

UTILIZAÇÃO DE BIOMATERIAL NA TENTATIVA DE CONTROLAR CRESCIMENTO BACTERIANO

Use of Biomaterial in Controlling Bacterial Growth

Nayara Coury de Rezende ¹, Letícia Ferreira Lamha², Tatiana Alves Toledo³, Alessandro Del'Duca⁴

Resumo: A Hidroxiapatita (HAP) é um biomaterial indissociável no processo da manutenção da resistência óssea. Nanopartículas são substâncias iônicas que, em contato com a HAP, ensejam o aparecimento de propriedades físico-químicas e características biológicas específicas nesse biomaterial, que variam em função dos efeitos biológicos dos íons. O estudo de íons que em contato com a HAP resultam numa atividade antimicrobiana devem ser verificados. Nesse sentido, o foco do trabalho em questão foi verificar a eficiência antimicrobiana dos dopantes Cloreto de Cobre (CuCl), Sulfato de Cobre (CuSO₄), Sulfato de Prata (AgSO₃) e Nitrato de Zinco (ZnNO₃), os quais são frequentemente utilizados na síntese de HAP, bem como o efeito antimicrobiano de HAP dopada com Magnésio, Titânio, Ferro e Prata. Os testes de atividade antibacteriana foram realizados para bactérias potencialmente patogênicas em humanos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp.). A HAP dopada não apresentou eficiência para controle de nenhum dos patógenos. No entanto, os dopantes quando testados de forma pura apresentaram eficiência no controle do crescimento de todos os patógenos testados.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, Efeito bactericida, Biomaterial dopado.

Abstract: *Hydroxyapatite (HAP) is an indispensable biomaterial in maintaining bone resistance. Nano-particles are ionic substances which, on contact with HAP, enable its physical-chemical properties and specific biological characteristics, which vary depending on the biological effects of the ions. The ions which, on contact with HAP, result in antimicrobial activity, should be verified. Thus, the focus of this study was to determine the antimicrobial efficiency of the dopants Copper Chloride (CuCl), Copper Sulphate (CuSO₄), Silver Nitrate (AgSO₃), and Zinc Nitrate (ZnNO₃), which are often used in synthesizing HAP, as well as the*

¹Bolsista CNPq/IFSUDESTEMG, Curso Técnico em Edificações, nayara.coury@hotmail.com

²Bolsista FAPEMIG/IFSUDESTEMG, Curso Técnico em Edificações, leticialamha@live.com

³Laboratório de Técnicas em Biologia, Departamento de Educação e Ciências, tatiana.alves@ifsudestemg.edu.br

⁴Laboratório de Técnicas em Biologia, Departamento de Educação e Ciências, alessandro.delduca@ifsudestemg.edu.br

antimicrobial effect of HAP doped with Magnesium, Titanium, Iron and Silver. Antibacterial activity tests were performed with bacteria that are potentially pathogenic in humans (Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Salmonella sp.). The doped HAP was not shown to be efficient in controlling any of the pathogens. However, when tested in pure form, the dopants showed effectiveness in controlling the growth of all tested pathogens.

Key- Words: *Hydroxyapatite, Antimicrobial effect, Biomaterial*

INTRODUÇÃO

A Hidroxiapatita (HAP) é um biomaterial⁵ constantemente aplicado como biocerâmica densa, porosa ou de revestimento nos campos médico e odontológico (VALENTE, 1999). Devido à sua biocompatibilidade e composição química similar à do osso – a HAP é um dos constituintes básicos naturais da fibra óssea, representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes – é capaz de formar ligações químicas fortes com o tecido ósseo e a sua associação com as fibras colágenas (parte orgânica dos ossos) é decisiva para a manutenção da resistência óssea (FONSECA, 2007).

A hidroxiapatita possui ainda a propriedade de osteocondução, que é a capacidade de fazer ligações na interface osso/implante, o que a torna uma possível substituta do osso humano em implantes e próteses e a transforma em uma substância de grande interesse no âmbito científico/médico (HENCH, 1998; TIRRELL et al., 2002).

