

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS

JULIANA HOCH

MODIFICAÇÃO DA ADESÃO E PROLIFERAÇÃO BACTERIANA EM
SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL AISI 430TEXTURIZADAS POR *SHOT*
PEENING

PORTO ALEGRE, RS

2022

JULIANA HOCH

**MODIFICAÇÃO DA ADESÃO E PROLIFERAÇÃO BACTERIANA EM
SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL AISI 430 TEXTURIZADAS POR *SHOT
PEENING***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia, área de concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Shigueaki Takimi

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Célia de Fraga Malfatti

Prof. Dr. Vicente Castelo Branco Leitune

Dra. Fernanda Cortez Lopes

PORTO ALEGRE

2022

Às mulheres cientistas que abriram caminhos e nos permitiram experimentar o poder transformador da ciência.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Marlene, a quem devo todos os agradecimentos possíveis pelo exemplo de doação, competência e garra. Foi ela quem sempre estimulou meu desenvolvimento e garantiu um espaço onde minha capacidade criativa pudesse se desenvolver livremente, com incentivo, apoio e amor.

Ao meu marido, Felipe, com quem tenho o privilégio de dividir a rotina, os desafios, vitórias e sonhos. É ele quem me inspira pelo exemplo de paixão à ciência, dedicação ao ensino público de qualidade e vocação à docência.

Ao meu irmão, Arthur, com quem dei os primeiros passos no descobrimento do gosto pela pesquisa, e que muito tem me ensinado sobre amor, humildade e parceria durante a reta final do mestrado.

Ao meu pai, Claudio, que sempre esteve presente, auxiliando de maneira especial na criação e confecção de equipamentos para viabilizar minhas mais diversas pesquisas.

Ao meu orientador, Antonio Takimi, pelo auxílio ao longo deste período, e por ter me inspirado, ainda na Graduação, a seguir na área de materiais.

À equipe do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial à Anne Helene Souza Martinelli e Fernanda Cortez Lopes, pela dedicação na execução dos ensaios, mesmo diante das limitações impostas pela pandemia da Covid-19.

Ao laboratorista João Paulo Bruneto e ao professor Daniel Eduardo Weibel, do Laboratório Multiusuário de Análise de Superfícies da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela realização das análises de perfilometria.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Por fim, um agradecimento especial aos pesquisadores brasileiros que continuam resistindo e contribuindo brilhantemente para o avanço da ciência, mesmo diante da falta de incentivo do governo atual.

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que-fazer-se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade.”

(Paulo Freire)

RESUMO

Estima-se que aproximadamente 80% das infecções no mundo estão relacionadas à adesão bacteriana e formação de biofilmes, que envolvem interação entre bactéria, superfície e microambiente. Nesse contexto, superfícies biomiméticas texturizadas com padrões micro e nanométricos têm recebido especial atenção como mecanismo de redução da adesão e formação de biofilmes. Tendo em vista a dificuldade no tratamento tradicional e o aumento da resistência bacteriana, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da texturização superficial de amostras de aço inoxidável AISI 430 por *shot peening* na adesão e proliferação de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli*). As amostras foram obtidas sob diferentes condições operacionais e caracterizadas quanto à rugosidade, topografia superficial, proliferação e adesão bacteriana submetidas a 24h de contato frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Os resultados indicaram redução na adesão bacteriana de 77% para Gram-positiva e 50% para Gram-negativa para amostras submetidas ao *shot peening* por 80s, utilizando esferas de aço projetadas a 100 psi com ângulo de 30°. Este estudo demonstra a influência direta do ângulo de jateamento na morfologia das superfícies, no tempo necessário de processo e reforça a importância do perfil topográfico na adesão bacteriana e formação de biofilmes. Dessa forma, a técnica de *shot peening* avaliada se mostra como alternativa promissora para texturização de superfícies para redução da adesão e proliferação bacteriana e formação de biofilmes em superfícies metálicas AISI 430.

Palavras-chave: *Shot peening*. Texturização. Adesão bacteriana. Biofilmes.

ABSTRACT

It is estimated that approximately 80% of infections in the world are related to bacterial adhesion and biofilm formation, which involve interaction between bacteria, surface and microenvironment. In this context, textured biomimetic surfaces with micro and nanometric patterns have received special attention as a mechanism for reducing adhesion and biofilm formation. Given the difficulty in traditional treatment and the increase in bacterial resistance, this study aimed to evaluate the influence of surface texturing of AISI 430 stainless steel samples by shot peening on the adhesion and proliferation of Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*) bacteria. The samples were obtained under different operating conditions and characterized for roughness, surface topography, bacterial proliferation and adhesion submitted to 24h of contact against strains of *S. aureus* and *E. coli*. The results indicated a reduction in bacterial adhesion of 77% for Gram-positive and 50% for Gram-negative for samples submitted to shot peening for 80s, using steel balls projected at 100 psi with an angle of 30°. This study demonstrates the direct influence of the blast angle on the surface morphology, the time required for the process and reinforces the importance of the topographic profile in bacterial adhesion and biofilm formation. Thus, the evaluated shot peening technique is a promising alternative for surface texturing to reduce bacterial adhesion and proliferation and biofilm formation on AISI 430 metallic surfaces.

Key words: *Shot peening*. Texturing. Bacterial adhesion. Biofilms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Subdivisões da Engenharia de Superfície.....	20
Figura 2. Desenho esquemático das tensões induzidas pelo <i>shot peening</i>	21
Figura 3. Fases de formação do biofilme bacteriano.....	27
Figura 4. Fatores que influenciam a adesão bacteriana.....	28
Figura 5. <i>Escherichia coli</i> e seus flagelos	32
Figura 6. Mecanismos de topografias nano e micrométricas	34
Figura 7. Superfície da pele do tubarão (<i>Carcharhinus galapagensis</i>).....	35
Figura 8. <i>Time-lapse</i> da bactéria percorrendo uma superfície texturizada em 120 min	36
Figura 9. Medida da adesão bacteriana em diferentes superfícies	37
Figura 10. Características topográficas dos diferentes padrões de superfície testados	38
Figura 11. Adesão seletiva das células bacterianas nas plataformas <i>honeycomb</i>	39
Figura 12. Ação mecanobactericida das superfícies nanoestruturadas	40
Figura 13. <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Figura 14. Formação de biofilme por cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Figura 15. <i>Escherichia coli</i>	45
Figura 16. Formação de biofilme por cepas de <i>Escherichia coli</i>	45
Figura 17. Fluxograma da metodologia.....	47
Figura 18. Projeto da cabine de <i>shot peening</i>	48
Figura 19. Substratos polidos.....	49
Figura 20. Rugosímetro Mitutoyo SJ 401	52
Figura 21. Parâmetros bidimensionais de rugosidade	53
Figura 22. Perfilômetro óptico	54
Figura 23. Superfície com textura periódica (a) e superfície com textura aleatória (b)	55
Figura 24. Metodologia para teste de adesão e proliferação bacteriana.....	57
Figura 25. Metodologia para determinação das células planctônicas e sésseis	58
Figura 26. Confecção da cabine de <i>shot peening</i>	59
Figura 27. Procedimento de <i>shot peening</i> – Ângulo de 30°	60
Figura 28. Amostras antes (a) e depois do processo de <i>shot peening</i> (b)	60
Figura 29. Controle e substratos após o <i>shot peening</i> por 40s a 30° e 90°	61

Figura 30. Microscopia óptica da superfície após <i>shot peening</i>	62
Figura 31. Perfis de rugosidade das amostras antes do <i>shot peening</i> (Controle) e após o <i>shot peening</i> por 40s a 30°, 45°, 60° e 90°.....	64
Figura 32. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio I: 30° por 40s, 46 rpm.....	65
Figura 33. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio II: 30° por 80s, 46 rpm.....	65
Figura 34. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio III: 30° por 80s, 0 rpm.....	66
Figura 35. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio IV: 45° por 40s, 46 rpm	66
Figura 36. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio V: 45° por 100s, 0 rpm	66
Figura 37. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio VI: 60° por 40s, 46 rpm	66
Figura 38. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio VII: 60° por 120s, 0 rpm	66
Figura 39. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio VIII: 90° por 40s, 46 rpm	67
Figura 40. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio IX: 90° por 25s, 0 rpm	67
Figura 41. Perfil de rugosidade 2D – Controle: AISI 430 polido	67
Figura 42. Superfícies distintas com valores idênticos de R_a	68
Figura 43. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio I: 30° por 40s, 46 rpm.....	70
Figura 44. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio II: 30° por 80s, 46 rpm.....	70
Figura 45. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio III: 30° por 80s, 0 rpm.....	71
Figura 46. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio IV: 45° por 40s, 46 rpm	71
Figura 47. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio V: 45° por 100s, 0 rpm	71
Figura 48. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio VI: 60° por 40s, 46 rpm	72
Figura 49. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio VII: 60° por 120s, 0 rpm	72
Figura 50. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio VIII: 90° por 40s, 46 rpm	72
Figura 51. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio IX: 90° por 25s, 0 rpm	73
Figura 52. Perfil de rugosidade 3D – Controle AISI 430 polido	73

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Adesão e proliferação bacteriana (UFC/mL) – <i>S. aureus</i>	76
Gráfico 2. Adesão e proliferação bacteriana (UFC/mL) – <i>E. coli</i>	76
Gráfico 3. Adesão e proliferação em relação ao controle (%) – <i>S. aureus</i>	77
Gráfico 4. Adesão e proliferação em relação ao controle (%) – <i>E. coli</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de <i>shot peening</i> aplicados para texturização das superfícies	50
Tabela 2. Combinações dos valores de cada variável na realização do <i>shot peening</i>	50
Tabela 3. Parâmetros tridimensionais de rugosidade	56
Tabela 4. Tempo de processo necessário para 100% de cobertura	61
Tabela 5. Rugosidades médias Ra e Rz das amostras e seu acréscimo percentual	63
Tabela 6. Parâmetros de superfície de rugosidades médias	65
Tabela 7. Parâmetros de perfil de rugosidades médias	69
Tabela 8. Parâmetros de perfil S_{ku} e S_{sk}	69
Tabela 9. Amostras selecionadas para realização dos testes microbiológicos	75

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AISI	<i>American Iron and Steel Institute</i>
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCC	Cúbica de Corpo Centrada
CFC	Cúbica de Face Centrada
DLVO	Teoria de Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPS	Exopolissacarídeo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ISO	<i>International Organization Standardization</i>
LAMAS	Laboratório Multiusuário de Análises de Superfícies
LB	Luria Bertani
Ltda	Limitada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscopia de força atômica
NBR	Norma Técnica Brasileira
NIH	<i>National Institute of Health</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano
QS	<i>Quorum Sensing</i>
R _a	Rugosidade média
R _q	Rugosidade média quadrática
R _z	Média dos valores absolutos das alturas dos cinco picos mais altos e dos cinco vales mais profundos
RPM	Rotações por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

PREFÁCIO	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 Engenharia de superfícies	19
3.1.1 Shot peening	21
3.1.1 Variáveis operacionais de <i>shot peening</i>	22
3.1.1.1 <i>Tipo de granalha</i>	22
3.1.1.2 <i>Pressão</i>	23
3.1.1.3 <i>Ângulo de jateamento</i>	24
3.1.1.4 <i>Distância do jateamento</i>	24
3.1.1.5 <i>Tempo de processo</i>	24
3.2 Adesão bacteriana e formação de biofilme	25
3.2.1 Fatores que influenciam a adesão e formação de biofilmes.....	28
3.2.1.1 <i>Fatores físico-químicos e termodinâmicos</i>	29
3.2.1.2 <i>Hidrofobicidade</i>	30
3.2.1.3 <i>Aspectos microbiológicos e estruturas extracelulares</i>	31
3.2.1.4 <i>Rugosidade e microtopografia</i>	32
3.2.2 Bactérias envolvidas.....	41
3.2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	42
3.2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	44
4 METODOLOGIA	47
4.1 Confecção da cabine de <i>shot peening</i>	48
4.2 Substrato	48
4.3 Shot peening	49
4.4 Caracterização das amostras	50
4.4.1 Microscopia óptica.....	50
4.4.2 Rugosidade 2D.....	51
4.4.2.1 <i>Perfilômetro de Contato – Rugosímetro</i>	51
4.4.3 Rugosidade 3D.....	53

4.4.3.1 Perfilômetro óptico	54
4.4.4 Adesão e proliferação bacteriana.....	57
4.4.4.1 Suspensão do microrganismo.....	57
4.4.4.2 Adesão e proliferação bacteriana nos substratos de aço inoxidável.....	57
4.4.4.3 Determinação do número de células planctônicas e sésseis	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
5.1 Confeção da cabine de <i>shot peening</i>.....	59
5.2 Texturização por <i>Shot peening</i>.....	60
5.3 Análise da topografia/textura por microscopia óptica.....	61
5.4 Medição da rugosidade 2D	63
5.3 Medição da rugosidade 3D	68
5.4 Adesão e proliferação bacteriana	75
6 CONCLUSÕES	81
7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	82
REFERÊNCIAS.....	83

PREFÁCIO

Iniciei o mestrado em março de 2019, quando completava 10 anos do início da minha experiência com pesquisa científica. Desde 2009, enquanto cursava o ensino médio e o técnico em química na Fundação Liberato Salzano Vieira da Cunha, minha trajetória foi marcada pela participação em feiras de ciência. A pesquisa mudou minha vida porque me ensinou a ter paciência, mas não esperar sentada pelos resultados; me ensinou a propor pequenas soluções simples e viáveis, ao invés de reinventar a roda; e, mais do que mudar a minha forma de enxergar os problemas, a pesquisa me abriu portas, janelas e a mente para o mundo.

Minha graduação foi cursada integralmente com uma bolsa de estudos, obtida como prêmio por uma das pesquisas desenvolvidas. A essa altura, a paixão pela ciência já era evidente e declarada, assim como a luta para que existam condições de exercê-la no Brasil, mesmo diante dos ataques a que foi submetida nos últimos anos.

Finalizada a graduação, não havia dúvidas de que seguiria para a próxima etapa: o mestrado. A colação de grau ocorreu em janeiro de 2019, e o mestrado foi iniciado em março. Aproveitei aquele ano para cursar todas as disciplinas, realizar o estágio de docência e definir as diretrizes da pesquisa. O ano de 2020 seria dedicado exclusivamente às práticas experimentais. A pesquisa já tinha um objetivo idêntico ao atual, mas com uma metodologia de texturização superficial muito distinta, através da polimerização por plasma, e a tentativa de reprodução da topografia superficial em matrizes poliméricas.

E 2020 começou no laboratório. Diversos testes de obtenção, variações das condições no reator a plasma e testes com diferentes polímeros. No início de fevereiro já estávamos rodando os primeiros testes microbiológicos para validação da metodologia, e na metade do mês, estávamos realizando análises no microscópio eletrônico de varredura para avaliar os resultados preliminares.

Com novos testes agendados, e novas estratégias definidas para aprimoramento do método, chegamos em 11 de março de 2020, quando a Organização Mundial da Saúde (OMS) elevou o estado da infecção causada pelo coronavírus à pandemia de Covid-19. Mundo em alerta, Universidades e laboratórios fechados. Pausa temporária e por tempo indeterminado na parte experimental da pesquisa, até que pudéssemos retornar aos laboratórios, resultando também na prorrogação dos prazos de defesa da dissertação.

A pausa temporária teve fim depois de 454 dias, quando consegui autorização para retorno restrito aos laboratórios da UFRGS, mediante apresentação do teste RT-PCR. Nesse momento, completávamos seis meses desde o início da vacinação no mundo, mas a minha primeira dose viria apenas 50 dias depois. No intervalo de 15 meses, entre o fechamento dos laboratórios e a autorização para retorno restrito, a pesquisa idealizada em 2019 sofreu alterações significativas, especialmente no que diz respeito ao método de texturização superficial. Essas modificações aconteceram para viabilizar a realização de testes fora das dependências da Universidade.

Foi projetada uma cabine de *shot peening*, confeccionada e mantida nas dependências da carpintaria administrada pelo meu pai. Essa confecção foi viabilizada através de materiais adquiridos de diferentes fontes (desmontagem de equipamentos para retirada de peças, compras online, adaptações e empréstimos). Com isso, as variáveis operacionais que puderam ser aplicadas à cabine foram incluídas, e alguns parâmetros tiveram limitações impostas pela confecção da cabine (situação típica, frequentemente vivida por pesquisadores de diferentes áreas).

A partir dessa mudança de metodologia, meu pai e meu irmão tornaram-se os novos “auxiliares de laboratório”. Um microscópio digital USB simples foi acoplado ao computador, e os funcionários da carpintaria tornaram-se os novos curiosos pelas modificações superficiais provocadas pelo processo. À medida que os resultados dos testes microbiológicos iam surgindo, eu presenciava as teorias complexas sendo explicadas de maneira simples e acessível, com exemplos concretos, pelos novos aprendizes que acompanhavam as atividades. A ciência tem mesmo esse poder de encantamento (ainda bem)!

As restrições impostas pela pandemia alteraram os rumos da minha e de tantas outras pesquisas, ao longo desses quase dois anos. No meu caso, essas limitações forçaram mudanças metodológicas que tornaram o processo mais acessível e reproduzível em larga escala. Essa transição nos permitiu aproximar a pesquisa científica do “chão de fábrica”, e projetar os efeitos concretos da sua aplicação num futuro próximo.

No momento em que a ciência é posta em xeque por negacionistas que, provisoriamente, ocupam o poder, produzir soluções com potencial de contribuição social é também uma forma de (re) existência. Espero que os resultados obtidos possam servir a esse propósito, mas, ao mesmo tempo, que essa existência esteja apenas começando!

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes obstáculos enfrentados pelo sistema de saúde está relacionado a adesão bacteriana e a consequente formação de biofilmes, associada a aproximadamente 80% das infecções médicas no mundo, segundo a *National Institutes of Health* (NIH, 2002). Biofilmes são comunidades tridimensionais de células aderidas entre si e a uma superfície, envolvidas em uma matriz polimérica extracelular auto-excretada. Uma das mais importantes características do biofilme bacteriano é a sua resistência ao sistema imune do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos, podendo tornar-se de 10 a 1.000 vezes mais resistente do que quando na forma de bactérias livres (DAVIES, 2003). Por essa razão, a formação de biofilmes possui um papel importante na patogênese, sendo causa comum de infecções persistentes e representando um grande obstáculo para a saúde humana (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Dessa maneira, micro-organismos que apresentam suscetibilidade a determinados antimicrobianos em testes laboratoriais convencionais podem ser altamente resistentes aos mesmos quando na forma de biofilmes, provocando doenças crônicas e difíceis de tratar.

Essa dificuldade de tratamento, provocado pela resistência bacteriana em infecções associadas a biofilmes, possui consequências diretas e indiretas no desfecho clínico e na qualidade de vida dos pacientes, podendo gerar maior tempo de internação, aumento dos custos com médicos e procedimentos diagnósticos, bem como aumento dos custos de antibioticoterapia e medicamentos complementares.

Para que a adesão bacteriana ocorra é necessário que haja a interação multifacetada de três componentes: a bactéria, a superfície e o microambiente em que eles se encontram (DAROUCHE, 2001). Dessa forma, as estratégias para o combate de biofilmes podem, basicamente, ser divididas em dois segmentos: a inibição da formação de biofilmes e a erradicação ou tratamento de biofilmes já formados.

Existem diversos tipos de bactérias formadoras de biofilme. Entre as Gram-positivas, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, que é capaz de invadir e sobreviver dentro de células fagocíticas e driblar o sistema imunológico do hospedeiro. (UÇKAY *et al.* 2009). Dentre as Gram-negativas destacam-se *Escherichia coli* e *Salmonella*, responsáveis por grande parte das infecções gastrointestinais; e as *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cenocepacia*, capazes de acarretar e agravar infecções respiratórias em pacientes com fibrose cística (NORDMANN & CORNAGLIA, 2012).

Um dos atuais desafios da engenharia é a modificação das superfícies através de soluções economicamente viáveis, que representem uma outra alternativa na prevenção da formação de biofilmes. Buscando atender à essa demanda, diversas áreas de pesquisa se destinam a agregar propriedades antimicrobianas pela modificação superficial dos materiais, através da inclusão de nanopartículas de prata, liberação controlada de antibióticos, funcionalização da superfície, modificação química e métodos mecânicos (IARIKOV *et al.* 2014; GU *et al.* 2016).

Superfícies texturizadas com padrões micro e nanométricos têm recebido especial atenção como mecanismo de redução da adesão bacteriana e formação de biofilmes, pela modificação das interações físico-químicas que medeiam a adesão primária ao substrato. (GALLO *et al.* 2014; CAMPOCCIA *et al.* 2013). Essa texturização, de maneira geral, permite modificar a superfície externa de modo a dificultar a adesão e colonização microbiana, mantendo inalteradas as propriedades mecânicas, o volume e as funcionalidades desejáveis do material, podendo ainda facilitar a biocompatibilidade material-tecido, no caso de implantes. (BAZAKA *et al.* 2012).

Dentre as técnicas de texturização disponíveis, o processo de *shot peening* vêm ganhando cada vez mais interesse devido à sua capacidade de melhorar as propriedades mecânicas dos materiais, possibilitando altas taxas de deformação a temperaturas baixas, sem alterar consideravelmente as dimensões gerais do material. (VALIEV *et al.* 2000; VALIEV, 2004). Além disso, o processo de *shot peening* promove a limpeza da superfície exposta, atua no alívio de tensões trativas, aumenta a resistência a fadiga, a corrosão e ao atrito, e reduz a tensão média superficial, atrasando a iniciação e o crescimento de tricas (ASM, 2007). (CLÁUDIO *et al.* 2008). (CMV, 2014).

Diante disso, essa pesquisa buscou avaliar a influência da texturização superficial de amostras de aço inoxidável AISI 430 por *shot peening* na adesão e proliferação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As amostras foram obtidas sob diferentes condições operacionais e caracterizadas quanto à rugosidade, topografia superficial e adesão/proliferação bacteriana após 24 horas de contato frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da topografia da superfície na adesão e proliferação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em substratos de aço inoxidável AISI 430 texturizados através da técnica de *shot peening*.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Submeter amostras de aço inoxidável AISI 430 à diferentes condições operacionais de tratamento por *shot peening*;
- b) Caracterizar as amostras obtidas quanto à rugosidade; e
- c) Avaliar os efeitos do *shot peening* na adesão e proliferação bacteriana frente às cepas de *E. coli* e *S. aureus*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

“Somente quando as coisas podem ser vistas por muitas pessoas, numa variedade de aspectos, sem mudar de identidade, de sorte que os que estão à sua volta sabem que veem o mesmo na mais completa diversidade, pode a realidade do mundo manifestar-se de maneira real e fidedigna.”

(Hannah Arendt)

3.1 Engenharia de superfícies

A engenharia de superfícies é caracterizada pelo desenvolvimento e aplicação de processos tecnológicos de preparação e modificação de superfícies, a fim de conferir propriedades específicas dentro de uma aplicação. Segundo Tom Bell (1990), a modificação da superfície possibilita a obtenção de materiais cujas propriedades são inatingíveis apenas com o material base ou com a superfície isolada.

É uma área emergente e multidisciplinar que abrange ramos da engenharia, física, química e ciência dos materiais. Seu desenvolvimento foi motivado pela compreensão de que a superfície, para um grande número de aplicações, se constitui como a parte mais importante dos componentes, sendo o local onde são iniciados diversos mecanismos que levarão a falha. (DAVIS, 2001; ELLIOTT, 1978; GALLO, 2009). Técnicas de modificação de superfície permitem alterações nas propriedades mecânicas, químicas, elétricas, térmicas e ópticas dos materiais. (BERNAL, 2006; CZERWINSKI, 2012).

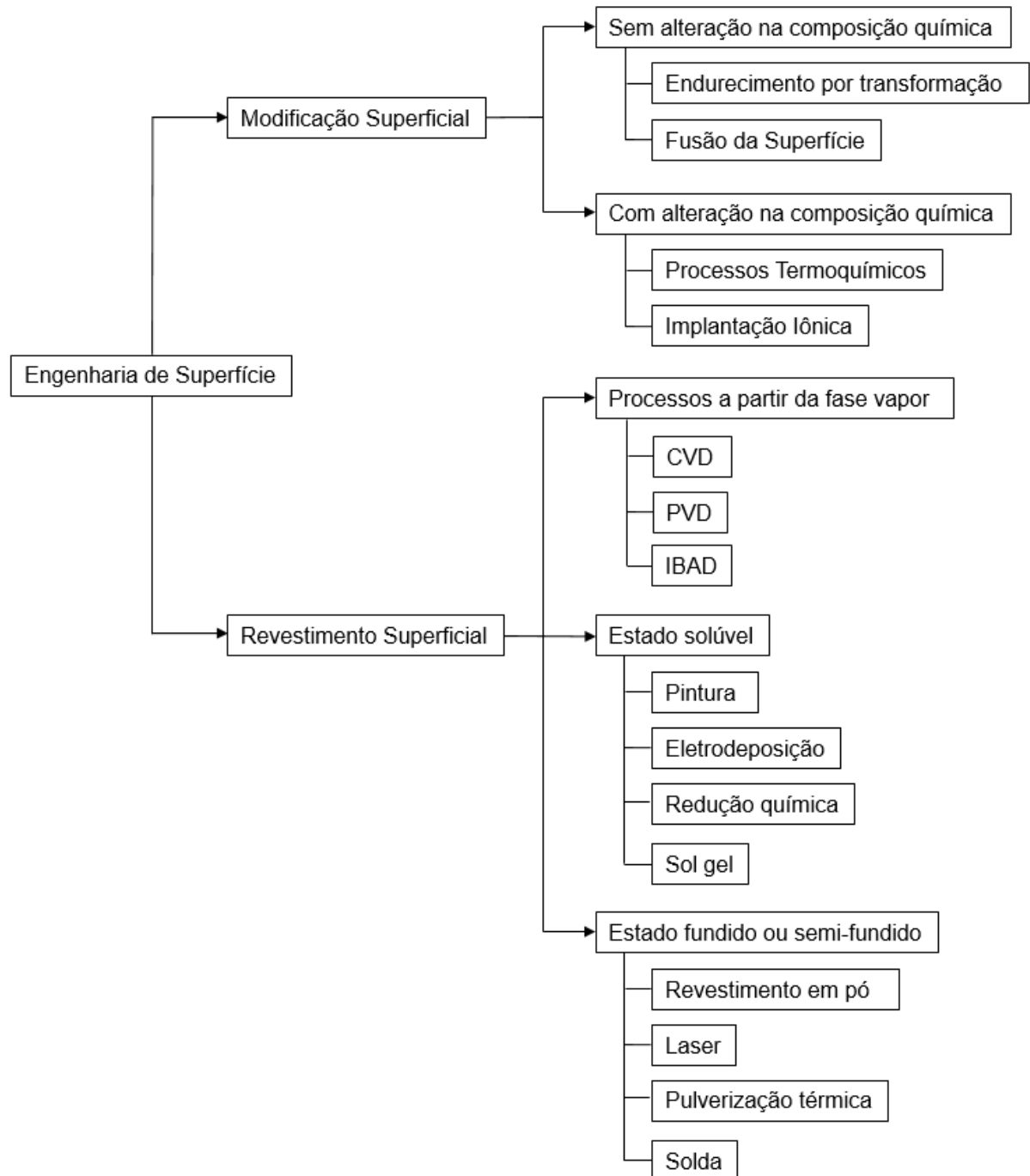
A engenharia de superfícies subdivide-se, basicamente, em duas áreas: a modificação do material base ou a utilização de um revestimento, conforme ilustrado na Figura 1.

Tratamentos que envolvem a modificação do material base são aqueles onde o substrato é modificado, seja em suas propriedades físicas (via têmpera por indução, *shot peening*, jato de areia), ou em suas propriedades físico-químicas, geralmente envolvendo difusão (como na nitretação, cementação, carbonitretação, etc).

Tratamentos que envolvem uma deposição de um revestimento não buscam a modificação do substrato, mas, sim, aliar as propriedades do material base com as do revestimento formando o compósito. Deste modo, procura-se atingir propriedades ótimas através da utilização conjunta das propriedades metais/mecânicas do

substrato e do revestimento. Encontramos uma variedade de exemplos destas aplicações como tintas, revestimentos cerâmicos e revestimentos metálicos.

Figura 1. Subdivisões da Engenharia de Superfície



Fonte: Adaptado de PIANA, 2001; HOLMBERG & MATTHEWS, 1994.

