



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Camila Cristina De Foggi

Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de óxidos bimetálicos e de revestimentos depositados à plasma sobre resina acrílica

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Camila Cristina De Foggi

Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de óxidos bimetálicos e de revestimentos depositados à plasma sobre resina acrílica

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, na Área de Prótese

Orientador: Ana Lucia Machado

Araraquara

2017

Foggi, Camila Cristina de

Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de óxidos bimetálicos e de revestimentos depositados a plasma sobre resina acrílica / Camila Cristina de Foggi. -- Araraquara: [s.n.], 2017

189 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Reabilitação oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lucia Machado

1. Antibacterianos 2. Candida albicans 3. Escherichia coli
4. Staphylococcus aureus resistente à meticilina 5. Polimetil metacrilato 6. Prótese parcial removível. I. Título

Camila Cristina De Foggi

Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de óxidos bimetálicos e de revestimentos depositados à plasma sobre resina acrílica

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de doutor em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Profa. Dra. Ana Lucia Machado

2º Examinador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

3º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

4º Examinador: Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban

5º Examinador: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

Araraquara, 10 de março de 2017.

DADOS CURRICULARES

Camila Cristina de Foggi

NASCIMENTO: 31/10/1989

FILIAÇÃO: Susi Elaine Cristina Fioraneli e José Augusto De Foggi

2008 - 2012- Graduação em Odontologia - Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

07/2013 - 12/2013- Estágio de Docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível I - UNESP

03/2014 - 12/2014- Estágio de Docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível II - UNESP

03/2015 – 12/2015 - Estágio de Docência na Disciplina de Prótese Total II - UNESP

2013 - 2017- Doutorado em Reabilitação Oral - Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedico este trabalho à minha mãe Susi, por seu amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos Especiais

À minha mãe, **Susi Fioraneli**

À você, que é o maior exemplo de amor e dedicação da minha vida e dos meus irmãos. Uma mãe maravilhosa, sempre presente, que muitas vezes renunciou à própria felicidade pela nossa. Obrigada por ter me ensinado tudo o que sei, por ser meu espelho e meu maior exemplo.

Aos meus irmãos **Augusto e Sophia**

Augusto, que sempre me acompanhou em tudo, desde minhas primeiras recordações. Obrigada por ser meu mais velho companheiro, por torcer por meu sucesso e sofrer junto comigo as minhas ansiedades. Obrigada por ser esse irmão maravilhoso que és para a Sophia e para mim. Tenho muito orgulho de você.

Sophia, minha (nossa) companheira mais nova! Você veio para alegrar e iluminar ainda mais as nossas vidas. A pessoa mais linda, mais doce e mais humana que eu conheço. Tenho muito orgulho de você.

Agradeço à **Deus** pela oportunidade de ter pessoas tão maravilhosas quanto vocês. Vocês são os meus maiores tesouros. Amo vocês.

Ao meu namorado **Luís Carlos**

Um dos maiores presentes que a Pós-Graduação me deu, já que nos conhecemos em um Congresso Científico! Obrigada por dividir comigo todos os momentos dessa caminhada, desde os muito bons até os piores. Obrigada pela paciência e companheirismo diário. Amo você.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. **Ana Lucia Machado**:

Obrigada pela convivência, e por toda influência que a senhora teve em meu desenvolvimento profissional. Obrigada por sempre estar presente, mesmo que as

circunstâncias não fossem favoráveis. Obrigada por todos os ensinamentos que me proporcionou, desde o início da minha vida acadêmica (na Iniciação Científica) até agora, ao final do Doutorado. Sempre muito paciente e muito doce; guardarei toda a nossa trajetória no coração.

Ao prof. Dr. **Carlos Vergani**

Obrigada por acompanhar de perto durante todo o meu Doutorado, por todo o apoio e dedicação aos nossos trabalhos. Agradeço pela oportunidade de trabalharmos juntos, e pelos conhecimentos que pude absorver nesses anos. Obrigada pelas oportunidades concedidas, e por todo o tempo que se dedicou sobre meu projeto de pesquisa, artigos, e em me ensinar não apenas metodologias. Sua energia é inspiradora a todos que o rodeiam.

Ao prof. Dr. **Elson Longo**

Agradeço por ter me dado a oportunidade de trabalharmos juntos, e por toda a paciência com que sempre me recebe. Obrigada por todo o tempo despendido com explicações químicas complexas para um grupo de dentistas! Pela ética e competência que conduz seu grupo de pesquisa, e pela imensa capacidade de motivar dezenas de pesquisadores excepcionais que trabalham juntos com o senhor, te admiro muito. Obrigada por fazer a diferença na vida de muitas pessoas, incentivando os alunos a serem não só alunos, mas grandes pesquisadores e empreendedores.

Agradeço à vocês por tudo, mas, principalmente, por terem acreditado e sempre confiarem em meu trabalho.

“Há escolas que são gaiolas e há escolas que são asas.

Escolas que são gaiolas existem para que os pássaros desaprendam a arte do vôo. Pássaros engaiolados são pássaros sob controle. Engaiolados, o seu dono pode levá-los para onde quiser. Pássaros engaiolados sempre têm um dono. Deixaram de ser pássaros. Porque a essência dos pássaros é o vôo.

Escolas que são asas não amam pássaros engaiolados. O que elas amam são pássaros em vôo. Existem para dar aos pássaros coragem para voar. Ensinar o vôo, isso elas não podem

fazer, porque o vôo já nasce dentro dos pássaros. O vôo não pode ser ensinado. Só pode ser encorajado.”

Rubem Alves

Obrigada aos professores Ana, Carlos e Elson, por terem sido meus encorajadores.

Aos professores Dr^a **Elidiane Rangel**, Dr. **Nilson Cruz** e Dr. **Mario Bica**

Agradeço pela parceria nas pesquisas, e por terem aberto as portas dos laboratórios de maneira acolhedora. Obrigada por terem me ensinado tão pacientemente o manejo dos equipamentos e a interpretação dos dados, e por terem se dedicado à minha pesquisa da maneira como o fizeram. O aprendizado vindo de vocês fizeram cada minuto valer a pena.

À **Camila Zamperini**, por ter estado presente nos meus primeiros passos, por ter orientado a mim e ao **Darcy Fernandes** na Iniciação Científica, nos acompanhando ao laboratório em várias madrugadas, por ter nos ensinado e incentivado a seguir nesse caminho. Vocês fazem parte dessa história, e sempre me recordarei com carinho dos nossos momentos juntos.

À minha amiga **Jéssica Bernegossi**, pela companhia diária, pelas madrugadas no laboratório trabalhando juntas, pelas risadas, mas, principalmente, pela amizade.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela bolsa de Doutorado concedida (FAPESP 2015/03654-7).

À Capes, pela bolsa de Doutorado concedida na primeira etapa do curso.

Ao Programa de Pós Graduação em Reabilitação Oral, pela oportunidade concedida.

Aos alunos de Iniciação Científica Maíra, Marina e Guilherme pelos trabalhos que desenvolvemos juntos.

À Profa. Dra. Marlise Klein, pelos ensinamentos e ajuda com os experimentos realizados em seu laboratório.

À Bruna, Lucas e Natali, por todas as horas de laboratório, alegrias e ansiedades compartilhadas durante o desenvolvimento dos nossos trabalhos.

À Érica Dorigatti, pela ética e seriedade, e principalmente pela amizade.

Aos meus amigos de turma Kassia, Cibele, Aion, Cláudia, Lívia, Taisa e Raphael pela amizade e todos os momentos que compartilhamos.

À todos os amigos de laboratório, pela convivência diária e troca de experiências.

Às técnicas de laboratório Raissa, Geisi, Luana, Ligia e Bruna pela convivência e principalmente pela amizade.

Aos professores Gelson, Karin, Vanessa e Carlos, por terem aceitado o convite para composição da banca avaliadora. Seus conhecimentos enriqueceram muito este trabalho.

Aos professores Juan, Lourdes e Yuri, pela parceria nas pesquisas e colaboração nos artigos.

Aos professores da Disciplina de Prótese Removível Janaina, Ewerton, Ana Claudia e Paula, por todo o conhecimento compartilhado.

À Paula Barbugli, que além da amizade, sempre se mostrou muito disposta a ajudar e ensinar.

Às alunas do LIEC Regiane, Mennay, Gleice e Cibele, pela troca de experiências e pelos trabalhos desenvolvidos.

À Heloisa, por compartilhar comigo vários momentos em Campinas.

Aos colegas de Sorocaba, pela troca de ensinamentos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação Mara, Cristiano e José Alexandre.

À todos os funcionários do LIEC São Carlos e Araraquara.

Foggi CC. Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de óxidos bimetálicos e de revestimentos depositados a plasma sobre resina acrílica. [Tese de doutorado]. Araraquara: FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNESP; 2017.

RESUMO

Devido ao aumento da tolerância dos microrganismos aos antimicrobianos atualmente disponíveis, existe a necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos para o controle das infecções. Na primeira etapa dessa pesquisa, óxidos bimetálicos foram sintetizados por meio dos métodos hidrotermal assistido por micro-ondas e co-precipitação, variando-se as condições de síntese, como temperatura, pH, utilização ou não de surfactantes e tipos de solventes. Os diferentes microcristais de tungstato de prata (α -Ag₂WO₄) e molibdato de prata (β -Ag₂MoO₄) obtidos foram caracterizados por difração de Raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura por emissão de efeito de campo (MEV-EC), microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX), espectroscopia Raman e mensurações de fotoluminescência (PL) e UV-Vis. A atividade antimicrobiana desses compostos contra células planctônicas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina – SARM, *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Candida albicans* (*C. albicans*) foi avaliada por meio da determinação das concentrações inibitórias (CIM) e bactericida/fungicida mínimas (CBM/CFM). Além disso, com base nos testes de CIM, CBM e CFM, os compostos que proporcionaram os melhores resultados (α -Ag₂WO₄ irradiado e α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄, ambos sintetizados em álcool) foram também avaliados quanto à inibição da formação de biofilmes de SARM, *E. coli* e *C. albicans*, através de contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), determinação do peso seco dos biofilmes e análise por microscopia de varredura confocal a laser (CLSM) e MEV. Outra alternativa para o controle das infecções, avaliada na segunda etapa desta pesquisa, foi a deposição de filmes de prata/dióxido de silício (Ag/SiO₂) sobre resina acrílica para base de prótese por meio de co-pulverização assistida à plasma, utilizando dois tempos de deposição (7 e 15 minutos). Filmes puros de Ag e de SiO₂ também foram depositados para comparação e todos foram caracterizados através de DRX, análise de espessura, determinação da rugosidade média, hidrofobicidade e energia livre de superfície (ELS), espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (FTIR), MEV-EC e microscopia de força atômica (MFA). A adesão de *C. albicans* sobre a superfície da resina acrílica, com ou sem revestimento (controle), foi avaliada por meio de contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL),

CLSM e MEV-EC. Os resultados das caracterizações de MET e EDX do α -Ag₂WO₄ irradiado e não-irradiado confirmaram o crescimento de Ag metálica na superfície dos cristais de α -Ag₂WO₄ irradiados. Todos os microcristais de α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄ analisados apresentaram cristalinidade, sem a presença de fases deletérias, ordem estrutural e simetria a longo (DRX) e curto alcance (Raman). As análises UV-Vis permitiram estabelecer a energia dos gaps ópticos (E_{gap}) que variaram de 2,4 eV a 3,12 eV para o α -Ag₂WO₄ irradiado e aquele sintetizado em álcool e de 3,29 eV para 3,33 eV para os microcristais de β -Ag₂MoO₄ sintetizados em amônia e etanol, respectivamente. As mensurações de PL indicaram maior absorção na região do laranja (613 nm) e do vermelho (750 nm) para o α -Ag₂WO₄ sintetizado em água, enquanto para aqueles sintetizados em álcool e amônia os picos máximos foram no azul (447 nm). Já para o β -Ag₂MoO₄, a maior absorção foi observada na região do azul, sobretudo para os microcristais sintetizados em álcool. Imagens de MEV-EC revelaram que os microcristais de α -Ag₂WO₄ apresentaram natureza aglomerada, forma de bastões hexagonais alongados, sendo organizados em forma de flores quando sintetizados em amônia e álcool. Para o β -Ag₂MoO₄, os microcristais apresentaram formato arredondado e tamanho em escala micrométrica. As imagens também revelaram que, dependendo do solvente utilizado, os microcristais apresentaram diferentes faces cristalográficas: [001], [101] e [010] para o α -Ag₂WO₄ e [011], [001] e [111] para o β -Ag₂MoO₄. Os testes microbiológicos realizados com células planctônicas evidenciaram que todos os microcristais apresentaram atividade antimicrobiana. Entretanto, a CIM/CBM para o SARM foi menor com o α -Ag₂WO₄ irradiado (31,25 $\mu\text{g/mL}$) que aquela obtida com o não irradiado (125 $\mu\text{g/mL}$). Valor intermediário (62,50 $\mu\text{g/mL}$) foi observado para inativar *C. albicans*, tanto para o α -Ag₂WO₄ sintetizado com polivinil pirrolidona (PVP) como para o β -Ag₂MoO₄ sem PVP, ambos obtidos por co-precipitação. Os valores verificados para os microcristais de α -Ag₂WO₄ sintetizados em álcool, amônia e água foram, respectivamente, 3,90 $\mu\text{g/mL}$, 7,81 $\mu\text{g/mL}$ e 7,81 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans*, 15,62 $\mu\text{g/mL}$, 62,50 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$ para SARM e 0,48 $\mu\text{g/mL}$, 0,48 $\mu\text{g/mL}$ e 0,97 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli*. Para os microcristais de β -Ag₂MoO₄ sintetizados em álcool, amônia e água os valores foram, respectivamente, 7,81 $\mu\text{g/mL}$, 7,81 $\mu\text{g/mL}$ e 15,62 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans*, 31,25 $\mu\text{g/mL}$, 62,50 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$ para SARM e 0,49 $\mu\text{g/mL}$, 1,95 $\mu\text{g/mL}$ e 3,91 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli*. Nos testes realizados com biofilmes, os três microcristais selecionados (α -Ag₂WO₄ irradiado, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄, ambos sintetizados em álcool) foram capazes de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* nas seguintes concentrações: 15,62 $\mu\text{g/mL}$, 15,62 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. As

concentrações obtidas para SARM foram, respectivamente, 31,25 µg/mL, 62,50 µg/mL e 250 µg/mL, enquanto para *E. coli* foram, respectivamente, 1,95 µg/mL, 3,90 µg/mL e 7,81 µg/mL. Os microcristais selecionados, nas mesmas concentrações, também reduziram o peso seco das culturas microbianas dos três microrganismos. As imagens de CLSM e MEV mostraram resultados consistentes entre si e com aqueles obtidos por UFC/mL. Além disso, as análises de MEV indicaram alterações morfológicas, tendo sido mais evidentes para as células de *C. albicans* e com o α -Ag₂WO₄ sintetizado em álcool. Os resultados da segunda etapa deste estudo mostraram que não foi possível, com perfilômetro, detectar a espessura dos filmes depositados. Os filmes Ag/SiO₂7, Ag e SiO₂ aumentaram a rugosidade (Ra) da superfície (3,4 µm, 4,2 µm e 4,1 µm, respectivamente), enquanto o filme Ag/SiO₂15 diminuiu (2,8 µm), em comparação com o controle (PMMA) sem revestimento (3,2 µm). O ângulo de contato com água do PMMA foi de 100,83° (hidrofóbico) enquanto os dos filmes depositados foram menores (Ag/SiO₂7 = 61,57°, Ag/SiO₂15 = 93,97°, Ag = 83,66° e SiO₂ = 47,01°). A ELS do PMMA e dos filmes Ag/SiO₂15 e Ag foram similares e menores que as dos filmes Ag/SiO₂7 e SiO₂. As imagens de MEV-EC e MFA revelaram a presença de grãos de tamanhos diferentes nos filmes Ag/SiO₂7 e Ag/SiO₂, apresentando uma camada de SiO₂ inferior (grânulos pequenos), recoberta com nanopartículas de Ag (grânulos maiores) na superfície. A estrutura dos filmes Ag/SiO₂7 e Ag/SiO₂ apresentou-se na fase amorfa (DRX) e a análise em FTIR demonstrou a presença de picos relacionados com as ligações Si-O e Si-H. As médias de Log₁₀ UFC/mL de *C. albicans* observadas para os filmes Ag/SiO₂7, Ag e SiO₂ foram semelhantes e não diferentes do controle, porém o filme Ag/SiO₂15 promoveu redução no número de células viáveis em mais de 2 logs em comparação com o controle. Com base nos resultados obtidos, a atividade antimicrobiana mais efetiva foi observada com os microcristais de α -Ag₂WO₄ sintetizados em álcool e com o filme Ag/SiO₂15.

Palavras-chave: Antibacterianos. *Candida albicans*. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Polimetil metacrilato. Prótese parcial removível.

Foggi CC. Synthesis, characterization and antimicrobial action of bimetallic oxides and thin films deposited by plasma on acrylic resin. [Tese de doutorado]. Araraquara: FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNESP; 2017.

ABSTRACT

Due to the increased tolerance of the microorganisms to the available antimicrobial drugs, there is a need of development of alternative methods for infection control. In the first part of this study, bimetallic oxides were synthesized by hydrothermal microwave-assisted and co-precipitation methods, varying synthesis conditions, as presence or absence of surfactants and types of solvents used. The different microcrystals of α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄ obtained were characterized by X-ray diffraction (XRD), field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM), transmission electron microscopy (TEM), energy diffraction spectroscopy (EDS), Raman spectroscopy and photoluminescence measurements (PL) and UV-Vis. Their antimicrobial activity was evaluated against planktonic cells of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA, *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Candida albicans* (*C. albicans*) by the determination of inhibitory concentrations (MIC) and bactericidal/fungicidal concentrations (MBC/MFC). Based on the MIC, MBC and MFC values, the microcrystals that provided the best results (α -Ag₂WO₄ irradiated and α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄, both synthesized in alcohol) were also evaluated for their ability to inhibit biofilm of MRSA, *E. coli* and *C. albicans*, by counting the CFU/mL, dry weight determination, and analysis using confocal laser scanning microscopy (CLSM) and FE-SEM. Other method for infection control evaluated in the second part of this research, was the deposition of SiO₂/Ag thin films on the surface of an denture base acrylic resin by co-sputtering plasma, using two deposition times (7 and 15 minutes). Pure Ag and SiO₂ films were also deposited for comparison and all thin films were characterized by XRD, thickness measurement, roughness determination, hydrophobicity and surface free energy (SFE), Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR), SEM and atomic force microscopy (AFM). *C. albicans* adhesion was evaluated by CFU/mL counting, CLSM and MEV. Results from TEM and EDS confirmed the growth of nanofilaments of metallic Ag on the surface of the irradiated α -Ag₂WO₄. All microcrystals of α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄ analysed showed crystallinity, without the presence of secondary phases, with structural order and symmetry at short (Raman) and long range (XRD). The band gap values derived from UV-Vis spectra ranged from 2.4 eV to 3.12 eV for the irradiated α -Ag₂WO₄ and those synthesized in alcohol and from 3.29 eV to 3.33 eV for the microcrystals of β -Ag₂MoO₄ synthesized in ammonia and ethanol, respectively. PL measurements indicated

that the maximum absorption was observed at the orange region (613 nm) and red region (750 nm) for the α -Ag₂WO₄ synthesized in water, while for those obtained in alcohol and ammonia, the highest peaks were in the blue region (447 nm). For the β -Ag₂MoO₄, the maximum absorption was seen at the blue region, mainly when the synthesis was performed in alcohol. FE-SEM images revealed that the microcrystals of α -Ag₂WO₄ showed an agglomerated nature, in the shape of elongated hexagonal nanorods, being organized in flower-like structures when synthesized in ammonia and alcohol. For β -Ag₂MoO₄, the microcrystals showed were round-shaped, typically in the micrometer size. The microscopic images also revealed that, depending on the solvent used, the microcrystals presented different crystallographic faces: [001], [101] and [010] for the α -Ag₂WO₄ and [011], [001] and [111] for the β -Ag₂MoO₄. Microbiological tests performed with planktonic cells showed that all synthesized microcrystals exhibit antimicrobial activity. However, the MIC/MBC value for MRSA for the irradiated α -Ag₂WO₄ (31.25 μ g/mL) was lower than that obtained for the non-irradiated (125 μ g/mL). Intermediate value (62.50 μ g/mL) was required to inactivate *C. albicans*, for the α -Ag₂WO₄ synthesized with PVP and β -Ag₂MoO₄ without PVP, both obtained by co-precipitation method. The values found for the α -Ag₂WO₄ microcrystals synthesized in alcohol, ammonia and water were, respectively, 3.90 μ g/mL, 7.81 μ g/mL and 7.81 μ g/mL for *C. albicans*, 15.62 μ g/mL, 62.50 μ g/mL and 125 μ g/mL for MRSA and 0.48 μ g/mL, 0.48 μ g/mL and 0.97 μ g/mL for *E. coli*. For the β -Ag₂MoO₄ microcrystals synthesized in alcohol, ammonia and water the values were, respectively, 7.81 μ g/mL, 7.81 μ g/mL e 15.62 μ g/mL for *C. albicans*, 31.25 μ g/mL, 62.50 μ g/mL and 500 μ g/mL for MRSA and 0.49 μ g/mL, 1.95 μ g/mL and 3.91 μ g/mL for *E. coli*. In the tests performed with biofilms, (irradiated α -Ag₂WO₄, α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄, both synthesized in alcohol) were able to inhibit *C. albicans* biofilm formation at the following concentrations: 15.62 μ g/mL, 15.62 μ g/mL and 125 μ g/mL, respectively. The concentrations required for MRSA were, respectively, 31.25 μ g/mL, 62.50 μ g/mL and 250 μ g/mL, while for *E. coli* were, respectively, 1.95 μ g/mL, 3.90 μ g/mL and 7.81 μ g/mL. The selected microcrystals, at the same concentrations, also reduced the dry weight of the biofilms of the three microorganisms. CLSM and SEM images showed results that were consistent with each other and with the data obtained in the CFU/mL assay. In addition, SEM analyses indicated morphological alterations, which were more evident for the *C. albicans* cells and with the α -Ag₂WO₄ synthesized in alcohol. The results from the second part of this study showed that it was not possible to detect the thickness of the deposited films. The Ag/SiO₂, Ag and SiO₂ thin films

increased the surface roughness (Ra) (3.4 μm , 4.2 μm and 4.1 μm , respectively), whereas the Ag/SiO₂ decreased (2.8 μm), in comparison to control, (PMMA) without coating (3.2 μm). The water contact angle of the PMMA was 100.83° (hydrophobic) while those of the deposited films were lower (Ag/SiO₂7 = 61.57°, Ag/SiO₂ = 93.97°, Ag = 83.66°e SiO₂ = 47.01°). The SFE of the PMMA and the films Ag/SiO₂15 and Ag were similar and lower than those of the films Ag/SiO₂7 and SiO₂. FE-SEM and MFA revealed the presence of grains with different sizes in the films Ag/SiO₂7 and Ag/SiO₂15, showing a base layer of SiO₂ (small granules), covered by Ag nanoparticles (bigger grains) in the surface. The structures of the Ag/SiO₂7 and Ag/SiO₂ films were in the amorphous state (XRD) and FTIR analysis demonstrated the presence of peaks related to Si-O and Si-H bonds. The mean values of Log₁₀ CFU/mL of *C. albicans* observed for the Ag/SiO₂7, Ag and SiO₂ were similar and not different from the control, but the Ag/SiO₂ film promoted a reduction in the number of viable cells more than 2 logs compared to control. Based on the obtained results, the more effective antimicrobial activity was observed for the α -Ag₂WO₄ microcrystals synthesized in alcohol and for the Ag/SiO₂15 thin film.

Key Words: Anti-Bacterial agents. *Candida albicans*. *Escherichia coli*. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Polymethyl Methacrylate. Removable Partial Denture.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Estudos Sobre Óxidos Bimetálicos	22
2.2 Estudos Sobre Atividade Antimicrobiana e Mecanismos de Ação de Óxidos Bimetálicos	38
2.3 Estudos Sobre Estrutura Celular	58
2.4 Estudos Sobre Características Superficiais e Filmes Depositados à Plasma	63
3 PROPOSIÇÃO	71
4 MATERIAL E MÉTODO	72
4.1 Microcristais de α -Ag ₂ WO ₄ com e sem Irradiação.....	76
4.1.1 Síntese.....	76
4.1.2 Caracterização.....	77
4.1.3 Atividade antibacteriana contra SARM.....	78
4.2 Microcristais de α -Ag ₂ WO ₄ com surfactante	79
4.2.1 Síntese.....	79
4.2.2 Caracterização.....	80
4.2.3 Efeito antifúngico contra <i>C. albicans</i>	80
4.3 Microcristais de β -Ag ₂ MoO ₄ sem Surfactante.....	81
4.3.1 Síntese.....	81
4.3.2 Caracterização.....	82
4.3.3 Efeito antifúngico contra <i>C. albicans</i>	82
4.4 Microcristais de α -Ag ₂ WO ₄ em Diferentes Solventes.....	82
4.4.1 Síntese.....	82
4.4.2 Caracterização.....	83
4.4.3 Efeito antimicrobiano contra SARM, <i>C. albicans</i> e <i>E. coli</i>	84
4.5 Microcristais de β -Ag ₂ MoO ₄ em Diferentes Solventes	85
4.5.1 Síntese.....	85

4.5.2 Caracterização	86
4.5.3 Efeito antimicrobiano contra SARM, <i>C. albicans</i> e <i>E. coli</i>	86
4.6 Ação de Compostos (Óxidos Bimetálicos) Associados à Prata Contra Biofilme	86
4.6.1 Inibição da formação de biofilmes microbianos de <i>C. albicans</i> , SARM e <i>E. coli</i>	87
4.6.2 Unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)	87
4.6.3 Peso seco das culturas microbianas	88
4.6.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	88
4.6.5 Microscopia confocal a laser	88
4.7 Revestimentos Contendo Ag Depositados à Plasma	89
4.7.1 Confecção dos substratos de resina acrílica	89
4.7.2 Deposição dos filmes finos	89
4.7.3 Caracterização dos filmes finos depositados	90
4.7.4 Atividade dos filmes finos depositados contra adesão de <i>C. albicans</i>	92
5 RESULTADO	94
5.1 Microcristais de α -Ag ₂ WO ₄ com e sem Irradiação	94
5.2 Microcristais de α -Ag ₂ WO ₄ com Surfactante	100
5.3 Microcristais de β -Ag ₂ MoO ₄ sem Surfactante	105
5.4 Microcristais de α -Ag ₂ WO ₄ em Diferentes Solventes	107
5.5 Microcristais de β -Ag ₂ MoO ₄ em Diferentes Solventes	119
5.6 Ação de Compostos (Óxidos Bimetálicos) Associados à Prata Contra Biofilmes	129
5.7 Revestimentos Contendo Ag Depositados à Plasma	139
6 DISCUSSÃO	151
7 CONCLUSÃO	171
REFERÊNCIAS	172

1 INTRODUÇÃO

Os óxidos bimetálicos que apresentam a fórmula básica A_2BO_4 constituem uma família de compostos com várias aplicações tecnológicas^{20, 51}. Os molibdatos de prata, como o Ag_2MoO_4 , que pertencem a essa família, tem atraído a atenção dos pesquisadores devido às suas propriedades que permitem a utilização em diversas áreas, como dispositivos eletroquímicos e sensores de gás^{20, 37, 103, 120, 157}, e técnicas de efeito Raman intensificado pela superfície (SERS - "*Surface Enhanced Raman Scattering*")^{16, 65, 103}. Segundo Arora et al.¹², em 2012, o Ag_2MoO_4 pode exibir estrutura α -tetragonal e β -cúbica, dependendo da pressão utilizada no processamento. Da mesma forma, os tungstatos cerâmicos tem sido bastante investigados. Os tungstatos de metais de transição, como o tungstato de prata (Ag_2WO_4), são óxidos semicondutores que contém a combinação de ligações covalentes, iônicas e metálicas⁷. Esse óxido também pode exibir polimorfismo e, dessa forma, pode ter três tipos de estruturas: α -ortorrômbica, β -hexagonal e γ -cúbica, dependendo do pH (ácido ou alcalino)^{30, 55, 82}. Entre esses polimorfos, designados como α -, β -, e γ - Ag_2WO_4 ¹⁶⁹, a fase α - Ag_2WO_4 é termicamente estável e tem sido considerado um material interessante devido ao crescimento de filamentos de prata (Ag) na sua superfície quando exposto à irradiação com elétrons^{7, 105, 106, 146}. Os tungstatos apresentam numerosas aplicações e o Ag_2WO_4 tem sido pesquisado para descontaminação da água e degradação de produtos orgânicos^{36, 181}, por sua atividade fotocatalítica quando em luz visível^{163, 188}, bem como para sensores de gás⁴⁵.

