

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MATEUS GUILHERME LOBO

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓXIDO DE ZINCO E DIÓXIDO DE  
TITÂNIO DOPADO COM PRATA

Uberlândia - MG

2022

MATEUS GUILHERME LOBO

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓXIDO DE ZINCO E DIÓXIDO DE  
TITÂNIO DOPADO COM PRATA

Trabalho de Conclusão de Curso da  
Universidade Federal de Uberlândia como  
requisito à aprovação na disciplina de Trabalho  
de Conclusão de Curso II.

Área de concentração: Microbiologia e  
Nanobiotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas  
Mota

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Vivian Alonso  
Goulart

Uberlândia - MG

2022

MATEUS GUILHERME LOBO

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓXIDO DE ZINCO E DIÓXIDO DE  
TITÂNIO DOPADO COM PRATA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de Uberlândia como  
requisito parcial para obtenção do título de  
bacharel em medicina veterinária.

Área de concentração: Microbiologia e  
Nanobiotecnologia

Uberlândia, 19 de agosto de 2022

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota – Orientador –  
FAMEV UFU

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Daise Aparecida Rossi –FAMEV UFU

---

Me. Phelipe Augusto Borba Martins Peres - UFU

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus queridos pais Marcos e Simone por todo apoio durante minha graduação, sem a qual esse trabalho não seria possível.

A minha amada avó Bernadete e tia Josiane que com seu amor desmedido tiveram enorme participação em minha criação.

Ao meu querido avô Luiz (*in memoriam*) que foi e sempre será minha fonte de inspiração e reflexão.

Aos meus irmãos Lucas, Raphael e Beatriz dos quais estive distante durante minha graduação e são uma imensa saudade dentro de meu coração.

Aos meus amigos de república Bruno, Gabriel, Vitor e Rogério que em meio a intercorrências que permeiam a vida de um estudante sempre estiveram ao meu lado e com grande orgulho digo que se tornaram uma família para mim.

Aos meus amigos de curso Beatriz, Hugo, Leonardo e Maria Victória que se tornaram meu porto seguro longe de casa e tiveram participação em cada etapa de meu desenvolvimento pessoal.

Ao meu orientador professor Dr. Francisco que além de um grande mestre, sempre muito atencioso e disposto a ensinar, é sem dúvida uma inspiração para mim.

A minha coorientadora professora Dr<sup>a</sup>. Vivian que não mediu esforços para me ajudar da realização desse projeto.

Ao meu caro amigo Phelipe que teve participação fundamental na elaboração desse trabalho, sempre se mostrando muito paciente e disposto.

## RESUMO

As infecções bacterianas de origem hospitalar são um desafio para realidade da medicina veterinária, tornando tratamentos mais onerosos, demandando antibióticos mais potentes, aumentando a gravidade dos quadros clínicos e agravando possíveis prognósticos. Com o aparecimento cada vez maior de bactérias super-resistentes e o precário desenvolvimento de novos fármacos faz necessário explorar a capacidade e aplicabilidade dos biomateriais na rotina clínico cirúrgica da medicina veterinária. Esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos das nanopartículas de óxido de zinco puro, óxido de zinco associado a dióxido de titânio e dióxido de titânio dopadas com prata sobre o crescimento bacteriano do *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Foram realizados testes de disco difusão em ágar nutritivo com concentrações de 8000 µg/mL e 4000 µg/mL das diferentes composições de nanopartículas frente a inóculos padronizados a 0,5 na escala MacFaland e com uma diluição 1:10 de todos os microrganismos testados. Foram observados halos inibitórios apenas nas composições de nanopartícula com presença de ZnO frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25924, com inóculo 0,5 na escala MacFaland diluído 1:10. Dessa forma concluiu que nesse experimento o dióxido de titânio dopado com prata sem ação fotocatalítica não possui atividade antimicrobiana sobre os microrganismos testados, já o óxido de zinco possui efeitos promissores frente a microrganismos gram positivos, sendo necessário mais estudos.

**Palavras-chave:** Nanotecnologia; nanopartículas; biomateriais; microrganismo; bactéria.

## ABSTRACT

Bacterial infections of hospital origin are a challenge for the reality of veterinary medicine, making treatments more expensive, demanding more potent antibiotics, increasing the severity of clinical conditions and aggravating possible prognoses. With the increasing emergence of super-resistant bacteria and the precarious development of new drugs, it is necessary to explore the capacity and applicability of biomaterials in the clinical surgical routine of veterinary medicine. This work aimed to evaluate the effects of pure zinc oxide nanoparticles, zinc oxide associated with titanium dioxide and silver-doped titanium dioxide on the bacterial growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Disk diffusion tests were performed in nutrient agar with concentrations of 8000  $\mu\text{g/mL}$  and 4000  $\mu\text{g/mL}$  of the different nanoparticle compositions against standardized inoculum at 0.5 on the MacFaland scale and with a 1:10 dilution of all tested microorganisms. Inhibitory halos were observed only in the nanoparticle compositions with the presence of ZnO against *Staphylococcus aureus* ATCC 25924, with inoculum 0.5 on the MacFaland scale diluted 1:10. Thus, it was concluded that in this experiment, titanium dioxide doped with silver without photocatalytic action does not have antimicrobial activity on the microorganisms tested, whereas zinc oxide has promising effects against gram positive microorganisms, requiring further studies.

**Keywords:** Nanotechnology; nanoparticles; biomaterials; microorganism; bacterium.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	7
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	7
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	7
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	8
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	8
<b>4.1 Tipos de fratura</b> .....	8
<b>4.2 Implantes ortopédicos</b> .....	8
<b>4.3 Osteomielite</b> .....	9
<b>4.4 Biomateriais</b> .....	10
<b>4.5 Nanopartículas</b> .....	11
<b>4.5.1 Dióxido de titânio</b> .....	11
<b>4.5.2 Nanopartícula de prata</b> .....	12
<b>4.5.3 Nanopartícula de óxido de zinco</b> .....	13
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	13
<b>5.1 Síntese das nanopartículas</b> .....	13
<b>5.2 Preparo do inóculo</b> .....	14
<b>5.3 Ensaio de potencial antimicrobiano das nanopartículas de ZnO e TiO<sub>2</sub> dopado com prata</b> .....	15
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	16
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	19
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	21

## 1 INTRODUÇÃO

Na atual conjuntura da clínica cirúrgica de pequenos animais observamos as moléstias ortopédicas como episódios frequentes, destacando-se principalmente as fraturas no esqueleto apendicular dos cães e gatos, que possuem como principal causa, etiologias de origem traumáticas (CHITOLINA et al. 2022). Esse quadro tem como justificativa o grande número de animais de companhia com acesso as vias públicas, sem supervisão dos tutores, propiciando incidentes de atropelamento (VIDANE et al., 2014).

Não obstante, a causa da fratura acarretará uma grande demanda financeira por parte dos tutores (ROSANOWSKI et al., 2019), influenciando na tomada de decisão do médico veterinário, além de confrontar as expectativas quanto a recuperação do estado normal do paciente (ORSINI, 2011). Nesse contexto, o tratamento de afecções ortopédicas visa associar técnicas e materiais versáteis, com baixo custo e que possam propiciar uma adequada estabilização do foco de fratura (SEVERO et al., 2010).