Existe uma gama variada de tratamentos que podem ser aplicados em aços para melhoria de suas propriedades, visando diminuição da degradação superficial e desgaste ocorrido durante os processos em que são submetidos, por exemplo. A engenharia de superfícies, além de promover redução de custos em processos de

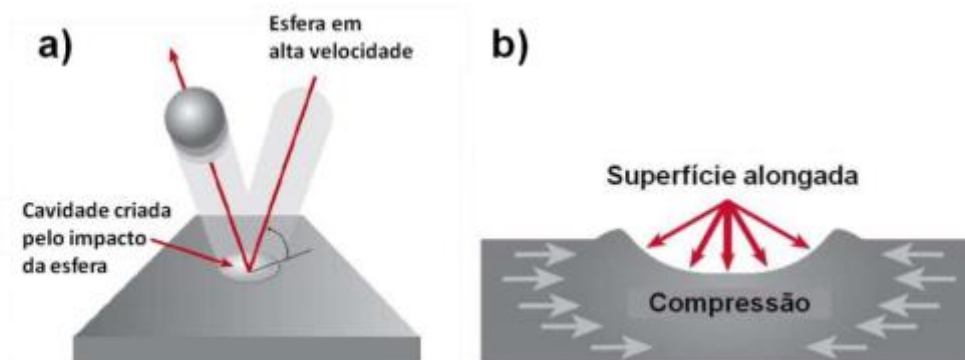
fabricação, também pode melhorar a precisão e qualidade superficial dos produtos fabricados.

3.1.1 Shot peening

O *shot peening* é um processo de deformação plástica à frio, que ocorre através de um jato de granalhas direcionadas em alta velocidade sob condições controladas, a fim de introduzir tensões residuais compressivas nas camadas superficiais do metal. (ASM, 2007; BLODGETT, 2004).

Quando as esferas projetadas em alta velocidade entram em contato com a superfície do material, atuam como pequenos martelos que provocam uma deformação plástica côncava na camada superficial. (COSTA, 2006; TOTTEN, 2004). Abaixo de cada concavidade criada, o material que foi deformado tenta retornar à sua forma original, criando assim tensões compressivas e endurecimento superficial (encruamento). (MELO & NUNES, 2013). A Figura 2 demonstra esquematicamente as tensões induzidas por shot peening.

Figura 2. Desenho esquemático das tensões induzidas pelo *shot peening*



- a) Demonstração do impacto da esfera sobre a superfície
 b) Distribuição das tensões após o processo de *shot peening*

Fonte: Adaptado de MIC, 2006.

Entretanto, à medida que essas tensões compressivas são introduzidas na superfície, surgem também tensões residuais trativas subsuperficiais de reação. Isso ocorre a fim de satisfazer as condições de equilíbrio de forças e momentos internos do material. (STEPHENS, 2001).

Este processo, além de promover a limpeza da superfície exposta e atuar no alívio de tensões trativas, também aumenta a resistência a fadiga, reduzindo a tensão média superficial e atrasando a iniciação e o crescimento de trincas. (ASM, 2007;

CLÁUDIO *et al.* 2008). Além das vantagens citadas, o tratamento por *shot peening* também aumenta a resistência a corrosão, aumenta a resistência ao atrito, e possibilita a redução dimensional e/ou de peso sem comprometer a resistência mecânica. De acordo com um estudo realizado em 2001 (SPM, 2001), a vida a fadiga dos componentes é fortemente influenciada pelo tratamento de *shot peening* e podem ser aumentadas a patamares de 600% em feixes de mola, 1300% em molas helicoidais, e 1500% em engrenagens.

A magnitude da tensão residual que pode ser introduzida pelo *shot peening* é limitada, e depende principalmente do material da peça. Para metais de elevada dureza, a tensão pode chegar a pouco mais da metade do valor da tensão de escoamento do material (ASM, 2007; STEPHENS, 2001).

A profundidade da camada onde se concentram as σ compressivas, que podem variar entre 0,03 mm a 2 mm (ROCHA, 2010), e a rugosidade da superfície jateada são determinadas pelo material da peça e pela intensidade de jateamento. A intensidade de jateamento depende do tamanho, do peso e da dureza do material da granalha, da velocidade do jato, do ângulo de jateamento e do tempo de exposição (ASM, 2007; STEPHENS, 2001). Todos esses parâmetros, além da cobertura e saturação são variáveis importantes no controle dos resultados do *shot peening* (OLIVEIRA, 2014). Nos itens a seguir, essas variáveis serão abordadas mais detalhadamente.

3.1.1 Variáveis operacionais de *shot peening*

No processo de *shot peening* diversos fatores devem ser considerados, uma vez que interferem diretamente no resultado final do tratamento. Dentre as principais variáveis operacionais a serem observadas, destacam-se: o tipo de granalha, pressão de jateamento, ângulo de jateamento, distância de jateamento e tempo de processo.

3.1.1.1 Tipo de granalha

Dentre as variáveis do *shot peening*, o tipo de granalha destaca-se como sendo um dos mais importantes, principalmente no que diz respeito ao material da granalha escolhida, dureza, formato e dimensão.

O formato ideal é o esférico, evitando a formação de arestas e descontinuidades acentuadas na superfície da peça, que podem gerar concentradores de tensão. A dimensão das esferas impacta diretamente na distribuição das tensões residuais, assim como na rugosidade da peça. Uma vez que o jateamento é um processo de impacto, a superfície jateada sofre alterações microscópicas que serão de maior magnitude quanto maior a massa da granalha. Segundo Rego (2011), se as demais variáveis do processo são mantidas, o aumento da dimensão da granalha resulta em aumento da intensidade de jateamento, profundidade da camada compressiva, e diminuição da área de cobertura.

De maneira geral, o material da granalha deve apresentar uma dureza igual ou superior a do material da peça (KRITZLER; WÜBBENHORST, 2002; apud REGO, 2011). Comumente, elas se dividem em materiais ferrosos e não ferrosos, sendo as duas principais matérias-primas as esferas de vidro (não ferrosas) e as granalhas de aço (ferrosas). As granalhas de aço se dividem em granalhas de fio de aço cortado e granalha de aço fundido. As esferas de aço fundido apresentam normalmente dureza entre 40 e 50 HRC (escala de dureza Rockwell C), enquanto as esferas de ferro fundido são mais quebradiças e apresentam valores entre 58 e 68 HRC. (OLIVEIRA, 2014). Segundo a Brasibras (2014), as principais vantagens das granalhas de aço são seu baixo custo operacional em função da vida útil (podem suportar mais de 400 ciclos), velocidade de limpeza, uniformidade no acabamento, menor desgaste e menor geração de pó.

3.1.1.2 Pressão

O controle da pressão está diretamente relacionado com a velocidade com que as granalhas são propelidas. A velocidade das granalhas interfere no processo de modo que aumentar a velocidade das esferas aumenta a intensidade do tratamento, uma vez que as granalhas se chocam com maior energia cinética na superfície da peça. (OLIVEIRA, 2014). Isso interfere diretamente na profundidade das tensões residuais compressivas geradas no material, sem influenciar os valores da tensão residual máxima.

Há um ponto máximo de pressão para o aumento da magnitude da tensão residual, ou seja, há um limite de pressão de jateamento e após essa pressão os valores de tensão residual menor serão na superfície dos componentes tratados. Isto

é dado em função do relaxamento da rede que ocorre devido ao alto impacto das granalhas com a peça. (OLIVEIRA, 2014).

Em materiais mais dúcteis costuma-se trabalhar com velocidades baixas, enquanto que para peças mais duras trabalha-se com velocidades superiores para que se possa obter resultados significativos. (ROHWEDER *et al.* 2011).

3.1.1.3 Ângulo de jateamento

O ângulo de jateamento consiste no ângulo que é formado entre a direção do jato e o plano da superfície do material. Quanto maior o ângulo de jateamento, maior será a intensidade do tratamento, uma vez que a componente vertical da força será maior quanto maior o ângulo. Entretanto, evita-se trabalhar com ângulo de 90° em função do ricocheteamento das esferas, que colidem com as incidentes, aumentando o consumo de granalhas e diminuindo a eficiência do tratamento. (REGO, 2011).

A escolha do ângulo no jateamento varia em função do material das granalhas. Normalmente, para granalhas de aço e granalhas de vidro, o ângulo fica entre 60° e 70°, entretanto, para granalhas de material mais frágil o ângulo trabalhado costuma ser inferior a 60°. (ROHWEDER *et al.* 2011).

3.1.1.4 Distância do jateamento

A distância do jateamento é definida como a distância entre a saída do jato até a face do material. Sendo assim, quanto maior for esta distância, maior será a área do material submetida ao tratamento, no entanto, menor será a velocidade de impacto das esferas, reduzindo a intensidade do processo.

Gariépy e colaboradores (2012) relatam que a distância do jateamento tem impacto direto no refinamento do grão e no acabamento superficial. Quanto menor a distância, maior a tendência de a superfície ficar mais lisa e com bom acabamento.

3.1.1.5 Tempo de processo

O parâmetro tempo operacional quando ligado ao tempo de jateamento segue a lógica do conceito de saturação. Ou seja, o quão maior for o tempo de exposição da

peça ao jateamento, maior será a intensidade do mesmo, no entanto, isto se dá apenas até um determinado ponto, chamado de ponto de saturação (REGO, 2011).

O ponto de saturação é definido como o ponto onde a intensidade do *shot peening* permanece a mesma ou varia de maneira insignificante. Normalmente, este ponto é atingido quando cerca de 98% do material está coberto. (OLIVEIRA, 2014).

3.2 Adesão bacteriana e formação de biofilme

Um dos grandes desafios presentes na saúde pública atualmente está relacionado às infecções proporcionadas por biofilmes e patógenos que se tornaram multirresistentes a antimicrobianos. Isso impacta no aumento de morbidade, mortalidade, no aumento do tempo de internação e nos gastos do sistema de saúde (NEIDELL *et al.* 2012). O órgão norte-americano “*National Institute of Health*” afirma que os biofilmes têm relação com aproximadamente 80% de todas as infecções médicas no mundo (NIH, 2002), onde as principais infecções têm relação com próteses (DONLAN; COSTERTON, 2002; HOIBY *et al.* 2011). Quando estas células são resistentes, ao utilizar um antimicrobiano para acabar com a infecção, o paciente obtém como resultado uma reinfecção.

A descrição dos biofilmes tem sido discutida em muitos sistemas desde Antonie van Leeuwenhoek, em 1675, mas a teoria geral da existência de biofilmes só foi publicada em 1978, através de um estudo realizado por Costerton, Geesey e Cheng. A partir dessa publicação, revelou-se que várias bactérias não se desenvolvem igualmente se comparadas como as células individuais, mas sim em comunidades estruturadas, como biofilmes. (COSTERTON *et al.* 1978; LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010).

O termo biofilme pode ser definido por um ecossistema ou comunidade microbiológica complexa, caracterizado por células que possuem adesão irreversível a um substrato ou entre si, protegidas por uma matriz formada de polissacarídeos extracelular de produção própria. (CAIXETA, 2008; SALDANHA, 2013).

Pode-se definir que as bactérias possuem dois estados básicos de vida: como células planctônicas – caracterizadas como células de vida livre, com metabolismo mais ativo – e como células sésseis – sendo as células que compõe os biofilmes, que vivem em comunidade, fixas em determinadas superfícies e com um metabolismo mais compensado. As células planctônicas são essenciais para garantir rápida

proliferação, resultando na disseminação dos micro-organismos para outros locais. Por outro lado, as células sésseis têm a importante característica de cronicidade. (CONSTERTON *et al.* 1987).

A formação do biofilme se dá através de cinco etapas: a adesão primária, a adesão irreversível, a formação da cadeia polimérica, a maturação do biofilme e a liberação das células persistes.

A adesão primária em superfície, também conhecida como adesão bacteriana reversível, é o primeiro estágio na formação de biofilmes. Células microbianas planctônicas que por algum motivo passaram por modificações fenotípicas ou se encontram em ambiente hostil migram para determinada superfície abiótica (inanimada, plástico e metais por exemplo) e, passam a viver de modo sésseis, ou seja, em comunidade. A adesão reversível entre bactérias e superfícies abióticas ocorre mediada por interações físico-químicas não específicas, enquanto a adesão a superfícies bióticas é acompanhada por interações moleculares mediadas por ligações específicas do tipo receptor-ligante. (MORAES *et al.* 2013; TRENTI *et al.*, 2013).

Depois de aderidos, ocorre a proliferação destes micro-organismos. Nessa fase são produzidas substâncias que tem a função de atrair outros micro-organismos, e fazer com que as células bacterianas produzam uma matriz de exopolissacarídeo (EPS), que se comporta como uma membrana protetora que recobre totalmente a comunidade bacteriana. Nesse momento, os micro-organismos fracamente ligados à superfície consolidam o processo de adesão, através da produção de EPS. Durante essa fase de adesão, os micro-organismos são capazes de se ligar a células da mesma ou de diferentes espécies, formando agregados que vão estar firmemente ligados à superfície (STOODLEY *et al.* 2002). Nessa etapa a adesão é considerada irreversível pois é mediada por interações fortes como ligações eletrostáticas ou de Van der Waals. (DONLAN *et al.* 2001; CAIXETA, 2008; FLACH, 2005).

Com a formação da membrana, inicia-se o processo de troca de substâncias entre o meio interno e o externo, que é possível através do gradiente de concentração, fazendo com que o EPS seja mais seletivo, e as bactérias mais próximas a extremidades do mesmo tenham o metabolismo mais ativo do que as que foram aderidas inicialmente (MENOITA, 2012). Dessa forma, no ambiente interno à membrana, podem ocorrer alterações de pH, temperatura, umidade, produção de toxinas, expressão dos fatores de virulência e até mesmo troca plasmidial. Este

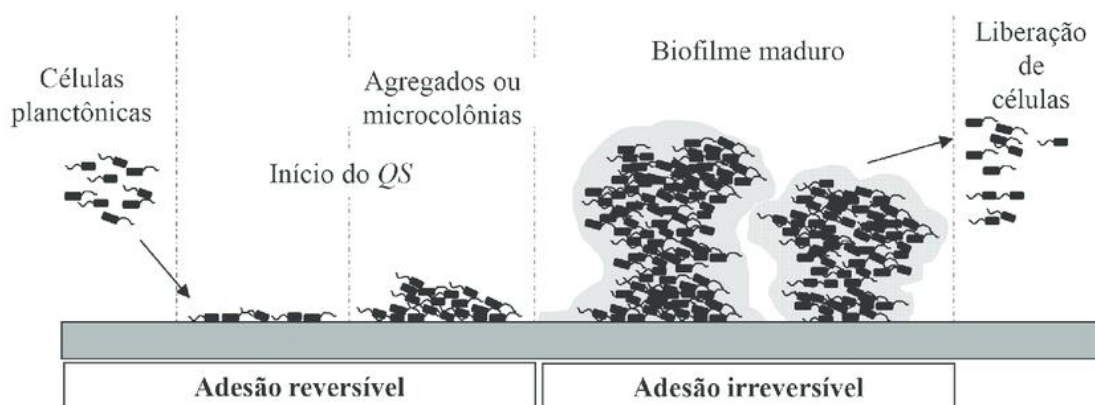
processo de comunicação pode ser encontrado em diversos micro-organismos, muitas vezes associado a bactérias patogênicas e é chamado de *Quorum sensing* (RUTHERFORD; BASSLER, 2012; TRENTI *et al.* 2013).

No terceiro estágio inicia-se a formação de micro colônias, onde o biofilme começa a se estruturar para o seu amadurecimento, sua adesão é forte e estável. Com a matriz extracelular já estabelecida, inicia-se a multiplicação celular para o aumento populacional. Nessa fase a atividade metabólica é alta apresentando quebra de enzimas e substratos.

Após a maturação, o biofilme adquire uma estrutura tridimensional e heterogênea, semelhante a cogumelos que interfere diretamente em sua virulência. Essa estrutura é envolta por poros e canais de água que funcionam como sistema de entrada e troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos, esta estrutura também serve como uma barreira contra a penetração de antibióticos.

Na quinta e última fase da formação do biofilme, em decorrência da alta densidade populacional e falta de nutrientes, as células que estavam em estado de dormência são expulsas, podendo formar assim um novo biofilme em outros locais. Esse processo de dispersão/deslocamento ou desprendimento de porções de biofilme, é conhecido como erosão, ou, "*sloughing off*". As células persistes liberadas, são mais virulentas que as células da comunidade anterior, pois quando se encontram em estado de dormência adquiriram genes de resistência, o que torna essas bactérias menos suscetíveis ao efeito dos antibióticos. (XAVIER, 2002; MENOITA, 2012; TRENTIN *et al.* 2013). A Figura 3 representa a formação de um biofilme e as fases associadas a ele.

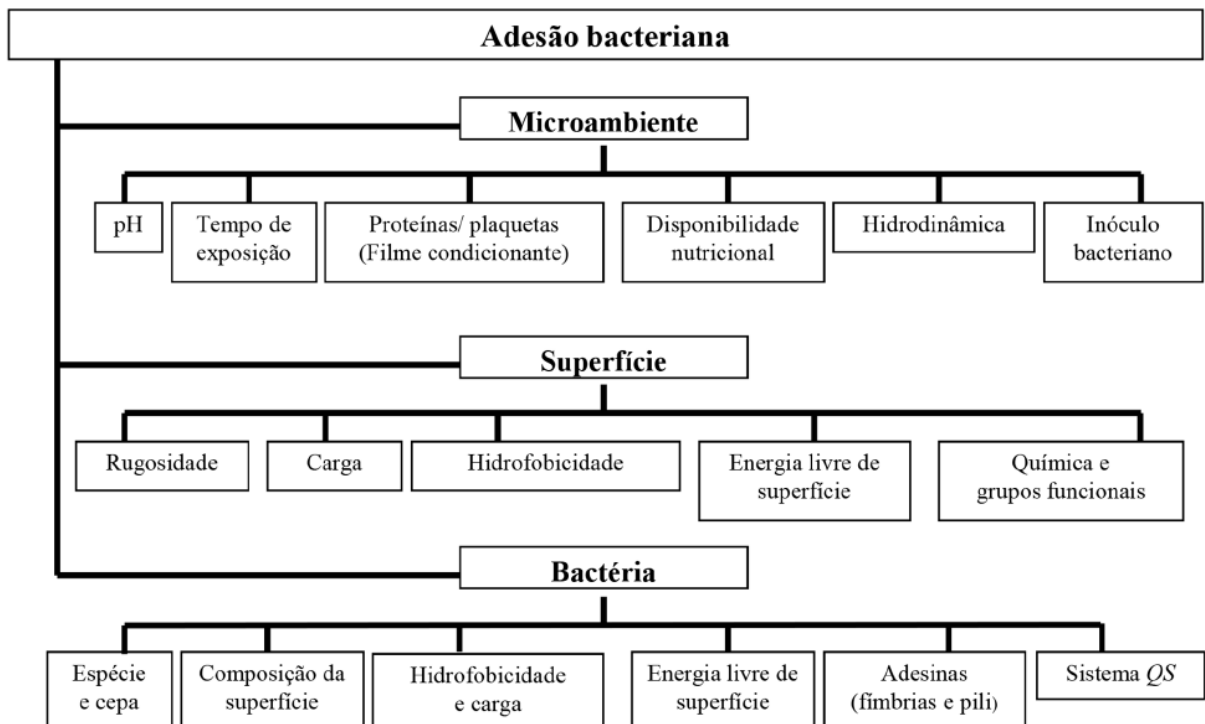
Figura 3. Fases de formação do biofilme bacteriano



3.2.1 Fatores que influenciam a adesão e formação de biofilmes

A adesão bacteriana é um processo bastante complexo que envolve a interação multifacetada de três componentes: a bactéria, a superfície (biótica ou abiótica) e o microambiente em que eles se encontram. (DAROUICHE, 2001). Destes três fatores, as características bacterianas são provavelmente as mais importantes na patogênese das infecções associadas ao dispositivo, enquanto as características superficiais do dispositivo são as mais passíveis de modificação com o objetivo de prevenir a infecção. A Figura 4 ilustra as diversas variáveis que podem influenciar esse processo de adesão bacteriana.

Figura 4. Fatores que influenciam a adesão bacteriana



Fonte: MACEDO & ABRAHAM, 2009.

A adesão de células microbianas às superfícies é um fenômeno que ocorre naturalmente em meios aquosos e que depende das propriedades superficiais dos suportes de adesão, do microambiente e das células dos microrganismos envolvidos na adesão. Dentre essas propriedades, destacam-se: as características do meio de crescimento, como pH, tempo de exposição e disponibilidade de nutrientes; fatores inerentes à morfologia das superfícies, como a rugosidade, a carga superficial e hidrofobicidade (PEREIRA *et al.* 2000); e propriedades microbiológicas das células, como espécie e cepa (CHAVES, 2004).

3.2.1.1 Fatores físico-químicos e termodinâmicos

O estudo da adesão da bactéria à superfície requer o conhecimento das características físico-químicas da superfície da bactéria, da superfície de adesão e da interação entre elas. Como demonstrado na Figura 4, a possibilidade de formar ligações específicas entre a bactéria e superfície depende da composição química dessa e da composição da camada mais externa da célula. (VALCARCE *et al.* 2002).

A termodinâmica das superfícies microbianas é um reflexo das características físico-químicas das células microbianas e das características biológicas, e está teoricamente fundamentada na termodinâmica das superfícies de coloides usando a teoria clássica de estabilidade de coloides conhecida como teoria DLVO, desenvolvida inicialmente por Derjaguin e Landau, em 1941 e complementada por Verwey e Overbeek, em 1948. (STREVETT; CHEN, 2003).

As propriedades físicas da maioria das bactérias são semelhantes às daquelas dos coloides. Assim, estas podem ser consideradas partículas coloidais vivas por apresentarem, em geral, forma de bastonetes curtos, carga global negativa, densidade pouco superior à da água, aproximadamente 1 μm de comprimento e serem cobertas com biomacromoléculas. (MARSHALL, 1971; UBBINK; ZAMMARETTI, 2007).

A teoria DLVO afirma que a energia potencial total de interação entre dois corpos é resultante da ação combinada entre as forças atrativas de van der Waals e as forças de dupla camada elétrica. A intensidade das forças de van der Waals é diretamente proporcional ao tamanho das partículas que interagem e inversamente proporcional à distância da superfície.

As forças de dupla-camada elétrica estão associadas à carga elétrica superficial e aos movimentos brownianos. A superfície de um sólido eletricamente carregado em contato com uma solução aquosa atrai íons de sinal contrário ao do meio e simultaneamente repele os de sinais iguais. Em sistemas biológicos a carga superficial é resultante da adsorção de íons ou ionização dos grupos superficiais. (CHAVES, 2004).

Em geral, as bactérias apresentam carga elétrica negativa em pH neutro. Nas bactérias Gram-positivas a carga negativa é originária dos ácidos teicóicos e lipoteicóicos da parede e dos polipeptídios do glicocálix; nas bactérias Gram-negativas, esta carga é associada a presença de lipopolissacarídeos e proteínas

presentes na membrana externa, em associação com os polímeros do glicocálix. (WICKEN, 1985).

A teoria DLVO considera apenas as forças de longo alcance. No entanto, quando uma partícula ou célula microbiana encontra-se muito próxima de uma superfície (entre 2 nm e 5 nm), forças de curto alcance passam a regular o processo. Estas forças denominadas de não-DLVO são representadas pelas forças de repulsão de Born, forças de hidratação, interações hidrofóbicas e pontes poliméricas. Estas forças permitem justificar os desvios da teoria DLVO, contudo estes tipos de interações não são facilmente quantificáveis com exceção da interação hidrofóbica (ELIMELECH, 1995), que é considerada a força de curto alcance mais importante para a adesão bacteriana. (BUSSCHER *et al.* 1990; VAN OSS, 1997).

Para considerar os aspectos termodinâmicos no processo de adesão, van Oss *et al.* (1994), adicionaram à teoria DLVO as influências das interações de Lifshitz-van der Waals, de ácido base de Lewis, das forças de dupla camada elétrica e movimentos brownianos. Esta teoria é conhecida como XDLVO ou DLVO Estendida e considera as forças de curto alcance, principalmente as interações hidrofóbicas.

A energia livre global das interações numa superfície é resultante do somatório das energias livres das interações de Lifshitz-van der Waals, interações ácido-base de Lewis, forças eletrostáticas de dupla camada elétrica e interações resultantes de movimentos Brownianos. (MARSHALL, 1992).

Além disso, o contato direto entre a bactéria e a superfície pode ser estabelecido em nível molecular por meio de substâncias poliméricas extracelulares, sintetizadas pelas bactérias. Esses compostos não estão sujeitos ao mesmo tipo de repulsão que as bactérias, portanto podem facilitar a adesão entre a bactéria e a superfície por várias combinações de ligações químicas (eletrostáticas, covalente e de hidrogênio), interações dipolo (dipolo-dipolo, dipolo-induzido e íon-dipolo), além de interações hidrofóbicas. Como consequência disso, a bactéria poderá ter diferentes tipos de adesividade. (MARSHALL, 1992).

3.2.1.2 Hidrofobicidade

Segundo van Oss e Giese (1995), a hidrofobicidade é expressa como energia hidrofóbica de atração e estabelece o grau de interação entre as moléculas de um material imerso em água. A hidrofobicidade é definida em termos de energia livre de

interação entre as moléculas das superfícies imersas em água. Quando a energia livre global de interação entre as moléculas imersas em água é atrativa, as moléculas do sólido têm maior afinidade entre si do que pela água. Quando a energia livre global de interação entre as moléculas de um sólido imerso em água é suficientemente repulsiva, a superfície é considerada hidrofílica.

Os microrganismos podem apresentar variações na hidrofobicidade, em função do crescimento bacteriano e das condições de cultivo. A hidrofobicidade de bactérias Gram-negativas é aumentada quando a quantidade de água no meio é reduzida porque a membrana externa tem grande concentração de lipídios e pouco peptidoglicano. A hidrofobicidade é a propriedade termodinâmica mais facilmente influenciada pela quantidade de água do meio. Já as bactérias Gram-positivas são menos influenciadas pela modificação da umidade do meio, em função da grande concentração de peptidoglicano em suas membranas e menor quantidade de lipídeos. (STREVETT; CHEN, 2003).

Dentre os vários métodos usados para determinar a hidrofobicidade, incluem-se a adesão microbiana a hidrocarbonetos, a cromatografia de interação hidrofóbica, a adesão a superfícies hidrofóbicas, agregação por adição de sais, partição hidrofóbica num sistema aquoso bifásico e a medida do ângulo de contato. No entanto, o único método que permite determinar um valor quantitativo da hidrofobicidade é a medida do ângulo de contato, pois os demais fornecem apenas um valor relativo para comparação entre microrganismos ou superfícies. (CHAVES, 2004).

3.2.1.3 Aspectos microbiológicos e estruturas extracelulares

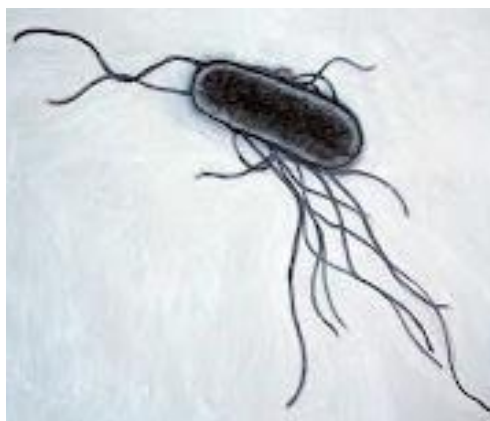
As propriedades da superfície da parede celular bacteriana têm um papel importante na adesão, na fase inicial das infecções bacterianas e na formação de biofilmes. Por serem sistemas vivos, as bactérias podem mudar a composição da sua superfície durante a fase de crescimento ou em função de mudanças de composição do meio. (UBBINK & ZAMMARETTI, 2007). Essas mudanças, conseqüentemente, refletem nas suas propriedades físico-químicas.

Além disso, características bacterianas, como carga superficial, hidrofobicidade e apêndices celulares podem aumentar a capacidade de adesão. (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987).

A termodinâmica da superfície microbiana é uma consequência das características físico-químicas dessa superfície que é controlada por componentes macromoleculares, por exemplo, lipopolissacarídeos, proteínas e exopolímeros que variam em quantidade com as condições de crescimento de estirpe para estirpe. (STREVETT & CHEN, 2003).

Algumas estruturas extracelulares, conhecidas como apêndices celulares, podem facilitar a adesão das bactérias às superfícies. Quando a bactéria não faz contato direto com a superfície, a adesão é mediada por estes apêndices que são capazes de sobrepor os efeitos da repulsão eletrostática. (DENYER *et al.* 1993). Eles podem variar em tamanho e rigidez e chegam a ter várias vezes a dimensão da célula. (BUSSCHER, 1987). Dentre estas estruturas extracelulares destacam-se i) os flagelos, que são estruturas responsáveis pela motilidade das bactérias e medeiam a adesão irreversível que é estabelecida por pontes poliméricas (Figura 5); ii) polímeros extracelulares, que correspondem às substâncias excretadas por muitas bactérias para o ambiente, sendo sua produção associada à adesão irreversível de bactérias a superfícies de adesão por pontes poliméricas; e iii) fímbrias que são apêndices que não estão associados à motilidade das bactérias, no entanto, são responsáveis pela capacidade de adesão das bactérias a outras bactérias, a células animais ou vegetais ou a partículas sólidas. (CHAVES, 2004).

