

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

KAYO BARRETO DE ALMEIDA

ESTUDO *IN VITRO* DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM IMPLANTE ORTOPÉDICO
DE TITÂNIO E TITÂNIO/DLC (*DIAMOND-LIKE CARBON*) EM CULTURA DE
SERRATIA MARCESCENS

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2024

KAYO BARRETO DE ALMEIDA

ESTUDO *IN VITRO* DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM IMPLANTE
ORTOPÉDICO DE TITÂNIO E TITÂNIO/DLC (*DIAMOND-LIKE CARBON*) EM
CULTURA DE *SERRATIA MARCESCENS*

Dissertação apresentada ao
Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como requisito para
obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal na área de
Concentração de Reprodução e
Saúde Animal.

ORIENTADOR: Prof. Dr. André Lacerda de Abreu Oliveira

COORIENTADOR: Dr. Sérgio Henrique Seabra

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2024

KAYO BARRETO DE ALMEIDA

ESTUDO *IN VITRO* DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM IMPLANTE
ORTOPÉDICO DE TITÂNIO E TITÂNIO/DLC (*DIAMOND-LIKE CARBON*) EM
CULTURA DE *SERRATIA MARCESCENS*

Dissertação apresentada ao
Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como requisito para
obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal na área de
Concentração de Reprodução e
Saúde Animal.

Aprovado em 26 de fevereiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Josias Alves Machado

Dra. Paula Gebe Cabral

Coorientador Dr. Sérgio Henrique Seabra

Orientador Dr. André Lacerda de Abreu Oliveira

*Ao Senhor Jesus,
o Deus da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus, que me gerou para sua honra e glória.

À minha querida esposa Thayane, por toda compreensão e apoio.

Aos meus pais, por todo sacrifício, pela base que me deram e pelo apoio financeiro, pra que eu pudesse continuar nos estudos, mesmo em meio aos planos de casamento.

Aos meus tios, por me inspirarem e sonharem esse desafio comigo.

Aos meus pastores e irmãos, por todo suporte em orações.

Ao meu professor e orientador André Lacerda, por esta oportunidade, por todo ensino e confiança.

Aos meus queridos amigos e amigas, mestrandos, doutorandos e residentes, que tanto me ensinaram e ajudaram nessa caminhada. Em especial Ademila e Tainara.

Aos queridos professores, Josias Machado, Sérgio Seabra e Fernanda Antunes.

Ao companheiro de viagem, Robson.

Aos amigos da república, e ao Gustavo.

Porque N'Ele foram criadas todas as coisas que há nos céus e na terra, visíveis e invisíveis, sejam tronos, sejam dominações, sejam principados, sejam potestades. Tudo foi criado por Ele e para Ele.

Colossenses 1:16

RESUMO

A contaminação em implantes ortopédicos compreende um problema na saúde mundial, pois intervém diretamente no bem-estar do paciente, no complexo diagnóstico e nos altos custos do tratamento. O quadro de infecção em sítio cirúrgico (ISC) pode chegar a 15% dos pacientes hospitalizados e, quando há presença de implantes, podem ser difíceis de tratar, pois estão relacionadas à formação de biofilme. A necessidade de explante em animais acometidos por fraturas expostas, corrigidas com fixação interna, é de 21%. Por isso, atualmente, a propriedade antibiofilme tem sido considerada altamente desejável para aplicações médicas, e o uso do revestimento de DLC, como biomaterial, tornam-se bastante atraentes neste cenário. A biocompatibilidade do DLC já está bem consolidada em artigos de revisão e, graças às suas excelentes propriedades, já tem sido comercializado por empresas da área médica, com o intuito de melhorar a resistência dos dispositivos. A bactéria *Serratia marcescens* é clinicamente significativa porque está frequentemente envolvida em diversas infecções associadas aos cuidados da saúde. Sua patogênese é complicada devido aos vários fatores de virulência e capacidade de formação de biofilme. A estrutura do DLC permite a infiltração de oxigênio em sua superfície, produzindo assim, espécies reativas de oxigênio (ERO). Esta pesquisa pretende avaliar se o revestimento de DLC em implante ortopédico é eficaz para inibir o crescimento de biofilme bacteriano de *S. marcescens*, *in vitro*, e por qual método isto ocorre. O presente experimento foi conduzido em três grupos, no qual foram utilizadas uma placa ortopédica de titânio, uma placa ortopédica de titânio revestida com DLC, e 0,1g de lã de vidro, para o grupo controle. Os implantes e a lã de vidro foram colocados em frascos Erlenmeyer com meio de cultura e, em seguida, foram autoclavados e depois inoculada a bactéria *S. marcescens*, em cada frasco. O crescimento se deu com os frascos fixados em uma incubadora *shaker*, durante 48h. O biofilme foi extraído de cada grupo e quantificado em um espectrofotômetro. Foram também realizadas imagens por MEV, e em microscópio estereoscópico com fluorescência (MEF), para analisar a produção de ERO. Com isso, concluímos que o revestimento com filme de DLC foi capaz de inibir a formação de biofilme de *S. marcescens* em implantes ortopédicos *in vitro* e, sugerimos, que o método pelo qual o DLC impede a adesão bacteriana, seja em virtude de sua capacidade de gerar ERO.

Palavras-chave: ISC; Fratura exposta; Biomaterial; Antibiofilme; ERO;

ABSTRACT

Contamination in orthopaedic implants is a worldwide health problem, as it directly affects the patient's well-being, with complex diagnosis and high treatment costs. Surgical site infections (SSI) can affect up to 15% of hospitalized patients, and when implants are present they can be difficult to treat, as they are related to biofilm formation. The need for explantation in animals affected by open fractures, corrected with internal fixation, is 21%. For this reason, the antibiofilm property has currently been considered highly desirable for medical applications, and the use of DLC coatings as biomaterials has become very attractive in this scenario. The biocompatibility of DLC is already well established in review articles, and thanks to its excellent properties, it has already been marketed by medical companies in order to improve the resistance of devices. The bacterium *Serratia marcescens* is clinically significant because it is frequently involved in various healthcare-associated infections. Its pathogenesis is complicated by various virulence factors and biofilm formation capacity. The structure of DLC allows oxygen to infiltrate its surface, thus producing reactive oxygen species (ROS). This research aims to assess whether DLC coating on orthopaedic implants is effective in inhibiting the growth of *S. marcescens* bacterial biofilm *in vitro*, and by what method this occurs. This experiment was conducted in 3 groups, using a titanium orthopaedic plate, a titanium orthopaedic plate coated with DLC, and 0.1g of glass wool for the control group. The implants and glass wool were placed in Erlenmeyer flasks with culture medium, then autoclaved and the *S. marcescens* bacteria inoculated into each flask. Growth took place with the flasks fixed in a shaker incubator for 48 hours. The biofilm was extracted from each group and quantified using a spectrophotometer. Images were also taken using SEM and a stereoscopic fluorescence microscope (SEM) to analyze ROS production. We conclude that the DLC film coating was able to inhibit the formation of *S. marcescens* biofilm on orthopaedic implants *in vitro*, and suggest that the method by which DLC prevents bacterial adhesion is due to its ability to generate ROS.

Keywords: SSI; Exposed fracture; Biomaterial; Antibiofilm; ROS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| FIGURA 1: BACTÉRIA <i>SERRATIA MARCESCENS</i> FORMANDO UMA MATRIZ EXTRACELULAR (BIOFILME). FONTE: HTTPS://COMMONS.WIKIMEDIA.ORG/WIKI/FILE:SALMOBANDEAU.JPG (2023). | 19 |
| FIGURA 2: IMAGEM ESQUEMÁTICA DEMONSTRANDO A ESTRUTURA DE UM BIOFILME BACTERIANO ADERIDO À UMA SUPERFÍCIE. FONTE: ADAPTADO DE QUINN <i>ET AL.</i> (2020). | 20 |
| FIGURA 3: PLACA ORTOPÉDICA DE TITÂNIO REVESTIDA COM DLC, UTILIZADA NO PRESENTE EXPERIMENTO. FONTE: PRÓPRIO AUTOR (2024). | 28 |
| FIGURA 4: LÃ DE VIDRO. FONTE: HTTPS://SUDLAB.COM.BR/INDEX.PHP?ID_PRODUCT=332&CONTROLLER=PRODUCT (2024)..... | 30 |
| FIGURA 5: PLACAS ORTOPÉDICAS UTILIZADAS NO EXPERIMENTO. A PLACA DE COR PRETA, AO LADO ESQUERDO DA IMAGEM, É A PLACA DE TITÂNIO REVESTIDA COM DLC; E A PLACA DE COR AMARELA, AO LADO DIREITO, É A PLACA DE TITÂNIO. FONTE: PRÓPRIO AUTOR (2024). | 30 |
| FIGURA 6: PLACA DE PETRI CONTENDO COLÔNIAS DA BACTÉRIA <i>SERRATIA MARCESCENS</i> . FONTE: PRÓPRIO AUTOR (2024)..... | 31 |
| FIGURA 7: MICROSCÓPIO ESTEREOSCÓPICO DE FLUORESCÊNCIA (MEF) CARL ZEISS, NO MOMENTO EM QUE ESTAVAM SENDO VISUALIZADAS UM DOS IMPLANTES ORTOPÉDICOS. FONTE: PRÓPRIO AUTOR (2024)..... | 33 |
| FIGURA 8: GRÁFICO PRODUZIDO NO EXCEL, UTILIZANDO OS DADOS DE ABSORBÂNCIA DA TABELA 1. FONTE: PRÓPRIO AUTOR (2024)..... | 35 |
| FIGURA 9: MÉDIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME PRODUZIDO POR <i>S. MARCENCES</i> EM PLACAS DE TITÂNIO, TITÂNIO/DLC E GRUPO CONTROLE. FONTE: PROTOCOLO DE PESQUISA (2023). | 37 |
| FIGURA 10: TESTE DE TUKEY DAS MÉDIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME PRODUZIDO POR <i>S. MARCENCES</i> EM PLACAS DE TITÂNIO, TITÂNIO/DLC E LÃ DE VIDRO. FONTE: PROTOCOLO DE PESQUISA (2023). | 38 |
| FIGURA 11: IMAGEM DA PLACA ORTOPÉDICA DE TITÂNIO, CAPTURADA POR MEV. OBSERVA-SE A PRESENÇA DE COLONIZAÇÃO BACTERIANA (BIOFILME) SOBRE A SUPERFÍCIE DO IMPLANTE. FONTE: THERMOFISHER APREO VS SEM – LBCT UENF (2024)..... | 39 |
| FIGURA 12: IMAGEM DA PLACA ORTOPÉDICA DE TITÂNIO REVESTIDO COM DLC, CAPTURADA | |

POR MEV. OBSERVA-SE A AUSÊNCIA DE COLONIZAÇÃO BACTERIANA (BIOFILME) SOBRE A SUPERFÍCIE DO IMPLANTE. FONTE: THERMOFISHER APREO VS SEM – LBCT / UENF (2024).39

FIGURA 13: IMAGEM DA PLACA ORTOPÉDICA DE TITÂNIO, VISUALIZADA ATRAVÉS DO MEF, DEMONSTRANDO NÃO PRODUZIR ERO, NÃO APRESENTANDO NENHUM ASPECTO FLUORESCENTE APÓS SER BANHADA COM 2,7- DICLOROFLUORESCEÍNA, POR 30MIN. FONTE: AXIOCAM MR5 (ZEISS) E SOFTWARE AXIONVISION LE (VERSÃO 4.8.2, ZEISS) (2024).40

FIGURA 14: IMAGEM DA PLACA ORTOPÉDICA DE TITÂNIO REVESTIDA COM DLC, VISUALIZADA ATRAVÉS DO MEF, DEMONSTRANDO PRODUZIR ERO, APRESENTANDO ASPECTO VERDE FLUORESCENTE, APÓS SER BANHADA COM 2,7- DICLOROFLUORESCEÍNA, POR 30MIN. FONTE: AXIOCAM MR5 (ZEISS) E SOFTWARE AXIONVISION LE (VERSÃO 4.8.2, ZEISS) (2024).41

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - VALORES DE ABSORBÂNCIA ADQUIRIDOS NA QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO. FONTE: PROGRAMA SOFTMAXPRO (2023). | 34 |
| TABELA 2 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS MÉDIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME PRODUZIDO POR <i>S. MARCENCES</i> EM PLACAS DE TITÂNIO, TITÂNIO/DLC E GRUPO CONTROLE. FONTE: PROTOCOLO DE PESQUISA (2023). | 36 |
| TABELA 3 - TESTES SIMULTÂNEOS DE TUKEY PARA AS DIFERENÇAS DE MÉDIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME PRODUZIDO POR <i>S. MARCENCES</i> EM PLACAS DE TITÂNIO, TITÂNIO/DLC E LÃ DE VIDRO. FONTE: PROTOCOLO DE PESQUISA (2021). | 38 |