A obtenção de diferentes morfologias de molibdatos de prata tem sido relatada na literatura, como feixes ("*broon-like*"), flores ("*flower-like*"), cubos ("*cube-like*")^{100, 152}, semi-esferas⁴⁴, nanopartículas, nanofios e nanobastões²¹, sendo as formas de nanoesferas, nanobastões e bastões alongados também descritas para o tungstatos de prata^{30, 45, 51, 97, 110, 141, 181, 197}. Além disso, conforme mencionado, os óxidos bimetálicos também podem existir em diversas estruturas cristalinas ou fases^{12, 30, 45, 51, 71, 106, 152, 181}. Beltrán et al.²⁰ em 2014, realizaram uma investigação sistemática utilizando primeiros princípios para calcular as propriedades estruturais e eletrônicas, bem como as diversas transições de fase, sob pressão, do Ag_2MoO_4 . Cinco fases foram consideradas: Ag_2MoO_4 tetragonal (com estrutura espinélio normal e inversa), β - Ag_2MoO_4 (estrutura espinélio cúbica), tipo olivina (estrutura ortorrômbica), e α - Ag_2MoO_4 (estrutura tetragonal do tipo K_2NiF_4). Dessa forma, variando-se o método de síntese, bem como os parâmetros utilizados, como pH, temperatura, pressão, entre outros, é possível controlar a morfologia e o tamanho das partículas, bem como a estrutura cristalina (Fabbro et al.⁶⁰, 2016). É importante ressaltar que, diferentes morfologias e

fases exibem também propriedades distintas e, conseqüentemente, é possível a obtenção de compostos com características funcionais específicas. Várias rotas de síntese foram desenvolvidas e utilizadas na preparação de microcristais de Ag_2WO_4 e Ag_2MoO_4 , incluindo a co-precipitação, sono-química^{30, 55, 73}, hidrotermal convencional^{30, 197} e hidrotermal assistida por micro-ondas^{100, 110, 140}.

Dentro desse contexto, outra possível aplicação desses diversos compostos que vem sendo sintetizados seria na área biomédica, como agentes antimicrobianos. Recentemente, a síntese de nanopartículas de prata (Ag) ou compósitos contendo Ag tem sido bastante pesquisada^{5, 48, 49, 56, 96, 121, 130, 132, 173, 177, 194}. Recentemente, com base na conhecida atividade da prata contra um amplo espectro de microrganismos, as pesquisas também tem sido focadas no estudo do potencial antimicrobiano dos materiais Ag_2MoO_4 e Ag_2WO_4 ^{55, 180, 198}. Os possíveis benefícios das nanopartículas e compósitos contendo Ag³⁹ não se referem apenas à sua atividade contra fungos, bactérias e vírus, mas também à baixa propensão de induzir resistência microbiana^{96, 137}. Nos últimos anos, tem sido observado rápido aumento da tolerância dos microrganismos aos antibióticos e antifúngicos utilizados convencionalmente, devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência por meio de mutações genéticas^{15, 77}, produção de enzimas,^{2, 29, 185} e atuação de sistemas de efluxo^{22, 76, 182}. Como consequência, tem havido um aumento significativo na incidência de infecções sistêmicas, como bacteremia e fungemia, tanto em hospitais como na comunidade, trazendo considerável preocupação na área de saúde pública^{32, 58, 68, 122}. Entre os microrganismos presentes nessas infecções, o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina – SARM, *Escherichia coli* e *Candida albicans* tem sido frequentemente isolados^{32, 58, 68}. Esses microrganismos são comensais e colonizam vários nichos no hospedeiro humano^{7, 154, 162}. No entanto, também podem causar uma série de doenças, desde infecções superficiais da pele e mucosas a condições invasivas graves, como pneumonia, endocardite, infecções do trato urinário e da corrente sanguínea (bacteremia, fungemia)^{52, 145, 164, 185, 193}. Vários fatores tem sido correlacionados com a ocorrência aumentada de infecções sistêmicas, mas é geralmente aceito que o envelhecimento da população, a maior longevidade de pacientes com doenças crônicas, o surgimento da AIDS e o uso disseminado de terapias imunossupressivas, os tratamentos de câncer, os dispositivos médicos como catéteres intravenosos de longo uso, enxertos vasculares, válvulas cardíacas, os antibióticos de largo espectro e a resistência microbiana são aspectos significantes^{32, 50, 91, 111, 112}.

Quando microrganismos altamente patogênicos estão presentes, alta mortalidade e morbidade, bem como o aumento do tempo de permanência nos hospitais e dos custos, tem

sido relatados ^{17, 24, 27, 50, 122, 124, 139, 143, 145, 178, 172}. Todos esses aspectos evidenciam a necessidade de se buscar tratamentos alternativos e do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Recentemente, Longo et al.¹⁰⁵ (2013), pela primeira vez, demonstraram o crescimento in situ de nanofilamentos de Ag metálica a partir de cristais de tungstato de prata (α -Ag₂WO₄). Nesse estudo, feixes de elétrons acelerados oriundos das análises de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo/ microscopia eletrônica de transmissão (MEV-EC/MET) foram capazes de induzir a enucleação e o crescimento de filamentos de Ag. As propriedades físico-químicas, estruturais e eletrônicas desses nanofilamentos foram caracterizadas pelos autores por meio de diferentes técnicas, bem como cálculos teóricos. Além disso, um possível mecanismo de formação dos nanofilamentos de Ag também foi proposto nesse estudo ¹⁰⁵. Segundo os autores, esse novo material pode ser uma plataforma ideal com potencial para diversas aplicações, incluindo aplicações catalíticas e biológicas. Em estudo inicial ¹¹⁰, avaliamos o efeito antibacteriano de cristais de tungstato de prata (α -Ag₂WO₄), com ou sem filamentos de prata, que foram obtidos por meio da irradiação das amostras. Foi observado que, embora os dois compostos tenham apresentado efeito bacteriostático e bactericida contra SARM, as amostras irradiadas foram mais efetivas. Cálculos foram realizados para se obter as propriedades estruturais e eletrônicas do α -Ag₂WO₄ e da Ag metálica, que proporcionaram suporte quantitativo para o mecanismo antibacteriano proposto, baseado no aumento dos processos de transferência de elétrons entre α -Ag₂WO₄ e as nanopartículas de Ag. Esses resultados sugerem que tanto o novo material como outros diversos compostos contendo prata que vem sendo sintetizados apresentam potencial antimicrobiano e merecem ser investigados.

O efeito de agentes antimicrobianos tem sido avaliado contra os microrganismos na forma livre determinando-se as alterações resultantes nas células, bem como as concentrações que inibem seu crescimento e promovem sua inativação ^{5, 79, 87, 88, 96, 98, 123, 129, 132, 173}. Outro aspecto importante é avaliar também se os compostos sintetizados previnem ou reduzem a formação de biofilme, que constitui uma comunidade complexa de microrganismos aderidos a substratos, e é altamente organizada e envolta por uma matriz polimérica extracelular autoproduzida ^{128, 136, 150, 165, 174}. Células microbianas vivendo na forma de biofilmes exibem características fisiológicas distintas de suas formas planctônicas, fato que, associado à arquitetura dos biofilmes microbianos, resulta, entre outros aspectos, em tolerância aumentada contra agentes antimicrobianos e mecanismos de defesa do hospedeiro ^{34, 136, 174}. Isto tem sido atribuído às propriedades da matriz de biofilme, através do aprisionamento ou inibição de difusão e ação de antimicrobianos, diminuição das taxas de crescimento celular que ocorre em

biofilmes, resistência genética por meio da transferência horizontal de genes, modificação do substrato-alvo do fármaco, expressão gênica alterada e a presença de células “*persisters*”^{63, 165}. Em biofilmes maduros, a matriz polimérica extracelular, composta por diversas proteínas, quitinas, DNA, β -1,3 carboidratos glucanos, ácido colânico, celulose^{3, 23, 64}, atua como uma barreira protetora, dificultando a difusão de moléculas relacionadas à resposta imune do hospedeiro e de agentes antimicrobianos; além disso, estudos tem demonstrado que a composição química dessa matriz apresenta papel relevante na resistência microbiana¹³⁶. Os componentes da matriz polimérica extracelular proporcionam estabilidade mecânica para os biofilmes, mediam sua adesão com as superfícies e formam uma estrutura coesiva tridimensional que interconecta e imobiliza temporariamente as células do biofilme. Essa matriz também atua como um sistema digestivo externo por manter as enzimas extracelulares próximas às células, tornando-as capazes de metabolizar biopolímeros sólidos, dissolvidos ou em forma coloidal⁶⁴. Em função desses aspectos, a inibição da formação de biofilmes é preferível à erradicação de biofilmes já estabelecidos pelo fato dos microrganismos rapidamente desenvolverem tolerância aos agentes antimicrobianos, tornando as infecções mais difíceis de serem tratadas. Assim, compostos que possam inibir a formação de biofilmes^{1, 113} podem constituir importante estratégia terapêutica.

Entre as diversas possibilidades exploradas para o controle microbiano, o revestimento de biomateriais com compostos contendo prata também tem sido relatado^{1, 33, 81, 118, 161, 183}. Em odontologia, as próteses removíveis feitas de polimetil metacrilato (PMMA) ainda são comumente utilizadas para reabilitação oral de pacientes edêntulos ou parcialmente edêntulos, melhorando a mastigação, nutrição, fonética e estética, com impacto positivo no seu bem-estar psicológico e social, além da qualidade de vida¹⁸⁷. A resina PMMA apresenta propriedades desejáveis como adequada resistência, biocompatibilidade, insolubilidade em fluidos orais, estética satisfatória, custo moderado e facilidade de manuseio. Apesar destes aspectos positivos, as bases de próteses confeccionadas em PMMA suportam o crescimento de biofilmes microbianos e podem atuar como reservatórios de patógenos oportunistas capazes de desencadear infecções orais e sistêmicas¹²⁷. Diferentes biomateriais, incluindo PMMA, podem ser revestidos com nanopartículas de Ag ou nanocompósitos contendo Ag, objetivando melhorar as suas propriedades biológicas, especialmente com relação à adesão e à colonização de microrganismos⁸¹. Na cavidade oral, particularmente, o fungo *C. albicans* pode proliferar-se facilmente nas bases de próteses de resina acrílica, formando biofilmes que tem sido frequentemente associados à patogênese da estomatite protética, doença comum que acomete usuários de próteses removíveis^{26, 57, 127, 133, 151}. Além da alta incidência em usuários

de próteses, a estomatite protética merece atenção porque os biofilmes atuam como reservatórios de microrganismos. Tem sido relatado que espécies de *Candida* da cavidade oral podem colonizar o trato gastrointestinal superior e causar septicemia e pneumonia em pacientes imunocomprometidos^{59, 95, 170}. Nesse contexto, estratégias visando a prevenção ou a inibição da adesão de *C. albicans* e, conseqüentemente, a formação de biofilmes, são de grande interesse e constituem campo importante de pesquisas. Assim, a utilização de filmes contendo Ag, como revestimento de biomateriais como o PMMA, tem significado prático e merece ser avaliada.

Entre os vários métodos de modificação de superfície de biomateriais, tem se destacado os tratamentos assistidos a plasma^{85, 118, 195, 196}. O plasma pode ser descrito como um gás parcialmente ionizado⁸⁵. Quando energia adicional é fornecida a um gás, as partículas colidem umas com as outras, liberando elétrons, gerando íons e o gás apresenta carga elétrica. Esse estado da matéria (quarto estado) é denominado de plasma, que contém, além de partículas neutras, um número praticamente igual de partículas com cargas positivas e negativas. Há vários métodos para fornecer energia ao gás para gerar o plasma, sendo o mais comumente utilizado a aplicação de um campo elétrico ou eletromagnético. Por isso, o plasma frequentemente é denominado de “*gas discharge*”. Dentre as correntes alternadas de descarga (“*AC discharges*”) a mais utilizada é a rádio-frequência (RF), que é tipicamente 13,56 MHz (116). Assim, os tratamentos a plasma consistem em uma mistura gasosa composta de elétrons de alta energia, íons, fótons ultravioleta e espécies reativas com energia para quebrar ligações covalentes na superfície do material e, conseqüentemente, alterar suas características superficiais⁷⁵. O plasma pode ser frio (“*cold plasma*”) ou térmico (“*thermal plasma*”)⁸⁵. Assim, nos tratamentos a plasma, a temperatura do gás pode permanecer tão baixa quanto a temperatura ambiente, possibilitando o tratamento de materiais sensíveis a altas temperaturas^{75, 85, 171} tais como polímeros utilizados para bases de próteses removíveis. Uma forma de se obter o plasma frio é utilizar baixa pressão, em sistemas a vácuo⁸⁵. Várias vantagens tem sido atribuídas aos tratamentos a plasma. Tendo em vista que a profundidade desses tratamentos limita-se a poucos nanômetros da superfície, esses permitem modificações superficiais, como aumentar a molhabilidade, biocompatibilidade e durabilidade, sem influenciar as propriedades internas (“*bulk*”) dos materiais^{18, 75, 85}. Além disso, essa técnica é seca, rápida e pode ser usada para uma ampla variedade de materiais⁷⁵. Esses aspectos fazem com que o plasma apresente grande potencial para aplicações na Odontologia. Entretanto, esses tratamentos ainda não foram extensivamente explorados.

Nos tratamentos assistidos a plasma, as condições de processamento que incluem a potência, a pressão, a composição química do plasma e a natureza do substrato determinarão se a modificação da superfície ocorrerá por meio da deposição de um filme, incorporação ou remoção de espécies, ou ainda, por alterações estruturais induzidas por modificações químicas¹⁸. A pulverização catódica é um dos métodos de revestimento mais versáteis, que consiste em uma câmara de vácuo em que o plasma de um gás veículo (geralmente Argônio - Ar) é usado para criar íons⁶². Neste processo, alvos sólidos são bombardeados com as partículas energéticas (íons acelerados) para ejetar átomos na fase gasosa. Estes átomos/moléculas extraídos ou aglomerados de átomos/moléculas são, em seguida, depositados sobre o substrato¹⁴. Para aumentar a eficiência de pulverização, pode ser aplicado um campo magnético na superfície alvo, e a fonte de energia utilizada para criar o plasma pode ser proveniente de corrente contínua (CC) ou de radiofrequência (RF)⁶². De particular interesse, a deposição por pulverização por magnetron de RF permite a síntese de películas finas contendo prata em baixas temperaturas⁶², sendo apropriado para polímeros termicamente sensíveis^{14, 62}. Recentemente, a deposição de um revestimento antibacteriano de nanoaglomerados de prata/compósito de sílica sobre a superfície de próteses oculares confeccionadas em PMMA foi obtida pela técnica de co-pulverização por RF¹³. Entretanto, embora alguns autores tenham estudado esse tipo de modificação de superfície, a viabilidade, a caracterização e a atividade contra a adesão de *C. albicans* de filmes finos contendo Ag-SiO₂ depositados em PMMA utilizado como base de prótese, pelo método de co-pulverização ainda precisam ser melhor investigadas.

Com base nessas considerações, foi considerado oportuno avaliar a síntese, a caracterização e as propriedades antimicrobianas de compostos (óxidos bimetálicos) associados à prata, bem como de filmes contendo Ag depositados à plasma sobre resina acrílica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estudos Sobre Óxidos Bimetálicos

Wyckoff ¹⁸⁶ em 1922 estudou a estrutura cristalina de molibdato de prata (Ag_2MoO_4), e mostrou que entre 8 ou 64 moléculas estão contidas em uma única célula. O autor determinou também que o comprimento de um cubo contendo oito moléculas apresentou uma medida de 9,26 angstroms. Para cada 8 átomos de molibdênio, existem 16 átomos de prata e 32 átomos de oxigênio na mesma célula unitária, e os arranjos atômicos decorrentes de todos os 3 grupos espaciais são idênticos e, portanto, possuem simetria holoédrica entre si. O autor apresentou também como cada átomo de Ag e Mo estão arranjados entre si, e concluiu que os átomos de prata podem estar organizados de duas formas diferentes na estrutura atômica, e o fator determinante para essa organização é a localização dos átomos de oxigênio. Utilizando métodos facilmente aplicáveis e com base nos resultados da teoria dos grupos espaciais e os dados dos espectros de reflexão de Laue, o autor demonstrou que o molibdato de prata apresenta estrutura espinélio e magnetita, de acordo com a disposição dos átomos na célula unitária.

Urbach ¹⁶⁸ em 1953 realizou uma extensa investigação do espectro de sensibilidade de vários tipos de emulsões fotográficas, e verificou que, para as emulsões não sensibilizadas mais simples, o gráfico do logaritmo de sensibilidade versus frequência se aproximava de uma linha. Para emulsões de brometo de prata puras quando em temperatura ambiente, a inclinação desta linha foi encontrada muito próxima de $1/\kappa T$, e segundo o autor, esse comportamento é mais do que uma coincidência, e sim um fato esperado que ocorra em uma faixa de temperatura razoável. No comprimento de onda de baixa sensibilidade, o coeficiente de absorção é esperado que seja proporcional à sensibilidade. Um conjunto de medidas de fotoluminescência realizadas demonstrou que a relação $d\log e/d\nu = -1/\kappa T$, é aproximada para coeficientes de absorção na ordem de 10^{-1} cm^{-1} , para temperaturas entre 200°K e 650°K. Uma análise de dados de várias fontes sobre materiais, tais como AgCl, Ge, TiO_2 e CdS, indica um comportamento similar, com inclinações dentro de um fator de 2 de $1/\kappa T$, em temperaturas elevadas.

Em 1977, Turkovic et al.¹⁶⁷ estudaram partículas de tetratungstato de prata ($\text{Ag}_8\text{W}_4\text{O}_{16}$) submetidos a altas temperaturas por meio de mensurações de espectroscopia Raman. Os cristais de tetratungstato de prata foram sintetizados pelo método de precipitação, lavados diversas vezes, filtrados e em seguida secos a uma temperatura de 110°C.

Posteriormente, os cristais foram superaquecidos a uma temperatura de 650°C, onde sofreram fusão. Esse aquecimento provocou escurecimento do material, que os autores relacionaram com reações de decomposição complexas. Do material fundido, espécimes de 2,5 x 2,5 mm em secção transversal e 2,0 mm de espessura foram cortados e polidos para análise em espectroscopia Raman. Os espectros de Raman polarizados foram obtidos dos cristais de $\text{Ag}_8\text{W}_4\text{O}_{16}$, e os resultados demonstraram dois grupos vibracionais de interesse, considerando a alta temperatura de tratamento. Primeiramente, os modos de 40-65 cm^{-1} se apresentaram bastante intensos e não estavam presentes em outros tungstatos como CaWO_4 , SrWO_4 , BaWO_4 , ou ZnWO_4 . Esse fato pode ser explicado pela movimentação dos íons de Ag^{4+} em decorrência da fusão do material. A segunda frequência de interesse foi próxima a 900 cm^{-1} , onde a energia mais alta corresponde ao estiramento simétrico W – O, que normalmente é encontrado nos tungstatos como as scheelitas e ZnWO_4 . Espectroscopia Raman também foi realizada com o aquecimento da amostra, e foi observado que houve alargamento rápido dos modos vibracionais, conforme a amostra era aquecida, característico de desordem estrutural dos cristais. A baixa frequência da Ag na região de 40-65 cm^{-1} não se alterou com o aumento de temperatura, e isso é um fato esperado devido à movimentação dos íons de Ag durante o aquecimento. Com esses dados, os autores concluíram que não houve modificação dos cristais quando foram aquecidos até seu ponto de fusão.

Yasuda et al.¹⁹² estudaram o efeito de elétrons provenientes de microscopia eletrônica de transmissão em compostos intermetálicos In e Pd, em 1995. Os compostos intermetálicos de In e Pd foram preparados para espectrometria de absorção atômica. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução. Em conclusão, a vaporização ou atomização ocorrida em compostos intermetálicos de Pd-In foi observada por MET ao nível atômico. As redes do composto intermetálico Pd-In se movimentaram e depois evaporaram-se. Os compostos intermetálicos Pd-In que permaneceram após a observação possuíam outras fases, em que a porcentagem atômica de Pd aumentou consideravelmente.

Cui et al.⁴³ em 2003 estudaram a síntese seletiva de nanobastões/ nanofios de molibdato/ tungstato de prata monocristalinos uniformes em grande escala, sintetizados através de uma técnica de recristalização hidrotermal rápida e fácil. A influência do pH, do tempo de reação e temperatura na transformação da fase foram parâmetros testados e discutidos pelos autores. Como resultados, foi observado que o aumento da temperatura causa aumento no diâmetro dos nanofios. Ag_2MoO_4 puro e $\text{Ag}_6\text{Mo}_{10}\text{O}_{33}$ podem ser facilmente obtidos sob condições neutras e pH 2, respectivamente, enquanto que outras fases mistas de $\text{Mo}_{17}\text{O}_{47}$, $\text{Ag}_2\text{Mo}_2\text{O}_7$, $\text{Ag}_6\text{Mo}_{10}\text{O}_{33}$ foram observadas sob diferentes condições de pH.

$\text{Ag}_6\text{Mo}_{10}\text{O}_{33}$ com morfologia de nanofios, com diâmetro uniforme 50-60 nm e comprimento até várias centenas de micrômetros foram observados na síntese feita a 140° C. Verificou-se que o ponto de fusão dos nanofios de $\text{Ag}_6\text{Mo}_{10}\text{O}_{33}$ foi aproximadamente 238°C. De forma semelhante, nanobastões e nanofios de Ag_2WO_4 e $\text{Ag}_2\text{W}_2\text{O}_7$ podem ser sintetizados seletivamente controlando-se o valor do pH. Segundo os autores, esses resultados foram apresentados pela primeira vez na literatura e demonstraram que esta via de síntese poderia ser uma forma potencial para sintetizar, seletivamente, vários nanofios de molibdato, com várias fases e em grande escala.

Devido os molibdatos como CaMoO_4 e SrMoO_4 terem recebido muita atenção recentemente devido às suas interessantes propriedades luminescentes e estruturais, Gong et al.⁶⁹ estudaram essas propriedades em 2006. Neste estudo, foi relatado um método mediado por microemulsão como uma nova técnica para sintetizar mesocristais de CaMoO_4 e SrMoO_4 com estrutura oca. A síntese foi realizada num frasco de vidro de 50 mL com temperatura de reação inferior a 100°C e em autoclave, em recipientes de 50 mL de aço inoxidável revestido com Teflon com temperatura de reação superior a 100°C. Após a síntese, os microcristais foram caracterizados através de DRX, MEV, MET, PL e análise termogravimétrica. Todos os picos de DRX se apresentaram nítidos e determinaram que a estrutura cristalina obtida foi tetragonal, e ambas as amostras sintetizadas apresentaram os mesmos padrões de difração. As imagens de MEV e MET demonstraram que a morfologia obtida foi em forma de flores, com oito ou mais “pétalas” com tamanho aproximado de 2 a 3 μm de comprimento. Essas pétalas estão localizadas sob nanopartículas de tamanho aproximado 150-300 nm. Quando a concentração de Ca^{2+} e MoO_4^{2-} foi reduzida de 0,5 M para 0,2 M, os cristais em forma de flor de CaMoO_4 puderam ser obtidos com quantidade de pétalas inferior a 8, e comprimento reduzido para cerca de apenas 1 μm , e o tamanho dos blocos eram cerca de 100-150 nm. No entanto, quando a concentração de Ca^{2+} e MoO_4^{2-} é aumentada para uma concentração maior que 0,8 M, os cristais não são obtidos. Isso indica que a concentração inicial desses componentes tem importante influencia na morfologia final dos cristais. O estudo sobre o mecanismo de formação das superestruturas revela que o mecanismo de agregação orientado é responsável pela morfologia do cristal. Os mesocristais de CaMoO_4 e SrMoO_4 são mostrados em um estado termodinamicamente metaestável, que pode ser destruído pelo tempo maior de reação ou alteração de temperatura durante a síntese.

Chen et al.³⁵, ainda no mesmo ano (2006), estudaram os microcristais de MMoO_4 tetragonais (M = Ca, Sr) de grande escala com morfologias delicadas, tais como hastes elipsoidais, “amendoim”, “pêssegos” com entalhes, “halteres” e esférulas. Para isso, os

microcristais foram sintetizados através de reação entre os íons metálicos e o molibdato, solubilizados em solução aquosa alcalina, sem a utilização de surfactantes. Após a síntese, o precipitado foi lavado com etanol para remoção de impurezas. Os microcristais foram caracterizados através de DRX, espectroscopia Raman e medidas de fotoluminescência, e a morfologia e o tamanho das partículas foi analisada através de MEV. Os padrões de DRX demonstraram picos perfeitamente indexados à fase tetragonal pura do material, sem a presença de picos que indiquem fases deletérias ou impurezas. Os picos bem definidos indicam cristalinidade dos microcristais CaMoO_4 e SrMoO_4 . Os resultados também indicaram que ambas as amostras de CaMoO_4 e SrMoO_4 têm um processo geral de nucleação e crescimento baseado na sua natureza cristalográfica incomum. No processo de crescimento de microcristalinas de CaMoO_4 e SrMoO_4 , pode ser observado um mecanismo de transformação de morfologia distinto das hastas elipsoidais a amendoins, halteres, pêssegos e esférulas crescidas em solução aquosa alcalina. Neste sistema de reação alcalina, o valor de pH da solução não teve grande influência na síntese e evolução da morfologia dos produtos. Os resultados experimentais apresentaram uma via simples para a formação de materiais inorgânicos de grande escala com morfologias particulares sob condições suaves, e podem ser estendidos à síntese de outros materiais inorgânicos importantes com morfologias especiais.

