

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

ADRIELE JANAINA SILVA ROCHA

**Caracterização de Biofilmes de *Staphylococcus aureus* sobre
Vidros Contendo Óxido de Zinco: uma Abordagem Topográfica e
Nanomecânica em Microscopia de Força Atômica**

São Carlos - SP

2024

ADRIELE JANAINA SILVA ROCHA

Caracterização de Biofilmes de *Staphylococcus aureus* sobre Vidros Contendo Óxido de Zinco: uma Abordagem Topográfica e Nanomecânica em Microscopia de Força Atômica

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Henrique Staffa

Co-orientador: Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

São Carlos - SP

2024

Ao meu pai que sonhou antes de mim para que eu pudesse seguir neste mundo sonhando por ele e a minha mãe, que foi a muralha que me protegeu, a base sólida que sustentou meus passos e o farol que impediu que minha jornada se perdesse na escuridão.

A vocês eu dedico este Trabalho.

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Primeiramente, agradeço a minha mãe, Silvana da Silva Rocha, cujo apoio incondicional e amor foram a base sólida sobre a qual construí minha jornada acadêmica. Aos meus irmãos, Lucas, Abner e Eliabe, sou grata pelo carinho e pela força constante que sempre me deram. Um agradecimento especial também à minha sobrinha Anna Klara, cuja presença trouxe alegria e conforto durante este período.

Agradeço também às minhas queridas amigas, Laura, Lívia e Sarah, que estiveram ao meu lado com sua amizade sincera e incentivo constante. Ao meu companheiro, Arthur, meu profundo agradecimento pelo suporte e compreensão que me permitiram enfrentar os desafios com coragem e determinação.

Não posso deixar de mencionar o meu orientador, Prof. Dr. Lucas Henrique Staffa, e o co-orientador, Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza, cujas orientações valiosas e sabedoria foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também ao Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) e à doutoranda Thalia Delmondes pela disponibilização do material de análise essencial para a realização deste estudo.

Finalmente, um agradecimento especial ao Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela infraestrutura multiusuária disponibilizada que permitiu este trabalho acontecer. Além disso, agradeço toda a equipe técnica, cuja colaboração e *expertise* foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Resumo

Os biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* representam um desafio significativo em infecções hospitalares, especialmente em dispositivos médicos, devido a sua resistência a tratamentos antimicrobianos e ao sistema imunológico do hospedeiro. Neste contexto, a eficácia dos biomateriais, como os vidros bioativos, no combate a essas infecções, tem sido amplamente estudada. Este trabalho investiga a topografia e propriedades nanomecânicas dos biofilmes de *S. aureus* crescidos após 24 horas em superfícies vítreas dopadas com diferentes concentrações de óxido de zinco (ZnO) (5, 7,5 e 10% (m/m)), utilizando microscopia de força atômica (AFM). Os resultados mostraram que a presença de ZnO impacta significativamente a estrutura e a formação dos biofilmes. Em superfícies com 5% de ZnO, a topografia dos biofilmes revelou um aumento na rugosidade, indicando uma resposta defensiva das bactérias com produção de uma matriz extracelular mais robusta. No entanto, concentrações mais elevadas de ZnO (7,5 e 10% (m/m)) levaram à inibição da formação de biofilmes, com uma redução notável na altura e densidade do biofilme, resultando em superfícies mais lisas e menos colonizadas. As propriedades nanomecânicas dos biofilmes mostraram uma diminuição no módulo de elasticidade com o aumento da concentração de ZnO, enquanto a força de adesão apresentou um aumento. Esses resultados sugerem que o ZnO pode ser eficaz na inibição da formação de biofilmes e na melhoria das propriedades antimicrobianas de superfícies vítreas. Entretanto, o estudo revelou limitações, como a variabilidade na área de biofilme em altas concentrações de ZnO, o que pode afetar a robustez dos resultados. Para aprofundar o entendimento das interações biofilme-superfície e explorar potencialmente novas aplicações tecnológicas, futuras pesquisas devem investigar outras concentrações de ZnO e diferentes tipos de superfícies.

Palavras-chave: biofilmes, *Staphylococcus aureus*, óxido de zinco, microscopia de força atômica, propriedades nanomecânicas, superfícies vítreas.

Lista de Ilustrações:

Figura 01 – Etapas da formação do biofilme por <i>Staphylococcus aureus</i>	12
Figura 02 – Esquema do modo tapping no AFM.....	13
Figura 03 – Imagem mostrando a interação entre a ponta da sonda e a amostra com a deflexão do cantilever correspondente, nomeadas de A a E.....	14
Figura 04 – Princípio de operação do modo PeakForce QNM em AFM.....	16
Figura 05 – Imagens de AFM de altura de um biofilme de <i>S. aureus</i> crescido em vidro sem dopagem de óxido de zinco (Controle) e com de óxido de zinco a 5%.....	31
Figura 06 – Imagens de AFM de altura de um biofilme de <i>S. aureus</i> crescido em vidro com dopagem de óxido de zinco a 7,5% e a 10%.....	32
Figura 07 – Imagens de AFM de altura com eixos X, Y e Z de um biofilme de <i>S. aureus</i> crescido em vidro sem ZnO (Controle) e com ZnO a 5; 7,5 e 10%.....	32
Figura 08 – Imagens de módulo obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no modo PeakForce de um biofilme de <i>S. aureus</i> crescido em vidro óxido de zinco (Controle) e com de óxido de zinco a 5%.....	34
Figura 09 – Imagens de módulo obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no modo PeakForce de um biofilme de <i>S. aureus</i> crescido em vidro com dopagem de óxido de zinco a 7,5% e a 10%.....	35
Figura 10 – Imagens de adesão obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no modo PeakForce de um biofilme de <i>S. aureus</i> crescido em vidro sem dopagem de óxido de zinco (Controle) e com de óxido de zinco a 5%.....	36
Figura 11 – Imagens de adesão obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no modo PeakForce de um biofilme de <i>S. aureus</i> crescido em vidro com óxido de zinco a 7,5% e a 10%.....	37
Figura 12 – Imagens de deformação obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no modo PeakForce de um biofilme de <i>S. aureus</i> crescido em vidro sem dopagem de óxido de zinco (Controle) e com de óxido de zinco a 5%.....	38
Figura 13 – Imagens de adesão obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no modo PeakForce de um biofilme de <i>S. aureus</i> crescido em vidro com dopagem de óxido de zinco a 7,5% e a 10%.....	39
Figura 14 – Imagens de AFM das amostras de biofilme de <i>S. aureus</i> crescido em vidro com diferentes concentrações de óxido de zinco, com máscaras de exclusão por altura.....	40
Figura 15 - Gráfico de rugosidade média aritmética de área por porcentagem de ZnO após zero e 24 horas de crescimento de <i>S.aureus</i>	41
Figura 16 - Gráfico de rugosidade máxima de área por porcentagem de ZnO após zero e 24 horas de crescimento de <i>S. aureus</i>	42
Figura 17– Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilme de <i>S. aureus</i> crescido em vidro sem óxido de zinco (controle 0%).....	44

Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilme de *S. aureus* crescido em vidro com 7,5% óxido de zinco..... 45

Figura 20 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilme de *S. aureus* crescido em vidro com 10% óxido de zinco..... 45

Sumário	
Agradecimentos	3
Resumo	4
Lista de Ilustrações:	5
Sumário	7
1. Introdução	9
2. Revisão bibliográfica:	11
2.1. Staphylococcus aureus.....	11
2.2. Microscópio de Força Atômica:.....	12
2.2.1.1. Curva do PeakForce.....	15
2.2.2. Calibrações.....	18
2.2.2.1. Relativa.....	18
2.2.2.2. Absoluta.....	19
2.3. Superfície Vítrea:.....	20
3. Objetivo	23
4. Materiais e Métodos:	24
4.1. Preparação do Substrato:.....	24
4.2. Cultivo dos Biofilmes.....	26
4.3. Análise em Microscopia de Força Atômica:.....	27
4.3.1. Calibração:.....	27
4.3.2. Parâmetros de Análise.....	28
4.3.3. Método de Edição.....	29
4.3.3.1. Medidas de Rugosidade.....	30

4.4. Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).....	30
5. Resultados.....	31
5.1. Análise Topográfica dos Biofilmes.....	31
5.2. Caracterização Nanomecânica.....	34
5.2.1. Módulo de Elasticidade.....	34
5.2.2. Adesão.....	37
5.2.3. Deformação.....	39
5.3. Parâmetros de Rugosidade.....	41
5.3.1. Média aritmética da altura (S_a).....	41
5.3.2. Altura Máxima (S_z).....	42
5.4. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
6. Conclusões:.....	48
7. Perspectivas e Trabalhos Futuros.....	49
8. Referências.....	50

1. Introdução

Os biofilmes formados por *Staphylococcus* são agregados multicelulares encapsulados em uma matriz extracelular. Essas células bacterianas podem aderir a superfícies e são responsáveis por muitas infecções hospitalares, colonizando dispositivos médicos como ventiladores, cateteres e implantes. Na forma de biofilme, elas demonstram uma resistência aumentada a agentes antimicrobianos (Archer et al., 2011). A formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* apresenta um grande desafio clínico, devido à sua capacidade de resistir a tratamentos convencionais e ao sistema imunológico do hospedeiro. Essa resistência complica e encarece os tratamentos, além de aumentar o tempo de hospitalização dos pacientes.

Os biomateriais, podem ser descritos como qualquer substância ou combinação de substâncias, excluindo fármacos, que tenham interação com sistemas biológicos com o objetivo de tratar, melhorar ou substituir tecidos, órgãos ou funções corporais (Parida et al., 2012), e devem cumprir requisitos como a promoção do crescimento e proliferação celular, serem biodegradáveis em taxas que acompanham o crescimento do tecido original, serem biocompatíveis e apresentar propriedades mecânicas adequadas à sua aplicação (Gómez et al., 2016). Esses materiais têm sido historicamente utilizados para substituir ou regenerar tecidos danificados ou doentes, melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Vidros bioativos foram descobertos em 1969 e representaram a primeira alternativa para a ligação interfacial entre um implante e o tecido hospedeiro. A composição original do Bioglass® 45S5 está em uso clínico desde 1985. A descoberta do 45S5 impulsionou diversos estudos para o desenvolvimento de novos vidros bioativos. Existe uma grande variedade de materiais cerâmicos que são bioativos ou biocompatíveis, utilizados na reparação de tecidos duros, como ossos, articulações e dentes (Hench e Wilson, 1993).

Milhões de cirurgias de implantes são realizadas anualmente, com mais de 50 tipos de implantes feitos de 40 tipos diferentes de biomateriais. Há grande preocupação com falhas pós-operatórias, sendo as infecções uma das mais preocupantes (Hench, 1996).

Infecções associadas a implantes cirúrgicos são difíceis de tratar e geralmente requerem longos períodos de terapia com antibióticos, o que prolonga a hospitalização (Whitehouse et al., 2002). Muitas vezes, é necessário revisar todo o

processo, com cirurgias adicionais que apresentam altos riscos de complicações (Peel, Buising e Choong, 2012). Além disso, infecções nos ossos e articulações são particularmente difíceis de tratar devido às suas características fisiológicas e anatômicas (Lew e Waldvogel, 2004).

Para as pessoas que permanecem sob observação em hospitais, além da atenção com Infecções no Sítio Cirúrgico (ISC), que caracteristicamente envolvem biofilmes bacterianos, existem aquelas que podem se iniciar a partir de feridas ou lesões presentes no corpo do paciente. Um dos microrganismos mais frequentemente encontrados nos casos de ISC é o *Staphylococcus aureus*, uma bactéria que apresenta resistência a diversas drogas utilizadas atualmente para combatê-lo, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (Darouiche, 2004; Lew; Waldvogel, 2004).

A atividade bactericida é uma propriedade muito importante do vidro bioativo que, em conjunto com suas características regenerativas, contribui para a prevenção e o combate a infecções. Pesquisas recentes têm explorado sua aplicação como uma estratégia promissora para prevenir e combater infecções associadas a dispositivos biomédicos.

Esses vidros, incluindo novas formulações desenvolvidas em laboratórios como o Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), têm mostrado eficácia na atividade bactericida *in vitro* contra microrganismos planctônicos e oferecem um potencial alternativa para combater infecções de biofilmes bacterianos em humanos (Siqueira, 2011; Crovace, 2016; Negar, 2023).

Neste contexto, este estudo visa não apenas compreender a resistência dos biofilmes de *S. aureus* formados em superfícies vítreas com óxido de zinco, mas também explorar novas abordagens avançadas para a caracterização desses biomateriais. Para tanto, focou-se no uso da Microscopia de Força Atômica (AFM), uma técnica de de Microscopia de Varredura por Sonda (SPM) que utiliza uma sonda extremamente afiada para escanear a superfície de uma amostra, fornecendo informações topográficas detalhadas e interações físicas com a camada mais externa da superfície de uma amostra. A combinação de análises detalhadas dos biofilmes com a investigação de novos materiais pode pavimentar o caminho para soluções inovadoras em implantes, especialmente os odontológicos.

2. Revisão bibliográfica:

2.1. *Staphylococcus aureus*

Conforme descrito por HOLT *et al.*, (1994), a *Staphylococcus aureus* mede entre 0,5 e 1,5 μm de diâmetro e pode aparecer sozinho, em pares, em cadeias curtas ou agrupados em cachos. A Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) descreve as condições que permitem o seu crescimento e sobrevivência em ambientes com temperaturas entre 7 a 46°C com uma temperatura ótima de 35 a 37°C, sendo altamente resistente a variações de temperatura e a períodos relativamente longos de restrição de nutrientes, além de possuir uma alta osmotolerância.

Devido às suas características intrínsecas, este microrganismo possui ampla distribuição, podendo permanecer viável por períodos elevados. Além disso, é comumente encontrada no corpo humano, em sítios anatômicos como pele, intestino e vias aéreas superiores (cavidades nasais, faringe e laringe), podendo partir dessas regiões para outras onde a pele ou mucosa, que são barreiras naturais, estejam comprometidas (Tong *et al.*, 2015).

Em ensaios clínicos, o isolamento de *S. aureus* de feridas cirúrgicas infectadas possui alta frequência, o que pode representar focos para desenvolvimento de infecções sistêmicas. Sendo também, a bactéria mais comum em infecções ósseas, artrites sépticas e infecções de próteses ósseas (Santos *et al.*, 2007).

Os biofilmes são agregados multicelulares revestidos por uma matriz extracelular, formando uma espécie de comunidade microbiana, que conferem uma proteção significativa às células bacterianas, tornando-as altamente resistentes a agentes antimicrobianos. Essa matriz também pode ser chamada de substância polimérica extracelular (SPE), que cresce ao redor e sobre as células e é composta por polissacarídeos, DNA extracelular, proteínas, lipídios, surfactantes, flagelos e pili (Abrantes *et al.*, 2022). A resistência resultante faz dos biofilmes uma das principais causas de infecções persistentes e difíceis de tratar, já que essa matriz polimérica se forma especialmente em ambientes hospitalares. Os biofilmes de *Staphylococcus aureus* são particularmente problemáticos devido à sua capacidade de colonizar superfícies de dispositivos biomédicos, como cateteres, respiradores e dispositivos implantáveis.

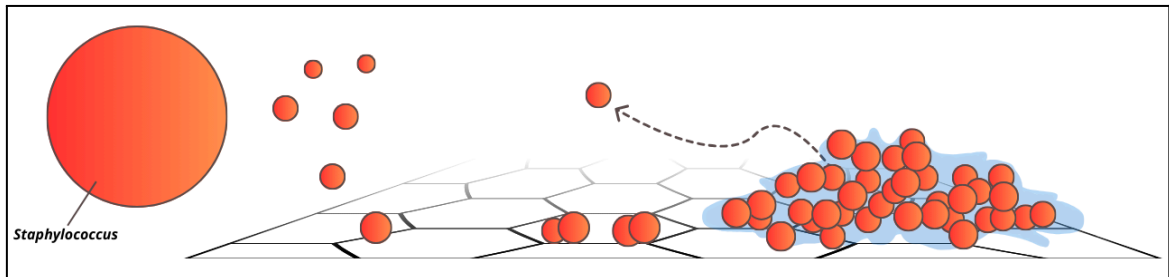


Figura 01 – Etapas da formação do biofilme por *Staphylococcus aureus*.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A formação de biofilmes por *S. aureus* ocorre em várias etapas, como é possível observar na **Figura 01**. A formação inicia-se com a adesão aleatória das células bacterianas a uma superfície, mediada pela interação de estruturas celulares ao substrato; essa interação com a superfície gera um sinal específico para a formação de microcolônias, com a síntese de moléculas de sinalização intercelular e polissacarídeos extracelulares, e a maturação do biofilme. Entretanto, a formação do biofilme não o torna estático, ou seja, as células podem se desvencilhar da matriz culminando na sua dispersão para colonizar novas áreas. A matriz extracelular do biofilme proporciona uma barreira física que protege as bactérias não apenas dos antimicrobianos, mas também do sistema imunológico do hospedeiro (Pelczar et. al., 1997).