Diversos fatores estão atrelados para definir a melhor abordagem cirúrgica de estabilização do foco de fratura: a idade, tipo de fratura, grau de exposição e contaminação, além de especificidades do proprietário, que vão influenciar na escolha do dispositivo, que por sua vez, se falhar no alinhamento do osso, vai retardar o processo de cura (HARARI, 2002). Dentre as complicações que podem ocorrer após a fixação de uma fratura, as infecções são as com abordagem mais complexas, levando a um atraso na cicatrização, até mesmo a perda de função, e conseqüente amputação do membro acometido (METSEMAKERS et al., 2016). Os fatores que vão influenciar a taxa de ocorrência dessa complicação estão associados a natureza da fratura, tamanho da ferida, da espécie e número da bactéria (PENN-BARWELL et al., 2014). Em casos de fratura exposta as taxas de infecção podem chegar a 65%, e até 30% após a síntese óssea, retardando a recuperação do paciente (YANO et al. 2014).

Os agentes comumente identificados nos quadros de osteomielite em cães e gatos são *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* (com destaque para *Staphylococcus aureus*, sendo a bactéria mais frequentemente isolada) e micro-organismos entéricos gram-negativos (DECAMP et al., 2016b; GRANT; OLDS, 2007; ZIMMERLI et al., 2011). Com a emergência de microrganismos multirresistentes pelo uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, há necessidade de lançar mão de técnicas mais onerosas e com pior prognóstico aos pacientes, sendo necessário o reconhecimento dessa problemática por todos os profissionais de saúde (PRIMAZ et al, 2021).



O campo da nanotecnologia vem descobrindo novos biomateriais com escalas de tamanho que variam de 0,1 a 100 nm, permitindo uma ampla gama de aplicações para diversos segmentos devido suas características físico-químicas únicas (CARREIRA et al., 2009; SYAMA et al., 2014). Dentre esses novos biomateriais, as nanopartículas com propriedades metálicas vêm ganhando destaque no campo da biomedicina devido seu baixo custo e fácil obtenção. Dentre elas, podemos destacar a nanopartícula de prata (Ag) com propriedades antibacterianas e baixa toxicidade aos organismos animais (CARREIRA et al., 2009; KOGA et al., 2009). Nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) já são utilizadas em uma ampla gama de produtos em diversas cadeias produtivas, incluindo a adição a implantes ortopédicos, aprimorando suas características físicas e diminuindo também a taxa de infecção bacteriana (JIN et al., 2017; NISKA et al., 2015; ZHAO et al., 2013;). Também podemos citar o óxido de zinco, o qual possui proeminência quando confrontado com antibióticos orgânicos e aptidão no controle de frente a formas esporuladas de fungos (GRUMEZESCU, 2016; KARUNAKARAN et al., 2011; SONDI, SONDI, 2004).

Tendo em vista esse contexto, este trabalho foi realizado para estudar o impacto das nanopartículas de ZnO puro, ZnO associada a TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub> dopadas com prata sobre o crescimento bacteriano do *Staphylococcus aureus* SCCmec III (staphylococcal cassette chromosome mec), *Staphylococcus aureus* ATCC 25924, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Como exposto na introdução deste trabalho, as infecções bacterianas se mostram presentes na rotina cirúrgica da medicina veterinária, aumentando os custos com tratamento, agravando a clínica dos pacientes e fazendo-se necessário a utilização de antibióticos potentes. Com o surgimento cada vez maior de bactérias super-resistentes aos antimicrobianos existentes e o precário desenvolvimento de novos fármacos, faz-se necessário explorar a utilização das nanopartículas como alternativa de tratamento e entender sua aplicabilidade na medicina veterinária.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a capacidade inibitória das nanopartículas de ZnO puro, associação de ZnO 75%/TiO<sub>2</sub> 25% e TiO<sub>2</sub> dopadas com prata em diferentes tamanhos e formas sobre

*Staphylococcus aureus* SCC mec III, *Staphylococcus aureus* ATCC25924, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a ação inibitória das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> dopadas com prata, sem a realização de um processo de fotoexcitação, sobre *Staphylococcus aureus* SCC mec III, *Staphylococcus aureus* ATCC 25924, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044.
- Avaliar o impacto do tamanho e forma das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> dopadas com prata sobre o efeito antimicrobiano.
- Avaliar a ação inibitória das nanopartículas de ZnO puro e associado com TiO<sub>2</sub> sobre *Staphylococcus aureus* SCC mec III, *Staphylococcus aureus* ATCC 25924, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Tipos de fratura

As fraturas devem ser classificadas a fim de possibilitar um melhor planejamento e tratamento por parte do médico veterinário, além de tornar precisa a comunicação entre profissionais e proprietários. Dessa forma, as fraturas devem ser avaliadas como completas ou incompletas, simples ou cominutivas, abertas ou fechadas, quanto à disposição da linha de fratura, sendo transversa, oblíqua ou espiral. Além disso, faz parte da avaliação agrupar as fraturas em redutíveis ou irredutíveis e acerca do local onde ocorreu a lesão, sendo na diáfise, metáfise, fisárias, epífise e na superfície articular (FOSSUM, 2013).

Fraturas abertas por sua vez podem ser graduadas em Grau I, para lesões como uma mínima comunicação com o ambiente externo, Grau II, com feridas de tamanhos variáveis promovidas pela perfuração da pele pelo osso fraturado, entretanto apresentando poucos fragmentos ósseos, e de Grau III com uma fratura gravemente cominutiva concomitantemente a uma lesão de pele e de tecidos moles extensa (FOSSUM, 2013). Levando em conta a localização, fraturas fisárias em animais jovens seguem a classificação de Salter-Harris que é graduado em 5 graus de acordo com a localização e gravidade (DECAMP et al., 2016a).

### 4.2 Implantes ortopédicos

No mercado estão disponíveis uma gama de dispositivos cirúrgicos que permitem diversas alternativas de fixação (ROUSH, 2005), atendendo as necessidades dos diferentes

tipos de fratura, condição financeira e nível de cooperação do tutor no pós-operatório (DEYOUNG; PROBST, 1998). Fatores mecânicos, biológicos e clínicos vão influenciar direta ou indiretamente o processo de consolidação óssea, sendo assim fundamental considerar essas condições para a escolha de uma redução aberta ou fechada (DENNY; BUTTERWORTH, 2006; PIEMATTEI; FLO; DECAMP, 2006).

Faz-se a opção pela redução aberta da fratura quando a mesma for simples, oblíqua, com presença de fragmentos ósseos ou com comprometimento de superfícies articulares, devido a melhor visualização do foco de fratura (DENNY; BUTTERWORTH, 2006), entretanto o comprometimento intenso do sistema vascular e tecidos moles aumenta as chances de infecções bacterianas (REDFERN et al., 2004). Todavia, a utilização do método de redução fechada não envolve exposição cirúrgica, mantendo a integridade da vasculatura e tecidos moles no foco de fratura (JOHNSON et al., 1989; PALMER, 1999; PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2006), mas podendo comprometer o processo de consolidação óssea pelo insucesso do alinhamento da fratura (PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2006).

Dentre os implantes ortopédicos utilizados para fixação interna temos as cerclagens, pinos intramedulares, pinos de Rush, banda de tensão, haste bloqueada, placas e parafusos (DENNY; BUTTERWORTH, 2006; TUDURY; POTIER, 2009), sendo esse último um método muito empregado para fraturas de ossos longos devido sua vantagem em favorecer a utilização prematura do membro fraturado e bem-estar no pós-operatório (PIERMATTEI; FLO, 1999). Entretanto, a utilização de placas e parafusos podem culminar em complicações como quebra do implante, retardo no processo de consolidação e osteomielite (STIFFLER, 2004).

Os implantes cirúrgicos de titânio são aqueles com menor taxa de complicações (RENGANATHAN, TANNERU; MADURAI, 2018), tendo como vantagem a propriedade de formar espontaneamente uma camada de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) pouco espessa e desuniforme, que confere maior resistência e bioatividade ao material (LIU; CHU; DING, 2004).

