biofilme em uma semana, enquanto o titânio viabilizou maior geração de biofilme no período de 17 horas. Além disso, observou-se que um período de maior permanência do biomaterial em contato com a bactéria não pode ser considerado como um fator de proteção no processo de formação de biofilme. Desse modo, evidenciamos a necessidade de investimento em pesquisas relacionadas à prevalência e desenvolvimento de biofilme em ligas metálicas largamente utilizadas nos implantes cirúrgicos. Conclusão: O tempo influenciou apenas na formação de bactéria no cromo-cobalto, sendo quanto maior tempo de contato com a bactéria, maior quantidade de biofilme. Entre as ligas metálicas titânio e cromo-cobalto, o cromo-cobalto produziu menor quantidade de biofilme.

**Palavras-chave:** Coluna Vertebral. Biofilmes. Infecções

### Abstract

Objective: This work aims to identify and characterize the development of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* forte that produces biofilm in the following orthopedic materials: titanium and chromium-cobalt rods. Method: The amount of biofilm formed in the samples was evaluated based on the amount of *Pseudomonas aeruginosa* composing the biofilm of the samples. Result: The biofilm formation in titanium alloys was significantly higher than that observed in chromium-cobalt alloys both in 17 hours and in a week. Chromium-cobalt enabled the formation of a greater number of biofilms in one week, while titanium enabled greater generation of biofilms in 17 hours. In addition, it was observed that a period of greater permanence of the biomaterial in contact with the bacteria cannot be considered as a protective factor in the biofilm formation process. Thus, we highlight the need for investment in research related to the prevalence and development of biofilm in metal alloys widely used in surgical implants. Conclusion: Time influenced only the formation of bacteria in chromium-cobalt, the longer the contact with the bacteria, the greater the amount of biofilm. Among the titanium and chromium-cobalt metal alloys, chromium-cobalt produced less biofilm.

**Keywords:** Spine. Biofilms. Infections

Correspondência

**Yasmin de Rezende Beiriz**

Rua Horácio Simões - 52 - Bairro Santos Dumont

Cidade Vila Velha - AC - CEP: 29109-280

E-mail: yasminbeiriz123@gmail.com

Recebido em 10/04/2021 | Aprovado em 10/02/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202202135

## INTRODUÇÃO

As doenças do sistema osteomuscular foram a causa de morbidade de mais de 200.000 pessoas em território brasileiro no ano de 2017, sendo que em muitas dessas doenças há demanda de cirurgia.<sup>(1,2)</sup> Os biomateriais ortopédicos utilizados no tratamento dessas patologias podem ser introduzidos no corpo humano substituindo ou reparando diferentes tecidos<sup>(1)</sup> e até orientando a reparação óssea, quando necessário.<sup>(2,3)</sup>

A infecção causada por bactérias é uma das principais limitações para a permanência dos biomateriais ortopédicos, como hastes no organismo.<sup>(4,5)</sup> Próteses utilizadas para correção em cirurgia de coluna vertebral estão relacionadas com uma taxa de infecção de 2% a 20%.<sup>(2)</sup> A adesão bacteriana aos biomateriais é um processo de alta complexidade que demanda preocupação, dada a sua influência sobre a morbidade e mortalidade dos pacientes.<sup>(6)</sup> A adesão a superfícies inertes pelas bactérias é um mecanismo de sobrevivência, contudo também é um importante fator de virulência.<sup>(7)</sup> O risco de infecção também pode variar de acordo com o tipo de prótese, devido a uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de biofilme em cada um dos tipos.<sup>(2)</sup>