Como a metodologia de espalhamento Raman intensificado pela superfície (SERS) possui um grande potencial como método de transdução de sinal sensível e seletivo para a identificação de moléculas biológicas ou químicas, Kim et al.⁸⁷ estudaram, em 2007, o potencial da utilização de nanopartículas como marcadores de células cancerígenas. As bandas estreitas bem delimitadas permitiram a detecção simultânea de grande número de moléculas biológicas ou analitos químicos. Além disso, o uso de nanopartículas como detecção biomolecular em vez de fluoróforos moleculares convencionais pode levar a melhorias na sensibilidade, seletividade e capacidade de identificação. As nanopartículas utilizadas nesse estudo foram nanoesferas de sílica embutidas em nanopartículas de Ag, e posteriormente foram adicionados corantes orgânicos fluorescentes nas partículas. As partículas produzidas apresentaram diâmetro de aproximadamente 120-150 nm, e apresentaram alta estabilidade na fotoexcitação. Após a aplicação de anticorpo conjugado nas partículas, estas demonstraram boa seletividade e especificidade em células e tecidos cancerígenos, possibilitando a realização de imagens específicas para diagnóstico.

Em 2007, Longo et al.¹⁰⁷ esclareceram que a fotoluminescência violeta-azul foi produzida à temperatura ambiente em uma estrutura de perovskita estruturalmente desordenada $(\text{SrZrO}_3)(\text{SZ})$ com linha de excitação de 350,7 nm. A intensidade dessa emissão

foi maior que a de qualquer outra perovskita previamente estudada. Para isso, pós ordenados e desordenados de SZ foram sintetizados usando o método de precursores poliméricos, onde uma resina polimérica foi tratada a 350°C durante 2h e produziu pós com resíduos orgânicos resultantes do método de síntese empregado. Os pós foram tratados termicamente a 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 660 e 1250°C durante 2h em atmosfera de oxigênio. Em seguida, foram caracterizados através de DRX e mensurações de fotoluminescência. Os picos indicados no DRX podem ser utilizados para avaliação da ordem estrutural do material, e como resultados demonstraram que os pós tratados a 660 e 1250°C apresentaram picos de difração indicando a ordem de longo alcance desses materiais, e foram indexados como cristais na fase ortorrômbica. Os pós tratados em temperaturas abaixo de 660°C não atingiram estrutura completamente ordenada. Os resultados de fotoluminescência dos materiais submetidos a tratamento de 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 660°C apresentaram comportamento associado à desordem estrutural do material, indicando a presença de níveis eletrônicos adicionais no intervalo de gap óptico do SZ. O aspecto geral dos espectros indicou a existência de banda larga. O pó estruturalmente desordenado tratado a 400°C apresentou baixa emissão de PL, e após o tratamento a 660°C, o pó SZ foi estruturalmente ordenado e a PL desapareceu. Entretanto, resultados interessantes de PL foram obtidos dos pós de SZ desordenados estruturalmente. A intensidade da emissão de luz azul violeta apareceu após o tratamento a 400°C e aumentou gradualmente. As faixas foram amplas e intensas, particularmente no pó tratado a 500°C, onde esta emissão de luz violeta-azul foi tão intensa que foi possível à visualização a olho nu. Estes estados eletrônicos dos cristais estão fortemente relacionados com a ordem-desordem estrutural da rede cristalina.

No estudo de Sczancoski et al.¹⁴⁸ de 2008 foi relatada a síntese de pós de SrMoO₄, sua caracterização e propriedades ópticas. Os pós de SrMoO₄ foram obtidos pelo método da coprecipitação e foram processados através de método hidrotermal utilizando um micro-ondas (413 K durante 5h), com a presença de polietileno glicol (PEG). A pressão no micro-ondas foi estabilizada a 294 kPa, e após o tratamento, o recipiente contendo o material foi resfriado em temperatura ambiente. Os pós obtidos foram secos em recipiente convencional, utilizando forno a 373 K durante 24h. Quatro amostras de SrMoO₄ foram preparadas utilizando as mesmas condições experimentais para analisar a reprodutibilidade do método. Após a síntese, estes pós foram analisados por DRX, espectroscopia Raman por transformada de Fourier (FT-Raman), UV-Vis e PL. As análises de DRX revelaram picos nítidos e bem definidos para as amostras, indicando que os pós de SrMoO₄ eram livres de fases secundárias e cristalizaram estrutura tetragonal. As investigações FT-Raman mostraram a presença de modos de vibração

Raman-ativa correspondentes para este molibdato. Utilizou-se a técnica UV-Vis para determinar o intervalo de banda óptica deste material, e as quatro amostras sintetizadas apresentaram valor de E_{gap} de 3,98 eV, comportamento típico para esse tipo de material, e que se refere à diferença de energia entre a banda de valência e a banda de condução. As análises de PL demonstraram que os pós de SrMoO_4 exibiram uma emissão intensa à temperatura ambiente, com pico máximo a 540 nm (região verde) quando excitados por um comprimento de onda de 488 nm de um laser de íons de argônio, fato que os autores associaram às transições nos “clusters” tetraédricos $[\text{MoO}_4]$, relacionado com defeitos superficiais no material.

Cheng et al.³⁷ em 2009 obtiveram Ag_2MO_4 (M = Cr, Mo e W) unidimensionais em larga escala, de elevada pureza e uniformidade por um método hidrotérmico fácil. Os materiais Ag_2MO_4 preparados apresentaram características de corrente-tensão (I-V) linear e excelente fotoresposta. À medida que a fonte de luz foi ligada e desligada, as correntes podiam ser comutadas de modo reversível entre valores altos e baixos à tensão de 0,1 V. Assim, os resultados sugeriram que as razões de condutividade luz/não luz destes compostos estavam correlacionadas com as ligações iônicas potenciais do metal. A extensão das fotorrespostas ao silicato de prata e ao vanadato de prata também mostrou resultados semelhantes, indicando suas potenciais aplicações em dispositivos no futuro.

Stone et al.¹⁵⁶ 2010 estudaram as mudanças químicas e na estrutura cristalina de filmes finos de molibdato de prata ($\text{Ag}_2\text{Mo}_2\text{O}_7$) e tungstato de prata (Ag_2WO_4), com a finalidade de uso como lubrificantes sólidos que são comumente utilizados no setor aeroespacial, automotivo e indústrias de energia nuclear. Os filmes foram depositados através de técnica de *sputtering*, gerando filmes estequiométricos de $\text{Ag}_2\text{Mo}_2\text{O}_7$ e Ag_2WO_4 . Para a formação do filme, alvos de Ag, Mo ou W foram submetidos a bombardeamento por elétrons em ambiente reativo, na presença do gás oxigênio. Em seguida, alvos de Ag, MoS_2 e WS_2 foram utilizados em ambiente sem gás reativo e, posteriormente, sofreram tratamento térmico a 700°C durante 1h, para que houvesse substituição dos átomos de S por O. A composição dos filmes foi confirmada por análise em DRX. Os autores demonstraram, utilizando um modelo de dinâmica molecular *ab initio*, difração de raios X de alta temperatura, espectroscopia Raman de alta temperatura e calorimetria de varredura diferencial, em combinação com testes de deslizamento, que a estrutura atômica em camadas do molibdato de prata facilita o deslizamento, resultando em baixo coeficiente de atrito (<0,2) de 300 a 500°C, temperatura em que esses materiais são submetidos quando aplicados como lubrificantes sólidos. Esses resultados não foram encontrados para o tungstato de prata depositado, que não se mostrou

capaz de reduzir fricção, sendo, então, contra indicado para utilização como lubrificante. Os autores discutiram que, na literatura, existem valores de coeficientes de atrito não favoráveis para Ag e MoO₃ isolados, sendo, portanto, a combinação deles necessária para que haja uma aplicação nessa área.

Os óxidos à base de Ag, Ag₂M₂O₇ (M = Mo, W) com uma estrutura triclinica foram preparados por Kim et al.⁸⁴ em 2010. Eles utilizaram um método de reação de estado sólido convencional, e as suas estruturas elétricas e propriedades fotocatalíticas foram investigadas. A partir dos cálculos da estrutura de banda eletrônica, Ag₂Mo₂O₇ apresentou um gap de energia de 2,65 eV, enquanto que Ag₂W₂O₇ apresentou um gap de energia de 3,18 eV. Além disso, as afinidades eletrônicas calculadas foram de 4,75 eV para Ag₂Mo₂O₇ e 4,62 eV para Ag₂W₂O₇. O menor gap de energia e maior afinidade eletrônica de Ag₂Mo₂O₇ do que os de Ag₂W₂O₇ originaram-se da contribuição do orbitário Mo 4d desocupado para a banda de condução, que foi posicionada em um nível de energia menor que o orbital W 5d. Os efeitos das diferentes características da estrutura da banda em Ag₂M₂O₇ (M = Mo, W) sobre a atividade fotocatalítica foram investigados pela degradação de uma solução de corante de Rodamina B sob irradiação de luz visível. Os resultados mostraram que a atividade fotocatalítica de Ag₂Mo₂O₇ era muito mais elevada do que a de Ag₂W₂O₇ e comparável com um pó WO₃ bem conhecido. A maior propriedade fotocatalítica de Ag₂Mo₂O₇ foi atribuída à sua maior capacidade de absorção óptica e menor taxa de recombinação de carga.

No ano de 2011, Yan et al.¹⁹¹ exploraram a síntese seletiva de polimorfos do semicondutor CdWO₄ em fase tetragonal ou monoclinica, através da otimização dos parâmetros experimentais, variando os precursores e os solventes utilizados. Os materiais foram sintetizados através de síntese solvotermal aquosa, e caracterizados através de DRX, espectroscopia de Raman, UV-Vis, MEV, mensurações de fotoluminescência, e os dados experimentais foram complementados com cálculos teóricos. Os ensaios fotocatalíticos foram realizados em um recipiente de quartzo onde 150 mg do semicondutor foi ressuspenso em 150 mL solução aquosa contendo 10 ppm de laranja de metilo, e quatro lâmpadas UV de 4 W com um comprimento de onda centrado a 254 nm foram utilizadas como fonte de iluminação. Após intervalos de tempo sob irradiação da luz UV, alíquotas foram analisadas em espectrofotômetro. O DRX demonstrou todos os picos nítidos e bem definidos, que demonstra alta cristalinidade dos semicondutores. Porém, a adição de propileno glicol nos sistemas de reação reduziu o tamanho de partícula do CdWO₄ final. Quando o solvente aquoso foi completamente substituído por propileno glicol, o semicondutor era uma fase mista de monoclinica e tetragonal. Estes resultados têm duas implicações importantes: (1) a adição de

solvente orgânico propileno glicol pode estabilizar o CdWO_4 tetragonal, enquanto (2) a presença de água nos sistemas de reação favorece a formação do estado monoclinico. MEV indicou que ambos os polimorfos possuíam morfologias esféricas semelhantes, porém eram estruturalmente diferentes. Os cálculos das estruturas eletrônicas para ambos os polimorfos demonstraram as mesmas construções de banda de condução ou banda de valência, enquanto as larguras de banda de condução de ambos foram bastante diferentes. Ambos os CdWO_4 exibiram uma boa atividade fotocatalítica para a degradação de laranja de metilo sob irradiação de luz UV. A atividade fotocatalítica específica do CdWO_4 monoclinico foi ainda maior do que a do fotocatalisador TiO_2 comercial (Degussa P25), comumente utilizado. A atividade aumentada do CdWO_4 tetragonal ao monoclinico foi consistente com a tendência da diminuição da simetria, o que poderia ser explicado em termos das estruturas geométricas e estruturas eletrônicas para ambos os polimorfos.

A influência do surfactante polivinil pirrolidona (PVP) e de citrato trissódico na transformação de morfologias de Ag foi estudado por Tsuji et al.¹⁶⁶ em 2012. Neste estudo, foi avaliado a modificação rápida da morfologia da Ag, passando de nanopartículas esféricas, nanobastões, cubos ou bipirâmides para prismas triangulares. Para isso, várias morfologias de Ag em escala nanométrica foram sintetizadas e caracterizadas através de UV-Vis. Os resultados mostram que os prismas puderam ser preparados sem adição de surfactante PVP, embora seja útil sintetizar prismas com tamanhos menores do que os obtidos. Um novo papel importante do citrato foi encontrado neste estudo, além de um papel conhecido como agente de proteção de facetas [111], é um agente que facilita o ataque oxidativo seletivo de nanopartículas de Ag por H_2O_2 . Os dados deste estudo fornecem informações úteis para a síntese controlada de tamanhos de prismas de Ag triangulares, a partir de várias nanoestruturas de Ag e utilizando um método de redução química, tendo bandas de ressonância plasmônica de superfície (SPR) a um comprimento de onda desejado.

Singh et al.¹⁵² em 2012 afirmaram que os microbastões de molibdato de prata são orientados em estruturas de tamanho micrométrico, semelhantes a flor, e em suas investigações indicaram que, através de um processo hidrotermal simples, a produção em grande escala dessa estrutura foi possível. Na síntese, os autores utilizaram soluções de molibdato de amônio e nitrato de prata como precursores, e comprovaram que as arquiteturas dos cristais sintetizados dependiam do pH do material precursor de partida. Para a compreensão da formação e desorganização da morfologia florística, foram realizados vários experimentos controlados por pH (3, 4, 5, 6, 7 e 8) e sua influência na estrutura / microestrutura dos materiais sintetizados. Estudos de microscopia eletrônica de varredura

revelaram que a morfologia e microestrutura dos produtos variaram significativamente alterando os valores de pH de 3 a 8 durante a mistura dos reagentes; pH = 3 e 4 resultaram na organização de microbastões de $\text{Ag}_2(\text{Mo}_2\text{O}_7)$ em estruturas *broom-like*, enquanto que pH = 5 resultou na morfologia semelhante a uma flor (*flower-like*) de fase mista de $\text{Ag}_2\text{Mo}_2\text{O}_7$ monoclinico e triclinico. Verificou-se também que o aumento do pH após um certo valor limiar (por exemplo, pH > 6) resultou em colapso e desorganização total da morfologia *flower-like*. O aumento adicional do pH para 7 e 8 resultou na formação de micropartículas de Ag_2MoO_4 . Foi proposto um esquema explicativo baseado na evolução da organização estrutural baseada no pH para explicar a formação das heteroestruturas observadas.

Arora et al.¹² em 2012 estudaram o comportamento da fase de espinélio cúbico de Ag_2MoO_4 em alta pressão usando difração de raios X e espectroscopia Raman. O Ag_2MoO_4 foi sintetizado utilizando solução de amônia a 25% e foi realizado tratamento térmico a 300°C durante 5h. Após a síntese, os cristais foram submetidos à variação de pressão e avaliados. Verificou-se que o composto exibiu uma transição de fase em torno de 5 GPa para uma estrutura tetragonal e foi observado que as duas fases coexistem numa gama de pressões. Os espectros Raman exibiram mudanças dramáticas ao longo da transição de fase. O aumento da dispersão de fundo de raios X e o alargamento dos picos de Raman associados aos íons tetraédricos de MoO_4 na fase de alta pressão sugerem a evolução do distúrbio posicional. No entanto, não houve indícios de amorfização induzida pela pressão até 47 GPa.

No ano de 2012, Cavalcante et al.³⁰ relataram a síntese de microcristais de tungstato de prata por diferentes métodos (sonoquímico, co-precipitação e hidrotermal convencional) e estudaram sua estrutura química e propriedades fotoluminescentes através de DRX, refinamento de Rietveld, FTIR, espectroscopia de alta resolução da borda de absorção (XANES) e espectroscopia EXAFS. A morfologia e o tamanho médio dos microcristais sintetizados foram observados por microscopia eletrônica de varredura, e as propriedades ópticas foram investigadas através de UV-Vis e mensurações de fotoluminescência. Os padrões de DRX e refinamento de Rietveld indicaram que todos os microcristais sintetizados possuíam uma estrutura ortorrômbica, sem fases secundárias ou deletérias, com presença de grupo espacial $Pn2n$. Os picos acentuados e bem definidos indicam organização estrutural e cristalinidade a longo alcance. Entretanto, este método não é indicado para observação da presença de partículas de Ag no material. Os espectros de FTIR exibiram quatro modos ativos de 250 a 1000 cm^{-1} . Os espectros de XANES demonstraram que os cristais apresentaram “clusters” octaédricos distorcidos [WO_6] na rede, enquanto as análises EXAFS confirmaram que os átomos de W são coordenados por seis átomos de O. As imagens de MEV-EC

sugeriram que os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crescem por agregação, e foram observados cristais alongados e aglomerados de vários tamanhos. Foi observado também que as propriedades de PL dos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ diminuem com um aumento nos valores do intervalo de banda óptica (3,19-3,23 eV). Por fim, os autores observaram que os cristais preparados pelo método sonoquímico exibiam uma intensidade de emissão de PL maior em relação aos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ preparados pelos métodos da co-precipitação e hidrotérmico convencional, comprovando a teoria que diferentes rotas de síntese produzem materiais com diferentes propriedades.

Em 2013, foi relatado pela primeira vez na literatura por Longo et al.¹⁰⁵, a nucleação (crescimento) in situ e em tempo real de nanofilamentos Ag em cristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. Esse fenômeno foi observado após o material ser submetido à análise em microscópio eletrônico, e o crescimento foi movido pelos feixes de elétrons acelerados do próprio microscópio eletrônico, sob alto vácuo. Após essa descoberta, os autores utilizaram várias técnicas para caracterizar o material, como DRX, MEV e MET comum e de alta definição. Além das caracterizações estruturais, os autores realizaram cálculos teóricos para determinação da estrutura eletrônica molecular. Através das caracterizações por microscopia, foi identificado que o crescimento dos nanofilamentos de Ag ocorre no exato local onde o feixe de elétrons é incidido, além disso, o crescimento ocorre mais rapidamente em microscópio de transmissão, em comparação ao microscópio de varredura, devido à maior dosagem e maior energia dos elétrons que atingem a amostra. Análise de DRX foi realizada em diversos locais do nanofilamento nucleado, e comprovou que a região do nanofilamento mais próxima da amostra possui pouca quantidade de Ag e grande quantidade de tungstênio, e na extremidade foi observado o inverso: grande quantidade de Ag. Análise de EDX constatou que o filamento é composto em sua maioria por Ag, com pequena quantidade de W e O. Os resultados teóricos demonstraram que os “clusters” $[\text{AgO}_4]$ são os mais carregados positivamente, enquanto que os “clusters” $[\text{AgO}_2]$ são os mais carregados negativamente. Portanto, é possível que a absorção de elétrons ocorra no “cluster” $[\text{AgO}_4]$ e permita a nucleação dos nanofilamentos de Ag.

Fodjo et al.⁶⁵ sintetizaram, em 2013, nanopartículas de prata suportadas em nanomateriais de óxidos de molibdênio. O material $\text{Ag}_x\text{Mo}_y\text{O}_z$ foi sintetizado através de duas rotas diferentes, sendo a primeira síntese aquecida a 80°C e adicionado glicose à mistura, e a segunda síntese foi adicionado etanol, e a reação foi realizada em temperatura ambiente durante 5h. Após as sínteses, ambos os precipitados resultantes foram lavados sucessivas vezes com acetona e secos em forno, a 80°C durante 20h. Separadamente, foram sintetizadas

nanopartículas de Ag e Ag_2MoO_4 . A partir dessas duas rotas de síntese, os autores variaram alguns parâmetros, como temperatura, pH, tempo de reação, quantidade de glicose utilizada na síntese. Seguidamente às sínteses, foi realizado o preparo de discos de silício revestidos com Ag/ $\text{Ag}_x\text{Mo}_y\text{O}_z$ e também amostras para medições de Raman intensificadas pela superfície (SERS, sigla em inglês). A morfologia e o tamanho dos produtos obtidos foram analisados através de MEV e MET, e a estrutura cristalina foi caracterizada por DRX. Foram realizadas também mensurações de UV-Vis e Raman. Para os cristais $\text{Ag}_x\text{Mo}_y\text{O}_z$ sintetizados com glicose, foi observado que conforme houve aumento da temperatura na análise, apareceram novos picos Raman (277 , 811 e 985 cm^{-1}), e desapareceram outros (595 cm^{-1}). Em relação à presença de glicose, foi observado que ela pode evitar a formação de fases complexas, proporcionando nucleação e crescimento dos cristais, e inibindo a reação direta de Ag_2O com os demais óxidos. Com a variação de pH, houve uma modificação dos espectros de Raman e UV-Vis obtidos, que está relacionada com a formação de óxidos binários de molibdato de prata. Adicionalmente, a análise de SERS realizada utilizando discos de Si revestidos com Ag / Ag_2MoO_4 apresentaram excelente estabilidade e sensibilidade para a detecção de moléculas em matrizes complexas, o que é uma característica importante para a concepção de sensores em áreas como proteção e indústria química, bem como produtos farmacêuticos.

Li et al.¹⁰⁰, em 2013, obtiveram o composto Ag- Ag_2MoO_4 de morfologia cúbica na presença de PVP através de processo hidrotermal assistido por micro-ondas, seguido de tratamento térmico a 180°C , e estudaram suas propriedades através de DRX, MEV, EDX, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e UV-Vis. Também foram realizadas mensurações da atividade fotocatalítica de rodamina pelo material através de reator fotoquímico XPA, e detecção de radicais hidroxila foi realizada através da aplicação de uma sonda molecular. O estudo do seu desempenho fotocatalítico na decomposição de rodamina indicou que o composto Ag- Ag_2MoO_4 de morfologia cúbica exibiu boas atividades catalíticas sob irradiação com luz visível. A absorção da luz visível pode ser atribuída à ressonância plasmônica de superfície. Além disso, a caracterização com DRX confirmou que os íons de prata Ag^+ foram parcialmente reduzidos em Ag metálica. A temperatura de reação, o tempo e a quantidade de PVP também foram estudados e descobriu-se que desempenha papéis cruciais na formação de microestruturas cúbicas, sendo então, possível controlar a morfologia através da variação dos parâmetros estudados.

Foi realizada, em 2014, por Beltrán et al.²⁰ uma investigação sistemática de primeiros princípios (cálculos teóricos) usando o formalismo funcional de densidade com a

aproximação B3LYP para calcular propriedades estruturais e eletrônicas, bem como transições de fase sob pressão de molibdato de prata (Ag_2MoO_4). Foram consideradas cinco fases: Ag_2MoO_4 tetragonal (com estruturas P4122 normais e inversas), $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ (estrutura espinélica cúbica), olivina (estrutura ortorrômbica) e $\alpha\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ (estrutura tetragonal de tipo K_2NiF_4). Foram realizados ensaios numéricos e analíticos para determinar a geometria da célula unitária de equilíbrio e parâmetros de equação de estado para todas as estruturas e compostos envolvidos no diagrama de fases. Foram investigadas as dependências de pressão das estruturas das bandas, das lacunas de energia, da densidade de estados (DOS) e das frequências vibracionais. Os resultados teóricos mostram que o Ag_2MoO_4 inverso com a simetria P4122 é mais estável acima de 15 GPa do que a estrutura normal em espinélio, enquanto a estrutura tetragonal é ligeiramente mais estável do que a representação cúbica acima de 6 GPa, devido a uma distorção tetragonal. Foi realizada também a determinação da estabilidade contra a decomposição de Ag_2MoO_4 em direção a óxidos binários (MoO_2 , MoO_3 , Ag_2O , AgO e Ag_2O_3), metal (Ag e Mo), oxigênio e $\text{Ag}_2\text{Mo}_2\text{O}_7$. Os resultados teóricos indicam que $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ pode decompor em $\text{Ag}_2\text{Mo}_2\text{O}_7$ e Ag_2O a 12 GPa. Os autores afirmaram que as propriedades do estado fundamental para $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ estavam em bom acordo com dados experimentais e outros resultados teóricos já publicados na literatura.

Uma correlação entre cálculos teóricos e dados experimentais para explicar a estrutura eletrônica e as propriedades ópticas dos microcristais de molibdato de prata ($\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$) sintetizados pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas foi realizado por Gouveia et al.⁷¹ em 2014. Após a síntese, onde se variou a temperatura em que os cristais eram obtidos (100, 120, 140 e 160°C) os microcristais foram caracterizados através de DRX, refinamento de Rietveld e espectroscopia micro-Raman, além de MEV, UV-Vis e medidas de fotoluminescência. A difração de raios X, o refinamento de Rietveld e a espectroscopia de micro-Raman confirmaram que esses microcristais cristalizam em uma estrutura cúbica tipo espinélio. As imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de efeito de campo revelaram que as temperaturas de processamento influenciam na forma final dos microcristais; microcristais obtidos a 100°C se agregaram aleatoriamente, e a morfologia foi irregular; quando foram obtidos a 120 e 160°C possuíam morfologia bem definida, em forma de cubos. As propriedades ópticas foram analisadas por espectroscopia de reflectância difusa ultravioleta-visível; o aumento da energia do gap de banda óptica (E_{gap}) (de 3,24 a 3,31 eV) com a temperatura de processamento está associado à redução dos níveis de energia intermediária. Foram conduzidos cálculos quânticos de primeiro princípio baseados na teoria funcional da densidade ao nível de B3LYP. A estrutura de banda calculada revelou um E_{gap}

indireto de aproximadamente 4,00 e 3,34 eV para o β - Ag_2MoO_4 sem e com a formação de defeitos, respectivamente. Cálculos teóricos baseados na densidade de estados e mapas de densidade eletrônica foram empregados para entender o fenômeno de polarização induzido por defeitos estruturais nos cristais de β - Ag_2MoO_4 . Em relação às propriedades de fotoluminescência, os cristais se apresentaram diferentes entre si, diferenças atribuídas ao fenômeno da ordem-desordem causado por grupos tetraédricos $[\text{MoO}_4]$ na estrutura β - Ag_2MoO_4 , bem como alterações morfológicas induzidas pelo processamento de temperatura no sistema MAH.

Em 2014, de Santana et al.⁵¹ investigaram as características de microcristais de Ag_2MoO_4 e Ag_2WO_4 . Dessa maneira, os nanomateriais de molibdato de prata e tungstato de prata foram preparados utilizando dois métodos de síntese, sendo síntese hidrotérmica assistida por micro-ondas (MAH), com pH controlado (pH 7) e temperatura em 140°C , e co-precipitação também com pH controlado (pH 4), e temperatura a 70°C . Na síntese assistida por micro-ondas para o tungstato, os precursores foram misturados em 50 mL de água deionizada e levados a micro-ondas durante 1h (2,45 GHz; 800 W), o precipitado foi lavado diversas vezes e seco. Para o molibdato, foi feito o mesmo procedimento acima, porém em segunda etapa, foi adicionado 0,2 g de tungstato em 50 mL de água destilada, e 25 mL de molibdato de sódio e 25 mL de nitrato de prata. Os cristais foram denominados W-htmw, Mo-htmw e W/Mo-htmw para os cristais de tungstato decorados com molibdato. Mais dois cristais foram sintetizados pelo método da co-precipitação simples, e foram denominados Mo/W-70 para os cristais de molibdato decorados com tungstato, e W/Mo-70 os cristais de tungstato decorados com molibdato. A forma e o tamanho dos microcristais foram observados por microscopia eletrônica de varredura por emissão de efeito de campo, e foram observadas diferentes morfologias, sendo que o método de síntese produziu morfologias bem diferentes entre si. Os pós foram caracterizados por DRX e UV-Vis (reflectância difusa e fotoluminescência). Os padrões de DRX mostraram que as amostras de Ag_2MoO_4 obtidas pelos dois métodos eram monofásicas e pertenciam à estrutura de α - Ag_2MoO_4 (tipo espinélio). Em contraste, os Ag_2WO_4 obtidos nas duas sínteses foram estruturalmente diferentes: o sintetizado em micro-ondas exibiu a estrutura estável tetraédrica conhecida β - Ag_2WO_4 , enquanto que a co-precipitação proporcionou o alótropo meta- β - Ag_2WO_4 , coexistindo com uma fraca quantidade da α -. O gap óptico de β - Ag_2WO_4 (3,3 eV) foi avaliado pela primeira vez. Em contraste com β - Ag_2MoO_4 / β - Ag_2WO_4 , os cristais α - Ag_2WO_4 / β - Ag_2MoO_4 exibiram fotoluminescência fortemente aumentada na banda de baixa energia (650 nm), fato explicado pela criação de uma grande densidade de defeitos locais (distorções)

nos “*clusters*” na interface entre os dois cristais, devido à presença de dois tipos diferentes de poliedros MO_x nas duas estruturas.