Sua alta capacidade de adsorver e de absorver moléculas faz da HAP um excelente suporte para a ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos e propicia a adsorção e replicação de bactérias, estabelecendo outro campo de aplicação desse biomaterial (ANDRADE, 2013). Ademais, possui eficiência no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (SOUZA et al., 2010).

Implantes com biomateriais são dependentes da osteogênese, que é o processo de formação óssea, e sua sobrevivência está relacionada à prevenção e combate de futuras infecções bacterianas no pós-operatório. A fim de que a adesão bacteriana não compita com a integração do tecido celular na superfície externa dos materiais implantados, faz-se necessária a utilização de agentes antimicrobianos. Materiais nanoestruturados tais como o óxido de titânio, a prata e o óxido de zinco têm manifestado um grande potencial antibacteriano: a prata como agente bactericida, o óxido de zinco como agente fungicida e bactericida e o dióxido de

⁵Biomaterial é definido como “qualquer substância ou combinação de substâncias que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte ou como todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo” (WILLIAMS, 1987).

titânio como agente bactericida a partir de propriedades fotocatalíticas (DASTJERDI e MONTAZER, 2010; SCHEIDT, 2013).

Muitas pesquisas são desenvolvidas com o intuito de atribuir propriedades antimicrobianas aos biomateriais a partir de seu tratamento com íons metálicos de natureza biocida, como os cátions de prata, cobre e zinco (BEILER, 2012). A Environmental Agency Protection (EPA) comprovou que o cobre é um metal antimicrobiano, pois em seus estudos, o uso do metal capaz de dissipar aproximadamente 99,9% das bactérias de uma superfície contaminada em apenas duas horas de exposição e reduzir em até 58% as infecções hospitalares em UTI's.

A utilização da prata como agente bactericida já é conhecida como uma alternativa viável aos antibióticos comuns, tendo uma ampla gama de atuação em diversas bactérias (ZHANG et al., 2010). O uso deste material proporciona relevante atividade bacteriana, acelerando a eficácia e eficiência do tratamento. As nanopartículas de prata atuam no mercado de agentes bactericidas graças as suas inúmeras vantagens sobre os desinfetantes tradicionais, no que diz respeito à estabilidade química, a segurança, a longa duração e a eficiência bactericida (XU et al., 2011). Nesse sentido, diversas propostas de incorporação de prata à biomateriais vêm sendo descritas na literatura (DIAMOND-STANIC et al., 2011; ZHANG et al., 2010).

Alternando o uso da prata, visto a toxicidade da mesma, que é prejudicial em alguns casos, muito se tem utilizado o zinco, já que este apresenta características favoráveis. Tais como, exercer atividade antimicrobiana, apresentar pouca toxicidade quando empregada em baixas concentrações, além de ser elemento de imensa importância no metabolismo humano (BEILER, 2012).

O aumento da resistência de bactérias patogênicas as drogas antimicrobianas (SANTOS, 2004) representa hoje o grande desafio dos estudos em Microbiologia, principalmente devido ao grande impacto que se pode gerar para a saúde pública. Compostos com os íons prata e zinco, em especial, apresentam-se como uma alternativa aos antibióticos que já não possuem efeito em determinadas bactérias, uma vez que esses metais apresentam ampla atividade e baixa incidência de resistência, incluindo as bactérias envolvidas nas infecções ocasionadas por implantes biomédicos (ZHANG et al., 2007).

Apesar das diversas aplicações biológicas promissoras, o uso da HAP é limitado em função de sua lenta taxa de degradação. Geralmente, a degradação dos compostos de fosfato

de cálcio depende da razão molar entre os íons cálcio e fósforo. A incorporação de íons metálicos a sua estrutura tem sido utilizada como alternativa para aumentar a sua solubilização em processos biológicos (BOANINI et al., 2010). Estas substâncias iônicas possibilitam que a HAP tenha propriedades físico-químicas e características biológicas específicas, que variam em função dos efeitos biológicos dos íons.