### **4.3 Osteomielite**

A osteomielite é estabelecida como uma infecção óssea promovida por micro-organismos piogênicos, podendo ser classificada em aguda, subaguda e crônica, como também caracterizada quanto a forma de infecção, sendo hematogênica, contígua e crônica (CAREK et

al., 2001). A infecção do tecido ósseo pode ocorrer por inoculação de microrganismos, traumas ou presença de implantes ortopédicos (BRANDY et al., 2006) e está diretamente relacionada ao comprometimento ósseo e de tecidos moles adjacentes, sendo uma implicação importante e presente nos procedimentos de osteossíntese (ELLINGTON et al., 2006).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são microrganismos de relevância nos processos de osteomielite, quando as infecções estão associadas a implantes ortopédicos (DAROUICHE, 2004), já os micro-organismos gram negativos frequentemente associadas a infecções hospitalares são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (CAMARGO JUNIOR; ARIAS; PERUGINI, 2020), tornando a resolução da consolidação óssea mais onerosa (TURK et al., 2015) e em alguns casos demandando mais procedimentos cirúrgicos, além da remoção dos dispositivos implantados (NICOLL et al., 2014). A patogenia dos quadros de osteomielite por *Staphylococcus sp.* ligada a materiais cirúrgicos implantáveis se sucede pela capacidade de formar biofilme (OLIVEIRA, 2014), permitindo a sobrevivência desses microrganismos frente a agentes antimicrobianos e propiciando a manutenção da infecção (WOLSKA et al., 2016).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2016), *Klebsiella pneumoniae* foi o microrganismo mais constantemente relatado em infecções de unidades de tratamento intensivo no período de 2011-2015, além de ser crescente os índices de resistência aos carbapenêmicos. As carbapenemases produzidas por esses microrganismos são enzimas capazes de causar hidrólise em antibióticos betalactâmicos (LOGAN; WEINSTEIN, 2015; GUPTA et al., 2011;) além de ser um fator de resistência com alta correlação com a taxa de mortalidade dos pacientes (HIGASHINO, 2020).

#### **4.4 Biomateriais**

A palavra biomaterial é definida por materiais que constituem implantes médicos, vastamente utilizados na medicina, odontologia e medicina veterinária (TURRER; FERREIRA, 2001), e suas características vão mudar dependendo do local onde serão empregadas. Em um contexto geral, esses materiais vão possuir características apoiadas em propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas, como biocompatibilidade, citotoxicidade, hemocompatibilidade, estímulo a adesão e proliferação celular (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Os principais metais que compõe os biomateriais são baseados em Fe, Cr, Ni, Ti, Co, entre outros elementos, formando as ligas metálicas que são toleradas pelo organismo (RODRIGUES, 2013).

A implementação de nanopartículas de Ag, Fe, Cu em implantes cirúrgicos reduzem complicações como infecções bacterianas (ALLAKER; YUAN, 2019), onde a associação de um metal e um semicondutor aumenta o número de radicais livres disponíveis no sistema, conferindo ação bactericida (KURIAKOSE et al., 2014, REN et al., 2010), como a ação observada na associação de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e Ag, onde juntas foram capazes de produzir um efeito bactericida frente a *Escherichia coli* (GUIN et al., 2007), também vista no composto híbrido de nanopartículas de ZnO e Ag frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ANDRADE et al., 2016).

#### 4.5 Nanopartículas

A utilização da palavra nanotecnologia se deu com a iniciação de pesquisas com foco em materiais de escalas nanométricas (BRAKMANE et al., 2012), tendo diversas aplicações em variados segmentos de áreas como física, química, biologia e área médica (CLAVIJO et al., 2009). Esses materiais de escala nanométrica podem ser produzidos e projetados com dimensões, formas e composições variadas, como metais e óxidos de metais (DOAK et al., 2009).

Como possuem grandezas nanométricas são partículas muito menores que a grande maioria das células eucariontes, possibilitando sua internalização (RASMUSSEN et al., 2010). Além disso quando comparadas a partículas com proporções maiores, as nanopartículas possuem na sua superfície uma quantidade átomos mais elevada, tornando-as mais reativas (GOGOTSI, 2006; GUOZHONG, 2004).

##### 4.5.1 Dióxido de titânio

O dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) é um óxido de metal que ocorre em três estruturas cristalinas naturalmente. O rutilo é a forma mais comum, com uma forma tetragonal, enquanto anatase e brukita são formas consideradas raras, sendo elas tetragonal e um octaedro respectivamente (CHEN et al., 2014, MOELLMANN et al., 2012). As características físico-químicas do TiO<sub>2</sub> mudam de acordo com a forma cristalina em que se encontra (rutilo, anatase e brukita), o tamanho, área de superfície e grau de cristalinidade (TAN et al., 2015). Dependendo da sua morfologia os nanocristais de TiO<sub>2</sub> darão origem a diferentes reações competitivas entre os íons presentes no eletrólito, resultando em efeitos diversos como estímulo de adesão celular com a incorporação de íons fluoreto e aumento da proliferação celular pela incorporação de íons fosfato (KIM et al., 2008).

Existem preocupações com o potencial citotóxico que nanopartículas no geral poderiam desempenhar, como demonstrado em estudos onde na aplicação intravenosa de TiO<sub>2</sub> promoveu um aumento na inflamação pulmonar (FERIN, OBERDÖRSTER; PENNEY, 1992). Entretanto, como demonstrado no estudo de DUARTE et al (2019) não houve citotoxicidade a células tronco mesenquimais derivadas de adipócitos frente a nanopartículas de TiO<sub>2</sub> com diferentes composições e concentrações. Essa associação libera fosfoesfingolipídeos, subclasse ceramida fosfoetanolamina, que é essencial para funções básicas e de proliferação celular, também participando de mecanismos inflamatórios e de angiogênese (DUARTE et al., 2019), também mostrou efeitos positivos quanto a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais, aumentando a produção de matriz óssea (LIMA,2017). As nanopartículas de TiO<sub>2</sub> quando associadas a antibióticos mostraram efeitos sinérgicos quando confrontadas contra *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) promovendo acréscimo no tamanho dos halos inibitórios em ensaios de disco difusão (ROY et al., 2010).

Alguns trabalhos mostram que a ação antimicrobiana das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> está diretamente ligada à sua capacidade fotocatalítica, onde através de um processo de Fotoexcitação com luz ultravioleta ou luz visível gera pares de elétrons em sua superfície capazes de agir sobre as membranas dos micro-organismos e causando injúria celular (BONILLA et al., 2013; FU et al., 2005; JOO et al., 2005; MOHR et al., 2017). Entretanto o uso do TiO<sub>2</sub> ativado na luz ultravioleta é limitado por estar associado a injúria a células humanas e lesão no DNA de células (ALLAHVERDIYEV et al., 2011).

#### **4.5.2 Nanopartícula de prata**

As nanopartículas de prata possuem ação bactericida já conhecida, causando alterações e até mesmo rompendo a membrana ou parede celular, aumentando o número de espécies reativas de oxigênio, promovendo danos as células. A ação antimicrobiana está diretamente associada a taxa de liberação e quantidade de prata, uma vez que ocorre ligação da prata com proteínas dos tecidos, promovendo alteração na estrutura da bactéria, impedindo replicação e promovendo a morte dos microrganismos (GERVÁSIO et al., 2005). Além disso, as nanopartículas de prata possuem potencial sobre biofilme pré-formado, demonstrado em alguns estudos, expondo uma alta toxicidade as bactérias nessa forma (KASITHEVAR et al., 2017).