Figura 5. *Escherichia coli* e seus flagelos



Fonte: Nano creative | Science source | Science Photo Library

3.2.1.4 Rugosidade e microtopografia

A rugosidade é um fator importante na formação de biofilmes porque a maioria das superfícies em que ocorrem a deposição de microrganismos possui

irregularidades. A rugosidade de uma superfície pode aumentar a retenção de microrganismos, pois representam locais de abrigo menos influenciados pelas forças do fluido. O efeito da rugosidade da superfície influencia para que ocorra a adesão da primeira camada de microrganismos tendo menor influência quando uma superfície de adesão já tem biofilme formado. (MACHADO, 2005).

O aumento do grau de adesão associado à rugosidade da superfície atribui-se à proteção das células no interior das irregularidades da superfície e das forças de cisalhamento, o que permite a adesão irreversível seja estabelecida mais facilmente, sendo, por isso, locais preferenciais para a colonização inicial. Além disso, as irregularidades da superfície contribuem para o aumento na área superficial disponível para a adesão. (QUIRYNEN *et al.* 1994).

Superfícies utilizadas em indústrias e que entram em contato com os alimentos apresentam diferentes microtopografias de superfície, e podem apresentar fissuras, microfissuras ou fendas com tamanho suficiente para alojar microrganismos, principalmente bactérias. A ocorrência destas imperfeições origina regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência de procedimentos de higienização e favorece o crescimento microbiano e o desenvolvimento de microrganismos. (BOWER *et al.* 1996).

Nos Estados Unidos existe um padrão sanitário (US3-A01-07 Associação Internacional Higienistas de Leite, Alimentos e Meio Ambiente, 1990) que especifica que superfícies que entram em contato com alimentos precisam ter grau de polimento nº 4. Um padrão alemão específico para indústria de laticínios determina que a rugosidade da superfície não deve exceder valores superiores a 0,8 μm de rugosidade média (Ra). (DIN 11 480, 1992).

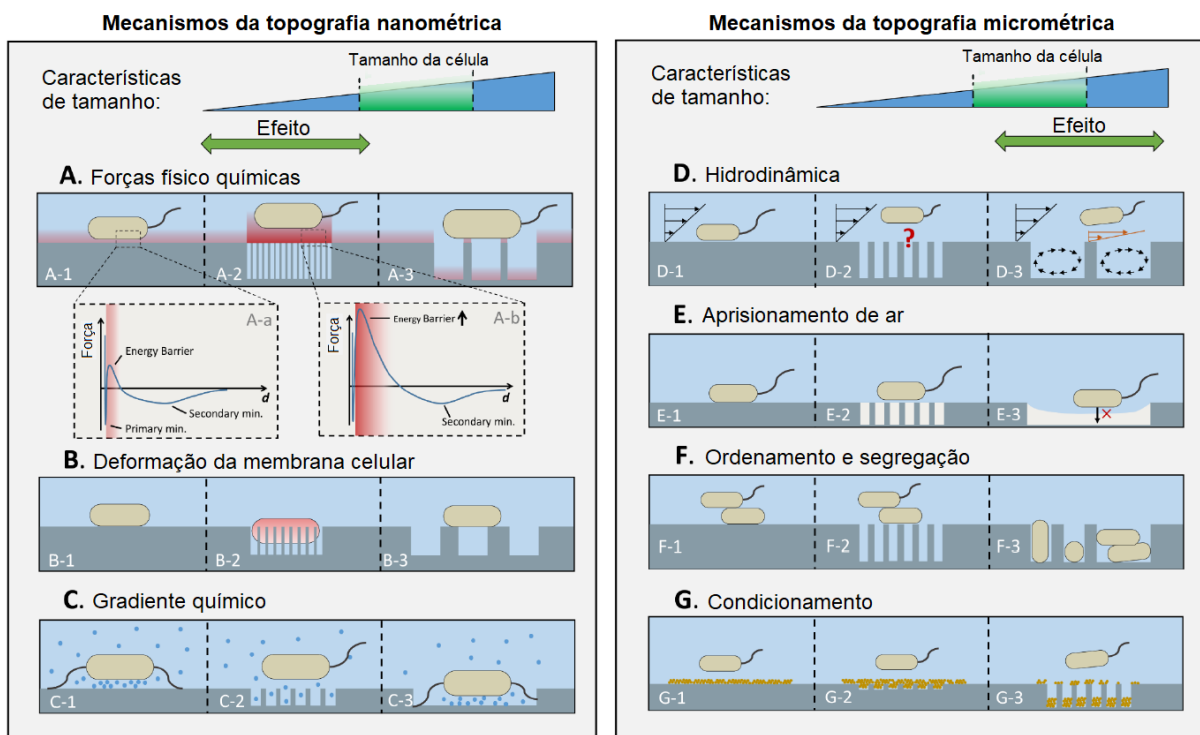
Entretanto, pesquisas recentes também demonstram significativa diminuição da adesão bacteriana em superfícies texturizadas, e atribuem essa redução ao aumento da rugosidade superficial. Existem diversos relatos sobre o papel significativo de várias irregularidades superficiais, comparáveis ao tamanho da bactéria, em sua adesão e funções subsequentes. (PUCKETT *et al.* 2010; IZQUIERDO *et al.* 2015).

Os esforços científicos para elucidar o efeito da topografia na adesão bacteriana muitas vezes levaram a conclusões contraditórias. Algumas das principais razões que podem explicar essas divergências são: (i) o fato de que os parâmetros de rugosidade da superfície considerados na maioria dos estudos não descrevem características topográficas abrangentes das superfícies. Informações topográficas

importantes para compreender o fenômeno são perdidas quando a rugosidade é usada como o único descritor da topografia; (ii) os efeitos topográficos são combinados com efeitos de outros fatores físico-químicos (como por exemplo, química de superfície); (iii) diferentes mecanismos podem exibir efeito de adesão ou inibição bacteriana em diferentes escalas topográficas. (CHENG *et al.* 2019).

Conforme elucidado com Cheng e colaboradores (2019), de maneira geral, a topografia em escala micrométrica, comparável à das células bacterianas, impacta a fixação via hidrodinâmica, ordenação celular induzida por topografia e aprisionamento de ar, enquanto a topografia nanométrica impacta a fixação por meio da alteração de gradientes químicos, campos de força físico-química e deformação da membrana celular (Figura 6).

Figura 6. Mecanismos de topografias nano e micrométricas



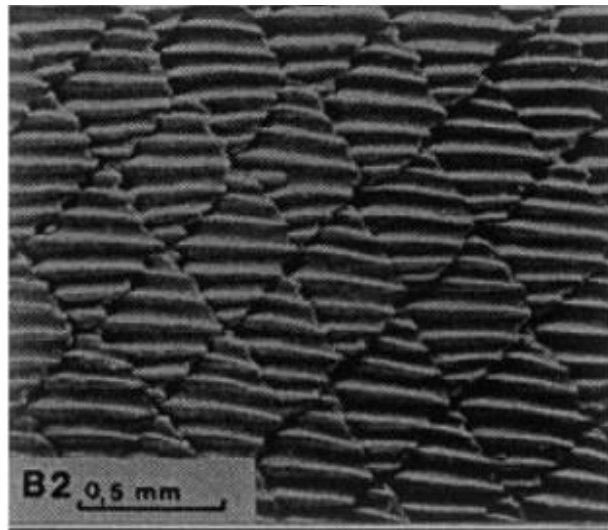
Dentro de cada linha, da esquerda para a direita, são ilustrados os cenários para uma superfície plana, uma superfície com nanoescala e uma superfície com topografia em microescala. Os efeitos anti-adesão das forças físico-químicas (A), deformação da membrana celular (B) e gradiente químico (C), são aumentados por superfícies com características muito menores do que as células bacterianas, enquanto os efeitos anti-adesão da hidrodinâmica (D), aprisionamento de ar (E) e ordenação e segregação de células (F) são aumentadas pelas topografias com tamanhos de características maiores ou comparáveis às células bacterianas. Filmes de condicionamento (G) dificultam as tendências de fixação, alterando a química e a topografia da superfície limpa.

Fonte: Adaptado de CHENG *et al.* 2019.

Cabe destacar também que a escala varia para a espécie em estudo (osteoblastos têm diâmetro de 10 a 50 μm enquanto bactérias têm cerca de 1 μm , por exemplo) e como suas membranas respondem ao estado da superfície do substrato. As bactérias têm um tamanho menor, membrana mais rígida e forma característica mais estável em relação às células eucarióticas. (BAGHERIFARD *et al.* 2015).

Corroborando os estudos recentes que apresentam a rugosidade controlada como uma aliada no controle bacteriano, existem exemplos presentes na natureza de topografias com capacidade de reduzir a adesão bacteriana. Um exemplo clássico é a pele do tubarão (*Carcharhinus galapagensis*), que possui uma microtextura responsável por inibir a colonização bacteriana (Figura 7). Experimentalmente foi observado que a texturização orientada das escamas reúne condições de espaçamento que dificulta a aderência de determinados micro-organismos à superfície. (CARMAN, 2006).

Figura 7. Superfície da pele do tubarão (*Carcharhinus galapagensis*)



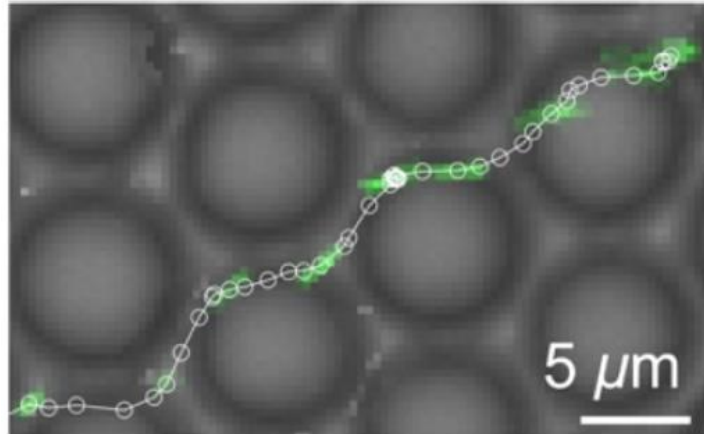
Fonte: BECHERT *et al.* 2000.

Conforme demonstrado por Bagherifard (2015), a alta densidade superficial das nanoirregularidades tende a limitar o número de pontos de ancoragem para as bactérias, reduzindo a área de superfície em contato com sua membrana. Os mesmos estudos realizados por Bagherifard (2015) relataram densidade de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) inversamente proporcional à rugosidade da superfície após 1 dia de cultura.

Um importante estudo publicado em 2018 por Chang e colaboradores, demonstrou que a motilidade da superfície da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é

prejudicada por uma topografia hemisférica cristalina com comprimento de onda na faixa de 2-8 μm . A motilidade foi determinada pela análise de imagens de microscopia de células em meio de crescimento em fluxo mantido a 37°C (Figura 8).

Figura 8. *Time-lapse* da bactéria percorrendo uma superfície texturizada em 120 min



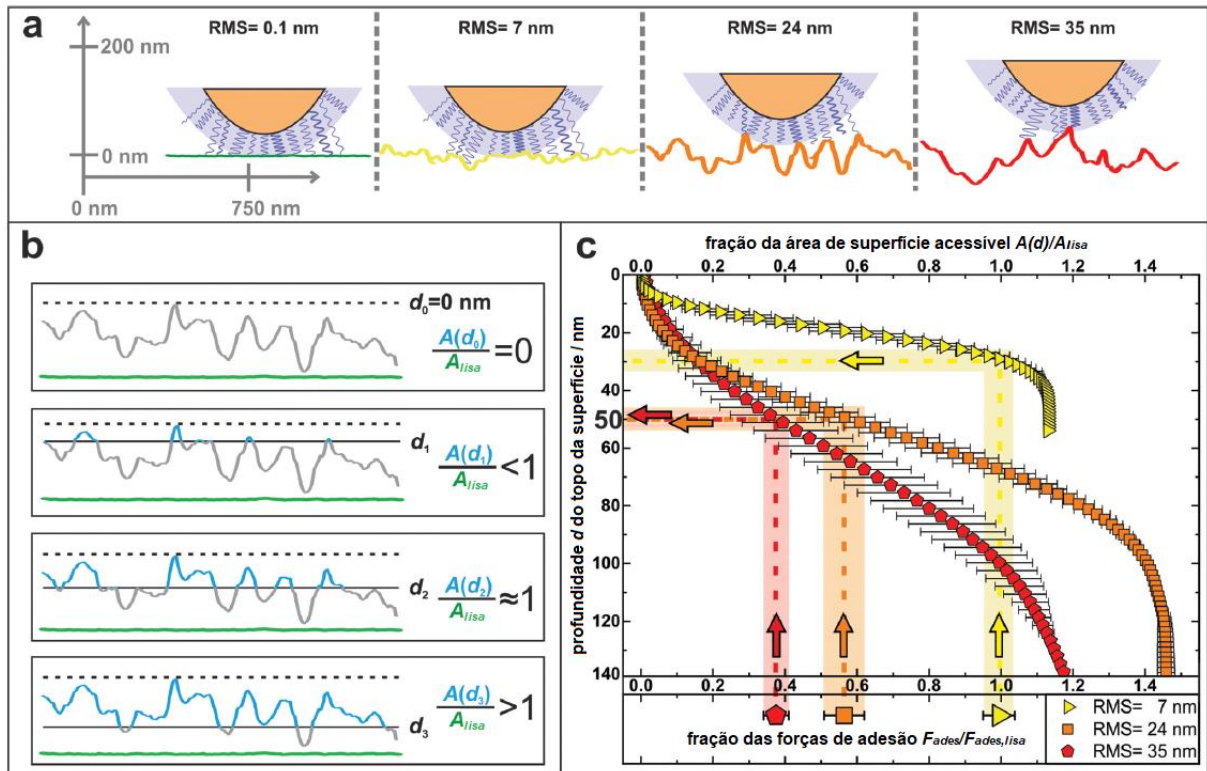
Fonte: CHANG; WEEKS & DUCKER, 2018.

Os resultados mostram que a topografia da superfície pode atuar como uma barreira significativa para a motilidade da superfície, dificultando a exploração da superfície pelas bactérias. Uma vez que essa exploração da superfície faz parte do processo pelo qual as bactérias formam colônias e buscam nutrientes, esses resultados ajudam a elucidar o mecanismo pelo qual a topografia da superfície impede a formação de biofilme.

Outro estudo elaborado por Schumacher e colaboradores (2008) considera o conceito de gradientes de nanoforças para explicar este fenômeno. A hipótese baseia-se na ideia de que gradientes de força são causados por variações de geometria, induzindo gradientes de tensão nas membranas de células no momento do contato inicial com a superfície. Nesse caso, de acordo com o estudo, quando a célula entra em contato com estruturas de diferentes geometrias, há uma tendência de se mover, buscando aderência em outra área.

Na pesquisa conduzida por Spengler e colaboradores (2019), a força de adesão bacteriana de *S. aureus* em superfícies nanoestruturadas foi quantificada por morfometria de substrato. Nesse estudo, a força necessária para destacar a célula das superfícies estruturadas foi medida por AFM-SCFS (espectroscopia de força de célula única). Os principais resultados obtidos pelo estudo estão apresentados esquematicamente na Figura 9.

Figura 9. Medida da adesão bacteriana em diferentes superfícies



(a) Esboço para ilustrar a adesão de *S. aureus* mediada por amarração macromolecular em diferentes superfícies nanoestruturadas: quanto maiores as estruturas da superfície, menor é o número de macromoléculas que são capazes de atingir o substrato. Todas as superfícies são representadas por linhas de varredura AFM reais.

(b) Explicação visual dos dados mostrados na parte c: área de superfície acessível (linhas azuis) de um substrato nanoestruturado em comparação com a área de superfície de um substrato liso (linhas verdes) para quatro valores de profundidade exemplares d_0 - d_3 .

(c) Profundidade d do topo da superfície e a fração correspondente da área de superfície acessível de todos os substratos nanoestruturados em comparação com a área de superfície do substrato liso.

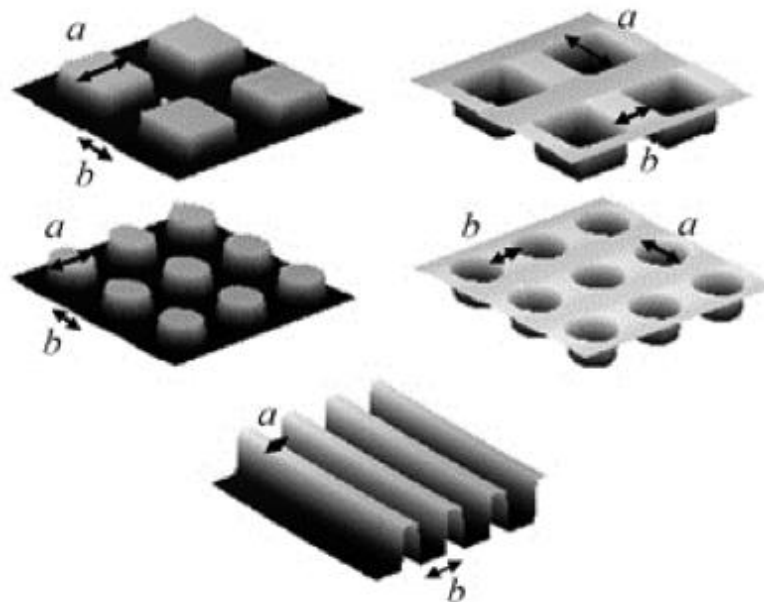
Fonte: Adaptado de SPENGLER *et al.* 2019.

As Figuras 9a e 9c mostram que na superfície com rugosidade RMS de 7 nm, após cerca de 30 nm do topo, a área de superfície acessível já está em 100% e todas as macromoléculas da parede celular (com um comprimento médio de amarração de 50 nm) responsáveis pela adesão podem atingir a superfície e, portanto, a força adesiva é a mesma que na superfície lisa. Algumas células chegam a apresentar uma adesão mais forte do que na superfície lisa, o que pode ser explicado, além de flutuações estatísticas, pelo fato da área total da superfície do substrato nanoestruturado ser - para distâncias do topo superiores a 30 nm - maior do que na superfície lisa. Assim, as macromoléculas da parede celular com comprimentos de amarração de 50 nm podem encontrar ainda mais locais de ligação, resultando em uma adesão mais forte. Para as superfícies com rugosidade RMS de 24 nm e 35 nm, as proporções das áreas de superfície que correspondem à adesão reduzida são

acessíveis em uma profundidade de 45–55 nm. Esta profundidade corresponde ao comprimento de amarração do *S. aureus* (50 nm), apoiando a hipótese de que a razão para forças de adesão reduzidas é causada principalmente pela área de superfície acessível reduzida.

No estudo conduzido por Costa e colaboradores (2014) a influência da topografia da superfície na adesão bacteriana foi avaliada usando uma variedade de padrões de superfície microtopográficos espacialmente organizados gerados em polidimetilsiloxano (PDMS) e três cepas bacterianas não relacionadas (Figura 10).

Figura 10. Características topográficas dos diferentes padrões de superfície testados



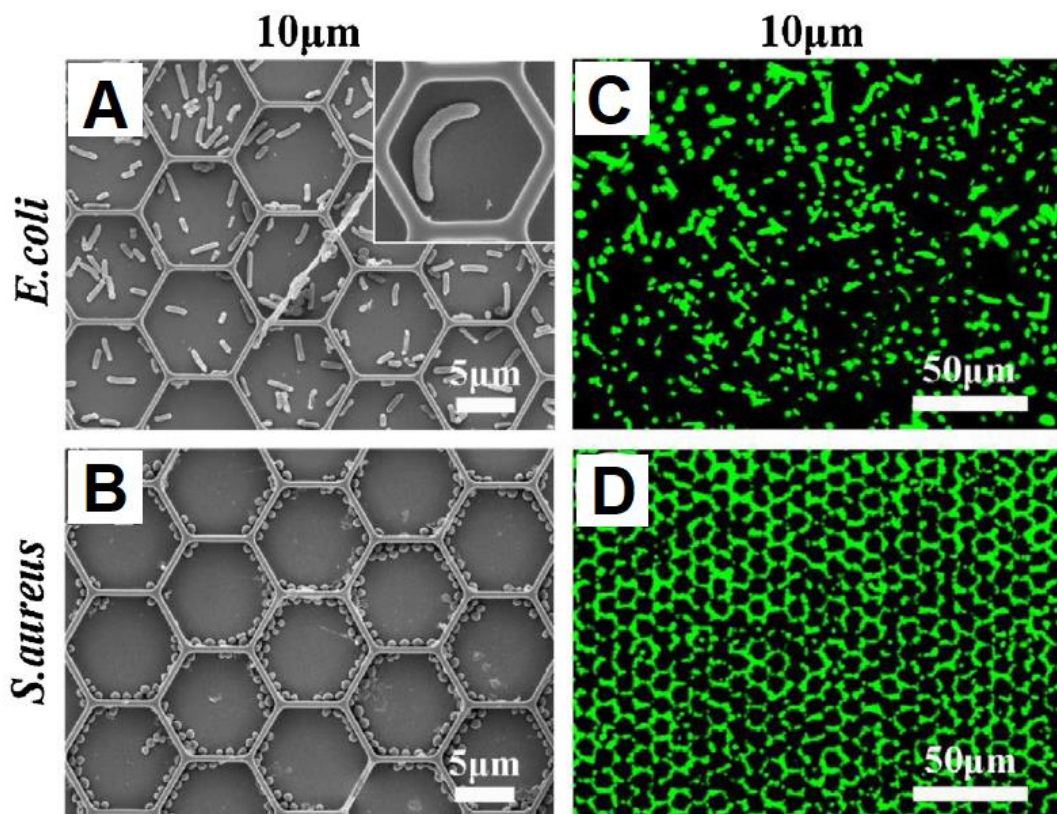
Fonte: COSTA *et al.* 2014.

Os resultados indicaram que as células bacterianas escolhem de maneira seletiva o local de superfície mais energeticamente favorável para se estabelecer. Essa adesão seletiva depende do tamanho e da forma das células em relação às dimensões das características topográficas da superfície e da hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície. Nesse estudo, foi observado que as células optaram por locais em que foi possível estabelecer contato simultâneo com o piso inferior e a área lateral exposta, tendo sua área de contato com a superfície maximizada. Verificou-se também que todas as topografias investigadas provocaram redução significativa na adesão bacteriana (30-45%) em relação às amostras de controle lisas, independentemente da hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície,

tanto em células Gram-positivas quanto Gram-negativas, com formato esférico ou bastonete, ditado apenas pela topografia de superfície.

Nos estudos realizados por Yang e colaboradores (2015), superfícies padronizadas semelhantes a favos de mel (*honeycomb*) em microescala (0,5 a 10 μm) foram avaliados frente às cepas de *E. coli* e *S. aureus*. A análise quantitativa da cobertura da superfície bacteriana mostrou que os padrões de 1 a 10 μm inibiram o crescimento bacteriano e retardaram a colonização das células de *E. coli* e *S. aureus* em comparação com a superfície plana. Os resultados experimentais sugerem que dois fatores principais contribuem para a natureza antibacteriana das estruturas avaliadas: a indisponibilidade de locais de adesão energeticamente favoráveis e os confinamentos físicos (Figura 11). Além disso, observou-se que células de *E. coli* mostraram uma distribuição relativamente aleatória dentro do poro (Figura 11A), enquanto as células de *S. aureus* predominantemente aderiram ao longo das paredes laterais dos padrões dentro do poro (Figura 11B). Isso ajuda a indicar que a maximização da área de contato não é o único motivo que controla a adesão seletiva das bactérias.

Figura 11. Adesão seletiva das células bacterianas nas plataformas *honeycomb*

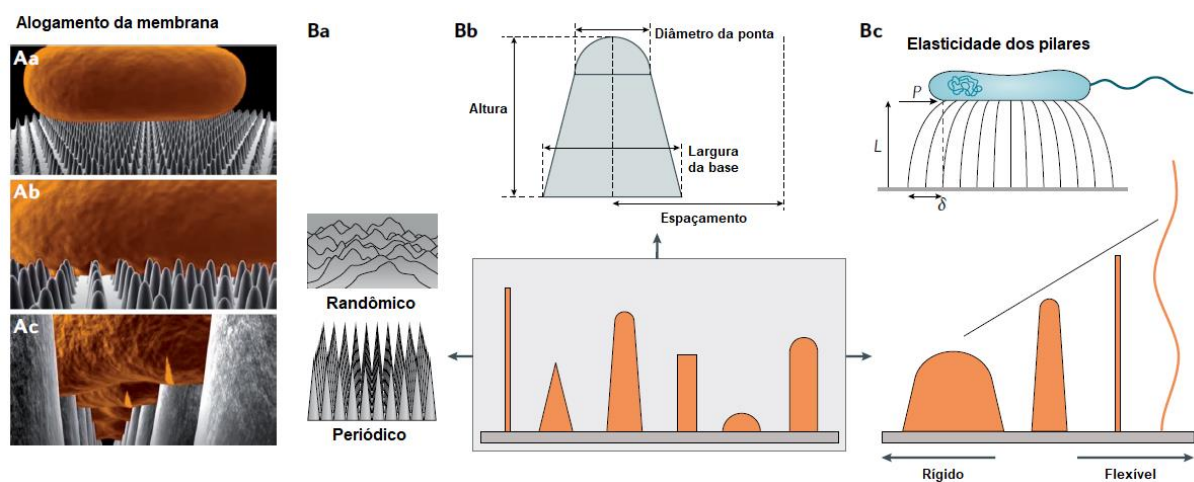


Fonte: Adaptado de YANG *et al.* 2015.

O artigo de revisão publicado em 2021 por Linklater e colaboradores demonstra que o desenvolvimento de novas superfícies nanoestruturadas antibacterianas apresenta perspectivas muito promissoras. Fica demonstrado que as interações físico-mecânicas entre as superfícies nanoestruturadas e as bactérias levam à morte bacteriana ou à inibição da fixação bacteriana e subsequente formação de biofilme.

O artigo elucida a ação mecanobactericida das superfícies nanoestruturadas associadas a uma superfície composta por nanopilares que induzem o estiramento e a ruptura da membrana bacteriana (Figuras 12Aa, 12Ab e 12Ac). Essa ação pode ser descrita por um modelo biofísico recente que ilustra a ruptura da célula bacteriana pela suspensão contínua da membrana da célula bacteriana no substrato nanopadrão, levando ao alongamento além do limite elástico da membrana. Resumidamente, a célula bacteriana entra em contato com a superfície e se adsorve às saliências da superfície, esticando a membrana celular. A adsorção contínua da membrana leva ao seu alongamento até que ocorra a ruptura (lise celular).

Figura 12. Ação mecanobactericida das superfícies nanoestruturadas



A – Alongamento da membrana. B – Diferentes nanopadrões

Fonte: Adaptado de LINKLATER *et al.* 2021.

Entretanto, há uma ampla variedade de nanopadrões que podem induzir a morte celular bacteriana de acordo com o mecanismo mecanobactericida descrito na parte A. Os diferentes padrões podem ser arranjos periódicos ou randômicos/aleatórios (Figura 12Ba) e podem ser caracterizados de acordo com a altura, diâmetro da ponta, largura de base e espaçamento (Figura 12Bb). A tensão imposta na membrana celular bacteriana por um nanopadrão específico é um resultado direto da geometria do pilar e da força de adesão entre a membrana celular e a superfície. Em

alguns casos, um parâmetro adicional de superfície pode ser considerado, que é a flexibilidade do pilar (Figura 12Bc).

Outra importante constatação que o artigo apresenta é a de que a influência da rugosidade da superfície na adesão bacteriana é específica para as espécies bacterianas. Por exemplo, *S. aureus* Gram-positivo pode colonizar superfícies metálicas que exibem rugosidade abaixo de 0,5 nm, enquanto as células bacterianas de *P. aeruginosa* são incapazes de colonizar as chamadas superfícies nano-lisas (rugosidade superficial média abaixo de 1 nm) (TROUNG *et al.* 2015). Por outro lado, superfícies cerâmicas nano lisas reduziram a retenção de *S. aureus* em 98% (LU *et al.* 2020). Portanto, diversas espécies de bactérias podem exibir vários graus de fixação às superfícies, dependendo da extensão da rugosidade da superfície, da química da superfície e das respectivas características da superfície celular. Essas descobertas sugerem que há uma faixa intermediária de rugosidade em nanoescala que pode ser usada para reduzir a adesão bacteriana.

A partir dos diversos estudos recentes conduzidos, está bem estabelecido que a interação de células bacterianas com as superfícies dos materiais é muito influenciada pela topografia de superfície. No entanto, como os impactos da topografia no nível de célula individual afetam aglomerados multicelulares e biofilmes está apenas começando a ser compreendido.

Outra questão que precisa de mais aprofundamento, é a capacidade de sustentar a eficácia dos padrões nano e micrométricos por longos períodos, uma vez que vários fatores ambientais (por exemplo, solo ou acúmulo de um filme de condicionamento) e biológicos (por exemplo, produção de EPS, interações célula-célula) irão lenta, mas seguramente, mascarar as topografias eficazes e, eventualmente, modificar suas propriedades superficiais.