LISTA DE SIGLAS

% - por cento

°C – graus Celsius

µL - microlitro

µm – micrometro

DLC – *Diamond-like-Carbon*

ERO – espécies reativas de oxigênio

g – grama

g/L – grama por litro

ISC – infecção em sítio cirúrgico

L – litro

LBCT - Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

M – massa molar

MEF – microscópio estereoscópico com fluorescência

MEV – microscopia eletrônica por varredura

min. – minuto

mL – mililitro

mm – milímetros

NB – *Nutrient Broth*

nm – nanômetro

pH – potencial hidrogeniônico

S. marcescens – *Serratia marcescens*

TiO₂ – dióxido de titânio

UNF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 16 |
| 2.1 | INFECÇÃO NOSOCOMIAL..... | 16 |
| 2.2 | <i>SERRATIA MARCESCENS</i> | 17 |
| 2.3 | BIOFILME BACTERIANO | 19 |
| 2.3.1 | Formação de biofilme em implantes ortopédicos | 21 |
| 2.4 | BIOMATERIAIS | 24 |
| 2.5 | <i>DIAMOND-LIKE CARBON (DLC)</i> | 27 |
| 2.6 | ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) | 29 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODO..... | 30 |
| 3.1 | PREPARO DO MEIO DE CULTURA | 31 |
| 3.2 | INOCULAÇÃO DAS AMOSTRAS | 31 |
| 3.3 | QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME | 32 |
| 3.4 | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)..... | 32 |
| 3.5 | ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ERO | 33 |
| 4 | RESULTADO | 34 |
| 4.1 | QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME | 34 |
| 4.2 | ESTATÍSTICA..... | 35 |
| 4.3 | IMAGENS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)..... | 39 |
| 4.4 | VISUALIZAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) | 40 |
| 5 | DISCUSSÃO | 42 |
| 5.1 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 46 |
| 6 | CONCLUSÃO | 48 |
| | REFERÊNCIAS..... | 49 |

1 INTRODUÇÃO

A contaminação em implantes ortopédicos compreende um problema na saúde mundial, pois intervém diretamente no bem-estar do paciente, sendo uma enfermidade de complexo diagnóstico e alto custo no tratamento, tendo em vista a necessidade de nova intervenção cirúrgica (QUINN *et al.*, 2020). O avanço da medicina tem levado a um aumento dos procedimentos cirúrgicos envolvendo a colocação de implantes, porém, os biomateriais desses implantes têm uma importante função no sucesso dos procedimentos ortopédicos (EVANS *et al.*, 2019).

Embora benéfico e necessário, o uso de implantes está associado ao aumento de infecção pós-operatória do sítio cirúrgico, devido à colonização bacteriana na superfície do implante. Infecções relacionadas aos implantes podem ser difíceis de tratar e estão relacionadas à formação de biofilme. Neste estado, as bactérias podem ser até 1.000 vezes mais resistentes aos antibióticos que a forma planctônica (BJARNSHOLT, 2013; QUINN *et al.*, 2020). O quadro de infecção pós-operatória pode chegar a 15% dos pacientes hospitalizados, e isso demonstra um grave problema nos serviços de saúde em que, grande parte dessas infecções acometem, de forma iatrogênica, pacientes expostos aos procedimentos cirúrgicos ortopédicos (DA SILVA *et al.*, 2021).

As fraturas expostas podem ocorrer em cerca de 14% dos cães acometidos por traumas ortopédicos e, este tipo de fratura, é caracterizado pela comunicação dos fragmentos com o meio externo, quando há rupturas na pele, causando assim, a contaminação da ferida. A taxa de necessidade de explante, em fraturas expostas que utilizaram fixação interna, foi de 21%, o que é notavelmente maior que as taxas de explante em fraturas fechadas eletivas, que normalmente é de no máximo 7%. Esse quadro leva à prescrição de longos períodos do uso de antibióticos na medicina veterinária, elevando com isso, o sofrimento dos pacientes, os custos do tratamento e a resistência antibiótica (SANDNESS; PERRY; BRUCE, 2023).

Algumas propriedades devem ser avaliadas ao utilizar um biomaterial, como a biocompatibilidade geral, resistência à corrosão, carga de superfície, citotoxicidade e propriedades mecânicas. O titânio é um metal que apresenta excelentes características em relação aos outros biomateriais metálicos mais populares.

Durante muitos anos, os estudos foram direcionados na busca de

biomateriais de alto desempenho, baseados, principalmente, na citotoxicidade e biocompatibilidade dos biomateriais. Porém, atualmente a propriedade antibiofilme tem sido considerada altamente desejável para biomateriais. (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Levando em consideração as altas taxas de resistência aos antibióticos, devido ao biofilme bacteriano gerado na superfície dos materiais (QUINN *et al.* 2020), têm se investigado o desenvolvimento de novas técnicas para modificação da superfície dos dispositivos médicos, de maneira que, as superfícies possam ser antimicrobianas, antiaderentes, que promovam integração óssea e continuem apresentando biocompatibilidade com os tecidos adjacentes. A modificação da superfície e agregação de partículas, que não só mantenham as propriedades desejáveis desses biomateriais, mas que também, em sinergismo reduzam, a formação de biofilme, também é o proposto por estudos recentes (CHOUIRFA *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2018).

No entanto, mais pesquisas são necessárias para estabelecer uma maneira segura de reduzir a profilaxia antibiótica em cirurgia ortopédica veterinária e humana. Com isso, o uso de implantes de titânio revestidos com Diamond-like carbon (DLC) tornam-se bastante atraentes neste cenário, visto que, tem demonstrado propriedades antimicrobianas (PENG *et al.*, 2022). Além disso, estabelecer métodos de controle de qualidade microbiológico para evitar a formação de biofilmes, são necessários para minimizar o uso de antibióticos e evitar as altas taxas de morbidade e custos com revisão cirúrgica e substituição dos implantes/próteses relatadas da medicina de forma geral (BRAGA *et al.*, 2012).

A bactéria *Serratia marcescens* é clinicamente significativa porque está, frequentemente, envolvida em diversas infecções associadas ao uso de implantes, além de poder causar infecção alimentar. Sua patogênese é complicada devido aos vários fatores de virulência, como: proteases, lipases, nucleases, hemolisina, motilidade, capacidade de formação de biofilme e emergente resistência às multidrogas (ABBAS; HEGAZY, 2020).

Este é o primeiro estudo, até o presente momento, em que se avalia a formação de biofilme bacteriano *in vitro*, em placa ortopédica de titânio, comparando-a com placa ortopédica de titânio revestida com filme de DLC, em cultura de *Serratia marcescens*, para avaliar se o revestimento com DLC, na placa ortopédica de titânio, será capaz de inibir a colonização de biofilme bacteriano, e inibir a adesão do

biofilme bacteriano em sua superfície, e por qual método isso ocorre.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÃO NOSOCOMIAL

Em razão das altas taxas de morbidade e mortalidade, a infecção em sítio cirúrgico (ISC) pode gerar grande prejuízo emocional relacionado ao bem-estar, aumentando o tempo dos pacientes em ambientes hospitalares, além de altos custos financeiros (SANTOS *et al.*, 2016). Em medicina humana, as infecções em feridas cirúrgicas têm demonstrado um grande obstáculo na saúde pública, por volta de 15% dos pacientes hospitalizados estão envolvidos nesta enfermidade, em que as cirurgias traumato-ortopédicas apresentam maior prevalência (DA SILVA *et al.*, 2021).

Segundo Santos *et al.* (2016), a ISC pode ser entendida como a contaminação, a permanência e o crescimento do patógeno na ferida operatória. E a infecção hospitalar é definida como aquela contraída durante os procedimentos realizados em ambientes hospitalares, cirurgias e internações. Normalmente, as manifestações clínicas de infecção tendem a aparecer de quatro a seis dias depois da cirurgia, mas podem se apresentar até 30 dias após o procedimento. Nos casos em que são utilizados implantes de próteses, pode acontecer dentro de aproximadamente um ano depois. Os sinais clínicos observados são: febre, anorexia, apatia, edema com secreção purulenta, e sinais claros de infecção por microrganismos.

Segundo Fuglestad *et al.* (2021), por ser um grande problema em saúde pública, vários métodos pré-operatórios para prevenir a ISC têm sido estabelecidos, como por exemplo: a utilização de antibióticos profiláticos, ampla tricotomia, banho pré-operatório, preparo da pele com antissépticos a base de clorexidina, traje adequado para a equipe cirúrgica; essas são técnicas eficazes para diminuir a incidência de ISC. Vários surtos nosocomiais resultaram de antisepsia inadequada da pele ou desinfecção de dispositivos médicos e superfícies ambientais mal realizadas (KECK *et al.*, 2020; WEBER *et al.*, 2007)

A maioria das infecções associadas ao sítio cirúrgico está relacionada aos cocos gram-positivos derivados da pele, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *streptococos* e *Enterococcus sp.* Além disso, cirurgias gastrointestinais, de cabeça e pescoço, estão associadas às infecções de bactérias

aeróbias entéricas e bacilus anaeróbios gram-negativos (SANTOS *et al.*, 2016).

Embora pouco relatada em medicina veterinária, acredita-se que a natureza das infecções nosocomiais seja semelhante à medicina humana. Animais de companhia podem ser infectados ou colonizados por agentes patogênicos ou microrganismos oportunistas. Alguns desses microrganismos potencialmente representam ameaça, tanto para saúde animal quanto pra saúde pública, especialmente quando envolvem bactérias multirresistentes (KECK *et al.*, 2020).

Entre os tipos de infecções hospitalares que podem acontecer, a ISC se apresenta em terceiro lugar, cerca de 14% a 16% dos pacientes hospitalizados, no Brasil (SANTOS *et al.*, 2016). Em ortopedia, os estafilococos são a principal causa de infecção relacionadas aos implantes, sendo responsáveis por quase 80% de todas as infecções protéticas. Considerado um patógeno nosocomial o MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), tornou-se cada vez mais prevalente nos últimos anos (ERCOLE *et al.*, 2011; VISHNU *et al.*, 2019).

Segundo Oliveira *et al.*, (2016), no Hospital Universitário Ortopédico de São Paulo, observaram que a incidência de ISC ortopédico era maior em pacientes acometidos por fraturas expostas. E que, dentre as infecções, predominaram aquelas contaminadas por meio de bacilos gram-negativos.

Existem várias bactérias conhecidas como agentes oportunistas, especialmente na ortopedia. A etiologia de surtos de infecção nosocomiais em hospitais veterinários tem sido relatada envolvendo, principalmente, *S. pseudointermedius*, *Enterobacteriales* ou *Acinetobacter baumannii* e *Serratia marcescens* (BOERLIN *et al.*, 2001; GRONTHAL *et al.*, 2014; HAENNI *et al.*, 2013; KECK *et al.*, 2020).

2.2 SERRATIA MARCESCENS

Serratia spp. são patógenos oportunistas gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* que, normalmente, se espalham pelo contato corpo a corpo. *Serratia marcescens* é a espécie mais patogênica do gênero, e é causa frequente de infecções adquiridas na área da saúde, principalmente, após cirurgias de coluna. A

bactéria é prevalente no meio ambiente e causa uma ampla gama de infecções adquiridas na área da saúde, como infecções do trato respiratório, osteomielite, infecções do trato urinário e endocardite (GARCIA *et al.*, 2019).

As bactérias do gênero *Serratia* são gram-negativas em forma de bastonetes, anaeróbio facultativo (GARCIA *et al.*, 2021). Estão amplamente distribuídas no solo, sedimentos, água, raízes de plantas, superfícies, bem como no trato gastrointestinal de animais. Foi, no passado, considerado um microrganismo saprófita, porém, tem sido reconhecida como um importante patógeno oportunista relacionado às infecções nosocomiais e à resistência antimicrobiana (ADAMSON *et al.*, 2012; KECK *et al.*, 2020; STORR *et al.*, 2017). *S. marcescens* foram relatadas vivendo simbioticamente e, às vezes, causando doenças em insetos e nematoides economicamente importantes (CHEN; BLOM; WALKER, 2017). É atualmente conhecida por causar infecções oculares, pulmonares, trato urinário e infecções sanguíneas associadas ao uso de cateter central. As bactérias da Família *Enterobacteriaceae* demonstraram ser excepcionais em adquirir, transferir e expressar resistência antimicrobiana (RAY *et al.*, 2017).