De maneira geral, os implantes ortopédicos de coluna vertebral são compostos de polímeros ou de ligas metálicas, sendo que neste último é necessária maior concentração bacteriana para o desenvolvimento de infecções.<sup>(8)</sup> Entre os metais, as ligas de titânio são menos propensas às infecções quando comparadas às de cromo-cobalto, por apresentar resistência à corrosão e ser mais inerte quando implantado em tecidos humanos.<sup>(9,10)</sup> Em estudos comparando a diferença de propensão à formação de biofilme em ligas de cromo-cobalto e titânio, notou-se que os primeiros apresentaram maior tendência a essa formação.<sup>(11)</sup> Dentre as inúmeras bactérias envolvidas nos estudos de biofilme, destacam-se *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.<sup>(12)</sup> Estudos realizados comparando a liga de titânio em relação ao cromo-cobalto mostraram que a liga de titânio apresenta menor nível de aderência bacteriana.<sup>(13)</sup> A espécie *P. aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo aeróbico pertencente à família bacteriana *Pseudomonadaceae*, com metabolismo oxidativo e temperatura ótima de crescimento entre 37°C e 42°C. Suas infecções predominam em pacientes críticos e 13 imunocomprometidos.<sup>(6,14)</sup> Estudos em vários países mostram a presença de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a antimicrobianos causando infecções hospitalares.<sup>(15-19)</sup> Desse

modo, esse estudo objetiva identificar o desenvolvimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, forte produtora de biofilmes nos biomateriais titânio e cromo-cobalto.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de Microbiologia da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM) e o biofilme formado no meio de cultura das amostras de hastes de titânio e de cromo-cobalto foi avaliado de acordo com a quantidade de *Pseudomonas aeruginosa* desenvolvida nas amostras. O estudo se iniciou com o repique da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, forte produtora de biofilme, centrifugação da cultura restante a 3500 rpm por 10 minutos e lavagem da biomassa com tampão de fosfato (PBS – bactérias solubilizadoras de fosfato) pH 7,2. A biomassa foi, então, suspensa em 3mL de PBS e a turvação da suspensão foi monitorada por densidade óptica (DO) em espectrofotômetro para avaliar a absorbância de cada uma das amostras. A amostra com maior absorbância (0,313), ou seja, com maior concentração de bactérias, foi utilizada para a pesquisa.<sup>(15)</sup> Fez-se, então, a preparação dos inóculos de bactéria, que foram transferidos individualmente para tubos Falcon de 15mL esterilizados, contendo 5mL de caldo Mueller-Hinton. Os corpos de prova de cada biomaterial foram esterilizados e introduzidos nestes tubos, permanecendo incubados a 37°C, sob agitação, em estufa por 17 horas e por 168 horas (uma semana), a fim de viabilizar a formação de biofilme nos materiais.<sup>(15)</sup> Após estes períodos de incubação, as hastes foram retiradas dos tubos e lavadas separadamente com salina fisiológica estéril. Os biofilmes formados nesses materiais foram fixados com etanol, secos em ar ambiente e corados com cristal violeta por 5 minutos. O excesso de corante não ligado ao biofilme foi removido lavando-se as amostras com água destilada.<sup>(15)</sup>

Após essa etapa, os corpos de prova foram secos ao ar, colocados em contato com salina tamponada com fosfato pH 7,2, em seguida foram submetidos ao vórtex por 3 minutos. Após esse processo, foi feita sonicação por 5 minutos a 120 W para separar o biofilme formado do biomaterial.<sup>(11)</sup> Após a sonicação, as amostras foram novamente vorticadas por 3 minutos. As suspensões restantes tiveram seus valores de absorbância medidos a 570 nm por espectrofotômetro Espectronic 20 – Bausch Lomb para determinar a quantidade de biofilme formado em cada biomaterial.<sup>(15)</sup> Esse ensaio<sup>(15)</sup> foi realizado em triplicata, utilizando-se três amostras de cada

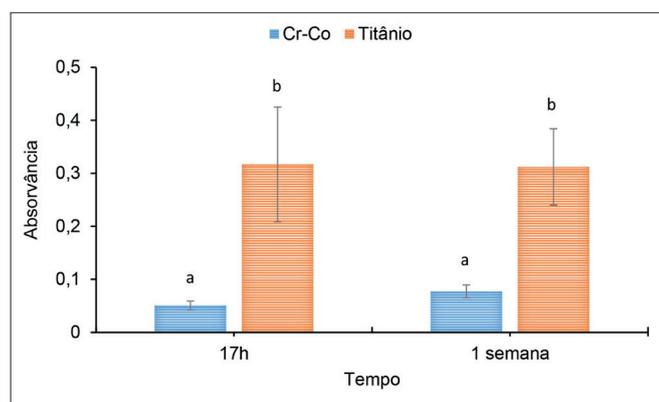
material para a avaliação por 17 horas e três amostras de cada material para a avaliação por 168 horas, isto é, uma semana.