2.2. Microscópio de Força Atômica:

O Microscópio de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy* - AFM) é um microscópio de varredura de sonda que possibilita a obtenção de imagens de alta resolução sem o uso de qualquer radiação ionizante. Desde sua introdução à comunidade científica pela primeira vez em 1986, seu uso vem sendo uma técnica amplamente utilizada (BRUKER, 2017). O AFM foi desenvolvido por Binnig, Rohrer e Quate e foi desenvolvido a partir da evolução do Microscópio de Tunelamento por Varredura, invento este que rendeu a Binnig e Rohrer o Prêmio Nobel de Física em 1986.

É fundamental compreender que o funcionamento do AFM não envolve a ampliação de uma imagem óptica. Sua operação baseia-se na interação entre uma ponta extremamente afiada e a superfície da amostra, detectada por meio de variações nas forças de interação. A ponta, mantida em um *cantilever* flexível, em maioria feitos de silício ou nitreto de silício, responde às forças de atração e repulsão entre seus átomos e os da superfície da amostra, movendo-se para cima e para

baixo enquanto varre a superfície da amostra. Um laser é direcionado para a parte traseira da sonda e é refletido em um fotodetector de quatro (4) seções, que detecta a deflexão do *cantiléver* e o traduz em sinais elétricos.

Em alguns AFMs, o sistema de controle mantém uma altura da ponta constante ajustando continuamente a distância entre ela e a amostra, compensando as forças de repulsão como ilustrado na **Figura 02**. Esse processo, conhecido como *feedback* de altura, permite a digitalização da superfície da analisada em um padrão predeterminado. Durante a varredura em modo topográfico, a ponta registra as alterações na altura, essas informações são usadas para criar imagens topográficas extremamente precisas da superfície da amostra (Bhushan, 2004). Em adição ao modo de contato, o AFM pode operar em modos como não-contato, contato intermitente (*tapping mode*) e força lateral, proporcionando diferentes tipos de informações que são geradas simultaneamente à topografia. Além de permitir análise em diferentes condições de trabalho, operando tanto em ar, como em vácuo ou em fluido.

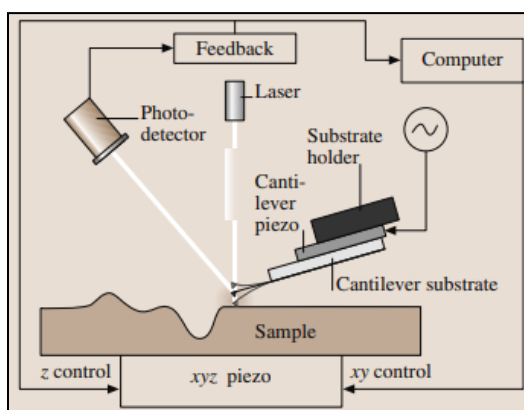


Figura 02 – Esquema do modo *tapping* no AFM.
Fonte: Bhushan. B, 2004.

Ao iniciar uma análise com o microscópio de força atômica (AFM), a ponta do *cantilever* é cuidadosamente aproximada da superfície da amostra. Durante a varredura da superfície, as interações entre a ponta e a amostra provocam uma curvatura no *cantilever*, ilustrado na **Figura 03**. Inicialmente, essas interações são dominadas por forças atrativas de Van der Waals, que se transformam em forças repulsivas quando a ponta se aproxima muito da superfície. As deflexões do *cantilever*, resultantes dessas interações, são medidas através da reflexão de um feixe de laser na parte traseira do *cantilever* em direção a um fotodetector de quatro (4) seções sensível à posição (**Figura 02**), transformando a deflexão do *cantilever*

em sinais elétricos. Qualquer desvio na deflexão altera a posição do feixe de laser. Devido à amplificação gerada pela grande distância entre o *cantilever* e o fotodetector, em comparação com o comprimento do *cantilever*, esse sistema permite a detecção de deflexões minúsculas, na escala sub-angstrom. (BRUKER, 2017).

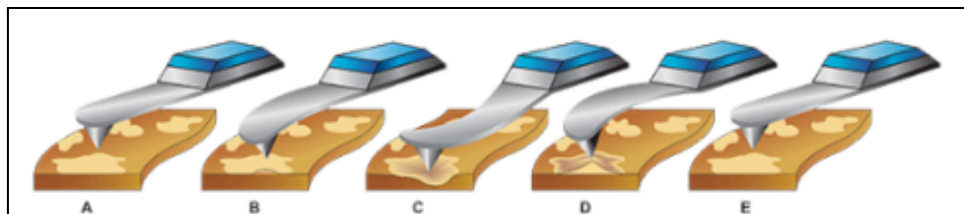


Figura 03 – Imagem mostrando a interação entre a ponta da sonda e a amostra com a deflexão do cantilever correspondente, nomeadas de A a E.

Fonte: Adaptado de Bruker, 2024.

Segundo o site da Bruker, “O exclusivo PeakForce Tapping® da Bruker tem sido o avanço científico mais significativo na tecnologia de microscópio de força atômica (AFM) desde a introdução do Tapping Mode™”. Esse modo de análise trata-se de uma abordagem avançada que oferece dados detalhados sobre as propriedades nanomecânicas da superfície da amostra. Ao contrário do modo de contato convencional, o PeakForce Tapping® opera dinamicamente, com a ponta se aproximando periodicamente da amostra e aplicando forças intermitentes durante o ciclo. Durante cada ciclo, a força aplicada pela ponta atinge um valor mínimo conhecido como PeakForce, que ocorre quando a ponta está na aproximação máxima da amostra. Esse processo permite precisão nas propriedades nanomecânicas da superfície. Em tempo real, o AFM analisa continuamente a força necessária para manter o PeakForce constante, fornecendo informações da resposta mecânica da amostra.

As imagens geradas por esse modo de análise fornecem informações detalhadas sobre diferentes propriedades mecânicas da amostra, como:

- (i) Módulo de elasticidade, onde cada *pixel* na imagem corresponde à “rigidez” da sua região analisada, sendo que as áreas mais claras indicam regiões mais “rígidas”, enquanto áreas mais escuras indicam regiões menos “rígidas”. Por mais que o termo “rigidez” não seja equivalente a módulo de elasticidade, neste trabalho será utilizado este termo como a resistência à deformação elástica, ou mais

precisamente, a resistência à separação de átomos adjacentes, um indicativo de forças de ligação interatômica;

- (ii) Adesão, que destacam as forças adesivas entre a ponta e a amostra, revelando as variações na aderência em diferentes partes da superfície. Regiões de alta adesão são representadas por tons mais claros, proporcionando maior interação entre a ponta e a amostra, podendo fornecer interpretações sobre a presença de diferentes materiais ou regiões quimicamente distintas na amostra;
- (iii) Deformação, que mostram a resposta da amostra à aplicação de forças pela ponta, representando as deformações locais na superfície, onde as áreas mais deformadas indicam maior complacência ou elasticidade, o que pode estar associado à flexibilidade de materiais ou à presença de regiões com diferentes propriedades mecânicas;
- (iv) Imagem de altura, que são as mais amplamente utilizadas, e fornecem uma representação topográfica específica da superfície da amostra em que as variações na altura da amostra são mapeadas, revelando características como rugosidades, “degraus” e detalhes da morfologia.

A combinação destas imagens oferece uma ampla visão das propriedades físicas e químicas de uma amostra, permitindo análises detalhadas e precisas de suas propriedades e interações.

2.2.1.1. Curva do PeakForce

A curva PeakForce é uma representação detalhada das interações entre uma ponta e a superfície. Este processo pode ser dividido em quatro partes distintas, cada uma oferecendo informações específicas sobre as propriedades da amostra.

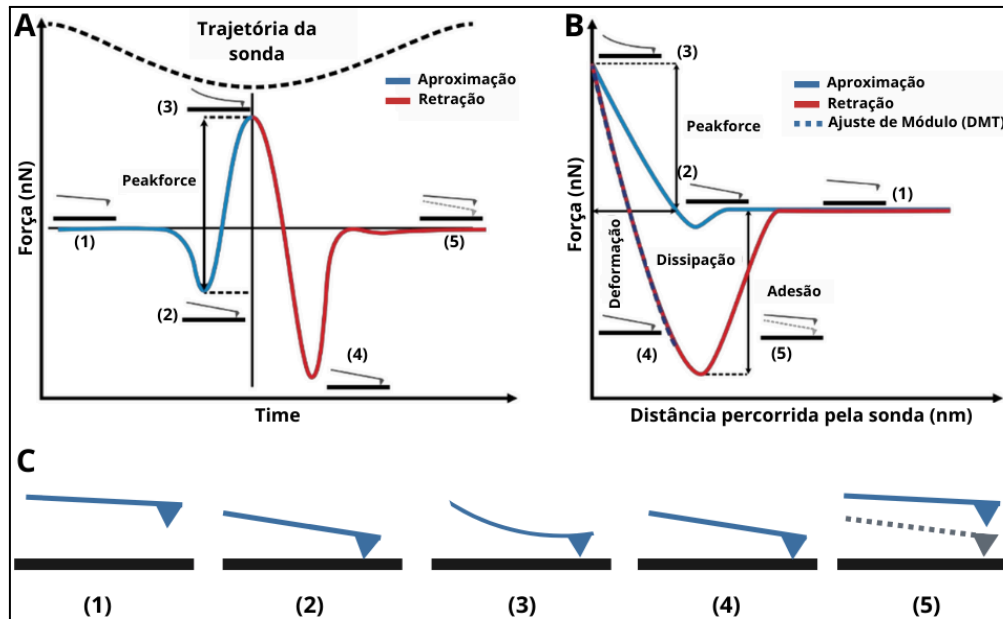


Figura 04 – Princípio de operação do modo PeakForce QNM em AFM.

(A) Esquema das curvas de força para um cantilever operando em Peak Force Tapping®, (B) esquema da curva de força-distância obtida em cada ciclo e (C) aproximação e retirada da ponta do AFM em um único ciclo de modulação.

Fonte: Adaptado de Kwaśniewska et al., 2023.

Na fase de aproximação, a ponta do *cantilever* se move em direção à superfície da amostra. Durante essa etapa, é possível obter informações sobre a relação entre a ponta e a superfície antes de haver um contato real, observando a relação entre a deflexão do *cantilever* e a distância percorrida até o contato, fornecendo uma visão inicial da mecânica da superfície.

Quando a ponta entra em contato (ponto 1) com a superfície da amostra, ocorre o contato inicial. Neste ponto, a força necessária para manter a ponta em contato com a superfície é registrada como a adesão inicial que fornece as propriedades adesivas entre a ponta e a superfície da amostra.

Durante a fase de compressão, a ponta continua a pressionar a superfície da amostra até atingir a força máxima, conhecida como PeakForce (ponto 3), aumentando a deflexão do *cantilever*. A força máxima registrada neste ponto reflete as propriedades mecânicas máximas da amostra, fornecendo uma medida essencial da resistência da superfície e da capacidade de suportar forças. Essa etapa permite a obtenção de informações sobre a “rigidez” da amostra. Caso o *cantilever* da sonda utilizada tenha a constante de mola conhecida e rígida o suficiente, também é possível calcular o módulo de elasticidade (ou módulo de Young), que reflete a relação entre a força aplicada e a deformação elástica da amostra. O pico de força refere-se à força máxima aplicada durante o ciclo de compressão.

Após o pico de força, a ponta começa a se afastar da superfície, marcando a fase de descompressão (ponto 4). Nesta fase, a elasticidade da amostra é avaliada pela capacidade de recuperação após a compressão, onde a voltagem aplicada é invertida, refletindo no afastamento da sonda da superfície da amostra. Com isso, a diferença entre as curvas de carregamento e descarregamento, gerada pela adesão entre os átomos da ponta e da superfície da amostra, faz a sonda continuar aderida e defletir inversamente, fornecendo informações sobre a dissipação de energia.

Finalmente, na fase de retração, a ponta se afasta completamente da superfície da amostra (ponto 5). A força necessária para separar a ponta da superfície, chamada de força de adesão final, é registrada. Esta medida indica as interações adesivas restantes entre a ponta e a amostra e fornece dados sobre a natureza das forças de contato entre os dois.

A curva de força *versus* tempo é mostrada na **Figura 04** (A), que ilustra a operação do modo PeakForce Tapping® e a trajetória da ponta. Usando as configurações do *scanner* calibrado, o sistema converte a curva de força-tempo, **Figura 04** (A), na curva de força-distância mostrada na **Figura 04** (B). (S. N. Nahar et. al., 2015). O cálculo do módulo de elasticidade está demonstrado na **Equação 1**.

$$E = \frac{(1-\nu^2) \cdot F}{2 \cdot R \cdot \delta^2} \quad \text{(Equação 1)}$$

Sendo (E) o módulo de elasticidade da amostra, (ν) o coeficiente de Poisson da amostra, (R) é o raio da ponta do *cantilever*, (δ) a profundidade de penetração da ponta na amostra e (F) é a força aplicada pelo *cantilever* na amostra, essa força é calculada a partir da Lei de Hooke para deflexão que é quando a ponta da sonda que é suficientemente afiada acoplada ao *cantilever* é aproximada da superfície a alguns nanômetros de distância. Pode-se medir as forças interativas através de mudanças no feixe de laser defletido, esta relação linear permite calcular a força aplicada com base na deflexão medida. (B. Bhushan, 2004).

A adesão e a histerese (ou dissipação) são parâmetros críticos na análise das propriedades mecânicas de biofilmes. A força de adesão é determinada no momento em que a ponta da sonda de AFM se destaca da superfície do biofilme. Essa força é diretamente utilizada para calcular o valor de adesão, refletindo a intensidade da interação entre o biofilme e o substrato. Uma maior força de adesão indica uma

ligação mais forte entre o biofilme e a sonda, enquanto uma força de adesão menor sugere uma interação mais fraca.

Já a histerese é analisada através da área entre as curvas de carregamento e descarregamento durante o ciclo de medição. Essa área representa a energia dissipada durante o ciclo de carga e descarga. A histerese fornece percepções sobre como o biofilme responde a deformações mecânicas, revelando características como a capacidade de dissipar energia e resistir a deformações, aspectos cruciais para entender a estabilidade e a durabilidade dos biofilmes em diferentes condições.

2.2.2. Calibrações

A calibração relativa e a calibração absoluta servem diferentes propósitos no uso do AFM em modo Peak Force e ambas tem como objetivo converter a unidade básica de *volts*, em unidade de força (newtons). Enquanto a calibração relativa é adequada para garantir consistência e precisão em um contexto experimental específico, a calibração absoluta é essencial para assegurar que as medições sejam rastreáveis a unidades físicas padronizadas, proporcionando a mais alta precisão e confiabilidade. A escolha entre esses métodos depende dos requisitos específicos da aplicação e do nível de precisão necessário.

2.2.2.1. Relativa

A calibração relativa é um passo crucial para garantir a precisão e a reprodutibilidade dos dados obtidos pelo Microscópio de Força Atômica (AFM) em modo PeakForce Tapping[®]. Esse processo envolve ajustar e verificar a resposta do equipamento e da ponta do *cantilever* em relação a padrões conhecidos, garantindo que as medições de força e deslocamento sejam exatas. Nesse processo é realizada a calibração do *cantilever*, utilizando-se padrões de referência com propriedades mecânicas conhecidas para que seja possível verificar a precisão de suas propriedades como: a sensibilidade de deflexão, determinação de sua constante de mola, ajustes de amplitude e frequência de oscilação da ponta para certificar-se de que a ponta da sonda atinja a força de pico necessária a cada ciclo de oscilação. Como também, garantir que o sistema de *feedback* esteja ajustado, ou seja, que a ponta mantenha uma altura constante em relação a amostra durante o processo de varredura, permitindo uma resposta estável e precisa às variações no relevo da amostra.

Por se basear em padrões internos com referências conhecidas, esse modo pode não converter diretamente as medições para unidades físicas absolutas, mas garante que as medições sejam consistentes e comparáveis dentro de um conjunto de amostras ou condições experimentais, oferecendo precisão suficiente para aplicações de pesquisa onde a comparação entre amostras é mais importante que a medição absoluta.

2.2.2.2. Absoluta

A calibração absoluta é um processo rigoroso que visa determinar a precisão das medições do Microscópio de Força Atômica (AFM) em termos de unidades físicas conhecidas e padronizadas, como Newtons para força ou nanômetros para deslocamento. Ao contrário da calibração relativa, que ajusta as medições em relação a padrões internos ou amostras de referência conhecidas, a calibração absoluta busca uma correspondência direta com unidades de medida reconhecidas internacionalmente.