Um estudo experimental e teórico combinado conduzido por Longo et al.¹⁰⁶ em 2014 sobre a estrutura e as propriedades eletrônicas de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ teve a finalidade de esclarecer os processos de nucleação e crescimento de filamentos de Ag em cristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ induzidos por irradiação por feixe de elétrons sob microscopia eletrônica. Para as análises, os microcristais de Ag_2WO_4 foram sintetizados através da síntese hidrotérmica assistida por micro-ondas, em diferentes temperaturas (100, 120, 140 e 160°C) e caracterizados através de DRX, refinamento Rietveld, espectroscopia Raman de alta resolução e espectroscopia FTIR, além de cálculos teóricos. A morfologia dos cristais foi observada através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, para entendimento das propriedades ópticas do material, os autores realizaram análises de fotoluminescência em temperatura ambiente. Os espectros de DRX revelaram que o microcristal possui estrutura ortorrômbica sem fases deletérias; resultados que foram corroborados pelo refinamento Rietveld. A espectroscopia Raman demonstrou 17 sítios vibracionais ativos típicos, indicando alto grau de ordem estrutural a curto alcance da rede para as amostras, com exceção da amostra sintetizada a 100°C, que não apresentou picos bem definidos, indicativo de desordem estrutural. Espectroscopia FTIR indicou que o método empregado na síntese de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ causou um congelamento dos “*clusters*” distorcidos $[\text{WO}_6]$ e $[\text{AgO}_y]$ ($y = 2, 4, 6$ e 7), que são poliedros constituintes do microcristal. Assim, com base nos resultados teóricos e experimentais, os autores descreveram a relação entre a desordem, crescimento de nucleação, taxa de formação de Ag e comportamento de fotoluminescência antes e depois da irradiação por elétrons acelerados. Os cálculos teóricos indicaram mudanças significativas na ordem da estrutura inicial de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, com uma diminuição no valor do gap de 3,55 para 2,72 eV. As medições de fotoluminescência demonstraram que nenhum deslocamento da banda azul foi observado, indicando que os aglomerados de $[\text{WO}_6]$ permaneceram inalterados pela irradiação. Porém, na região de emissão de luz vermelha foram constatados modificações, que foram atribuídas aos “*clusters*” instáveis $[\text{AgO}_y]$, que se tornaram desordenados após a irradiação e crescimento dos filamentos. A partir desses resultados, os autores sugeriram que essas diferenças estruturais poderiam modificar várias características do material, incluindo atividade antimicrobiana e fotodegradação. Assim, concluíram que o aglomerado $[\text{AgO}_2]$ sofre excitação eletrônica com a irradiação por elétrons, e permite o crescimento dos nanofilamentos na superfície do cristal.

Andrés et al.⁷ em 2014 utilizaram uma combinação de estudos teóricos, computacionais e experimentais para entender os eventos iniciais relacionados à nucleação dos nanofilamentos de Ag em cristais de α -Ag₂WO₄, que é movido por um feixe de elétrons acelerado de um microscópio eletrônico sob alto vácuo. O processo de crescimento e a composição química e distribuição elementar nesses filamentos foram analisados em profundidade ao nível nanoescalar usando TEM com detector anular de campo escuro de alto ângulo (HAADF), EDX e XPS; os aspectos estruturais e eletrônicos foram sistematicamente estudados pela teoria quântica de um átomo em uma molécula (QTAIM). Todos os picos de difração de raios-X das amostras refletem um padrão ortorrômbico, sem qualquer fase deletéria e com um grupo espacial $Pn2n$ e uma simetria, valores que estão de acordo com cartão indexado número ICDS 416510. Análise de EDX demonstrou que os nanofilamentos são compostos basicamente por Ag, contudo foram identificados Ag, W e O nas regiões do nanofilamento mais próximas da estrutura de α -Ag₂WO₄. Estudos teóricos demonstraram que no “cluster” [AgO₂], a distância Ag-O aumenta de 2,15 a 2,75 Å. No “cluster” [AgO₄] duas distâncias diferentes são observadas: um par exibe comportamento semelhante as ligações no “cluster” [AgO₂] e possui um ângulo O-Ag-O de aproximadamente 170°; e o outro par tem um ângulo O-Ag-O de aproximadamente 108° e uma distância Ag-O mais longa, o que indica que os átomos se separam quando os elétrons foram incididos sobre o material. Resultados experimentais e teóricos mostram que esse comportamento está associado a mudanças estruturais e eletrônicas dos “clusters” [AgO₂] e [AgO₄] e, em menor extensão, ao agrupamento [WO₆]. Esses “clusters” representam coletivamente os blocos constitutivos de α -Ag₂WO₄.

O α -Ag₂WO₄ (AWO) também foi estudado por Lin et al.¹⁰² em 2015, devido à sua grande capacidade de degradação de poluentes orgânicos, quando excitado por luz ultravioleta. Embora o AWO apresente essa excelente propriedade sob luz UV, devido seu intervalo de banda ser teoricamente calculado como 3,55 eV, isso resulta em reação lenta à luz visível. Essa característica UV-dependente dificulta sua utilização como degradante. Dessa maneira, os autores fizeram uma reconstrução eletrônica do AWO, através de modificações no cristal após serem submetidos ao tratamento com laser pulsado, com as amostras em líquido. Após o tratamento, os cristais foram submetidos à análise em MEV, e foi observado que os cristais irradiados se apresentaram mais regulares e uniformes, mas a morfologia de ambos era semelhante (bastões). Foi observado também que os cristais não-irradiados se aglomeraram sem orientação definida, diferentemente dos cristais irradiados, que não se agregaram, além disso, a superfície das facetas do cristal não-irradiado apresentou

algumas protuberâncias, diferentemente do cristal irradiado, que possuía facetas mais suaves. Análise de EDX demonstrou que ambas as amostras apresentam os componentes Ag, W e O, porém na amostra irradiada, essa distribuição é mais uniforme do que a não-irradiada. Devido à energia de ligação fraca do AWO e ao processo de equilíbrio termodinâmico criado pela irradiação com laser em líquido, são introduzidas distorções de abundantes nos “clusters”, especialmente distorções do “cluster” $[WO_6]$. Na rede estrutural cristalina, a densidade de defeitos aumenta num fator de 2,75, e os níveis de energia intermediários irregulares são inseridos no intervalo de banda, resultando em uma diminuição de 0,44 eV do hiato de banda, o que modificou o próprio AWO por reconstrução eletrônica para ser sensível à luz visível. Além disso, cálculos teóricos foram realizados para esclarecer a reconstrução eletrônica de AWO, e os resultados confirmaram a dedução obtida através dos ensaios experimentais.

Um estudo combinado experimental e teórico foi apresentado por Andrés et al.⁸ em 2015, onde observaram e explicaram, pela primeira vez na literatura, os mecanismos envolvidos no processo de nucleação e evolução do crescimento de filamentos de Ag em cristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$, impulsionada por um feixe de elétrons acelerado de um microscópio eletrônico sob alto vácuo. O processo de crescimento, a composição química e a distribuição de elementos nestes filamentos foram analisados em profundidade de nanoescala, utilizando MEV-EC e MET com EDX. Para complementar os resultados experimentais, a estabilidade química, os aspectos estruturais e eletrônicos foram estudados sistematicamente usando a teoria da estrutura eletrônica QTAIM. A nucleação e formação de Ag em $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ são o resultado de mudanças estruturais e eletrônicas do aglomerado tetraédrico AgO_4 , que são componentes constituintes de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$, consistente com a formação de metais Ag. A formação do filamento Ag transforma o semiconductor $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ do tipo *n* para tipo *p*, e essas transformações acontecem concomitantemente com o aparecimento de defeitos de Ag.

Fabbro et al.⁶¹ em 2015 apresentaram um estudo teórico e experimental combinado sobre os aspectos morfológicos, estruturais e as propriedades ópticas dos microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$, onde as amostras de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ foram preparadas pelo método de coprecipitação. A nucleação e formação de nanopartículas de Ag na superfície dos microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ durante a irradiação com feixe de elétrons também foi analisada. Esses eventos foram monitorados diretamente em tempo real utilizando MEV-EC. A forma de equilíbrio termodinâmico dos cristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ foi construída com superfícies (001), (011) e (111) através da construção teórica de Wulff. Esta forma sugere que a face (011) é a superfície dominante na morfologia ideal. Um aumento significativo nos valores da energia de superfície para a face (011) em relação aos valores das outras superfícies foi observado, e os

autores demonstraram que houve concordância entre os achados experimental e as diferentes morfologias. Eles apontam que a importância do estudo foi fornecer informações de como a morfologia do cristal pode ser controlada, de modo que a superfície química possa ser ajustada para aplicações específicas. A presença de desordem nos “clusters” tetraédricos [MoO₄] e octaédrico [AgO₆] dos microcristais foi utilizada para explicar teoricamente os dados encontrados nos experimentos de fotoluminescência. Além disso, os valores teóricos e experimentais para parâmetros e frequências vibracionais de Raman estavam em acordo, e estes resultados podem ser úteis para a concepção e construção de novas nanoestruturas com facetas específicas expostas, que podem servir para aplicações relacionadas à superfície, tais como sensores de gás, dispositivos ópticos e catalisadores.

2.2 Estudos Sobre Atividade Antimicrobiana e Mecanismos De Ação de Óxidos Bimetálicos

A susceptibilidade da bactéria *Escherichia coli* a íons de prata foi estudada por Zhao et al.¹⁹⁹ em 1998. Foram estudadas a concentração inibitória inicial, concentração bactericida mínima, concentração tolerante máxima e o tempo de morte da bactéria na presença dos íons de Ag. A uma concentração de 9,45 µM e um de inóculo de 10 UFC/ mL, a prata causou atraso de crescimento de *E. coli*; a uma concentração de 18,90 µM, a prata inibiu completamente o crescimento bacteriano. Os efeitos de contato prolongados variaram entre 1,5 e 12 h a 0,75 x a concentração inibitória inicial, 1,0 x a concentração inibitória inicial e 1,5 x a concentração inibitória inicial do íon prata. Uma unidade logarítmica do tamanho da população bacteriana viável foi perdida a cada 30 min na concentração bactericida mínima do íon de prata em contato com a bactéria. A tolerância de prata foi determinada como 20 vezes a concentração inibitória inicial com 48 h de exposição. Este estudo apresentou um modelo avaliativo como referência para a análise quantitativa da susceptibilidade de bactérias a íons de prata.

A descoberta da superóxido dismutase (CuZnSOD) dentro dos periplasmas de vários patógenos Gram-negativos sugere que esta enzima evoluiu para proteger os microrganismos de fontes exógenas de superóxido, tais como a explosão oxidativa dos fagócitos. No entanto, sua presença em algumas bactérias não patogênicas implica que pode haver um papel para a SOD durante o crescimento normal das bactérias. Foi elucidado por Gort et al.⁷⁰ em 1999 que a SOD defende as biomoléculas contidas dentro da membrana plasmática contra as espécies reativas contidas no interior da célula, que não conseguem atravessar a membrana. Também

foi descoberto que o gene que codifica a SOD (sodC) de *E. coli* é reprimido quando o microrganismo entra em fase estacionária de crescimento, ou seja, quando se encontram nessa fase, a bactéria apresenta um período de sensibilidade aguda ao peróxido de hidrogênio.

Em 2000, Cabisco et al.²⁸ realizaram uma revisão de literatura sobre estresse oxidativo em bactérias e danos proteicos provenientes de espécies reativas de oxigênio e revelaram que quando as proteínas são expostas a espécies reativas de oxigênio, ocorrem modificações de aminoácidos, que levam a mudanças funcionais e perturbam o metabolismo celular. As proteínas localizadas no citosol evoluíram para manter o equilíbrio celular, uma vez que quando ocorrem desequilíbrios e aumento da concentração de espécies reativas intracelulares, há uma restauração automática da homeostase normal e eliminação das espécies reativas através da membrana celular. Quando a célula não consegue neutralizar todas as espécies reativas de oxigênio, estas interagem com os lipídios, DNA, RNA e proteínas, causando severos danos nas funções celulares, inviabilizando sua sobrevivência.

Com a finalidade de determinar a atividade bactericida do zeólito de prata contra *Escherichia coli*, Matsumura et al.¹¹⁶ em 2003 testaram o material, que é disponível comercialmente, em concentrações que variavam entre 10 e 100 mg/L e compararam com diferentes concentrações de nitrato de prata, entre 0,5 a 5,0 µM. Além disso, a influência de diversos componentes adicionados aos agentes antimicrobianos também foi testada. O microrganismo utilizado foi *E. coli* OW6, CSH7 e uma cepa mutante (deficiente em catalase UM1). As células foram cultivadas até a fase mid-log do crescimento, a 37°C. Após padronização da quantidade de células por mililitro (aproximadamente 2×10^7 células/mL), estas foram submetidas aos tratamentos propostos e incubadas a 37°C. Após o tratamento, as células foram submetidas à plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias para numeração dos microrganismos viáveis e o conteúdo de íons de prata foi mensurado através de espectrofotômetro de absorção atômica polarizado. Foi também mensurado o teor de prata livre na suspensão e o teor de prata total dentro das células dos microrganismos, através de incubação destas em ácido nítrico 8 N a 80 °C durante 1h. O zeólito de prata a 100 mg/mL reduziu notavelmente o número de células de *E. coli*, e a atividade bactericida do nitrato de prata a 1 µM foi semelhante a essa concentração do zeólito de prata. Porém, a atividade do zeólito de prata foi inibida pela adição de L-cisteína, L-metionina, L-histidina, L-triptofano, albumina de soro bovino e extrato de levedura, mas não por glicina, L-alanina, L-leucina ou L-fenilalanina. Em contrapartida, os quelantes de íons ferroso (o-fenantrolina e 2,2'-dipiridilo) aumentaram fortemente a atividade antimicrobiana. Para o nitrato de prata, L-cisteína, L-histidina e manganês, magnésio e íons ferrosos inibiram sua atividade. O 2,2'-

dipiridilo, como no caso da zeólito de prata, intensificou fortemente a atividade bactericida, ao passo que a o-fenantrolina não o fez. O fato de as propriedades inibitórias das substâncias testadas serem semelhantes entre o zeólito de prata e o nitrato de prata, exceto em alguns casos, sugere que o íon de prata ligado à matriz de zeólito está envolvido em sua ação bactericida.

Devido o aumento de novas cepas resistentes de bactérias aos antibióticos mais potentes utilizados, Morones et al.¹²³ em 2005 estudaram o efeito de nanopartículas de prata na faixa de 1-100 nm em bactérias Gram-negativas, usando MET e HAADF. Para isso, as nanopartículas foram sintetizadas e testadas nas concentrações 0, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, com os microrganismos *E. coli*, *V. cholera*, *P. aeruginosa* e *S. typhus*. Os microrganismos permaneceram em contato com as nanopartículas durante 30 minutos, e seguidamente foram analisados. As nanopartículas de prata utilizadas neste trabalho exibiram uma ampla faixa de tamanho, distribuição e morfologias, com facetas (111) altamente reativas. Foi identificado que as nanopartículas de prata atuam principalmente de três maneiras contra bactérias Gram-negativas: (1) nanopartículas (principalmente na faixa de 1-10 nm) aderem a superfície da membrana celular e perturbam sua função adequada, como permeabilidade e respiração; (2) elas são capazes de penetrar dentro das bactérias e causar danos, possivelmente interagindo com compostos contendo enxofre e fósforo (compostos tais como DNA); (3) nanopartículas são capazes de liberar íons de prata, que contribuem adicionalmente com seu efeito bactericida.

As ações bactericidas de íons de prata em *Escherichia coli* também foram estudadas por Yamanaka et al.¹⁹⁰ em 2005. Solução aquosa com concentração de íons de prata de 900 ppb foi preparada eletroliticamente pela aplicação de uma corrente de 12,5 mA durante 28 segundos, através de duas placas de eletrodos instalados dentro do recipiente onde foi preparada a solução. Microrganismo *E. coli* NBCR-3972 foi padronizado em 10^7 a 10^8 UFC/mL, e 10 mL desse inóculo foi incubado com 90 mL da solução de íons durante 30 min, 3h e 24h, e após a incubação, foi feito o plaqueamento dessas soluções para determinação das células viáveis, através de contagem de UFC/mL. A interação do microrganismo com os íons foi estudada utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão por filtração de energia (EFTEM), eletroforese bidimensional (2-DE) e ionização de dessorção por laser assistida por matriz (MALD). As observações de EFTEM demonstraram que o íon de prata se infiltra rapidamente no interior de *E. coli*, ao contrário da hipótese anteriormente aceita, de que os íons residiam inicialmente na área da membrana celular. Além disso, o 2-DE e o MALD indicaram que a expressão de uma proteína de subunidade ribossomal bem como a de

algumas outras enzimas e proteínas são afetadas pelos íons de prata. Os autores demonstraram que uma das principais ações bactericidas dos íons de prata é a sua interação com o ribossoma e a consequente inibição na expressão das enzimas e proteínas essenciais para a produção de ATP nas células bacterianas.

Stark ¹⁵⁵ em 2005 realizou uma revisão da literatura elucidando sobre as consequências funcionais de danos em membrana causados por danos oxidativos. A interação de espécies reativas de oxigênio com membranas biológicas é conhecida por produzir uma grande variedade de diferentes modificações funcionais. Parte dessas modificações pode ser classificada como efeitos diretos. Eles são devido à interação direta das espécies reativas com os componentes moleculares, com uma subsequente modificação química e funcional dessas moléculas. No entanto, uma parte importante das modificações funcionais observadas são efeitos indiretos. São a consequência de uma modificação oxidativa do ambiente de macromoléculas biológicas. A peroxidação lipídica através da sua geração de produtos quimicamente reativos contribui para a perda de funções celulares através da inativação de enzimas de membrana e mesmo de proteínas citoplasmáticas (isto é, solúveis em água). A oxidação de lipídios de membrana pode, no entanto, também aumentar a eficiência das funções de membrana. Isto foi observado para uma série de sistemas de transporte. A peroxidação lipídica foi acompanhada pela ativação de certos tipos de canais iônicos e portadores de íons. O efeito é devido a um aumento da polaridade do interior da membrana por acúmulo de produtos polares provenientes dos processos de oxidação. A mudança concomitante da constante dielétrica, que pode ser detectada através do aumento da capacitância da membrana, facilita a abertura de canais e reduz sua barreira interna para o movimento de íons através da membrana. Porém, o efeito predominante da peroxidação lipídica é a inibição das funções da membrana, que contribui para a despolarização de seu potencial, destrói suas propriedades de barreira e pode finalmente conduzir, através de um aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático, à morte celular. As conclusões foram derivadas de artigos que realizaram experimentos com diferentes sistemas: sistemas modelo em membranas lipídicas planares, canais iônicos nativos reconstituídos em membranas lipídicas ou investigados em seu ambiente natural.

Lok et al.¹⁰⁴ em 2006 sintetizaram partículas esféricas nanométricas de Ag (diâmetro médio = 9,3 nm) utilizando um método de redução de boro-hidreto e o mecanismo de sua ação antibacteriana contra *E. coli* foi investigado por abordagens proteômicas (identificação 2-DE e espectroscopia de massa MS) paralelamente a análises envolvendo soluções de íons Ag^+ . Os dados proteômicos revelaram que uma exposição durante curto tempo de células de

E. coli a concentrações antibacterianas de nano-Ag resultou em acúmulo de precursores de proteínas de envelope, indicativo da dissipação da força próton-motora da membrana. Consistente com esses achados proteômicos foi identificado que as nano-Ag desestabilizaram a membrana externa, causando colapso do potencial da membrana plasmática e esgotamento dos níveis de ATP intracelular. Verificou-se também que o mecanismo de ação das nano-Ag foi semelhante ao dos íons de Ag⁺. Entretanto, as concentrações efetivas dos íons nano-Ag e Ag⁺ estavam nos níveis nanomolar e micromolar, respectivamente. Os autores concluíram que as nanopartículas de Ag são um eficiente sistema físico-químico que possui eficiência antibacteriana desejável.

Pal et al.¹²⁹ em 2007 investigaram as propriedades antibacterianas de nanopartículas de prata com diferentes morfologias contra bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, tanto em sistemas líquidos como em placas de ágar. Foram sintetizadas nanopartículas de prata de diferentes morfologias por síntese de fase de solução, e suas interações com *E. coli* foram estudadas. As imagens de microscopia eletrônica revelaram alterações consideráveis nas membranas celulares após o tratamento com as AgNPs, resultando na morte celular. Nanoplaquetas de prata triangulares com plano (111) apresentaram a maior ação antibacteriana, em comparação com nanopartículas esféricas e em forma de bastonete. Propõe-se que o tamanho da nanoescala e a presença do plano (111) em combinação promovem a maior efetividade contra *E. coli*. Os autores concluíram, com base nos dados obtidos experimentalmente, que as AgNPs apresentam uma interação dependente da morfologia com as células de *E. coli*.

O objetivo do trabalho de Choi e Hu³⁸ de 2008 foi determinar a relação entre tamanho das nanopartículas e inibição microbiana e avaliar a relação entre a inibição e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As nanopartículas com um intervalo de tamanho médio de 9-21 nm foram sintetizadas variando as razões molares de BH₄ / Ag⁺ na solução. A produção de ROS resultante foi quantificada na presença e na ausência das bactérias nitrificantes, enquanto o grau de inibição foi inferido a partir de medições específicas da taxa de absorção de oxigênio, determinadas por respiração contínua. Ao examinar a correlação entre a distribuição de tamanhos de nanopartículas, geração de ROS fotocatalítica, acúmulo de ROS intracelular e inibição de nitrificação, foi observado que a inibição de organismos nitrificantes correlacionou-se com a fração de nanopartículas de Ag menor que 5 nm na suspensão. Aparentemente as nanopartículas com esse tamanho poderiam ser mais tóxicas para as bactérias do que qualquer outra partícula. Além disso, a inibição por nanopartículas de Ag, bem como outras formas de prata (colóide AgCl e íons Ag⁺) correlacionaram-se bem com

as concentrações intracelulares de ROS, mas não com as frações fotocatalíticas de ROS. As correlações de ROS foram diferentes para as variadas formas de prata, indicando que outros fatores além de ROS também são importantes na determinação da toxicidade das nanopartículas de Ag para microrganismos.

A atividade antifúngica de NPs preparadas pelo processo de Tollens modificado foi avaliada contra *Candida* spp, por Panacek et al.¹³⁰ em 2009. Na síntese, foram empregados os seguintes estabilizantes e surfactantes: dodecil sulfato de sódio, monooleato de polioxietileno sorbitano, éter laurílico de polioxietileno, polioxietileno cetil éter, éter polioxietileno oleílico, e polivinilpirrolidona com diferentes pesos moleculares. A atividade antifúngica das partículas foi testada contra *C. albicans* I e II, *C. tropicalis* e cepas de *C. parapsilosis* isoladas de amostras sanguíneas de pacientes com septicemia causada por *Candida* por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), da concentração fungicida mínima (CFM) e da dependência temporal da inibição do crescimento de leveduras, onde foram comparados os efeitos das nanopartículas estabilizadas e das não-estabilizadas. A citotoxicidade dos íons de Ag foi testada em fibroblastos humanos. Os resultados obtidos mostraram que as NPs de prata não estabilizadas inibiram o crescimento de todas as espécies de *Candida* testadas, e a concentração necessária para inibição depende da espécie. A CIM mais baixa (0,21 mg/L) foi obtida contra *C. albicans* II. O crescimento de *C. albicans* I e *C. tropicalis* foi inibido pela CIM igual a 0,42 mg/L e 0,84 mg/L, respectivamente. Em comparação a essas espécies, *C. parapsilosis* foi menos sensível, com a CIM determinada em 1,69 mg/L. A atividade antifúngica das nanopartículas foi comparada com a prata iônica como referência, e as CIMs de Ag iônica contra as leveduras testadas foram idênticas às CIMs das NPs de prata, com exceção de *C. albicans* II por concentração de prata iônica igual a 0,42 mg/L. Para atividade fungicida, os autores encontraram concentrações mais elevadas em comparação com as CIMs. As NPs de prata estabilizadas por surfactantes apresentaram melhores efeitos antifúngicos, com exceção das submetidas à polietilenoglicóis. Quando PVP 360 foi aplicado, as CIMs foram menores (0,84 mg/L) para *C. parapsilosis* e 0,42 mg/L para *C. tropicalis*. Para *C. albicans* I, a CIM diminuiu para 0,1 mg/L e *C. albicans* II, a MIC permaneceu a mesma. O aumento mais significativo na atividade antifúngica das NPs de prata estabilizadas foi observado para dodecil sulfato de sódio (SDS), onde foi observada a CIM de 0,052 mg/L para *C. albicans* I e MICs nas outras leveduras com valores pela metade, quando comparado com as CIMs das NPs de Ag não estabilizadas. As NP de prata inibiram eficazmente o crescimento das leveduras testadas nas concentrações abaixo do seu limite citotóxico contra os fibroblastos humanos testados determinados a uma concentração igual a

30 mg/L de Ag. Entretanto, a prata iônica inibiu o crescimento das leveduras testadas a concentrações comparáveis ao nível citotóxico (aproximadamente 1 mg/L) de prata iônica contra os fibroblastos humanos testados.

Novos compostos catalisadores de Ag/AgBr/WO₃ foram sintetizados por Wang et al.¹⁷⁹ em 2009, com a finalidade de causar reação fotocatalítica sob luz visível e serem utilizados na destruição de bactérias. Para isso, os compostos foram sintetizados e sua atividade fotocatalítica mensurada contra bactéria *E. coli*, utilizadas em uma concentração de 10⁷ UFC/mL. A reação de fotocatalise foi iniciada com a irradiação dos compostos e da bactéria com luz visível, e após 24h de incubação a 37°C, foi realizada a contagem de UFC/mL. Também foi realizado ensaio de fotodegradação de corante, analisado por UV-Vis. Análises de DRX demonstraram que todas as amostras possuíam estrutura cristalina, com unidades celulares na fase ortorrômbica. A morfologia do material sintetizado é composta de estruturas semelhantes a prismas, de tamanho micrométrico. Em relação ao processo fotocatalítico de destruição de *E. coli*, ao contrario dos materiais WO₃ H₂O N-TiO₂ e Ag/AgBr, o composto Ag/AgBr/WO₃ H₂O exibiu elevada atividade fotocatalítica sob luz visível, sendo responsável pela eliminação de metade da população bacteriana em apenas 10 minutos de contato, e quase toda a população é eliminada com 20 minutos de irradiação, diferentemente dos demais compostos, que após esse tempo de incubação, demonstraram que 95% das bactérias ainda estavam viáveis. Os resultados mostram que as nanopartículas de Ag formadas a partir de AgBr não desempenham um papel importante no processo antibacteriano, pois Ag / AgBr e Ag / AgCl não foram capazes de destruir a *E. coli* sob a luz visível. O mecanismo de ação proposto foi a oxidação das paredes bacterianas, e sua consequente destruição. Os microrganismos que incubados no escuro com os compostos não sofreram redução, o que evidencia que esses materiais apresentam elevada atividade fotocatalítica apenas em luz visível.