### 4.5.3 Nanopartícula de óxido de zinco

Os óxidos metálicos se mostram eficientes quanto aos seus efeitos antimicrobianos devido seu tamanho e alta reatividade, sendo capazes de interagir com as membranas de bactérias (ALLAKER, 2010; GARCIA, 2011). Além disso possuem superioridade quanto a estabilidade quando comparado a antimicrobianos orgânicos, onde podemos citar o óxido de zinco (GRUMEZESCU, 2016; SONDI, SONDI, 2004), sendo além de bactericida, com potencial de controlar esporos de fungos (KARUNAKARAN et al., 2011).

A origem da ação bactericida do ZnO é provavelmente, devido a liberação de íons  $Zn^{2+}$  (LI et al., 2011) e o estrito contato do óxido metálico com a superfície bacteriana com subsequente produção de espécies reativas de oxigênio (SAWAI, YOSHIKAWA, 2004; ZHANG et al., 2007). Além disso as dimensões e forma do ZnO estão diretamente atrelados a sua capacidade de penetrar na célula e causar seus efeitos decorrente ao estresse oxidativo, sendo assim quanto maior a molécula pior será sua capacidade de interagir com a bactéria (YANG et al., 2009; ZHANG et al., 2007).

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Síntese das nanopartículas

As nanopartículas de dióxido de titânio ( $TiO_2$ ) dopadas com prata foram produzidas e caracterizadas no Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, e gentilmente cedidas para execução deste experimento. Foram sintetizadas três formulações com forma e temperatura diferentes, como mostra a tabela 1, dos quais foram acrescentados 1% de prata (Ag) em sua composição.

**Tabela 1-** Fração de tamanho e peso de anatase, fração ponderal de rutila e fração ponderal de brukita dos NC de  $TiO_2$  submetidos a recozimento térmico a  $100^\circ C / 24h$ ,  $500^\circ C / 1h$ ,  $650^\circ C / 1h$  e  $800^\circ C / 1h$ .

Temperatura	Tamanho (nm)	Anatase (%)	Rutila (%)	Brukita (%)
$500^\circ C / 1h$	8.5	91,06	8,94	0
$650^\circ C / 1h$	32	35,44	64,56	0

800°C/ 1h	44.1	0,00	84,07	15,93
-----------	------	------	-------	-------

Fonte: Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas.

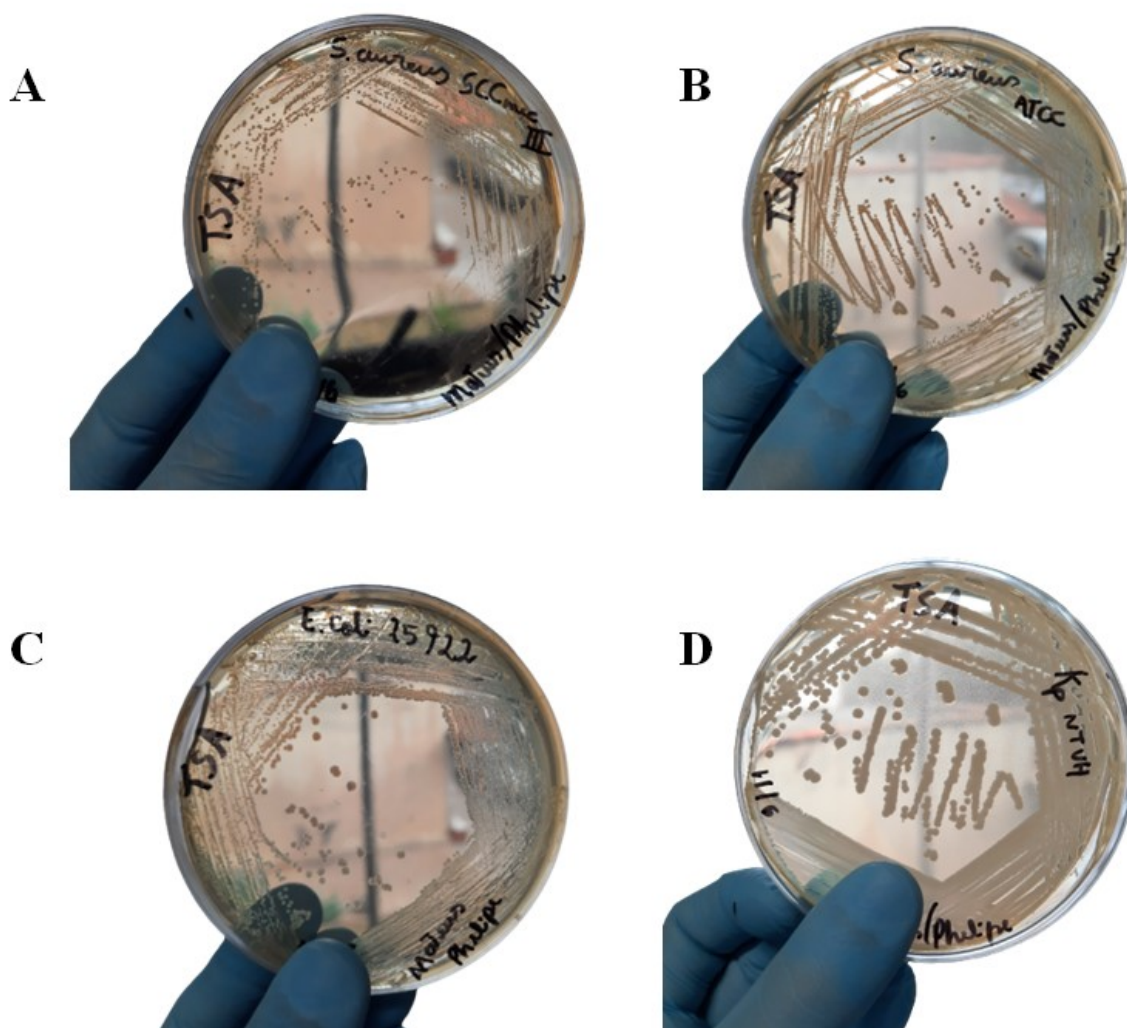
As concentrações das nanopartículas foram preparadas a 10 mg/mL com água ultrapura e solubilizadas através de ultrassonicação utilizando ultrassonicador tipo sonda, por 15 minutos, utilizando gelo para refrigeração da solução.

Da mesma forma as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) foram produzidas e caracterizadas no Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia e gentilmente cedidas para execução deste experimento. As composições de nanopartículas foram caracterizadas como ZnO puro e 75% ZnO associado a 25%TiO<sub>2</sub>. As concentrações das nanopartículas foram preparadas a 10 mg/mL com água ultrapura e solubilizadas com auxílio de um vórtex.

## 5.2 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo se deu com o descongelamento das amostras de *Staphylococcus aureus* SCC mec III, *Staphylococcus aureus* ATCC 25924, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 mantidas em meio BHI (Brain Heart Infusion) com glicerol 10% a -80°C. As cepas foram reativadas em meio rico em nutrientes TSA (Tryptic Soy Agar) por meio de técnica de esgotamento utilizando *swab* descartável, e posteriormente, incubadas por 24h a 37°C. Em seguida, as bactérias foram repicadas em meio TSA (Tryptic Soy Agar) por meio da técnica de isolamento utilizando alças descartáveis estéreis, e posteriormente incubadas por 24h a 37°C. A partir disto, foram retiradas de 3 a 5 colônias e inoculadas em 9 mL de solução salina 0.9%, até obter uma turvação de 0,5 na escala MacFarland (EUCAST, 2022) confirmada por espectrofotometria. A leitura foi realizada em absorbância de 0,3 em comprimento de onda de 600nm, correspondendo a 10<sup>8</sup>UFC/mL. A partir do inóculo padrão (MacFarland 0,5) foi realizada uma diluição de 1:10 de salina 0,9% para obtenção de uma concentração bacteriana de 10<sup>7</sup>UFC/mL, por não ser possível comparar diretamente os compostos de nanopartícula com antibióticos descritos na literatura faz-se necessário um ajuste do inóculo para avaliar a faixa de ação da substância (figura 1).