Esse método utiliza padrões de referência certificados e métodos de metrologia para assegurar que as medições sejam diretamente rastreáveis a unidades de medida padronizadas, fornecendo a mais alta precisão para aplicações onde as medições quantitativas absolutas são necessárias.

A análise de biofilmes de *Staphylococcus aureus* utilizando o Microscópio de Força Atômica (AFM) em modo PeakForce® beneficia-se significativamente da calibração relativa, sendo mais rápida, menos complexa e considerando os objetivos e a natureza específica do estudo. Tratando-se de uma calibração altamente eficaz para garantir a consistência das medições entre diferentes amostras, exercendo um papel crucial ao objetivo de comparar as diferentes condições experimentais de variação de substrato.

Neste presente estudo de biofilmes de *S. aureus*, o interesse principal está nas diferenças relativas das propriedades mecânicas, como módulo de elasticidade, deformação e adesão. A calibração relativa é suficiente para detectar e quantificar essas diferenças com alta precisão, proporcionando dados relevantes para entender a variação nos comportamentos dos biofilmes.

Esse método de calibração permite que sejam feitos ajustes rápidos e eficazes nos parâmetros do equipamento, como a sensibilidade de deflexão e a constante de mola do *cantilever*, com base em amostras de referência específicas

do estudo. Essa flexibilidade é particularmente útil em estudos exploratórios onde os parâmetros podem necessitar de ajustes com maior frequência.

2.3. Superfície Vítrea:

Os vidros bioativos (BGs) têm sido cada vez mais investigados para aplicações em engenharia tanto de tecidos ósseos quanto de tecidos moles. BGs exibem uma capacidade única de ligação óssea ao formar uma camada de hidroxiapatita após a incubação em fluidos fisiológicos, além de suportar processos biológicos regenerativos, como angiogênese e osteogênese, durante sua dissolução. Composições específicas de BGs podem ainda proporcionar atividade antibacteriana e/ou induzir uma resposta anti-inflamatória. Devido a essas propriedades, BGs têm grande potencial em sistemas de regeneração óssea, entrega de medicamentos, reparo de tecidos moles e cicatrização de feridas. (PANTULAP, 2021).

A bioatividade de materiais foi inicialmente descrita em biocerâmicas, como hidroxiapatita e vidros bioativos, sendo definida como "a capacidade de materiais se ligarem, ou aderirem a tecidos vivos" (Hench, 1991). Materiais inertes, como silicone e ouro, formam uma camada fibrosa ao redor do implante, impedindo essa adesão (Souza et al., 2001). No entanto, para implantes com função estrutural, essa integração é essencial. Assim, a bioatividade deve ser compreendida como "a capacidade dos materiais de interação com os tecidos vivos de tal modo a estimular processos físico-químicos protetores a sistemas biológicos capazes de permitir a integração do biomaterial no ambiente receptor" (Souza et al., 2001).

Em 1969, Hench et al. utilizaram o diagrama de fases $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ para desenvolver o primeiro BG, chamado "45S5 BG", com a composição: 45 SiO_2 -24,5 CaO -6 P_2O_5 -24,5 Na_2O (em % em massa). O 45S5 BG tem sido considerado para aplicações médicas desde 1985, com os primeiros implantes cirúrgicos de 45S5 BG sendo usados para substituir pequenos ossos no ouvido médio para tratar a perda auditiva condutiva.

Nas últimas décadas, um variado número de composições de BGs nos sistemas de silicato, borosilicato, borato e fosfato foram desenvolvidos e caracterizados. Em geral, a adição de modificadores de vidro tem efeitos significativos nas propriedades do vidro, incluindo a bioatividade. Os íons biologicamente ativos têm sido amplamente utilizados para melhorar a eficácia física e biológica dos vidros bioativos (BGs) para essa funcionalidade. Os íons metálicos,

além de serem vitais para a saúde, oferecem uma alternativa mais acessível a medicamentos caros. Muitos estudos têm explorado a incorporação de íons metálicos em BGs. A adição de íons como Ag^+ , Li^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ga^{3+} e B^{3+} aos sistemas de silicato, fosfato e borato de BGs tem sido comum, visando promover osteogênese, angiogênese, bioatividade, efeitos antibacterianos e imunomoduladores para a regeneração de tecidos, além do tratamento de infecções e câncer. Recentemente, BGs dopados com íons menos comuns têm ganhado destaque por suas propriedades funcionais e efeitos terapêuticos, tornando-se promissores na regeneração de tecidos (Hope, 2011).

O zinco, essencial em diversos processos biológicos, atua também como um agente antimicrobiano promissor quando aplicado em materiais odontológicos e de saúde. No contexto de tratamentos periodontais, o zinco e seus sais, como o óxido de zinco (ZnO), têm demonstrado eficácia significativa na inibição de patógenos orais (Goudouri et al., 2014). O óxido de zinco, em particular, é conhecido por suas propriedades antimicrobianas e tem sido incorporado em diversos sistemas de liberação para tratamento de periodontite. Em estudos recentes, o zinco demonstrou capacidade para suprimir o crescimento de *S. aureus*, uma bactéria relevante em infecções periodontais e peri-implantares (Lipovsky, 2011). A utilização de vidro dopado com ZnO permite explorar a eficiência desse material na inibição de *S. aureus*, aproveitando as propriedades antimicrobianas do zinco para melhorar o tratamento de infecções periodontais e outras condições relacionadas

A adição de ZnO a vidros resulta em uma estrutura amorfa que não causa cristalização, o que é crucial para manter as propriedades desejadas. Análises de propriedades físicas e ópticas indicam que o vidro dopado com 5% de ZnO mantém características semelhantes como densidade, índice de refração, transmissão e absorção de luz, e estabilidade térmica, que permanecem comparáveis ao vidro de referência (Demirel; Taygun, 2023). Esses resultados indicam que o vidro com ZnO é uma opção promissora para aplicações em setores críticos, como saúde e indústria alimentícia. Na literatura também é possível encontrar testes com vidro borossilicato dopado com ZnO que exibem uma alta atividade contra *S. aureus*, evidenciando a eficácia do ZnO como agente antibacteriano. No entanto, o vidro dopado com ZnO demonstraram uma atividade antibacteriana reduzida, devido à estrutura cristalina do vidro cerâmico, que limita a liberação de íons de zinco e, conseqüentemente, compromete a eficácia antibacteriana do material (DEMIREL; TAYGUN, 2023).

A combinação das propriedades antimicrobianas do ZnO com a preparação meticulosa das superfícies vítreas permite uma investigação detalhada da interação entre os biofilmes de *S. aureus* e as superfícies modificadas. Utilizando a microscopia de força atômica, exploraremos ao longo desse trabalho a topografia e as propriedades nanomecânicas dos biofilmes formados nas diferentes concentrações de ZnO. Além disso, sua natureza inerte contribui para uma maior prevenção a longo prazo, reduzindo riscos de reações adversárias e garantindo maior estabilidade.

3. Objetivo

O objetivo geral deste trabalho visa compreender a resistência dos biofilmes à presença de vidros bioativos e explorar como essas superfícies podem influenciar a formação e comportamento dos biofilmes bacterianos.

Para tanto, algumas metas são necessárias:

- Preparar biofilmes de *S. aureaus* em substratos de biovidros dopados com diferentes teores de ZnO;
- Após 24 horas de crescimento, analisar a superfície dos biovidros *via* microscopia de força atômica (AFM) com abordagem topográfica. A fim de complementar esta abordagem, análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) também foram realizados.
- Calibração relativa do AFM para abordagem nanomecânica;
- Avaliar as propriedades nanomecânicas dos biofilmes formados sobre essas superfícies: módulo de elasticidade, adesão e deformação;
- Aferir a respeito da rugosidade dos biofilmes e da interação com o substrato;
- Comparar a eficácia dos vidros bioativos com óxido de zinco em relação a outros materiais biomédicos na prevenção à formação de biofilmes bacterianos.

4. Materiais e Métodos:

4.1. Preparação do Substrato:

Vidros dopados com diferentes concentrações de ZnO (0, 5, 7,5 e 10% (m/m)), foram doados pelo Laboratório de Materiais Vítreos (LAMAV) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Estes foram utilizados para avaliar a atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. Os corpos de prova foram preparadas com uma composição que inclui um alto teor de SiO₂ (>65% em mol), além de óxidos minoritários como Al₂O₃, CaO, Li₂O, MgO, Na₂O, TiO₂, ZrO₂, e das concentrações de ZnO como agente bactericida de forma significativa para a condução das análises deste trabalho.

Para preparar os vidros como substrato de biofilmes para análise em microscopia de força atômica (AFM), é essencial garantir que o substrato esteja o mais polido possível. Todos os discos de vidro com dimensões de aproximadamente 14 mm de diâmetro e 1 mm de altura, foram submetidos a um rigoroso processo de polimento para assegurar a qualidade necessária para a análise em AFM. O procedimento seguiu as etapas descritas a seguir:

- (i) Os corpos de prova de vidro foram fixadas em um suporte utilizando cola instantânea Tekbond. Neste processo, os corpos de prova com a mesma percentagem em massa de ZnO foram coladas em conjunto nos suportes, garantindo que recebessem o mesmo tratamento de lixamento e polimento. Este método assegurou que os corpos de prova, com concentrações idênticas de ZnO, apresentassem exatamente o mesmo padrão de superfície após o polimento. Tal fato é imperativo para manter a uniformidade no tratamento da superfície dos corpos de prova e para garantir que quaisquer variações observadas nas análises subsequentes pudessem ser atribuídas a diferenças intrínsecas nos vidros, e não a discrepâncias dos substratos;
- (ii) Em seguida, o preparo envolveu um detalhado lixamento para garantir uma superfície mais lisa e homogênea, utilizando politriz rotativa da Pantec, POLIPAN-U, com lixas d'água de granulação progressiva. Cada etapa do lixamento foi cuidadosamente monitorada para assegurar a eficiência do processo e a integridade dos corpos de prova. O processo foi

iniciado com a lixa de granulação 400, para a remoção das irregularidades mais pronunciadas e das imperfeições superficiais visíveis, suavização das áreas mais ásperas e preparação da superfície para as etapas subsequentes de lixamento. A cada etapa do processo, a granulação da lixa foi incrementada. Após o uso da lixa de granulação 400, a transição para a lixa de granulação 600 permitiu a remoção de arranhões maiores e a continuidade do alisamento da superfície. O uso da lixa de granulação 800 prosseguiu com o refinamento da superfície, enquanto a lixa de granulação 1000 e 2000 foram utilizadas para ajudar no preparo do corpo de prova para o polimento mais fino e suavizar ranhuras causadas pelas granulometrias anteriores, a fim de garantir que o vidro atingisse o nível desejado de suavidade e uniformidade. Todo o processo foi realizado com a utilização de água, para remover os resíduos de lixamento e a manter a temperatura da superfície dos corpos de prova controladas. Cada lixa foi aplicada por um período de vinte minutos em uma politriz rotativa da Pantec, POLIPAN-U, com uma rotação constante de 150 rpm, assegurando um lixamento uniforme e eficaz. Esse método meticuloso garantiu que a superfície do vidro fosse preparada adequadamente para a etapa de polimento fino, essencial para as análises posteriores;

- (iii) Em seguida, os corpos de prova foram submetidos a um polimento em uma politriz vibratória Minimet 1000 da Grinder Polisher. Para isso, foi utilizada uma pasta de diamante com granulometria de 1 μ m, garantindo um polimento fino e uniforme. Os vidros foram polidos por um período de 2 horas, sob uma carga constante de 2 libras. Esse polimento com pasta de diamante é essencial para atingir o nível de suavidade e planicidade necessário para a análise em AFM, permitindo uma caracterização precisa da topografia e das propriedades nanomecânicas dos biofilmes;
- (iv) Após o polimento, os corpos de prova foram submetidos a um processo de limpeza detalhado para garantir a remoção completa de qualquer resíduo. Inicialmente, os vidros foram imersos em acetona e submetidos a banho ultrassônico por 5 minutos, para remover a cola instantânea Tekbond utilizada na fixação dos vidros no suporte durante o processo de polimento. Após a remoção da cola com acetona, os corpos de prova foram cuidadosamente limpos com etanol, utilizando banho ultrassônico

por 12 minutos, auxiliando na remoção eficaz dos resíduos, garantindo que a superfície esteja completamente limpa e livre de contaminantes que possam interferir na análise subsequente.

Com essas etapas, os corpos de prova dos vidros preparados apresentam a suavidade e limpeza necessárias para a caracterização dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* por microscopia de força atômica.

4.2. Cultivo dos Biofilmes

Para a análise dos biofilmes de *S. aureus* neste estudo, utilizamos a cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923, fornecida pelo Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza, do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos. Esta cepa é amplamente utilizada em pesquisas devido à sua relevância clínica e ao seu bem-estabelecido perfil de formação de biofilmes, permitindo uma investigação detalhada dos mecanismos de resistência e das características estruturais dos biofilmes. Para a ativação da cepa bacteriana em cada ensaio, utilizou-se também a infraestrutura disponível no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LMP). A bactéria *S. aureus* ATCC 25923 foi transferida a partir de sua cultura estoque, mantida a -20°C , para um meio de cultura caldo Müller-Hinton (MH) com $\text{pH } 7,3 \pm 0,1$ (Oxoid®). A incubação ocorreu em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 horas. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada a 3600 g por 10 minutos, utilizando uma centrífuga Eppendorf, modelo 5418. O sobrenadante foi descartado, e a bactéria sedimentada foi ressuspensa em uma solução tampão fosfato (PBS) 0,01 M, preparada com NaCl (8 g), KCl (0,2 g), Na_2HPO_4 (1,15 g), e KH_2PO_4 (0,2 g) em 1 litro de água destilada, ajustada para $\text{pH } 7,4 \pm 0,1$.

A padronização do inóculo foi realizada inicialmente com a escala de McFarland 0,5, seguida pela verificação da concentração através de um espectrofotômetro Femto, modelo 600. A absorção foi medida a 600 nm, resultando em um valor de 0,159, que corresponde a aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL). A suspensão, então padronizada, foi diluída em PBS (caldo triptona soja) para atingir uma concentração final de 10^6 UFC/mL, conforme necessário para o inóculo inicial, onde os diferentes corpos de prova foram acondicionados em microplaca de 24 poços e, cada poço foi inoculado com um mililitro (1 mL) do inóculo. Após esse procedimento as placas foram

incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para permitir a análise com Microscopia de Força Atômica (AFM) após o crescimento de 24 horas, cada grupo de corpo de prova foi lavado com PBS e fixado em uma solução de glutaraldeído a 2,5% por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram desidratadas gradualmente com uma série crescente de soluções de álcool etílico: 70%, 80%, e 90%, cada uma por 15 minutos, seguidas de duas etapas com álcool absoluto (100%) também por 15 minutos cada. Este procedimento assegura a preservação da morfologia dos biofilmes para posterior análise.

4.3. Análise em Microscopia de Força Atômica:

As análises de AFM foram realizadas no Multimode® 8 da Bruker com controladora NanoScope 6 disponível na infraestrutura multiusuário do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

4.3.1. Calibração:

Optou-se pela utilização da sonda RTESPA525A da Bruker, cujos parâmetros nominais são: (i) *cantilever* de silício de geometria retangular com 40 μm de largura e 125 μm de comprimento; (ii) constante de mola nominal de 200 N/m; (iii) raio da ponta de 8 nm; e (iv) frequência nominal de 525 kHz. A escolha dessa sonda foi baseada nos valores de módulo de elasticidade do substrato. A calibração relativa do microscópio de força atômica (AFM) no modo de análise PeakForce Tapping™ (PFT) foi realizada utilizando padrões de safira (Sapphire-12M) e poliestireno (PSFilm-12M).

Para a calibração inicial, realizamos a calibração da constante de mola do *cantilever* por meio do método *Thermal Tune*, utilizando um intervalo de 100 Hz e uma sensibilidade de deflexão estimada de 20,87 nm/V, com uma constante de mola ajustada para 0,1828 N/m. Em seguida, calibramos o toque da sonda em um padrão de safira, utilizando parâmetros de rampa com um deslocamento de 300 nm e um *setpoint* de 0,1 V, obtendo uma sensibilidade de deflexão de 76,25 nm/V e uma constante de mola de 0,2458 N/m. A calibração final foi realizada no modo PeakForce Tapping™ (PFT), onde medimos frequências de 1 Hz e 2 Hz. A sensibilidade de deflexão foi ajustada para 78,21 nm/V e 78,03 nm/V, respectivamente, com distâncias de sincronização QNM de 27,78% e 29,16%, e

amplitude de sensibilidade PDF de 222,84 nm/V e 228,02 nm/V, ambas com curvas Df-Z satisfatórias. A frequência escolhida para a análise foi 1 kHz, que se comportou melhor nas amostras analisadas.