O estudo de Dalrymple et al.⁴⁷ de 2010 apresentou uma revisão da literatura onde investigaram os mecanismos fundamentais de desinfecção por fotocatalise e os modelos utilizados para adequar esse processo de desinfecção. Fotocatalise é uma tecnologia atraente para o tratamento de água em grande parte devido ao seu potencial para utilizar a energia solar diretamente e alcançar desinfecção e desintoxicação química. Muitos trabalhos têm sido publicados sobre a desinfecção fotocatalítica, mas ainda há um debate considerável sobre os mecanismos de desinfecção e uma escassez de modelos mecanicistas para o processo. Os mecanismos fundamentais de desinfecção fotocatalítica que se relacionam com a inativação de bactérias foram discutidos nesse estudo. O processo de peroxidação lipídica de ácidos de

membrana, particularmente ácidos graxos poli-insaturados, está ganhando visibilidade na literatura. Em artigos recentes, um número crescente de pesquisadores deste assunto está aumentando. Os modelos matemáticos, empíricos e mecanicistas, utilizados para ajustar o processo de desinfecção também foram cuidadosamente revistos, e a maioria dos modelos propostos é de natureza empírica e enraizada nos princípios de desinfecção química tradicional, que muitas vezes não são representativos do processo fotocatalítico heterogêneo. O desenvolvimento teórico de um modelo mecanicista para a desinfecção fotocatalítica baseada na peroxidação lipídica por meio da formação de espécies reativas como o hidroperóxido (O_2H) e oxigênio singleto (O_2) é explorado com a devida consideração à interação entre micróbios e partículas fotocatalíticas, sendo então um dos principais mecanismos de ação dos modelos apresentados. A extensa literatura sobre a auto oxidação de lipídios em campos como a biologia e a medicina é informativa para o desenvolvimento de novos métodos de desinfecção.

Allaker⁴ em 2010 realizou uma revisão de literatura sobre a ação de nanopartículas na formação de biofilmes orais. A aplicação de nanopartículas para controlar a formação de biofilmes dentro da cavidade oral, em função das suas características biocida e anti-adesivas, tem sido levada em consideração nos últimos anos. O seu uso como constituintes de revestimentos de dispositivos protéticos aplicados topicamente, ou dentro de materiais dentários é uma alternativa à utilização de antimicrobianos comumente empregados. Muitos dos estudos analisados na revisão foram realizados *in vitro*, e há uma clara necessidade de um maior embasamento científico com estudos *in vivo* e *in situ*. Os metais nanoparticulados merecem atenção especial devido à sua durabilidade e propriedades antimicrobianas já comprovadas, em particular as nanopartículas de prata, cobre, zinco, silício e seus óxidos. Certas nanopartículas podem ser tóxicas para os tecidos humanos, contudo, com a modificação das suas características superficiais pode se determinar uma redução de toxicidade, permitindo assim várias aplicações. Várias abordagens para alterar a biocompatibilidade estão sendo estudadas, dentre elas a mudança da capacidade de agregação, aplicação de revestimentos de superfície e alteração da densidade da carga e estado oxidativo dos materiais.

Chaloupka et al.³³ em 2010 realizaram uma revisão de literatura sobre nanopartículas de Ag e a geração de novos produtos da área biomédica. Várias rotas de sínteses têm sido utilizadas na fabricação de nanopartículas de prata, cada uma com suas especificações e limitações. Os parâmetros utilizados na síntese podem influenciar no diâmetro e tamanho das partículas produzidas, distribuição de tamanho, forma, estabilidade, etc. Embora várias

técnicas de síntese tenham sido descritas na literatura, normalmente são obtidas através da redução de nitratos de prata diversos por um agente redutor, ou por fotorredução ocasionada por luz UV. Durante a redução química, o agente redutor doa elétrons para os íons da Ag. Ao controlar as condições experimentais e a cinética de reação, é possível manipular sua produção, desenvolvendo materiais com diversos formatos e tamanhos, inclusive em tamanhos nanométricos, característica importante, já que os materiais nessa escala apresentam diferentes propriedades físicas, ópticas e químicas. Dentre essas propriedades, está a atividade antimicrobiana. Embora os mecanismos de ação das nanopartículas de Ag ainda não tenham sido completamente elucidados, é aceito que, quando em solução aquosa, a Ag libera íons que são biologicamente ativos, responsáveis pela atividade antimicrobiana. Acredita-se que os íons de Ag interagem com três componentes principais para a manutenção da vida microbiana: parede celular de peptidoglicano, membrana plasmática e DNA. Além dessas interações, a produção de espécies reativas de oxigênio também explica a sua efetividade. Devido à sua efetividade antimicrobiana, foram realizados estudos sugerindo sua utilização em implantes cardiovasculares, cateteres intravenosos, cateteres utilizados em neurocirurgias, cimento ósseo e curativos para feridas. Embora existam muitas aplicabilidades, as questões toxicológicas das nanopartículas de Ag ainda permanecem sem resposta.

A atividade antibacteriana e o mecanismo de nanopartículas de prata (Ag-NPs) também foram estudados por Li et al.⁹⁸ em 2011. Para isso, utilizaram o microrganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e solução de nanopartículas de Ag, e foram determinadas as CIM e CBM; a ação das nanopartículas nas células dos microrganismos através de MET; mensurado o efeito das Ag-NPs na atividade enzimática da desidrogenase da cadeia respiratória, e realizada análise proteômica das células de *S. aureus* submetidas ao tratamento com Ag-NPs. Após as análises, a CIM encontrada foi de 5 µg/mL e a CBM foi 20 µg/mL. Na análise em MET, foi encontrado um condensamento do DNA das células expostas às nanopartículas, além de lise da parede celular e liberação de seu conteúdo, até o completo esvaziamento celular. A desidrogenase da cadeia respiratória do grupo experimental foi semelhante à do grupo controle, e os autores sugerem que isso ocorreu pois a quantidade de partículas utilizadas para esse ensaio não inibiu completamente os microrganismos. A análise proteômica demonstrou que a proteína acetiltransferase aumentou cerca de 5,3 vezes nas células tratadas em relação ao controle, e glicerol-3-fosfato desidrogenase, proteína de ligação a ATP e proteína recombinase A sofreram uma diminuição após o tratamento. O mecanismo de ação proposto pelos autores foi: Ag-NPs atuaram sobre a parede celular, agiram nos mecanismos da membrana celular, paralisando as enzimas e interferiram com o metabolismo

normal das células, posteriormente, os Ag-NP entraram nas bactérias e condensaram o DNA, prevenindo a replicação celular (mecanismo de reprodução). Simultaneamente, as Ag-NP atuam continuamente na parede e membrana celular para destruí-los, até sua completa ruptura.

Segundo Vazquez-Muñoz et al.¹⁷³ (2011), embora alguns estudos tenham relatado a atividade antifúngica de nanopartículas de prata (AgNPs) contra algumas espécies de *Candida*, não foram relatadas análises ultraestruturais sobre a interação das AgNPs com esse microrganismo. Em seu trabalho, foi avaliado o efeito de AgNPs sobre *C. albicans*. Foi cultivada a cepa ATCC SC5314 de *C. albicans* a 37° C em meio de cultura específico. As AgNPs que foram utilizadas são comercialmente disponíveis (Vector Vita Ltd, Novosibirsk). O produto é definido como um medicamento "Argovit" que é aglomerado de prata (AgNPs) funcionalizado com polivinilpirrolidona (PVP) e o tamanho médio relatado de partículas é de cerca de 1,5-2 nm. A concentração de prata do produto é de 12.000 µg/mL. Foram determinadas a concentração inibitória mínima das AgNPs e do Fluconazol em combinação, medicamento comercialmente disponível e amplamente utilizado no tratamento de infecções fúngicas. Após o tratamento, as células foram preparadas e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) e MET de alta resolução. A CIM foi determinada para diferentes concentrações de culturas celulares, e os valores para AgNPs isoladas foram: 600 µg/mL para 10⁷ células; 150 µg/mL para 10⁶; e 42 µg/mL para 10⁴ células/mL. Os valores para AgNPs em combinação com fluconazol foram: 60 µg/mL e 125 µg/mL de AgNPs e fluconazol, respectivamente, para 10⁶ células/mL; e 18 µg/mL e 31 µg/mL de AgNPs e fluconazol, respectivamente, para 10⁴ células/mL. A análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou acúmulo de AgNPs fora das células, mas também nanopartículas menores localizadas em todo o citoplasma. A análise por espectroscopia de dispersão de energia (EDX) confirmou a presença de prata intracelular. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que as AgNPs utilizadas no estudo não penetram na célula, mas liberam íons de prata que se infiltram na célula, levando à formação de NPs através da redução por compostos orgânicos presentes na parede celular e no citoplasma.

A atividade antibacteriana de nanopartículas de prata (AgNPs) foi investigada por Mirzajani et al.¹¹⁹ em 2011, utilizando *Staphylococcus aureus* PTCC1431 como modelo de bactérias Gram-positivas. O mecanismo de atividade antibacteriana das AgNPs foi estudado por análise do crescimento, morfologia e variações moleculares na parede celular. Os dados experimentais mostraram que as AgNPs a uma concentração de 4 µg/ml inibiram completamente o crescimento bacteriano. Os resultados da microscopia eletrônica de

transmissão confirmaram danos na parede celular produzidos pelas AgNPs, bem como acumulação de AgNPs na membrana bacteriana. Enquanto isso, as bactérias tratadas com AgNP foram monitorizadas para revelar variações de peptidoglicano. Os autores observaram algum grau de variação na posição da hélice e da cadeia peptídica. Além disso, o aumento da concentração de AgNP para 8 µg/ml resultou na liberação de ácido murâmico no meio de cultura, o que poderia ser atribuído à deterioração da parede celular. Uma análise de cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas e liberação de ácido murâmico, como indicador bacteriano, mostraram que as cadeias de glicano podem também terem sido decompostas como resultado do tratamento com AgNP.

O estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio (ROS) é um dos mais importantes mecanismos antibacterianos de nanopartículas (NPs). Para elucidar os mecanismos de geração de ROS, Li et al.⁹⁹ em 2012 investigaram a cinética de produção de ROS de sete NPs de óxido de metal selecionados sob irradiação UV (365 nm). Foram selecionados sete óxidos metálicos, sendo eles: TiO₂, CeO₂, ZnO, CuO, SiO₂, Al₂O₃ e Fe₂O₃, e investigada a geração de três espécies de ROS (O₂¹, OH^{*} e O₂^{*}). Seguidamente à mensuração da produção de ROS, foi realizada uma correlação entre produção e morte de *E. coli*. Os resultados mostram que diferentes óxidos de metal tinham cinética de ROS fotogerada distinta. Particularmente, as nanopartículas de TiO₂ e as nanopartículas de ZnO geraram três tipos de ROS (radical superóxido, radical hidroxilo e oxigênio singlete), enquanto outros óxidos metálicos geraram apenas um ou dois tipos ou não geraram qualquer tipo de ROS. Além disso, NPs produziram mais ROS do que suas contrapartes em massa provavelmente devido a maiores áreas superficiais de NPs fornecendo mais locais de absorção para a irradiação UV. O mecanismo de geração de ROS foi elucidado comparando as estruturas eletrônicas dos óxidos de metal com os potenciais redox de várias gerações de ROS, que corretamente interpretaram a geração de ROS da maioria dos óxidos metálicos. Para desenvolver uma relação quantitativa entre o estresse oxidativo e a atividade antibacteriana de NPs, foi examinada a viabilidade de células de *E. coli* em suspensões aquosas de NPs sob irradiação UV e uma correlação linear foi encontrada entre a concentração média de ROS totais e as taxas de sobrevivência bacteriana ($R^2 = 0,84$). Embora as NPs de ZnO e CuO tenham liberado íons tóxicos que contribuíram parcialmente para a sua atividade antibacteriana, esta correlação relacionou quantitativamente a capacidade de produção de ROS das NPs com a sua atividade antibacteriana, assim como elucidou as aplicações de NPs de óxido metálico como potenciais agentes antibacterianos.

Devido a falta de conhecimento específico sobre a interação de nanopartículas de CuO com bactérias e sua possível permeação nas células bacterianas até o momento deste estudo, Applerot et al.¹⁰ em 2012 realizaram uma pesquisa cujo objetivo foi esclarecer a relação entre tamanho de partículas e atividade antibacteriana de CuO. As partículas de CuO foram sintetizadas através do método sonoquímico, com solução de amônia adicionada a reação. A análise por DRX não apresentou picos relacionados a impurezas das partículas sintetizadas. O tamanho das partículas foi analisado através de microscopia de varredura e microscopia de transmissão, e as imagens foram comparadas com nanopartículas de CuO micrométricas e nanométricas disponíveis comercialmente. Tanto as partículas comercialmente disponíveis quanto as sintetizadas apresentaram escala nanométrica e natureza aglomerada, provavelmente devido ao seu pequeno tamanho e interação entre elas através de forças de van der Waals. A citotoxicidade das partículas contra *E. coli* e *S. aureus* foi realizada, durante um período de tempo de 3 horas. Os resultados demonstraram que o controle dos microrganismos sem tratamento com as partículas não apresentou nenhuma modificação de sua viabilidade, e todas as amostras de CuO reduziram pelo menos 36% da viabilidade microbiana em 3 h. Embora ambos os microrganismos tenham sido reduzidos com as partículas sintetizadas, a *E. coli* apresentou maior susceptibilidade aos tratamentos em comparação com *S. aureus*. O aumento no tamanho das partículas promoveu maior toxicidade para *S. aureus*, porém essa correlação não foi observada para a *E. coli*.

As nanopartículas de prata demonstram ser prejudiciais às células fúngicas, e devido aos mecanismos de ação ainda não terem sido totalmente estabelecidos, Hwang et al.⁷⁹ em 2012 realizaram um estudo para demonstrar que células de *C. albicans* em contato com nanopartículas de prata sofriam morte por apoptose. Muitos estudos têm demonstrado que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio induz e regula a apoptose celular. Além disso, os radicais hidroxila são considerados componente importante da morte celular. Portanto, foi assumido pelos autores que radicais hidroxila estavam relacionados com a apoptose e seu efeito foi investigado. Para isso, foi utilizado um corante (DHR-123), que é um indicador de níveis de ROS, e foi utilizado para a morte de células com a presença de radicais hidroxila, e o peróxido de hidrogênio foi utilizado como controle de morte. Através deste teste, foi demonstrado que as células de *C. albicans* tratadas com as nanopartículas de Ag exibiram quantidade de ROS semelhantes às células tratadas com H₂O₂. Foi observado que, com o aumento de ROS intracelular, o nível intracelular de OH também foi marcadamente aumentado quando as células foram tratadas com nano-Ag. Uma redução na membrana mitocondrial demonstrada pela análise de citometria de fluxo e a liberação de citocromo C de

mitocôndrias também foram verificados, indicando que as nano-Ag também atuam sobre esses sistemas celulares. Usando outros marcadores diagnósticos confirmadores de apoptose de levedura, incluindo Fosfatidilserina, DNA e fragmentação nuclear, e ativação de metacaspases, as células expostas a nanopartículas de prata mostraram aumento da espécie reativa de oxigênio e produção de radicais hidroxila. Todos os outros fenômenos de disfunção mitocondrial e características apoptóticas também apareceram. Os resultados indicam que nanopartículas de prata possuem efeitos antifúngicos com características apoptóticas e os autores sugeriram que os radicais hidroxila gerados pelas nanopartículas de prata têm um papel significativo na apoptose disfuncional mitocondrial.

Com a finalidade de investigar a atividade antifúngica e propriedades estruturais de nanocristais de TiO_2 , Longo et al.¹⁰⁹ em 2013 sintetizaram dióxido de titânio nanocristalino através do método solvotermal, onde isopropanol, acetilacetona e isopropóxido de titânio foram misturados e mantidos em agitação constante em temperatura ambiente, e em seguida, 5 mL de solução de ácido nítrico foram adicionados ao sistema. Esta solução foi então aquecida a 60°C durante 24h, o que resultou em um colóide amarelo transparente intenso. Em seguida a mistura foi transferida para uma autoclave de Teflon que foi selada e processada por um método solvotérmico. Depois disso, a solução foi centrifugada, lavada várias vezes e seca a 40°C . Em seguida, preparou-se uma solução aquosa de nc- TiO_2 (2 mg/mL) para os testes microbiológicos. As partículas obtidas foram caracterizadas por DRX, espectroscopia Raman e MET. A atividade antifúngica dos nanocristais foi determinada com o microrganismo *C. albicans* ATCC 90028, e após o tratamento do microrganismo com as partículas, a atividade antifúngica foi determinada através de plaqueamento e contagem de UFC/mL. Cálculos teóricos também foram realizados para melhor entendimento das propriedades eletrônicas da rede cristalina. Os padrões DRX do TiO_2 sintetizado indicam nanocristais monofásicos cristalinos com uma estrutura de TiO_2 de fase anatase tetragonal. Os picos foram largos, indicativos da desordem estrutural do material, consequência da estrutura de superfície que é diferente da estrutura em massa. Nos espectros de Raman a fase rutilo foi encontrada, fato que não havia sido evidenciado pelo DRX. Micrografias de MET mostraram que as estruturas de TiO_2 tem uma morfologia homogênea e esférica. Um histograma de análise de 200 partículas obtidas usando o *software* ImageJ mostrou que a distribuição de tamanho de partícula tem um diâmetro médio de 5,4 nm. Testes microbiológicos mostraram que a exposição de *C. albicans* à solução de TiO_2 resultou em uma redução de 30% no crescimento de fungos em comparação com o controle de crescimento. Este resultado indica que a solução de TiO_2 teve um efeito antifúngico contra células de *C. albicans* mesmo sem radiação induzida pela luz. Com base

nos cálculos teóricos, foi proposto pelos autores que a geração de espécies reativas de oxigênio que são responsáveis pela redução dos microrganismos são geradas na superfície (101) das nanopartículas de TiO₂.

Os potenciais efeitos fungistáticos e fungicidas de nanopartículas de hidroxiapatita com Ag (HA @ Ag) em solução contra *C. albicans* foram avaliados por Zamperini et al.¹⁹⁴ (2013), por meio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM). Além disso, os efeitos da solução de HA @ Ag contra a formação de biofilme de *C. albicans* foram também investigados. A síntese das nanopartículas de hidroxiapatita foi feita através do método da co-precipitação, com o controle do pH da solução em 11 com gotejamento de solução amoniacal. Em seguida, a suspensão contendo as partículas foi inserida em recipiente de Teflon e levado para tratamento em micro-ondas, com 800 W de potência, aquecimento de 140°C e pressão constante de 3 bar. Após o tratamento, o produto resultante foi lavado diversas vezes até a obtenção de um pH neutro, e em seguida foi seco em forno. Para as partículas decoradas com Ag, o mesmo produto proveniente da síntese descrita foi disperso em água destilada, o pH foi mantido em 5 e 5 mL de solução de AgNO₃ foram adicionados, mantendo em agitação constante e aquecimento a 60°C. A caracterização das partículas foi feita através de MET, EDX, DRX, espectroscopia Raman e UV-Vis. A atividade antifúngica das partículas foi verificada contra *C. albicans* ATCC 90028, em forma planctônica e em biofilmes de 48 h. Análise em MET demonstrou que houve poucas diferenças entre as duas partículas em relação ao tamanho e morfologia. As partículas apresentaram tamanhos entre 12 a 27 nm em formato de nanohastes, enquanto as partículas decoradas com Ag possuíam a mesma morfologia, porém com pequenas esferas correspondentes a Ag na superfície. Análise de EDX demonstrou a presença de cálcio, fósforo, oxigênio e prata nas amostras. Os resultados de DRX demonstraram que as estruturas obtidas não possuíam fases secundárias deletérias, e todos os modos Raman encontrados foram atribuídos às estruturas de HA. UV-Vis demonstrou uma diferença significativa entre E_{gap} das amostras de HA e HA @ Ag, sendo 4,7 eV e 3,6 eV, respectivamente. Os autores acreditaram que essa diferença significativa pode ser atribuída a defeitos de superfície da Ag e defeitos na interface HA e Ag. Os valores de CIM e CFM foram 62,50 µg/mL e 250 µg/mL para os cristais decorados contra *C. albicans* planctônica. Foi observada uma redução significativa na quantidade de células viáveis nos biofilmes de 48 h quando expostos às nanopartículas, porém apenas na concentração de 1000 µg/mL. Esses resultados foram confirmados por análise dos biofilmes em MEV, onde pode-se observar alterações morfológicas nas células e diminuição da quantidade de hifas, forma invasiva da *C. albicans*.

Com base nos resultados, os autores concluíram que as partículas possuem atividade antifúngica contra *C. albicans*.

O Ortofosfato de prata (Ag_3PO_4) é um material reconhecido por sua alta atividade fotocatalítica, e devido a essa e outras características do material, Xu et al.¹⁸⁹ investigaram em 2014 a atividade antimicrobiana do nanocompósito heteroestruturado $\text{Ag}_3\text{PO}_4 / \text{TiO}_2 / \text{Fe}_3\text{O}_4$ contra *E. coli*, além de sua atividade fotocatalítica na degradação de laranja ácido sob luz visível. Para isso, os autores sintetizaram as nanoesferas e, em seguida, filmes com esses compostos. Verificou-se que o nanocompósito exibe uma atividade fotocatalítica marcadamente aumentada, estabilidade no ciclo e durabilidade a longo prazo na fotodegradação de laranja ácido 7 (AO7) sob luz visível. Além disso, o filme antibacteriano preparado a partir de nanocompósito $\text{Ag}_3\text{PO}_4 / \text{TiO}_2 / \text{Fe}_3\text{O}_4$ apresentou excelente atividade bactericida e reciclabilidade em relação às células de *E. coli* sob irradiação de luz visível. Além da citotoxicidade intrínseca dos íons de prata, a eficiência bactericida elevada de $\text{Ag}_3\text{PO}_4 / \text{TiO}_2 / \text{Fe}_3\text{O}_4$ pode ser atribuída em grande parte à sua atividade fotocatalítica aumentada. Os radicais hidroxila e superóxido nas interfaces formadas $\text{Ag} / \text{Ag}_3\text{PO}_4 / \text{TiO}_2$ causam alterações morfológicas consideráveis nas células do microrganismo e conduzem à morte das bactérias.

Ninganagouda et al.¹²⁶ em 2014 estudaram a atividade antibacteriana de nanopartículas de Ag sintetizadas a partir de um filtrado extracelular de *Aspergillus niger* em contato com nitrato de Ag, contra a bactéria *E. coli*. As nanopartículas foram biosintetizadas e, em seguida, caracterizadas através de UV-Vis, MET, determinação do potencial zeta, FTIR, MEV, EDX e quantificação das espécies reativas de oxigênio contidas na superfície das nanopartículas. Um pico único de 416 nm observado em UV-Vis revela ressonância plasmônica de superfície específica nesse pico; as micrografias de MET revelaram o tamanho das nanopartículas em 20-55 nm, e seu diâmetro médio foi de 73 nm, com um potencial zeta de -24 mV. Micrografias de MEV demonstraram que as AgNPs possuíam morfologia esférica com a superfície lisa. Análise em EDX revelou a presença de AgNPs metálicas puras juntamente com traços de carbono e oxigênio. Das diferentes concentrações (0, 2,5, 5, 10 e 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) utilizadas, a concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi suficiente para inibir 10^7 UFC/mL de *E. coli*. A interação entre a proteína bacteriana e AgNPs foi investigada por FTIR, e os resultados demonstraram a presença de diferentes grupos funcionais como amina secundária, hidrocarbonetos alifáticos saturados (alcanos), alquilenos, anidrido, alceno, composto aromático, álcool primário. Nesse estudo, o FTIR foi uma ferramenta importante para a identificação dos compostos. A produção de ROS foi medida usando o diclorofluoresceína

diacetato (DCFH-DA) e o efeito de geração de radicais livres pelas AgNPs sobre a inibição do crescimento bacteriano foi investigado por espectroscopia de ressonância de spin eletrônico (ESR). Após 5 h de incubação, ROS formados na amostra foram detectados na emissão de 523 nm. Excesso de espécies reativas de oxigênio podem atacar a membrana lipídica e, em seguida, levar a uma degradação de sua função. O resultado confirma a geração de radicais livres pela superfície dos AgNPs, que se torna tóxico para bactérias, levando as células à morte. Os autores concluíram que AgNPs possuem propriedades antibacterianas e atuam por ancoragem à superfície celular, tentando entrar na célula bacteriana através da ruptura da membrana, causando vazamento de componentes e morte. Além disso, a geração de ROS pelas AgNPs é tóxica para as células.

Para compreender o efeito antibacteriano de microcristais de α -Ag₂WO₄ com e sem nanofilamentos de Ag metálica na superfície, Longo et al.¹¹⁰ em 2014 sintetizaram microcristais de tungstato de prata pelo método hidrotérmico assistido por micro-ondas, a 120°C durante 1h, utilizando 1 g de PVP como surfactante. O crescimento de nanofilamentos de Ag metálica nos microcristais de α -Ag₂WO₄ foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura modelo 30 kV operado a 30 kV durante 30 minutos. As amostras (irradiadas e não irradiadas) foram caracterizadas por DRX, espectroscopia Raman, MEV, MET e EDX. A atividade antimicrobiana foi realizada por microdiluição em caldo, de acordo com as normas preconizadas por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) com modificações. Cepa padrão de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) ATCC 33591 foi cultivada e as concentrações inibitória / bactericida mínima (CIM / CBM) foram determinadas. Análise em MEV demonstrou que as partículas apresentaram morfologia hexagonal, embora formas triangulares e cúbicas também puderam ser observadas. Os resultados de EDX confirmam que as estruturas formadas após a exposição aos elétrons são compostas, principalmente, por Ag, enquanto a partícula na sua condição original é composta, principalmente, por tungstênio (W), com menor quantidade de Ag, como esperado. Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) foi realizada no nanofilamento de Ag metálica, após os microcristais terem sido irradiados, e revelou que os parâmetros de rede possuem em torno de 2,3Å, o que é consistente com o plano (111) da estrutura cúbica do nanofilamento de Ag metálica. Nos espectros de DRX, ambos os cristais apresentaram picos de difração nítidos e bem definidos, o que indica ordem estrutural e cristalinidade, sem a presença de fases deletérias. Os resultados microbiológicos revelaram que as soluções AWO e AWO: Ag apresentaram efeitos bacteriostáticos e bactericidas contra SARM, porém a amostra irradiada foi mais eficiente, sendo necessária uma concentração 4

vezes menor para eliminar o microrganismo em relação à partícula sem irradiação. A atividade antimicrobiana foi explicada pelo aumento no processo de transferência de elétrons entre a banda de condução e a banda de valência dos cristais permitiu um aumento na produção de espécies reativas, o que causou a morte do microrganismo.