São bactérias que possuem forte capacidade formadora de biofilme, demonstrado em estudo sobre isolado clínico. A *S. marcescens* é uma das bactérias mais significativas clinicamente, porque está frequentemente envolvida em diversas infecções associadas aos cuidados da saúde, além de poder causar infecção alimentar. Sua patogênese é complicada devido aos vários fatores de virulência, como: proteases, lipases, nucleases e hemolisina, motilidade, formação de biofilme e sua emergente resistência às multidrogas. A formação de biofilme representa uma das principais causas de resistência aos antibióticos em *S. marcescens* (Figura 1). Pela adesão às superfícies vivas ou dispositivos médicos, *S. marcescens* pode formar biofilmes, resultando em infecções com risco de vida (ABBAS; HEGAZY, 2020; SHANKS *et al.*, 2013).



Figura 1: Bactéria *Serratia marcescens* formando uma matriz extracelular (biofilme). Fonte: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salmobandeau.jpg> (2023).

2.3 BIOFILME BACTERIANO

Os microrganismos podem ser classificados em duas formas de vida, nomeadamente planctônico e biofilme. Os microrganismos planctônicos são flutuantes, têm um metabolismo ativo e se replicam rapidamente. Em contraste, os microrganismos do biofilme existem como multicelulares, tridimensionais complexos, estruturas envolvidas por exopolissacarídeos (Figura 2). Eles estão em fase estacionária de crescimento, são metabolicamente menos ativos e resistem, não apenas aos mecanismos do hospedeiro mas, também, à maioria dos agentes antimicrobianos. Portanto, as infecções por biofilme são difíceis de tratar. Via de regra, a terapia antimicrobiana deve ser combinada com o manejo cirúrgico, a fim de curar infecção. Os biofilmes geralmente se formam em uma superfície não viva. Muitas infecções do sistema musculoesquelético são infecções por biofilme. Os microrganismos aderem, tanto ao osso morto como aos implantes (ZIMMERLI; SENDI, 2017).

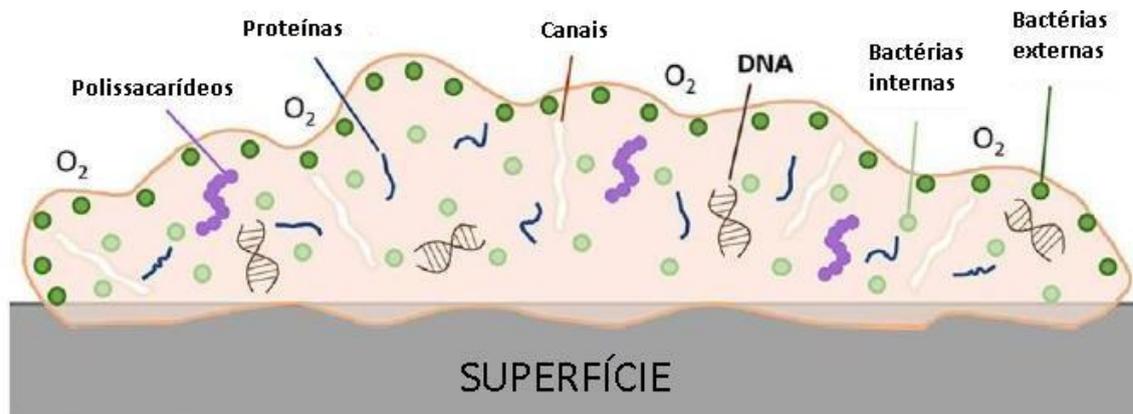


Figura 2: Imagem esquemática demonstrando a estrutura de um biofilme bacteriano aderido à uma superfície. Fonte: Adaptado de Quinn *et al.* (2020).

Bactérias e fungos podem se apresentar de formas individuais, flutuantes (planctônicas), ou como agregados de células (biofilmes). Um biofilme é um aglomerado de células microbianas, envolvidas por uma matriz de mucopolissacarídeo produzida por eles mesmos e, podem ser incorporados a ela, componentes do próprio hospedeiro, como fibrina, plaquetas e imunoglobulinas. O biofilme pode conter apenas um microrganismo ou ser polimicrobiano (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

O biofilme é formado quando bactérias planctônicas, que estão presentes no ambiente ósseo, aderem ao implante tornando-se sésseis, e agregam-se formando uma comunidade celular complexa dentro de substância polimérica extracelular (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007). Neste estado, as bactérias podem ser até 5.000 vezes mais resistentes aos antibióticos do que na forma planctônica (BJARNSHOLT *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2016; QUINN *et al.*, 2020).

Microrganismos formadores de biofilme exibem propriedades diferentes daqueles planctônicos, possuem arquitetura heterogênea, microscopicamente assumindo camadas de variadas densidades de polímeros. Além de grande parte de água e células microbianas, a matriz do biofilme inclui polímeros secretados, nutrientes e metabólitos, células lisadas, material particuladas e detritos. Dentro do biofilme, os microrganismos organizam comunidades com heterogenicidade estrutural e funcional semelhante à de um organismo multicelular (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

O biofilme compreende três camadas: a camada inicial consiste no filme de ligação ou condicionamento que é aderido à superfície do tecido ou biomaterial; a

segunda camada é a base do biofilme que contém microrganismos; e o filme de superfície atua como uma camada externa (terceira camada) onde os organismos planctônicos são liberados como organismos flutuantes livres e se espalham para o compartimento circundante (VEERACHAMY *et al.*, 2014).

O biofilme bacteriano é gerado quando um conjunto de microrganismos adere a uma superfície, sendo estes envolvidos por uma matriz extracelular. Esta matriz, formada por exopolissacarídeos, tem por função manter a integridade funcional deste biofilme, sendo possível sua proteção aos diferentes estresses ambientais (CARVALHO *et al.*, 2019).

A formação do biofilme inicia pela rápida adesão e proliferação na superfície do tecido ou implante, seguida pela agregação e maturação, levando à formação de micro colônias mais estáveis. As microcolônias se desenvolvem em macrocolônias que já estão envolvidas por uma matriz polissacarídica extracelular, o que protege e atua como barreira durante condições adversas. Dentro dessa matriz, ocorre um mecanismo de sinalização, o que permite a regulação da atividade microbiana através da mudança de expressão gênica chamada de *Quorum sensing*. Esse mecanismo tem demonstrado desempenhar um papel importante na ligação e desprendimento das células do biofilme. Quando há a formação de uma massa crítica, faltando nutrientes, o biofilme gera microrganismos planctônicos que se desprendem, levando complicações embólicas e colonizando outras superfícies (VEERACHAMY *et al.*, 2014).

Devido à proteção por essa matriz polimérica produzida pelas próprias bactérias, há dificuldade na ação do sistema imunológico e de antibióticos em eliminar as células bacterianas, o que torna a infecção por biofilme crônica. Além disso, assumem um perfil menos inflamatório, sendo de difícil detecção por parte dos exames microbiológicos convencionais (ABRANTES; NOGUEIRA, 2022).

2.3.1 Formação de biofilme em implantes ortopédicos

Os biofilmes podem se formar em diversas superfícies diferentes, como em tecidos vivos ou equipamentos médicos, tubulações industriais, sistema de água

potável ou sistema aquático natural (COSTA *et al.*, 2016). A maior parte dos microrganismos que contaminam equipamentos biomédicos, não causariam infecção na forma planctônica, mas podem levar às infecções persistentes quando agrupados. O biofilme é responsável por causar infecção em biomateriais devido ao agregado de microrganismos que contribuem para o seu crescimento (SANTOS *et al.*, 2017).

A patogênese de muitas infecções ortopédicas é relatada na presença de microrganismos formadores de biofilme. No entanto, a formação deste pode ocorrer durante o processo de fabricação dos implantes ortopédicos, e técnicas de usinagem (especialmente aquelas que utilizam uma interface úmida entre o conjunto da ferramenta e o implante) podem levar ao desenvolvimento de biofilme (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). A esterilização (por exemplo, com óxido de etileno) mata as bactérias nesses biofilmes, mas não remove os resíduos de suas matrizes. Esses depósitos devem ser removidos antes que os dispositivos possam ser implantados. Técnicas com tratamentos enzimáticos estão disponíveis para a remoção de resíduos de biofilme (BALSAMO *et al.*, 2012).

Um implante contaminado pode ser um reservatório para o tecido circundante, onde as bactérias podem residir intracelularmente. Infecções associadas aos dispositivos biomédicos são resistentes à ação do sistema imunológico e difíceis de tratar com antibióticos (VEERACHAMY *et al.*, 2014).

O primeiro trabalho relatado tentando reproduzir a osteomielite, em modelo experimental (coelho), foi publicado em 1885. No início da década de 70, foi demonstrado que a presença de um corpo estranho inserido na tíbia de um coelho (pino de aço inoxidável) poderia potencializar o desenvolvimento de osteomielite crônica por *Staphylococcus aureus*. Mas, somente dez anos depois, a ligação entre a formação de biofilme e dispositivos ortopédicos foi confirmada usando o mesmo modelo. Embora coelhos tenham sido frequentemente usados para esses estudos, modelos de implantes ortopédicos têm sido desenvolvido em muitos outros animais, como ratos, camundongos, cães e ovelhas, com uma ampla gama de corpos estranhos e locais de inserção (LEBEAUX *et al.*, 2013).

Dentre as causas de falha dos implantes estão a falha mecânica, desgaste excessivo, falha cirúrgica, resposta inflamatória, incompatibilidade na elasticidade e infecção. A contaminação no equipamento ortopédico é um dos motivos mais comuns na falha do implante (QUINN *et al.*, 2020).

Infecções microbianas associadas aos implantes são um sério problema na medicina moderna. Biofilmes bacterianos estão associados a 65% das infecções relacionadas aos implantes ortopédicos, sendo apontado como a principal causa de falha, o que leva à destruição tecidual, disseminação sistêmica do patógeno, e perda de função, resultando em sérios problemas de saúde e até à morte (VEERACHAMY *et al.*, 2014; MOORE *et al.*, 2022).

A patogênese de muitas infecções ortopédicas está relacionada à presença de microrganismos formadores de biofilmes. Microrganismos de infecções associadas aos implantes vivem agrupados em uma matriz extracelular altamente hidratada ligada à uma superfície. O esgotamento de nutrientes e/ou acúmulo de resíduos em biofilmes faz com que os microrganismos entrem em um estado de crescimento lento ou não (estacionário), tornando-os até 1000 vezes mais resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos do que seus equivalentes planctônicos (de vida livre) (MORAES *et al.*, 2013).

Diversas estratégias são relatadas para prevenir a infecção de superfícies de titânio e liga de titânio, como modificação da superfície por antibióticos, peptídeos antimicrobianos, elementos metálicos antibacterianos inorgânicos e polímeros antibacterianos. Além disso, várias estratégias, tais como adsorção para revestimentos e conjugação covalente química para modificações de superfície, foram aplicadas para imobilizar elementos antimicrobianos em titânio nas superfícies. (CHOUIRFA *et al.*, 2019).

A adesão de microrganismos à superfície do implante envolve rápida fixação por fatores específicos (por exemplo, adesinas) ou fatores inespecíficos (por exemplo, tensão superficial, hidrofobicidade e forças eletrostáticas). Esta fase inicial é seguida por uma fase cumulativa durante a qual as células bacterianas se ligam umas às outras e formam um biofilme. A presença de um corpo estranho demonstrou aumentar significativamente a suscetibilidade à infecção (MORAES *et al.*, 2013).

As infecções associadas à fixação da fratura podem ocorrer exogenamente em casos de trauma aberto (pré-operatório), durante a inserção do dispositivo de fixação (intra-operatório), ou durante a cicatrização de feridas (pós-operatório). A infecção hematogênica é menos frequente e é comumente associada à bacteremia originada de infecções de pele, respiratórias, dentárias ou do trato urinário (PACCOLA, 2001).

Os materiais dos implantes mais utilizados na ortopedia são aço inoxidável e titânio, e já está bem documentado que, implantes de aço inoxidável apresentam taxas de infecção maiores que os implantes de titânio na medicina humana (MOORE *et al.*, 2022).

Os implantes ortopédicos são compostos por diversos materiais com superfícies passíveis de colonização por biofilmes bacterianos. Observou-se que o biofilme gosta de se ligar ao titânio, discos de liga, polimetilmetacrilato (PMMA), polietileno de ultra alto peso molecular (UHMW-PE), aço inoxidável (SST) e alumínio. Os resultados *in vitro* mostraram que, materiais com superfícies mais rugosas, como Hidroxiapatita (HA) e polietileno (PE), têm maior área de superfície que titânio e aço inoxidável 316L. Para evitar o acúmulo de biofilmes nessas superfícies, vários métodos têm sido estudados, incluindo condução elétrica e revestimentos, contudo, revestimentos com antibióticos podem selecionar bactérias resistentes, e revestimento de prata em liga metálica de titânio-alumínio-nióbio com prata, apresentou efeitos limitados (MOORE *et al.*, 2022).