Foi utilizada a estatística descritiva para apresentação dos resultados da avaliação da formação de biofilme bacteriano em diferentes ligas metálicas (titânio e cromocobalto). A normalidade dos dados obtidos foi testada a partir do teste Shapiro-Wilk, a fim de verificar como se apresentava tal distribuição. Para a comparação entre os grupos com distribuição normal foi utilizado o teste paramétrico ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os dados com distribuição não normal foram comparados com a utilização do teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Para todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa graphpadPrism 6.01.

## RESULTADOS

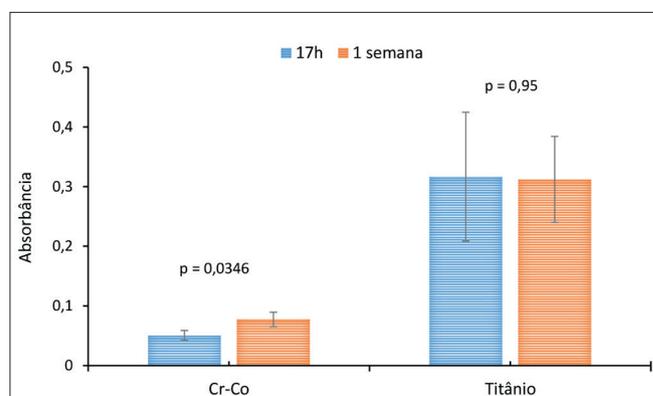
Dentre os biomateriais testados no presente estudo, observou-se que a formação de biofilme nas ligas de titânio foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que o observado nas ligas de cromo-cobalto tanto em 17 horas quanto em 1 semana (Figura 1).

Além disso, foi observado que o crescimento bacteriano em cromo-cobalto obteve diferença significativa quando comparado os tempos 17 horas e 1 semana de incubação ( $p = 0,0346$ ). Para os resultados do crescimento bacteriano no biomaterial titânio, não foi observada diferença significativa ( $p = 0,95$ ) (Figura 2).



**Figura 1**

Comparação do crescimento bacteriano nos biomateriais cromo-cobalto e titânio em 17h e 1 semana. Letras diferentes no gráfico indicam diferença significativa pelo teste-T ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2**

Comparação temporal (17h e 1 semana) do crescimento bacteriano nos biomateriais cromo-cobalto e titânio.

## DISCUSSÃO

Dados na literatura não apontam um consenso sobre como as características físicas de um biomaterial influenciam a formação precoce do biofilme. É possível que características físico-químicas adicionais, como íons metálicos liberados e estrutura química, possam ter alguma influência que iniba ou retarde o desenvolvimento do biofilme.<sup>(15)</sup> Outros estudos advogam que a composição química e a superfície são características dos biomateriais que mais influenciam na sua capacidade de interagir com microrganismos,<sup>(15,20)</sup> de forma que a formação inicial de biofilme é um processo multifatorial que dificilmente pode ser explicado por uma única característica de superfície.<sup>(15)</sup> Poucos estudos comparam a formação de biofilme bacteriano entre titânio e cromo-cobalto e, quando comparados, apresentam resultados contraditórios. Há indícios de que as ligas de titânio são menos propensas às infecções quando comparadas às de aço e de cromo-cobalto,<sup>(21-24)</sup> o que ocorre devido a uma melhor biointegração do titânio, mais inerte quando implantada em tecidos humanos.<sup>(22)</sup> Os implantes de liga de titânio permitem que células hospedeiras se desenvolvam em um revestimento de tecido fibroso, dificultando a aderência bacteriana na superfície do implante.<sup>(25)</sup> Além disso, o titânio pode manter as bactérias dispersas na superfície do implante, tornando-as mais suscetíveis aos antibióticos.<sup>(26)</sup> As ligas de cromo-cobalto, por apresentarem reduzida integração com células do hospedeiro, dispõem de mais energia livre em sua superfície, o que permite mais colonização bacteriana.<sup>(7,22)</sup>