Roca et al.¹⁴⁰ em 2015 combinaram testes e resultados experimentais e cálculos teóricos para explicar as atividades fotocatalíticas e antibacterianas de cristais de α -Ag₂WO₄, que foram obtidos usando o método hidrotermal assistido por micro-ondas (MH) com surfactantes aniônicos. As vantagens dos resultados obtidos através do presente trabalho foram duas: em primeiro lugar, o mecanismo e a origem das atividades fotocatalíticas e antibacterianas foram racionalizados. Em segundo lugar, este método sintético fácil e controlável encoraja a síntese de óxidos metálicos complexos com facetas ativas específicas, que podem contribuir para o desenho racional de novos materiais para aplicações multifuncionais. A difração de raios X e a análise de refinamento de Rietveld confirmaram que todos os cristais têm uma estrutura ortorrômbica sem fases deletérias. A espectroscopia de refletância difusa UV-Vis indicou a presença de níveis intermediários de energia e uma variação nos valores do gap de banda óptica (3,09-3,14 eV) com o processo de crescimento de cristais. A geometria, as propriedades eletrônicas e as energias superficiais desses cristais foram avaliadas utilizando-se cálculos quânticos de primeiro princípio baseados na teoria funcional da densidade. As formas de cristal foram experimental e teoricamente modeladas com base em dados de refinamento de Rietveld, imagens de MEV-EC e construção de Wulff. Para obter uma grande variedade de formas de cristal, as morfologias foram gradualmente variadas ajustando a química da superfície, isto é, a estabilidade relativa dos cristais facetados. Os mecanismos de crescimento de diferentes cristais de α -Ag₂WO₄ e seus desempenhos fotocatalíticos e antibacterianos dependentes de faceta foram explorados, e os resultados da combinação de dados experimentais e teóricos revelou a presença de planos (110) e (011) com altas energias superficiais juntamente com o desaparecimento de faces relacionadas aos planos (010)/(010) nos cristais de α -Ag₂WO₄, e esses achados foram fatores-chave para racionalizar tanto as atividades fotocatalíticas quanto antibacterianas. As diferentes atividades podem ser atribuídas ao número diferente de átomos Ag e W superficiais insaturados capazes de formar os principais locais de adsorção ativos. Diferentes propriedades químicas e físicas e o conhecimento de suas propriedades eletrônicas permitem a síntese controlada de cristais com morfologias específicas, melhorando seu desempenho e aumentando suas aplicações.

O extrato alcoólico de folhas de tulsi foi utilizado como agente redutor e estabilizador para a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) no estudo de Khatoon et al.⁸³ 2015. O uso de extrato vegetal para a síntese de nanopartículas apresenta um excelente custo-benefício, é efetivo, de fácil reprodução, e representa um processo ecologicamente correto (“*ecofriendly*”). As AgNPs biosintetizadas foram caracterizadas utilizando-se a análise UV-Vis, MET, DRX e FTIR. As AgNPs formadas mostram a ressonância plasmônica de superfície a 430 nm. Possuíam uma superfície lisa com um diâmetro médio de 2-7 nm e sua natureza cristalina foi confirmada pelo DRX. A atividade antifúngica das AgNPs foi avaliada para patógenos fúngicos humanos oportunistas como *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. O efeito antifúngico foi determinado pela CIM, CFM e ensaio de difusão em disco. Além disso, para avaliar a patogenicidade, realizaram-se ensaios de proteinase e fosfolipase. A análise em MET das células de *Candida* tratadas revela que as AgNPs podem exercer atividade antifúngica rompendo a estrutura e a integridade da membrana celular. A citotoxicidade de AgNPs foi verificada por realização de ensaio hemolítico contra eritrócitos humanos. Nos valores correspondentes à CIM, as AgNPs causaram apenas 5,6% de lise nos glóbulos vermelhos, o que foi muito baixo em comparação com os agentes antifúngicos convencionais. Assim, as AgNPs biosintetizadas utilizando extratos de plantas têm grande potencial antifúngico e podem ser utilizadas no tratamento de infecções fúngicas. Segundo os autores, mais estudos devem ser feitos para entender seu mecanismo de ação.

A atividade antimicrobiana e propriedades do TiO₂ decorado com prata (TiO₂:Ag) foram estudadas por André et al.⁶ em 2015. Os autores descreveram a síntese e caracterização de nanopartículas de TiO₂: Ag, que foram obtidas através da síntese hidrotérmica assistida por micro-ondas e caracterizadas por DRX, MET, MEV, espectroscopia Raman e UV-Vis. Os testes microbiológicos foram realizados com os microrganismos *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM), *C. albicans*, *C. glabrata*, e *C. tropicalis* obtidas em *American Type Culture Collection* (ATCC 33591, ATCC 90028, ATCC 2001, e ATCC 4563, respectivamente), nas formas planctônicas e biofilmes. O teste de microdiluição em caldo foi realizado seguindo as normas estabelecidas por CLSI, onde os microrganismos são incubados com uma solução contendo as partículas, e a biomassa total do biofilme foi avaliada através de coloração com cristal violeta. A base da atividade biológica de TiO₂: Ag foi investigada por análise eletrônica do material usando cálculos quânticos teóricos. A análise de DRX demonstrou que as amostras de TiO₂ e TiO₂: Ag foram indexadas como a fase anatase de TiO₂ com estrutura tetragonal. Os picos de difração relacionados às fases secundárias foram detectados e indexados como Ag metálica, além da fase anatase primária de TiO₂, na amostra

de TiO_2 : Ag. Resultados de UV-Vis e espectroscopia Raman levaram os autores a concluir que a heteroestrutura formada com TiO_2 e Ag aumentou a formação de estados profundos no intervalo de banda, levando à partilha de elétrons entre TiO_2 e Ag (semicondutor / metal). As micrografias feitas em MEV mostraram que as estruturas de TiO_2 : Ag apresentaram uma morfologia homogênea e esférica, com uma natureza aglomerada. No mecanismo de ação proposto, o semicondutor impregnado doa elétrons para as fendas de bandas proibidas no metal, gerando defeitos pontuais, com elétrons e buracos parcialmente localizados na superfície, iniciando um processo radical envolvendo o solvente e o alvo biológico. Os autores sugerem que este nanomaterial tem potencial para uso no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Variando os solventes utilizados na síntese, a estrutura, atividade antifúngica e as propriedades ópticas de microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ foram investigados por Fabbro et al.⁶⁰ em 2016, utilizando abordagens experimentais e teóricas. As amostras de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ foram preparadas por um método de co-precipitação utilizando diferentes solventes (água, etanol e amoníaco), e a sua atividade antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 90028 foi investigada. Para determinação da atividade antifúngica, foi utilizada a metodologia preconizada pelo CLSI, onde se determina a concentração fungistática e fungicida mínima para os microcristais. As amostras foram caracterizadas por DRX, espectroscopia de micro-Raman, MEV-EC e MET com EDX. As propriedades ópticas foram investigadas por espectroscopia UV-Vis e medições de fotoluminescência à temperatura ambiente. A forma termodinâmica de equilíbrio dos cristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ foi determinada com base nas energias de superfície calculadas utilizando a construção de Wulff. Como resultados, elucidaram que a superfície (011) foi a predominante na morfologia. A morfologia experimental foi obtida pela variação da razão de energia de superfície para cada faceta. Uma grande diminuição da energia superficial para a superfície (111) forneceu a morfologia experimental para os cristais sintetizados usando água e etanol como solventes; quando as energias superficiais para as superfícies (011) e (001) aumentaram, a morfologia cristalina obtida usando amoníaco como solvente foi reproduzida. Uma correlação entre as superfícies expostas e a atividade antifúngica foi revelada, e o microcristal sintetizado utilizando o álcool como solvente apresentou melhores resultados antifúngicos. Os autores correlacionaram a atividade antifúngica com a morfologia dos cristais. Os cálculos teóricos confirmam a racionalidade do esquema experimental e elucidam a razão subjacente à atividade fungistática e fungicida contra *Candida albicans*.

A resistência bacteriana aos antibióticos convencionais é atualmente um dos mais importantes problemas de saúde e tem graves impactos negativos na prática médica. O estudo de Panacek et al.¹³¹ em 2016 apresentou uma solução potencial para este problema, utilizando os fortes efeitos sinérgicos dos antibióticos combinados com nanopartículas de prata (NPs). Os NPs de prata inibem o crescimento bacteriano por meio de um modo de ação antibacteriana de vários níveis em concentrações que variam de alguns ppm a dezenas de ppm. As NPs de prata aumentaram fortemente a atividade antibacteriana contra *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamase e carbapenemase quando combinadas com os seguintes antibióticos: cefotaxima, ceftazidima, meropenem, ciprofloxacina e gentamicina. Todos os antibióticos, quando combinados com NPs de prata, apresentaram atividade antibacteriana aumentada em concentrações muito abaixo das concentrações inibitórias mínimas (décimos a centésimos de um ppm) de antibióticos individuais e NPs de prata. A atividade aumentada de antibióticos combinados com NPs de prata, especialmente meropenem, foi mais fraca contra bactérias não resistentes do que contra bactérias resistentes. O teste de sinergia de disco duplo mostrou que as bactérias não produziram β -lactamase quando tratadas com antibióticos combinados com NPs de prata. Foram necessárias baixas concentrações de prata para o aumento efetivo da atividade antibacteriana contra bactérias multirresistentes. Estas baixas concentrações de prata não mostraram efeito citotóxico para as células de mamíferos, uma característica importante para potenciais aplicações médicas.

Tamayo et al.¹⁵⁹ em 2016 realizaram uma revisão bibliográfica sobre a ação antibacteriana de nanopartículas de cobre. O desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos com propriedades antimicrobianas tem sido um fator importante para o controle ou inibição do crescimento de microrganismos, prevenindo doenças alimentares e infecções nosocomiais. Comercialmente, os produtos antibacterianos disponíveis baseados em polímeros de prata são os mais utilizados, embora o cobre seja consideravelmente mais barato. A incorporação de nanopartículas de cobre como agentes antibacterianos em matrizes para gerar nanocompósitos de cobre-polímero apresentaram excelentes resultados na inibição do crescimento de um amplo espectro de microrganismos. As potenciais aplicações em embalagens de alimentos, dispositivos médicos, indústrias têxteis e farmacêutica, e tratamento de água geraram um número crescente de investigações sobre a síntese e preparo de nanocompósitos à base de cobre e matrizes poliméricas alternativas, como hospedeiros potenciais de partículas nanomodificadoras. Atualmente, existem vários métodos de síntese para a obtenção de nanopartículas, dentre as principais: síntese química, física e biológica. As principais técnicas químicas para síntese de nanopartículas de cobre são redução química, micro-emulsão,

redução sono-química, eletroquímica, síntese hidrotérmica em micro-ondas e sínteses hidrotérmicas convencionais. A síntese biológica é considerada um tipo de técnica química, embora produza nanopartículas pela redução de íons metálicos por biomoléculas presentes em plantas, frutos, algas marinhas, bactérias e leveduras. Métodos físicos de síntese de nanopartículas de cobre são laser, vapor de metal, descarga de fio pulsado, e moagem mecânica. Os métodos físicos permitem a produção de nanopartículas de cobre de diferentes tamanhos e morfologias. Contudo, o processo requer equipamento dispendioso e a qualidade do produto é menor do que as nanopartículas produzidas por métodos químicos. Existem diferentes condições de trabalho para controlar o crescimento e a geometria de nanopartículas durante a síntese química, como a escolha de agentes estabilizadores, solventes e agentes redutores. Embora a síntese química gere nanopartículas com características específicas, a principal desvantagem é a toxicidade relativa destes produtos. Neste sentido, a síntese biológica é a alternativa mais ecológica dentre as citadas. A eficácia antibacteriana de nanocompósitos de polímeros associados a metais melhora com uma elevada relação superfície / volume, o que aumenta o número de íons liberados das nanopartículas no polímero. O mecanismo de corrosão do cobre em soluções aquosas e a geração de espécies reativas de cobre variam com o pH. Em geral, duas espécies de cobre são formadas na presença de água e oxigênio, Cu_2O e CuO , que podem se dissolver em íons de cobre, responsáveis pela atividade antibacteriana. Algumas propriedades desses materiais, como cristalinidade e polaridade da matriz que englobam as nanopartículas podem influenciar diretamente na liberação dos íons. Estudos demonstraram que as nanopartículas de cobre são responsáveis por se aderirem e causarem danos na membrana de *E. coli*, resultando em células lisadas e mortas com cerca de duas horas de contato entre elas. Os autores concluíram com essa revisão que com o passar dos anos, vários estudos têm sido publicados com a finalidade de elucidar os mecanismos de ação antibacterianos das nanopartículas de cobre. Embora tenham muitos estudos comprovando seu efeito bactericida, ainda há a necessidade de maiores investigações sobre a citotoxicidade desses materiais, para que seu uso possa ser tão difundido quanto o uso da Ag, que apresenta um custo 8 vezes maior em relação ao cobre.

2.3 Estudos Sobre Estrutura Celular

Devido à parede celular de fungos possuir importante papel na manutenção de sua viabilidade e conter componentes que não são encontrados nas células de mamíferos, podendo servir de alvo para o desenvolvimento de novos fármacos, Klis et al.⁹² em 2001

desenvolveram uma revisão de literatura onde estudaram a organização molecular da parede celular de *C. albicans*. As macromoléculas que são responsáveis pela resistência mecânica da parede celular formam uma camada esquelética próxima da membrana plasmática. Essa camada protetora interna é composta por proteínas e funciona como um limitador da permeabilidade para grandes moléculas, e determina as propriedades antigênicas e hidrofobicidade da superfície celular. Já a camada protetora externa contém diversas proteínas responsáveis pela adesão celular nas células do hospedeiro ou superfícies. A parede celular de *C. albicans* e *S. cerevisiae* é composta basicamente por manoproteínas, β (1, 3) -glucano, β (1, 6) -glucano e, em menor quantidade, quitina.

Ruiz-Herrera et al.¹⁴⁴, em 2006, realizaram análises comparativas dos componentes estruturais da parede celular e das proteínas estruturais, e elucidaram as semelhanças nos mecanismos de síntese e construção da parede celular em diferentes fungos, mas também revelaram várias singularidades da espécie *C. albicans*. Entre as diferenças reveladas, pode-se citar a estrutura de β (1, 3) -glucano e das proteínas Pir, o mecanismo biossintético do β (1, 6) -glucano, e as diversas funções da quitina, além das características superficiais e adesivas da parede. Assim, a parede celular da *C. albicans* é composta por lipídios, como o fosfolipomanano, quitina (formada por N-acetilglucosamina), e polissacarídeos β -glucanos, e proteínas. As proteínas desempenham papéis extremamente importantes para a fisiologia celular, já que possuem funções enzimáticas, são responsáveis pela interação da célula com o ambiente, antigenicidade, patogenicidade, além de influenciar na morfologia e estrutura celulares.

Em 2008, Chaffin³¹ estudou, através de revisão e análise sistemática da literatura, as proteínas que compõe a parede celular da *Candida albicans*. A parede celular, com os polissacarídeos e proteínas, é uma organela dinâmica. Análises proteômicas e transcrição são métodos para identificação das proteínas expressas pela parede, sob diferentes condições. A superfície das células apresenta basicamente duas funções: proteger seu conteúdo, e permitir a interação da célula com o ambiente. Além disso, ela é o ponto de contato entre o microrganismo e as superfícies do hospedeiro, incluindo células fagocitárias, ou superfícies inertes, como próteses. Devido à sua importância, o estudo das proteínas da parede celular tem avançado, e diversas ferramentas têm sido utilizadas. Especificamente as proteínas da parede celular exercem um papel importante na manutenção da integridade estrutural da membrana, mediam a adesão celular, possuem funções enzimáticas (como a proteólise), influenciam na morfologia da célula (levedura, pseudo-hifa e hifa) e no estilo de vida

planctônico ou sésil do microrganismo. O número de camadas que formam a parede celular é variável entre as espécies, e também podem variar de acordo com a metodologia empregada na análise. Várias proteínas que não estão ligadas à matriz de polissacarídeos possuem funções enzimáticas na parede celular, e afetam a estrutura da parede celular.

Masuoka¹¹⁴ em 2010 investigou na literatura os glicanos de superfície de *Candida albicans* e outros fungos patogênicos. A primeira interação entre os fungos patogênicos e os pacientes infectados ocorre devido a parede celular. A parede celular fúngica é composta por glicoproteínas incorporadas dentro de uma matriz de polissacarídeos. Além disso, algumas espécies produzem uma cápsula de polissacarídeos que rodeiam a parede celular. Assim, a caracterização dos componentes externos da membrana poderia conduzir a uma melhor compreensão dos mecanismos de adesão fúngica, gerar propostas de modo a aumentar a resposta imonológica do hospedeiro contra o patógeno e auxiliar no desenvolvimento de testes diagnósticos baseados na identificação dos carboidratos que compõe a membrana. Três tipos de monossacarídeos formam as cadeias de carboidratos da parede celular dos gêneros *Candida* e *Saccharomyces*: Dglucose, N-acetil-D-glucosamina e D-manose. Estudos anteriores estudaram a composição da parede celular de *C. albicans*, e já haviam isolado, pela primeira vez, o manano a partir de uma parede celular. Embora as paredes celulares esquematizadas sejam frequentemente descritas como sendo uma estrutura aparentemente estática, é evidente que a parede celular é uma estrutura dinâmica e que pode ser referida mais adequadamente como zona de enriquecimento, onde as manoproteínas são os componentes principais dessa zona de enriquecimento, e ficam se movendo para fora da membrana. Essa zona de enriquecimento também é referida na literatura como espaço periplasmático. A região proximal dessa zona enriquecida é formada por quitina e glucano, e a zona mais externa é composta de manoproteínas. Com a evolução dos métodos e estratégias de glicobiologia, os autores concluíram que os pesquisadores estão muito próximos de serem capazes de quebrar os glicanos contidos na parede celular e estudar os componentes que influenciam na patogênese, resposta imunológica, além do desenvolvimento de terapias e diagnósticos. Além disso, o detalhamento dos componentes da parede celular permite o estudo mais completo da interação hospedeiro-parasita.

Candida albicans, é um patógeno fúngico humano comum, e pode mudar a morfologia de levedura para pseudo-hifa ou hifa, dependendo de estímulos ambientais. É bem conhecido que a capacidade de conversão morfológica (polimorfismo) e sua capacidade de adesão torna a *C. albicans* um microrganismo virulento. Vale ressaltar que todos os fatores envolvidos na

morfogênese são conhecidos por serem importante para a virulência deste patógeno. Para examinar uma proteína ribossomal de grande importância na virulência da *C. albicans* (Asc1p), Kim et al.⁸⁹ (2010) reproduziram um modelo animal (rato) mutante homocigótico nulo em Asc1p para estudo. Cepas de *C. albicans* foram cultivadas em meio de cultura YPD e foram utilizadas técnicas de biologia molecular para gerar a expressão de CaAsc1 em uma cepa do fungo. Foram realizados testes de adesão e invasão celular pelas cepas de *Candida*, e teste de sobrevivência dos modelos animais durante o período de um mês, após o microrganismo ter sido inoculado em seu corpo. A partir dos resultados, que demonstraram que a atividade de adesão e expressão gênica de fatores de virulência foram alteradas nas células de *C. albicans* devido à deleção do Asc1, os autores sugeriram que Asc1 possui um papel fundamental na virulência do microrganismo.

Kishen e Haapasalo⁹⁰ em 2012 realizaram uma revisão de literatura, com variedade de modelos de biofilme *in vitro* que são atualmente usados em endodontia para diferentes experimentos microbiológicos. Nesta área, os biofilmes bacterianos são desenvolvidos para o estudo das interações microbianas no espaço dos canais radiculares ou entre bactérias e células imunes do hospedeiro. Entretanto, para o desenvolvimento de um modelo de biofilme, deve-se levar em consideração as peculiaridades dos microrganismos envolvidos, como, por exemplo, a taxa de crescimento do biofilme, as bactérias resistentes, a natureza da aderência bacteriana ao substrato, características físico-químicas do substrato, espessura do biofilme, densidade celular bacteriana, quantidade de LPS produzido na lise celular e co-existência de bactérias diferentes no mesmo biofilme. As técnicas de avaliação do biofilme são muito importantes para o sucesso da pesquisa. Dentre as técnicas para avaliação mais utilizadas, temos a contagem de UFC/mL, técnicas de avaliação colorimétricas e técnicas microscópicas. A avaliação por contagem de UFC/mL permite uma quantificação do número de células vivas existente em toda a extensão do biofilme, desde as camadas mais externas até o seu interior e camadas mais basais. No entanto, a contagem de UFC tem a capacidade de detectar apenas as bactérias que são capazes de iniciar um processo de divisão celular a uma taxa suficiente para que haja a formação de colônias, e cujas necessidades são suportadas pelo meio de cultura utilizado. Além disso, vários protocolos recomendam a remoção do biofilme do substrato por sonicação ou centrifugação, e esses processos são críticos, pois se forem mal executados, podem não desprender todo o biofilme da superfície. Além disso, algumas bactérias podem ser sensíveis a estes procedimentos. Os ensaios colorimétricos são métodos semi-quantitativos baseados na captação de corante (por exemplo, cristal violeta) pela estrutura do biofilme, e é

revelado após a captação com álcool ou algum surfactante, e a intensidade do fluido é mensurada em espectrofotômetro. Este é um método rápido de avaliação, porém os resultados obtidos são um reflexo do número de microrganismos no biofilme, e não um indicador real da matriz extracelular formada. A microscopia de luz é uma técnica amplamente utilizada para análise de biofilmes, seja diretamente em amostras *in vitro* ou em cortes histológicos. Possui as vantagens de ser uma análise de relativo baixo-custo, simples, rápida e amplamente disponível. Esta técnica consiste em corar o biofilme com corantes fluorescentes adequados (por exemplo, iodeto de propídio) ou de natureza não fluorescente (por exemplo, safranina). Células bacterianas também podem ser observadas em microscópios fluorescentes sem utilização de sondas fluorescentes. As MEV e MET e também são métodos eficazes para a avaliação de biofilmes. A principal desvantagem da técnica é a necessidade de extenso preparo das amostras, como fixação, desidratação química, congelamento ou secagem, e recobrimento. Esses tratamentos podem alterar a morfologia original do biofilme. Embora os processos causem alteração na matriz biofilme, as células microbianas ainda permanecem com a mesma morfologia, tamanho e estrutura após a fixação, podendo ser facilmente diferenciadas e analisadas. A microscopia confocal a laser é uma das metodologias mais importantes de análise, pois supera as limitações existentes nos microscópios eletrônicos, e permite a quantificação das células vivas e mortas do biofilme, além de sua espessura e estruturas. O uso de uma combinação de corantes fluorescentes, como o kit LIVE/DEAD BacLight e análise em confocal, onde as células mortas emitem luz vermelha e as células vivas emitem luz verde, se tornou uma rotina para análises de biofilmes *in vitro*.

Em 2013, Brown et al.²⁵ realizaram uma revisão de literatura com o tema ácidos teicóicos da parede celular de bactérias Gram-positivas. Explicam que as bactérias são cercadas por uma membrana complexa, que desempenha diversas funções. Essas membranas podem se apresentar diferentes entre espécies, porém todas apresentam uma camada de peptidoglicano ligadas a uma matriz de carboidratos através de ligações covalentes. Essa matriz é essencial para a sobrevivência dos microrganismos, e em bactéria Gram-positivas ela é densamente funcionalizada com outros glicopolímeros, como os ácidos teicóicos de parede, que estão intimamente relacionados com muitos aspectos da divisão celular. Os ácidos teicóicos são necessários para resistência a β -lactâmicos em SARM e modulam a suscetibilidade a antibióticos catiônicos em diversos outros organismos devido à sua importância na patogênese, esses ácidos são possíveis alvos para novas modalidades terapêuticas em infecções bacterianas resistentes. Os ácidos teicóicos possuem papel

determinante na regulação da morfologia celular e divisão, regulação da atividade autolítica, regulação da homeostase iônica, proteção contra as defesas do hospedeiro e ação de antibióticos, e na adesão e proliferação bacteriana. Por serem moléculas vitais para a fisiologia e patogênese bacteriana, os ácidos teicóicos podem ser alvos de estudos de novos agentes antibacterianos e vacinas.

2.4 Estudos Sobre Características Superficiais e Filmes Depositados à Plasma

A superfície das próteses orais maxilares que permanece em contato com a mucosa dos pacientes é frequentemente um reservatório de infecção para *Candida albicans*. A superfície não é lisa, contudo a maioria dos estudos sobre a adesão de *Candida* aos materiais de utilizados como base de prótese tem usado superfícies lisas, muitas vezes polidas, para a avaliação da adesão de microrganismos, o que não representa a realidade clínica. No trabalho de Verran et al.¹⁷⁵ de 1990, os autores estudaram o efeito da rugosidade superficial na adesão de *C. albicans*. Para isso, superfície de acrílico polido, semelhante às bases de próteses, foram abrasionadas usando papel esmerilado de grãos com tamanhos crescentes, para a produção de diferentes rugosidades superficiais. Culturas de *C. albicans* GDH 2346 foram padronizadas e incubadas com os espécimes de acrílico a 37°C durante 1h. A fixação do microrganismo foi medida através da área percentual de um campo microscópico coberto por células, utilizando um sistema automatizado de análise de imagens, ou contando o número de células aderentes por campo. As células aderiram em números significativamente maiores ($P < 0,001$) nas superfícies de acrílico rugoso, em comparação ao acrílico liso, mas a adesão máxima foi obtida em superfícies acrílicas rugosas com papel de esmeril de tamanho médio. Microscopia eletrônica de varredura revelou células aderidas entre os picos e os vales da rugosidade, muitas vezes em aglomerados, e também em maior quantidade em defeitos e detritos presentes na superfície analisada. As células não aderiram nas grandes lesões produzidas por rugosidade com papel esmerilado mais grosso.

Takeda e Fukawa¹⁵⁸ investigaram em 2003 os efeitos de dopamento metálico sobre as propriedades químicas da superfície de filmes finos de óxido de silício (SiO_2). Filmes finos de SiO_2 dopado com Al, Ti ou Zr foi depositado em amostras de vidro através do método de pulverização catódica com magnetron por radio-frequência, com espessura de 40 nm. Os alvos utilizados na pulverização foram alvos de silício dopados com Al, Ti ou Zr. As concentrações das substâncias dopantes não foram superiores a 3%, para que não houvesse alterações significativas nas propriedades do filme. A molhabilidade dos filmes foi avaliada

através de medidas de ângulo de contato usando um goniômetro, em vários tempos. As medições foram realizadas cinco vezes para cada amostra nas mesmas condições. Os resultados demonstraram que a hidrofobicidade dos filmes foi significativamente alterada pelos dopings metálicos presentes nos filmes, que foram relacionados com os compostos OH presentes na superfície dos filmes. Análise por XPS demonstrou que houve uma tendência de que a densidade do grupo OH de superfície aumentasse juntamente com a quantidade de oxigênio não ligados nas películas. Os autores concluíram que a dopagem com os metais Al, Ti e Zr modificaram as características superficiais do filme, sem influenciar na sua estrutura.