**Figura 1.** Cultura em placa meio TSA (Tryptic Soy Agar): **A-** *Staphylococcus aureus* SCC mec III, **B-** *Staphylococcus aureus* ATCC 25924, **C-** *Escherichia coli* ATCC 25922 e **D-** *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044.

### 5.3 Ensaio de potencial antimicrobiano das nanopartículas de ZnO e TiO<sub>2</sub> dopado com prata

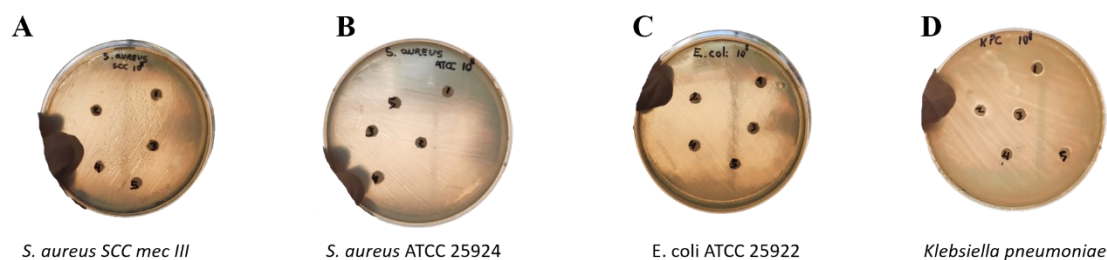
O potencial antimicrobiano das nanopartículas foi realizado pela técnica da difusão em discos. Inicialmente para análise, cada cepa foi semeada na superfície do ágar MH (Mueller Hinton), utilizando a técnica de esgotamento com *swab* estéril descartável, utilizando os inóculos previamente preparados (turvação correspondente a 0,5 na escala de MacFaland e posterior diluição 1:10), em seguida, discos de papel filtro estéreis foram preparados com a submersão em uma solução a 8000 µg/mL e 4000 µg/mL de concentração de TiO<sub>2</sub> 500°C, TiO<sub>2</sub> 650°C, TiO<sub>2</sub> 800°C, ZnO e ZnO 75%/ TiO<sub>2</sub> 25% e adicionados na superfície da placa semeada previamente com os micro-organismos. As placas foram então incubadas 37°C por 24 h,

quando então, foi realizada a medida dos halos de inibição em milímetros, representando a capacidade em inibir o crescimento das bactérias. Como controle foram utilizados discos impregnados com Ampicilina sódica (10 mg/mL).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

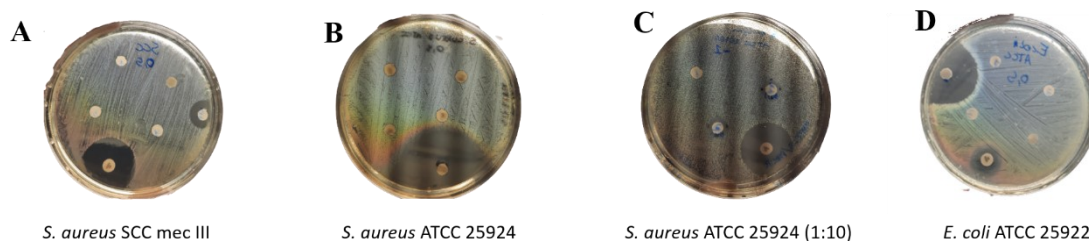
No teste de disco difusão em que foi utilizado discos impregnados com as formulações de TiO<sub>2</sub> dopado com Ag foi possível observar o crescimento das bactérias (*S. aureus* SCC *mec III*, *S. aureus* ATCC 25924, *E. coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044) na placa em sua totalidade, não apresentando nenhum halo inibitório em ambas as concentrações de nanopartículas (NPs), 8000 µg/mL e 4000 µg/mL (Fig 2).

### TiO<sub>2</sub> dopado com Ag



**Figura 2.** Teste de disco difusão. **A-** Teste com NPs de TiO<sub>2</sub> dopado com prata contra *S. aureus* SCC *mec III*. **B-** Teste com NPs de TiO<sub>2</sub> dopado com prata contra *S. aureus* ATCC 25924. **C-** Teste com NPs de TiO<sub>2</sub> dopado com prata contra *E. coli* ATCC 25922. **D-** Teste com NPs de TiO<sub>2</sub> dopado com prata contra *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044

Por sua vez nas formulações de ZnO puro e na associação de ZnO 75%/TiO<sub>2</sub> 25% foi observado halo inibitório de 8 mm para *Staphylococcus aureus* ATCC 25924 (figura 3C) na concentração de 8000 µg/mL, e na concentração de 4000 µg/mL foram obtidos halos de 6 mm também para ZnO puro e associado a TiO<sub>2</sub>. Nos demais microrganismos não foi observada a presença de halo inibitório para formulações com ZnO. O controle positivo utilizado apresentou halos de 18 mm, 35 mm (tabela 1) e 30 mm (tabela 2) para os respectivos microrganismos *Staphylococcus aureus* SCC *mec III*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25924 e *Escherichia coli* ATCC 25922 (figura 3).

**ZnO e ZnO+ TiO<sub>2</sub>**

**Figura 3.** Teste de disco difusão. **A-** Teste com NPs de ZnO e ZnO+ TiO<sub>2</sub> contra *S. aureus* SCC mec III. **B-** Teste com NPs de ZnO e ZnO+ TiO<sub>2</sub> contra *S. aureus* ATCC 25924. **C-** Teste com NPs de ZnO e ZnO+ TiO<sub>2</sub> contra *S. aureus* ATCC 25924 com inóculo na diluição 1:10. **D-** Teste com NPs de ZnO e ZnO+ TiO<sub>2</sub> contra *E. coli* ATCC 25922.

De acordo com EUCAST (2022) considera-se em *S. saprophyticus* resistente a ampicilina quando apresenta uma zona de inibição <18mm e susceptível quando a zona de inibição for >18mm. Tendo em vista *staphylococcus* coagulase-positivo, é esperado desses micro-organismos alguns mecanismos que confirmam resistência a beta-lactâmicos, sendo assim o *S. saprophyticus* mecA-negativo é susceptível a ampicilina, e o parâmetro para mensurar a resistência a essa classe de fármaco na literatura (EUCAST, 2022). Na tabela 2 estão apresentados também os diâmetros de inibição encontrados no teste de disco difusão para *S. aureus* SCC mec III e *S. aureus* ATCC 25924 quando utilizadas as NPs ZnO, ZnO + TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub> + Ag.

**Tabela 2** – Diâmetro da zona de inibição do *Staphylococcus aureus* frente as formulações de NPs na concentração de 8000 µg/mL e diâmetro da zona de inibição considerada R (resistência) e S (susceptibilidade) ao antibiótico ampicilina em *S. saprophyticus*, de acordo com EUCAST (2022).

	Inóculo	Diâmetro da zona de inibição (mm)			Ampicilina
		ZnO	ZnO + TiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub> + Ag	
<i>S. aureus</i> SCC mec III	MacFaland 0,5	0	0	0	18
	01:10	0	0	0	-

<i>S. aureus</i> ATCC <b>25924</b>	MacFaland 0,5 01:10	0 8	0 8	0 0	35 -	S	R
<i>S. saprophyticus</i> (EUCAST, 2022)	MacFaland 0,5	-	-	-	18	>18	<18

S: Susceptibilidade ao antibiótico. R: Resistência ao antibiótico

No experimento desenvolvido neste trabalho, as NPs TiO<sub>2</sub> dopadas com prata não apresentaram capacidade inibitória sobre o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* SCC mec III, *Staphylococcus aureus* ATCC 25924, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, mesmo quando testadas com uma carga bacteriana inferior a indicada no EUCAST (2022) para teste de susceptibilidade a antimicrobianos através de disco difusão, correspondente a escala 0,5 MacFaland.

