

Resumo

A formação de biofilme bacteriano em polímeros sintéticos tem um papel muito importante na indústria e na medicina modernas, originando, por exemplo, infecções difíceis de tratar, causadas pela colonização de corpos estranhos. A etapa crítica na prevenção da formação do biofilme é a adesão bacteriana inicial à superfície dos dispositivos, que é determinada pelas interações entre o biomaterial polimérico e a superfície bacteriana. Uma das formas de reduzir para níveis mínimos a adesão bacteriana é desenvolver estruturas interfaciais poliméricas adequadas através de modificações superficiais. A adesão bacteriana a polímeros pode ser avaliada sob condições de stress reduzido, simulando a situação em que ocorre a inoculação por contaminação directa, antes da inserção do dispositivo. No presente estudo os estafilococos coagulase-negativos *Staphylococcus epidermidis* que expressam o polissacarídeo/adesina capsular (PS/A), que são os agentes etiológicos mais comuns de colonização de dispositivos médicos implantáveis, foram seleccionados para o estudo da adesão *in vitro* a diacetato de celulose (CDA) assim como a três polímeros biomédicos comerciais, nomeadamente ao polietileno (PE) de baixa densidade e de referência primária, ao silicone (SI), e ao politetrafluoretileno expandido (ePTFE). A adesão bacteriana foi quantificada por sonicação das bactérias aderentes, assim como por observação directa usando microscopia de transmissão e confocal. Também foi estudada, sob condições de stress reduzido, a influência do fenótipo bacteriano, do tempo e da concentração bacteriana na adesão ao diacetato de celulose. De forma a investigar a influência do fenótipo foram utilizadas três estirpes diferentes de *S. epidermidis*: duas estirpes com polissacarídeo/adesina capsular (PS/A+) - RP62A e M187, e uma estirpe sem polissacarídeo/adesina capsular (PS/A-) - M187-Sn3. A energia superficial e a energia livre de interacção entre as células ou materiais e as moléculas de água foram calculadas através da medição de ângulos de contacto, pelo método da gota séssil. Este método permite a determinação da hidrofobicidade das superfícies dos materiais e das bactérias, considerando as interações electrostáticas. Todos os materiais ensaiados, foram previamente esterilizados por óxido de etileno, embora no estudo da influência do método de esterilização na adesão bacteriana se tenham também usado a radiação gama e o peróxido de hidrogénio. No silicone foi também empregue o calor húmido. Após esterilização foi quantificada a adesão bacteriana em todos estes materiais. Finalmente, foi estudada a influência das modificações superficiais na adesão bacteriana ao CDA através de alteração da rugosidade e de modificação química, designadamente por desacetilação e fosfatação.

Todos os polímeros mostraram uma elevada adesão bacteriana, excepto o CDA, que apresentou um valor significativamente inferior. Verificou-se existir uma boa correlação (0,96) entre os resultados obtidos por sonicação e por observação directa. A abordagem termodinâmica mostrou existir uma boa correlação entre os resultados dos ensaios experimentais de adesão e a hidrofobicidade dos materiais, existindo também boa correlação com os valores de energia livre interfacial entre as superfícies das bactérias, os materiais e a água. A adesão mostrou ser dependente dos fenótipos bacterianos ensaiados. As estirpes com o PS/A capsular são mais hidrofóbicas, apresentando valores mais elevados de adesão. A PS/A capsular é possivelmente um mediador da adesão bacteriana a

diacetato de celulose, sob condições de stress reduzido. O tempo de residência da suspensão bacteriana bem como a sua concentração aumentam a adesão bacteriana. O método de esterilização influenciou significativamente a adesão bacteriana, nomeadamente pela obtenção de valores inferiores de adesão para o óxido de etileno, embora não tenha havido diferenças significativas entre os outros métodos. No silicone, verificou-se uma diferença significativa na adesão bacteriana entre a esterilização por óxido de etileno e os restantes métodos. Os resultados da alteração de rugosidade indicam que a adesão bacteriana não é influenciada pela rugosidade para valores de Ra inferiores a 2 μ m. A modificação química do CDA por desacetilação e por fosfatação foram eficazes na diminuição da adesão bacteriana. Estes tratamentos químicos aumentaram o parâmetro ácido da energia superficial e diminuíram as interações ácido-base com os locais ácidos do polissacarídeo/adesina capsular.

Abstract

Bacterial biofilm formation on synthetic polymers plays an important role in industry and in medicine, leading, for example, to difficult-to-treat infections caused by colonised foreign bodies. The critical step in the prevention of biofilm formation is the initial bacterial adhesion to the device surface, which is determined by interactions between the polymeric biomaterial and bacterial surfaces. One possible approach to reduce bacterial adhesion levels to a minimum is the development of adequate polymeric interfacial structures through surface modification. Bacterial adhesion to polymers may be evaluated under very low shear conditions, mimicking the situation in which inoculation occurs by direct contamination, prior to device insertion.

In the present study, the adhesion of coagulase negative *Staphylococcus epidermidis* expressing capsular polysaccharide/adhesin (PS/A), the most common etiological agent of colonisation of implantable medical devices, was assessed in vitro to cellulose diacetate (CDA) as well as to three commercial biomedical polymers, namely primary reference low-density polyethylene (PE), silicone (SI) and expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE). Bacterial adhesion was quantified by sonication of the adhesive bacteria, as well as by direct observation using transmission and confocal microscopies. The influence of the bacterial phenotype, time and bacterial concentration on adhesion was also evaluated, under fluid stasis, using cellulose diacetate as the substrate. In order to assess the influence of phenotype three different strains of *S. epidermidis* were used, namely two strains with capsular polysaccharide/adhesin (PS/A+) - RP62A and M187, and one strain without it (PS/A-) - M187- Sn3. Surface energies and the free energy of interaction between cells or materials and water molecules, were calculated through contact angle measurement by the captive-bubble technique. This method enables the determination of cells and materials surface hydrophobicities taking into account electrostatic interactions. All materials under investigation, were sterilised by ethylene oxide, although to assess the influence of sterilisation procedures in bacterial adhesion we also used gamma radiation and hydrogen peroxide. Silicone was also sterilised by autoclaving. In all these materials the bacterial

adhesion was quantified thereafter. Finally, the influence of CDA surface modifications on bacterial adhesion was studied by means of surface roughness alteration and chemical modification, namely deacetylation and phosphorylation.

All polymers tested showed high bacterial adhesion, except CDA, which had low adhesion. A good correlation was found (0.96) between results obtained by sonication and by direct observation. The thermodynamic approach also showed a good correlation between results from bacterial adhesion assays and polymer surface hydrophobicity, as well as a good correlation to free energy of interaction between cells, materials surface and water. Adhesion was also found to be dependent on the bacterial phenotypes tested. Strains with capsular polysaccharide/adhesin are more hydrophobic and promoted higher adhesion values. PS/A is a possible mediator of bacterial adhesion to cellulose diacetate, under fluid stasis. Time and bacterial concentration also enhanced adhesion.

The sterilisation procedure influenced bacterial adhesion significantly, namely lower adhesion values were obtained using ethylene oxide, although no significant differences were observed among other methods tested. In silicone, there was a significant difference in bacterial adhesion between ethylene oxide and the other sterilisation procedures. Surface roughness alteration results indicated that an average roughness R_a up to 2 μm didn't influence bacterial adhesion. Chemical modifications of CDA by deacetylation and by phosphorylation were effective in lowering bacterial adhesion. These chemical treatments increased the acidic parameter of the surface energy and decreased the acid-base interactions with acidic sites of the capsular polysaccharide/adhesin.