Em meio a este contexto, este trabalho buscou verificar a eficiência bactericida de alguns dopantes utilizados para a síntese da Hidroxiapatita: Sulfato de Cobre (CuSO_4) e Nitrato de Prata (AgNO_3), além de verificar a atividade antimicrobiana na HAP dopada com íons de Cobre e Prata.

MATERIAIS E MÉTODOS

Devido a pouca solubilidade da HAP, fez-se necessária a utilização de métodos microbiológicos distintos para a obtenção de resultados mais confiáveis. Em todos os testes *in vitro*, as bactérias potencialmente patogênicas para humanos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp., foram cultivadas previamente e diluídas em salina 0,9 %, padronizadas na escala de Mac Farland 1,0 ($T = 63\% \pm 1$).

1. TESTE DOS DOPANTES

Para o teste com os dopantes pesou-se 0,1g dos pós de Nitrato de Prata (AgNO_3) e Sulfato de Cobre (CuSO_4) separadamente. Cada dopante foi diluído em 1 mL de água destilada e acondicionado em tubo de ensaio contendo aproximadamente 20 mL de ágar soja triptona (TSA) e esterilizado em autoclave por 15 minutos. O meio de cultura foi plaqueado e após o resfriamento e solidificação, uma alíquota de 10 μL de suspensão de bactérias potencialmente patogênicas foi semeada por espalhamento, para então serem incubadas em estufa bacteriológica a $\pm 36,5$ °C por 24 horas. Findado o tempo de incubação, as placas foram analisadas quanto ao crescimento ou inibição das bactérias.

2. TESTE DAS HIDROXIAPATITAS DOPADAS

O teste foi dividido em dois métodos distintos. O primeiro método, realizado em triplicata, consistiu em adicionar 100 μL da suspensão bacteriana (escala 1,0 Mac Farland) em 10 mL de caldo Todd Hewitt. Posteriormente, adicionaram-se porções de 0,1 g de HAP pura e suas variedades dopadas. O controle positivo foi uma suspensão bacteriana em caldo sem

adição de HAP. Após 24 horas em estufa bacteriológica a $\pm 36,5$ °C, uma alíquota de 200 μ L das suspensões foi semeada em TSA para observação do crescimento ou inibição das bactérias.

O segundo método caracterizou-se pelo espalhamento de 200 μ L de cada suspensão das bactérias (escala 1,0 Mac Farland) em placas com TSA. As amostras, em pó, foram adicionadas individualmente após a perfuração de poços no meio de cultura, a fim de verificar o surgimento de halos de inibição. As amostras foram encubadas em estufa bacteriológica $\pm 36,5$ °C por 24 horas.

3. TESTE DA HAP DOPADA COM PRATA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Em tubos distintos contendo 1 mL de salina 0,9 %, foram adicionados 0,02g de HAP pura e 0,1, 0,07 e 0,02 g de HAP-Ag. Foram retirados 300 μ L dessas suspensões e adicionados em outros tubos, devidamente identificados. Em seguida, foram acrescidos 300 μ L das suspensões bacterianas. Dessa nova suspensão, 50 μ L foram semeados em meio de cultivo TSA e incubados em estufa bacteriológica $\pm 36,5$ °C por 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. DOPANTES

As amostras contendo meio de cultivo TSA e os dopantes AgNO_3 e CuSO_4 não apresentaram crescimento das espécies patogênicas testadas, demonstrando que todos os dopantes propostos possuem efeito significativo no controle de crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp. (figura 1).



Fig. 1. Teste *in vitro* dos dopantes AgNO_3 e CuSO_4 , respectivamente, com as espécies *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*.