Em trabalhos como o realizado por Allahverdiyev et al. (2011) ressaltam que o poder antimicrobiano das nanopartículas de dióxido de titânio está atrelado ao seu poder oxidativo proveniente da fotoexcitação com luz ultravioleta, e sua dopagem com outros íons metálicos que possibilitaria uma melhora nesse processo de ativação. A carência de um fator que forneça luz para ativar as nanopartículas pode comprometer os mecanismos que presuntivamente seriam responsáveis por causar a inibição das bactérias (MOHR et al., 2017). Como exposto nesses resultados, as nanopartículas de dióxido de titânio, que não passaram por nenhum processo de estimulação por luz, não possuíram efeito algum sobre as bactérias testadas, mesmo utilizando concentrações muito elevadas e um inóculo menos concentrado.

O microrganismo *E. coli* é considerado resistente a ampicilina quando apresenta uma zona de inibição de <14 mm e susceptível quando a zona de inibição for ≥14mm de acordo com EUCAST (2022). Na tabela 3 estão apresentados também os diâmetros de inibição encontrados no teste de disco difusão para *E. coli* ATCC 25922 quando utilizadas as NPs ZnO, ZnO + TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub> + Ag.

**Tabela 3** - Diâmetro da zona de inibição da *Escherichia coli* frente as formulações de NPs na concentração de 8000 µg/mL e diâmetro da zona de inibição considerada R (resistência) e S (susceptibilidade) ao antibiótico ampicilina em *Escherichia coli*, de acordo com EUCAST (2022).

Inóculo	Diâmetro da zona de inibição (mm)			Ampicilina
	ZnO	ZnO + TiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub> + Ag	

<i>E. coli</i> ATCC 25922	MacFaland 0,5 01:10	0 0	0 0	0 0	30 -		S	R
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (EUCAST, 2022)	MacFaland 0,5	-	-	-	14		≥14	<14

S: Susceptibilidade ao antibiótico. R: Resistência ao antibiótico

A concentração mínima inibitória (CMI) de ZnO encontrada no trabalho realizado por Emami-Karvanie Chehrazi (2011) mostra que 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  são necessários para causar inibição em *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Já em Lakshmi et al. (2012) a concentração inibitória mínima para ambos os microrganismos foi de 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . Neste experimento utilizando discos encharcados com 8000  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  e 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  observamos a ação positiva do óxido de zinco sobre a bactéria *S. aureus* ATCC 25924, entretanto não houve halo inibitório frente a *E. coli* ATCC 25922. Essa diferença de concentrações nos trabalhos pode estar correlacionada ao tamanho das nanopartículas, que está diretamente ligado ao seu efeito frente as bactérias, outro fator que pode ter influência sobre os resultados é a tendência de agregação e sedimentação da solução podendo interferir no tamanho da molécula.

Devido as diferenças da membrana plasmática entre os microrganismos gram positivos e gram negativos é esperado uma disparidade na interação das nanopartículas frente a esses dois tipos de agentes. Como mostrado por Bonilla & García (2012) a entrada das moléculas é facilitada em microrganismos gram positivos por possuírem apenas uma camada exterior, como o *S. aureus* utilizado nesse experimento, onde as NPs apresentaram maior ação inibitória, enquanto as gram negativas, como a *E. coli*, possuem duas camadas externas, e devido as características dos lipopolissacarídeos que a compõe, promovem um maior desafio para a entrada e interação com as membranas pelas nanopartículas, o que está de acordo com os resultados apresentados, onde as NPs utilizadas em *E. coli* não apresentaram zona de inibição.

## 7 CONCLUSÃO

As nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  dopadas com Ag em diferentes proporções de anatase, rutila e brookita não foram capazes de produzir efeito inibitório no crescimento *Staphylococcus aureus* SCC mec III, *Staphylococcus aureus* ATCC 25924, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. Já as formulações de ZnO puro e a associação de ZnO 75%/TiO<sub>2</sub> 25% foram capazes de produzir efeito inibitório no crescimento da *Staphylococcus aureus* ATCC 25924 na concentração de 8000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mostrando uma boa perspectiva,

após realização de mais estudos, na aplicação com ação antimicrobiana em bactérias gram positivas.

## REFERÊNCIAS

- ALLAHVERDIYEV, A.M.; ABAMOR, E.S.; BAGIROVA, M.; RAFAILOVICH, M. Antimicrobial effects of TiO<sub>2</sub> and Ag<sub>2</sub>O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. **Future Microbiology**, 6(8), pp.933–940, 2011.
- ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **Journal of Dental Research**, v. 89, n.11, p. 1175–1186, 2010.
- ALLAKER, R. P.; YUAN, Z. Nanoparticles and the control of oral biofilms. **Nanobiomaterials in Clinical Dentistry**, v. 156.2, p. 128-145, 2011.
- ANDRADE, G. R. S. **Híbridos de ZnO auto-organizado na forma de estrelas e nanopartículas metálicas (Ag, Au) : síntese controlada e avaliação fotocatalítica e antibacteriana**. 2016. 149 f. Tese (Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2016.
- BONILLA; A.M.; GARCÍA, M.F. Polymeric materials with antimicrobial activity. **Prog. Polym. Sci.**, v. 37, p. 281–339, 2012
- BRAKMANE, G.; WINSLET, M.; SEIFALIAN, A. M. Systematic review: the applications of nanotechnology in gastroenterology. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 36(3), 213-221. 2012
- CAMARGO JUNIOR, V. E.; ARIAS, M. V. B.; PERUGINI, M. R. E. Características clínicas e microbiológicas de cães em sepsis de um hospital veterinário escola do norte do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, p. 903-913, 2021.
- CAREK, P.J.; DICKERSON, L.M.; SACK, J.L. Diagnosis and management of Osteomyelitis, **American Family Physician**, 63 (12), pp. 2413-2420. 2001.
- CARREIRA, C. M.; PEREIRA, C. A., BOMBANA, A. C.; JORGE, A. O. C. Eficácia antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bactérias. *In: XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação—Universidade do Vale do Paraíba, Anais*. São José dos Campos, 2009.

CARVALHO, L. N. **Interferência das diferentes fases dos nanocristais de dióxido de titânio na migração de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano**. 2019. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

CHEN, T.; YAN, J.; LI, Y. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles: Review. **Journal of Food and Drug Analysis**. p. 95-104. 2014.

CHITOLINA, T. SCHONS, L. C. DUNKER, E. C.; SANTOS, A. A.; SERAFINI, G. M. C. Fraturas apendiculares em cães e gatos: casuística. **Ciência Animal**, v. 32, n.1, p. 45-54, jan./mar., 2022.

CLAVIJO, V. G. R.; REIS, J. M. D. S. N.; KABBACH, W., SILVA, A. L. F.; OLIVEIRA JUNIOR, O. B. D.; ANDRADE, M. F. D. Fracture strength of flared bovine roots restored with different intraradicular posts. **Journal of Applied Oral Scienci**, 2009. 17(6): p. 574-8.

DAROUICHE, R. O. Treatment of infections associated with surgical implants. **New England Journal of Medicine**, 2004; 350:1422-9.

DECAMP, C. E.; JOHNSTON, S. A.; DÉJARDIN, L. M.; SCHAEFER, S. L. Fractures: Classification, diagnosis, and treatment. **In: Brinker, Piermattei and Flo's Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair**, 24-152, 2016a.