3.2.2 Bactérias envolvidas

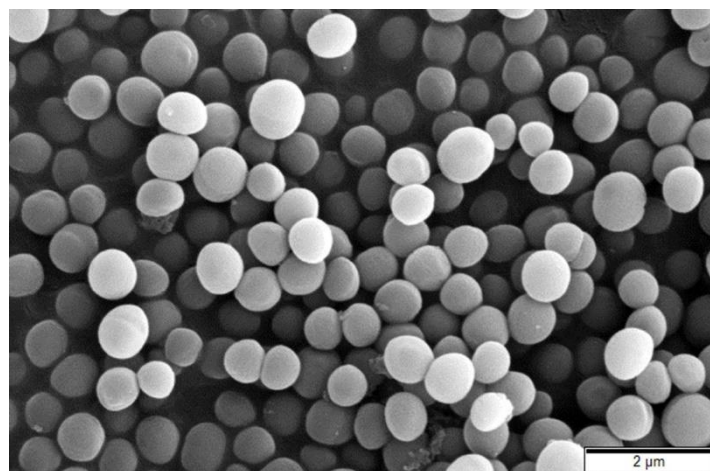
Biofilmes podem envolver apenas uma ou diferentes espécies microbianas. No caso de uma infecção multiespécie, algumas espécies apenas desempenham o papel de favorecer a virulência e a organização estrutural do biofilme, protegendo e permitindo a sobrevivência das demais espécies envolvidas que participam ativamente da infecção. (BURMOLLE *et al.* 2010).

Os patógenos formadores de biofilmes mais comumente encontrados em infecções humanas dividem-se em bactérias Gram positivas e Gram negativas. Entre as Gram positivas destacam-se *Staphylococcus coagulase negativo* e *Staphylococcus aureus*. Esse último microrganismo, é capaz de invadir e sobreviver dentro de células fagocíticas e driblar o sistema imunológico do hospedeiro, sendo o principal causador de infecções, associadas a implantes biomédicos, com crescente importância na medicina moderna. (UÇKAY *et al.* 2009). Dentre as Gram negativas estão *Escherichia coli* e *Salmonella*, responsáveis por grande parte das infecções gastrointestinais; e as *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cenocepacia*, capazes de acarretar e agravar infecções respiratórias em pacientes com fibrose cística. (NORDMANN; CORNAGLIA, 2012).

3.2.2.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e possui 47 espécies e 71 subespécies (EUZÉBY, 2010; DSMZ, 2012), das quais 18 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. (HOLT, 1994; GILLASPY; IANDOLO, 2009). Conforme mostrado na Figura 13, compreendem cocos dispostos em arranjo característico em formato de cachos de uva, são Gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm , anaeróbios facultativos, imóveis e não formadores de esporos. (LANCETTE; BENNETT, 2001).

Figura 13. *Staphylococcus aureus*



Fonte: MURTEY & RAMASAMY, 2016.

S. aureus são capazes de crescer sob temperaturas de até 6,7°C. Em geral, o crescimento ocorre na faixa de 7°C a 47,8°C, e as enterotoxinas são produzidas entre

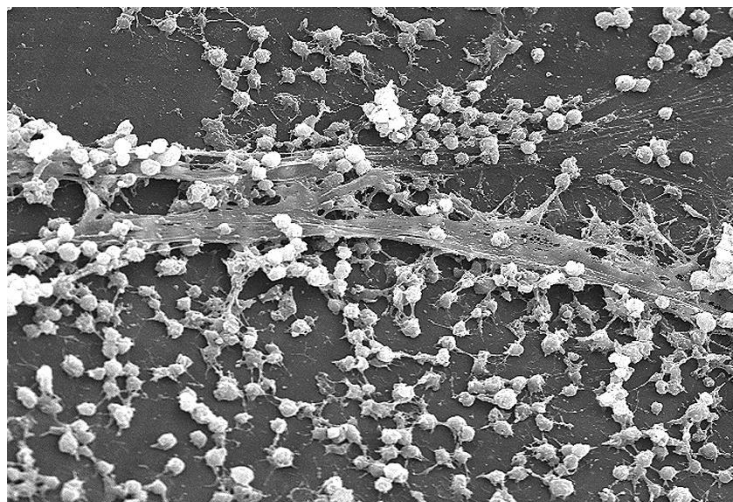
10°C e 46°C. A temperatura ótima para produção de enterotoxinas fica entre 40°C e 45°C. As temperaturas mínimas e máximas de crescimento e produção de toxinas assumem condições ótimas diferentes de acordo com outros parâmetros, como concentração de sais, atividade de água e pH. Uma característica importante das enterotoxinas é sua termoestabilidade (100°C/30 minutos), que lhes confere resistência a tratamentos térmicos, como a pasteurização. (JAY, 2005).

Nos Estados Unidos, *S. aureus* encontra-se entre os agentes etiológicos mais custosos aos cofres públicos, ao lado de *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Os gastos anuais estão estimados em cerca de 163 milhões de dólares. (PRODUCE SAFETY PROJECT, 2010).

No Brasil, sabe-se que o patógeno está relacionado a 20% dos surtos alimentares registrados no país nos últimos anos (BRASIL, 2013). No estado de São Paulo, de acordo com dados do Centro de Vigilância Epidemiológica em Saúde, no período compreendido entre 2000 e 2012, ocorreram 99 surtos de doenças transmitidas por alimentos que apresentaram como agente etiológico *S. aureus*, envolvendo 2.693 pessoas. (SÃO PAULO, 2014).

Além da produção de enterotoxinas, uma característica importante de *S. aureus* é a sua capacidade de formar biofilmes (Figura 14), tanto em superfícies biológicas quanto inertes.

Figura 14. Formação de biofilme por cepas de *Staphylococcus aureus*



Fonte: DONLAN, 2002.

Em muitos casos clínicos, a resposta imune do hospedeiro contra infecções persistentes é ineficaz, podendo levar a um quadro de doença crônica. (ARCHER *et al.* 2011). Além disso, estafilococos em biofilmes demonstram elevada resistência a

antimicrobianos, o que pode comprometer ainda mais o tratamento e seu controle. (MATHUR *et al.* 2005).

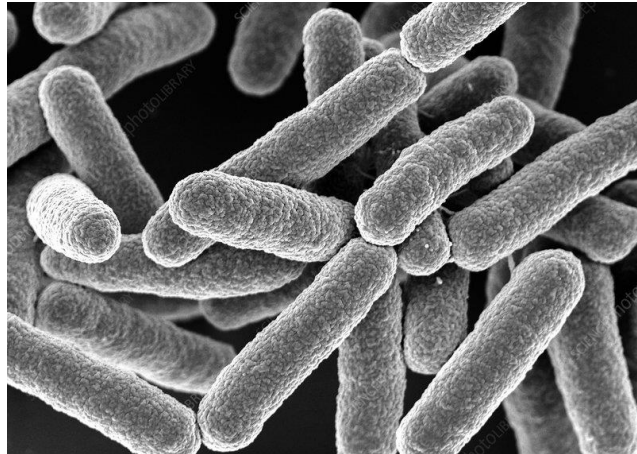
Além das implicações em Saúde Pública pela disseminação de patógenos via alimentos, biofilmes podem reduzir a vida útil de equipamentos, causando perdas econômicas significativas. Somam-se a isso os problemas decorrentes do aumento da resistência bacteriana a sanificantes, o que agrava o problema de sua ocorrência. (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2013).

No caso de *S. aureus*, a carga elétrica dos ácidos teicóicos presentes na superfície exerce um importante papel nas etapas iniciais da formação de biofilme, especificamente no momento da adesão da bactéria à superfície. Alterações induzidas na carga elétrica negativa da parede celular revelaram um aumento das forças de repulsão entre a bactéria e a superfície, impedindo a aderência bacteriana a superfícies como vidro ou poliestireno. Dessa maneira, a constituição dos ácidos teicóicos em *S. aureus* exerce um papel fundamental na expressão de um fenótipo positivo para a produção de biofilmes. (GROSS *et al.* 2001; FITZPATRICK *et al.* 2005).

3.2.2.2 *Escherichia coli*

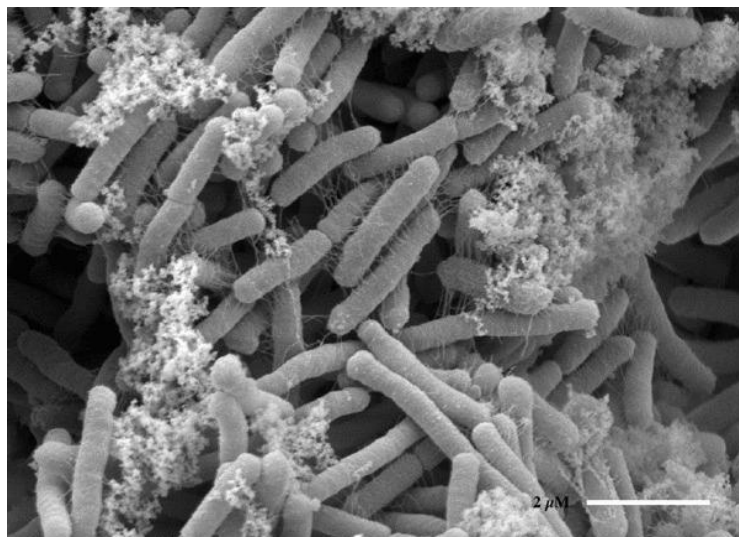
A *Escherichia coli* é um micro-organismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, presente no trato gastrintestinal dos animais e dos seres humanos, fazendo parte da microbiota intestinal. (NATARO & KAPER, 1998). Em pacientes imunossuprimidos ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas, essas bactérias podem causar doenças infecciosas como a gastroenterite, podendo ocorrer disseminação e colonização em outros nichos, incluindo sangue, sistema nervoso central e trato urinário, resultando em doenças graves. (MIRANDA *et al.* 2008; YAGUCHI *et al.* 2007).

São bastonetes Gram-negativos (Figura 15), não esporulados, anaeróbios facultativos, crescem bem em meio de cultura sintético contendo nutrientes simples e fermentam açúcares. No entanto, algumas linhagens desse micro-organismo podem ser patogênicas e causar doenças. A adesão da bactéria à célula do hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e infecção. (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

Figura 15. *Escherichia coli*

Fonte: Nano creative | Science source | Science Photo Library

Atualmente, *E. coli* é considerado o exemplo mais significativo de bactéria Gram-negativa relacionada com diversas doenças devido aos seus mecanismos de patogenicidade que são determinados pela habilidade de colonização do hospedeiro, potencial de penetração em superfícies mucosas, invasão e multiplicação nos tecidos além da capacidade de inibir os mecanismos de defesa locais ou sistêmicos do hospedeiro e formação de biofilmes (Figura 16). (NAVEEN; MATHAI, 2005). *E. coli* é a segunda fonte mais comum de infecção cujos pacientes requerem hospitalização (17,3%), ficando atrás somente de *S. aureus* (18,8%). (MELLATA *et al.* 2003).

Figura 16. Formação de biofilme por cepas de *Escherichia coli*

Fonte: TOUSSAINT; GHICO; SALMOND, 2003.

O aparecimento de cepas de *E. coli* multirresistentes tem emergido rapidamente devido a sua grande distribuição ambiental e propensão a abrigar elementos genéticos móveis, em especial os plasmídeos. (SHERLEY; GORDON;

COLLIGNON, 2004). Essa resistência tem ocorrido, principalmente, em relação a novos compostos como fluoroquinolonas e certas cefalosporinas. A maioria dessas estirpes resistentes é adquirida em áreas hospitalares. (COLLIGNON, 2009).

O desenvolvimento de novos antibióticos deve ser continuado, entretanto, a experiência das décadas passadas tem mostrado que novos antibióticos podem ser efetivos somente por um período de tempo restrito, ou seja, a resistência microbiana será desenvolvida cedo ou tarde para cada nova droga. Isso torna difícil o controle e tratamento das infecções e realça a necessidade de estratégias eficazes para o seu controle e prevenção. (COLLIGNON, 2009).

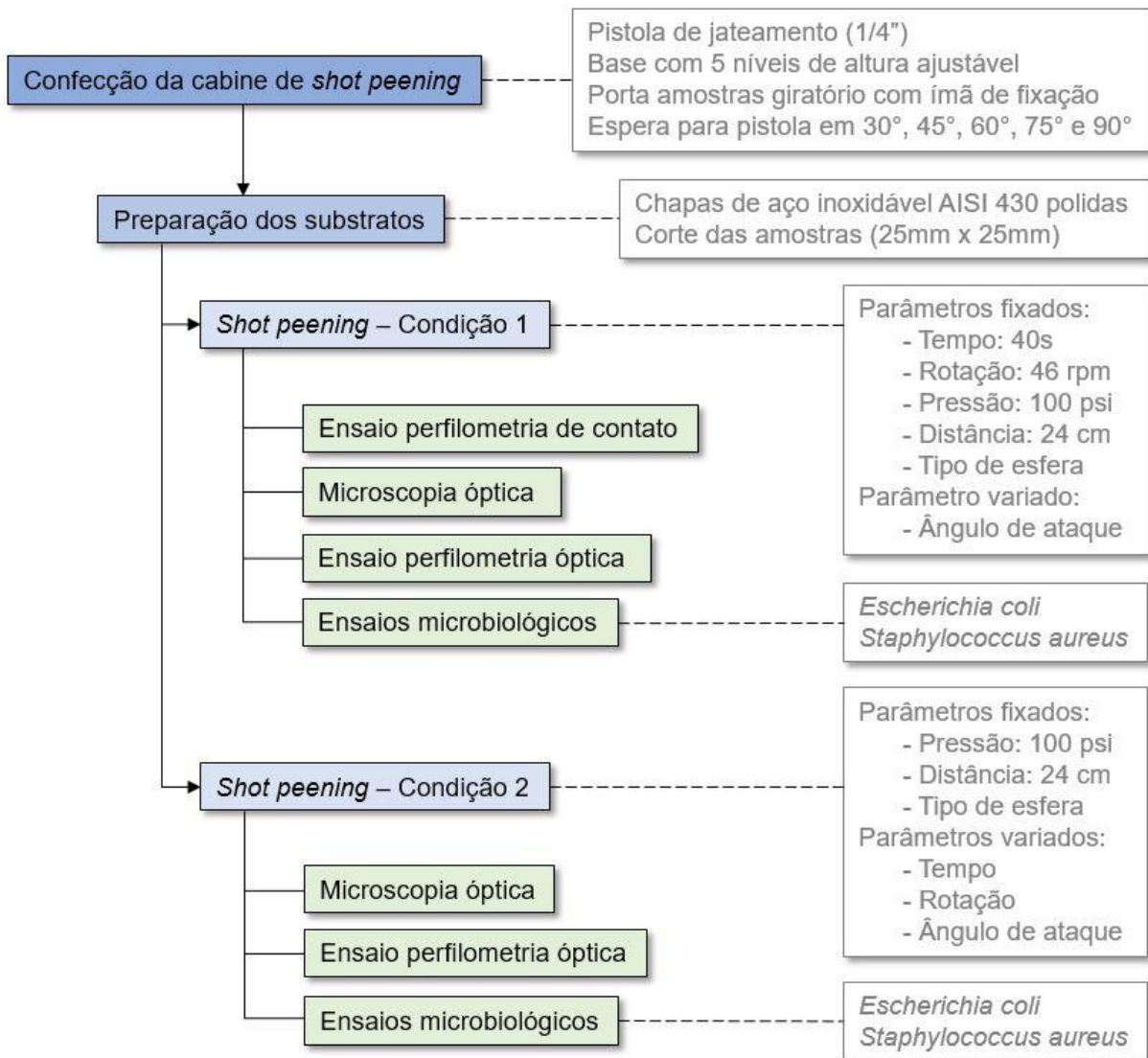
4 METODOLOGIA

“Uma teoria não é o conhecimento; ela permite o conhecimento. Uma teoria não é a chegada; é a possibilidade de uma partida. Uma teoria não é uma solução; é a possibilidade de tratar um problema. Em outras palavras, uma teoria só realiza seu papel cognitivo, só ganha vida com o pleno emprego da atividade mental do sujeito. É essa intervenção do sujeito que dá ao termo ‘método’ seu papel indispensável.”

(Edgar Morin)

Este trabalho foi composto de etapas práticas e uma constante revisão bibliográfica em artigos científicos, sites especializados, livros, dissertações e teses. As etapas da parte prática estão apresentadas na Figura 17 e detalhadas a seguir.

Figura 17. Fluxograma da metodologia

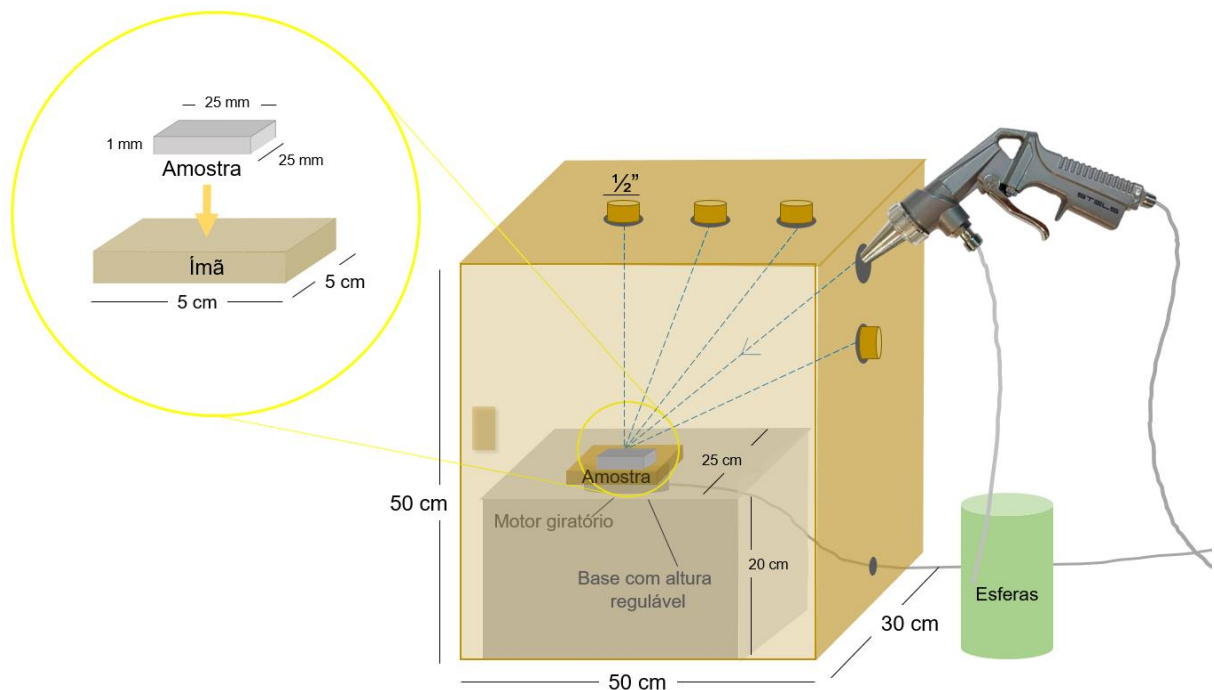


Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

4.1 Confeção da cabine de *shot peening*

Para que os testes fossem viabilizados, uma cabine de *shot peening* foi projetada, conforme apresentado na Figura 18. Foram consideradas esperas para uma pistola de $\frac{1}{4}$ " em cinco diferentes ângulos (30° , 45° , 60° , 75° e 90°). Para que a distância fosse mantida constantemente em 24cm, independentemente do ângulo de jateamento aplicado, foram considerados diferentes níveis para encaixe e ajuste da base. A base foi prevista de modo a conter um porta amostra com ímã de fixação e motor, para promover a rotação das amostras durante o *shot peening*.

Figura 18. Projeto da cabine de *shot peening*

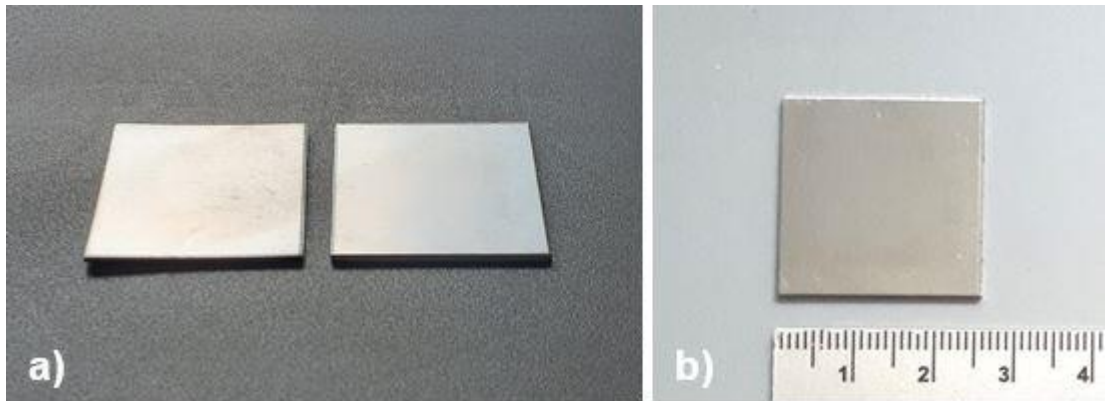


Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

4.2 Substrato

Foram utilizadas amostras de aço inoxidável AISI 430 polido, com dimensões de 25 mm x 25 mm x 1 mm para avaliar a influência da texturização superficial na adesão e proliferação de células Gram-negativas e Gram-positivas após 24 horas de contato. Os substratos preparados estão apresentados nas Figuras 19a e 19b.

Figura 19. Substratos polidos



Fonte: Registrado pela autora, 2021.

4.3 Shot peening

O processo de *shot peening* foi realizado nas dependências da Carpintaria Estância Ltda, com aplicação dos parâmetros descritos na Tabela 1. Os ensaios foram realizados em dois diferentes momentos e condições.

Para obtenção das amostras na Condição 1, foram fixados o tipo de granalha, os parâmetros pressão em 100 psi, distância em 240 mm e tempo em 40s. O tempo de exposição foi definido como o mínimo necessário para uma total cobertura do substrato ao tratamento. O tipo de granalha escolhido foi a granalha esférica de aço com granulometria de 300 μ m a 500 μ m do tipo S-110.

O parâmetro ângulo de jateamento foi variado, uma vez que ele interfere na intensidade do tratamento e na morfologia da rugosidade gerada na superfície. Foram testados os ângulos de 30°, 45°, 60° e 90°.

Depois da realização de testes iniciais e análise por microscopia óptica, na Condição 2 o parâmetro tempo foi variado de 25s a 120s, conforme necessidade para obtenção de boa cobertura em cada um dos ângulos aplicados. O tempo mínimo necessário para cobertura total do substrato foi monitorado com uso de um microscópio digital. Nas duas condições o ângulo de jateamento foi variado e sua influência foi avaliada. Na condição 2 as amostras não foram submetidas a rotação. Apenas uma das amostras (30°) foi testada em ambas as condições para verificar se alguma alteração significativa seria observada.

Tabela 1. Parâmetros de *shot peening* aplicados para texturização das superfícies

Parâmetro	Condição 1	Condição 2
Ângulos de jateamento	30°, 45°, 60° e 90°	30°, 45°, 60° e 90°
Pressão do ar comprimido	100 psi	100 psi
Distância de aplicação	24 cm	24 cm
Tempo	40s	25s a 120s
Rotação (rpm)	46	0 e 46
Granalha esférica de aço	S-110 ($\varnothing= 300\mu\text{m}$ a $500\mu\text{m}$)	S-110 ($\varnothing= 300\mu\text{m}$ a $500\mu\text{m}$)

Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

Ao todo, considerando as diferentes variações aplicadas, foram obtidas nove condições operacionais de ensaio, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Combinações dos valores de cada variável na realização do *shot peening*

Variáveis	Ensaio								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Ângulos de jateamento	30°	30°	30°	45°	45°	60°	60°	90°	90°
Tempo (s)	40	80	80	40	100	40	120	40	25
Rotação (rpm)	46	46	0	46	0	46	0	46	0

Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

4.4 Caracterização das amostras

Para a caracterização das amostras foram consideradas as seguintes análises:

- Cobertura da superfície por microscopia óptica;
- Rugosidade superficial 2D por perfilômetro de contato;
- Rugosidade superficial 3D por perfilômetro óptico; e
- Adesão e proliferação bacteriana por contagem de UFC/mL após exposição das amostras a 24 horas de contato com cepas de *E. coli* e *S. aureus*.

4.4.1 Microscopia óptica

A avaliação da cobertura das amostras na Condição 1 foi realizada por microscopia óptica, a partir do microscópio ótico Olympus BX51 conectado a um computador para captura de imagens, disponível no Laboratório de Processos

Eletroquímicos de Corrosão da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Eletrocorr/UFRGS).

Para a Condição 2, em que a cobertura foi monitorada ao mesmo tempo em que as amostras eram obtidas, foi utilizado um microscópio digital HAIZ X4, HZ 1600X, acoplado ao computador, nas dependências da Carpintaria Estância.

4.4.2 Rugosidade 2D

A rugosidade 2D das amostras obtidas na Condição 1 foi mensurada utilizando um perfilômetro de contato – Rugosímetro Mitutoyo SJ 401, disponível no Laboratório de Pesquisa em Corrosão da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LAPEC/UFRGS). Cada amostra teve os valores de rugosidade mensurados três vezes em pontos aleatórios, longitudinal e transversalmente.

O método para avaliar a rugosidade superficial tomou como base a norma ABNT NBR ISO 4287:2002 que se refere a medição da rugosidade média “ R_a ” e rugosidade de profundidade média “ R_z ”. Além das medidas, foram obtidos os perfis superficiais de rugosidade utilizando o mesmo equipamento.

Além disso, também foram obtidas medidas e imagens da rugosidade 2D por perfilometria óptica, para as amostras obtidas nas Condições 1 e 2, utilizando-se um perfilômetro da marca Bruker, modelo ContourGT, disponível no Laboratório Multiusuário de Análises de Superfícies da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LAMAS/UFRGS).

4.4.2.1 Perfilômetro de Contato – Rugosímetro

Quando estudada em uma escala suficientemente pequena, todas as superfícies dos sólidos são irregulares, até mesmo uma superfície extremamente polida de um componente de engenharia. Diversos métodos podem ser usados para analisar a topografia de um sólido, alguns envolvem a análise da superfície por meio de microscopia eletrônica ou outro método óptico, enquanto outras empregam o contato de uma ponta fina. (HUTCHINGS, 1992).

Um dos métodos mais usados para avaliar a topografia de uma superfície é por meio de um perfilômetro de contato. Uma ponteira é deslizada ao longo da superfície examinada. A medida que a ponteira desliza, o seu deslocamento vertical é registrado

e posteriormente convertido em um gráfico. Na Figura 20 está apresentado um perfilômetro de contato comumente encontrado para medir rugosidade, conhecido como rugosímetro.

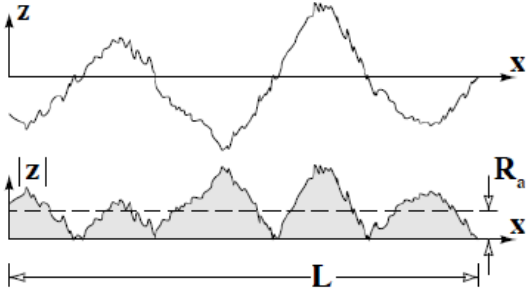
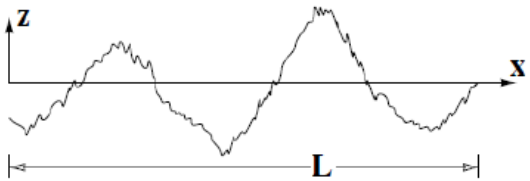
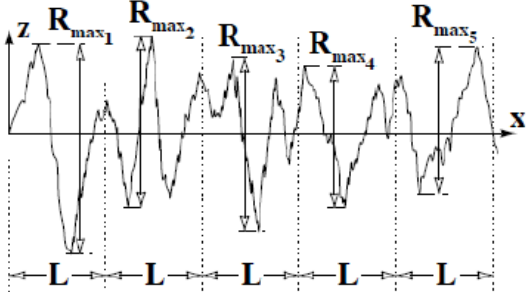
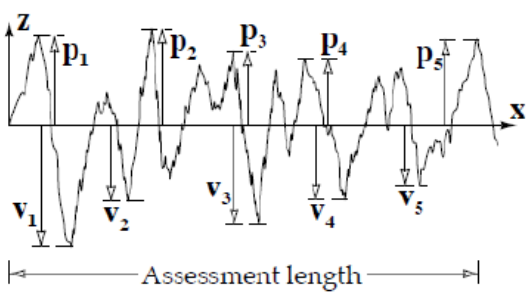
Figura 20. Rugosímetro Mitutoyo SJ 401



Fonte: Color Track, 2020.

Diversas técnicas e parâmetros foram desenvolvidos para caracterizar a topografia de superfícies. As mais conhecidas contemplam parâmetros estatísticos para quantificar um valor de rugosidade. Na maioria das aplicações de engenharia, o parâmetro mais utilizado é o da rugosidade média, R_a . O R_a representa a média dos picos e vales a partir de uma linha média para um dado comprimento analisado. O efeito de um único pico é minimizado no valor final de R_a . Logo, devido à média aplicada no cálculo, uma desvantagem desse parâmetro é que superfícies completamente diferentes podem resultar em valores de R_a idênticos. Além do R_a , também são utilizados os parâmetros de raiz quadrada da rugosidade média R_q , o valor médio da máxima altura entre pico e vale R_t , a média de dez pontos R_z , representados na Figura 21.