O desenvolvimento de próteses de alta qualidade, por modificação de superfícies, tem atraído o interesse da comunidade científica. O DLC tem emergido como um método eficiente para a modificação de superfícies metálicas. Estudos recentes têm mostrado que várias estruturas cobertas com filmes de DLC, com diferentes propriedades físico-químicas, podem influenciar as reações biológicas (LIAO *et al.*, 2016).

2.4 BIOMATERIAIS

O Instituto Nacional de Saúde Americana definiu, em 1982, que um biomaterial é qualquer substância ou elemento utilizado para substituir completa ou parcialmente qualquer tecido, órgão ou parte do corpo, por qualquer período de tempo, com intuito de conservar ou melhorar a qualidade de vida e bem-estar do indivíduo. Uma importante propriedade de um bom biomaterial é a biocompatibilidade *in vivo*, que é a capacidade que um material tem de gerar uma reposta adequada no local aplicado (QUINN *et al.*, 2020).

As principais características esperadas em um biomaterial de qualidade são: biocompatibilidade, resistência à corrosão e ao desgaste, não citotóxico, compatibilidade sanguínea, não carcinogênico, baixo coeficiente de atrito e antimicrobiano. Porém, ainda não foi encontrado um material perfeito, que apresente todas as características desejadas, por isso, é necessário o engajamento em estudos e tecnologia que façam associação entre os materiais ou modifiquem sua superfície (PENG *et al.*, 2022).

Outras características importantes para maior sucesso dos implantes ortopédicos são: forma, precisão dimensional e propriedades mecânicas adequadas. É de importância crescente a estabilidade química e toxicidade, devido à necessidade da biocompatibilidade ao longo da vida dos implantes. A combinação das propriedades mecânicas e biológicas, determina a utilidade clínica dos biomateriais nas cirurgias ortopédicas (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Segundo ROY & LEE (2007), o organismo é tão sensível em suas funções biológicas que um biomaterial completo e ideal seria aquele que, em contato com os tecidos e fluidos corporais, seria capaz de não perturbar as várias atividades biológicas do corpo. Além de apresentar inércia química e biológica, não ser citotóxico, nem carcinogênico, ser duro, ter baixo coeficiente de atrito e resistência ao desgaste. Seria interessante também, se ainda fornecesse algum tipo de tratamento biomédico.

Os materiais comumente utilizados são: aço inoxidável, cromo/cobalto, ligas de titânio, cerâmica, polietileno e cimento ósseo de polimetilmetacrilato (PMMA). Os metais foram considerados promissores para uso como implantes ortopédicos, devido à resistência mecânica consideravelmente maior diante dos outros biomateriais (Santos *et al.*, 2022). Embora de menor custo e presença de características bactericidas desejáveis, alguns metais como o cobre e suas ligas, ouro, prata, platina e rutênio, são irritantes e até tóxicos. Além disso, as consequências da inserção de metais como ferro, cobre e bronze em tecidos viáveis, são conhecidas há séculos. A alta suscetibilidade à corrosão, inflamação e infecção tecidual limitou suas aplicações médicas (SZCZEŚNY *et al.*, 2022).

O aço e suas ligas inoxidáveis, desenvolvidos no início do século 20, ainda são usados com pequenas modificações químicas até os dias atuais. O aço inoxidável também foi usado para a produção dos primeiros implantes e dispositivos ortopédicos amplamente utilizados, incluindo fixadores externos, pinos, placas e

parafusos ósseos, pinos intramedulares, próteses e muitos outros. Melhorias na tecnologia de aquisição de minério, fundição e purificação permitiram o desenvolvimento de grandes quantidades de metais e novas ligas, algumas das quais encontraram aplicações biomédicas. As ligas modernas mais amplamente utilizadas incluem ligas de cobalto-cromo (com ou sem molibdênio) e ligas de titânio (SZCZEŚNY *et al.*, 2022).

O titânio é o nono elemento mais abundante na crosta terrestre; no entanto, raramente é encontrado em sua forma pura, com a grande maioria de titânio presente como óxidos insolúveis. O óxido mais comum presente no meio ambiente é o dióxido de titânio (TiO₂), exemplos dos quais incluem os minerais rutilo e anatase (FAGE *et al.*, 2016). Os tratamentos de fabricação são usados para manipular a microestrutura de titânio tal que o produto finalizado possua propriedades metalúrgicas desejáveis para uso industrial, incluindo na indústria de dispositivos médicos e biomateriais (QUINN *et al.*, 2020).

Devido à biocompatibilidade, à ausência de toxicidade, à capacidade de osseointegração, além de alta resistência à tração em relação à densidade e resistência à corrosão, o titânio leva a uma melhor estabilidade do implante em relação aos de aço inoxidável. Atualmente, as ligas de titânio são amplamente utilizadas como implantes ortopédicos, praticamente todo tipo utilizado possui uma “variante” do titânio, incluindo parafusos, placas, pinos, pinos intramedulares, fixadores externos e próteses articulares (SZCZEŚNY *et al.*, 2022). Além disso, o titânio é ideal como implante, pois não aumenta a temperatura quando exposto ao campo magnético alternado, não interferindo na ressonância magnética. E, até o momento, foram encontradas mínimas evidências de atração leucocitária (COSTA *et al.*, 2015).

A liberação de íons pelos metais é a causa dos principais efeitos, como: sensibilização, toxicidade, mutagênese e teratogênese. Processos como polimento (eletropolimento), lixamento, passivação, anodização e revestimento com materiais secundários, foram desenvolvidos para reduzir a superfície de contato, proteger contra ação dos íons e do desgaste do implante e para aumentar a osseointegração (MORAIS; GUIMARÃES; ELIAS, 2007).

O principal objetivo dos revestimentos dos implantes é diminuir o contato direto com tecidos e materiais circundantes, podendo diminuir a intensidade de quaisquer efeitos físicos ou químicos prejudiciais na propriedade do material e bem-

estar do paciente (SILVA *et al.*, 2016).

As técnicas mais utilizadas de revestimento com materiais secundários são os revestimentos por plasma spray, hidroxiapatita e nitreto de titânio. Além disso, revestimentos de fosfato de cálcio, carbono e carbono tipo diamante (DLC), estão sob investigação crescente (RESENDE *et al.*, 2011).

2.5 DIAMOND-LIKE CARBON (DLC)

O DLC é um carbono predominantemente amorfo metaestável (por vezes microcristalino), contendo ligações sp² (similar ao grafite) e sp³ (similar aa diamante). O mecanismo de diferentes respostas das células às estruturas de DLC dependem dessa proporção sp²/sp³. O DLC tem atraído a atenção nas últimas décadas para uso como revestimento para aplicações biomédicas. Além das características físicas desejáveis, mostram biocompatibilidade com macrófagos, osteoblastos e fibroblastos (LIAO *et al.*, 2016).

As características do DLC são: dureza, baixo atrito, e alta resistência ao desgaste, o que o torna mais sustentável, além de possuir propriedades antitrombogênicas e não citotóxicas, mostrando a versatilidade mecânica e biomédica. Tem mostrado biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* devido ao forte ambiente de ligação (SANTOS *et al.*, 2017). O DLC não é um material único, ele pode ser ajustado de diferentes formas e variadas ligações atômicas, dependendo do seu método de preparo. Em razão de sua estrutura amorfa, os filmes de DLC têm a possibilidade de serem dopados e combinados aos diferentes elementos, proporcionando maior diversidade de utilizações e melhorando ou variando suas características, dependendo da aplicação desejada (ROY; LEE, 2007).

Os revestimentos de DLC têm a vantagem de poderem ser produzidos de maneira mais econômica (PENG *et al.*, 2022). E, dependendo da técnica e condições de síntese do DLC, como a incorporação de elementos metálicos ou não metálicos, as propriedades físicas e químicas podem ser adequadas para diversas aplicações biomédicas (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). As diferenças nas proporções de carbono com ligação sp² e sp³, também influenciam na dureza, na

biocompatibilidade, no desgaste e em outras propriedades. Esta possibilidade também permite sua aplicação em variados produtos médicos (ZIA *et al.*, 2023).

A utilização do revestimento de DLC como biomaterial (Figura 3) tem sido vastamente estudado nos últimos anos. E estes estudos têm demonstrado um grande potencial para o uso do filme de DLC em implantes médicos, pois este proporciona maior dureza, resistência ao desgaste e à corrosão nas superfícies, boa biocompatibilidade, diminui processos inflamatórios e aumenta a bioatividade celular, proporcionando melhor adesão das células e, ao mesmo tempo, reduz o crescimento bacteriano (LOPES *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2022; WACHESK *et al.*, 2021).

Por serem duros, resistentes ao desgaste, e de baixo coeficiente de atrito, os revestimentos com DLC foram, inicialmente, mais utilizados na área da indústria mecânica, mas com o passar do tempo, logo foi sendo descoberto e explorado por diversos mercados. A biocompatibilidade do DLC já está bem descrita e consolidada nos artigos de revisão e, graças às suas excelentes propriedades, vem sendo comercializado também por empresas da área médica, que produzem implantes ortopédicos, stents vasculares, próteses articulares, catéteres urinários, lentes oculares, instrumentais cirúrgicos, dentre outros dispositivos médicos (ZIA *et al.*, 2023).

A resistência do DLC limita sua aplicação isoladamente, por isso, tem sido testado apenas como material de revestimento que protege o implante do ambiente, mas também, apresenta alguma proteção mecânica e um sistema de liberação de agentes antimicrobianos (HUACHO *et al.*, 2017).

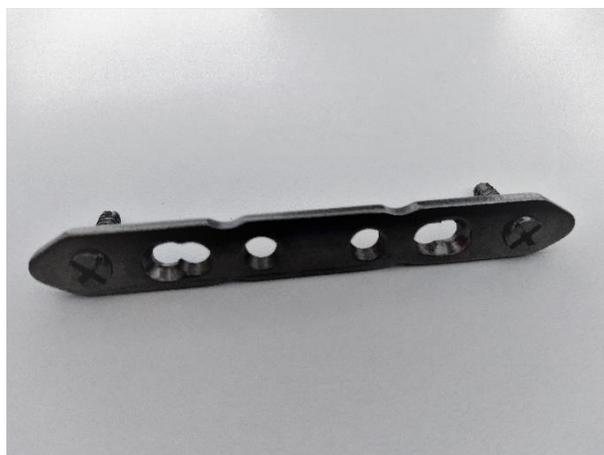


Figura 3: Placa ortopédica de titânio revestida com DLC, utilizada no presente experimento. Fonte: Próprio autor (2024).

2.6 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

As ERO são grupos de substâncias químicas oxidantes que reagem com facilidade, e são produzidas por parte do oxigênio consumido, que dependendo da concentração pode gerar danos às células, como: deterioração do DNA, injúria tecidual, danificar proteínas, lipídeos e organelas (SILVA; GONÇALVES, 2010; TAVARES *et al.*, 2011). Estas ERO, quando produzidas em excesso, geram um desequilíbrio entre os oxidantes e as funções de defesa da célula, os antioxidantes, e este desequilíbrio é chamado de estresse oxidativo (PARK *et al.*, 2009). Porém, a produção de ERO em quantidade moderada à excelente, tem um importante papel no equilíbrio das funções fisiológicas (GOUVEIA; LIMA, 2017).

A estrutura do filme de DLC permite a infiltração de oxigênio em sua superfície até as camadas mais basais, produzindo assim, espécies reativas de oxigênio nessas regiões (YANG *et al.*, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODO

Todo o experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual - LBCT, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. O trabalho foi conduzido em três grupos diferentes. No primeiro grupo está uma placa ortopédica de 2.7mm de titânio, com quatro furos (Figura 5); no segundo grupo uma placa ortopédica de 3mm de titânio revestida com filme de DLC, com seis furos (Figura 5); e, no terceiro grupo (grupo controle), 0,1g de lã de vidro (Figura 4).



Figura 4: Lã de vidro. Fonte: https://sudlab.com.br/index.php?id_product=332&controller=product (2024).



Figura 5: Placas ortopédicas utilizadas no experimento. A placa de cor preta, ao lado esquerdo da imagem, é a placa de titânio revestida com DLC; e a placa de cor amarela, ao lado direito, é a placa de titânio. Fonte: Próprio autor (2024).