Foi realizada por Ratsch e Venable¹³⁸ em 2003 uma revisão dos modelos de nucleação e de crescimento aplicados aos estádios iniciais do desenvolvimento de películas finas (ou filmes finos). A nucleação e o crescimento de filmes finos incluem processos de tempo e escalas de comprimento que abrangem muitas ordens de grandeza. Neste estudo, os autores focaram no estudo de modelo de crescimento de filmes finos por três métodos: Frank–van der Merwe, Volmer–Weber e Stranski–Krastanov. Processos típicos ocorrem durante o crescimento de filmes sobre superfícies: átomos são depositados sobre uma superfície, com um fluxo de deposição constante. Uma vez que os átomos estão na superfície, eles podem se difundir sobre a superfície, podendo se encontrar com outros átomos, formando dímeros, ou apenas se aderindo próximo a outro átomo, formando ilhas. Uma vez que os átomos são anexados a uma ilha, eles podem se movimentar para as bordas da ilha, ou se depositar em sua superfície, na parte superior. Quando as deposições ocorrem em altas temperaturas, os átomos podem se evaporar. Se o substrato estiver em alta temperatura, esses átomos também podem sofrer evaporação. Todos esses fenômenos, além das taxas de deposição dos filmes e das características de deposição, podem influenciar sua formação. Várias equações para estudos de filmes finos, como as equações de frequência, Monte Carlo e as simulações de conjuntos de níveis são descritas com detalhes pelos autores. A literatura experimental foi citada, e as comparações entre a experiência e a teoria foram feitas sempre que possível. A ênfase é dada aos modelos computacionais rápidos que podem abranger uma grande variedade de escalas de comprimento e tempo, que podem ser desenvolvidos na direção do controle de processo de deposição on-line.

Materiais nanocompósitos baseados em nanopartículas metálicas embebidas em matrizes de óxidos têm atraído atenção devido as suas propriedades físico-químicas, que podem ser manipuladas em função do tamanho, da forma e das interações das nanopartículas. A possibilidade de se obter uma deposição controlada de partículas de metal em uma superfície de óxidos abre caminho para um amplo espectro de aplicações tecnológicas, desde

catálise heterogênea, até fabricação de sensores de gás e instrumentos ópticos. O controle dos desempenhos funcionais de filmes finos depositados baseia-se na adaptação das propriedades do sistema através de uma escolha adequada das vias de síntese e de processamento. Devido a essas características, Armelao et al.¹¹ 2006 realizaram uma revisão de literatura sobre nanocompósitos de Ag, Cu e Au dispersos ou depositados sobre matrizes de óxidos, sendo eles SiO₂, TiO₂ e Al₂O₃. Algumas das metodologias mais empregadas para o desenvolvimento desse sistema são sol-gel, sputtering induzido por radio-frequência e as duas técnicas associadas. Especialmente para os filmes de Ag/SiO₂ depositados por sputtering induzido por radio-frequência, as duas variáveis que mais influenciam no filme são a frequência da RF, e a pressão total aplicada durante a descarga. Enquanto a primeira afeta a dinâmica e os processos de colisão que ocorrem tanto na fase plasmática como no crescimento superficial do filme, o segundo pode estar relacionado principalmente à transferência de energia do campo elétrico aplicado às espécies presentes na descarga, bem como ao alvo e ao substrato. Enquanto a via de síntese sol-gel é adequada para a obtenção de nanopartículas dentro de uma matriz de óxidos, o sputtering induzido por radio-frequência apresenta uma abordagem favorável para a deposição de “clusters” metálicos na superfície externa de um determinado substrato. Além disso, quando um sistema preparado por sol-gel é usado como suporte para deposições por RF, tem-se o preparo híbrido de materiais, que pode apresentar uma estratégia vantajosa na produção de nanocompósitos com características específicas e condições controladas.

O objetivo do estudo de Silva et al.⁴⁶ 2010 foi avaliar a bioatividade e a arquitetura dos biofilmes de *Candida albicans* desenvolvidos na superfície da resina de poli (metacrilato de metilo) (PMMA). Para isso, foram medidas a rugosidade superficial (SR) e a energia livre da superfície de amostras confeccionadas de PMMA, seguindo-se as recomendações do fabricante. Em seguida, os biofilmes de duas cepas diferentes de *C. albicans* (ATCC 90028 e SC5314) foram desenvolvidos na superfície das amostras de PMMA e avaliados após 24, 48 e 72 h da fase de adesão. A bioatividade dos biofilmes foi medida pelo ensaio de redução XTT e a topografia do biofilme foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. A microscopia confocal foi utilizada para avaliar as propriedades arquitetônicas do biofilme, incluindo volume, espessura média, rugosidade do biofilme, razão área / volume e proporção de células vivas / mortas nos diferentes estágios de desenvolvimento do biofilme. Os resultados demonstraram que SR e SFE não influenciaram o desenvolvimento do biofilme. Cada cepa de *Candida* exibiu uma atividade de biofilme diferente ($P < 0,001$), sendo que a cepa de *C. albicans* SC5314 apresentou maior atividade após 48h de crescimento. As imagens

de confocal mostraram arquiteturas diferentes para os diferentes estádios de desenvolvimento do biofilme, sendo que *C. albicans* ATCC90028 apresentou biofilme de maior volume e espessura, e *C. albicans* SC5314 apresentou biofilme com superfície irregular e rugosidades maiores nos tempos de 48 e 72h. A proporção de células vivas e mortas foi diferente para cada estágio de formação do biofilme. Os autores concluíram que as principais diferenças detectadas na bioatividade e na arquitetura do biofilme foram relacionadas às características de cada cepa de *C. albicans* e ao tempo de desenvolvimento do biofilme.

Wady et al.¹⁷⁶ em 2012 avaliaram, primeiramente, a atividade de uma solução de nanopartículas de prata contra *Candida albicans* e, em seguida, o efeito da incorporação das nanopartículas numa resina acrílica utilizada como base de próteses orais sobre a hidrofobicidade do material, a adesão de *C. albicans* e a formação de biofilme. A solução de AgNPs foi sintetizada por redução química e caracterizada através de UV-Vis, FTIR e dispersão dinâmica de luz. A atividade antifúngica contra *C. albicans* ATCC 90028, e foram determinados a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de células planctônicas da solução AgNPs. Os autores também prepararam espécimes (n = 360) de resina acrílica com AgNPs incorporadas com concentrações de 1000, 750, 500, 250 e 30 ppm, que foram confeccionados e posteriormente armazenados em PBS durante 0, 7, 90 e 180 dias. O controle foi resina acrílica sem AgNPs (0 ppm). Após os períodos de armazenamento, os ângulos de contato foram medidos e as amostras foram usadas em ensaios microbiológicos, para a adesão de *C. albicans* (37° C; 90 min; n = 9) e a formação de biofilme (37° C; n = 9; 48 h), que foram avaliadas por ensaio de XTT. A incorporação de AgNPs reduziu a hidrofobicidade da resina. Não se observou qualquer efeito na aderência e formação de biofilmes sobre os espécimes com AgNPs incorporadas. Aos 90 e 180 dias de armazenamento, houve aumento significativo na aderência e formação de biofilme. Os valores de CIM e CFM para células planctônicas foram, respectivamente, 3,98 e 15,63 ppm, e para biofilme a concentração requerida para inibição foi de 1000ppm. Embora a solução de AgNPs tenha apresentado atividade antifúngica, não foi observado nenhum efeito na aderência e formação de biofilme de *C. albicans* após sua incorporação em uma resina de base de prótese dentária. Assim, os autores concluíram que a solução AgNPs sintetizado é um agente antifúngico promissor, sendo necessárias maiores investigações de métodos mais eficientes de incorporação em resinas de base de prótese.

Mercier-Bonin et al.¹¹⁸ em 2012 realizaram uma série de revestimentos mediados por plasma, contendo nanopartículas de prata embebidas em organossilicone ou matriz

semelhante a sílica, depositadas sobre aço inoxidável e caracterizadas quimicamente. O processo de deposição de filmes a plasma utilizado pelos autores foi o método dual, de pulverização catódica em alvo de Ag e deposição de organossilicone hexametil- dissiloxano (HMDSO) em ambiente de argônio, simultaneamente, em descarga de radio-frequência (RF) de 13,56 MHz. Argônio puro foi usado como um gás de vetor, injetado no reator a uma velocidade de fluxo de 3,1 sccm e pressão parcial constante de 5,32 Pa. As suas propriedades anti-adesivas foram avaliadas in vitro com o microrganismo *Escherichia coli*, onde foram realizados experimentos de desprendimento celular por fluxo de cisalhamento, onde a superfície de revestimento onde as células se encontram aderidas é exposta a arrasto hidrodinâmico, e a taxa de desprendimento das células do substrato correlaciona-se diretamente com seu comportamento adesivo. O aumento da tensão de cisalhamento na superfície facilitou o desprendimento de células de *E. coli*, independentemente das características de revestimento. Quando nanopartículas de Ag foram incorporadas, o desprendimento celular foi menor, provavelmente devido à afinidade da prata incorporada para componentes biológicos da parede celular. A presença de grupos metilo na rede matricial também poderia promover interações hidrófobas melhoradas. Dentro da fração de população celular que permaneceu ligada ao revestimento sob fluxo de cisalhamento crescente, foram observados diferentes fenótipos de associação, estendendo-se progressivamente de forma plana, movendo-se lateralmente, permanecendo estática, ou girando por um único ponto de ancoragem, até alinhamento do longo eixo da célula bacteriana com a direção do fluxo. Este fenótipo de re-orientação e sua relação com o desprendimento foram dependentes do revestimento. Segundo os autores, os efeitos de tais heterogeneidades devem ser explorados mais profundamente.

Em 2012, Gow e Hube⁷² publicaram uma revisão de literatura onde estudaram sobre a importância da parede celular da *Candida albicans* para sua capacidade de infecção e comensalismo. Durante infecções em pacientes imunocomprometidos, esse microrganismo tem a capacidade de colonizar e se multiplicar em quase todos os órgãos do corpo humano, e em condições normais é um comensal de mucosa, predominantemente mucosa gastrointestinal. Durante a patogênese, três estágios podem ser distinguidos: I) adesão; II) invasão e III) dano. Durante esses estágios, um processo inflamatório se inicia, e o fungo passa de comensal para uma interação parasitária no hospedeiro. A invasão dos tecidos é dependente das hifas, e pode ocorrer através de duas formas: endocitose induzida e penetração ativa. A endocitose induzida é uma atividade dirigida pelo hospedeiro através da qual Als3

liga-se nas células epiteliais ou endoteliais de um hospedeiro, e a penetração ativa requer que as células do hospedeiro entrem em contato direto com o fungo, há a formação de um vacúolo, danos na integridade da parede celular e outras forças, que promovem a penetração da hifa no tecido. A parede celular da *C. albicans* é composta por 90% de carboidratos e 10% de proteínas. O reconhecimento imunitário e as proteínas têm o papel fundamental nas interações adesivas com superfícies hospedeiras de células. Contudo, proteínas da parede celular também são relevantes como antígenos, por exemplo Als3, e sabe-se que algumas proteínas associadas ou segregadas à parede celular, tais como as proteases aspárticas, são reconhecidas por células imunes. As hifas invasivas induzem a ativação dos complexos inflamatórios e induzem o recrutamento de neutrófilos, que operam para conter a invasão e tentativa de infecção. Muitos dos mecanismos de homeostase e ativação imune inata são controladas ou desencadeadas por moléculas da parede da célula fúngica, sendo assim, as proteínas da parede celular representam fatores de virulência. Os carboidratos da parede celular fúngica induz tanto a resposta imunológica protetora quanto a potencialmente patogênica, devido à exacerbação da resposta inflamatória.

O objetivo do estudo de Foggi et al.⁶⁶ de 2014 foi avaliar o efeito da rugosidade superficial (rugosidade média [Ra] μm) sobre a hidrofobicidade de uma resina acrílica à base de prótese dentária e a aderência inicial e formação de biofilme de *Candida albicans*. Os espécimes confeccionados de PMMA em forma de discos foram divididos em seis grupos: Ra 0,05, Ra 0,2, Ra 0,4, Ra 0,8, Ra 1,5 e Ra 3,0. Os ângulos de contato com água (WCA) foram medidos e os espécimes incubados com *C. albicans* por 90 min (aderência inicial, n = 108) ou 48 h (formação de biofilme, n = 108). As células aderidas e as células que compuseram o biofilme foram avaliadas por contagem de UFC/mL e sua bioatividade foi mensurada através do ensaio de redução do XTT, e a correlação entre os dois métodos foi avaliada. A superfície dos espécimes e células (aderidos e biofilme) também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os grupos Ra 0,05 e 3,0 apresentaram os valores médios de ângulo de contato mais baixos ($\sim 75^\circ$) e os maiores ($\sim 100^\circ$), respectivamente. Tanto para a adesão inicial como para a formação de biofilme, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre todos os grupos, como determinado por UFC/mL e XTT. Os autores encontraram uma correlação positiva entre estes dois métodos neste estudo. A análise em MEV mostrou a presença de riscos e vales nas amostras de acrílico e células de levedura densamente compactadas que cobrem toda a superfície. Dessa maneira, os autores concluíram que a rugosidade aumentou significativamente a hidrofobicidade (WCA), mas não

teve efeito sobre o número e a atividade metabólica das células aderentes e de biofilme de *C. albicans*.

Dutheil et al.⁵⁴ 2015 depositaram filmes finos de prata com espessura variando de 3 nm a 33 nm por pulverização catódica sobre placas de silício e camadas de tungstênio. Anteriormente ao processo de deposição da Ag, o W foi depositado nas amostras de silício por pulverização catódica variando as condições experimentais, como pressão de argônio e distância entre o alvo e o substrato, com a finalidade de se obter diferentes morfologias superficiais após a deposição. As observações em MEV e as imagens obtidas por microscopia de força atômica mostraram que o modo de crescimento dos filmes de Ag é semelhante em substratos de Si e nas camadas W mais lisas, enquanto que é diferente para camadas rugosas de W, que apresentam superfície com picos intensos. O efeito da morfologia da camada de W sobre o crescimento da película de Ag foi claramente evidenciado quando a deposição ocorreu a temperaturas elevadas. A propriedade de molhabilidade dos depósitos de Ag nas amostras de W/Si foi comparada com o depósito realizado somente nas amostras de Si, que apresentaram superfície hidrofóbica, com ângulos de contato maiores que 90 °. Já os depósitos sobre filmes de W, apresentaram característica mais hidrofílica. Com esse estudo, os autores verificaram que a realização da deposição sobre substratos de várias morfologias permite adaptar a molhabilidade dos depósitos de Ag.

No trabalho de Abanto⁹ de 2016, a caracterização de filmes finos de prata depositados em substratos de SiO₂ / Si, pelo método da deposição física a vapor foram realizadas. A espessura dos filmes depositados foi de 100 nm, e foram induzidas modificações estruturais nos filmes aplicando-se diferentes tratamentos térmicos com temperaturas compreendidas entre 250 a 1100°C. Foram realizadas caracterizações por DRX e a morfologia estrutural superficial foi determinada por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica, Com base nos resultados, o autor pode concluir que houve diferença nas morfologias superficiais com as variações de temperatura, onde foi observado a formação de ilhas de Ag devido à mecanismos de autodifusão. Houve uma melhoria na cristalização dos filmes com os tratamentos térmicos até 850°C na direção (111). No entanto, para temperaturas acima desta, houve uma modificação da direção de crescimento, de (111) para (200).

Filmes finos de nanocompósitos de ouro e alumínio foram depositados por Belahmar et al.¹⁹ (2016) sobre substratos de vidro pelo método de sputtering induzido por radio-frequência, a temperatura ambiente. Após a deposição, foi realizado tratamento térmico para a

formação de nano “*clusters*” de ouro. Os estudos de DRX confirmaram a presença de nanopartículas de ouro depositadas sobre uma matriz de alumínio amorfa. Após o tratamento térmico, a intensidade dos picos do difratograma aumentaram ligeiramente, evidenciando uma melhora na cristalinidade do filme com a temperatura. Os espectros de absorção óptica para os filmes depositados e tratados ou não termicamente, revelou uma absorção na região de comprimento de onda curto, e uma ampla absorção na região aproximada de 500nm, que foi atribuído às partículas de ouro. A intensidade da absorção aumentou progressivamente junto com o aumento da temperatura em que os filmes foram submetidos. Os autores atribuíram esse efeito ao aumento no tamanho das partículas metálicas, e à movimentação dos elétrons do filme, que podem ter interagido com a radiação incidente.

3 PROPOSIÇÃO

Diante do exposto nos capítulos anteriores, os objetivos deste estudo foram sintetizar e caracterizar compostos associados à prata e avaliar seu efeito antimicrobiano em relação à inativação de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina – SARM, *Escherichia coli* e *Candida albicans* na forma planctônica, e à inibição de formação de biofilmes desses microrganismos. Além disso, revestimentos contendo Ag foram depositados sobre resina acrílica por meio de co-pulverização assistida à plasma, caracterizados e avaliados quanto ao efeito na adesão de *C. albicans*.

4 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização da fase experimental do presente estudo, foram utilizados os seguintes materiais de consumo, instrumentos e equipamentos:

Materiais

1. Água destilada;
2. Água mili-Q;
3. Alça de inoculação 10 μ L, estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil);
4. Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
5. Cloreto de Potássio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
6. Cloreto de Sódio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
7. Cubeta de 4,5 mL (Cartel, SP, Brasil);
8. Cultura de *C. albicans* (ATCC 90028 - *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA);
9. Cultura de *S. aureus* methicillin-resistant (MRSA – ATCC 33491 - *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA);
10. Cultura de *E. coli* (ATCC 8739 - *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA);
11. Frasco coletor universal translúcido estéril 80mL (Cral, Cotia, SP, Brasil);
12. Glicose (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
13. Kit fluorimétrico Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)
14. Lâminas Histobond+ (Raymond A Lamb, Eastbourne, Reino Unido);
15. Meio de cultura Mannitol Salt Agar (Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA);
16. Meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
17. Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com clorofenicol (Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA);
18. Meio de cultura Trytic Soy Broth (TSB - Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA);
19. Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, MI, EUA);
20. Meio de cultura Mueller Hinton Ágar (MHA - Acumedia Manufactures Inc. Baltimore, Maryland, EUA);

20. Meio de cultura Mueller Hinton Broth (MHB - Acumedia Manufactures Inc. Baltimore, Maryland, EUA);
21. Menadiona (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
22. Microtubos tipo Eppendorfs Graduado (Axygen, Curitiba, PR, Brasil);
23. Nitrato de prata (Ag_2NO_3 , Sigma-Aldrich);
24. Parafilme (Laboratory Film, Chicago, IL, EUA);
25. Paraformaldeido (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
26. Placas de 24 poços de fundo chato e estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
27. Placas de 96 poços de fundo chato e estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
28. Placas de 96 poços específica para testes de fluorescência (Greiner Bio ONE, Frickenhausen, Germany);
29. Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis e estéreis (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);
30. Ponteiras brancas para micropipeta 10 μL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
31. Polivinilpirrolidona (PVP – $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}$, Sigma-Aldrich);
32. Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 μL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
33. Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 μL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
34. Ponteiras para micropipeta 5 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
35. Ponteiras para micropipeta 10 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
36. Resina acrílica termopolimerizável em micro-ondas (Vipi Wave, VIPI Indústria e Comércio de Importação Odontológica de Produtos Odontológicos Ltda Pirassununga, SP);
37. Sistema de filtração a vácuo estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
38. Solução de hidróxido de amônio 34% (Sigma-Aldrich);
39. Tubos tipo Falcon de 50 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).
40. Tungstato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich).

Instrumentos

1. Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);

2. Bico de Bunsen (J.Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);
3. Proveta graduada (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).
4. Erlenmeyer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
5. Micropipeta de 0,1-10 μL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
6. Micropipeta de 20-200 μL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
7. Micropipeta de 100-1000 μL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
8. Micropipeta de 1-5 mL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
9. Micropipeta de 1-10 mL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
10. Micropipeta Multicanal Discovery Comfort, 12 Canais, 50-300 μL (HTL, Warsaw, Polônia);
11. Pinça clínica (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);

Equipamentos

1. Aparelho de Espectroscopia Raman LabRAM HR 800nm (Horiba; Jobin-Yvon, França);
2. Aparelho de espectroscopia de UV-Vis Varian Modelo Cary 5G;
3. Aparelho de espectroscopia FTIR Jasco FTIR 410;
4. Agitador de tubos Modelo: AP 56 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);
5. Agitador magnético Modelo: 78HW-1 (Andrade's Comércio e materiais Ltda, São Paulo, SP, Brasil);
6. Autoclave vertical Modelo: AV 60 No 6614 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);
7. Balança de precisão Modelo: BG 400 No 016450 (Gehaka – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil);
8. Bomba a vácuo (Fanen, São Paulo, SP, Brasil);
9. Câmara de fluxo laminar vertical, Modelo: PA 115. No. 12898 (Pachane Ind. e Com. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil);
10. Centrífuga de microtubos Modelo: 2410 (Fanem, São Paulo, SP, Brasil);
11. Centrífuga de tubos Falcons Modelo: 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha);
12. Contador de colônias Modelo: CP 600 Plus (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);
13. Difractômetro de Raios-X Rigaku modelo D/Max-2500PC (DRX, Japão);
14. Espectrofotômetro – Biospectro Modelo: SP-220 (Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil);

15. Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);
16. Estufa para secagem e esterilização Modelo: MA 033 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);
17. Freezer -80°C (Thermo Scientific, EUA);
18. Gôniômetro Ramé-Hart 100-00 (NRL, USA);
19. Incubadora de bancada shaker Modelo: Q816M20 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil);
20. Leitora de Microplacas TP Reader-Basic (ThermoPlate, São Paulo, SP, Brasil);
21. Micro-ondas Brastemp Crisp 27 (Brastemp, Manaus, AM, Brasil);
22. Microscópio Eletrônico de Varredura por emissão de campo (MEV-EC - Zeiss DSM 940A); Inspect F50 (FEI Company, Hillsboro, OR);
23. Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM 2100F TEM/STEM) acoplado com EDX Thermo-Noran;
24. Microscópio confocal a laser Zeiss modelo LSM 780 invertido (Carl Zeiss, Jena, Alemanha);
25. Microscópio de força atômica (MFA - Bruker Nanoscope V, Santa Barbara, CA, EUA);
26. Monocromador Monospec 27 (Thermal Jarrel Ash, EUA) acoplado a fotomultiplicador R955 (Hamamatsu Photonics, Japão);
27. Perfilômetro de alta resolução Veeco, Dektak 150 (Veeco Instruments Inc., NY, EUA);
28. Sensor de temperatura Modelo CNT – 120 (INCON Electronic LTD, São Carlos, Brasil);
29. Ultrassom (Kondortech, São Carlos, Brasil).

A parte experimental deste estudo foi dividida em duas etapas. Na primeira, compostos (óxidos bimetálicos) associados à prata foram sintetizados, caracterizados e seus efeitos antimicrobianos avaliados contra três microrganismos. Na segunda etapa, a superfície do biomaterial PMMA foi revestida com filme de Ag/SiO₂, visando inibir a adesão de *C. albicans*. Os materiais e métodos utilizados nessas duas etapas serão descritos a seguir.

Etapa I

Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana dos compostos contendo prata

Nesta etapa da pesquisa foram sintetizados dez compostos. A Tabela 1 apresenta os microcristais obtidos, os métodos e as condições de síntese, as técnicas de caracterizações utilizadas e os microrganismos avaliados nos testes de atividade antimicrobiana.

Tabela 1 - Métodos e condições de síntese, caracterizações e microrganismos avaliados de acordo com os microcristais obtidos.

Cristal	Síntese	Surfactante	Solvente	Caracterizações	Microrganismos
Ag ₂ WO ₄ irradiado	Hidrotermal assistida por micro-ondas	PVP	Água	DRX, Espectroscopia Raman, UV-Vis, MEV-EC, MET e EDX.	SARM
Ag ₂ WO ₄ não-irradiado	Hidrotermal assistida por micro-ondas	PVP	Água	DRX, Espectroscopia Raman, UV-Vis, MEV-EC, MET e EDX.	SARM
Ag ₂ WO ₄	Co-precipitação	PVP	Água	DRX, MEV-EC	<i>C. albicans</i>
Ag ₂ MoO ₄	Co-precipitação	-	Água	DRX, MEV-EC	<i>C. albicans</i>
Ag ₂ WO ₄	Co-precipitação	-	Água, amônia ou álcool	DRX, Espectroscopia Raman, UV-Vis, MEV-EC, PL	SARM, <i>C. albicans</i> e <i>E. coli</i>
Ag ₂ MoO ₄	Co-precipitação	-	Água, amônia ou álcool	DRX, MEV-EC, Espectroscopia Raman, UV-Vis	SARM, <i>C. albicans</i> e <i>E. coli</i>

Fonte: Elaboração própria.

4.1 Microcristais de α -Ag₂WO₄ com e sem Irradiação

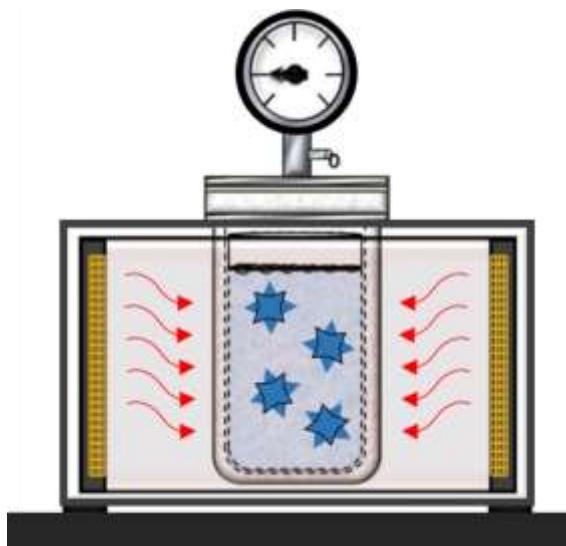
4.1.1 Síntese

Microcristais de tungstato de prata (Ag₂WO₄) foram sintetizados por meio da Síntese Hidrotérmica Assistida por Micro-ondas (HAM), a 120°C durante 1 h, com 1 g de polivinilpirrolidona (PVP – C₆H₉NO), com peso molecular 40000 e grau de pureza de 99%. Para obtenção dos cristais, 1x10⁻³ mol de tungstato de sódio dihidratado (Na₂WO₄ 2H₂O) com grau de pureza de 99,5% e 2x10⁻³ mol de nitrato de prata (Ag₂NO₃) com grau de pureza de

99,8% foram dissolvidos, separadamente, em água deionizada contidos em dois tubos tipo Falcon de 50 mL. Antes da dissolução dos sais, 0,5 g do surfactante PVP foi dissolvido em cada um dos tubos. Em seguida, as duas soluções foram transferidas para um recipiente de teflon, que foi selado e inserido dentro de um sistema de micro-ondas doméstico adaptado (Figura 1), e processado durante 1 h a 120°C, sem agitação. A temperatura do sistema foi monitorada durante seu processamento por um sensor de temperatura. Os microcristais de α - Ag_2WO_4 resultantes da reação foram lavados em água deionizada e acetona para remoção de íons Na^+ remanescentes e componentes orgânicos. Após a lavagem, os microcristais foram secos à temperatura ambiente durante 6 h.

Para a obtenção dos filamentos metálicos de Ag, os microcristais de α - Ag_2WO_4 , resultantes da síntese descrita anteriormente, foram submetidos à irradiação de elétrons em microscópio eletrônico de varredura operado à 30 kV durante 30 minutos.

Figura 1 - Micro-ondas doméstico adaptado utilizado na síntese HAM.



Autor: Adaptado de Sczancoski¹⁴⁹.

4.1.2 Caracterização

Os microcristais de α - Ag_2WO_4 e α - Ag_2WO_4 com nanofilamentos de Ag foram estruturalmente caracterizados por meio de padrões de DRX, utilizando radiação Cu- $K\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) e taxa de varredura de 0,02°/min para o intervalo de 2θ de 10° a 70°. A varredura foi realizada com ângulo de incidência μ igual a 2°, com passo angular (“*step scan*”) de 0,02° e tempo de passo (“*step time*”) de 2 segundos.