Figura 21. Parâmetros bidimensionais de rugosidade

Rugosidade média (R_a ou CLA)	$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L z dx$	
Rugosidade média quadrática (R_q ou RMS)	$R_q = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L z^2 dx}$	
Rugosidade total (R_t)	<p>Maior altura de pico à vale entre cinco períodos subsequentes</p> $R_t = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 R_{max_i}$	
Média de dez pontos (R_z)	<p>Média dos cinco picos mais altos e dos cinco vales mais profundos em um dado comprimento amostral</p> $R_z = \frac{p_1 + \dots + p_5 + v_1 + \dots + v_5}{5}$	

Fonte: STACHOWIAK, 2013.

4.4.3 Rugosidade 3D

As imagens de rugosidade 3D foram obtidas por perfilometria óptica. Foram realizadas utilizando-se um perfilômetro da marca Bruker, modelo ContourGT, disponível no Laboratório Multiusuário de Análises de Superfícies da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LAMAS/UFRGS). Uma vez que o equipamento limita a avaliação à uma área de aproximadamente 1mm², três regiões distintas foram avaliadas, de modo a obter uma amostragem representativa.

4.4.3.1 Perfilômetro óptico

O funcionamento do perfilômetro óptico é baseado em dois feixes de luz, refletidos da superfície examinada e de um plano perfeito de referência, os quais criam franjas que são registradas por fotodiodos conectados a um microprocessador. Pequenos desvios da superfície perfeita de referência causam mudanças no padrão das franjas, que por sua vez alteram a distribuição de alturas da superfície examinada as quais são registradas pelo processador. (HUTCHINGS, 1992). A Figura 22 apresenta um perfilômetro óptico utilizado para analisar a topografia de uma superfície em três dimensões.

Figura 22. Perfilômetro óptico



Fonte: Alta Tec en Lab, 2016.

Em relação ao perfilômetro de contato, o perfilômetro óptico apresenta as seguintes vantagens: i) Capacidade de examinar superfícies muito sensíveis sem danificá-las; ii) Possibilidade de extrair parâmetros bidimensionais em qualquer seção da área analisada; iii) Capacidade de analisar a topografia de uma área desgastada; iv) Capacidade de analisar regiões que a ponteira do perfilômetro de contato não consegue tocar devido a sua dimensão física.

Em contrapartida, a técnica mais antiga ainda é a mais utilizada em ambientes industriais por apresentar as seguintes vantagens: i) Custo mais acessível; ii) Praticidade e facilidade de movimentação para realizar medições em campo; iii) A maioria das normas para quantificar acabamento superficial referem-se a parâmetros

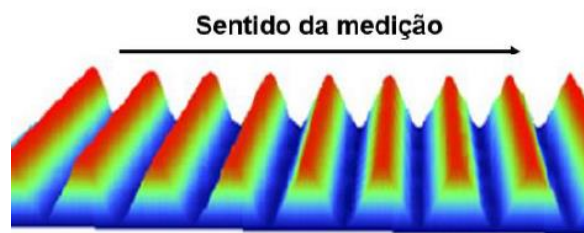
bidimensionais; iv) O método não é sensível à refletância ou coloração da superfície examinada. (DELEANU, 2012).

Os parâmetros tridimensionais mais utilizados são S_a , S_q , S_{sk} , S_{ku} , S_p , S_v e S_z . Os parâmetros a serem analisados dependem da aplicação a qual a superfície analisada é submetida.

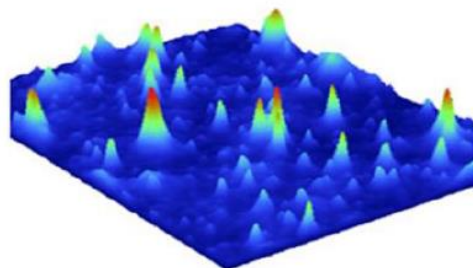
Os parâmetros S_a e S_q são, respectivamente, a rugosidade média e a raiz quadrada da rugosidade média de uma determinada área analisada. Esses parâmetros tridimensionais são análogos aos parâmetros bidimensionais R_a e R_q .

Os valores de S_a e S_q serão idênticos aos valores de R_a e R_q quando uma mesma superfície de textura periódica é analisada, como em um caso de uma superfície intacta após um processo de usinagem, por exemplo. No entanto, quando essa superfície é submetida ao desgaste, os valores dos parâmetros tridimensionais e bidimensionais diferem substancialmente. A Figura 23 ilustra a relação entre os parâmetros S_a e S_q com os parâmetros R_a e R_q para duas condições de superfície.

Figura 23. Superfície com textura periódica (a) e superfície com textura aleatória (b)



(a) Superfície periódica: $S_a = R_a$ e $S_q = R_q$



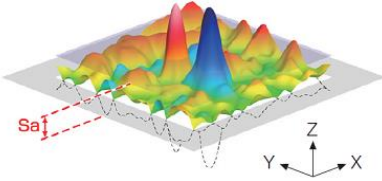
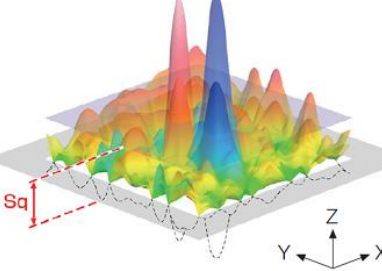
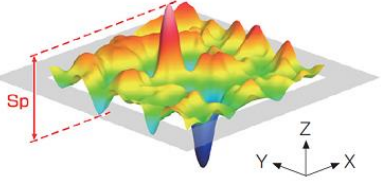
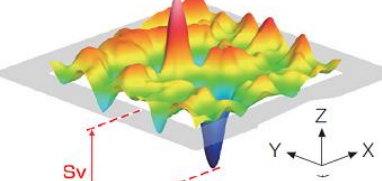
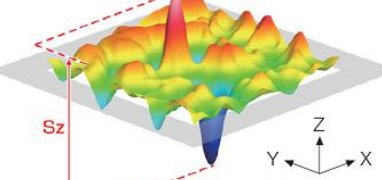
(b) Superfície aleatória: $S_a \neq R_a$ e $S_q \neq R_q$

Fonte: Adaptado de MICHIGAN METROLOGY, LLC, 2014.

A tecnologia utilizada para determinar os parâmetros tridimensionais de rugosidade deriva de métodos ópticos e sem contato mecânico.

A Tabela 3 resume os parâmetros tridimensionais de amplitude mais utilizados para analisar a rugosidade de uma superfície.

Tabela 3. Parâmetros tridimensionais de rugosidade

<p>Rugosidade média (S_a)</p> 	$S_a = \frac{1}{A} \iint_A Z(x,y) dx dy$	<p>Parâmetro incapaz de diferenciar entre pico e vale. Superfícies completamente distintas podem apresentar o mesmo valor de S_a. No caso de superfícies que apresentam uma textura com padrão periódico, o emprego do S_a é recomendável.</p>
<p>Rugosidade media quadrática (S_q)</p> 	$S_q = \sqrt{\frac{1}{A} \iint_A Z^2(x,y) dx dy}$	<p>Similar ao S_a. As aplicações mais comuns para o S_q envolvem algum tipo de superfície óptica.</p>
<p>Assimetria (S_{sk})</p>	$S_{sk} = \frac{1}{S_q^3} \left[\frac{1}{A} \iint_A Z^3(x,y) dx dy \right]$	<p>Avalia o grau de simetria das alturas de uma superfície sobre um plano médio. O sinal de S_{sk} indica predominância de picos ($S_{sk} > 0$) ou vales ($S_{sk} < 0$) da superfície.</p>
<p>Curtose (S_{ku})</p>	$S_{ku} = \frac{1}{S_q^4} \left[\frac{1}{A} \iint_A Z^4(x,y) dx dy \right]$	<p>Avalia a curtose de uma superfície, ou seja, a presença ($S_{ku} > 3,0$) ou ausência ($S_{ku} < 3,0$) de picos ou vales extremos de maneira desordenada na superfície.</p>
<p>Máxima altura de pico (S_p)</p> 	$S_p = \max(Z(x,y))$	<p>Quantifica a altura do pico mais alto. Geralmente é especificado em superfícies utilizadas em contato mecânico com deslizamento.</p>
<p>Máxima profundidade de vale (S_v)</p> 	$S_v = \min(Z(x,y)) $	<p>Quantifica a profundidade do vale mais profundo. É utilizado quando a profundidade do vale é importante para retenção de fluido.</p>
<p>Altura máxima da superfície (S_z)</p> 	$S_z = S_p + S_v$	<p>Representa a diferença entre o pico mais alto e o vale mais profundo. Aplicações típicas de S_z incluem retentores e superfícies após tratamento superficial.</p>

Fonte: Adaptado de OLYMPUS, 2016.

4.4.4 Adesão e proliferação bacteriana

As atividades referentes à adesão e proliferação bacteriana foram conduzidas no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS).

4.4.4.1 Suspensão do microrganismo

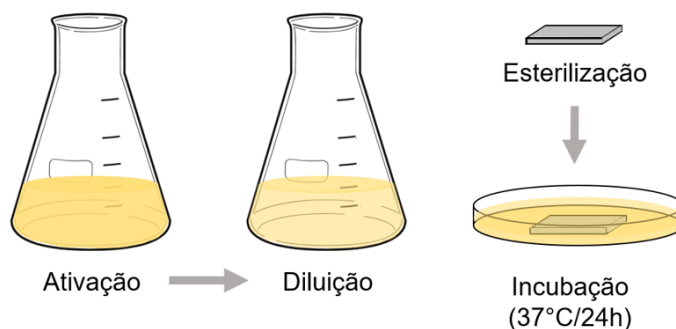
Cepas de *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 9801) foram inoculadas em caldo Luria Bertani (LB) e cultivados a 37°C/24h, em agitador orbital (Tecnal TE-400) a 150 rpm. As bactérias foram quantificadas a 600 nm em espectrofotômetro (NanoDrop 2000C) e diluídas a 0,5 na escala MacFarland. Após isso, foram diluídas para concentração de 10³ UFC/mL em 25 mL de caldo LB.

4.4.4.2 Adesão e proliferação bacteriana nos substratos de aço inoxidável

Antes de cada análise, os substratos foram limpos com detergente e enxaguados com água destilada. Após isso, as amostras foram esterilizadas por exposição a luz ultravioleta por 15 min de cada lado em fluxo laminar (Pachane 400).

As amostras foram imersas em placas de Petri estéreis contendo a suspensão de células vegetativas de forma a obter uma contagem aproximada de 10³ UFC/mL, e foram incubadas a 37°C/24 h em estufa bacteriológica (DeLeo), conforme demonstrado na Figura 24. As contagens de quantidade de células aderidas por cm² foram realizadas após as 24 horas de contato.

Figura 24. Metodologia para teste de adesão e proliferação bacteriana



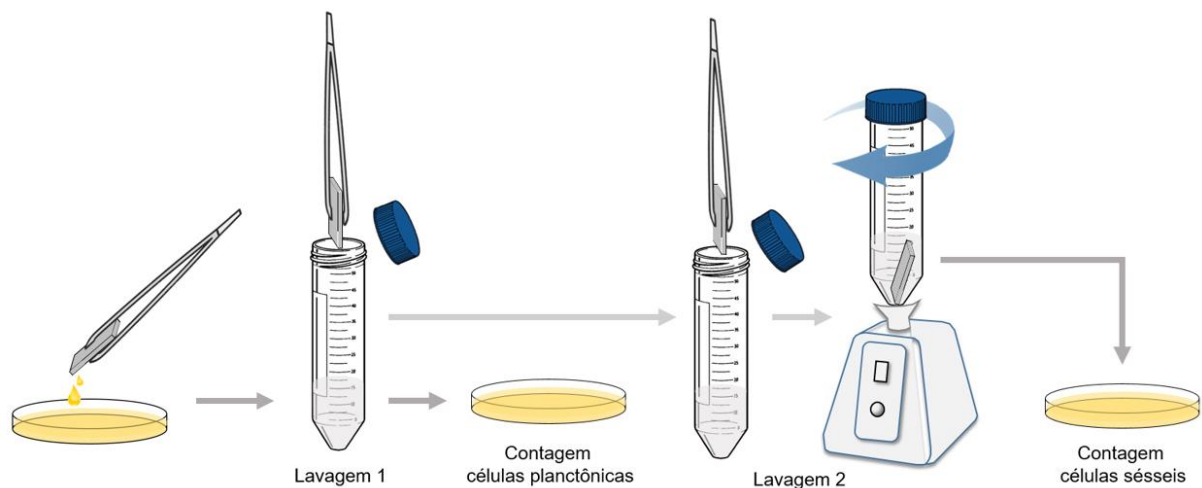
Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

4.4.4.3 Determinação do número de células planctônicas e sésseis

Após o término da incubação, as amostras foram retiradas do caldo nutriente com auxílio de pinça esterilizada e imersas em água peptonada 0,1%, por 1 min, para a remoção das células planctônicas. Depois foram imersas em frascos contendo 10 mL da mesma solução diluente e submetidos ao vórtex (Genie 2), durante 1 minuto para remoção de células sésseis/aderidas.

As soluções de lavagem contendo as células planctônicas e sésseis foram diluídas seriadamente em água peptonada e plaqueadas pelo método de *drop plate* em placas de ágar LB. As placas foram incubadas a 37°C/24h em estufa bacteriológica. A metodologia simplificada para determinação das células planctônicas e sésseis está apresentada na Figura 25. As células viáveis foram calculadas de acordo com as Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL). A significância estatística do modelo foi verificada pelo teste de F e análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnet, com confiança de 95%.

Figura 25. Metodologia para determinação das células planctônicas e sésseis



Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

“Manter a mente aberta é uma exigência essencial do pensamento crítico. Com frequência, falo de abertura radical, porque ficou nítido para mim, depois de anos em espaços acadêmicos, que é fácil demais se apegar ao próprio ponto de vista e protegê-lo, descartando outras perspectivas. Um compromisso radical com a abertura mantém a integridade do processo do pensamento crítico e seu papel essencial na educação. Esse compromisso exige muita coragem e imaginação.”

(bell hooks)

5.1 Confeção da cabine de *shot peening*

A cabine de *shot peening* foi construída majoritariamente em madeira nas dependências da Carpintaria Estância Ltda, conforme previamente projetada. Foram contempladas as esperas para pistola de ¼” em cinco diferentes ângulos (30°, 45°, 60°, 75° e 90°), com os diferentes níveis para encaixe e ajuste da base, mantendo a mesma distância de jateamento para todos os ângulos. A porta da cabine foi construída com vidro temperado, de modo a facilitar a visualização da aplicação do *shot peening* nos substratos. Na base, foi incluído o motor acoplado a um porta amostra com ímã de fixação, para promover a rotação das amostras. Nas Figuras 26a e 26b estão apresentados registros da cabine confeccionada.

Figura 26. Confeção da cabine de *shot peening*



- a) Cabine com visor e espera para pistola em 30°, 45°, 60°, 75° e 90°.
 b) Base com motor giratório e diferentes níveis de altura ajustáveis.

Fonte: Registrado pela autora, 2021.

Nas Figuras 27a e 27b está demonstrado o funcionamento da cabine de *shot peening* com o substrato e a pistola posicionados.

Figura 27. Procedimento de *shot peening* – Ângulo de 30°

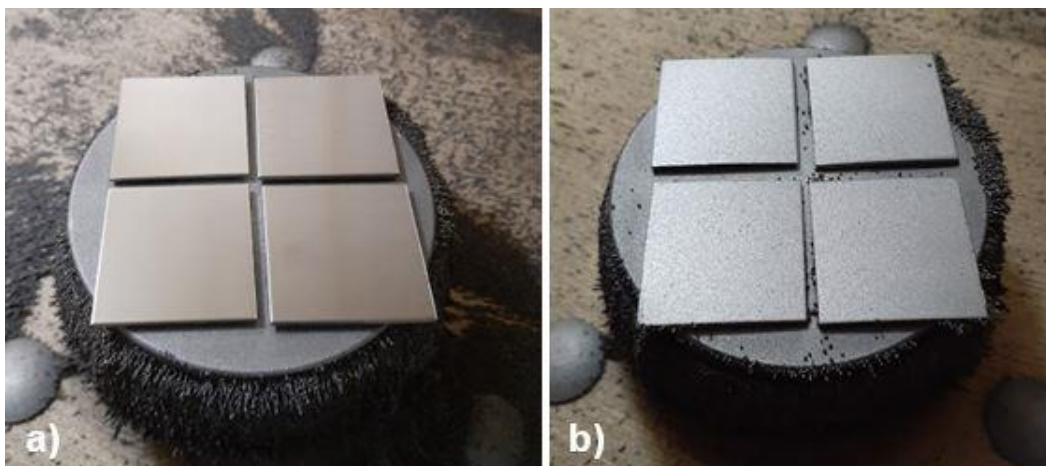


Fonte: Registrado pela autora, 2021.

5.2 Texturização por *Shot peening*

Para realização dos processos de *shot peening*, na Condição 1, o parâmetro tempo foi fixado em 40s. Essa definição de tempo necessário para cobertura se deu à olho nu, pela limitação da ausência de microscópio óptico nas dependências da Carpintaria Estância. Nas Figuras 28a e 28b estão apresentadas as amostras antes e depois do processo de *shot peening*. É possível observar à olho nu nítida alteração na rugosidade e aparente homogeneidade nas amostras.

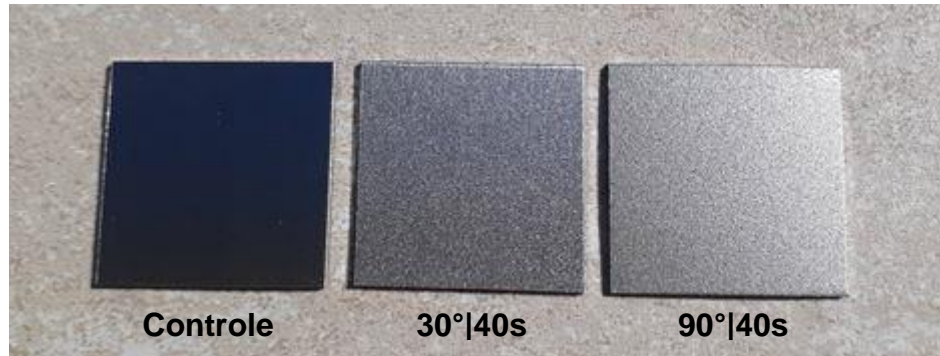
Figura 28. Amostras antes (a) e depois do processo de *shot peening* (b)



Fonte: Registrado pela autora, 2021.

Na Figura 29 podem ser visualizados os substratos antes e depois *shot peening* por 40s a 30° e 90°. A olho nu percebe-se diferença na intensidade dos tratamentos e um leve empenamento na amostra obtida a 90°.

Figura 29. Controle e substratos após o *shot peening* por 40s a 30° e 90°



Fonte: Registrado pela autora, 2021.

Após a realização dos testes de rugosidade e microscopia ótica com as amostras obtidas na Condição 1, identificou-se a necessidade de uma nova etapa de testes (Condição 2), uma vez que a cobertura de tratamento não foi suficiente para atingir 100% para todos os ângulos testados com o tempo fixado em 40s.

A partir disso, um novo critério passou a definir o tempo de tratamento para cada ângulo de processo: a cobertura total dos substratos. Essa cobertura foi avaliada com uso do microscópio digital portátil e os tempos de processo obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Tempo de processo necessário para 100% de cobertura

Ângulo de processo	Tempo (s)
30°	80
45°	100
60°	120
90°	25

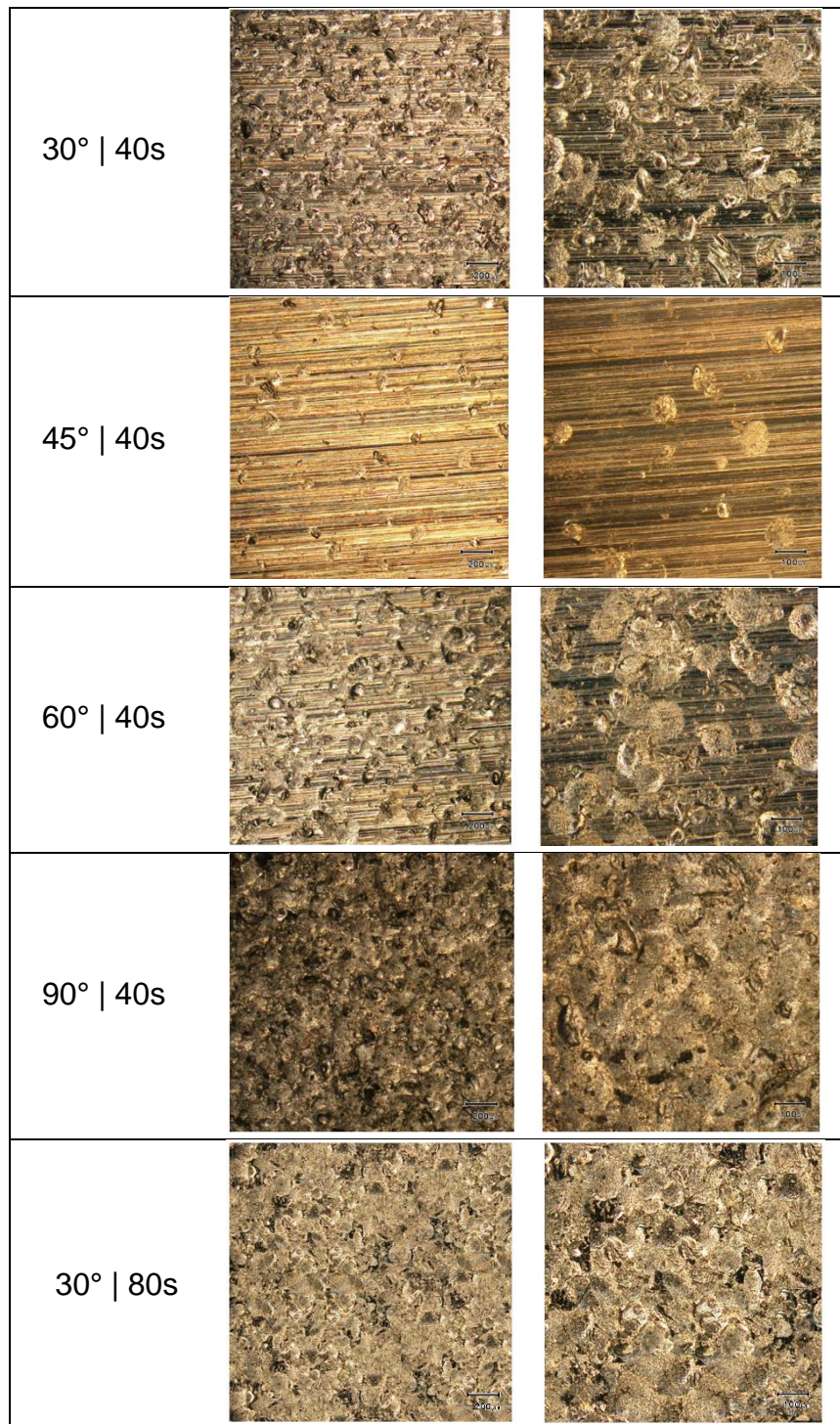
Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

5.3 Análise da topografia/textura por microscopia ótica

Após a obtenção das amostras na Condição 1, por 40s, os substratos foram avaliados com microscópio ótico (Figura 30). A partir dessa análise visual, foi evidenciado que o tempo não poderia ser fixado, uma vez que o percentual de cobertura sofre grande influência do ângulo de jateamento.

As imagens obtidas por microscopia óptica demonstram que (i) para o ângulo de 45°, o tempo de processo de 40s foi insuficiente, mantendo majoritariamente características do substrato; (ii) para o ângulo de 90° observa-se que o tempo de exposição de 40s foi excessivo; e (iii) para as amostras obtidas a 30° e 60° o percentual de cobertura foi similar, com cobertura um pouco maior em 30°.

Figura 30. Microscopia óptica da superfície após *shot peening*



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A imagem da amostra obtida a um ângulo de 30° por 80s demonstra a superfície com uma cobertura próxima de 100%.

5.4 Medição da rugosidade 2D

As amostras obtidas na Condição 1, com tempo fixado em 40s, também foram submetidas a medição da rugosidade e obtenção dos perfis. A Tabela 5 apresenta os valores de R_a e R_z médios obtidos para cada condição. Cada amostra teve os valores de rugosidade mensurados três vezes em pontos aleatórios.

Ao avaliar os dados, observa-se boa homogeneidade de cobertura pelos baixos valores de desvio padrão.

Tabela 5. Rugosidades médias R_a e R_z das amostras e seu acréscimo percentual

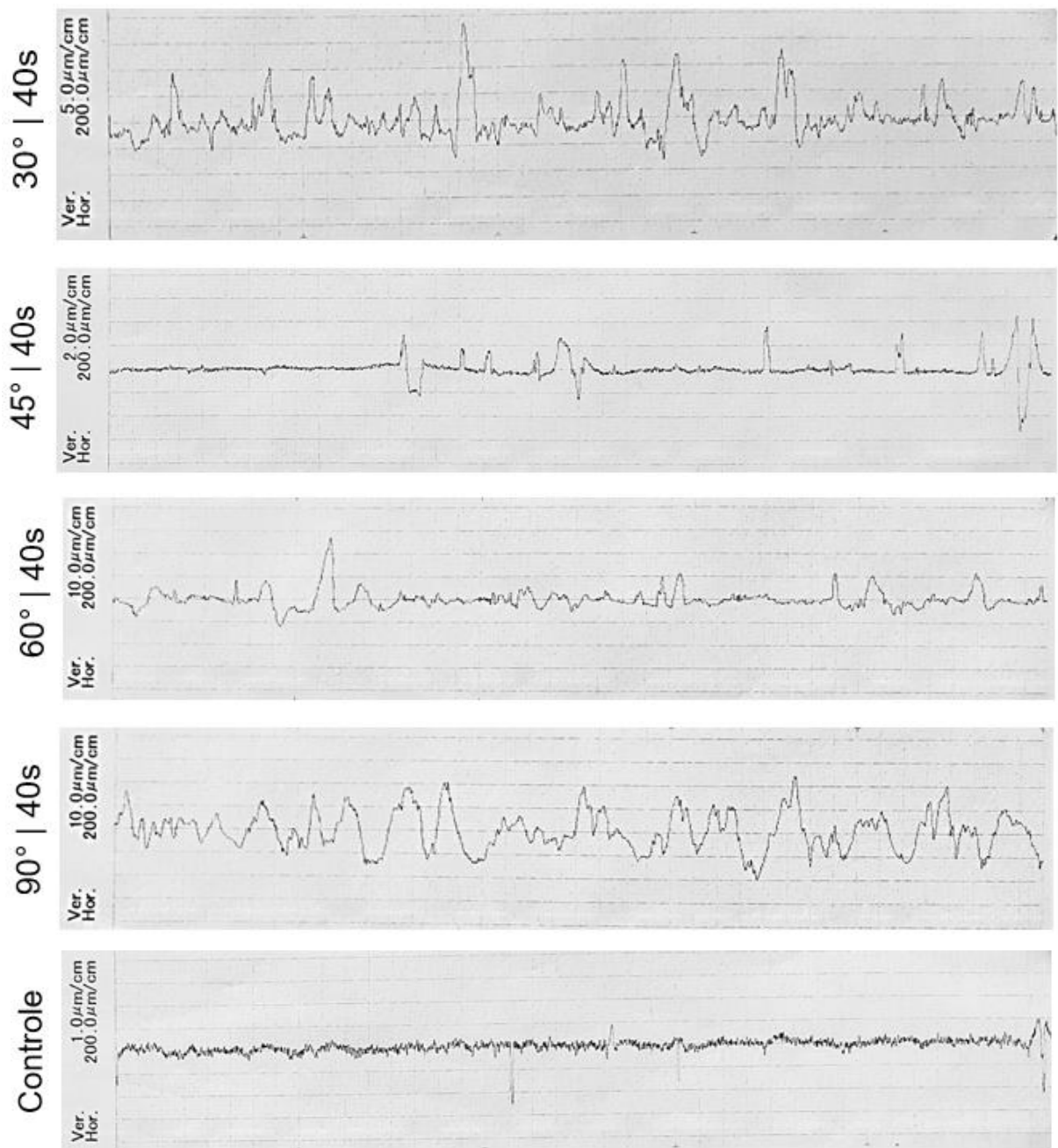
Amostra	Ângulo	Tempo (s)	R_a médio (μm)	R_z médio (μm)	Acréscimo R_a médio (%)	Acréscimo R_z médio (%)
Controle	-	-	$0,1 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,22$	-	-
30° 40s	30°	40	$1,2 \pm 0,17$	$8,67 \pm 0,37$	1376	1238
45° 40s	45°	40	$0,2 \pm 0,04$	$1,83 \pm 0,25$	196	262
60° 40s	60°	40	$1,4 \pm 0,08$	$10,67 \pm 1,11$	1652	1524
90° 40s	90°	40	$2,9 \pm 0,16$	$17,47 \pm 1,25$	3476	2495

Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

Para facilitar a análise da modificação superficial, foram comparados os acréscimos percentuais nos valores de rugosidade das amostras, em relação ao controle.