3.1 PREPARO DO MEIO DE CULTURA

Para o início do experimento foi preparado o meio de cultura Nutrient Broth (NB) 8g/L em água destilada, onde a bactéria *S. marcescens* (Figura 6) iria ser cultivada. Foram utilizados três frascos Erlenmeyer 500mL. Depois do preparo do NB, foram colocados 50mL do meio de cultura em cada frasco e, em seguida, os implantes ortopédicos, um em cada frasco, e no terceiro frasco (controle) foi colocado 0,1g de lã de vidro. Em seguida, todos os frascos foram devidamente selados e autoclavados.

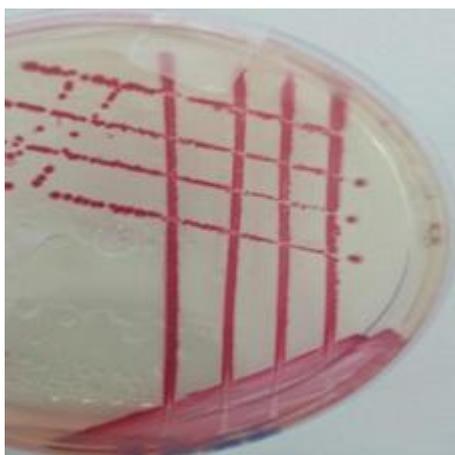


Figura 6: Placa de Petri contendo colônias da bactéria *Serratia marcescens*. Fonte: Próprio autor (2024).

3.2 INOCULAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após esterilização do material dentro de uma cabine de segurança biológica (Pachane), inoculamos 20 μ L da *S. marcescens* em cada frasco. Imediatamente, os frascos foram vedados com algodão e colocados em uma incubadora shaker (Novatecnica) a 31°C, durante 48 horas, para que houvesse o desenvolvimento das bactérias e formação do biofilme.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME

Para a quantificação do biofilme, após incubação e crescimento da bactéria nas amostras, as placas ortopédicas e a lâ de vidro foram removidas do meio, e dispostas separadamente em placas de Petri, seguidamente coradas com cristal violeta. Após 30 min, foram lavadas três vezes em solução tampão fosfato 50 mM. A extração do biofilme, foi feita com 4 mL de etanol 100% e, após sua obtenção, uma alíquota de 200 µL foi transferida para uma placa de 96 poços. Todo ensaio foi realizado em triplicata. A quantificação foi obtida através da leitura em espectrofotômetro versamax com absorbância de 540 nm pelo programa SoftmaxPro.

3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Após o período de incubação de 48 horas, os implantes foram fixados com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4), glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído 4%. Os implantes foram submetidos à lavagem com gradiente de etanol com intervalos de 15 minutos para desidratação. Os materiais do implante foram secos no ponto crítico usando CO₂ líquido Polaron Critical Point Dryer (CPD). Os materiais do implante foram, então, revestidos com ouro de paládio na proporção de 60:40 a 2 nm/14 min, usando um revestidor Emitech K550 para visualização sob o SEM-VAIO CARL ZEISS. Para cada implante testado, foram capturadas imagens em ampliação de 5000x, usando o ThermoFisher Apreo VS SEM.

3.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ERO

Para analisar a possível produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), as placas interagidas com *S. marcescens* foram tratadas com 2,7-diclorodihidrofluoresceína, por 30 minutos. Este marcador entra passivamente nas células, e esterases intracelulares fazem com que ele seja desacetilado, caso tenha sido oxidado por ERO, tornando-o fluorescente (MELLO *et al.*, 2019). Após o tratamento, as placas foram observadas através do microscópio estereoscópico com fluorescência (MEF) CARL ZEISS (Figura 7), e capturadas imagens através da câmera AxioCam MR5 (Zeiss) e *software AxionVision LE* (versão 4.8.2, Zeiss).

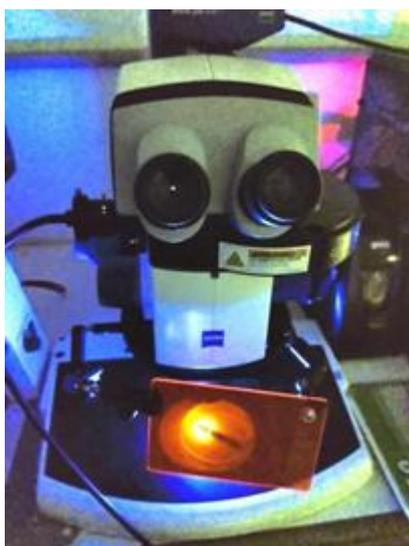


Figura 7: Microscópio estereoscópico de fluorescência (MEF) CARL ZEISS, no momento em que estavam sendo visualizadas um dos implantes ortopédicos. Fonte: Próprio autor (2024).

4 RESULTADO

4.1 QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME

O biofilme bacteriano foi quantificado através do espectrofotômetro versamax em comprimento de onda 540nm, e o programa SoftmaxPro gerou os valores de absorvância da Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de absorvância adquiridos na quantificação de biofilme bacteriano. Fonte: Programa SoftmaxPro (2023).

| Lã de Vidro (controle) | Placa de Titânio | Placa Titânio/DLC |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 3,270 | 1,405 | 0,720 |
| 3,336 | 1,451 | 0,770 |
| 3,375 | 1,384 | 0,754 |
| 2,881 | 0,280 | 0,173 |
| 2,946 | 0,295 | 0,173 |
| 2,937 | 0,309 | 0,162 |
| 1,218 | 0,154 | 0,097 |
| 1,272 | 0,163 | 0,089 |
| 1,266 | 0,156 | 0,085 |

O gráfico (Figura 8) demonstra que a quantidade de biofilme formado na placa de titânio /DLC, foi menor que a quantidade de biofilme gerado na placa de titânio sem o revestimento. Com isso, observamos a ação antimicrobiana do DLC, que impede a formação do biofilme na superfície da placa. Como o experimento foi conduzido em triplicata, os números de 1 a 3 representam as alíquotas da primeira lavagem (extração do biofilme), os números de 4 a 6, a segunda lavagem, e os números de 7 a 9, a terceira.

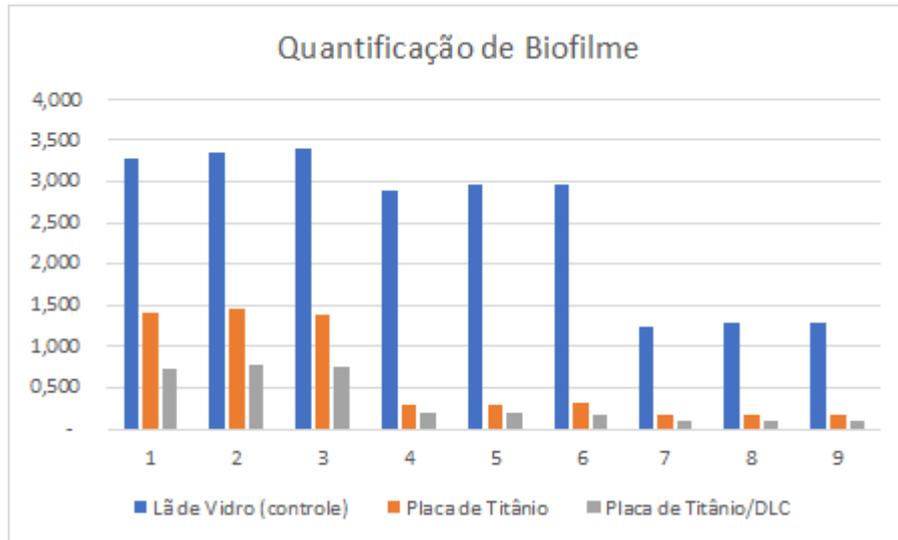


Figura 8: Gráfico produzido no Excel, utilizando os dados de absorvância da Tabela 1. Fonte: Próprio autor (2024).

4.2 ESTATÍSTICA

A Tabela 2 mostra a análise de variância das médias de formação de biofilme produzido pela *S. marcescens* em placas de titânio, titânio/DLC e o grupo controle que é o terceiro grupo e está com 0,1g de lã de vidro. Observa-se que há diferença significativa entre os três grupos, de maneira que: no grupo controle a média é mais elevada ($\mu = 2,500$; $\sigma = \pm 0,953$), e no grupo da placa de titânio a média foi 0,622 com desvio padrão de $\pm 0,597$. A placa titânio/DLC apresentou a menor média entre os três grupos, com 0,336 e desvio padrão de $\pm 0,311$.

Tabela 2 - Análise de variância das médias de formação de biofilme produzido por *S. marcescens* em placas de titânio, titânio/DLC e grupo controle. Fonte: Protocolo de pesquisa (2023).

| Grupo | N | Média (μ) | DesvPad ($\pm \sigma$) | IC de 95% | P-Valor⁽¹⁾ |
|--------------------------|----------|---------------------------------|--|------------------|------------------------------|
| Lã de Vidro | 9 | 2.500 | 0.953 | (2.037; 2.964) | |
| Placa de Titânio | 9 | 0.622 | 0.597 | (0.158; 1.085) | 0.000* |
| Placa Titânio/DLC | 9 | 0.336 | 0.311 | (-0.128; 0.799) | |

DesvPad Combinado = 0.673656.

Nota: Os resultados são baseados em linhas e colunas não vazias em cada subtabela mais interna.

⁽¹⁾ Teste ANOVA (p -valor < 0.05).

*Valores Significativos; NS - Valores Não Significativos.

Interpretação do teste:

H₀: Não há uma associação estatisticamente significativa entre os grupos.

H_a: Há uma associação estatisticamente significativa entre os grupos.

Decisão: Como o valor de p computado é menor que o nível de significância $\alpha = 0,05$, deve-se rejeitar a hipótese nula H_0 e aceitar a hipótese alternativa H_a .

Este excelente resultado, observado na Tabela 2 e também demonstrado na Figura 9, revela o potencial do recobrimento com DLC de inibir a formação de biofilme bacteriano. Uma vez que no grupo controle a quantificação do biofilme foi significativamente alta, e na placa de titânio puro, o valor ainda foi elevado em relação ao valor exposto para a placa de titânio/DLC, que foi bem menor.

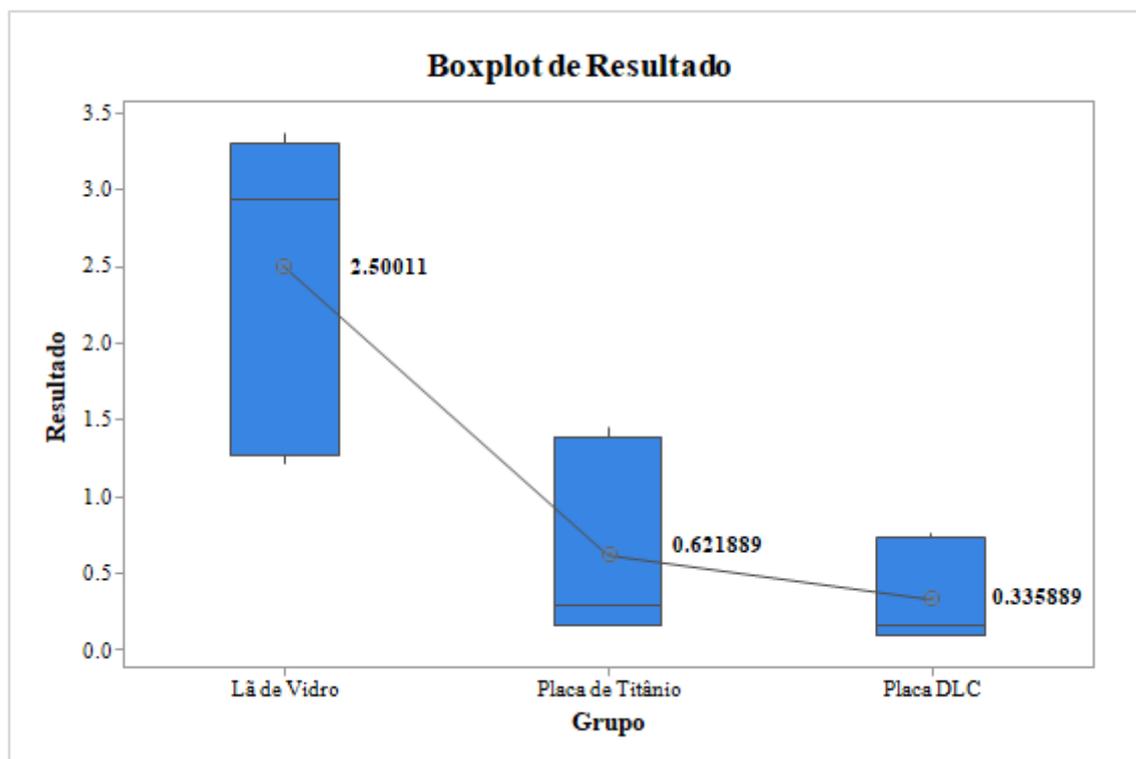


Figura 9: Médias de formação de biofilme produzido por *S. marcescens* em placas de titânio, titânio/DLC e grupo controle. Fonte: Protocolo de pesquisa (2023).