2. HAPs DOPADAS

Após o período de incubação, verificou-se que a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das amostras do primeiro procedimento apresentou mais de 300 UFC, caracterizando como número incontável de colônias.

As amostras do segundo procedimento também demonstraram um crescimento acima de 300 UFC, demonstrando que os diferentes tipos de Hidroxiapatita (pura e dopada) não fizeram surgir os halos de inibição, ou seja, o biomaterial dopado não foi eficaz no controle de crescimento de nenhuma das espécies bacterianas selecionadas.

A eficácia de nanopartículas de cobre e de prata na atividade antibacteriana em relação à *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus* já foi descrita anteriormente (ARAKAWA et al., 2015). Contudo, nossos experimentos não obtiveram este mesmo efeito. Essa diferença dos resultados pode ser devido ao método de obtenção das nanopartículas apresentado por Arakawa e colaboradores (2015), os quais utilizam a metodologia de impregnação a vácuo, diferentemente da nossa síntese, que utiliza a precipitação por via úmida.

A forma de ação da prata, no que diz respeito a seu efeito bactericida, é muito discutida. Sabe-se que sua manifestação depende da maneira na qual ela se encontra (bulk, nano, íons), envolvendo também a sua oxidação a íons de prata (XIU et al., 2012). Em relação às nanopartículas, a ação se relaciona especialmente ao seu tamanho, sendo que as menores – de 5 a 10 nm – apresentam maior reatividade, e os clusters atômicos de 0,4 a 2 nm, apresentam ainda maior atividade bactericida (MORONES et al., 2005).

Segundo VIEIRA (2013), outro fator preponderante para o efeito bacteriano é o aumento do contato superficial da Ag. Dessa forma, quanto melhor estiverem distribuídos os íons na superfície do material, maior será o efeito bacteriano.

O Ministério da Agricultura afirma que compostos cúpricos como o Sulfato de Cobre, Hidróxido de Cobre e Oxicloreto de Cobre podem ser utilizados como agroquímicos no combate a bactérias e fungos na agricultura. Tal utilização se deve ao fato do cobre, segundo LEITE JÚNIOR (2000), atuar na proteção do tecido vegetal contra infecção por bactérias e na redução da população bacteriana na superfície foliar.

MENEGUIM e colaboradores (2007) testaram a sensibilidade ao cobre de 122 isolados bacterianos utilizando diferentes concentrações de CuSO_4 e perceberam que a maior concentração em que foram encontradas células bacterianas foi de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, os isolados apresentaram variações na sensibilidade ao cobre para as diferentes concentrações testadas.

3. HAP COM PRATA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Ao utilizarmos diferentes concentrações de HAP dopada com Ag, não se encontrou um resultado satisfatório no controle das patógenas *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* sp., visto que todas as amostras, incluindo a HAP pura, apresentaram crescimento.

DIAMOND-STANIC et al. (2011) avaliaram a atividade bactericida da HAP dopada com íons Ag em diferentes concentrações. Neste caso, utilizou-se o teste de halo de inibição para a avaliação do material obtido frente aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus* em amostras com o Ag⁺ (0,1 % em peso). Os resultados apresentaram uma resposta bactericida satisfatória e relevante, em detrimento das amostras que tinham concentrações de 0,01 % em peso deste íon. Além disso, a cultura de bactérias que continha *S. aureus* apresentou-se mais resistente quando comparada aculturas de *E. coli*.

TRUJILLO (2010), estudando a HAP contendo Ag em concentrações de 0,5 e 1,5 % em peso, observou que, em geral, as amostras que apresentaram maior quantidade de bactérias mortas – *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* – continham maior teor de Ag em sua estrutura. Da mesma forma, RAMESHBABU et al (2005) concluiu que as amostras de HAP sintetizadas com teores de Ag entre 0,5 e 1,5 % apresentaram eficácia como agente bactericida para *E. coli* e *S. aureus*, sem comprometer a bioatividade e osteointegração.