Os perfis de rugosidade (apresentados na Figura 31) corroboram os dados apresentados na Tabela 5, e as imagens obtidas por microscopia óptica. Confirma-se a insuficiência do jateamento por 40s na amostra obtida a 45°, e a expressiva rugosidade da amostra obtida a 90°.

Figura 31. Perfis de rugosidade das amostras antes do *shot peening* (Controle) e após o *shot peening* por 40s a 30°, 45°, 60° e 90°



Fonte: Obtido pela autora, 2021.

Após a realização dos novos testes de *shot peening*, na Condição 2 (variando o tempo de jateamento e mantendo as amostras estáticas), as amostras foram submetidas a novas análises de rugosidade, com uso do perfilômetro óptico.

Os valores de rugosidade R_a , R_q , R_p e R_v medidos estão apresentados na Tabela 6. Os valores incluem o desvio padrão calculado para cada amostra.

Tabela 6. Parâmetros de superfície de rugosidades médias

Amostra	R_a (μm)	R_q (μm)	R_p (μm)	R_v (μm)
I	1,2 \pm 0,04	1,751 \pm 0,065	18,080 \pm 3,069	-20,250 \pm 6,280
II	1,2 \pm 0,06	2,459 \pm 0,094	19,679 \pm 2,878	-24,478 \pm 1,079
III	1,6 \pm 0,03	2,210 \pm 0,045	14,399 \pm 1,622	-26,229 \pm 2,612
IV	1,3 \pm 0,12	1,991 \pm 0,124	30,168 \pm 18,069	-23,164 \pm 8,143
V	1,9 \pm 0,05	2,587 \pm 0,118	19,842 \pm 5,452	-24,617 \pm 4,247
VI	1,5 \pm 0,02	2,154 \pm 0,040	21,509 \pm 4,829	-22,191 \pm 2,384
VII	1,7 \pm 0,08	2,251 \pm 0,062	13,777 \pm 1,585	-25,617 \pm 8,594
VIII	3,5 \pm 0,32	4,509 \pm 0,428	21,768 \pm 1,609	-35,003 \pm 6,239
IX	2,4 \pm 0,07	3,087 \pm 0,114	18,061 \pm 1,670	-36,817 \pm 5,218
Controle	0,2 \pm 0,01	0,332 \pm 0,020	2,523 \pm 0,079	-5,691 \pm 0,911

Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

Estudos anteriormente realizados relacionando valores de R_a com a adesão inicial de *Candida albicans*, sugerem que valores de R_a abaixo de 0,2 μm não afetam a adesão bacteriana (BOLLEN *et al.* 1997), e valores acima de 0,2 μm apresentam influência na adesão. (QUIRYNEN *et al.* 1990). Observa-se que a amostra controle (polida) apresentou R_a neste limite de 0,2 μm . Todas as amostras obtidas nas nove diferentes condições operacionais testadas apresentaram valores maiores.

Além das medidas de R_a , R_q , R_p e R_v , também foram obtidos os perfis de rugosidade por perfilometria óptica para as nove amostras e o controle polido. Cada amostra teve os valores de rugosidade mensurados três vezes em pontos aleatórios longitudinal e transversalmente (Figuras 32 a 41).

Figura 32. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio I: 30° por 40s, 46 rpm

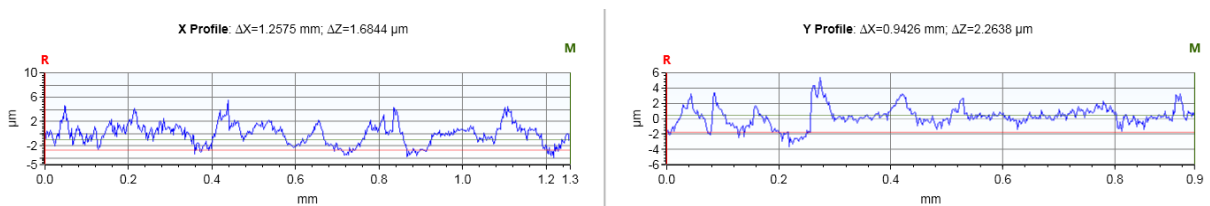


Figura 33. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio II: 30° por 80s, 46 rpm

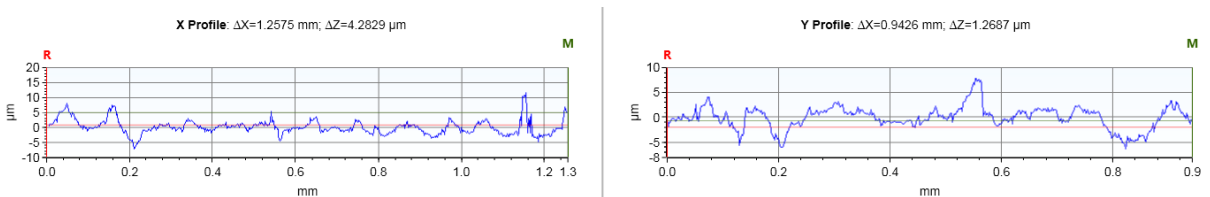


Figura 34. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio III: 30° por 80s, 0 rpm

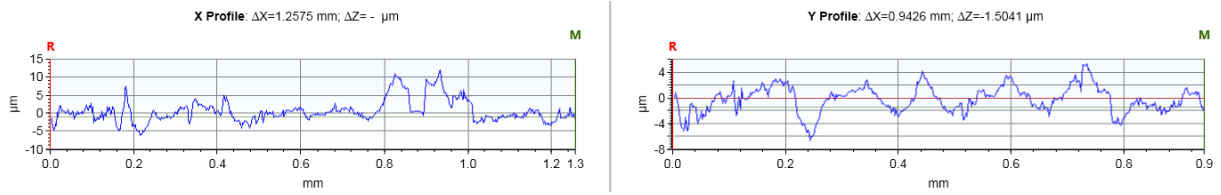


Figura 35. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio IV: 45° por 40s, 46 rpm

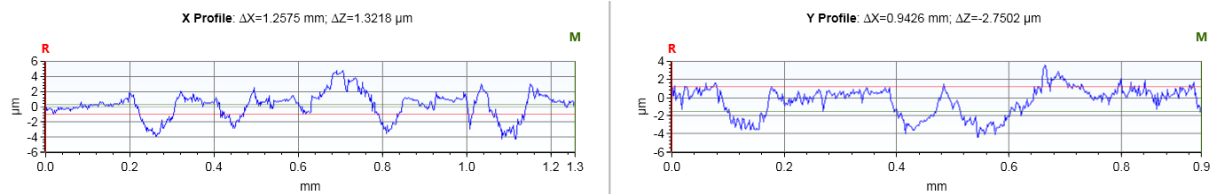


Figura 36. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio V: 45° por 100s, 0 rpm

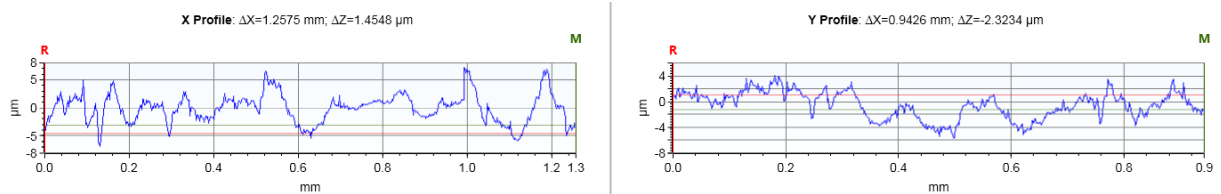


Figura 37. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio VI: 60° por 40s, 46 rpm

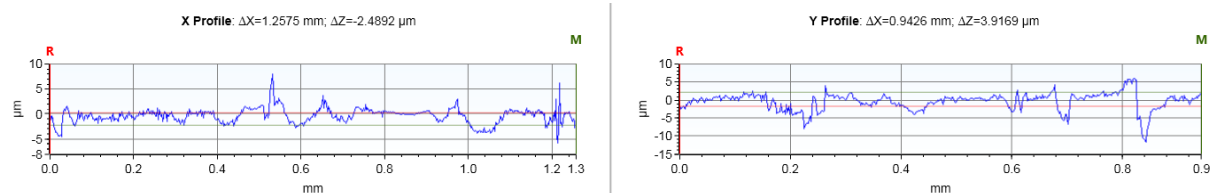


Figura 38. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio VII: 60° por 120s, 0 rpm

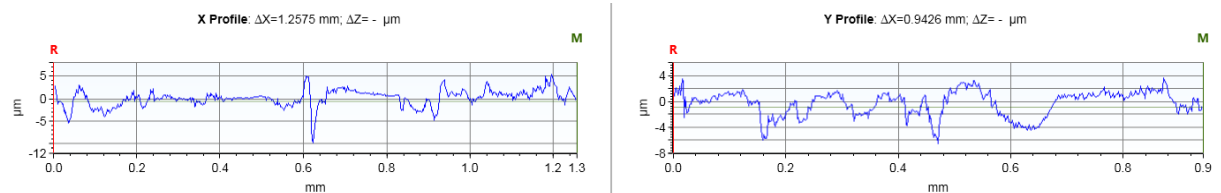


Figura 39. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio VIII: 90° por 40s, 46 rpm

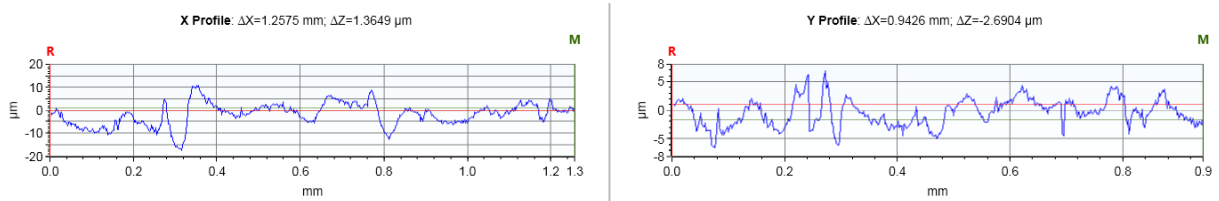


Figura 40. Perfil de rugosidade 2D – Ensaio IX: 90° por 25s, 0 rpm

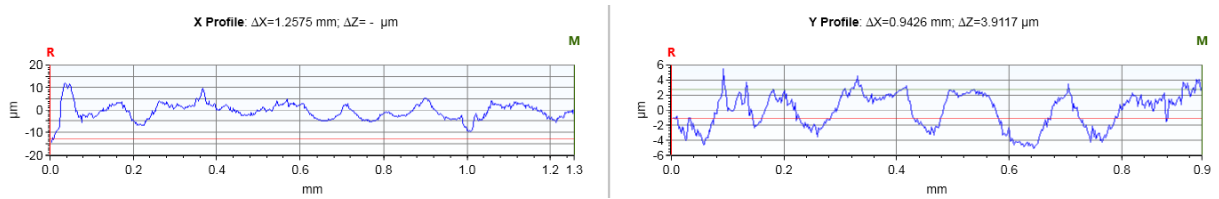
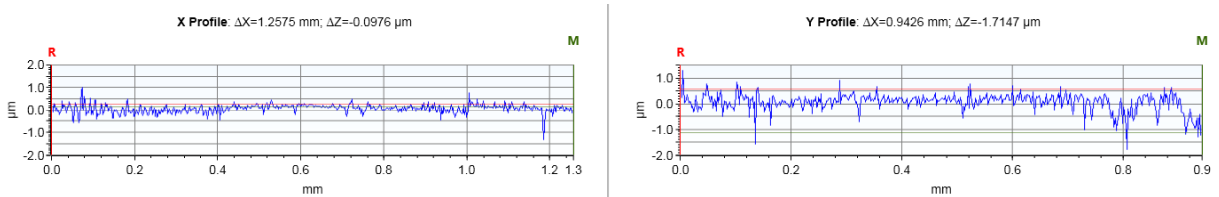
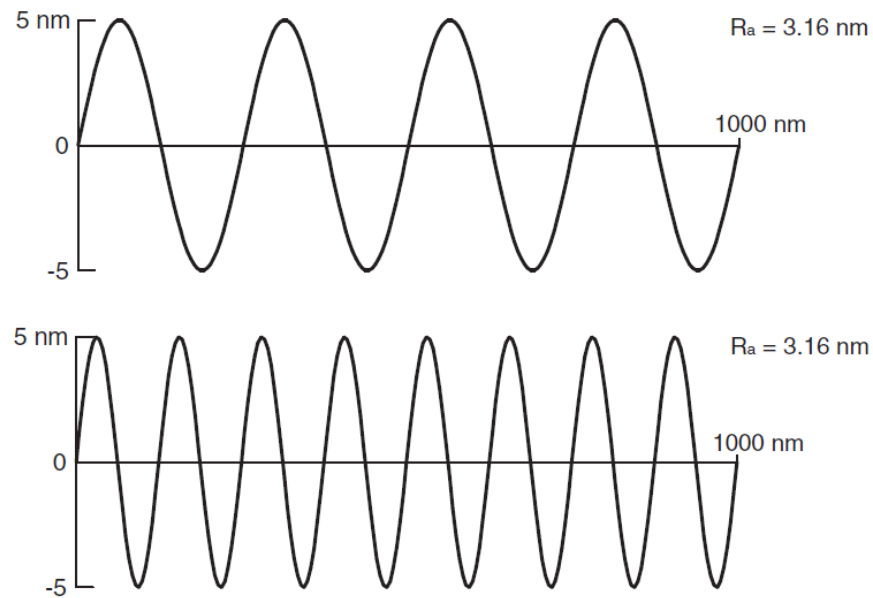


Figura 41. Perfil de rugosidade 2D – Controle: AISI 430 polido



A rugosidade superficial média (R_a) e a rugosidade superficial quadrada média (R_q) são os parâmetros mais frequentemente usados para caracterizar a topografia da superfície, e vários esforços foram feitos para estudar a correlação entre a adesão bacteriana e esses dois parâmetros. (CRAWFORD *et al.* 2012). Entretanto, ao avaliar os valores R_a medidos, juntamente com os perfis de rugosidade 2D, fica evidente a limitação da utilização de apenas esse como parâmetro descritivo da rugosidade. No caso das amostras I e II, obtidas a 30° com 40s e 80s, respectivamente, os valores de R_a são idênticos, embora a topografia das superfícies apresente características muito distintas. Conforme demonstrado na Figura 42, superfícies com estruturas de superfície completamente diferentes podem ter valores de R_a e R_q semelhantes, uma vez que essas medidas não fornecem informações sobre a distribuição espacial ou sobre a morfologia da superfície.

Figura 42. Superfícies distintas com valores idênticos de R_a



Fonte: CRAWFORD *et al.* 2012.

Outra informação que pode ser obtida através da análise dos perfis de rugosidade 2D é a ocorrência do fenômeno de *ploughing*, em que há formação de bordas elevadas em torno de cada entadação provocada pelo choque das esferas.

De maneira geral, excetuando-se os valores obtidos para o ângulo de 45° , observa-se correlação entre o aumento da rugosidade e o aumento do ângulo de incidência das esferas. Conforme relatado por Rego (2011), isso se dá em função da componente vertical da força, que fica maior à medida em que se aproxima de 90° (componente máxima). O acréscimo mais expressivo observado nas amostras submetidas ao jateamento a 90° , além da componente vertical de força, também é justificado pelo ricocheteamento das esferas, que colidem com as esferas incidentes e aumentam a frequência de choques.

5.3 Medição da rugosidade 3D

A partir das análises realizadas no perfilômetro óptico, foram obtidas medidas dos parâmetros de perfil de rugosidade e as imagens da rugosidade 3D. Os valores médios obtidos para S_a , S_q , S_p , S_v e S_z , bem como o desvio padrão, estão apresentados na Tabela 7. A Tabela 8 apresenta os valores médios de S_{ku} e S_{sk} .

Tabela 7. Parâmetros de perfil de rugosidades médias

Amostra	S_a (μm)	S_q (μm)	S_p (μm)	S_v (μm)	S_z (μm)
I	1,2 \pm 0,04	1,817 \pm 0,08	18,072 \pm 3,08	-20,238 \pm 6,26	38,311 \pm 8,75
II	1,8 \pm 0,06	2,547 \pm 0,10	19,679 \pm 2,86	-24,482 \pm 1,08	44,162 \pm 3,30
III	1,6 \pm 0,03	2,267 \pm 0,05	14,412 \pm 1,62	-26,202 \pm 2,62	40,613 \pm 4,21
IV	1,4 \pm 0,12	2,079 \pm 0,12	30,179 \pm 18,1	-23,128 \pm 8,13	53,307 \pm 11,99
V	2,0 \pm 0,07	2,667 \pm 0,15	19,831 \pm 5,43	-24,599 \pm 4,24	44,430 \pm 9,01
VI	1,5 \pm 0,01	2,239 \pm 0,07	21,539 \pm 4,84	-22,159 \pm 2,39	43,699 \pm 2,50
VII	1,7 \pm 0,07	2,354 \pm 0,04	13,818 \pm 1,59	-25,562 \pm 8,60	39,380 \pm 10,16
VIII	3,5 \pm 0,32	4,536 \pm 0,43	21,782 \pm 1,62	-34,984 \pm 6,24	56,766 \pm 6,99
IX	2,5 \pm 0,08	3,199 \pm 0,13	18,100 \pm 1,69	-36,737 \pm 5,25	54,837 \pm 6,89
Controle	0,2 \pm 0,01	0,339 \pm 0,02	3,985 \pm 2,07	-5,690 \pm 0,91	9,675 \pm 1,75

Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

Comparando-se os parâmetros de superfície (2D) aos parâmetros de perfil (3D), observa-se que os valores de S_a , S_q , S_p e S_v são idênticos aos valores de R_a , R_q , R_p e R_v . Essa similaridade indica certa periodicidade na topografia das superfícies.

Tabela 8. Parâmetros de perfil S_{ku} e S_{sk}

Amostra	S_{ku}	S_{sk}
I	10,479 \pm 1,76	-0,204 \pm 0,13
II	7,108 \pm 0,68	0,092 \pm 0,21
III	6,500 \pm 0,37	-0,198 \pm 0,20
IV	14,615 \pm 7,50	-0,335 \pm 0,63
V	7,214 \pm 1,87	-0,160 \pm 0,22
VI	9,949 \pm 1,41	-0,854 \pm 0,41
VII	8,310 \pm 3,68	-0,971 \pm 0,28
VIII	4,967 \pm 0,62	-0,506 \pm 0,13
IX	5,969 \pm 0,89	-0,738 \pm 0,24
Controle	24,012 \pm 7,90	-1,769 \pm 0,82

Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

O parâmetro S_{ku} acima de 3,0 indica a presença de picos ou vales extremos de maneira desordenada na superfície. O maior valor obtido foi na amostra de controle (AISI 430 polido). Isso ocorre porque a rugosidade da amostra é composta por picos muito agudos, todos acima do plano da superfície, praticamente sem a presença de depressões.

O parâmetro S_{sk} indica o grau de simetria das alturas de uma superfície sobre um plano médio. No caso da amostra II, há uma leve predominância de picos, e nas demais amostras há predominância de vales. Isso é esperado, uma vez que o

processo de *shot peening* projeta esferas em alta velocidade provocando deformações plásticas côncavas, formando vales. A amostra II é a única que foi obtida com rotação na Condição 2.

As Figuras 43 a 52 apresentam os perfis de rugosidade 3D para as amostras obtidas em 9 diferentes condições operacionais e para o controle polido.

No caso das amostras obtidas na Condição 1, com o tempo fixado em 40s, o perfil de rugosidade em 3D reforça o que já havia sido evidenciado na microscopia óptica e na rugosidade de contato: a insuficiência da cobertura no tratamento com este tempo de processo.

Figura 43. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio I: 30° por 40s, 46 rpm

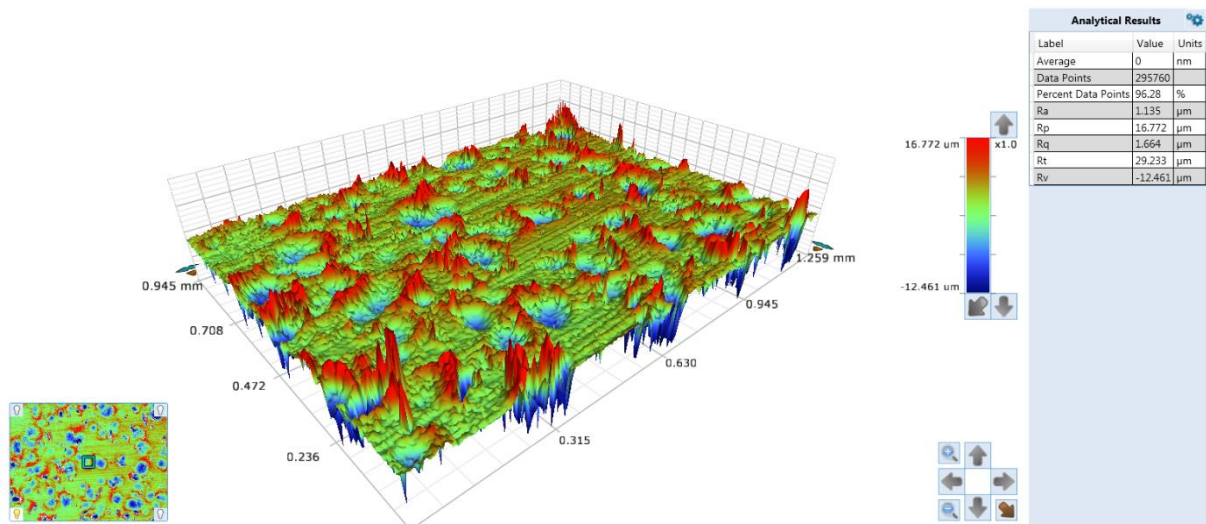


Figura 44. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio II: 30° por 80s, 46 rpm

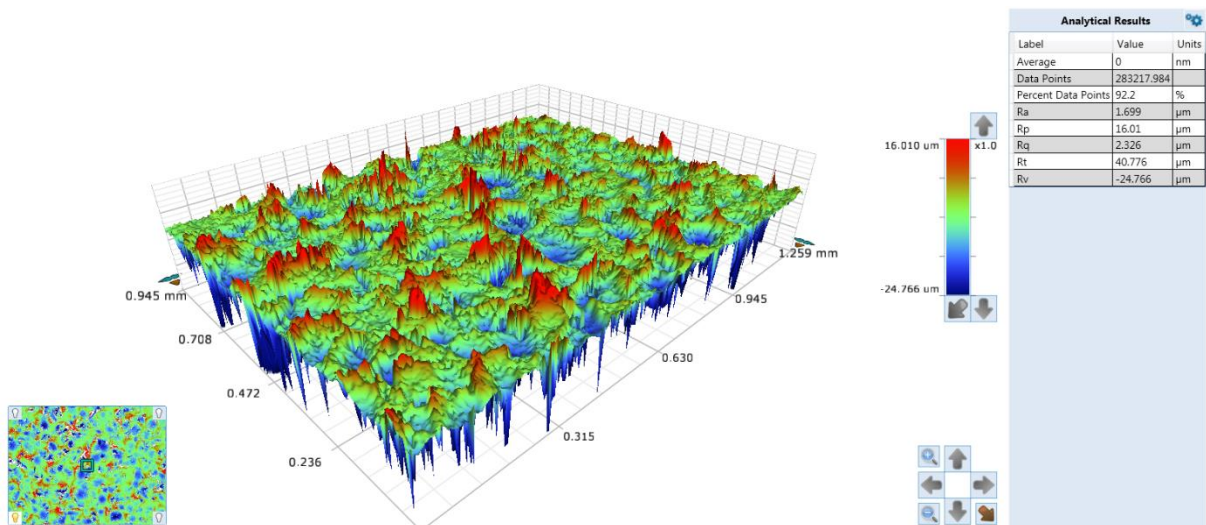


Figura 45. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio III: 30° por 80s, 0 rpm

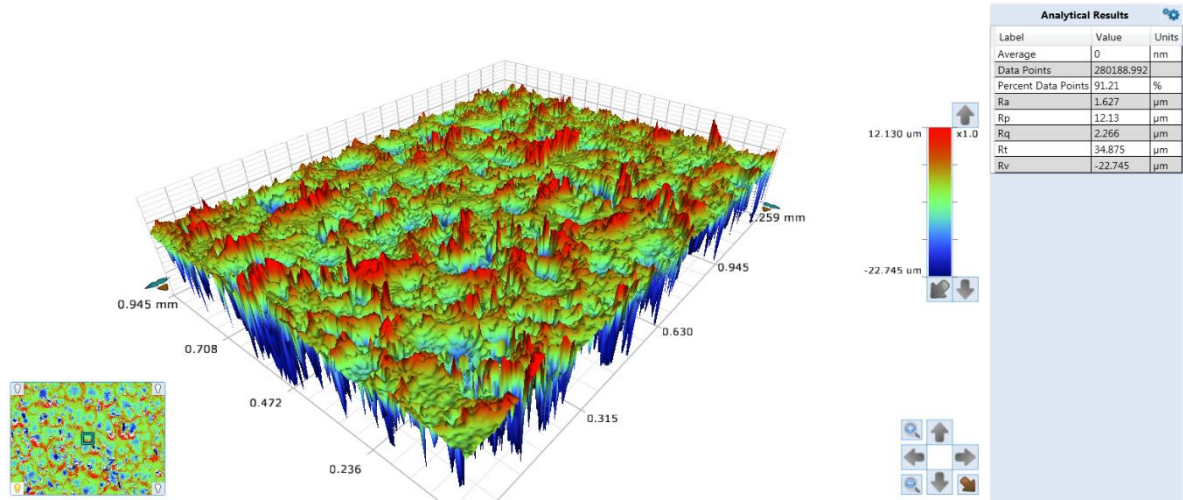


Figura 46. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio IV: 45° por 40s, 46 rpm

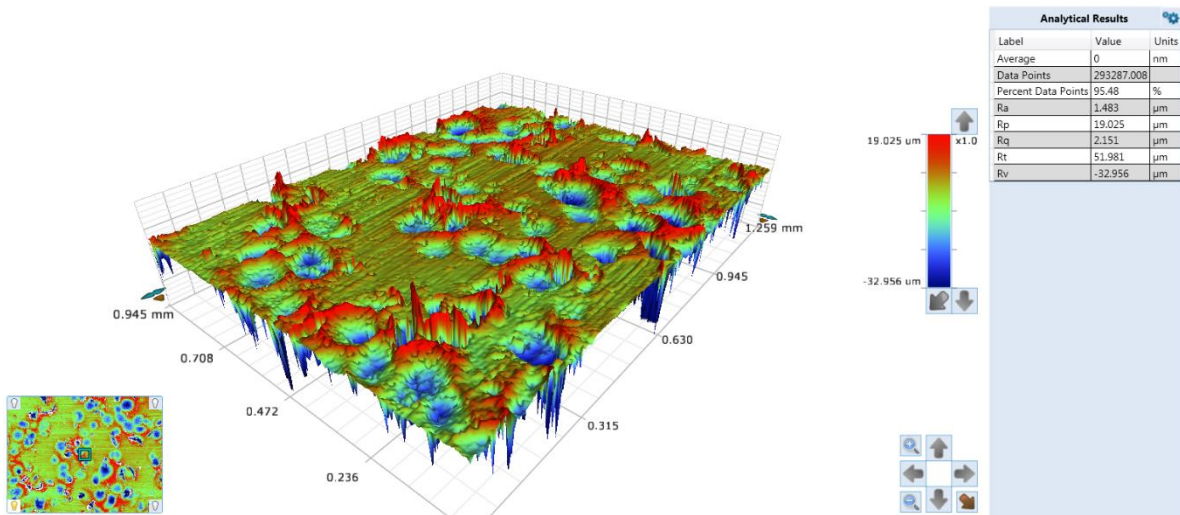


Figura 47. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio V: 45° por 100s, 0 rpm