Estudos também concluíram que implantes de cromo-cobalto tiveram maior propensão para formação de biofilme em comparação com implantes de liga de titânio em 48 e 96 horas de incubação.<sup>(27)</sup> Contudo, observaram que após 6 horas a liga de cromo-cobalto-molibdênio (Cr-Co-Mo) formou menos biofilme que a liga de titânio, de modo que propriedades da superfície, como a hidrofobicidade ou a baixa energia livre superficial do Co-Cr-Mo, podem ter alguma influência na inibição ou no ato de retardar a expansão bidimensional do biofilme em superfícies com um grau semelhante de suavidade.<sup>(15)</sup> Um estudo comparando o titânio com outros materiais avaliou o titânio e o aço inoxidável, concluindo que o primeiro obteve uma taxa de infecção mais baixa que o aço inoxidável, corroborando o fato de que o material do implante impacta diretamente na taxa de infecção.<sup>(28)</sup>

Apesar do presente trabalho mostrar que o titânio forma mais biofilme que o cromo-cobalto, dados na literatura já indicam que o aço inoxidável permite mais formação de biofilme que o titânio.<sup>(28)</sup> Além disso, foi observado por meio do presente estudo que manter a bactéria em contato com o cromo-cobalto por uma semana favoreceu a formação de biofilme, sugerindo que quanto maior o tempo da prótese, maior é a chance de formação de biofilme. É importante salientar que estudos afirmam que as características inerentes do substrato, como rugosidade da superfície e a tendência hidrofóbica relativa da instrumentação, são pré-requisitos importantes para a formação de biofilmes.<sup>(29)</sup> Essas características também devem ser levadas em consideração por parte do ortopedista no momento da escolha do material.

## CONCLUSÃO

Os resultados do desenvolvimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* demonstraram maior formação de biofilme no biomaterial titânio em comparação com os dados observados do crescimento bacteriano em cromo-cobalto. Também foi observado que o cromo-cobalto apresentou maior crescimento bacteriano quando avaliado após uma semana de incubação.

## REFERÊNCIAS

1. DATASUS [internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2018 [citado 2018 abr 10]. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/>
2. Kasliwal MK, Tan LA, Traynelis VC. Infection with spinal instrumentation: Review of pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Surgical Neurology International*. 2014; 4(Suppl 5):392-403. doi:10.4103/2152-7806.120783.