Conforme os dados apresentados, observamos que o teor dos íons prata incorporados ao nosso biomaterial estavam aquém do teor mínimo necessário para um resultado significativo em relação à inibição de crescimento de bactérias patogênicas. O teor mínimo dos íons com resultados relevantes foram 0,1 % em peso, e, em nossa síntese, o valor utilizado foi 0,01 % em peso, sem contabilizar o rendimento.

CONCLUSÕES

A partir dos experimentos realizados, verificou-se que apenas os dopantes, Sulfato de Cobre e Nitrato de Prata, foram capazes de controlar de forma efetiva as três patógenas inicialmente escolhidas. Em detrimento dos experimentos com a Hidroxiapatita em sua forma pura e dopada com Prata, em diferentes concentrações, e Cobre, as quais não apresentaram resultado bactericida. Contudo, devido ao grande potencial desses dopantes, são necessários novos testes com teores mais elevados dos íons a serem dopados para verificar a eficácia desse biomaterial.

Agradecimentos

Agradecemos ao IF Sudeste MG – *Campus* Juiz de Fora pelo apoio financeiro no desenvolvimento dos experimentos. À professora Denise Barros de Almeida Barbosa e aos bolsistas Felipe Abrahão Cury Dias e Jéssica da Conceição Nascimento, do Laboratório de Pesquisa e Experimento em Nanociências, pelo auxílio na síntese do HAP. As bolsas de Iniciação Científica foram financiadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

BIBLIOGRAFIA

ANDRADE, F. **Desenvolvimento de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata com propriedades antibacterianas**. 2013. 119 p. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo. São Carlos, 2013.

ARAKAWA, F.; SHIMABUKU, Q.; SILVEIRA, C.; BAZANA, S.; BUENO, M.; MORETI, L.; CAMACHO, F.; HEIDEMANN, G; BERGAMASCO, R. Síntese de nanopartículas metálicas e óxidos metálicos suportadas em carvão ativado para remoção de *Escherichia coli* da água. **e-Xacta**, Belo Horizonte, v.8, n.1, p. 87-98, 2015.

BEILER, R. **Estudo Da Cinética De Incorporação De Zinco Em Bentonita: Desenvolvimento De Material Antimicrobiano**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

BOANINI, E; GAZZANO, M; BIGI, A., Ionic substitutions on calcium phosphates synthesized at low temperature, **Acta Biomaterialia**. v.6, p. 1882-1894, 2010.

DASTJERDI, Roya e MONTAZER, Majid. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 79, p. 5–18, 2010.

DIAMOND-STANIC, M.; MARCHIONNE, E.; TEACHEY, M.; DURAZO, D.; KIM, J.; HENRIKSEN, E. Critical role of transient p38 MAPK activation in skeletal muscle insulinresistance caused by low-level *in vitro* oxidant stress. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 45, p. 439-444, 2011.

FONSECA, F. **Biocerâmicas porosas bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzidas por gelcasting**. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Materiais). Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2007.

HENCH, L. Bioceramics. **Journal of the American Ceramic Society**, v.81, n.7, p.1705-1728, 1998.

HERNÁNDEZ-SIERRA, J.; RUIZ, F.; PENA, D.; MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, F.; MARTÍNEZ, A.; GUILLEN, A.; TAPIA-PÉREZ, H.; CASTAÑÓN, G. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. **Nanomedicine**, v. 4, p. 237-240, 2008.

LEITE JÚNIOR, R. Surviving with Citrus Canker in Brazil. **Proceedings, 9th Congress of the International Society for Citriculture**. Orlando FL. p. 890-896, 2000.

LOPES, C. **Efeito dos sulfatos de cobre e zinco no controle da população de fungos e bactérias do solo que causam intemperismo em arenitos de prédios históricos na Lapa (PR)**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

MARCO, G.M.; STALL, R.E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. **Plant Disease**, v. 67, p. 779-781, 1983.