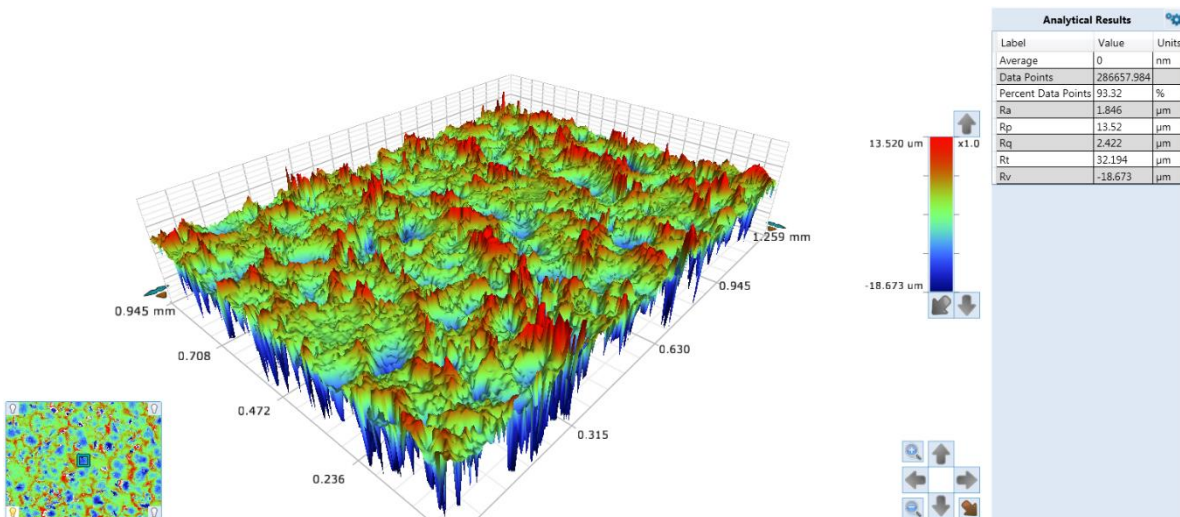


Figura 48. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio VI: 60° por 40s, 46 rpm

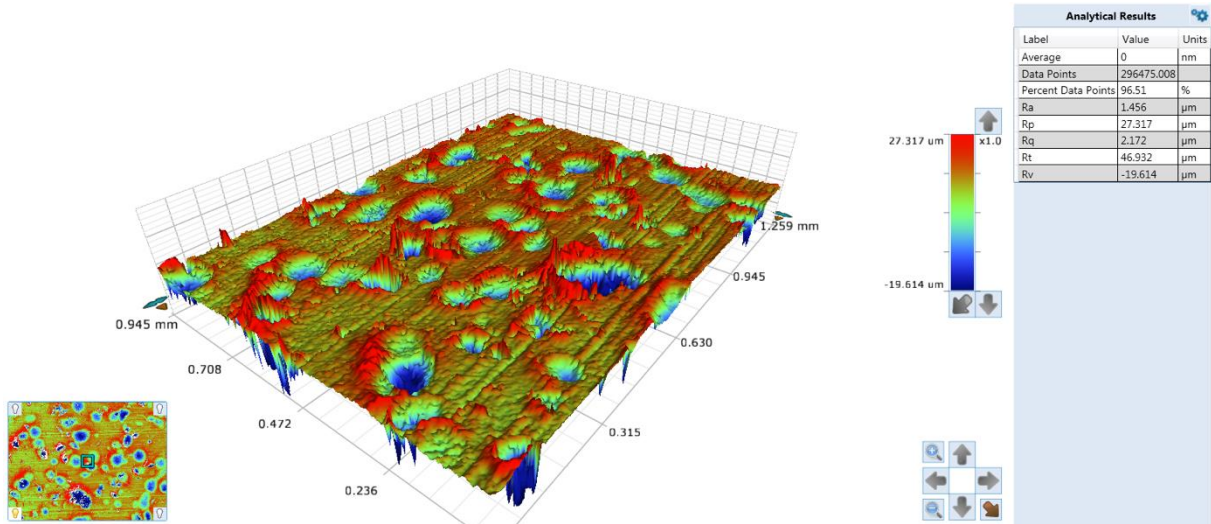


Figura 49. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio VII: 60° por 120s, 0 rpm

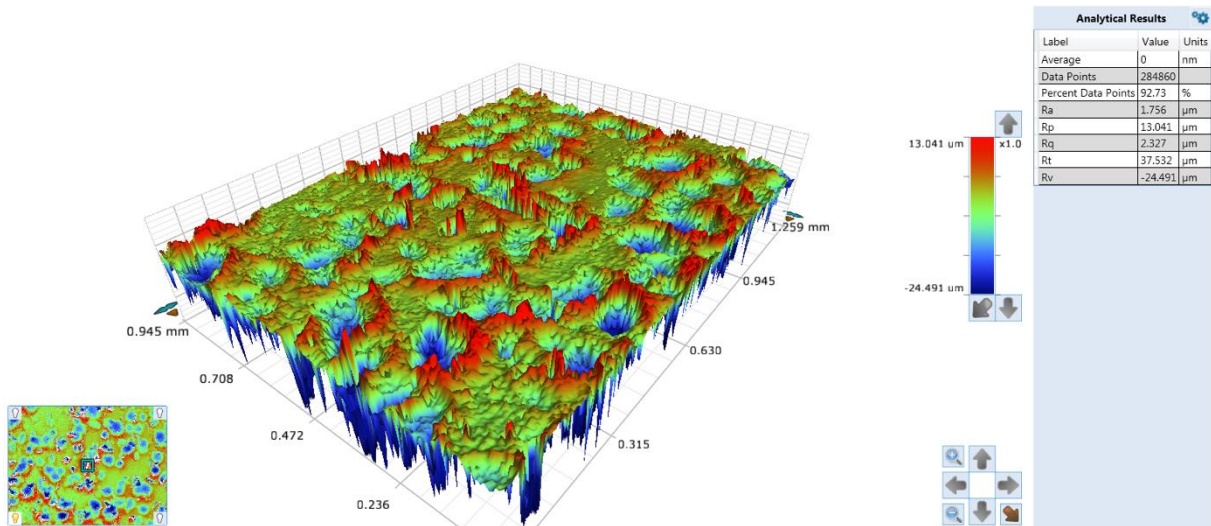


Figura 50. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio VIII: 90° por 40s, 46 rpm

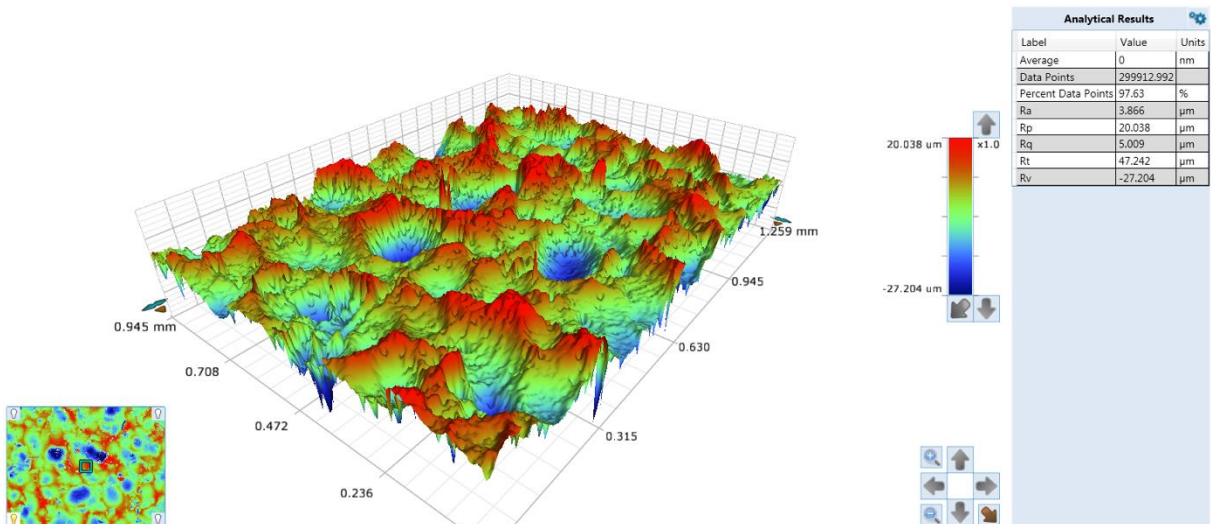


Figura 51. Perfil de rugosidade 3D – Ensaio IX: 90° por 25s, 0 rpm

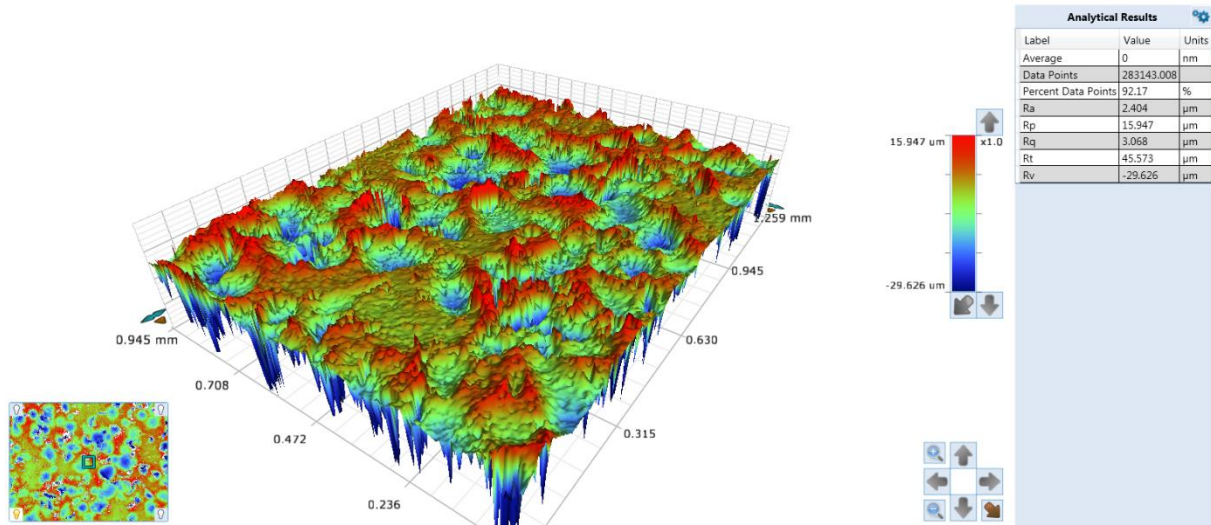
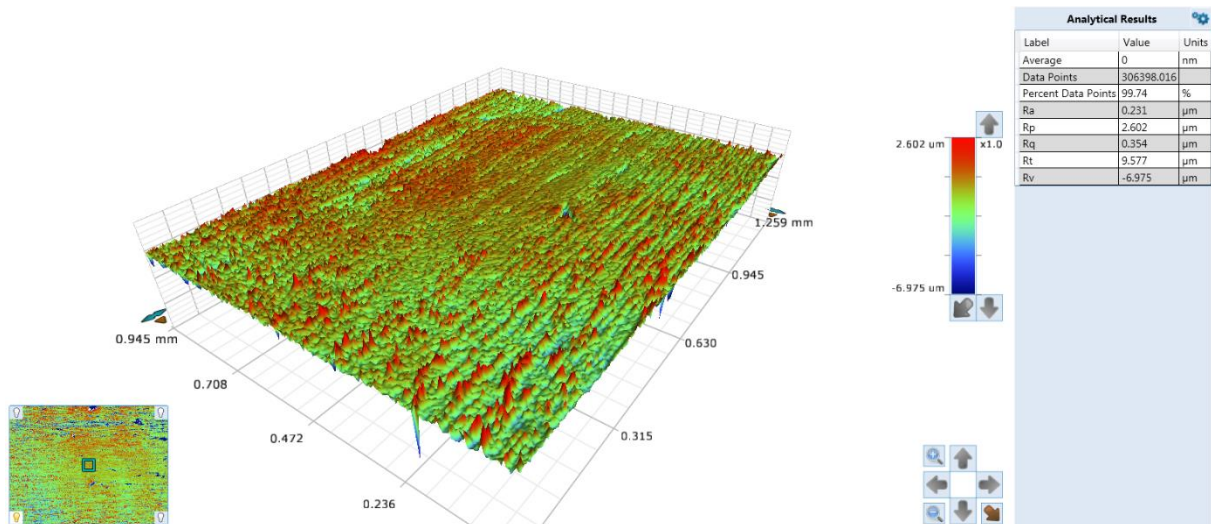


Figura 52. Perfil de rugosidade 3D – Controle AISI 430 polido



A partir das imagens de rugosidade 3D, assim como observado através dos perfis de rugosidade 2D, ficou evidente o fenômeno de *ploughing*, com a formação de bordas elevadas (identificadas nas imagens pela coloração vermelha) em torno de cada depressão provocada pelas esferas (majoritariamente identificadas nas imagens pela coloração azul).

As imagens em 3D permitem identificar similaridade em aspectos morfológicos nas diferentes amostras, como a presença de microcavidades, arestas vivas e picos, sem que seja possível identificar claramente a direção de origem da esfera que originou o vale. Essas semelhanças auxiliam na investigação sistemática da influência do ângulo e do tempo de processo na adesão bacteriana.

Quando comparadas as amostras II e III, que tiveram como única variável distinta a rotação, observa-se que a amostra estática teve menor formação de picos, evidenciado através dos valores de S_{sk} medidos.

A partir das imagens de rugosidade 3D foi possível perceber que para a amostra VII, obtida por 120s a 60°, o tempo de processo não foi suficiente para obtenção de cobertura total. Essa foi a amostra submetida ao maior tempo de tratamento, mas seria necessário um período mais prolongado.

As imagens também permitem estimar com maior precisão os diâmetros dos vales, que variaram aproximadamente de 90 μm a 130 μm . No caso da amostra VIII (90°/40s) os diâmetros variaram de 200 μm a 300 μm , evidenciando uma maior severidade no tratamento. Além de apresentar os maiores valores de rugosidade, foi a amostra que apresentou os maiores diâmetros de vales e visível empenamento.

Esses diâmetros de vales, com valores muito maiores do que as bactérias (com diâmetro médio de aproximadamente 1 μm) provavelmente não permitem que ocorra um confinamento físico que barre a expansão e proliferação celular, conforme relatado nos estudos realizados por Yang e colaboradores (2015). Pelo contrário, nesse caso, uma das hipóteses é que os vales possam facilitar a adesão primária, com um acúmulo bacteriano nas regiões rebaixadas e paredes laterais das fossas, por serem localizações energeticamente favoráveis, como mostrado em estudo conduzido por Rodríguez e colaboradores (2018).

Além do diâmetro, a profundidade das concavidades e a distribuição espacial das microcavidades possuem influência na adesão bacteriana. Nos estudos realizados por Chung e colaboradores (2007), e Reddy e colaboradores (2011), uma característica comum da maioria dos padrões empregados é a rugosidade em microescala, contendo características de superfície cuja altura e profundidade dos vales eram sempre comparáveis ou maior do que o tamanho das células. Essas características têm sido propostas para atuar como uma barreira física contra a proliferação bacteriana de *S. aureus* e *E. coli* em diferentes variações da topografia.

A partir das imagens em 3D e valores de rugosidade obtidos pela perfilometria óptica, observa-se que para as amostras testadas, as profundidades máximas de vales (S_v) variaram entre 12,479 μm (Amostra I, 30°) e 42,466 μm (Amostra VIII, 90°).

Destaca-se, adicionalmente, que as barreiras físicas indicadas pelos estudos realizados anteriormente podem ser provocadas também pela incorporação de bolsas de ar no espaço entre os vales, reduzindo significativamente a área da superfície

acessível para que ocorra interação e fixação das bactérias com a superfície. (FRIEDLANDER *et al.* 2013). Isso foi também elucidado por Cheng e colaboradores (2019), indicando que, de maneira geral, a topografia em escala micrométrica comparável à das células bacterianas, impacta a fixação via aprisionamento de ar.

5.4 Adesão e proliferação bacteriana

Para realização dos testes de adesão e proliferação bacteriana foram selecionadas as amostras apresentadas na Tabela 9 e o controle polido.

Tabela 9. Amostras selecionadas para realização dos testes microbiológicos

	I	III	V	VI	VII	VIII	IX
Ângulos	30°	30°	45°	60°	60°	90°	90°
Tempo (s)	40	80	100	40	120	40	25
Rotação (rpm)	46	0	0	46	0	46	0

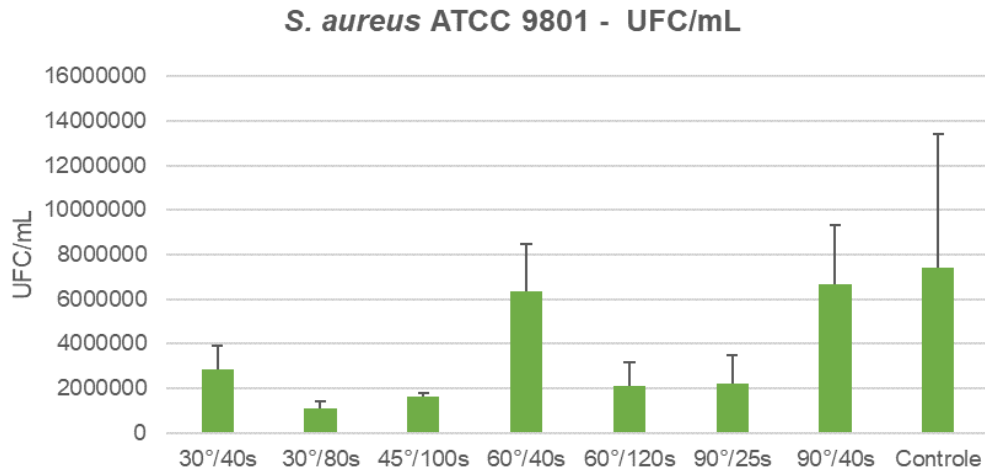
Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

A exclusão das amostras II (30°/80s/46 rpm) e IV (45°/40s/46 rpm) se deu em função dos resultados previamente obtidos de rugosidade 3D, que indicaram, respectivamente, ausência de alteração significativa na morfologia e baixa cobertura no tratamento por *shot peening* por 40s°.

Para avaliar a proliferação e adesão bacteriana, foi considerada a soma das contagens de bactérias planctônicas e sésseis. Os resultados obtidos estão apresentados em UFC/mL, e em percentual de crescimento em relação ao controle. Nesse segundo caso, o crescimento bacteriano dos controles respectivos a cada um dos ensaios foi assumido como sendo 100% de crescimento.

Destaca-se que os ensaios de adesão e proliferação bacteriana foram conduzidos em meios aquosos, com alta disponibilidade de nutrientes, com pH e temperatura ótimos para crescimento. Isso nem sempre corresponde à realidade de aplicação do material, mas são condições escolhidas de maneira conservadora.

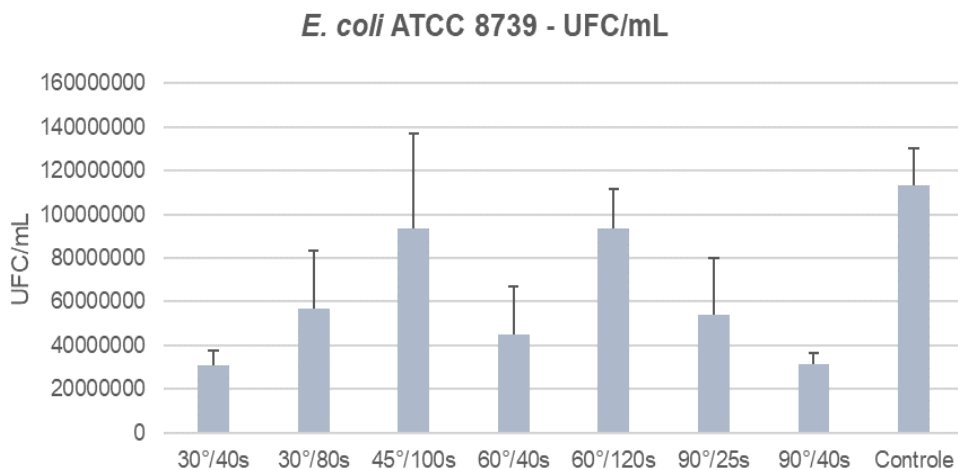
As concentrações de unidades formadoras de colônia por mL para cada uma das amostras avaliadas, frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*, no período de contato de 24h, estão apresentadas nos Gráficos 1 e 2, respectivamente.

Gráfico 1. Adesão e proliferação bacteriana (UFC/mL) – *S. aureus*

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Quando avaliados os resultados microbiológicos frente à cepa de *S. aureus*, é possível observar que para todos os ângulos testados, as amostras obtidas na Condição 2, em que a cobertura do tratamento foi mais próxima de 100%, os resultados de inibição foram mais favoráveis.

A amostra obtida a 90° por 40s foi a que apresentou os maiores valores de rugosidade e os maiores diâmetros de vales (200 µm a 300 µm). Nesse caso, como os diâmetros de vales são muito maiores do que as bactérias, provavelmente não houve confinamento físico (YANG *et al.* 2015), e sim uma facilitação dos pontos de ancoragem e da adesão primária pelo acúmulo bacteriano nas regiões de vales e paredes laterais das concavidades. Conforme demonstrado por Rodríguez e colaboradores (2018), essas regiões tornam-se energeticamente favoráveis.

Gráfico 2. Adesão e proliferação bacteriana (UFC/mL) – *E. coli*

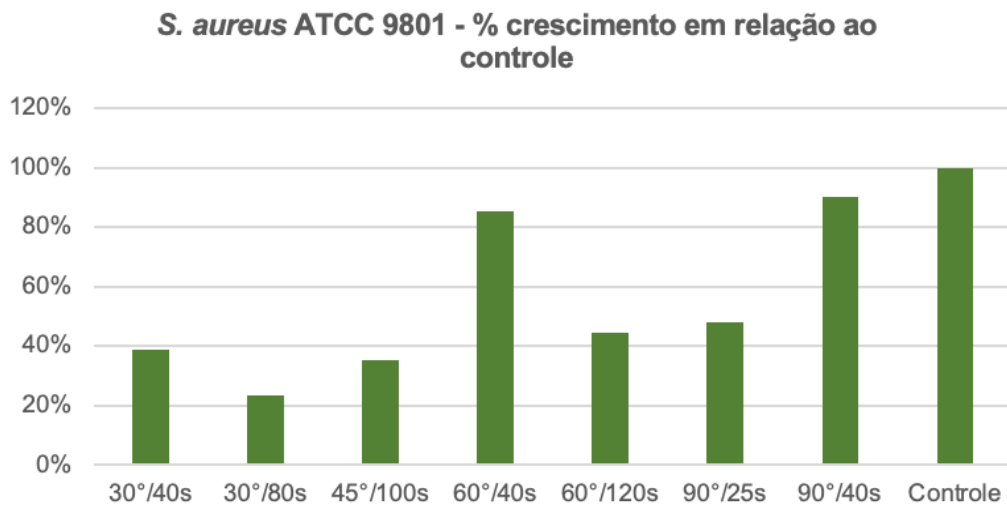
Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

No caso da amostra obtida a 90° por 40s, apesar dos altos valores de rugosidade e diâmetro de vale, a proliferação e adesão bacteriana foi reduzida. Uma das hipóteses para esse resultado de adesão e proliferação reduzido, pode estar relacionado com a presença de bolhas de ar aprisionadas no espaço entre os vales, dificultando a adesão bacteriana. (FRIEDLANDER *et al.* 2013).

Para que a avaliação dos resultados seja mais compatível com a realidade dos testes microbianos, optou-se por avaliar os dados em percentual de crescimento e adesão em relação aos controles. Isso ocorre porque cada teste possui seus próprios controles, e realizar comparações com UFC/mL pode não ser a forma de avaliação mais adequada.

Os Gráficos 3 e 4 apresentam, respectivamente, os percentuais de adesão e proliferação para cada uma das amostras avaliadas em relação ao seu controle, frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*, no período de contato de 24h.

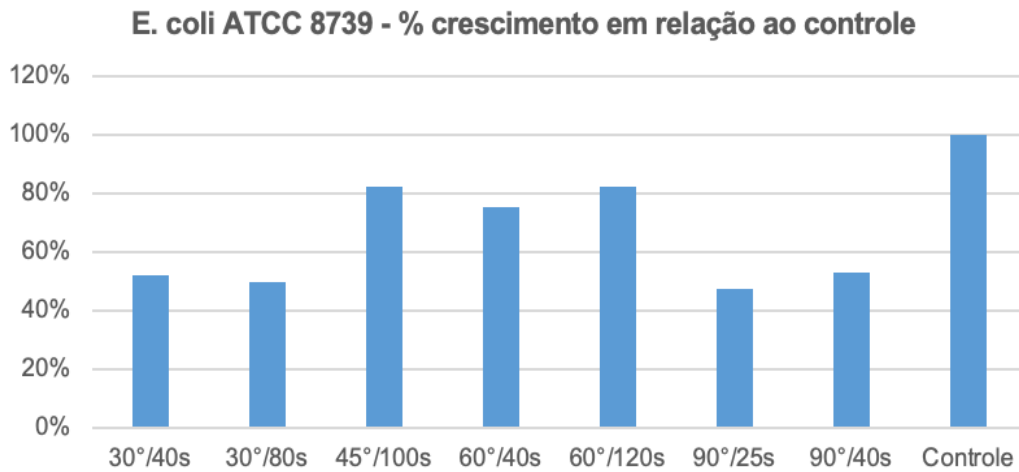
Gráfico 3. Adesão e proliferação em relação ao controle (%) – *S. aureus*



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

No caso da *S. aureus*, a condição que apresentou os maiores valores de redução da proliferação e adesão bacteriana foi o *shot peening* aplicado por 80s a 30°. Nessas amostras, houve uma redução de 77%.

No caso da *E. coli*, as amostras obtidas nos ângulos de 30° e 90° (tanto na Condição 1 quanto na Condição 2) apresentaram percentual de redução similar, próximo de 50%.

Gráfico 4. Adesão e proliferação em relação ao controle (%) – *E. coli*

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

De maneira geral, os resultados obtidos indicam que, para ambas as bactérias avaliadas, houve redução significativa da proliferação e adesão bacteriana. As maiores reduções observadas foram nas amostras obtidas a 30° por 80s, chegando a uma redução de 77% para *S. aureus* (Gram-positiva).

O bom desempenho na redução da adesão bacteriana em relação ao controle pode ser explicada pelo papel significativo de várias irregularidades superficiais. No caso das amostras lisas, sua topografia não apresenta estruturas capazes de restringir e inibir o movimento das células, fazendo com que possam aderir e se reproduzir com maior facilidade. (IZQUIERDO *et al.* 2015; PUCKETT *et al.* 2010).

Entretanto, quando comparados os resultados microbiológicos frente à cepa de *E. coli*, observa-se que a inibição da adesão e proliferação bacteriana não foi tão pronunciada quanto frente à cepa de *S. aureus*. Os estudos conduzidos por Linklater e colaboradores (2021) já indicavam que a influência da rugosidade da superfície na adesão bacteriana seria específica para as espécies bacterianas, e que diversas espécies podem exibir diferentes graus de fixação às superfícies, dependendo da extensão da rugosidade da superfície, da química da superfície e das respectivas características da superfície celular.

No processo de adesão, entende-se que existem dois termos de energia principais que contribuem para a mudança de energia total: energia de adesão e energia de deformação. A energia de deformação é o aumento de energia para produzir a deformação das células bacterianas. O processo de adesão é o equilíbrio

entre a energia de adesão e a energia de deformação, a fim de minimizar a energia total do sistema. (YANG *et al.* 2015).

Com base nessas considerações termodinâmicas, elucidadas pelos estudos realizados por Yang e colaboradores (2015), a adesão bacteriana é favorecida quando a energia do sistema for menor como resultado do aumento da área de contato célula-substrato e/ou da diminuição da deformação celular. Por um lado, a rugosidade gerada pelo processo de *shot peening* fornece um aumento da área de contato célula-substrato, oferecendo localizações energeticamente favoráveis. Por outro lado, as arestas, picos e vales, aumentam a probabilidade de deformar as células para que haja adaptação à geometria do padrão da superfície, gerando uma condição energeticamente desfavorável.

No caso das bactérias avaliadas (*E. coli* e *S. aureus*), a energia de deformação necessária para a deformação das células de *E. coli* é significativamente maior do que para as células de *S. aureus*, em função de suas diferentes morfologias. As células de *E. coli* possuem tamanho maior e precisam gerar uma deformação muito maior para se adaptar à geometria do padrão da superfície do que as células de *S. aureus*, que possuem formato esférico e tamanho menor. Isso significa que a adesão seletiva das células de *E. coli* é menos favorável do ponto de vista energético do que as células de *S. aureus*. (YANG *et al.* 2015). Isso pode explicar por que a modificação da topografia teve efeito mais aparente na adesão seletiva das células de *S. aureus* do que das células de *E. coli*.

Além disso, outro fator que pode ter favorecido a adesão e proliferação das células de *E. coli*, em comparação com *S. aureus*, é a presença de flagelos. Conforme demonstrado em estudos realizados por Friedlander e colaboradores (2013), e também apresentado por Haiko e Wikström (2013), os flagelos de *E. coli* podem estar envolvidos diretamente na adesão bacteriana. Os flagelos, além de promover maior contato da bactéria com a superfície, facilitam o deslocamento bacteriano, podendo atuar na adesão seletiva e na busca por regiões energeticamente mais favoráveis.

Os resultados obtidos ao avaliar a adesão e proliferação bacteriana neste estudo confirmam que as características morfológicas e de rugosidade da superfície fornecem obstáculos para retardar a expansão e adesão bacteriana.