A Tabela 3 mostra o resultado dos testes simultâneos de Tukey para as diferenças de médias entre os três grupos, placas de titânio, titânio/DLC e o terceiro grupo que está com 0,1g de lã de vidro para controle. Ao compararmos os grupos placa de titânio com lã de vidro, verifica-se que a média do grupo controle é maior do que a média obtida no grupo de placa de titânio em 1.878, sendo esta uma diferença significativa ($p < 0.05$) entre estes dois grupos. Na comparação entre a placa de titânio/DLC e o grupo controle de lã de vidro, observa-se que a média obtida no grupo de placa titânio/DLC é menor do que no grupo controle em -2.164, sendo esta uma diferença significativa ($p < 0.05$) entre estes dois grupos. Quando comparamos os grupos placa titânio/DLC e placa de titânio, verifica-se que a média obtida no grupo de placa titânio/DLC é menor do que no grupo controle em -0.286, contudo, esta não é uma diferença significativa ($p < 0.05$) entre estes dois grupos.

Tabela 3 - Testes simultâneos de Tukey para as diferenças de médias de formação de biofilme produzido por *S. marcesces* em placas de titânio, titânio/DLC e lã de vidro. Fonte: Protocolo de pesquisa (2021).

| Diferença de Níveis | Diferença de Médias | EP da Diferença | IC de 95% | Valor-T | Valor-P Ajustado |
|--------------------------------------|---------------------|-----------------|------------------|---------|---------------------|
| Placa de Titânio - Lã de Vidro | -1.878 | 0.318 | (-2.671; -1.086) | -5.91 | 0.000* |
| Placa Titânio/DLC - Lã de Vidro | -2.164 | 0.318 | (-2.957; -1.372) | -6.82 | 0.000* |
| Placa Titânio/DLC - Placa de Titânio | -0.286 | 0.318 | (-1.079; 0.507) | -0.90 | 0.645 _{ns} |

Nível de confiança individual = 98.02%

Nota: Os resultados são baseados em linhas e colunas não vazias em cada subtabela mais interna.

⁽¹⁾ Teste de Tukey para comparações simultâneas de grupos (p-valor < 0.05).

*Valores Significativos; NS - Valores Não Significativos.

Interpretação do teste:

H₀: Não há uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

H_a: Há uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Decisão: Como o valor de p computado é menor que o nível de significância alfa = 0,05, deve-se rejeitar a hipótese nula H₀ e aceitar a hipótese alternativa H_a.

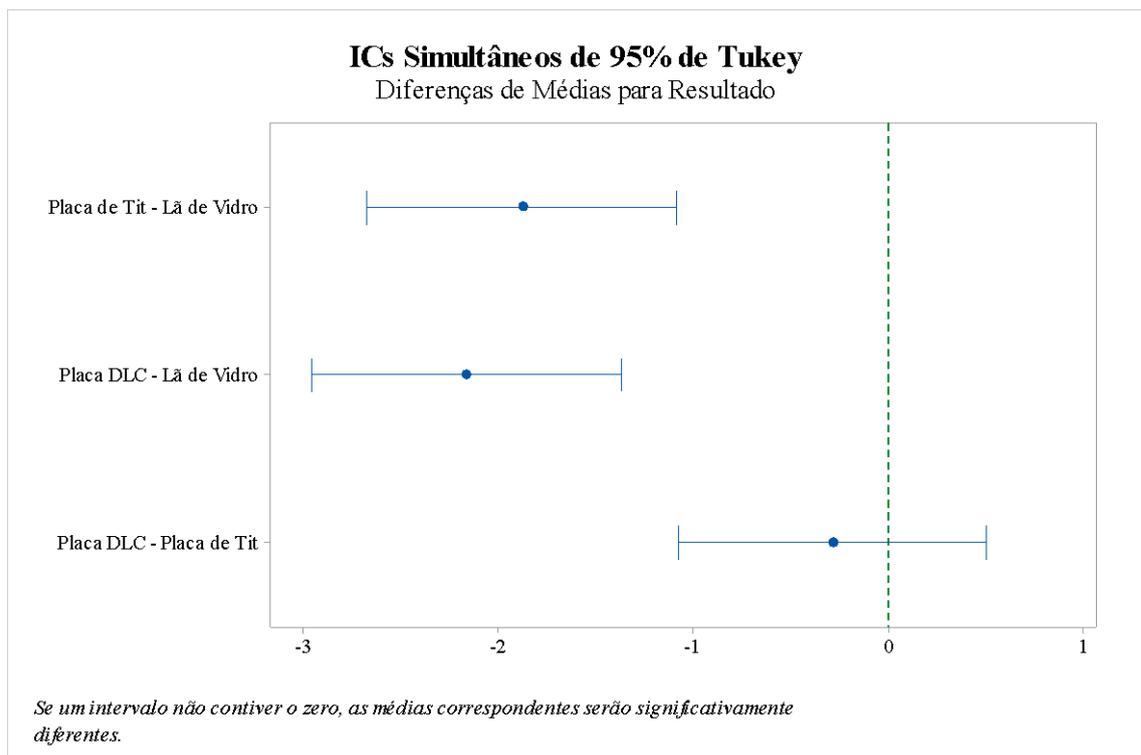


Figura 10: Teste de Tukey das médias de formação de biofilme produzido por *S. marcesces* em placas de titânio, titânio/DLC e lã de vidro. Fonte: Protocolo de pesquisa (2023).

A Figura 10 ilustra a Tabela 3, na qual, ao comparar a placa de titânio/DLC com a placa de titânio, o intervalo ultrapassa a faixa 0, sinalizando uma diferença não significativa entre os dois grupos.

4.3 IMAGENS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens capturadas através da MEV, demonstraram formação de biofilme da bactéria *S. marcescens* na superfície da placa ortopédica de titânio puro (Figura 11). Em contrapartida, na superfície do implante ortopédico de titânio revestido com filme de DLC, não foi observada nenhuma formação de biofilme bacteriano (Figura 12).

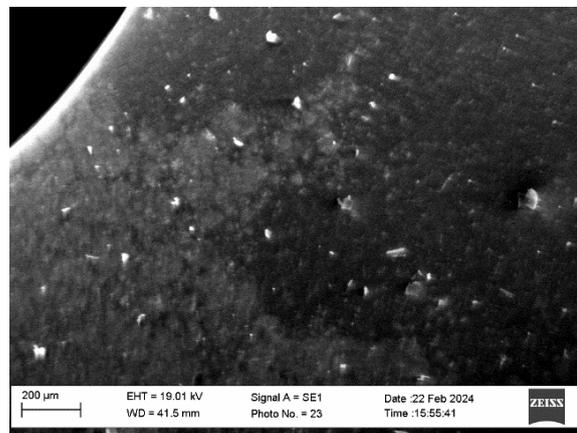


Figura 11: Imagem da placa ortopédica de titânio, capturada por MEV. Observa-se a presença de colonização bacteriana (biofilme) sobre a superfície do implante. Fonte: ThermoFisher Apreo VS SEM – LBCT UENF (2024).

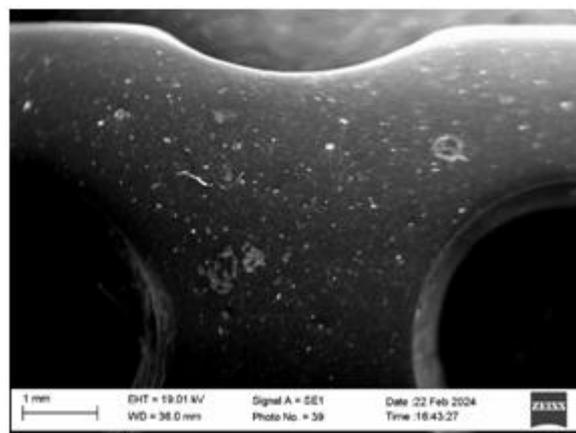


Figura 12: Imagem da placa ortopédica de titânio revestido com DLC, capturada por MEV. Observa-se a ausência de colonização bacteriana (biofilme) sobre a superfície do implante. Fonte: ThermoFisher Apreo VS SEM – LBCT / UENF (2024).

4.4 VISUALIZAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Analisando as imagens capturadas através do MEF, visualiza-se que o implante ortopédico de titânio (Figura 13), em contato com a 2,7-diclorofluoresceína durante 30 min, não apresentou nenhum aspecto fluorescente, devido a não produção de ERO, demonstrando apenas a luz amarela do equipamento. Já na placa de titânio revestida com DLC (Figura 14), sob o mesmo tratamento, observamos o aspecto luminoso verde fluorescente refletido na imagem. Este aspecto fluorescente se dá devido à liberação de ERO pela superfície do DLC, em contato com a 2,7-diclorofluoresceína. Esta liberação de ERO é o mecanismo pelo qual sugerimos que o DLC seja capaz de inibir a aderência bacteriana em sua superfície.

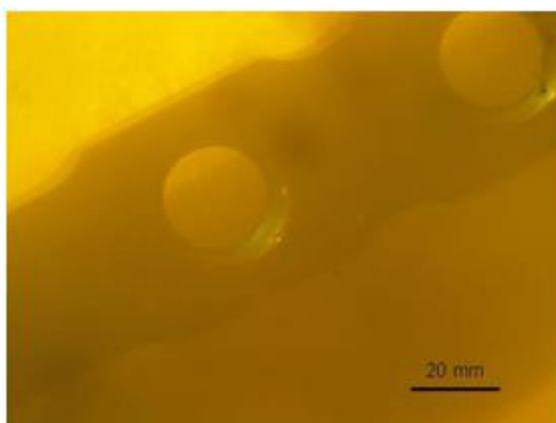


Figura 13: Imagem da placa ortopédica de titânio, visualizada através do MEF, demonstrando não produzir ERO, não apresentando nenhum aspecto fluorescente após ser banhada com 2,7-diclorofluoresceína, por 30min. Fonte: AxioCam MR5 (Zeiss) e *software AxionVision LE* (versão 4.8.2, Zeiss) (2024).

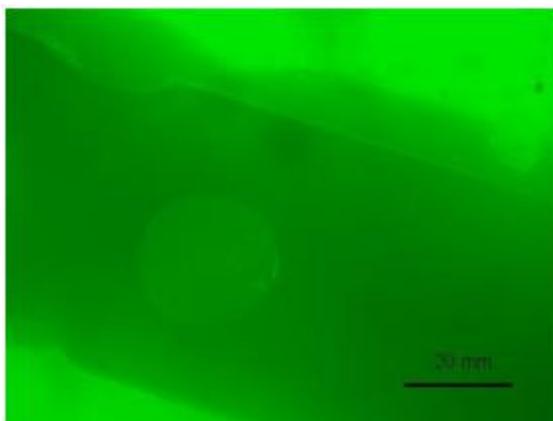


Figura 14: Imagem da placa ortopédica de titânio revestida com DLC, visualizada através do MEF, demonstrando produzir ERO, apresentando aspecto verde fluorescente, após ser banhada com 2,7-diclorofluoresceína, por 30min. Fonte: AxioCam MR5 (Zeiss) e *software AxionVision LE* (versão 4.8.2, Zeiss) (2024).

5 DISCUSSÃO

A formação de biofilme é importante para a medicina e merece atenção, uma vez que são responsáveis por mais de 80% das infecções microbianas no corpo, incluindo próteses e dispositivos de fixação interna. Em estudos *in vitro*, foi observado que *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* podem facilmente formar biofilmes em parafusos ortopédicos de aço inoxidável e titânio. E que estas mesmas bactérias também possuem fortes forças de adesão aos corpos estranhos (VEERACHAMY e col., 2014). Em hospital veterinário universitário, foi constatado uma taxa de infecção em sítio cirúrgico de 4,25 a 16%, no pós-cirúrgico de pacientes hospitalizados (ARIAS *et al.*, 2013).

Conforme dito por Moraes *et al.* (2013), os dispositivos médicos implantados ainda não são capazes de resistir ativamente à adesão bacteriana, colonização e formação de biofilme. Dessa forma, se faz necessária a busca de biomateriais e associações entre eles que impeçam esse processo ou, que pelo menos, tenham a mínima porcentagem de adesão *in vitro*, aumentando as chances de impedir a adesão bacteriana, colonização e formação de biofilme *in vivo*. Com isso, neste trabalho se apresenta uma alternativa para este problema, em que foi demonstrado que o filme de DLC em placa ortopédica de titânio, *in vitro*, foi capaz de inibir a adesão bacteriana em sua superfície.