3. Narayan R. The next generation of biomaterial development. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2010; 368(1917):1831-1837. doi:10.1098/rsta.2010.0001.
4. Almirante B, Miró J. Infecciones asociadas a las válvulas protésicas cardíacas, las prótesis vasculares y los dispositivos de electroestimulación cardíacos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008; 26(10):647-664. doi:10.1016/s0213-005x(08)75281-9.
5. Neut D, van Horn J, van Kooten T, van der Mei H, Busscher H. Detection of Biomaterial-Associated Infections in Orthopaedic Joint Implants. *Clin Orthop Relat Res*. 2003; 413:261-268. doi:10.1097/01.blo.0000073345.50837.84.
6. Ferreira JAB, Nobrega HN, Vieira VV, Abrantes SMP. Diversidade genética e produção de biofilme de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água utilizada em unidades de Terapia Renal Substitutiva. *RevAnalytica [Internet]*. 2014; 65:56-69.
7. Henriques A, Vasconcelos C, Cerca N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais: O estado da arte. *Arq Med [Internet]*. 2013 Fev [citado 2019 Ago 30]; 27( 1 ): 27-36.
8. Corder J, Munuera L, Folgueira M. Influence of bacterial strains on bone infection. *Journal of Orthopaedic Research*. 1996; 14(4):663-667.
9. Seaman S, Kerezoudis P, Bydon M, Torner J, Hitchon P. Titanium vs. polyetheretherketone (PEEK) interbody fusion: Meta-analysis and review of the literature. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2017; 44:23-29.
10. Morlock M, Jäger M. Endoprothetik des älteren Menschen. *Der Orthopäde*. 2016; 46(1):4-17. 22.
11. Patel S, Aruni W, Inceoglu S, Akpolat Y, Botimer G, Cheng W et al. A comparison of *Staphylococcus aureus* biofilm formation on cobalt-chrome and titanium-alloy spinal implants. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2016; 31:219- 223.
12. Freitas VR, van der Sand ST, Simonetti AB. In vitro biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on the surface of highspeed dental handpieces. *Rev Odontol UNESP*. 2010; 39(4): 193-200.
13. Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review *Proc Inst Mech Eng H*. 2014; 228(10):1083-1099.
14. Lima JLC et al. Análise da produção de biofilme por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2017; 3(29): 310-316. doi:10.5935/0103-507x.20170039.
15. Koseki H, Yonekura A, Shida T, Yoda I, Horiuchi H, Morinaga Y et al. Early Staphylococcal Biofilm Formation on Solid Orthopaedic Implant Materials: In Vitro Study. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e107588.
16. Batista OMA, Monteiro RM, Machado MB, Ferreira AM, Valle ARMC, Watanabe E et al. Cateter urinário: o tempo de exposição e calibre podem influenciar na formação de biofilme. *Acta Paul Enferm*. 2018; 31(5): 535-541.
17. Ferreira PVA, Amêndola I, Oliveira LD, Silva CRG, Leão MVP, Santos SSF. Prevalence and Sensitivity of Bacilli and *Pseudomonas* in the Newborn's Oral Cavity *Braz Dent J*. [Internet]. 2017 Aug [citado 2019 Ago 30]; 28(4): 423-427. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-64402017000400423&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402017000400423&lng=en).
18. Monteiro RM, Marques DM, Domingues PCA, Oliveira VC, Macedo AP, Razaboni AM et al. Avaliação de um protocolo para redução da contaminação microbiana da água da unidade odontológica. *Ato Odontol Latinoam [Internet]*. 2018 Dec [citado 2019 Ago 30]; 31(3): 138-143. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1852-48342018000300003&lng=en](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-48342018000300003&lng=en).
19. Carvalho TP, Maske TT, Signori C, Brauner KV, Oliveira EFCMS. Desenvolvimento de lesões de cárie em dentina em um modelo de biofilme simplificado in vitro: um estudo piloto. *Rev. Odontol. Unesp [internet]*. 2018 jan 23 [citado 2019 ago 30]; 47(1): 40-44. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s1807-25772018000100040&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1807-25772018000100040&lng=en).

20. Speranza G, Gottardi G, Pederzoli C, Lunelli L, Canteri R, Pasquardini I, et al. Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials*. 2004; 25:2029-37.
21. Cordero J, Manuera L, Folgueira MD. Influence of bacterial strains on bone infection. *J Orthop Res*. 1996; 14:663-7.
22. Cordero J, Manuera L, Folgueira MD. The influence of the chemical composition and surface of the implant on infection. *Injury*. 1996; 27(3):34-7.
23. Chang CC, Merritt K. Infection at the site of implanted materials with and without preadhered bacteria. *J Orthop Res*. 1994; 12:526-31.
24. Bos R, van der Mei HC, Gold J, Busscher HJ. Retention of bacteria on substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett*. 2000; 189: 311-5.
25. Trampuz A, Widmer AF. Infection associated with orthopedic implants. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2006; 19:349-56.
26. Lauderdale KJ, Malone CL, Boles BR, Morcuende J, Horswill AR. Dispersão de biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina associado à comunidade em material de implante ortopédico. *J Orthop Res*. 2010; 28(1): 55-61. doi:10.1002/jor.20943.
27. Shalin SP, Wilson A, Serkan I, Yusuf TA, Gary DB, Wayne KC, Olumide AD. A comparison of *Staphylococcus aureus* biofilm formation on cobalt-chrome and titanium-alloy spinal implants. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2016; 31:219- 223.
28. Soutanis KC, Pyrovolou N, Zahos KA, Karaliotas GI, Lenti A, Liveris I, et al. Late postoperative infection following spinal instrumentation: Stainless steel versus titanium implants. *J Surg Orthop Adv*. 2008;17:193-9.
29. Kasliwal MK, Tan LA, Traynelis VC. Infection with spinal instrumentation: Review of pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Surg Neurol Int*. 2013; 4(5): 392-403.