A calibração foi validada utilizando o padrão Bruker PSFilm-12M, com um módulo de elasticidade referência de 2,7 GPa, resultando em uma estimativa de raio da ponta de 32 nm.

Para garantir a precisão das medições e a resolução adequada nas análises, ajustou-se o tamanho de escaneamento (*scan size*) para 15 μm , o que proporciona uma visualização detalhada das características da superfície das amostras. O ajuste do Peak Force amplitude (PF_{amp}) foi configurado para ± 150 nm, garantindo uma aplicação precisa e controlada da força durante cada ciclo de contato. Além disso, o ajuste da força de adesão (F_{ad}) foi definido para 0,25 nN, otimizando a sensibilidade e a precisão na detecção das interações entre a ponta da sonda e a superfície da amostra.

4.3.2. Parâmetros de Análise

Os parâmetros utilizados no equipamento para a obtenção das imagens de Peak Force QNM definidas pelo autor com testes prévios e ajustados de forma a garantir a qualidade dos dados:

1. *Scan Size* (Tamanho de Escaneamento): Definido como 15,0 μm , este parâmetro refere-se à área total da amostra que foi escaneada para criar a imagem. O mesmo valor foi aplicado ao *Slow Scan Size*, que controla a área que é varrida lentamente para aumentar a resolução.
2. *Scan Rate* (Taxa de Escaneamento): Ajustada para 0,499 Hz, esta taxa indica a velocidade com que o scanner se move sobre a superfície da amostra. Taxas mais baixas permitem uma maior precisão na captura dos detalhes da superfície.
3. *Samples/Line* (Pontos por Linha): Com 256 pontos por linha, este parâmetro determina o número de pontos de dados coletados ao longo de cada linha de escaneamento, influenciando a resolução horizontal da imagem.
4. *Lines* (Linhas): Também definido como 256, este parâmetro especifica o número total de linhas de dados capturadas durante o escaneamento. Juntamente com o número de amostras por linha, ele afeta a resolução vertical da imagem.

5. *Line Direction* (Direção da Linha): Configurado para *retrace* (retração), isso indica que a sonda se move na direção oposta após a captura de cada linha de dados, melhorando a precisão da imagem.
6. *Data Type* (Tipo de Dado): Vários tipos de dados foram capturados para obter uma análise abrangente das propriedades da amostra, incluindo *Height* (altura), *Adhesion* (adesão), *Modulus* (módulo de elasticidade), *Deformation* (deformação), *Stiffness* (rigidez) e *Dissipation* (dissipação).
7. *Scan Line* (Linha de Escaneamento): Definido como a linha principal (*Main*), refere-se à linha de dados que é usada como referência para a análise.
8. *Peak Force Setpoint* (Ponto de Ajuste da Força de Pico): Ajustado para 4,164 nN, este valor representa a força máxima que a ponta da sonda aplica sobre a amostra durante a medição.
9. *PFT Gain* (Ganho do PFT): Com um valor de 16,8, o ganho do *Peak Force Tuning* (PFT) ajusta a sensibilidade do sistema para as mudanças na força aplicada, influenciando a precisão das medições.
10. *Peak Force Amplitude* (Amplitude da Força de Pico): Estabelecida em 150,0 nm, esta amplitude define a variação máxima da força de contato entre a ponta da sonda e a superfície da amostra durante o escaneamento.
11. *Aspect Ratio* (Proporção de Aspecto): Mantida em 1,00, indica que a imagem gerada tem uma proporção igual entre a largura e a altura, assegurando que os dados não sejam distorcidos.
12. *Capture Direction* (Direção de Captura): Configurada para cima (Up), refere-se à direção na qual a sonda captura os dados durante o escaneamento, o que pode impactar a interpretação dos resultados.

Esses parâmetros foram otimizados para garantir uma análise precisa e detalhada das propriedades mecânicas da superfície amostrada. além do modo convencional de Scanning Probe Microscopy (SPM) foi feita a aquisição simultânea (PeakForce Capture – PFC), das curvas de força gerada (**Figura 4b**) pelo contato da sonda com a superfície da amostra em um determinado ponto.

4.3.3. Método de Edição

O programa utilizado para a extração de dados e edição dos arquivos do AFM foi o Gwyddion 2.66, que é um software livre para visualização e análise de dados de técnicas de SPM.

Para os arquivos de PFC foi utilizado o software Nanoscope Analysis V1.8 da Bruker, que é projetado para a visualização e análise de diferentes formatos de imagens e dados obtidos pelos diferentes modos de operação do AFM, que permite a análise das curvas de PeakForce para a extração dos dados de interação de força entre a sonda e a amostra.

4.3.3.1. Medidas de Rugosidade

Para a medição de rugosidade, os valores médios por área (S_a e S_z) foram extraídos utilizando o software Gwyddion 2.66. Utilizando as imagens topográficas da superfície do substrato de vidro coberto com biofilme capturadas por AFM. No programa, as imagens foram analisadas utilizando a ferramenta "Mark Grains by Threshold" em modo de seleção por altura para criar uma máscara de exclusão. Esta ferramenta permite identificar e marcar regiões específicas da imagem com base em um limiar de altura, separando as áreas elevadas (grãos ou partículas) do resto da superfície. Esta máscara foi aplicada ao substrato de vidro, permitindo a separação das áreas de interesse, ou seja, aquelas contendo o biofilme, das áreas de substrato exposto. Dessa forma, a rugosidade foi medida exclusivamente nas regiões onde o biofilme estava presente, garantindo que os valores de rugosidade S_a (rugosidade média em uma área) e S_z (altura máxima da superfície em uma área) calculados e registrados refletem unicamente as características do biofilme.

4.4. Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Após a análise em AFM, as amostras foram fixadas em porta-amostras de MEV utilizando fita de carbono e aterradas com tinta prata, sendo deixadas para secagem por 24 horas. Em seguida, as amostras foram metalizadas com uma camada de ouro (Au) em uma corrente de 15 mA por 90 segundos a uma distância de 5 cm do alvo em sistema de recobrimento Balzers Sputter Coater SCD 004, para aumentar a condutividade e a qualidade da imagem, utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de 4ª geração MIRA da TESCAN com fonte de emissão de elétrons FEG (Field Emission Gun) em modo de análise SE (*Secondary Electrons*, ou elétrons secundários) para a aquisição de imagens de contraste topográfico.

5. Resultados

Com o objetivo de investigar as propriedades dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* formados sobre superfícies vítreas contendo diferentes concentrações de óxido de zinco. A pesquisa focou em duas áreas principais: (1) analisar a topografia dos biofilmes utilizando a técnica de microscopia de força atômica (AFM) para identificar padrões e características estruturais, e (2) avaliar as propriedades nanomecânicas dos biofilmes, como “rigidez” (módulo de elasticidade), adesão e deformação, a fim de entender como a interação com o material vítreo influencia a resistência e o comportamento desses biofilmes.

5.1. Análise Topográfica dos Biofilmes

Os resultados obtidos revelaram a influência das diferentes concentrações de óxido de zinco na topografia dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* formados. As análises foram realizadas comparando amostras sem crescimento bacteriano (controle) e após 24 horas de incubação em biovidros com 0, 5, 7,5 e 10% (m/m) de óxido de zinco para verificar a evolução da estrutura do biofilme.

Nas **Figuras 5 e 6**, são apresentadas as imagens de altura obtidas por AFM para biofilmes crescidos em vidro contendo concentrações de 0 (controle), 5, 7,5 e 10% (m/m) de óxido de zinco. Essas imagens ilustram claramente as mudanças na superfície do vidro antes e depois do crescimento do biofilme, evidenciando as variações na morfologia em função do teor de óxido de zinco presente na superfície. É notório que, com o aumento no teor de ZnO há menor incidência de colônias de *S. aureus*. Observa-se que, nas superfícies sem dopagem de óxido de zinco (**Figura 06a, 06b e 06c**), após 24 horas de crescimento, há total ocupação de biofilme na área varrida pelo AFM. Com a adição de 5% (m/m) de óxido de zinco (**Figuras 06d, 06e e 06f**), verifica-se uma menor área ocupada do biofilme, destacando-se a ação antimicrobiana do biovidro dopado com ZnO. A presença dos biofilmes obviamente aumenta a altura da área analisada, devido à presença das colônias de bactérias.

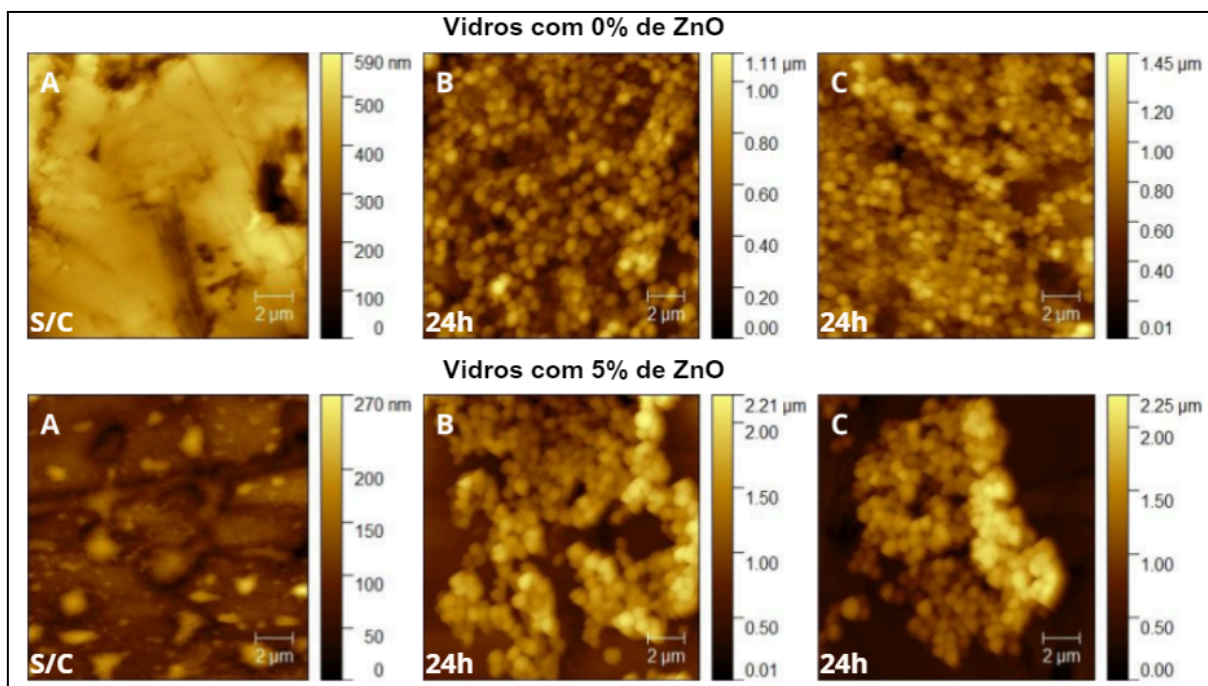


Figura 05 – Imagens de AFM de altura de um biofilme de *S. aureus* crescido em vidro sem dopagem de óxido de zinco (Controle) e com de óxido de zinco a 5%.

A: 0% ZnO sem crescimento bacteriano (S/C); **B e C:** 0% de ZnO após 24 horas de crescimento bacteriano; **D:** 5% de ZnO sem crescimento bacteriano (S/C); **E e F:** 5% de ZnO após 24 horas de crescimento bacteriano.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na **Figura 07** são apresentados os mesmos quatro grupos de amostras de forma tridimensional, analisadas antes e 24 horas após a inoculação, auxiliando na visualização das diferenças de alturas medidas. O substrato de vidro sem o crescimento do biofilme (substratos controle) (**Figuras 7a, 7b e 7c**), apresenta aumento nas diferenças de altura conforme a concentração de ZnO também aumenta. Ou seja, há aumento da rugosidade média do substrato apenas com a dopagem de ZnO.

Nas amostras que possuem 10% de óxido de zinco na formulação do substrato é perceptível a queda no crescimento bacteriano. Também é possível notar uma formação preferencial do biofilme em áreas não-uniformes do substrato, além da maior heterogeneidade topográfica (maior diferença de altura e maior rugosidade). Em suma, a estrutura tridimensional do biofilme se torna menos abundante com o aumento da concentração de óxido de zinco, atestando o poder biocida do substrato dopado com óxido de zinco.

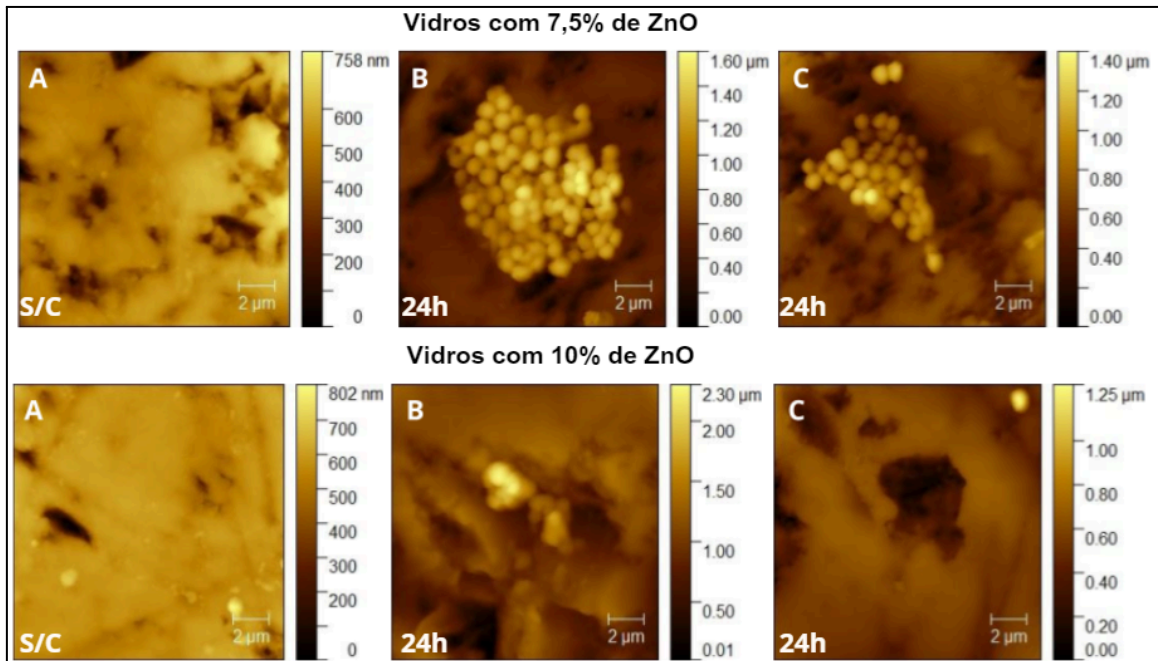


Figura 06 – Imagens de AFM de altura de um biofilme de *S. aureus* crescido em vidro com dopagem de óxido de zinco a 7,5% e a 10%.

A: 7,5% sem crescimento (S/C); B e C: 7,5% após 24 horas de crescimento; D: 10% sem crescimento (S/C); E e F: 10% após 24 horas de crescimento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

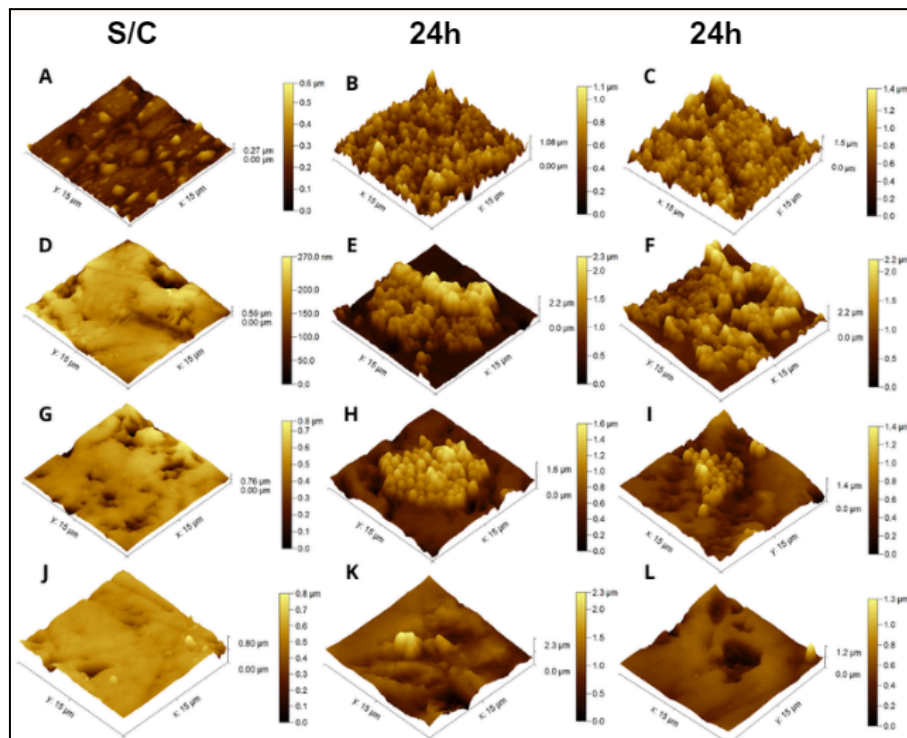


Figura 07 – Imagens de AFM de altura com eixos X, Y e Z de um biofilme de *S. aureus* crescido em vidro sem ZnO (Controle) e com ZnO a 5; 7,5 e 10%.