A incidência de infecção pós-operatória, conforme Sandness (2023), está fortemente ligada ao risco de explantação do implante ortopédico e, em um a cada cinco pacientes envolvidos em fraturas expostas, submetidos à osteossíntese com fixação interna, precisaram de uma segunda intervenção cirúrgica para remoção deste implante. Deste modo, a prevenção de infecções pós-operatórias deverá continuar sendo realizada através de antibióticos sistêmicos o quanto antes, ainda mais sabendo que as fraturas expostas têm alta probabilidade de contaminação. Além disso, existem outros métodos que podem contribuir para prevenir tais infecções, que são o uso de antibióticos locais, e o que tem sido muito estudado ultimamente, é a modificação da superfície dos implantes por biomateriais que tenham propriedades antimicrobianas (SANDNESS; PERRY; BRUCE, 2023). Este é o caso dos filmes de DLC, onde foram observadas características que impedem a aderência do biofilme nas placas, diminuindo a resistência antibiótica e,

consequentemente, o uso prolongado deles.

Uma vez que o principal problema relacionado aos implantes ortopédicos seja a infecção bacteriana, é importante a aplicação de biomateriais que apresentem atividade antimicrobiana. Devido às suas excelentes características de biocompatibilidade, não toxicidade, compatibilidade sanguínea, não carcinogenicidade, acrescida à ação antibacteriana e antibiofilme, o revestimento com filme de DLC tem sido amplamente estudado para utilização em dispositivos médicos (ZHOU *et al.*, 2008).

Peng *et al.* (2022) comentaram que instrumentais cirúrgicos não podem ser mantidos totalmente estéreis, e que seria interessante se o material destes instrumentos tivesse propriedades antibacterianas. Inclusive, os príons dificilmente são eliminados na esterilização comum, em função de sua estrutura especializada. E o filme de DLC nestes equipamentos cirúrgicos impede a adesão destes agentes patogênicos, diminuindo assim, o risco de infecção. Com isso, o revestimento de DLC seria uma excelente alternativa para estes instrumentais devido às suas propriedades antimicrobianas e biocompatibilidade tecidual.

Uma das grandes questões no uso de biomateriais para aplicação biomédica é que, no caso de dispositivos para implantes, o material ficará diretamente em contato com os tecidos biológicos, o que normalmente causa uma inflamação no tecido, e esta inflamação atrai macrófagos que geram um ambiente ácido no local que, consequentemente, corrói o biomaterial. Por isso, os dispositivos para implantes devem ter alta resistência ao desgaste e à corrosão, que é uma das características que o revestimento com DLC tem proporcionado aos materiais (PENG *et al.*, 2022).

Wachesk *et al.* (2021) afirmam em seu experimento que a aplicação do filme de DLC, em comparação com aço inoxidável, reduziu a contagem de macrófagos, que seriam provenientes da reação tecidual, mostrando que a utilização deste proporciona excelente biocompatibilidade, já que não gera danos ao tecido nem inflamação local.

Em estudo realizado por BEIRIZ *et al.* (2022), constataram que houve maior formação de biofilme de *P. aeruginosa* em hastes de titânio do que em hastes de cromo-cobalto. Comentaram também que o aço inoxidável apresenta uma taxa de infecção maior que as ligas de titânio. Além disso, a escolha do biomaterial dos implantes ortopédicos faz toda a diferença para o sucesso do procedimento

cirúrgico, e está diretamente ligado ao índice de infecção.

A utilização da película de DLC como revestimento de dispositivos médicos tem sido amplamente comercializada atualmente, por diversas empresas com inúmeros nomes comerciais, e a apropriação destes em tecnologias para implantes ortopédicos e produtos biomecânicos vem crescendo cada vez mais nos últimos anos. Sua visualização global e constante investimento por parte da comunidade científica tem revelado sua relevância para fins comerciais e acadêmicos (ZIA *et al.*, 2023). Porém, atualmente todos os revestimentos disponíveis no mercado visam apenas suas excelentes características mecânicas e baixo coeficiente de atrito, que melhoram sua resistência ao desgaste, atrelados à sua boa biocompatibilidade, nenhum deles ainda explora suas propriedades antibacterianas.

O DLC tem sido utilizado como revestimento para melhorar o desempenho de diferentes equipamentos biomédicos, como: próteses articulares, próteses de válvula cardíaca, cateteres, stents vasculares, implantes dentários, dentre outros. Outra aplicação em que o revestimento de DLC tem se destacado é em próteses de articulações. Segundo Zia (2023), tem aumentado a vida útil dos implantes e melhorado o seu desempenho, em razão do baixo coeficiente de atrito e resistência ao desgaste. Além disso, comparando aos biomateriais não revestidos, o filme de DLC como revestimento foi capaz de diminuir a contagem de estafilococos na superfície dos biomateriais (PENG *et al.*, 2022; ZIA *et al.*, 2023).

ZHOU *et al.* (2008) também constataram em seu trabalho a eficácia do DLC como revestimento, demonstrando sua propriedade antibacteriana. No entanto, segundo os autores, essa capacidade de resistir à adesão bacteriana dos filmes de carbono, se dá pela sua baixa energia e inércia química. Um resultado que difere do nosso experimento, em que atribuímos a propriedade antibacteriana à sua produção de ERO.

Conforme descrito por Zia *et al.* (2023), a biocompatibilidade dos filmes de DLC depende de sua capacidade de liberar íons de carbono, o que irá variar de acordo com sua estrutura cristalina ou amorfa. Os recobrimentos de DLC que apresentam sua estrutura mais cristalina, ou seja, que contêm maior número de ligações sp^3 , tendem a liberar maior número de íons de carbono e, conseqüentemente, produzem mais ERO. Eles podem apresentar maior reação tecidual, ser citotóxicos e ser bem utilizados como agentes antibacterianos. O acréscimo de partículas de diamante nanocristalino, incorporado ao filme de DLC,

melhora suas características eletroquímicas e sua resistência à corrosão, devido à diminuição dos microporos na superfície (RAMOS *et al.*, 2014). Estas afirmações dão base aos resultados encontrados no presente experimento, pois utilizamos uma placa com revestimento de DLC com estrutura predominantemente microcristalina, e obtivemos bons resultados quanto às propriedades antibiofilme.

Segundo Grill (2003), as vantagens dos revestimentos com DLC vão além da sua inércia química e biocompatibilidade, pois apresentam também boa hemocompatibilidade, o que possibilita sua utilização em dispositivos médicos que ficam em contato direto com sangue, como em aplicações coronárias, partes de corações artificiais e marcapassos. Os revestimentos com DLC também demonstraram ser neurocompatíveis e apresentaram atividades antimicrobianas (ROY; LEE, 2007). A combinação do DLC com titânio promoveu uma maior diferenciação das células da medula óssea de ratos em osteoblastos e diminuiu a ativação dos osteoclastos, o que contribuirá para sua aplicação em implantes ortopédicos, já que esse resultado levaria a uma cicatrização óssea mais rápida (GRILL, 2003). Nestas condições, o presente trabalho se beneficia, pois nossa pesquisa é voltada para implantes ortopédicos e utilizamos uma placa de titânio revestida com DLC.

Um estudo recente realizado por Watari *et al.* (2021), que corrobora os resultados obtidos em nosso trabalho, observou as propriedades antiadesão e antibiofilme do revestimento intraluminal com filme de DLC em cateteres urinários, e relataram que o DLC foi eficaz contra a aderência de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Neste mesmo estudo, Watari *et al.* relataram que o DLC era incapaz de inibir o biofilme de *Staphylococcus aureus*, no entanto, Myllymaa *et al.* (2013) obtiveram respostas contrárias. Acreditamos que essas diferenças sejam devido aos métodos de cultura bacteriana distintos (PENG *et al.*, 2022).

O revestimento com DLC mostrou ter propriedades antiaderentes independente da espécie bacteriana, onde em superfície de polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE) revestido com DLC, foi capaz de resistir às diferentes cepas bacterianas (DEL PRADO *et al.*, 2012).

Em estudo realizado por Santos *et al.* (2017), foram produzidos filmes de DLC e DLC com cânfora, aderidos em substrato de poliuretano, para avaliar o crescimento de biofilme formado por leveduras de *Candida albicans*. Foi observado

que o filme de DLC e DLC com cânfora reduziram a formação do biofilme em mais de 90%, em comparação com o poliuretano puro. Sinalizando assim, a eficácia do DLC como material de revestimento antimicrobiano, para ser utilizado em equipamentos biomédicos.

Em seu experimento, Zhou *et al.* (2008) compararam dois tipos de filmes de carbono: um continha em sua composição moléculas de hidrogênio e no outro apenas o filme de carbono puro. E observaram que, mesmo apresentando maior rugosidade em sua superfície, o revestimento com filme de carbono livre de hidrogênio apresentou melhor desempenho, pois um número menor de bactérias aderiu à sua superfície. Isso prova que a capacidade antiadesão bacteriana do implante revestido com filme de DLC, utilizado neste trabalho, não se dá apenas por suas características externas de menor rugosidade e de baixo atrito, mas sim, devido às propriedades intrínsecas do material que inibem a aderência de bactérias em sua superfície, como no caso apresentado pela liberação de ERO.

Lopes *et al.* (2017) constataram que filmes de apatita-TiO₂-DLC diminuíram o crescimento de biofilme de bactérias comuns em ambientes hospitalares. No mesmo trabalho, relataram o crescimento da atividade bactericida do DLC quando associado com o Dióxido de Titânio (TiO₂). Em outro experimento, Wachesk *et al.* (2021) também demonstraram que a combinação do TiO₂ com DLC *in vivo*, inibiu a formação de biofilme bacteriano, apresentando ausência de infecção e a diminuição do processo inflamatório quando colocado em peritônio de ratos. Todos estes resultados concordam com o trabalho em questão e confirmam sua relevância e aplicabilidade em implantes ortopédicos, pois comprovam a eficácia dos revestimentos com DLC para inibir a adesão de biofilme bacteriano, e não apenas da *S. marcescens*, como também de diversas outras bactérias formadoras de biofilme.

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, avaliamos as propriedades antibiofilme e antibacteriana da placa em questão. Um novo experimento, *in vivo*, será necessário para que possamos avaliar suas propriedades citotóxicas, como ela se comportará em meio

ao tecido vivo do animal, e quais as reações o organismo vivo poderá manifestar.

Devem ser realizados estudos para definir a estrutura e as porções de ligações sp^2/sp^3 ideais, que sejam necessárias para serem utilizadas em revestimentos de DLC para implantes ortopédicos, de maneira que haja um ajuste correto, para que não sejam citotóxicas para o tecido do paciente, mas que sejam capazes de inibir a formação de biofilme bacteriano nas placas ortopédicas.

Estudos demonstraram que, em fraturas expostas corrigidas com fixação interna, 65% delas precisaram de novo procedimento cirúrgico devido à contaminação bacteriana nos implantes (SANDNESS; PERRY; BRUCE, 2023). Por esta razão, é imprescindível a busca por biomateriais ou revestimentos que, além de serem biocompatíveis, também impeçam a adesão do biofilme nas placas ortopédicas. Isso previne a ISC, facilita o tratamento quando há necessidade deste e diminui seus custos. Além de diminuir o sofrimento dos pacientes e seus responsáveis, pode ser aplicado à medicina humana, promovendo bem-estar e qualidade de vida.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que o revestimento com filme de DLC foi eficaz para inibir a formação de biofilme bacteriano de *S. Marcescens* em implantes ortopédicos *in vitro*. Portanto, devido às suas propriedades antibacterianas, o DLC tem enorme potencial para prevenir infecções em sítio cirúrgico ortopédico. Concluimos também que o método pelo qual o DLC impede a adesão das bactérias em sua superfície é em virtude de sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio, que interagem com os microrganismos, impedindo sua aderência.

REFERÊNCIAS

ABBAS, H. A.; HEGAZY, W. A. H. Repurposing anti-diabetic drug “sitagliptin” as a novel virulence attenuating agent in *Serratia marcescens*. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, 1 abr. 2020.

ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. DA R. Biofilme e células persisters: da persistência à resistência microbiana. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 54, n. 3, p. 228–234, 28 set. 2022.

ADAMSON, V. *et al.* Prolonged outbreak of *Serratia marcescens* in Tartu University Hospital: A case-control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, 31 out. 2012.

ARIAS, M. V. B. *et al.* Estudo da ocorrência de infecção hospitalar em cães e gatos em um centro cirúrgico veterinário universitário. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 6, p. 771–779, 24 jan. 2013.