DECAMP, C. E., JOHNSTON, S. A., DÉJARDIN, L. M., & SCHAEFER, S. L. Treatment of acute and chronic bone infections. **In: Brinker, Piermattei and Flo's Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair**, 174-179, 2016b.

DECAMP, C. E., JOHNSTON, S. A., DÉJARDIN, L. M., & SCHAEFER, S. L. Correction of adnormal boné growth and healing. **In: : Brinker, Piermattei and Flo's Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair**, 791-820, 2016c.

DENNY, H. R.; BUTEERWORTH, S. J. Cicatrização óssea. **In: Cirurgia Ortopédica de Cães e Gatos**. 4ª ed. Roca, cap. 1, p. 2-13, 2006.

DEYOUNG, D. J.; PROBST, C.W. Métodos de fixação interna de fraturas. In: **SLATTER, D. Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 1ª ed. Manole, cap. 122, p.1909-1933, 1998.



DOAK, S.H.; GRIFFITHS, S.M.; MANSHEAN, B.; SINGH, N.; WILLIAMS, P.M.; BROWN, A.P.; JENKINS, G.J.S. Review: confounding experimental considerations in Nanogenotoxicology. **Mutagenesis**, v.24, n.4, p.285–293, 2009.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases** 2001; 33:1387–92

DUARTE, C. A. **Nanocristais de TiO<sub>2</sub> na fase rutilo-brookita aumentam a migração das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo in vitro**. 2019. 82 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2019.

ELLINGTON, J.K; HARRIS, M.; HUDSON, M.C.; VISHIN, S.; WEBB, L.X. and SHERERTZ, R. (2005). Intracellular Staphylococcus aureus and antibiotic resistance: Implications for treatment of Staphylococcal Osteomyelitis. **Journal of Orthopaedic Research**, pp. 87-93.

EUCAST, T. European committee on antimicrobial susceptibility testing. Routine Extended Internal Quality Control for MIC Determination Disk Diffusion as Recommended by **EUCAST**, Version 12.0, 2022.

FERIN, J., OBERDORSTER, G.; PENNEY, D.P., Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 1992. 6(5): p. 535-42.

FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U., STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology** 2016; 14:563–75.

FU, G.; VARY, P.S.; LIN, C.T. Anatase TiO<sub>2</sub>nanocomposites for antimicrobial coatings. **The Journal of Physical Chemistry. B.**, v. 109, p. 8889-8898. 2005.

GARCIA, M. V. D. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

GERVÁSIO, A.M.C, RENNER, S.H., ALMEIDA, J.V., MONDELLI, R.F.L., VALERA, R.C. Análise crítica dos pinos intra-radulares de cerâmica, fibra de carbono e fibra de vidro. **Ibero-Am Odontol Estética Dentística**. 2005; 4: 37-46.

GOGOTSI, Y. **Nanomaterials Handbook, manuals**. CRC press 2006.

GRANT, G.R., OLDS, R.B. Tratamento das fraturas expostas. In: Slatter D. **Manual de cirurgia em pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1793-1797, 2006.

GRUMEZESCU, A. M. **Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy: Applications of Nanobiomaterials**. Cap. 2, p. 29. 2016

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Estrutura de aço leve House a construção em: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

GUIN, D.; MANORAMA, S. V.; LATHA, J. N. L.; SINGH, S. Photoreduction of Silver on Bare and Colloidal TiO<sub>2</sub> Nanoparticles/Nanotubes: Synthesis, Characterization, and Tested for Antibacterial Outcome, **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, (36), pp. 13393–13397, 2007.

GUOZHONG, C. Nanostructures and nanomaterials. **Imperial college press**, v.4, n.2, p. 36-42, 2004.

GUPTA, N.; LIMBAGO, B. M.; PAEL, J. B.; KALLEN, A. J. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and prevention. **Clinical infectious diases**, v. 53, nº1, p. 60-67, 2011.

HARARI, J. Treatments for feline long bone fracture. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Praticce**. Philadelphia, v.32, n. 4, p. 927-947, Jul. 2002.

HIGASHINO, H. R. **Análise de características clínicas e microbiológicas em coorte retrospectiva de pacientes com colonização e infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos em unidade de transplante de células tronco hematopoiéticas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2020.

JIN, M. Q.; ZHANG, D.; ZHANG, Y.; ZHOU, S. S.; LU, X. T.; ZHAO, H. T. Neurological responses of embryo-larval zebrafish to short-term sediment exposure to

decabromodiphenylethane. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, 19, 400–408, 2018.

JOHNSON, A. L.; KNELLER, S. K.; WEIGEL, R. M. Radial and tibial fracture repair with external skeletal fixation: effects of fracture type, reduction, and complications on healing. **Veterinary Surgery**, v.18, n. 1, p.367-372, 1989.

JOO, J.; KWON, S.G.; YU, T.; CHO, M.; LEE, J.; YOON, J.; HYEON, T. Large-scale synthesis of TiO<sub>2</sub>nanorods via nonhydrolytic sol-gel ester elimination reaction and their application to photocatalytic inactivation of E. coli. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 109, p. 15297-15302, 2005.

KARUNAKARAN, C.; RAJESWARI, V.; GOMATHISANKAR, P. Optical, electrical, photocatalytic, and bactericidal properties of microwave synthesized nanocrystalline AgZnO and ZnO. **Solid State Sciences**, v. 13, p. 923928, 2011.

KASITHEVAR, M., PERIAKARUPPAN, P., MUTHUPANDIAN, S. & MOHAN, M. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles against multi-drug resistant clinical isolates from post-surgical wound infections. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 327-334, 2017.

KIM, S.E.; LIM, J. H.; LEE, S. C.; NAM, S. C.; KANG, H. G.; CHOI, J. Anodically nanostructured titanium oxides for implant applications. **Electrochimica Acta**, 2008. 53(14): p. 4846-4851.

KOGA, H.; KITAOKA, T.; WARIISHI, H. In situ synthesis of silver nanoparticles on zinc oxide whiskers incorporated in a paper matrix for antibacterial applications. **Journal Of Materials Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 15, p.2089-2260, 2009.

KURIAKOSE, S.; CHOUDHARY, V.; SATPATI, B.; MOHAPATRA, S. Facile synthesis of Ag–ZnO hybrid nanospindles for highly efficient photocatalytic degradation of methyl orange. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, (33), pp. 17560–17568, 2014

LAKSHMI, J., SHARATH, R., CHANDRAPRABHA, M.N., NEELUFAR, E., HAZRA, A., PATRA, M. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles. **Journal of Biochemical Technology**.v. 3, n° 5, p. S151-S154, 2012.

LEWIS K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, 2001; 45:999– 1007

LI, M.; ZHU, L.; LIN, D. Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 5, p. 1977–1983, 2011.

LIMA, I. L. **Potencial de diferenciação óssea das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano associadas à nanopartículas de dióxido de titânio**. 2018. 44 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

LIU, X.; CHU, P.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 47, n. 3–4, p. 49–121, 2004.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The impact and evolution as a global menace. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. suppl\_1, p. S28-S36, 2017.

METSEMAKERS, W. J.; KUEHL, R.; MORIARTY, T. F.; RICHARDS, R. G.; VERHOFSTAD, M. H. J.; BORENS, O.; KATES, S.; MORGENSTERN, M. Infection after fracture fixation: Current surgical and microbiological concepts. **Injury**, v. 49, n. 3, p. 511–522, 2016.

MOELLMANN, J.; EHRLICH, S.; TONNER, R.; GRIMME, S. A DFT-D study of structural and energetic properties of TiO<sub>2</sub> modifications. **Journal of Physics Condensed Matter**, 2012. 24(42): p. 424206.