A: Controle 0% de ZnO sem crescimento de biofilme (S/C); B e C: Controle 0% de ZnO após 24 horas de crescimento de biofilme; D: 5% de ZnO sem crescimento de biofilme (S/C); E e F: 5% de ZnO após 24 horas de crescimento de biofilme; G: 7,5% de ZnO sem crescimento de biofilme (S/C); H e I: 7,5% de ZnO após 24 horas de crescimento de biofilme; J: 10% de ZnO sem crescimento de biofilme (S/C); K e L: 10% de ZnO após 24 horas de crescimento de biofilme.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise topográfica realizada com Microscopia de Força Atômica (AFM) revelou que a adição de ZnO afeta significativamente a estrutura dos biofilmes. Em amostras sem ZnO, o biofilme apresentou uma estrutura relativamente homogênea após 24 horas de crescimento, evidenciando uma formação uniforme sobre a superfície vítrea. No entanto, a presença de 5% de ZnO resultou em uma diminuição na altura do biofilme e uma variação na rugosidade do substrato, que não era visível nas amostras controle. A partir de concentrações superiores de ZnO, como 7,5% e 10%, a formação do biofilme foi progressivamente inibida, com uma redução acentuada na altura do biofilme e uma variação irregular na rugosidade do substrato. Concentrações mais altas de ZnO resultaram em uma área de biofilme reduzida, refletindo uma inibição do crescimento bacteriano e alterações estruturais na superfície vítrea. Na literatura encontramos possíveis mecanismos de ação antibacteriana do óxido de zinco é a liberação de íons zinco (Zn^{2+}) compromete o transporte ativo, o metabolismo de aminoácidos e o funcionamento do sistema enzimático (Sirelkhatim et al., 2015). Além disso, a atividade antibiofilme das partículas de óxido de zinco pode estar relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio (JANANI et al., 2020), Sawai et al. (1998) sugerem que a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir da molécula de ZnO pode ser o principal mecanismo responsável pela ação antibacteriana do óxido de zinco.

5.2. Caracterização Nanomecânica

A caracterização nanomecânica dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* crescidos em superfícies vítreas com diferentes concentrações de óxido de zinco realizada permitiu investigar as variações nas propriedades mecânicas dos biofilmes, incluindo o módulo de elasticidade, a força de adesão e a deformação, e como estas são influenciadas pela presença de óxido de zinco.

5.2.1. Módulo de Elasticidade

As imagens de módulo de elasticidade obtidas por AFM, mostradas nas **Figuras 08 e 09**, destacam as variações nas propriedades mecânicas dos biofilmes crescidos em superfícies vítreas contendo 0% (controle), 5% e 7,5% de óxido de zinco.

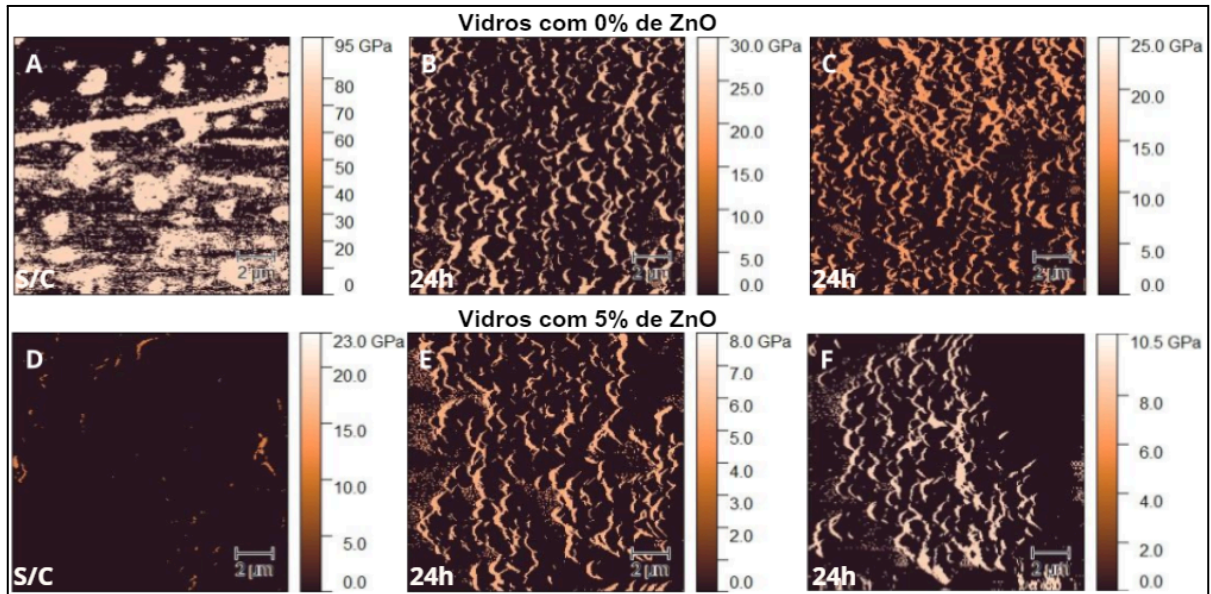


Figura 08 – Imagens de módulo obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no modo PeakForce de um biofilme de *S. aureus* crescido em vidro óxido de zinco (Controle) e com de óxido de zinco a 5%.

A: Controle 0% sem crescimento (S/C); **B e C:** Controle 0% após 24 horas de crescimento; **D:** 5% sem crescimento (S/C); **E e F:** 5% após 24 horas de crescimento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pode-se observar estruturas topográficas que se repetem nas imagens de módulo de elasticidade e que podem ter influenciado na medida, ou seja, um *crosstalk* da topografia e dados nanomecânicos. Ainda, nota-se que há maiores valores de módulo de elasticidade nas regiões de maior espessura (mais altas) observadas nas **Figuras 5, 6 e 7**. A interação entre materiais e biofilmes, ou o uso de tratamentos antibacterianos, pode alterar a elasticidade e a rigidez de superfícies, como descrito por Thomas, G. et al., 2013.

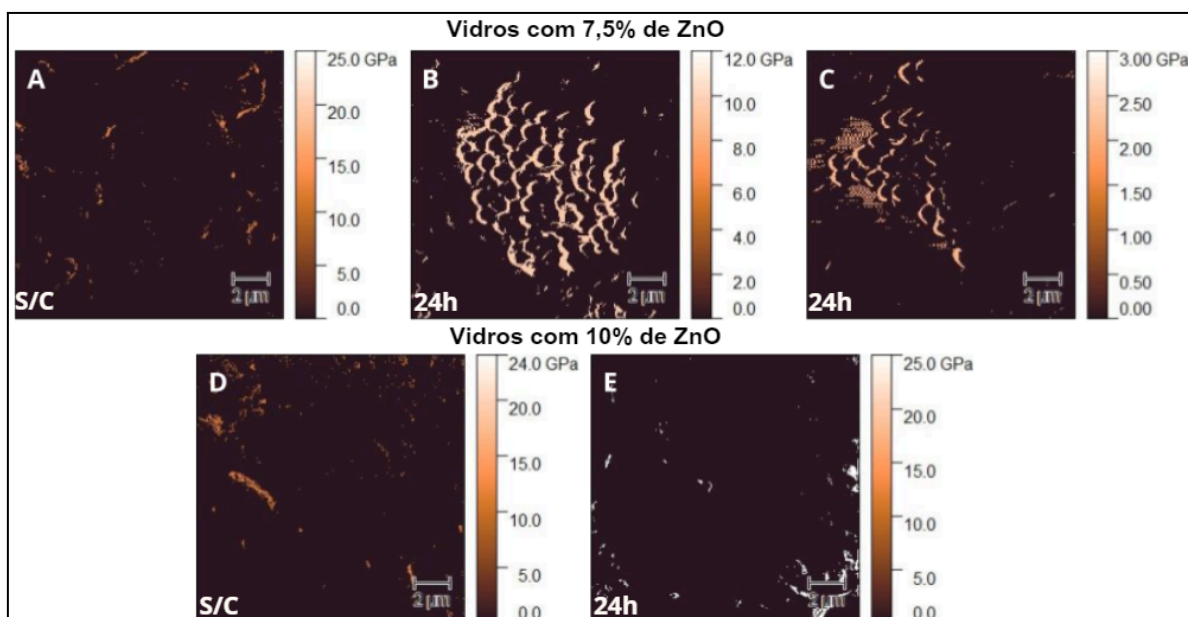


Figura 09 – Imagens de módulo obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no modo PeakForce de um biofilme de *S. aureus* crescido em vidro com dopagem de óxido de zinco a 7,5% e a 10%.

A: 7,5% sem crescimento (S/C); **B e C:** 7,5% após 24 horas de crescimento; **D:** 10% sem crescimento (S/C); e **E:** 10% após 24 horas de crescimento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Figura 09** nos revela que a diminuição do módulo de elasticidade não é linear, mas assim como na topografia é possível observar queda na quantidade de pontos de “rigidez” da amostra, e uma relação entre a quantidade de bactérias e a espessura do biofilme nos valores de módulo de elasticidade nas **Figuras 9b e 9c**, revelando uma diminuição, embora não sistemática, na “rigidez” dos biofilmes à medida que a concentração de óxido de zinco aumenta.

Nas amostras de controle, sem biofilme, o módulo de elasticidade apresenta valores mais elevados, sugerindo uma superfície mais “rígida”. No entanto, com o aumento do teor de óxido de zinco, o módulo de elasticidade geral do substrato tende a diminuir, indicando que os biofilmes são formados em superfícies menos rígidas. Ainda, vale-se mencionar que os valores de módulos de elasticidade aqui coletados são significativamente maiores que aqueles comumente relatados na literatura para cepas convencionais de *S. aureus*. (Di Stefano, A. et al., 2009). Portanto, os valores aqui reportados serão utilizados exclusivamente para fins comparativos entre as amostras, verificando o efeito da adição do ZnO na nanomecânica dos biofilmes formados.

O módulo de elasticidade dos biofilmes, em geral, diminuiu com a adição de ZnO, com uma redução mais pronunciada em concentrações mais altas, indicando menor “rigidez” e espessura do biofilme. Diversas interações físico-químicas da

superfície podem impactar a formação de biofilmes microbianos, incluindo tensão superficial, hidrofobicidade, interações eletrostáticas, rugosidade da superfície, citotoxicidade e diferentes concentrações de nanopartículas nos materiais (Sousa, Teixeira & Oliveira, 2009; Laverty, Gorman & Gilmore, 2013).

5.2.2. Adesão

A força de adesão dos biofilmes foi avaliada através das imagens apresentadas nas **Figuras 10 e 11**. Estas imagens mostram como a adesão do biofilme a sonda varia conforme a concentração de óxido de zinco no vidro.

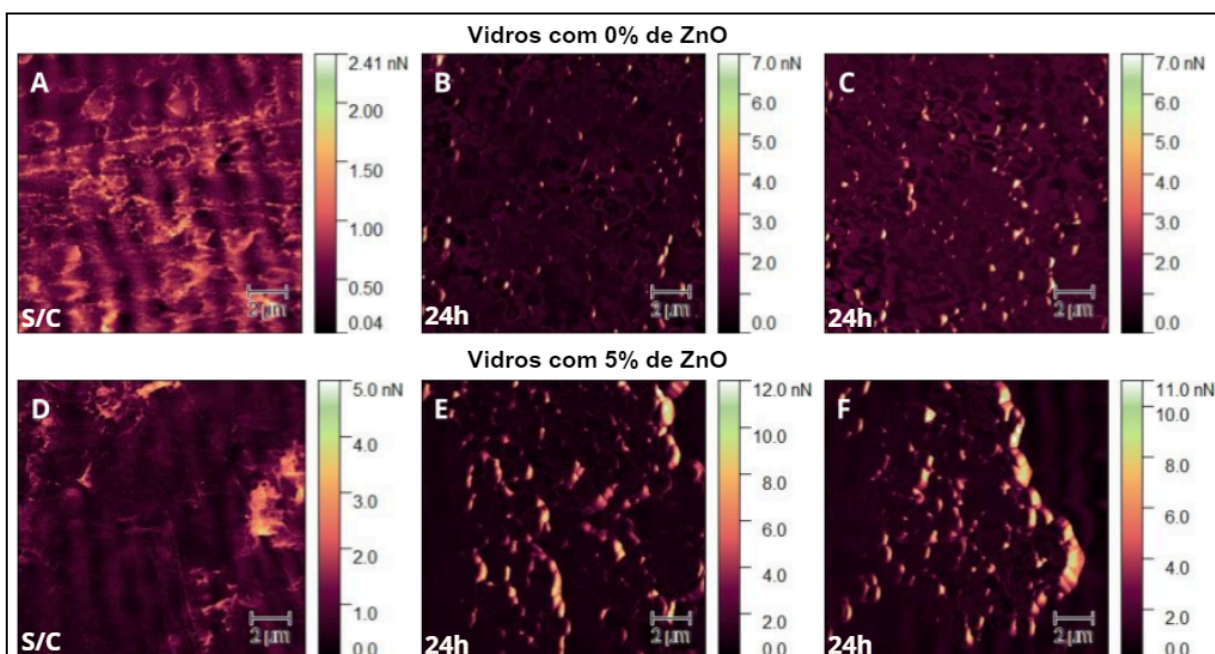


Figura 10 – Imagens de adesão obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no modo PeakForce de um biofilme de *S. aureus* crescido em vidro sem dopagem de óxido de zinco (Controle) e com de óxido de zinco a 5%.

A: Controle 0% sem crescimento (S/C); **B e C:** Controle 0% após 24 horas de crescimento; **D:** 5% sem crescimento (S/C); **E e F:** 5% após 24 horas de crescimento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

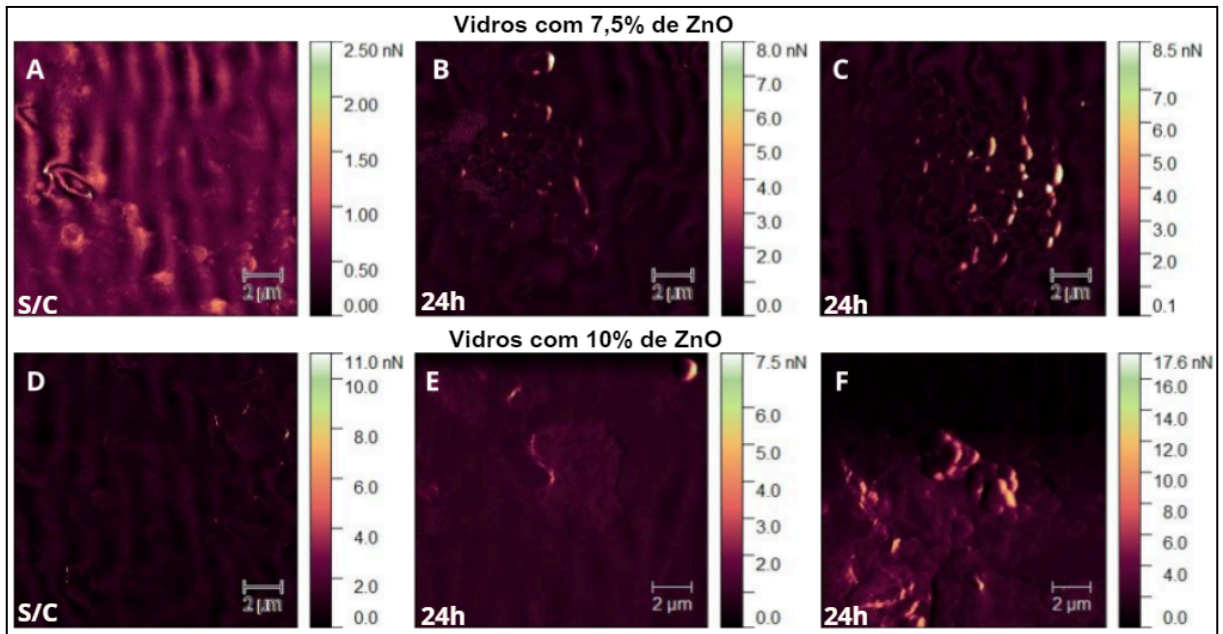


Figura 11 – Imagens de adesão obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no modo PeakForce de um biofilme de *S. aureus* crescido em vidro com óxido de zinco a 7,5% e a 10%. A: 7,5% sem crescimento (S/C); B e C: 7,5% após 24 horas de crescimento; D: 10% sem crescimento (S/C); E e F: 10% após 24 horas de crescimento. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados indicam que a força de adesão do biofilme aumenta com a concentração crescente de óxido de zinco tanto no vidro quanto no biofilme formado. Entretanto, outras medidas indicaram a diminuição da formação do biofilme, o que sugere que o aumento na adesão detectada pela sonda do AFM pode não estar relacionada diretamente à quantidade de biofilme formado. Podendo refletir outras mudanças nas superfícies da amostra e conseqüentemente na ação antibacteriana, indicando que a adição do óxido promove não apenas a inibição como possíveis modificações na sua estrutura celular.