BALSAMO, A. C. *et al.* **Remoção de biofilme em canais de endoscópios: avaliação de métodos de desinfecção atualmente utilizados**. São Paulo: [s.n.]. Disponível em: <www.scielo.br/reeusp>.

BEIRIZ, Y. DE R. *et al.* Avaliação da formação de biofilme bacteriano em diferentes ligas metálicas ortopédicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 54, n. 1, p. 77–81, 2022.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS. Supplementum**, n. 136, p. 1–51, 2013.

BJARNSHOLT, T. *et al.* **The in vivo biofilm**. **Trends in Microbiology**, set. 2013.

BOERLIN, P. *et al.* **Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary**

teaching hospital. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113501003960?casa_token=](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113501003960?casa_token=mgySVI-)

[mgySVI-kgkMAAAAAA:E5U7bUVgUVpSIZ58sq\\$TTwPRaDbkLEJt61LQPQUS_2QLnMO_89PTMgfT0I6yIApms3seeutMBPkK](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113501003960?casa_token=mgySVI-kgkMAAAAAA:E5U7bUVgUVpSIZ58sq$TTwPRaDbkLEJt61LQPQUS_2QLnMO_89PTMgfT0I6yIApms3seeutMBPkK)>. Acesso em: 28 fev. 2023.

BRAGA, D. P. et al. **Antibioticoprofilaxia em cirurgias de cães e gatos: necessidade e realidade.** Viçosa: [s.n.]. Disponível em: <<chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.scielo.br/j/rceres/a/yktk8MYntMyNjwch7wm8Wwh/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 26 fev. 2023.

CARVALHO, A. *et al.* FORMAÇÃO E RESISTÊNCIA DO BIOFILME MICROBIANO EM INDÚSTRIAS PROCESSADORAS DE ALIMENTOS. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 30, p. 311–325, 15 dez. 2019.

CHEN, S.; BLOM, J.; WALKER, E. D. Genomic, physiologic, and symbiotic characterization of *Serratia marcescens* strains isolated from the mosquito *Anopheles stephensi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, 10 ago. 2017.

CHOURIFA, H. *et al.* **Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications.** *Acta Biomaterialia*Acta Materialia Inc, 1 jan. 2019.

COSTA, L. J. DA *et al.* Superfície de implantes de titânio e sua capacidade de estímulo na formação óssea: uma revisão de literatura. **Odonto L Clin.-Cient**, v. 14, n. 4, p. 797–801, 2015

COSTA, K. A. D. *et al.* Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 2, p. 75–82, 7 jun. 2016.

DA SILVA, E. N. *et al.* Fatores de risco para infecção de sítio cirúrgico em cirurgias traumato- ortopédicas. **Revista Cuidarte**, v. 12, n. 2, 30 abr. 2021.

DEL PRADO, G. *et al.* DLC coatings for UHMWPE: Relationship between bacterial adherence and surface properties. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 100 A, n. 10, p. 2813–2820, out. 2012.

ERCOLE, F. F. *et al.* **Risk of surgical site infection in patients undergoing orthopedic surgery**Original Article Rev. Latino-Am. Enfermagem. Belo Horizonte: [s.n.]. Disponível em: <www.eerp.usp.br/rlae>.

EVANS, J. T. *et al.* **How long does a hip replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up**www.thelancet.com. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.thelancet.com>.

FAGE, S. W. *et al.* **Titanium: a review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity.** **Contact Dermatitis**Blackwell Publishing Ltd, 2016.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. **The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells”.** **Journal of Bacteriology**, nov. 2007.

FUGLESTAD, M. A.; TRACEY, E. L.; LEINICKE, J. A. **Evidence-based Prevention of Surgical Site Infection.** **Surgical Clinics of North America**W.B. Saunders, 1 dez. 2021.

GARCIA, A. C. F. S. *et al.* Fluoranthene Biodegradation by *Serratia* sp. AC-11 Immobilized into Chitosan Beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 4, p. 1168–1184, 15 ago. 2019.

GARCIA, D. *et al.* Silver carboxylate and titanium dioxide-polydimethylsiloxane coating decreases adherence of multi-drug resistant *Serratia marcescens* on spinal implant materials. **Spine Deformity**, v. 9, n. 6, p. 1493–1500, 1 nov. 2021.

GOUVEIA, S. DA S.; LIMA, A. A. Relação entre espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica insert relationship between reactive species of oxygen

and carcinogenic promotion. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR**, v. 20, n. 3, p. 174– 179, 2017.

GRILL, A. Diamond-like carbon coatings as biocompatible materials - An overview. **Diamond and Related Materials**, v. 12, n. 2, p. 166–170, 2003.

GRONTHAL, T. *et al.* Large Outbreak Caused by Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 in a Finnish Veterinary Teaching Hospital – From Outbreak Control to Outbreak Prevention. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–11, 1 mar. 2014.

GUPTA, S. *et al.* Prediction of biofilm inhibiting peptides: An In silico Approach. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, 2016.

HAENNI, M. *et al.* Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a French veterinary hospital. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 1, n. 4, p. 225–227, 2013.

HUACHO, P. M. M. *et al.* Analyses of biofilm on implant abutment surfaces coating with diamond-like carbon and biocompatibility. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, n. 3, p. 317–323, 2 ago. 2017.

KECK, N. *et al.* Long-lasting nosocomial persistence of chlorhexidine-resistant *Serratia marcescens* in a veterinary hospital. **Veterinary Microbiology**, v. 245, p. 108686, 2020.

LEBEAUX, D. *et al.* **From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections.** **Pathogens**MDPI AG, , 13 maio 2013. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/2/2/288>>. Acesso em: 28 fev. 2023

LIAO, T. T. *et al.* Biological responses of diamond-like carbon (DLC) films with different structures in biomedical application. **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 751–759, 1 dez. 2016.

LOPES, F. S. *et al.* Biomineralized diamond-like carbon films with incorporated titanium dioxide nanoparticles improved bioactivity properties and reduced biofilm formation. **Materials Science and Engineering C**, v. 81, p. 373–379, 1 dez. 2017.

MELLO, É. DE O. *et al.* Improved smallest peptides based on positive charge increase of the γ -core motif from PvD 1 and their mechanism of action against *Candida* species. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 407–420, 2019.

MOORE, K. *et al.* Mapping Bacterial Biofilm on Features of Orthopedic Implants In Vitro. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 1–10, 1 mar. 2022.

MORAES, M. N. *et al.* Mecanismos de adesão bacteriana aos biomateriais. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 23, n. 1, p. 99–104, 2013.

MORAIS, L. S. DE; GUIMARÃES, G. S.; ELIAS, C. N. **Liberção de íons por biomateriais metálicos**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/dpress/a/XDTwZXL3tXNd7bSjWjJYDGm/?lang=pt>>. Acesso em: 3 mar. 2023.

MYLLYMAA, K. *et al.* Formation and retention of staphylococcal biofilms on DLC and its hybrids compared to metals used as biomaterials. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 290–297, 1 jan. 2013.

OLIVEIRA, P. R. *et al.* The incidence and microbiological profile of surgical site infections following internal fixation of closed and open fractures. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 51, n. 4, p. 396–399, jul. 2016.

PACCOLA, C. A. J. **Fraturas expostas Rev Bras Ortop**. Ribeirão Preto: [s.n.].

PARK, H. J. *et al.* Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. **Water Research**, v. 43, n. 4, p. 1027–1032, 2009.

PENG, Y. *et al.* **Diamond-like Carbon Coatings in the Biomedical Field: Properties, Applications and Future Development**. **Coatings MDPI**, 1 ago. 2022.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. **BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO**. *Quimica Nova* Sociedade Brasileira de Química, 1 ago. 2015. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/th7gjVpvdpthnctYbhtFznN>>. Acesso em: 13 fev. 2023

QUINN, J. *et al.* Titanium for Orthopedic Applications: An Overview of Surface Modification to Improve Biocompatibility and Prevent Bacterial Biofilm Formation. *iScience*, p. 1–22, 20 nov. 2020.

RAMOS, B. C. *et al.* Diamond-like carbon electrochemical corrosion resistance by addition of nanocrystalline diamond particles for biomedical applications. *Surface and Coatings Technology*, v. 259, n. PC, p. 732–736, 25 nov. 2014.

RAY, C. *et al.* Killing of *Serratia marcescens* biofilms with chloramphenicol. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 16, n. 19, 29 mar. 2017.

RESENDE, C. X. *et al.* Tratamentos de Superfície e Recobrimentos. Em: **Biomateriais em Odontologia: princípios métodos investigativos e aplicações**. [s.l: s.n.]. p. 15–23.

RIBEIRO, K. L. *et al.* Clavanin A-bioconjugated Fe₃O₄/Silane core-shell nanoparticles for thermal ablation of bacterial biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 169, p. 72–81, 1 set. 2018.

ROY, R. K.; LEE, K. R. **Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: A review**. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, out. 2007.

SANDNESS, B. M.; PERRY, K. L.; BRUCE, M. Single institution retrospective study evaluating the frequency of implant removal and associated risk factors following open fracture fixation in 80 cases (2010–2020). *BMC Veterinary Research*, v. 19, n. 1, 1 dez. 2023.

SANTOS, E. F. C. DOS; BEZERRA, R. D. S.; ARAUJO, W. L. S. Ligas de Cobalto e Cromo Usadas em Aplicações Biomédicas. **Revista Virtual de Química**, v. 14, n. 6, p. 1058–1064, 2022.

SANTOS, W. B. DOS *et al.* Microbiota infectante de feridas cirúrgicas: análise da produção científica nacional e internacional. **Revista SOBECC**, v. 21, n. 1, p. 46–51, 8 jun. 2016.

SANTOS, T. B. *et al.* Flexible camphor diamond-like carbon coating on polyurethane to prevent *Candida albicans* biofilm growth. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 68, p. 239–246, 1 abr. 2017.

SHANKS, R. M. Q. *et al.* A *Serratia marcescens* PigP Homolog Controls Prodigiosin Biosynthesis, Swarming Motility and Hemolysis and Is Regulated by cAMP-CRP and HexS. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 1 mar. 2013.

SILVA, A. A. DO; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994–1002, abr. 2010.

SILVA, F. L. E *et al.* Tratamento de superfície em implantes dentários: uma revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia - UPF**, v. 21, n. 1, p. 136–142, 18 out. 2016.

STORR, J. *et al.* Core components for effective infection prevention and control programmes: New WHO evidence-based recommendations. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, n. 1, 10 jan. 2017.

SZCZĘSNY, G. *et al.* **A Review on Biomaterials for Orthopaedic Surgery and Traumatology: From Past to Present.** **MaterialsMDPI**, , 1 maio 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/journal/materials>>. Acesso em: 2 mar. 2023.

TAVARES, A. F. N. *et al.* Reactive oxygen species mediate bactericidal killing elicited by carbon monoxide-releasing molecules. **Journal of Biological Chemistry**,

v. 286, n. 30, p. 26708–26717, 29 jul. 2011.

TRENTIN, D. DA S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. **Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate 1**. Porto Alegre: [s.n.].

VEERACHAMY, S. *et al.* **Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine** SAGE Publications Ltd, , 6 out. 2014.

VISHNU, J. *et al.* Hydrothermal treatment of etched titanium: A potential surface nano-modification technique for enhanced biocompatibility. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 20, 1 ago. 2019.

WACHESK, C. C. *et al.* In vivo biocompatibility of diamond-like carbon films containing TiO₂ nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 32, n. 9, 1 set. 2021.

WATARI, S. *et al.* Intraluminal diamond-like carbon coating with anti-adhesion and anti-biofilm effects for uropathogens: A novel technology applicable to urinary catheters. **International Journal of Urology**, v. 28, n. 12, p. 1282–1289, 1 dez. 2021.

WEBER, D. J. *et al.* Microbiology of Ventilator–Associated Pneumonia Compared With That of Hospital-Acquired Pneumonia. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 7, p. 825–831, jul. 2007.

YANG, M. *et al.* Quantification of oxygenated species on a diamond-like carbon (DLC) surface. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 17, p. 7633–7638, 15 jun. 2011.

ZHOU, H. *et al.* Investigation into the antibacterial property of carbon films. **Diamond and Related Materials**, v. 17, n. 7–10, p. 1416–1419, jul. 2008.

ZIA, A. W. *et al.* Soft diamond-like carbon coatings with superior biocompatibility

for medical applications. **Ceramics International**, v. 49, n. 11, p. 17203–17211, 1 jun. 2023.

ZIMMERLI, W.; SENDI, P. **Orthopaedic biofilm infections**. **APMIS** Blackwell Munksgaard, , 1 abr. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/apm.12687>>. Acesso em: 26 fev. 2023.