Com base nos resultados obtidos e nos estudos anteriores realizados por outros autores, estima-se que para que os resultados sejam mais pronunciados, as irregularidades produzidas devem ser menores, mais próximas ao tamanho das

bactérias (de 1 μm a 6 μm). (YANG *et al.* 2015). Dessa forma, o confinamento físico provocado pelo aprisionamento de células bacterianas, também atuaria para inibir o crescimento e a colonização. As irregularidades próximas ao tamanho das bactérias dificultam suas interações, que são importantes para a colonização bacteriana e o desenvolvimento do biofilme. (YANG *et al.* 2015).

Estudos adicionais, incluindo uma variedade maior de padrões de superfície e cepas bacterianas são necessários para que as conclusões sejam mais definitivas, uma vez que biofilmes reais costumam ser compostos por várias espécies, coabitando ou competindo entre si.

Os resultados apresentados neste estudo contribuem para a compreensão de um campo experimental ainda pouco explorado, a respeito da resposta bacteriana às diferentes topografias com rugosidade de superfície em micro e nanoescala.

O avanço nessa e em tantas outras pesquisas relacionadas podem ajudar a desenvolver novos materiais para controle efetivo da adesão bacteriana e formação de biofilmes, para uma ampla gama de aplicações biomédicas e industriais, resultando na redução do risco de infecções e conseqüentes complicações de longo prazo sem que haja a necessidade da administração de agentes antimicrobianos que são responsáveis por produzir bactérias resistentes.

Encontrar uma nanotopografia otimizada em termos de tamanho, forma, proporção de aspecto e densidade, que deve ser ajustada para diferentes tamanhos e tipos de bactérias, continua sendo um desafio científico significativo. Dessa forma, a técnica de *shot peening* avaliada em superfícies metálicas AISI 430 apresenta-se como alternativa promissora na redução da proliferação e adesão bacteriana, bem como na formação de biofilmes em estágio inicial. A abordagem proposta é promissora e seu estudo deve ser aprofundado para maior entendimento dos mecanismos envolvidos para futuras aplicações da técnica em dispositivos médicos e/ou superfícies metálicas em ambiente hospitalar.

6 CONCLUSÕES

Torna-se cada vez mais evidente a necessidade de uma abordagem multidisciplinar para o tratamento e controle de biofilmes na medicina moderna.

Os resultados obtidos através da texturização superficial de aço inoxidável AISI 430 por *shot peening* em diferentes condições operacionais demonstram a influência direta do ângulo de jateamento no tempo de processo necessário para cobertura total do substrato.

A partir das medidas de rugosidade realizadas, conclui-se que a amostra controle (polida) apresentou R_a médio de $0,2 \mu\text{m}$, limite para o qual não haveria influência para adesão bacteriana (BOLLEN *et al.* 1997). No caso das amostras obtidas nas nove diferentes condições operacionais, todas apresentaram valores acima de $0,2 \mu\text{m}$, apresentando influência na adesão. (QUIRYNEN *et al.* 1990).

Ao comparar os parâmetros de superfície (2D) com os parâmetros de perfil (3D), conclui-se que os valores de S_a , S_q , S_p e S_v são idênticos aos valores de R_a , R_q , R_p e R_v , indicando certa periodicidade na topografia das superfícies.

Quando avaliados os resultados de proliferação e adesão bacteriana, todas as condições testadas apresentaram redução, se comparadas às superfícies lisas de substratos polidos.

Amostras submetidas ao *shot peening* por 80s, utilizando esferas de aço projetadas a 100 psi com ângulo de 30° apresentaram as reduções mais significativas, sendo redução na proliferação e adesão bacteriana de 77% para Gram-positiva e 50% para Gram-negativa. Por outro lado, no caso das amostras em que as esferas foram projetadas com ângulo de 60° , observou-se pouca redução bacteriana para ambas as cepas avaliadas. Isso demonstra a influência direta do ângulo de jateamento na rugosidade, na morfologia das superfícies, no tempo de processo necessário para cobertura total do substrato, e reforça a importância do perfil topográfico na adesão bacteriana e formação de biofilmes.

7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Ao longo deste trabalho, foram identificadas diversas oportunidades de pesquisas relacionadas ao tema abordado. A partir disso, sugere-se:

- Realizar testes de *shot peening* com diferentes tipos de esferas, variando diâmetro e dureza;
- Realizar testes de *shot peening* com diferentes tipos de substratos;
- Realizar testes de *shot peening* variando distâncias de processo;
- Avaliar adesão e proliferação bacteriana por um período maior que 24h;
- Avaliar adesão e proliferação bacteriana frente à outras bactérias patogênicas;
- Realizar análises em Microscópio Eletrônico de Varredura dos substratos com bactérias aderidas para observação da formação de biofilmes.

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, A. W. *Physical Chemistry of Surfaces*. Interscience. 1997. 3.
- Alta Tec en Lab. *ATL completando instalación exitosa perfilómetro óptico Bruker*. modelo ContourGT-K en empresa líder ramo automotriz. 2016.
- American Society for Metals. *Surface Engineering*. Metals Handbook. 2007. 5.
- ARCHER, N.K.; MAZAITIS, M.J.; COSTERTON, W.; LEID, J.G.; POWERS, M.E.; SHIRTLIFF, M.E. *Staphylococcus aureus biofilms - Properties, regulation and roles in human disease*. Virulence, Vienna. 2011. v. 2, n. 5, p. 445-459.
- ARENDT, H. [1958]. *A Condição Humana*. Tradução Roberto Raposo. Rio de Janeiro: Forense Universitária, 10 ed., 2005.
- BAGHERIFARD, S.; HICKEY, D. J.; LUCA, A. C.; MALHEIRO, V. N.; MARKAKI, A. E.; GUAGLIANO, M.; WEBSTER, T. J. *The influence of nanostructured features on bacterial adhesion and bone cell functions on severely shot peened 316L stainless steel*. Biomaterials. 2015. 73: 185-197.
- BAZAKA, K.; JACOB, M. V.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. *Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2012. 95: 299-311.
- BECHERT, D. W.; BRUSE, M.; HAGE, W. *Experiments with three-dimensional riblets as an idealized model of shark skin*. Experiments in Fluids. 2000. 28, 403–412.
- BELL, T. *Current status report Surface Engineering: Past, Present and Future*. Surface Engineering. 1990. 6(1): 31–40.
- BERNAL, A. *Investigation on nitriding with emphasis in plasma nitriding process, current technology and equipment*. 2006. Disponível em: http://ionheat.com/wpcontent/uploads/2016/10/investigation_in_plasma_nitriding_process.pdf. Acesso em: 20 mar. 2020.
- BLAU, P. J. *Friction Science and Technology: from concepts to applications*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group. 2009.
- BLODGETT, M. P.; NAGY, P. B. E. *Current assessment of near-surface residual stress in shot-peened nickel-base superalloys*. Journal Nondestructive Evaluation. 2004. 23(3): 107-123.
- BOLLEN, C. M.; LAMBRECHTS, P.; QUIRYNEN, M. *Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature*. Dent. Mater. 1997. 13, 258–269.
- BOWER, C. K.; Mc GUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. *The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces*. Trends in Food Science and Technology. 1996. v. 7, p. 152-157.

- BRASIBRAS. *Jateamento*. Disponível em: <http://www.brasibras.com.br>. Acesso em: 17 jul. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Análise epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil – 1999 a 2009*. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf. Acesso em: 28 jul. 2021.
- BURMOLLE, M. *et al.* *Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections*. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2010. v. 59, p. 324-36.
- BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H. *Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata*. FEMS Microbiology Reviews. 1987. v. 46, p. 165-173.
- BUSSCHER, H. J.; SJOLLEMA, J.; VAN DER MEI, H. *Relative importance of surface free energy as a measure of hydrophobicity in bacterial adhesion to surfaces*. In: DOYLE, R.J.; ROSENBERG, M. (Eds). *Microbial cell surface hydrophobicity*. Washington, D. C.: American Society of Microbiology. 1990.
- CAIXETA, D.S. *Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de Pseudomonas em superfície de aço inoxidável*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. 2008.
- CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. *A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces*. Biomaterials. 2013. 34(34): 8533–8554.
- CARBÓ, H. M. *Aço Inoxidável: aplicações e especificações*. 2001.
- CARMAN, M; L. *et al.* *Engineered antifouling microtopographies – correlating wettability with cell attachment*. Biofouling. 2006. 22.1. pp. 11–21.
- CHANG, Y. R.; WEEKS, E. R.; DUCKER, W. A. *Surface Topography Hinders Bacterial Surface Motility*. ACS Applied Mater. and Interfaces. 2018. 10, 9225-9234.
- CHAVES, L. C. D. *Estudo da cinética da formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia do Ambiente. Universidade do Minho, Portugal. 2004. 156.
- CHENG, Y.; FENG, G. & MORARU, C.I. *Micro- and Nanotopography Sensitive Bacterial Attachment Mechanisms: A Review*. Front. Microbiol. 2019. 10:191.
- CHUNG, K. K. *et al.* *Impact of engineered surface microtopography*. Biointerphases. 2007. Vol. 2 (2): 89-94.
- CLÁUDIO, R. A.; SILVA, J. M.; BRANCO, C. M.; BYRNE, J. *Fatigue life prediction of shot peened components*. Ciência & Tecnologia dos Materiais. 2008. 20 (1-2): 99-105.
- COLLIGNON, P. *Resistant Escherichia coli--we are what we eat*. Clin Infect Dis, 2009. 49(2): p. 202-4.

Color Track – Máquinas e Equipamentos. *Rugosímetro Digital SJ 401 Mitutoyo superficies especiais*. 2020. Disponível em: <https://www.colortrack.com.br/product-page/rugos%C3%ADmetro-digital-surfstest-402-mitutoyo-superficies-especiais>. Acesso em: 20 jul. 2021.

COSTA, M. Y. P.; VOORWALD, H. J. C.; PIGATIN, W. L.; GUIMARÃES, V. A. *Evaluation of Shot Peening on the fatigue strength of anodized Ti-6Al-4V alloy*. *Material Res.* 2006; 9(1): 107-109.

COSTA, D. P.; BRUQUE, J. M.; MARTÍN, M. L. G.; GARCÍA, A. C. G.; RODRÍGUEZ, V. V. *Studying the Influence of Surface Topography on Bacterial Adhesion using Spatially Organized Microtopographic Surface Patterns*. *Langmuir*. 2014. 30, 4633-4641.

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

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

CRAWFORD, R. J. *et al. Surface topographical factors influencing bacterial attachment*. *Advances in Colloid and Interface Science*. 179-182. 2012. 142-149.

CZERWINSKI, F. *Thermochemical Treatment of Metals*. Heat Treatment - Conventional and Novel Applications. 2012.

DAROUCHE, R. *Device-associated infections: a macroproblem that starts with a microadherence*. *Clinical Infectious Disease*. 2001. 33: 1567-1572.

DAVIES, D. G. *Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents*. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003. 2: 114-122.

DAVIS, J. R. *Surface Engineering for Corrosion and Wear Resistance*. Materials Park. ASM International. 2001.

DAVIS, J. R. *Surface engineering of specialty steels*. *Surface Engineering*. 1994. 5: 762-775.

DELEANU, L.; GEORGESCU, C.; SUCIU, C. *A Comparison between 2D and 3D surface parameters for evaluating the quality of surfaces*. *The Annals of Dunârea de Jos*. University of Galati, fascicle V. Technologies in machining building, ISSN 1221-4566, 2012.

DENYER, S. P.; GORMAN, S. P.; SUSSMAN, M. *Microbial biofilms: formation and control*. Londres: Blackwell Scientific Publications. 1993. 333 p.

DIN 11 480. Deutsches Institut für Normung e.v. *Milshwirtschaftliche Maschinen*. Tanks und Apparate, Oberflächen (Dairy Machines, Tanks and Apparatus Surfaces), Deutsche Norm DIN 11 480. Berlin: Deutsches Institut für Normung e.v., Beuth Verlag GmbH. 1992.

DONLAN, R. M.; *et al.* *Protocol for detection of biofilms on needleless connectors attached to central venous catheters*. *Jornal Clinical Microbiology*. Washington. 2001. v. 39, p. 750-753.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington. 2002. v. 15, p.167-193.

DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH – *Coleção Alemã de Micro-organismos e Cultura de Células*. Disponível em: http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Staphylococcus&show_all_details=1. Acesso em: 14 jul. 2021.

ELIMELECH, M.; GREGORY, J.; JIA, X.; WILLIAMS, R. *Particle deposition and aggregation-measurements, modeling and simulation*. Oxford. Colloid and surface engineering series, Butterworth-Heinemann Ltda., 1995.

ELLIOTT, T. L. *Surface hardening*. *Tribology International*. 1978. 11(2): 121–125.

EUZÉBY, J. *List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published*. Validation list n° 132. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, London. 2010. v. 60, p. 469-472.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O’GARA, J.P. *The genetics of staphylococcal biofilm formation--will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection?* *Clinical and Microbiology Infection*, Malden. 2005. v. 11, p. 967-973.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. *Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos*. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre. 2005. v. 33, n. 3, p. 291-96.

FREIRE, P. *Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa*. Paz e Terra. São Paulo, 2002.

FRIEDLANDER, R. S.; VLAMAKIS, H.; KIM, P.; KHAN, M.; KOLTER, R. & AIZENBERG, J. *Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion*. *PNAS*. 2013. Vol. 110 (14) 5624-5629.

GALLO, J.; HOLINKA, M.; MOUCHA, C. S. *Antibacterial Surface Treatment for Orthopaedic Implants*. *Int. J. Mol. Sci*. 2014. v 15(8): 13849–13880.

GALLO, S. C. *Active screen plasma surface engineering of austenitic stainless steel for enhanced tribological and corrosion properties*. University of Birmingham. 2009.

GARIÉPY, A.; PERRON, C.; BOCHER, P.; LÉVESQUE, M. *Finite element modelling of shot peening and peen forming processes and characterisation of peened aa2024-t351 aluminium alloy*. The Minerals, Metals & Materials Society, 2012. p. 251–256.

GILLASPY, A.; IANDOLO, J. *Staphylococcus*. In: SCHAECHTER, M. (Ed.). *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd ed. Oxford: Academic Press, 2009. p. 293-303.

- GROSS, M.; CRAMTON, S.E.; GOTZ, F.; PESCHEL, A. *Key role of teichoic acid net charge in Staphylococcus aureus colonization of artificial surfaces*. Infection and Immunity, Bethesda. 2001. v. 69, p. 3423-3426.
- GU, H.; LEE, S. W.; BUFFINGTON, S. L.; HENDERSON, J. H.; REN, D. *On-Demand Removal of Bacterial Biofilms via Shape Memory Activation*. ACS Appl. Mat. Interf. 2016. 8: 21140–21144.
- HAIKO, J. & WIKSTRÖM, B. W. *The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence*. Biology. 2013. 2: 1242-1267.
- HAYES, P. R. *Microbiología e higiene de los alimentos*. Tradução Bernabé Sanz Pérez. Zaragoza: Acribia. 1993. p.187-196.
- HOBSON, T. *Surface Finish Metrology*. 2003. 329 slides.
- HOIBY, N. *et al. The clinical impact of bacterial biofilms*. International Journal of Oral Sciences. 2011. v. 3, p. 55-65.
- HOLMBERG, K. & MATTHEWS, A. *Coatings tribology*. Amsterdam. Elsevier. 1994.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H.A.; SATLEY, J.T.; WILLIAMS, S. T. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Willians e Wilkins. 1994. p. 754.
- HOOKS, B. *Ensinando o pensamento crítico: sabedoria prática*. Tradução Bhuvi Libanio. Editora Elefante. 2020. p. 35.
- HUTCHINGS, I. M. *Tribology: Friction and Wear of Engineering Materials*. 1st ed. London: Edward Arnold. 1992.
- IARIKOV, D. D.; KARGAR, M.; SAHARI, A.; RUSSEL, L.; GAUSE, K. T.; BEHKAM, B.; DUCKER, W. A. *Antimicrobial Surfaces Using Covalently Bound Polyallylamine*. Biomacromolecules. 2014. 15: 169–176.
- International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians. *3-A sanitary standards for storage tanks for milk and milk products*. 3-A Sanitary Standard 01-07. Ames, Iowa: International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, 1990.
- IZQUIERDO-BARBA, I.; GARCÍA-MARTÍN, J. M.; ÁLVAREZ, R.; PALMERO, A.; ESTEBAN, J.; PÉREZ-JORGE, C., *et al. Nanocolumnar coatings with selective behavior towards osteoblast and staphylococcus aureus proliferation*. Acta Biomater. 2015. 15: 20-28.
- JAMES, A. S.; THOMAS, K.; MANN, P.; WALL, R. *The role and impacts of surface engineering in environmental design*. Materials & Design. 2005. v. 26; 7: 2005, 594-601.
- JAY, J. M. *Microbiologia dos alimentos*. Trad. por TONDO, E. C.; RECH, R.; GEIMBA, M. P.; FLÔRES, S. H.; FRAZZON, J.; CARVALHO, A. L. O.; FRAZZON, A.

P. G.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, F. C.; BIANCHINI, A.; SILVA, A. C. A. 6.ed. Porto Alegre: Artmed. 2005. p. 471-490.

JULLIEN, C.; BÉNÉZECH, T.; CARPENTIER, B.; LEBRET, V.; FAILLE, C. *Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry*. Journal of Food Engineering. 2002. v. 56, p. 77-87.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, RW. *Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins*. In: DOWNES, F.P; ITO, K. (Ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: APHA, 2001. p. 387-403.

LINKLATER, D.P.; BAULIN, V.A.; JUODKAZIS, S. *et al. Mechano-bactericidal actions of nanostructured surfaces*. Nature Reviews Microbiology. 2021. 19, 8–22.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. *Biofilms*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2010. v. 2, p. 1-11.

LU, A. *et al. Effects of surface roughness and texture on the bacterial adhesion on the bearing surface of bio-ceramic joint implants: an in vitro study*. Ceram. Int. 2020. 46, 6550–6559.

LULA, R. A. *Stainless steel*. Ohio, Metals Park, ASM. 1989. 173.

MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W. R. *Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication?* Medicinal Chemistry. 2009. v. 5, p. 517-528.

MACHADO, S. M. O. *Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia do Ambiente. Universidade do Minho, Portugal. 2005: 129.

MALIWEMU, E. U. K.; MALAU, V.; ISWANTO, P. T. *Effect of Shot Peening in Different Shot Distance and Shot Angle on Surface Morphology, Surface Roughness and Surface Hardness of 316L Biomaterial*. IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 299. 2018. 012051.

MARSHALL, K. C., STOUT, R., MITCHELL, R. *Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces*. Journal of General Microbiology. 1971. v. 68, p. 337-348.

MARSHALL, K. C. *Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces*. American Society Microbiology News. 1992. v. 58, n. 4 p. 202-207.

MATHUR, T.; SINGHAL, S.; KHAN, S.; UPADHYAY, D.; FATMA, T.; RATTAN, A.; *Adverse Effect of Staphylococci Slime on In Vitro Activity of Glycopeptides*. Japanese Journal of Infectious Disease, Toyama. 2005. v. 58, p. 353-357.

MCLEAN, M. *The Science of Interfaces in Materials Engineering*. Thermodynamics of interfaces. 1988. 8-27.

MELLATA, M., *et al. Role of avian pathogenic Escherichia coli virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages*. Infect Immun, 2003. 71(1): p. 494-503.

MELO, G. L.; NUNES, G. S. *Efeito do Shot Peening na Resistência à Fadiga de Contato em Ferros Fundidos Nodulares*. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, de Engenharia Mecânica, Curitiba. 2013.

MENOITA, E. *et al. Biofilmes: conhecer a entidade*. Journal of aging and innovation, Lisboa. 2012. v.1, n. 3, p. 23-32.

MIC. *Shot peening applications*. Metal Improvement Company. 2005. 9: 62.

MICHIGAN METROLOGY, LLC, 2014. Disponível em: https://www.michmet.com/3d_s_height_parameters.htm. Acesso em: 31 jul. 2021.

MIRANDA, J. M. *et al. Comparison of antimicrobial resistance in Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Listeria monocytogenes strains isolated from organic and conventional poultry meat*. J Food Prot, 2008. 71(12): p. 2537-42.

MORAES, M. N., *et al. Mecanismos de adesão bacteriana aos biomateriais*, Revista de Medicina de Minas Gerais. 2013. v. 23, p. 99-10, Belo Horizonte.

MORIN, E. *Ciência com consciência*. 2ª ed. Tradução Maria D. Alexandre e Maria Alice Sampaio Dória. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil. 1998. p. 33.

MURTEY, M.; RAMASAMY, P. *Staphylococcus aureus cells prepared using the air drying method with HMDS, SEM image*. 2016.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; *Diarrheogenic Escherichia coli*. Clin.Microbiol. Rev. 1998. 11(1):142.

National Institutes of Health. 2002. Disponível em: <http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>. Acesso em: 23 mar. 2020.

NAVEEN, R.; MATHAI, E. *Some virulence characteristics of uropathogenic Escherichia coli in different patient groups*. Indian J Med Res, 2005. 122(2): p. 143-7.

NEIDELL, M. J. *et al. Costs of healthcare and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms*. Clinical Infectious Disease, Chicago. 2012. v. 55, p. 807-815.

NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action!* Clinical Microbiology and Infection. 2012. 18: 411-412.

Núcleo Inox, *Guia Brasileiro do Aço Inox*, 2001.

OLIVEIRA, F. A. L. *Análise das Tensões Residuais Induzidas pelos Tratamentos Mecânicos Superficiais na Construção de Navios*. UFRJ/ Escola Politécnica. 2014. 35.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. *Biofilmes em indústrias de laticínios: aspectos gerais e uso de óleos essenciais como nova alternativa de controle*. Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”, Juiz de Fora. 2013. n. 390, v. 68, p. 65-73.

OLYMPUS CORPORATION. Disponível em: http://www.olympus-ims.com/pt/knowledge/metrology/roughness/3d_parameter/. Acesso em: 31 jul. 2021.

PEREIRA, M. A.; ALVES, A. A.; AZEREDO, J.; MOTA, M.; OLIVEIRA, R. *Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of a anaerobic consortium*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2000. 24: 181-186.

PIANA, L. A. *Caracterização e Avaliação da Adesão de Filmes de Nitreto de Titânio Depositados Via PAPVD*. Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Engenharia, PPGEM, UFRGS. 2001.

PRODUCE SAFETY PROJECT. *Health-related costs from foodborne illness in the United States*. 2010. Disponível em: <http://www.produce-safetyproject.org>. Acesso em: 22 jan. 2020.

PUCKETT, S. D.; TAYLOR, E.; RAIMONDO, T.; WEBSTER, T. J. *The relationship between the nano structure of titanium surfaces and bacterial attachment*. Biomaterials. 2010. 31: 706-713.

QUIRYNEN, M.; MARECHAL, M.; BUSSCHER, H.J.; WEERKAMP, A.H.; DARIUS, P.L.; VAN STEENBERGHE, D. *The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man*. J. Clin. Periodontol. 1990. 17, 138–144.

QUIRYNEN, M.; VAN DER MEI, H. C.; BOLLEN, C. M. L.; GEERTSEMADOORNBU-SCH, G. I.; BUSSCHER, H. J.; VAN STEENBERGHE, D. *Clinical relevance of the influence of surface free energy and roughness on the supragingival and subgingival plaque formation in man*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 1994. 2: 25-31.

RAMOS, F. D. *Oxidação a Plasma Pós Nitretação Utilizando Ar Atmosférico*. Trabalho de Diplomação, Departamento de Metalurgia, UFRGS. 2001.

REDDY, S. T.; CHUNG, K. K.; MCDANIEL, C. J.; DAROUICHE, R. O.; LANDMAN, J.; BRENNAN, A. B. *Micropatterned Surfaces for Reducing the Risk of Catheter-Associated Urinary Tract Infection: An In Vitro Study on the Effect of Sharklet Micropatterned Surfaces to Inhibit Bacterial Colonization and Migration of Uropathogenic Escherichia coli*. Journal of Endourology. 2011. 25: 1547-1552.

REGO, R. R. *Influência do uso de Distribuição Bimodal de Classes de Granalha no Processo de Shot Peening sobre o Perfil de Tensões Residuais de Engrenagens*. SENAI Cimatec. 2011.

RODRÍGUEZ, V. V.; MORA, A. I. G. G.; COSTA, D. P.; MARTÍN, M. L. G.; CALDERÓN, M. C. F. *Bacterial response to spatially organized microtopographic surface patterns with nanometer scale roughness*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2018. 169: 340–347.

ROHWEDER, A. *et al. Shot Peening jateamento por granalha*. Centro universitário Católica de Santa Catarina, Curso de Engenharia mecânica ciência e tecnologia dos materiais, 2011. Disponível em: [http://pt.scribd.com/doc/91647086/ Shot-Peening-Jateamento-por-Granalha-Cienciae-Tecnologia-dos-Materiais](http://pt.scribd.com/doc/91647086/Shot-Peening-Jateamento-por-Granalha-Cienciae-Tecnologia-dos-Materiais). Acesso em: 10 mai. 2021.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. *Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, New York. 2012. v. 2, p. 1-26.

SALDANHA, J. T.; *Emprego de nanopartículas em estratégias de prevenção e tratamento de infecções relacionadas à formação de biofilmes bacterianos*. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SÃO PAULO (ESTADO). Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE. *Surtos de doenças transmitidas por água e alimentos notificados – 2000-2012*. Informe NET: Dados estatísticos de doenças transmitidas por alimentos no Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 08 mai. 2021.

SCHUMACHER, J. F. *et al. Engineered nanoforce gradients for inhibition of settlement (attachment) of swimming algal spores*. PubMed. 2008. 24.9, pp. 4931–4937.

SHERLEY, M.; GORDON, D. M.; COLLIGNON, P. J. *Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of Escherichia coli*. Microbiology, 2004. 150: p. 1539-46.

SPENGLER, C.; NOLLE, F.; MISCHO, J.; *et al. Strength of bacterial adhesion on nanostructured surfaces quantified by substrate morphometry*. Nanoscale. 2019. 11; 19713-19722.

SPM, *Shot peening*. Course about structural failure and cases study. 2001.

STACHOWIAK, G. W.; BATCHELOR, A. W. *Engineering Tribology*. 4th ed. Elsevier, 2013.

STEPHENS, R. I.; FATEMI, A.; STEPHENS, R. R.; FUCHS, H. O. *Metal fatigue in engineering*. J. Wiley, New York. 2001. 2: 318.

STOODLEY, P. *et al. Biofilms as complex differentiated communities*. Annual Review of Microbiology. 2002. v. 56, p. 187-209.

STREVETT, K. A.; CHEN, G. *Microbial surface thermodynamics and applications*. Research in Microbiology. 2003. v. 154, p. 329-335.

TOTTEN, G. E. *Handbook of Metallurgical Process Design*. Marcel Dekker. 2004. 857-869.

TOUSSAINT, A.; GHICO, J. M.; SALMOND, G. P. C. *A new evaluation of our life-support system*. EMBO Reports. 2003. 4(9):820-4.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. *Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate*. Revista Liberato, Novo Hamburgo. 2013. v. 14, n. 22, p. 113-238.

TRUONG, V. K. *et al. Self-organised nanoarchitecture of titanium surfaces influences the attachment of staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa bacteria*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. 99, 6831–6840.

- UBBINK, J.; ZAMMARETTI, P. S. *Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces*. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2007. v. 12, p. 263-270.
- UÇKAY, I.; PITTET, D.; VAUDAUX, P.; SAX, H.; LEW, D.; WALDVOGEL, F. *Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis*. Annals of Medicine. 2009. 41: 109-119.
- VALCARCE, M. B.; BUSALMEN, S. R.; SÁNCHEZ, S. R. *The influence of the surface condition on the adhesion of Pseudomonas fluorescens (ATCC 17552) to copper and aluminium brass*. International Biodeterioration and Biodegradation. 2002. v. 50, p. 61-66.
- VALIEV, R. *Nanostructuring of metals by severe plastic deformation for advanced properties*. Nat. Materials. 2004. 3: 511-516.
- VALIEV, R. Z.; ISLAMGALIEV, R. K.; ALEXANDROV, I. V. *Bulk nanostructured materials from severe plastic deformation*. Prog. Material Science. 2000. 45: 103-189.
- VAN OSS, C. J. *Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfactants*. Current Opinion Colloids International Science. 1997. v. 2, p. 503-512.
- XAVIER, J. B., et al. *Monitorização e modelação da estrutura de biofilme*. Boletim de Biotecnologia, São Paulo, 2002.
- YAGUCHI, K., et al. *Virulence factors of avian pathogenic Escherichia coli strains isolated from chickens with colisepticemia in Japan*. Avian Dis, 2007. 51(3): p. 656-62.
- YANG, M.; DING, Y; GE, X.; LENG, Y. *Control of bacterial adhesion and growth on honeycomb-like patterned surfaces*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 135. 2015. 549–555
- WICKEN, J. S. *Thermodynamics and the conceptual structure of evolutionary theory*. Journal of theoretical biology. 1985. v. 117, p. 363-383.
- WILES, T. J.; KULESUS, R.R.; MULVEY, M.A. *Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli*. Exp Mol Pathol, 2008. 85(1): p. 11-9.
- ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. *Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern?* International Journal of Food Microbiology. 1994. v. 23, p. 125-148.