MOHR, L. C.; CAPELEZZO, A. P.; RIPPEL, T.; TERNUS, R. Z.; DALCANTON, F.; FIORI, M. A.; DE MELLO, J. M. M. Efeito antimicrobiano de nanopartículas de ZnO e TiO<sub>2</sub> frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**. Vol. 3. No. 1. 2017.

NICOLL, C., SINGH, A., WEESE, J. S. Economic impact of tibial plateau leveling osteotomy surgical site infection in dogs. **Vet Surgery** 2014;43:899–902.

NISKA, K.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; RADOMSKI, M. W.; INKIELEWICZ-STEPNIAK, I. CuO nanoparticles induce apoptosis by impairing the antioxidant defense and

detoxification systems in the mouse hippocampal HT22 cell line: protective effect of crocetin. **Toxicology in vitro**, 29 (4), 663–671, 2015.

NOSTRO, A., SUDANO ROCCARO, A., BISIGNANO, G., MARINO, A., CANNATELLI, M.A., PIZZIMENTI F.C., CIONI, P.L., PROCOPIO, F. and BLANCO, A.R. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**. 56(Pt 4):519-523. PMID:17374894.

OLIVEIRA, A. Biofilme estafilocócico: prevenção, detecção da produção e determinação do perfil de resistência a antimicrobianos. **Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) – UNESP**. São Paulo, 2014 p. 09-11

ORSINI, J. A. A Fresh Look at the Process of Arriving at a Clinical Prognosis Part 1: Laminitis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 4, p. 194–201, 2011.

O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B., KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology** 2000; 54:49–79

PENN-BARWELL, J.G., MURRAY, C.K., WENKE, J.C. Local Antibiotic Delivery by a Bioabsorbable Gel Is Superior to PMMA Bead Depot in Reducing Infection in an Open Fracture Model. **Journal of Orthopaedic Trauma**. 2014;28(6):370–5.

PERCIVAL, S.L., EMANUEL, C., CUTTING, K. F., WILLIAMS, D. W. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. **International Wound Journal** 2012b; 9:14–32

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, v. 38, p. 957-971, 2015.

POZZI, A.; LEWIS, D. D. Surgical Approaches for minimally invasive plate osteosynthesis in dogs. **Veterinary and Comparative Orthopedics And Traumatology**, Stuttgart, v.4, n. 22, p. 316-320, June 2009.

PRIMAZ, S. L.; DE ARRUDA MESTIERI, M. L.; DA SILVA, M. P.; COSTA, M. E. R.; DE MOURA JACQUES, A.; BECKMANN, D. V. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CÃES COM OSTEOMIELITE CRÔNICA. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 13, n. 3, 16 nov. 2021.

RASMUSSEN, J. W.; MARTINEZ, E.; LOUKA, P.; WINGETT, D. G. Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.7, n.9, p. 1063–1077, 2010.

REDFERN, D. J.; SYED, S.U.; DAVIES, S. J. M. Fractures of the distal tibia: minimally invasive plate osteosynthesis. **Injury**, v.35, n. 1, p.615-620, 2004.

REN, C.; YANG, B.; WU, M.; XU, J.; FU, Z.; IV, Y.; GUO, T.; ZHAO, Y.; ZHU, C. Synthesis of Ag/ZnO nanorods array with enhanced photocatalytic performance, **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, (1–3), pp. 123–129, 2010.

RENGANATHAN, G.; TANNERU, N.; MADURAL, S. L. Orthopedical and biomedical applications of titanium and zirconium metals. *Fundamental Biomaterials: Metals*, p. 211–241, 2018.

RODRIGUES, L. B. Aplicações de biomateriais em ortopedia. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 2, p. 63-76, 2013

ROSANOWSKI, S. M.; CHANG, Y. M.; STIRK, A. J.; VERHEYEN, K. L. P. Epidemiology of race-day distal limb fracture in flat racing Thoroughbreds in Great Britain (2000-2013). **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 1, p. 83– 89, 2019.

ROUSH, J. K. Management of fractures in small animals. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.35,n. 1, p.1137-1154, 2005.

ROY, A. S.; PARVEEN, A.; KOPPALKAR, A. R.; PRASAD, M. A. Effect of nano-titanium dioxide with different antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 1, n. 1, p. 37, 2010.

SAWAI, J.; YOSHIKAWA, T. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. **Journal Applied Microbiology**, v. 96, n.4, p. 803-809, 2004.

SANITÁRIA (BRASIL) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA. **Boletim de segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde nº14: Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à Saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2015**. 2016.

SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A.; DE FIGUEIREDO, M. L.; KEMPER, B.; SALVADOR, R. D. C. L.; LIMA, D. R. Estabilização de fraturas femorais e umerais de cães e gatos mediante pino intramedular e fixação paracortical com pinos e polimetilmetacrilato. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 546–553, 2010.

SCHLEGEL, U, PERREN, S. M. Surgical aspects of infection involving osteosynthesis implants: implant design and resistance to local infection. **Injury** 2006; 37 Suppl 2: S67- 73

SONDI, I., SONDI, S. B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n.1, p. 177-182, 2004.

STIFFLER, K. Internal fracture fixation. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.19, n. 1, p.105-113, 2004.

SYAMA, S.; SREEKANTH, P. J.; VARMA, H. K.; MOHANAN, P. V. Zinc oxide nanoparticles induced oxidative stress in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 24, n. 9, p.644-653, 3 set. 2014.

TAN, Z.; SATO, K.; OHARA, S. Synthesis of layered nanostructured TiO<sub>2</sub> by hydrothermal method. **Advanced Powder Technology**, v. 26, n. 1, p. 296-302, 2015.

TURK, R., SINGH, A., WEESE, J. S. Prospective surgical site infection surveillance in dogs. **Vet Surgery** 2015; 44:2–8.

TUDURY, E. A.; POTIER, G. M. A. **Tratado de Técnica Cirúrgica Veterinária**. Ed MedVet, p.377 - 408, 2009.

TURRER, C.; FERREIRA, F. Biomaterials in Craniomaxilofacial Surgery: basic principals and applications-literature revision. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 23, n. 3, p. 234-239, 2001.

VIDANE, A. S.; ELIAS, M. Z. J.; CARDOSO, J. M. M.; COME, J. A. S. S.; HARUN, M.; AMBRÓSIO, C. E. Incidência de fraturas em cães e gatos da cidade de Maputo (Moçambique) no período de 1998-2008. **Ciência Animal Brasileira**, 15(4), 490-494. 2014.

WOLSKA, K.I.; GRUDNIAK, A.M.; RUDNICKA, Z.; MARKOWSKA, K. Genetic control of bacterial biofilms. **Journal of applied genetics** 2016; 57:225–38.

YANG, H.; LIU, C.; YANG, D.; ZHANG, H.; XI, Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. **Journal Applied Toxicology**, v. 29, n.1, p.69-78, 2009.

YANO, M. H.; KLAUTAU, G. B.; DA SILVA, C. B.; NIGRO, S.; AVANZI, O.; MERCADANTE, M. T.; SALLES, M. J. C. Improved diagnosis of infection associated with osteosynthesis by use of sonication of fracture fixation implants. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4176-4182, 2014.

ZHANG, L.; JIANG, Y.; DING, Y.; POVEY, M.; YORK, D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 9, n. 3, p. 479-489, 2007.

ZHAO, J.; WANG, Z.; DAI, Y.; XING, B. Mitigation of CuO nanoparticle-induced bacterial membrane damage by dissolved organic matter. **Water research**, 47 (12), 4169–4178, 2013.

ZIMMERLI, W.; SENDI, P. Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. **Seminars in immunopathology**, v. 33, n. 3, p. 295–306, 2011.