Na literatura é possível encontrar trabalhos que mostram que os tratamentos antibacterianos podem modificar a química e as propriedades físicas das superfícies dos materiais, como tratamentos com nanopartículas, revestimentos antibacterianos, ou dopagem com íons metálicos podem aumentar a rugosidade, alterar a carga superficial, ou mudar a hidrofobicidade da superfície (Hajipour, M.J. et al., 2012). Ou que mesmo após a redução ou remoção de biofilmes, substâncias extracelulares como proteínas e polissacarídeos podem permanecer na superfície e afetar a adesão medida pelo AFM (Huang, L., 2022). No estudo de Chen, Y. (2014), por exemplo, constatou que deformações na parede celular bacteriana interferem nas forças de adesão, a partir de experimentos com o AFM demonstra a influência da deformação na adesão à superfície do substrato.

5.2.3. Deformação

As imagens de deformação, apresentadas nas **Figuras 12 e 13**, fornecem informações sobre a resistência dos biofilmes em diferentes concentrações de óxido de zinco. Conforme mencionado anteriormente, a deformação é a distância de separação do ponto em que a força é zero e a máxima carga (*peak force*) na curva de força. A distância correta, chamada de separação, é calculada subtraindo a deflexão do *cantilever* da posição no eixo Z.

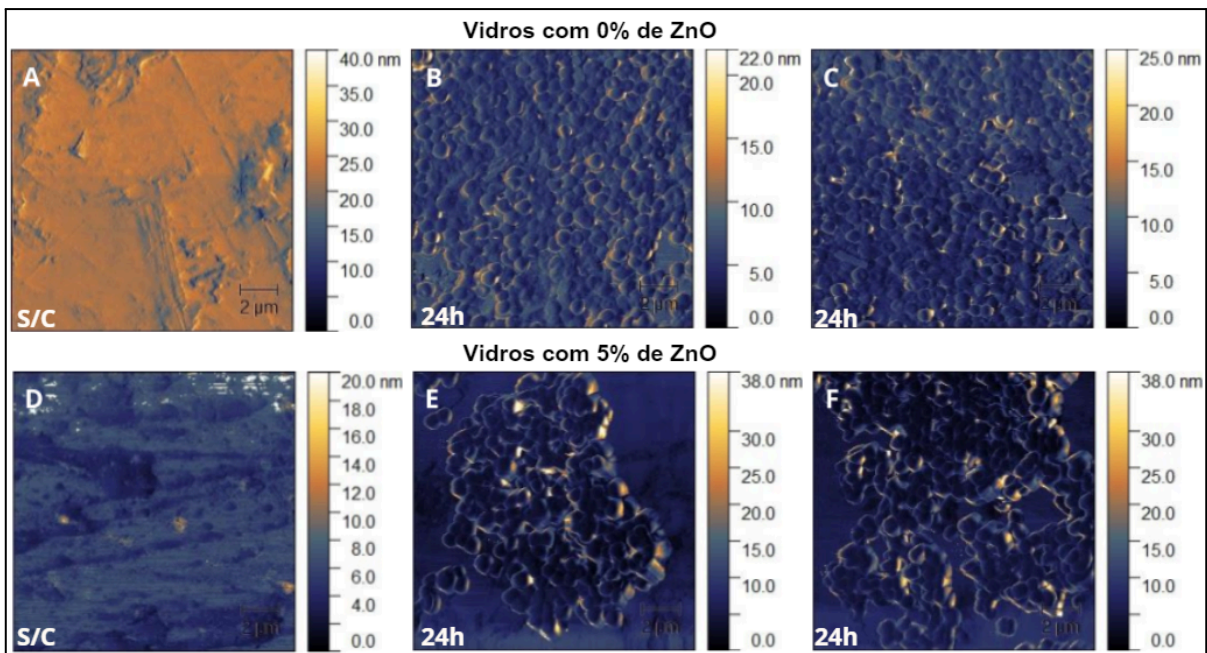


Figura 12 – Imagens de deformação obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no modo PeakForce de um biofilme de *S. aureus* crescido em vidro sem dopagem de óxido de zinco (Controle) e com de óxido de zinco a 5%.

A: Controle 0% sem crescimento (S/C); **B e C:** Controle 0% após 24 horas de crescimento; **D:** 5% sem crescimento (S/C); **E e F:** 5% após 24 horas de crescimento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

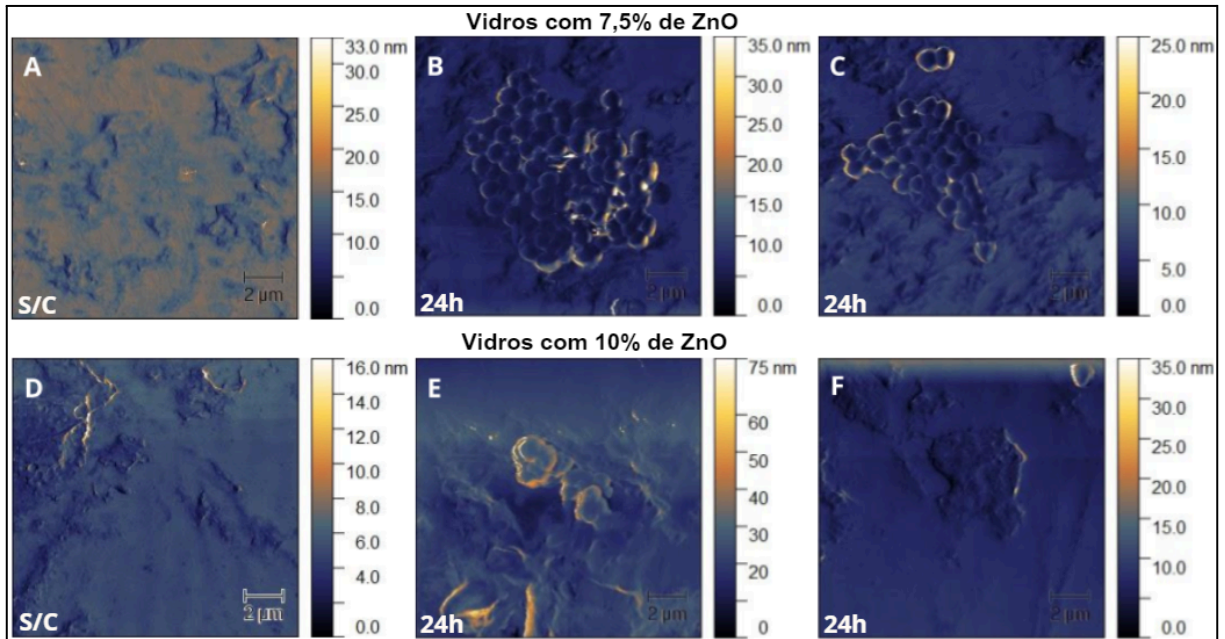


Figura 13 – Imagens de adesão obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no modo PeakForce de um biofilme de *S. aureus* crescido em vidro com dopagem de óxido de zinco a 7,5% e a 10%.

A: 7,5% sem crescimento (S/C); **B e C:** 7,5% após 24 horas de crescimento; **D:** 10% sem crescimento (S/C); **E e F:** 10% após 24 horas de crescimento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A deformação dos biofilmes mostrou um aumento com a concentração de ZnO. Todas as amostras, após 24 horas de inoculação, apresentaram alterações na deformação registrada em comparação ao substrato. Apesar das diferenças entre os vidros com diferentes porcentagens do óxido em questão, é possível perceber o aumento na deformação tanto nos valores médios, observados nas cores predominantes das **Figuras 12 e 13**, quanto no valor máximo observado, indicado pelas regiões claras, que se encontram majoritariamente, com exceções de possíveis interferências topográficas do substrato, nas áreas com crescimento bacteriano. Esse valor máximo de deformação observado aumenta significativamente entre as amostras controle e as amostras que cresceram em superfície com adição de óxido de zinco, indicando uma menor resistência ao estresse mecânico. Isso sugere que a capacidade da bactéria, em resposta a um estresse mecânico externo, é fortemente influenciada pela deformabilidade fisiológica prévia da parede celular bacteriana.

5.3. Parâmetros de Rugosidade

As imagens topográficas de AFM apresentadas na **Figura 14** ilustram as amostras de biofilme de *Staphylococcus aureus* crescido em vidro com diferentes concentrações de óxido de zinco com o emprego das “máscaras de exclusão” que permitiu isolar as áreas de interesse, aquelas contendo o biofilme, do restante do substrato de vidro exposto, permitindo as medidas de rugosidade exclusivamente das regiões com biofilme.

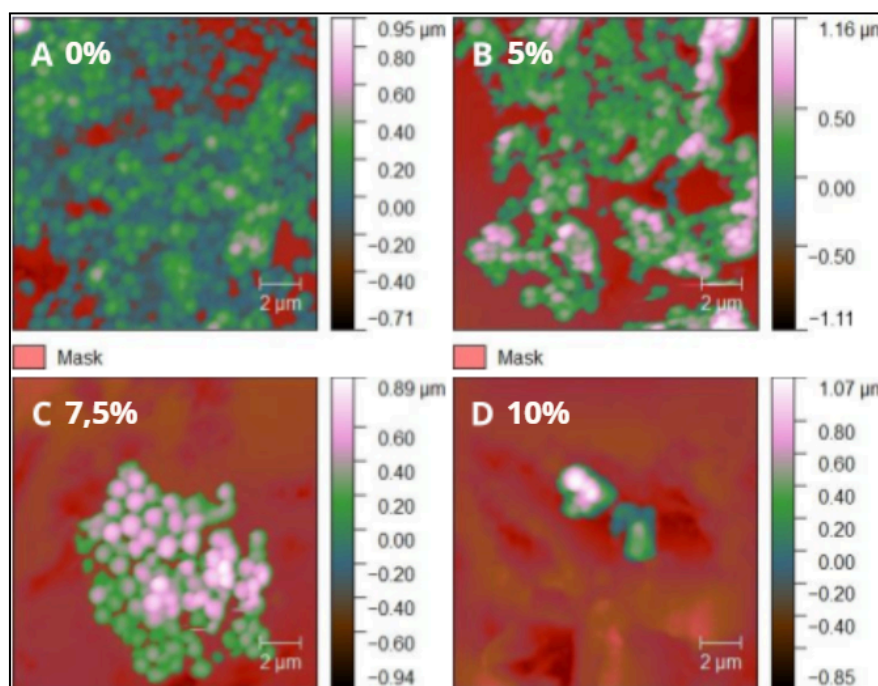


Figura 14 – Imagens de AFM das amostras de biofilme de *S. aureus* crescido em vidro com diferentes concentrações de óxido de zinco, com máscaras de exclusão por altura. **A:** 0% ZnO; **B:** 5% ZnO; **C:** 7,5% ZnO; **D:** 10% ZnO. Cada imagem exhibe em vermelho a máscara de exclusão utilizada para medir a rugosidade apenas nas áreas com biofilme.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.1. Média aritmética da altura (S_a)

A análise da rugosidade média por área (S_a) dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* formados em vidro dopado com diferentes concentrações de óxido de zinco (ZnO) revela importantes tendências relacionadas à interação entre o material dopado e as células bacterianas. S_a é um parâmetro que representa a média aritmética das ordenadas absolutas Z, X e Y na área de avaliação, fornecendo uma medida estável da rugosidade superficial em uma área. No **Gráfico 06**, observa-se um aumento da rugosidade média (S_a) nas amostras dopadas com 5% de ZnO após 24 horas de crescimento de *S. aureus*. Esse aumento pode estar atrelado pela interação entre o ZnO e as células bacterianas.

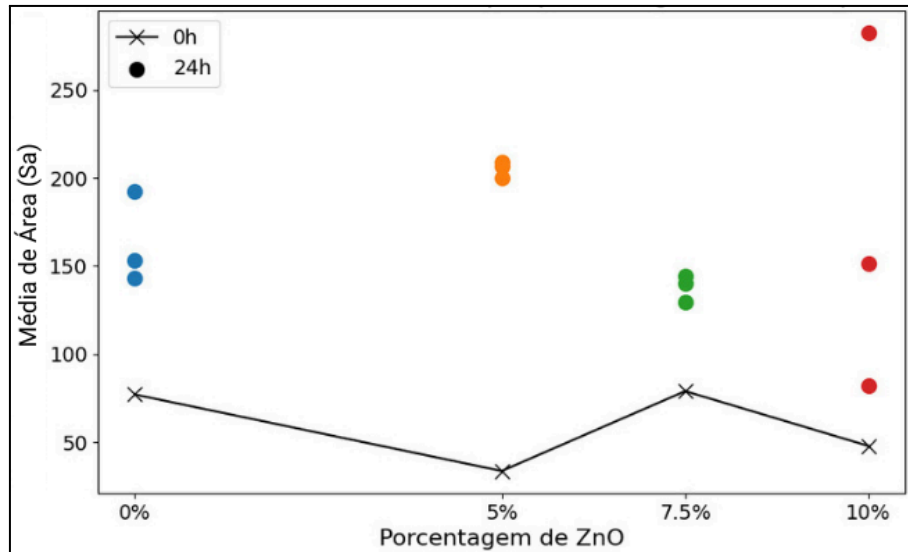


Figura 15 - Gráfico de rugosidade média aritmética de área por porcentagem de ZnO após zero e 24 horas de crescimento de S.aureus.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o aumento da concentração de ZnO para 7,5% o gráfico mostra uma diminuição na rugosidade média (S_a). Na concentração de 10%, a formação de biofilme é tão reduzida que a área coberta pelo biofilme se torna mínima, influenciando diretamente na padronização das medidas, como evidenciado nas imagens de altura e, principalmente, nas imagens da **Figura 6d e 6f**.

5.3.2. Altura Máxima (S_z)

Repetindo a análise anterior com foco na rugosidade média máxima (S_z), que é a diferença entre o ponto mais alto e o mais baixo na superfície do biofilme. Ou seja, é um parâmetro que equivale à soma da altura máxima do pico e à profundidade máxima da cavidade e, assim como o parâmetro anterior, se expande para as três dimensões (x, y e z).

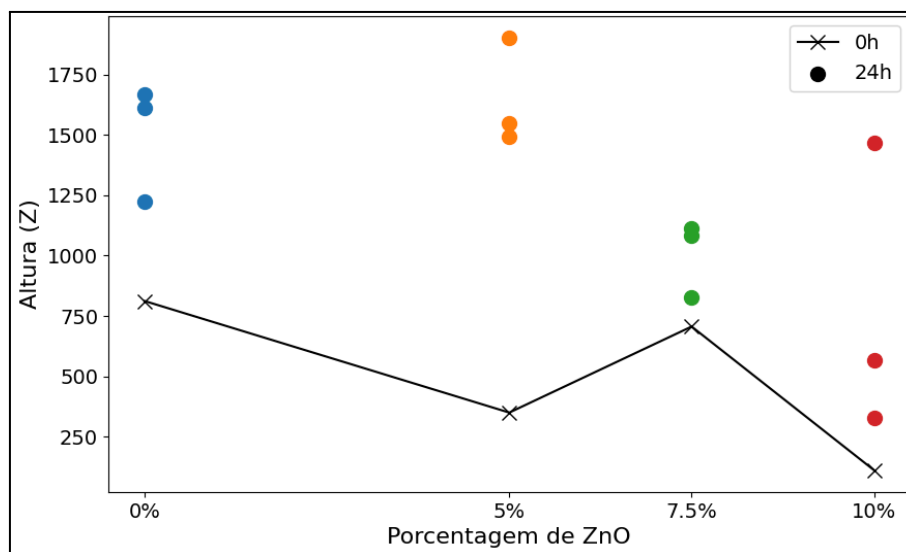


Figura 16 - Gráfico de rugosidade máxima de área por porcentagem de ZnO após zero e 24 horas de crescimento de *S. aureus*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A diminuição da rugosidade máxima (S_z) em superfícies dopadas com 7,5% e 10% de ZnO pode ser diretamente relacionada ao efeito antimicrobiano mais forte do ZnO em concentrações elevadas. Conforme evidenciado no **Gráfico 07**, a redução significativa de S_z após 24 horas de crescimento de *Staphylococcus aureus* indica que houve um substancial inibição na formação de biofilmes com 10% de ZnO. Dessa maneira, a formação de biofilmes é drasticamente reduzida e, assim como para S_a , influencia diretamente nas medidas realizadas.