MENEGUIM, L., RINALDI, D.A.M.F., SANTOS, A.C.A., RODRIGUES, L.S., SILVA, M.R.L., CANTERI, M.G., LEITE JÚNIOR, R.P. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ao cobre e mancozeb. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 247-252, 2007.

MORONES, J.; ELECHIGUERRA, J.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.; RAMÍREZ, J.; YACAMAN, M. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Journal of Nanotechnology**, v.16, p.2346 – 2353, 2005.

PANIZZUTTI, E. **Análise do perfil de resistência a antimicrobianos e a metais pesados em isolados oriundos do processo de compostagem**. Universidade Federal do Rio Grande

do Sul. Instituto de Biociências. RS, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/109932>>.

RAMESHBABU, N; PRASAD RAO, K; KUMAR, T. Accelerated microwave processing of nanocrystalline hydroxyapatite. **J Mater Sci.**, v. 40, p. 6319–6323, 2005.

RAMESHBABU, N; SAMPATH KUMAR, T.; PRABHAKAR, T.; SASTRY, V.; MURTY, K.; PRASAD RAO, K. Antimicrobial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 80, p. 581-591, 2007.

SAHA, N; KESKINBORA, K; SUVACI, E; BASU, B., Sintering, microstructure, mechanical, and antimicrobial properties of Hap-Zn Obiocomposites, **Journal of Biomedical Materials Research**. v.95, p. 430-440, 2010.

SANTOS, N. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto contexto – enfermagem**, Florianópolis, v.13, p. 64-70, 2004.

SANTOS, P. **Ciência e Tecnologia de Argilas**. 2ª ed. Editora Edgard Blücher Ltda. São Paulo, 1989.

SCHEIDT, G. **Filmes finos de cobre/óxido de cobre como agentes inibidores da adesão de biofilmes bacterianos**. 2013. 47 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) - Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa. 2013.

SOUZA, S.; SOUSA, E.; ARAÚJO, T. Effect of Zn²⁺, Fe²⁺ and Cr³⁺ addition to hydroxyapatite for its application as an active constituent of sunscreens. **J of Physics: Conference Series**. v. 249, n.3, p. 1-7, 2010.

TIRRELL, M.; KOKKOLI, E.; BIESALSKI, M. The role of surface science in bioengineered materials. **Surface Science**, v. 500, n. 1-3, p. 61-83, 2002.

TRUJILLO, N., **Antibacterial Effects of Sputter Deposited Silver-Doped Hydroxyapatite Thin Films**. M.Sc. Dissertation, University State Colorado, Colorado, USA, 2010.

VALENTE, M. **Síntese de Hidroxiapatita e sua aplicação como biomaterial**. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e nucleares – Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo. 1999. 129 p.

VIEIRA, J. **Recobrimento biomimétrico de HA dopada com Ag sobre superfície de Ticps**, Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, 2013.

WILLIAMS, D.; **Definitions in Biomaterials**, Elsevier: Amsterdam, 1987.

XIU, Z-m.; ZHANG, Q-b.; PUPPALA, H.; COLVIN, V.; ALVAREZ, P. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano Letters**, v.12, p.4271-4275, 2012.

XU G.; QIAO X.; QIU X.; CHEN J. Preparation and Characterization of Nano-silver Loaded Montmorillonite with Strong Antibacterial Activity and Slow Release Property. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 27, p. 685-690, 2011.

ZHANG, S.; S.; ZHANG, X.; ZHAO, C.; LI, J.; SONG, Y.; XIE, C.; TAO, H.; ZHANG, Y.; HE, Y.; JIANG, Y.; BIAN, Y. Research on an Mg-Zn alloy as a degradable biomaterial, **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 626-640, 2010.

ZHANG, W.; QIAO, X.; CHEN, J. Synthesis of nanosilver colloidal particles in water/oil microemulsion. **Colloids and Surface A: physicalchemistry andengineering aspects**, v. 299, p. 22-28, 2007.