Em relação à rugosidade e à formação de biofilmes, a presença de ZnO em concentrações menores parece estimular uma resposta defensiva nas bactérias, levando à produção de uma matriz extracelular mais robusta e um biofilme mais complexo e rugoso. Em contraste, concentrações mais altas de ZnO exercem um efeito antimicrobiano mais intenso, inibindo a formação de biofilmes e resultando em superfícies mais lisas e menos colonizadas por bactérias. A redução na rugosidade máxima em altas concentrações de ZnO sugere que a superfície se torna menos suscetível à colonização bacteriana e é mais fácil de se manter livre de biofilmes. Uma grande parte da literatura sugere que superfícies com maior rugosidade tendem a favorecer a aderência de bactérias com a *Staphylococcus aureus* (Yamauchi et al., 1990; Radford et al., 1998; Pereira-Cenci et al., 2007), que tem maior influência na fase inicial de adesão do biofilme, onde a rugosidade mais elevada favorece a retenção e proteção das células aderidas (Pereira-Cenci et al., 2008).

Nas amostras com 10% de ZnO, a área medida de biofilme foi significativamente menor (~2 μm) em comparação com outras amostras (~10-15 μm). Esta pequena área de biofilme pode não refletir o comportamento geral da amostra e pode introduzir variabilidade significativa nos resultados de rugosidade. Medidas de rugosidade baseadas em áreas tão pequenas podem ser menos confiáveis devido à falta de representatividade estatística, com pequenas variações na topografia impactando desproporcionalmente os valores de rugosidade.

O aumento da rugosidade nos biofilmes formados em substratos vítreos com porcentagens menores de ZnO acarreta em uma resposta de defesa nas bactérias estimulando a produção de uma matriz extracelular mais complexa. Nesse sentido Ranieri, Whitchurch e Burrows (2018) indicam que a exposição de bactérias a concentrações subinibitórias de agentes antimicrobianos pode levar a alterações fisiológicas que intensificam a produção de biofilmes, uma vez que o ambiente protegido desses biofilmes favorece a seleção de cepas resistentes e mutantes. Esses autores propõem que os antimicrobianos em concentrações subinibitórias atuam como moléculas sinalizadoras, promovendo a formação de biofilmes e aumentando a produção da matriz extracelular.

5.4. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi realizada a caracterização Morfológica de Biofilmes de *Staphylococcus aureus* em Substratos Vítreos com Variedades de Óxido de Zinco utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura, para complementação dos dados obtidos por AFM e uma visão de maior escala a respeito da distribuição dos biofilmes.

As imagens apresentadas na **Figura 15**, mostram a estrutura morfológica do biofilme de *Staphylococcus aureus* crescido em um substrato vítreo sem a presença de óxido de zinco (controle 0%). A observação revela a formação de um biofilme denso e homogêneo, característico de ambientes sem a influência de compostos antibacterianos.

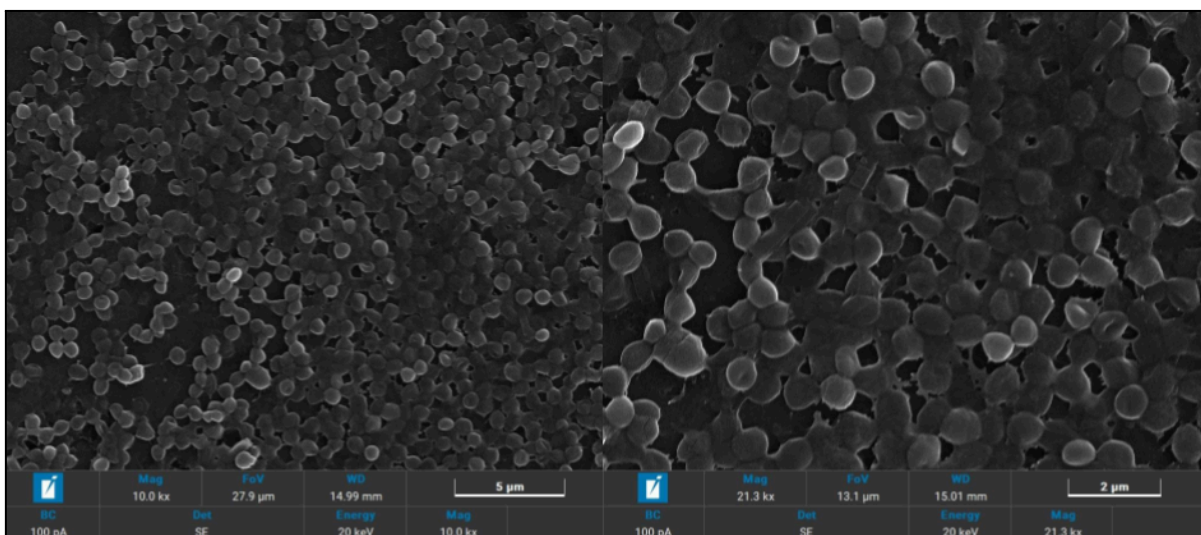


Figura 17– Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilme de *S. aureus* crescido em vidro sem óxido de zinco (controle 0%).

Fonte: Elaborado pelo autor.

As imagens da **Figura 16** mostram o biofilme de *Staphylococcus aureus* em vidro contendo 5% de óxido de zinco. Observa-se uma considerável redução na cobertura do biofilme e da matriz extracelular, sugerindo um início de efeito antibacteriano promovido pelo óxido de zinco. Apesar disso, ainda há uma formação considerável de biofilme.

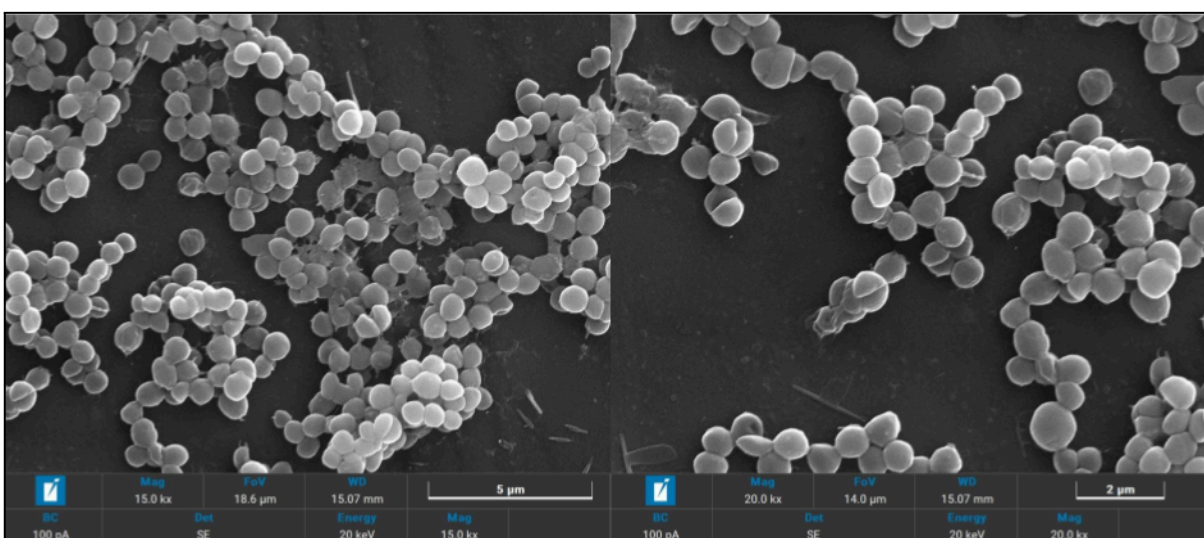


Figura 18 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilme de *S. aureus* crescido em vidro com 5% óxido de zinco.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na **Figura 17**, o biofilme formado em um substrato com 7,5% de óxido de zinco é apresentado. Há uma diminuição mais acentuada na densidade do biofilme, indicando que o aumento da concentração de óxido de zinco intensifica sua atividade antibacteriana, limitando o crescimento de *Staphylococcus aureus*.

Curiosamente, nota-se um aumento na matriz extracelular em comparação ao substrato com 5% de óxido de zinco, onde a matriz era quase imperceptível.

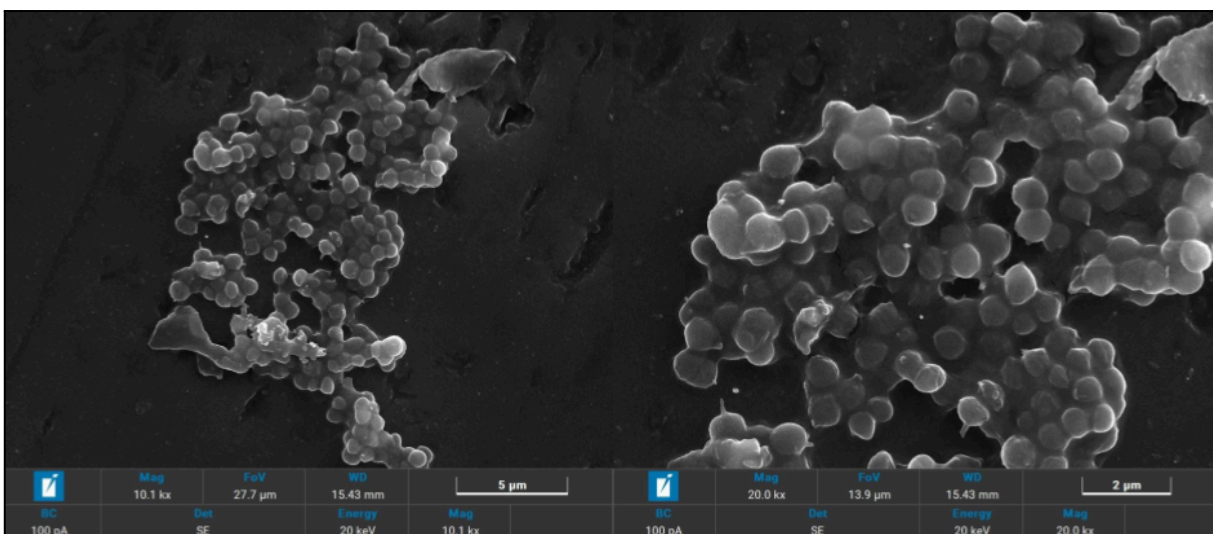


Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilme de *S. aureus* crescido em vidro com 7,5% óxido de zinco

Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, na **Figura 18** apresenta o biofilme de *Staphylococcus aureus* em vidro com 10% de óxido de zinco. Observa-se uma interrupção quase total na formação do biofilme, o que evidencia a alta eficácia do óxido de zinco em inibir o crescimento bacteriano nessa concentração.

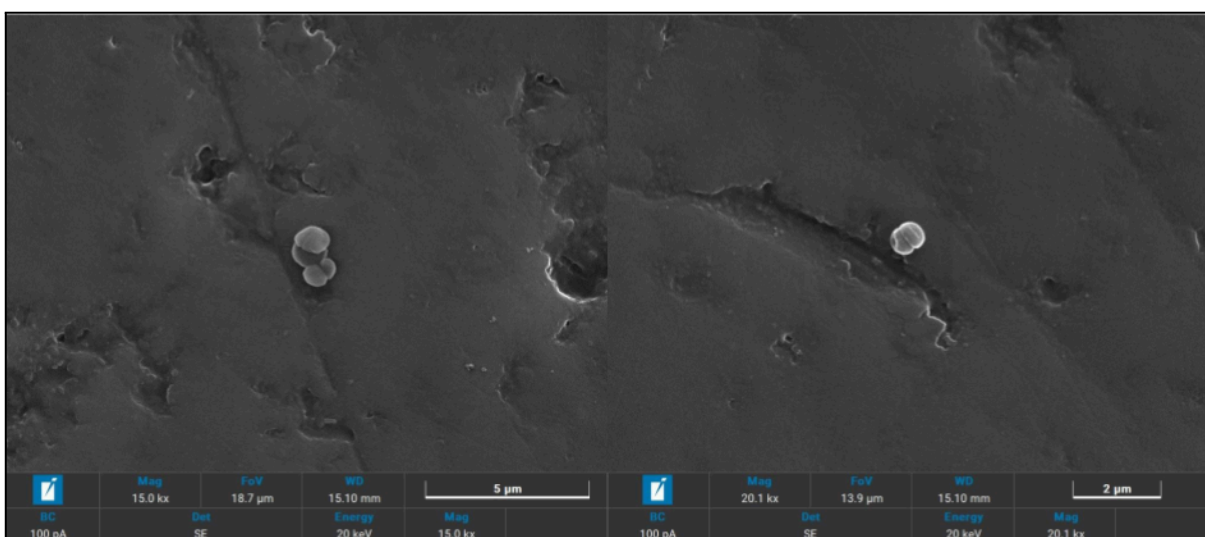


Figura 20 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilme de *S. aureus* crescido em vidro com 10% óxido de zinco.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) corroboram os dados obtidos por AFM, confirmando a eficácia do ZnO em reduzir a formação de biofilmes e, conseqüentemente, o seu acúmulo.

Os resultados contribuem para a compreensão da resistência dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* em contato com superfícies contendo ZnO e podem orientar futuras pesquisas para explorar outras concentrações de óxido de zinco, diferentes materiais bioativos e espécies distintas de microrganismos em diferentes tempos de crescimento a fim de otimizar estratégias de caracterização, controle e prevenção da formação de biofilmes.

6. Conclusões:

Esta investigação teve como objetivo central examinar aspectos topográficos das propriedades nanomecânicas dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* formados sobre superfícies vítreas dopadas com diferentes concentrações de óxido de zinco (ZnO). Através da análise da topografia e das propriedades nanomecânicas dos biofilmes, obteve-se uma compreensão abrangente do impacto do ZnO na formação e na resistência desses biofilmes.

A análise topográfica revelou que a adição de ZnO às superfícies vítreas afeta significativamente a estrutura dos biofilmes. Em concentrações menores, como 5% de ZnO, observou-se um aumento na rugosidade dos biofilmes, indicando uma resposta defensiva das bactérias com a produção de uma matriz extracelular mais robusta. Em contrapartida, concentrações mais elevadas de ZnO, como 7,5% e 10%, resultaram em uma redução acentuada na formação e na altura do biofilme, com uma superfície mais lisa e menos colonizada.

As propriedades nanomecânicas, avaliadas por meio de AFM, mostraram que o ZnO influencia diretamente o módulo de elasticidade dos biofilmes, com uma diminuição da "rigidez" em concentrações mais altas. A força de adesão aumentou com a concentração de ZnO, enquanto a deformação dos biofilmes indicou menor resistência ao estresse mecânico em substratos dopados com ZnO.

A presença de ZnO nas superfícies vítreas demonstrou uma influência significativa na formação e resistência dos biofilmes. O ZnO tem um efeito antimicrobiano que inibe a formação de biofilmes em concentrações elevadas, tornando as superfícies mais lisas e menos suscetíveis à colonização bacteriana.

Esses achados têm implicações importantes para o *design* de materiais bioativos, especialmente na criação de superfícies antimicrobianas que podem ser aplicadas em dispositivos médicos e em outros contextos onde a prevenção da formação de biofilmes é crucial. Além disso, contribuem na compreensão das interações entre biofilmes e superfícies modificadas quimicamente. Os resultados obtidos ajudam a elucidar como a modificação com ZnO pode influenciar a adesão e a resistência dos biofilmes, promovendo avanços na concepção de superfícies com propriedades antimicrobianas e na prevenção de biofilmes indesejáveis.

7. Perspectivas e Trabalhos Futuros

- **Influência do Tempo de Incubação:** Avaliação da adaptação e resistência bacteriana ao vidro dopado com ZnO em tempos prolongados.
- **Resposta de Diferentes Espécies Bacterianas:** Investigação da eficácia do vidro contra outros patógenos clínicos relevantes, como os associados a infecções hospitalares.
- **Combinação com Outros Biomateriais:** Teste de sinergias para potencializar a prevenção da adesão e formação de biofilmes.
- **Mecanismos Moleculares:** Estudo das interações entre o vidro e a membrana celular bacteriana, incluindo alterações estruturais e expressão gênica.
- **Investigar a solubilidade das diferentes composições e monitorar a variação de pH.**

8. Referências

ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. da R. **Biofilme e células persisters: da persistência à resistência microbiana.** Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Microbiologia (DCB – ENSP), Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2022. p. 228-234. DOI: 10.21877/2448-3877.202200074. Disponível em: <<https://www.rbac.org.br/artigos/biofilme-e-celulas-persisters-da-persistencia-a-resistencia-microbiana/>>. Acesso em: julho de 2024.

AKRAMI, N.; GHANAD, M.; KEIL, P.; BRADTMULLER, H.; HANSEN, M. R.; KARGOZAR, S.; KHAKI, J. V. ; BEIDOKHTI, S. M. **Microstructural properties and in vitro dissolution of microporous bioactive 13-93B3 glass powders synthesized via solution combustion synthesis.** Journal of Non-Crystalline Solids, v. 615, p. 12, jun. 2023. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2023.12242>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022309323002910?via%3Dihub>>. Acesso em: agosto de 2024.

ARCHER, N. K.; MAZAITIS, M. J.; COSTERTON, J. W.; LEID, J. G.; POWERS, M. E.; SHIRTLIFF, M. E. **Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease.** Virulence. 2011 Sep-Oct;2(5):445-59. doi: 10.4161/viru.2.5.17724. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21921685/>> Acesso em: agosto de 2024

CARVALHO, C. et al. **Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica.** Jornal de Pediatria (Rio J.), v. 81, n. 1, p. 29-33, fev. 2005. Artigos Originais. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0021-75572005000100007>>. Acesso em: julho de 2024.

CENCI, Tatiana Pereira. **Development of candida-associated denture stomatitis: new insights.** Revista de Ciência Oral Aplicada, v. 2, pág. 86-94, abr. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-77572008000200002> . Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jaos/a/kZKj8qqzPfdQWFh66jRzhYR/>>. Acesso em: agosto de 2024.

CROVACE, C. M.; SOUZA, T. M.; CHINAGLIA, R. C.; PEITL, O.; ZANOTTO, D. E.; **Biosilicate® — A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials.** Journal of Non-Crystalline Solids, v. 432, n. A, p. 90-110, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.03.022>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022309315001271>>. Acesso em: agosto de 2024.

DAROUICHE, R. O. **Treatment of infections associated with surgical implants.** New England Journal of Medicine, v. 350, n. 14, p. 1422-1429, 1 abr. 2004. DOI: 10.1056/NEJMra035415. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/10.105639.88-2003>> . Acesso em: maio de 2024.

DEMIREL, Barış; TAYGUN, Melek Erol. **Zinc oxide-doped antibacterial soda lime glass produced as a glass container.** ACS Omega, v. 8, p. 9257-9264, 3 mar.

2023. DOI: 10.1021/acsomega.2c07469. Disponível em:
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36936299/>>. Acesso em: agosto de 2024.

DEMIREL, Barış; TAYGUN, Melek Erol. **Antibacterial borosilicate glass and glass ceramic materials doped with ZnO for usage in the pharmaceutical industry.** ACS Omega, v. 8, n. 21, p. 18735-18742, 18 maio 2023. DOI: 10.1021/acsomega.3c00720. Disponível em:
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37273588/>>. Acesso em: agosto de 2024.

DI STEFANO, A., D'AURIZIO, E.; TRUBIANI, O., GRANDE, R.; DI CAMPLI, E., DI GIULIO, M., DI BARTOLOMEO, S.; SOZIO, P.; IANNITELLI, A.; NOSTRO, A.; CELLINI, L. **Viscoelastic properties of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mono-microbial biofilms.** Microb Biotechnol, v. 2, n. 6, p. 634-641, 2009. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2009.00120.x. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3815319/>>. Acesso em: agosto de 2024

GÓMEZ, S.; VLAD, M. D.; LÓPEZ, J.; FERNÁNDEZ, E. **Design and properties of 3D scaffolds for bone tissue engineering.** Acta Biomater, 2016. v. 15, n. 42, p. 341-350. doi: 10.1016/j.actbio.2016.06.032. Epub 2016 Jun 28. PMID: 27370904.

GOUDOURI, Ourania-Menti; KONTONASAKI, Eleana; LOHBAUER, Ulrich; BOCCACCINI, Aldo R. **Antibacterial properties of metal and metalloid ions in chronic periodontitis and peri-implantitis therapy.** Acta Biomaterialia, v. 10, n. 9, p. 3798-3810, ago. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.028>. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1742706114001482/>>. Acesso em: julho de 2024.

HAJIPOUR, M. J.; FROMM, K. M.; ASHKARRAN, A. A.; JIMENEZ, A. D., LARRAMENDI, I. R.; ROJO, T.; SERPOOSHAN, V.; PARAK, W. J.; MAHMOUDI, M. **Antibacterial properties of nanoparticles.** Trends Biotechnol, v. 30, n. 10, p. 499-511, out. 2012 DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.06.004. Disponível em:
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22884769/>>. Acesso em: agosto de 2024.

HENCH, L. L. **The story of Bioglass®.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 1. ed. [S.l.]: Springer Science + Business Media, LLC, 2006. v. 17, p. 967-978. DOI: 10.1007/s10856-006-0432-z. Recebido em: 8 fev. 2006. Aceito em: 10 fev. 2006. Acesso em: abril de 2024.

HOPPE, A.; GULDAL, N. S.; BOCCACCINI, A. R. **A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics.** Biomaterials, v. 32, n. 11, p. 27-57-74. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.004. Epub 2011 Feb 2. Disponível em:
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21292319/>>. Acesso em: agosto de 2024.

HUANG, L.; JIN, Y.; ZHOU, D.; LIU, L.; HUANG, S.; ZHAO, Y., CHEN, Y. **A Review of the Role of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Wastewater Treatment Systems.** Int J Environ Res Public Health, v. 26, n. 19, p. 12191. set. 2022 DOI: 10.3390/ijerph191912191. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9566195/>>. Acesso em: agosto de 2024.

JANANI, B.; SYED, A.; RAJU, L.; AL-HARTHI, H.; THOMAS, A.; DAS, A.; KHAN, S. **Síntese de nanopartículas de óxido de zinco estabilizadas por carbono e avaliação de suas atividades fotocatalíticas, antibacterianas e anti-biofilme.** Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, v. 30, 2020. DOI: 10.1007/s10904-019-01404-9.

KWASNIEWSKA, Anita; SWIETLICKI, Michał; PRÓSZYNSKI, Adam; GLADYSZEWSKI, Grzegorz. **The quantitative nanomechanical mapping of starch/kaolin film surfaces by Peak Force AFM.** Polymers, v. 13, p. 244, 2021. DOI: 10.3390/polym13020244. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/polym13020244>>. Acesso em: junho de 2024.

LAVERTY, Garry; GORMAN, Sean P.; GILMORE, Brendan F. **Mecanismos biomoleculares da formação de biofilme estafilocócico.** Future Microbiology, v. 8, n. 4, p. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.7>. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2217/fmb.13.7>>. Acesso em: agosto de 2024.

LEW, Daniel P.; WALDVOGEL, Francisco A. **Osteomyelite.** The Lancet, v. 364, n. 9431, p. 369-379, 24-30 jul. 2004. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16727-5. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(04\)16727-5/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(04)16727-5/abstract)>. Acesso em: maio de 2024

LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; GEDANKEN, A.; LUBART, R. **Antifungal activity of ZnO nanoparticles-the role of ROS mediated cell injury.** Nanotechnology, v. 11, n. 10. DOI: 10.1088/0957-4484/22/10/105101. Epub 2011 Feb 2. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21289395/>>. Acesso em: agosto de 2024.

MARQUES, Simone Cristina; REZENDE, Jaíne das Graças Oliveira Silva; ALVES, Lizandra Aparecida de Freitas; SILVA, Belami Cássia; ALVES, Eduardo; ABREU, Luiz Ronaldo de; PICCOLI, Roberta Hilsdorf. **Formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável e vidro e sua resistência a alguns sanitizantes químicos selecionados.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 38, n. 3, p. 538-543, set. 2007. *Food Microbiology*. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300029>>. Acesso em: junho de 2024.

PANTULAP, Usanee; ARANGO-OSPINA, Marcela; BOCCACCINI, Aldo R. **Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 33, n. 3, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06626-3>. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-021-06626-3>>. Acesso em: julho de 2024.

PEEL, T. N.; CHENG, A. C.; BUISING, K. L.; CHOONG, P. F. **Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, n. 5, p. 2386-2391, maio 2012. DOI: 10.1128/AAC.06246-11.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3346661/>>. Acesso em: maio de 2024.

PEREIRA-CENCI, Tatiana; PEREIRA, Luciano José; CENCI, Maximiliano Sérgio; BONACHELA, Wellington Cardoso; DEL BEL CURY, Altair Antoninha. **Força máxima de mordida e sua associação com disfunções temporomandibulares.** Revista Brasileira de Odontologia, v. 18, n. 1, pág. 65-68, 2007. DOI: 10.1590/s0103-64402007000100014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0103-64402007000100014>>. Acesso em: agosto de 2024.

RADFORD, DR; WALTER, JD **Aderência de *Candida albicans* a materiais para base de prótese com diferentes acabamentos superficiais.** Journal of Dentistry, v. 26, n. 7, p. 577-583, set. 1998. DOI: 10.1016/s0300-5712(97)00034-1. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9754746/>>. Acesso em: agosto de 2024.

RANIERI, Michael RM; WHITCHURCH, Cynthia B.; BURROWS, Lori L. **Mecanismos de estimulação de biofilme por concentrações subinibitórias de antimicrobianos.** Current Opinion in Microbiology, v. 45, p. 164-169, 2018. ISSN 1369-5274. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.006>>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527418300237>>. Acesso em: agosto de 2024.

SANTOS, André Luis dos; SANTOS, Dilvani Oliveira; FREITAS, Cícero Carlos de; FERREIRA, Bruno Leal Alves; AFONSO, Ilídio F.; RODRIGUES, Carlos Rangel; CASTRO, Helena C. ***Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007. Medicina Laboratorial. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000600005>>. Acesso em: junho de 2024.

SAWAI, Jun; SHOJI, Shinobu; IGARASHI, Hideo; HASHIMOTO, Atsushi; KOKUGAN, Takao; SHIMIZU, Masaru; KOJIMA, Hiromitsu. **Hydrogen Peroxide as an Antibacterial Factor in Zinc Oxide Powder Slurry.** Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 86, n. 5, p. 521-522, 1998. Disponível em: <<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:85021994>>. Acesso em: 17 ago. 2024.

SIRELKHATIM, A.; MAHMUD, S.; SEENI, A.; BAKHORI, SKM; HASAN, H.; MOHAMAD, D. **Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism.** Nanomicro Letters, v. 7, n. 3, p. 219-242, 2015. DOI: 10.1007/s40820-015-0040-x. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6223899/>>. Acesso em: agosto de 2024.

SOUSA, C.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R. **Influence of Surface Properties on the Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Acrylic and Silicone.** International Journal of Biomaterials, v. 2009, p. 1-9, 2009. DOI: 10.1155/2009/718017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2009/718017>>. Acesso em: agosto de 2024.

THOMAS, G.; BURNHAM, N. A.; CAMESANO, T. A.; WEN, Q. **Measuring the mechanical properties of living cells using atomic force microscopy.** J Vis Exp, v. 27, p. 76. jul. 2013. DOI: 10.3791/50497. PMID: 23851674. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23851674/>>. Acesso em: agosto de 2024.

TONG, S. Y.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. Jr. **Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management.** Clin Microbiol, V. 28, N. 3, P. 603-61, jul. 2015. DOI: 10.1128/CMR.00134-14. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26016486/>>. Acesso em: agosto de 2024.

TOUHAMI, Ahmed; JERICHO, Manfred H.; BEVERIDGE, Terry J. **Microscopia de Força Atômica do Crescimento e Divisão Celular em *Staphylococcus aureus*.** Journal of Bacteriology, v. 186, n. 11, p. 3286-3295, jun. 2004. DOI: 10.1128/JB.186.11.3286-3295.2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC415778/>>. Acesso em: maio de 2024.

WHITEHOUSE, J. D.; FRIEDMAN, N. D.; KIRKLAND, K. B.; RICHARDSON, W. J.; SEXTON, D. J. **The impact of surgical-site infections following orthopedic surgery at a community hospital and a university hospital: adverse quality of life, excess length of stay, and extra cost.** Infection Control & Hospital Epidemiology, v. 23, n. 4, p. 183-189, abr. 2002. DOI: 10.1086/502033. PMID: 12002232

BANNERMAN, T. L. Staphylococcus, Micrococcus e outros cocos catalase-positivos que crescem aerobicamente. In: MURRAY, P. R. et al. (eds.). **Manual de Microbiologia Clínica.** 8. ed. Washington, DC: ASM Press, 2003. v. 1, p. 384-404.

CHEN, Yun. **Analysis of bacterial adhesion forces: a study using atomic force microscopy.** 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – University of Groningen, Groningen, 2014. Disponível em: <<https://research.rug.nl/en/publications/análise-of-bacterial-adhesion-forces-a-study-using-força-atômica->> . Acesso em: agosto de 2024.

GOUDOURI, Ourania-Menti; KONTONASAKI, Eleana; LOHBAUER, Ulrich; BOCCACCINI, Aldo R. **Antibacterial properties of metal and metalloid ions in chronic periodontitis and peri-implantitis therapy.** *Acta Biomaterialia*, 2014. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.03.028. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.028>>. Acesso em: agosto de 2024>. Acesso em: julho de 2024

NAHAR, S. N. **Phase-separation characteristics of bitumen and their relation to damage-healing.** 2016. Tese (Doutorado) – Delft University of Technology, Delft, 2016. ISBN 978-94-6186-598-4. Disponível em: <http://repository.tudelft.nl/>. Acesso em: julho de 2024.

NORONHA, Victor Teixeira. **Revestimentos de prata sobre superfícies silanizadas: avaliação de resistência química e adesão bacteriana.** 2017. Tese (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/317168958>>. DOI: 10.13140/RG.2.2.34308.73602. Acesso em: agosto de 2024.

PASSOS, Tathiane Ferroni. **Atividade bactericida e inibidora da formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus* pelo vidro bioativo F18**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/11620>. Acesso em: março de 2024.

YAMAUCHI, M.; WAKABAYASHI, M.; KAWANO, J. **Aderência in vitro de microrganismos à resina para base de prótese com diferentes texturas superficiais**. *Dental Materials Journal*, v. 9, n. 1, p. 19-24, jun. 1990. DOI: 10.4012/dmj.9.19. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2098207/>. Acesso em: agosto de 2024.

BHUSHAN, Bharat (Ed.). **Springer handbook of nanotechnology**. 1. ed. Berlin: Springer, 2004. 1189 p. ISBN 3-540-01218-4. p. 325-492.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. ISBN 978-0-321-89739-8.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction to bioceramics**. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993. p. 1-15.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524 p. Unidade 4, cap. 19.

AUTORIDADE DE SEGURANÇA ALIMENTAR E ECONÓMICA. **Staphylococcus aureus**. Órgão de Polícia Criminal, Ministério da Economia, República Portuguesa. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/staphylococcus-aureus>. Acesso em: junho de 2024.

BRUKER. **PeakForce QNM**. Santa Barbara, CA: Bruker Nano Surfaces Division, 2010. Disponível em: <https://www.bruker.com>. Acesso em: junho de 2024.

BRUKER. **Nanomecânica quantitativa PeakForce (QNM)**. Disponível em: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microscopes/materials-afm/afm-modes/peakforce-qnm.html>. Acesso em: junho de 2024.

BRUKER. **PeakForce Tapping**. Disponível em: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microscopes/materials-afm/afm-modes/peakforce-tapping.html>. Acesso em: 17 ago. 2024.

KLAPETEK, Petr; NECAS, David; ANDERSON, Cristóvão. **Guia do usuário Gwyddion**, 2023. Disponível em: <http://gwyddion.net/documentation/user-guide-en/>. Acesso em: abril de 2024.

John Wiley & Sons Ltda, **ATOMIC force microscopy for materials**. 1. ed. Santa Barbara, CA: Bruker Nano Surfaces Division, 2027. Disponível em: <https://www.bruker.com>. Acesso em: junho de 2024.

PITTENGER, Bede; SLADE, Andrea; BERQUAND, Alexandre; MILANI, Pascale; BOUDAUD, Arezki; HAMANT, Olivier. **Bruker Nano Surfaces Division**. Santa Barbara, CA: Bruker Corporation, 2013. Disponível em: <<https://www.bruker.com>>. Acesso em: junho de 2024.