As mensurações de Raman foram registradas utilizando-se um equipamento modelo LabRAM HR 800nm. Espectros Raman de alta resolução foram obtidos através de laser de He-Ne a 632,81nm operado a 25-1000 cm^{-1} .

Espectroscopia de UV-Visível foi realizada através de espectrofotômetro Varian no modo de reflectância difusa.

A morfologia e o tamanho dos microcristais foram analisados através de Microscopia Eletrônica de Varredura por emissão de campo (MEV-EC) modelo Inspect F50, operado à 15 kV. Quando o feixe de elétrons começou a atingir a amostra, foi considerado como tempo zero, tendo sido os nanofilamentos de Ag observados após 30 minutos de irradiação.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi realizada utilizando modelo JEM 2100F TEM/STEM operado à 200 kV. Análise química das amostras foi obtida por meio de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX) utilizando-se um detector modelo EDX Thermo-Noran acoplado ao MET. Para análise em MET, as amostras foram dispersas em acetona e submetidas a ultrassom durante 10 minutos, para desagregação, e posteriormente depositadas em grades de cobre (Cu).

4.1.3 Atividade antibacteriana contra SARM

Para avaliar a atividade antibacteriana dos compostos sintetizados foi utilizado o método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), de acordo com as normas descritas por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI – documento M7-A7, 2006)⁴¹, com modificações. Para isso, cepa padrão de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (SARM) obtido da *American Type Culture Collection* (ATCC 33591) foi utilizada para o teste. Para o preparo do inóculo, uma alíquota de SARM foi descongelada e plaqueada em Mannitol Salt Agar (Acumedia Manufactures Inc. Baltimore, Maryland, EUA) e incubada em estufa de crescimento a 37°C durante 48 horas. Após a incubação, uma alçada do microrganismo foi transferida para 10 mL de meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB, Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland, USA) e incubada em estufa de crescimento com agitação orbital de 75 rpm, à 37°C “overnight”. Após esse período, as células de SARM foram centrifugadas a 5000 g durante 5 minutos e lavadas duas vezes com PBS (Phosphate-Buffered Saline, pH 7,2), em seguida foram ressuspensas novamente em meio de cultura TSB. A concentração do inóculo foi determinada através de espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm, e a densidade ótica (DO) foi

ajustada em valor correspondente a 1×10^7 células/mL, para posterior diluição conforme as normas do CLSI.

CIM e CBM foram determinadas após incubação do microrganismo em placa de cultura de 96 poços durante 24 h a 37°C, expostos a diluições seriadas dos microcristais em meio de cultura TSB. Um tubo tipo Falcon contendo meio de cultura e os microcristais na maior concentração (2000 µg/mL) foi colocado em aparelho de ultrassom durante aproximadamente 10 minutos para que os microcristais permanecessem suspensos no meio. A seguir, foram realizadas diluições seriadas obtendo-se as concentrações dos microcristais avaliadas, que variaram de 1000 a 1,95 µg/mL. Meio de cultura com SARM e sem microcristais foi utilizado como controle positivo para o crescimento do microrganismo, e meio de cultura estéril foi utilizado como controle negativo. Para as duas amostras, a CIM foi definida como a menor concentração dos microcristais que inibiu o crescimento do microrganismo, determinado por inspeção visual. Para determinação da CBM, alíquotas de 100 µL provenientes de cada poço foram removidas e diluídas em microtubos contendo 900 µL de PBS (diluições de 10^{-1} a 10^{-8}). Depois, foram plaqueados 25 µL de cada diluição em placas contendo meio de cultura. Os plaqueamentos foram realizados em duplicata, e após 48 h de incubação das placas a 37°C, unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) foram calculadas e o resultado transformado em \log_{10} . A CBM foi determinada como a menor concentração dos microcristais que resultou em inviabilidade dos microrganismos, observada através de contagem de UFC/mL.

Todos os testes microbiológicos foram realizados em triplicata e em três ocasiões distintas.

4.2 Microcristais de α -Ag₂WO₄ com Surfactante

4.2.1 Síntese

Para a síntese, foram utilizados somente reagentes químicos de grau analítico sem purificação adicional. Os microcristais de tungstato de prata α -Ag₂WO₄ foram obtidos pelo método da co-precipitação, utilizando PVP como agente estabilizador. O procedimento de síntese foi realizado como descrito a seguir. Separadamente, 1 mmol de tungstato de sódio dihidratado e 2 mmol de nitrato de prata AgNO₃ com 0,1 g de PVP foram dissolvidos em 50 mL de água deionizada. As duas soluções foram mantidas sob agitação contínua e aquecidas a 70°C. Em seguida, a solução contendo o AgNO₃ foi rapidamente adicionada à solução de

tungstato e a temperatura foi mantida a 70°C por 10 min. Os precipitados resultantes, de coloração cinza escuro, foram lentamente resfriados até a temperatura ambiente, lavados com água destilada e acetona e secos a 60°C por 24 h.

4.2.2 Caracterização

Os microcristais de α -Ag₂WO₄ foram estruturalmente caracterizados por meio de padrões de DRX utilizando radiação Cu- K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) e taxa de varredura de 0,02°/min para o intervalo de 2 θ de 10° a 70°. Os difratogramas obtidos foram comparados com os padrões do arquivo “ICSD” (*Inorganic Crystal Structure Database*) do material estudado. A morfologia (tamanho e forma) dos microcristais foi avaliada com um microscópio eletrônico de varredura por emissão de efeito de campo (MEV-EC), utilizando-se a tensão de aceleração de 5,0 kV.

4.2.3 Efeito antifúngico contra *C. albicans*

Para avaliar o efeito antifúngico dos microcristais sintetizados, foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) contra células planctônicas utilizando o ensaio descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* – (CLSI)⁴². A CIM foi determinada como sendo a concentração da solução de α -Ag₂WO₄ na qual não houve nenhum crescimento visível e o valor de CFM foi definido como sendo a menor concentração que resultou em ausência de crescimento nas placas de cultura¹⁹². Foi utilizada uma cepa padrão de *Candida albicans*, adquirida da coleção da *American Type Culture Collection* (ATCC 90028). Para preparar o inóculo, *C. albicans* foi semeada em Sabouraud Dextrose Agar contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol e incubada a 37°C por 48 h. Uma alçada desta cultura foi, então, transferida para 10 mL de meio de cultura RPMI-1640 e incubada em agitador orbital “overnight” a 37°C e 75 rpm. A seguir, as células de *C. albicans* foram centrifugadas a 5000 g por 5 min, lavadas duas vezes com solução salina tamponada (PBS, pH 7,2) e ressuspensas em meio RPMI-1640 em concentração de 10⁷ UFC/mL, ajustando a densidade óptica da suspensão para 0,6 a 540 nm. Um tubo tipo Falcon contendo RPMI-1640 e os microcristais na maior concentração (2000 $\mu\text{g/mL}$) foi colocado em aparelho de ultrassom durante aproximadamente 10 minutos para que os microcristais permanecessem suspensos no meio. A seguir, foram realizadas diluições seriadas obtendo-se as concentrações dos microcristais avaliadas, que variaram de 1000 a 1,95 $\mu\text{g/mL}$. CIM e CFM foram

determinados por meio da incubação das células de *C. albicans* em placas de 96 orifícios contendo 100 μL da solução de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ nas diversas concentrações. Meio RPMI-1640 inoculado, sem solução de microcristais, foi utilizado como controle positivo, e meio RPMI-1640 não inoculado com o fungo foi empregado como controle negativo, tendo sido submetidos às mesmas condições experimentais. Para estabelecer o valor de CFM, alíquotas obtidas de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) de cada orifício das placas foram inoculadas (25 μL) em placas contendo SDA, em duplicata, e incubadas por 48 h a 37°C . Em seguida, as unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foram calculadas e transformadas em log na base 10 (\log_{10}). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas em três ocasiões distintas. Considerando que os dados amostrais apresentaram normalidade e homocedasticidade, eles foram analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA) para um fator, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Microscópio eletrônico de varredura foi utilizado para observar alterações morfológicas da *C. albicans* quando expostas aos microcristais de tungstato de prata. Para esta análise, as suspensões de *C. albicans* foram inoculadas em discos de poliestireno colocados em microplaca de 24 poços. Após 90 min, o meio de cultura foi aspirado e as células não aderidas foram removidas por lavagem duas vezes com 2 mL de PBS. A solução de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ em concentrações sub-inibitórias foi então adicionada aos poços, e incubada durante 24 h a 37°C . Os controles foram discos de poliestireno inoculados com *C. albicans* por 24 h a 37°C , sem os microcristais. Após a incubação, os discos foram fixados em paraformaldeído a 4% durante 4 horas à temperatura ambiente, desidratados com uma série de etanol crescente (etanol a 70% durante 10 min, etanol a 95% durante 10 min e etanol a 100% durante 20 min) e secos durante 1 hora. Em seguida, os discos foram montados em *stubs* e revestidos com ouro antes da análise.

4.3 Microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$

4.3.1 Síntese

Para a síntese, foram utilizados somente reagentes químicos de grau analítico sem purificação adicional. Os microcristais de molibdato de prata $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ foram obtidos pelo método da co-precipitação. O procedimento de síntese foi realizado como descrito a seguir: 1 mmol de molibdato de sódio di-hidratado e 2 mmol de nitrato de prata AgNO_3 foram

dissolvidos separadamente em dois tubos em 50 mL de água deionizada, formando assim duas soluções (solução 1 e 2, respectivamente). A solução 2 foi, então, adicionada gota a gota na solução 1, sob vigorosa agitação magnética, à temperatura ambiente. Após a formação do precipitado, o mesmo foi lavado com água destilada e acetona e seco a 60°C por 24 h.

4.3.2 Caracterização

Os microcristais de β -Ag₂MoO₄ foram estruturalmente caracterizados por meio de padrões DRX utilizando radiação Cu- K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) e taxa de varredura de 0,02°/min para o intervalo de 2θ de 10° a 70°. A varredura foi realizada com ângulo de incidência μ igual a 2°, com passo angular (“*step scan*”) de 0,02° e tempo de passo (“*step time*”) de 2 segundos. Os difratogramas obtidos foram comparados com os padrões do arquivo “ICSD” (*Inorganic Crystal Structure Database*) do material estudado. A morfologia (tamanho e forma) dos microcristais foi avaliada com um MEV-EC, utilizando-se a tensão de aceleração de 5,0 kV.

4.3.3 Efeito antifúngico contra *C. albicans*

Para avaliação do efeito antifúngico contra *C. albicans* dos microcristais sintetizados, foi utilizada a metodologia descrita no item 4.2.3.

4.4 Microcristais de α -Ag₂WO₄ em Diferentes Solventes

4.4.1 Síntese

Os microcristais de α -Ag₂WO₄ foram sintetizados pelo método de co-precipitação utilizando-se água, álcool e amônia como solventes, sem a adição de surfactantes. Para a síntese onde foi utilizada água como solvente, em uma primeira etapa, 1 mmol de tungstato de sódio di-hidratado foi solubilizado em 50 mL de água deionizada (solução 1). Separadamente, 2 mmol de nitrato de prata foram dissolvidos em 50 mL de água deionizada (solução 2). A solução 2 foi, então, adicionada gota a gota, à solução 1 sob agitação magnética vigorosa e aquecida a 90°C por 10 minutos. O pH da solução foi monitorado, e mantido o mesmo valor (pH~8). O precipitado foi coletado por centrifugação, a solução foi lavada várias vezes com água e etanol, até atingir o pH = 7, indicando que os íons de Na⁺ e NO₃⁻ remanescentes da síntese foram eliminados, e posteriormente foi realizada a secagem a 60°C por 12 h. Na

síntese em que o álcool foi empregado como solvente, inicialmente, 1 mmol de tungstato de sódio dihidratado foi solubilizado em 50 mL de solução alcoólica (composta por 25 mL de álcool e 25 mL de água) (solução 1). Separadamente, 2 mmol de nitrato de prata foram dissolvidos em 50 mL de água (solução 2). Em seguida, a solução 2 foi adicionada, gota a gota, à solução 1 sob vigorosa agitação magnética e aquecida a 90°C por 10 min, com o pH mantido constante (pH ~ 6). O precipitado foi coletado por centrifugação, a solução foi lavada várias vezes com água e etanol até pH = 7, indicativo da ausência dos íons Na⁺ e NO₃⁻. A secagem foi realizada a 60 °C por 12 h. Quando o solvente utilizado foi amônia, a solução 1 foi preparada por meio da dissolução de 1 mmol de tungstato de sódio dihidratado em 50 mL de água deionizada e solução hidróxido de amônio foi adicionado ao sistema, gota a gota, até o pH da solução atingir 11. Paralelamente, 2 mmol de nitrato de prata foram dissolvidos em 50 mL de água deionizada (solução 2). Posteriormente, a solução 2 foi adicionada, gota a gota, na solução 1, sob agitação magnética vigorosa e aquecimento à temperatura de 90 °C por 10 min. O pH da solução foi verificado tendo sido observado valor constante (pH ~ 14). Por meio de centrifugação, o precipitado foi coletado e submetido à lavagem, várias vezes, com água e etanol até pH = 7, evidenciando que não havia mais a presença de íons Na⁺ e NO₃⁻ e, em seguida, foi realizada a secagem a 60°C por 12 h.

4.4.2 Caracterização

Os microcristais de α -Ag₂WO₄ foram estruturalmente caracterizados por meio de padrões de DRX com radiação Cu- K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) e taxa de varredura de 0,02°/min para o intervalo de 2 θ de 10° a 70°. Medições de espectroscopia Raman foram realizadas utilizando um espectrômetro T64000 (Horiba Jobin-Yvon, Japão) acoplado a um detector CCD Synapse e um laser de íon argônio, operando a 514 nm com potência máxima de 7 mW. Os espectros foram medidos na gama de 280-950 cm⁻¹. Os espectros UV-Vis foram obtidos utilizando um espectrofotômetro no modo de reflexão difusa. A morfologia das amostras foi examinada utilizando MEV-EC operado a 15 kV. As medições de fotoluminescência (PL) foram realizadas com monocromador Monospec 27 acoplado com um fotomultiplicador. Utilizou-se um laser de íons (Coherent Innova 200 K, EUA; $\lambda = 350 \text{ nm}$) como fonte de excitação com potência incidente de aproximadamente 14 mW na amostra. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

4.4.3 Efeito antimicrobiano contra SARM, *C. albicans* e *E. coli*

Para caracterização do efeito antimicrobiano dos compostos sintetizados, foi avaliada sua ação antifúngica contra *C. albicans*, de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.3. Para avaliação da atividade antibacteriana contra SARM, foi utilizada metodologia descrita no item 4.1.3. A atividade antibacteriana dos compostos sintetizados foi também analisada com o microrganismo *E. coli*, utilizando o método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), de acordo com as normas descritas por *Clinical and Laboratory Standards Institute*⁴¹, com modificações. Para isso, cepa de *E. coli* ATCC 8739 foi utilizada para o teste. Para preparo do inóculo, uma alíquota de *E. coli* foi descongelada e plaqueada em Mueller Hinton Ágar e incubada em estufa de crescimento à 37°C durante 24 horas. Após a incubação, uma alçada do microrganismo foi transferida para 10 mL de meio de cultura Mueller Hinton Broth e incubada em estufa de crescimento com agitação orbital de 75 rpm, à 37°C “overnight”. Após esse período, as células de *E. coli* foram centrifugadas a 5000 g durante 5 minutos e lavadas duas vezes com PBS e, em seguida foram ressuspensas novamente em meio de cultura Mueller Hinton. A concentração do inóculo foi determinada através de espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm, e a densidade ótica (DO) foi ajustada em valor correspondente à 1×10^7 células/mL, para posterior diluição conforme as normas do CLSI.

Um tubo tipo Falcon contendo meio de cultura (YNB para *C. albicans*, TSB para SARM e MH para *E. coli*) e os microcristais na maior concentração (2000 µg/mL) foi colocado em aparelho de ultrassom durante aproximadamente 10 minutos para que os microcristais permanecessem suspensos no meio. A seguir, foram realizadas diluições seriadas obtendo-se as concentrações dos microcristais avaliadas, que variaram de 1000 a 0,061 µg/mL. CIM e CBM foram determinadas após incubação do microrganismo em placa de cultura de 96 poços durante 24 h a 37°C, expostos às diluições avaliadas. Meio de cultura com os microrganismos e sem microcristais foi utilizado como controle positivo para o crescimento do microrganismo, e meio de cultura estéril foi utilizado como controle negativo. Para os três compostos, a CIM foi definida como a menor concentração dos microcristais que inibiu o crescimento do microrganismo, determinado por inspeção visual. Para determinação da CBM, alíquotas provenientes de cada poço foram removidas e diluídas em microtubos contendo 900 µL de PBS (diluições de 10^{-1} a 10^{-8}). Depois, foram plaqueados 25 µL de cada diluição em placas contendo meio de cultura (SDA para *C. albicans* e MH para SARM e *E. coli*). Os plaqueamentos foram realizados em duplicata, e após 48 h de incubação das placas à

37°C, unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) foram calculadas e o resultado transformado em \log_{10} . A CBM foi determinada como a menor concentração dos microcristais que resultou em inviabilidade dos microrganismos, observada através de contagem de UFC/mL.

Todos os testes microbiológicos foram realizados em triplicata e em três ocasiões distintas.

4.5 Microcristais de β -Ag₂MoO₄ em Diferentes Solventes

4.5.1 Síntese

Os microcristais de β -Ag₂MoO₄ foram sintetizados pelo método de co-precipitação utilizando-se água, álcool e amônia como solventes, sem a adição de surfactantes. Para a síntese onde foi utilizada água como solvente, em uma primeira etapa, 1 mmol de molibdato de sódio dihidratado foi solubilizado em 50 mL de água deionizada (solução 1). Separadamente, 2 mmol de nitrato de prata foram dissolvidos em 50 mL de água deionizada (solução 2). Essa solução 2 foi, então, adicionada, gota a gota, à solução 1 sob agitação magnética vigorosa e aquecida a 90°C por 10 minutos. O pH da solução foi monitorado tendo sido observado o mesmo valor (pH ~ 8). O precipitado foi coletado por centrifugação, a solução foi lavada várias vezes com água e etanol até pH = 7, indicando, dessa forma, a ausência de íons Na⁺ e NO₃⁻, e posteriormente realizada a secagem a 60°C por 12 h. Na síntese em que o etanol foi empregado como solvente, inicialmente, 1 mmol de molibdato de sódio dihidratado foi solubilizado em 50 mL de etanol (solução 1). Separadamente, 2 mmol de nitrato de prata foram dissolvidos em 50 mL de etanol (solução 2). Em seguida, a solução 2 foi adicionada, gota a gota, à solução 1 sob vigorosa agitação magnética e aquecida a 90°C por 10 min, com o pH mantido constante (pH ~ 6). O precipitado foi coletado por centrifugação, a solução foi lavada várias vezes com água e etanol até pH = 7, indicativo da ausência dos íons Na⁺ e NO₃⁻. A secagem foi realizada a 60°C por 12 h. Quando o solvente utilizado foi amônia, a solução 1 foi preparada por meio da dissolução de 1 mmol de molibdato de sódio dihidratado em 47 mL de água deionizada e 3 mL de hidróxido de amônio. Paralelamente, 2 mmol de nitrato de prata foram dissolvidos em 50 mL de água deionizada (solução 2). Posteriormente, a solução 2 foi adicionada, gota a gota, na solução 1, sob agitação magnética vigorosa e aquecimento à temperatura de 90°C por 10 min. O pH da solução foi verificado tendo sido observado valor constante (pH ~ 14). Por meio de

centrifugação, o precipitado foi coletado e submetido à lavagem, várias vezes, com água e etanol até $\text{pH} = 7$, evidenciando que não havia mais a presença de íons Na^+ e NO_3^- e, em seguida, foi realizada a secagem a 60°C por 12 h.

4.5.2 Caracterização

Os microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ foram estruturalmente caracterizados por meio de padrões de DRX com radiação Cu Ka ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) e taxa de varredura de $0,02^\circ/\text{min}$ para o intervalo de 2θ de 10° a 70° .

Para analisar a forma e tamanho dos microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ foi empregado um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (MEV-EC) utilizando-se a tensão de aceleração de 5,0 kV. Medidas de Raman foram registradas com o equipamento LabRAM HR 800. Análises de espectroscopia na região do UV-Vis dos microcristais foram realizadas com um equipamento Varian programado para o modo de refletância difusa. Os espectros de fotoluminescência foram obtidos a temperatura ambiente em um monocromador Monospec 27 acoplado a uma fotomultiplicadora R446 com um laser de Argônio (Coherent Innova 90 K, USA) ($\lambda = 350,7 \text{ nm}$); sua potência máxima de saída foi mantida em 500 mW. O feixe de laser passou através de um “chopper” óptico e sua potência máxima na amostra foi limitada a 40 mW. Todas as medidas foram feitas à temperatura ambiente.

4.5.3 Efeito antimicrobiano contra SARM, *C. albicans* e *E. coli*

Foi avaliado o efeito antifúngico contra *C. albicans* dos compostos sintetizados, de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.3. Para avaliação da atividade antibacteriana contra SARM e *E. coli*, foram utilizadas metodologias descritas nos itens 4.1.3 e 4.4.3, respectivamente.

4.6 Ação de Compostos (Óxidos Bimetálicos) Associados à Prata Contra Biofilmes

Neste estudo, os microcristais de $\alpha\text{-AgWO}_4$ irradiado, $\alpha\text{-AgWO}_4$ e $\beta\text{-AgMoO}_4$, ambos sintetizados em álcool, também foram avaliados em relação à inibição da formação de biofilmes microbianos. Esses microcristais foram selecionados devido ao seu melhor desempenho contra os microrganismos na forma planctônica^{60, 110}. As sínteses dos

microcristais de α -AgWO₄ irradiado, α -AgWO₄ e β -AgMoO₄, foram previamente descritas nos itens 4.1.1, 4.4.1 e 4.5.1, enquanto as caracterizações foram detalhadas nos itens 4.1.2, 4.4.2 e 4.5.2, respectivamente.

4.6.1 Inibição da formação de biofilmes microbianos de *C. albicans*, SARM e *E. coli*

Para avaliação da capacidade de inibição da formação de biofilmes, os microrganismos *C. albicans* ATCC 90028, SARM ATCC 33591 e *E. coli* ATCC 8739, mantidos congelados a -80°C, foram descongelados e semeados em meio de cultura ágar específico para cada espécie. Para o preparo do inóculo, uma alçada de cada microrganismo recém-cultivado foi semeada em 10 mL de meio de cultura caldo específico (Tryptic Soy Broth para SARM, Mueller Hinton Caldo para *E. coli* e RPMI para *C. albicans*) em tubos tipo Falcon (individual para cada microrganismo), e incubados em estufa de crescimento a 37°C, “overnight”. Após esse período, as células foram centrifugadas a 5000 g durante 5 minutos, e lavadas duas vezes com PBS. Após a lavagem, as células foram ressuspensas novamente em meio de cultura caldo específico, e a concentração dos inóculos foi determinada através de espectrofotômetro. O inóculo dos três microrganismos foi padronizado em uma concentração de 10⁷ células/ mL.

Após padronizados os inóculos, os microrganismos foram expostos, separadamente, a diluições seriadas dos três microcristais avaliados em placas de 24 poços. As placas foram incubadas em estufa estática, à 37°C durante 48 horas, para a formação dos biofilmes na presença dos compostos contendo Ag. Poços contendo apenas microrganismos e meio de cultura foram os controles positivos dos experimentos, e poços contendo apenas meio de cultura estéril foram controles negativos.

A formação dos biofilmes e os testes descritos a seguir foram realizados em triplicata, em três ocasiões independentes.

4.6.2 Unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)

Após formação dos biofilmes, uma ponteira estéril de 1000 µL foi utilizada para deslocar o biofilme formado no fundo do poço, em movimentos circulares. Alíquotas provenientes de cada poço foram removidas e diluídas em microtubos contendo 900 µL de PBS (diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁸). Depois, foram plaqueados 25 µL de cada diluição em placas

contendo meio de cultura ágar (SDA com cloranfenicol para *C. albicans* e MH ágar para *E. coli* e SARM), que foram mantidas em estufa à 37°C durante 48 h. Após esse período, unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) foram calculadas e o resultado transformado em \log_{10} .

4.6.3 Peso seco de culturas microbianas

Sem remover o meio de cultura, as culturas microbianas com 48 horas de formação foram desprendidas e o volume de 2 mL de cada poço foi aliquoteado e inserido em recipientes feitos de papel alumínio. Os recipientes foram pesados previamente à inserção dos biofilmes, tendo sido mantidos em estufa até atingirem peso constante. Após a inserção dos biofilmes nos recipientes, estes foram mantidos em estufa até a secagem total do conteúdo (*overnight*, temperatura de 37°C). Em seguida, os recipientes foram pesados novamente e, deste novo valor, foram subtraídos aquele obtido na pesagem inicial do recipiente bem como o peso calculado das concentrações do microcristal contido nos 2 mL da cultura microbiana que estava sendo avaliada. O resultado foi considerado o peso seco de 2 mL da cultura microbiana na presença do microcristal. O controle positivo foi o peso seco de 2 mL da cultura microbiana obtida nas mesmas condições, sem a presença dos microcristais.

4.6.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para essa análise, discos de poliestireno cortados foram utilizados para o crescimento dos biofilmes, seguindo-se as mesmas condições descritas no item 4.6.1. Após 48 h de incubação, as células não aderidas foram removidas com duas lavagens com PBS. Em seguida, os discos com os biofilmes foram desidratados em séries de etanol (70%, 95% e 100%), secos em temperatura ambiente e mantidos em dessecador a vácuo até o momento da análise. Antes da observação em microscópio, as amostras foram montadas em *stubs* metálicos e recobertas com ouro.

4.6.5 Microscopia confocal a laser

Após a incubação de 48 h dos biofilmes, o meio de cultura foi aspirado e corante Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit foi adicionado, na proporção indicada pelo fabricante (700 μ L de PBS + 0,7 μ L de Syto 9 + 0,7 μ L de iodeto de propídio), em volume

suficiente para recobrir todo o fundo dos poços. Após incubação na ausência de luz, o corante foi aspirado e os poços foram lavados duas vezes com PBS. As imagens das células vivas, das células mortas e imagens da intersecção entre elas foram realizadas em microscópio confocal de fluorescência, com excitação por laser de argônio, nos comprimentos de onda de 405, 488 e 514 nm.

Etapa II

4.7 Revestimentos Contendo Ag Depositados à Plasma

4.7.1 Confecção dos substratos de resina acrílica

Neste estudo, utilizou-se uma resina acrílica para base de prótese polimerizada por micro-ondas para obtenção dos substratos em forma de disco sobre os quais foram depositados os filmes finos de Ag-SiO₂. A resina acrílica foi proporcionada (1 g de pó e 0,47 mL de líquido) e manipulada seguindo as instruções do fabricante, e os discos de 10 mm de diâmetro por 2 mm de altura foram fabricados utilizando técnica convencional de inclusão e compressão¹⁷⁶. Para obter superfícies padronizadas com rugosidade que simulam a superfície interna das próteses, os substratos de PMMA foram prensados entre duas placas de vidro jateadas previamente com óxido de alumínio, procedimento responsável por gerar uma rugosidade superficial no vidro de aproximadamente 3,0 µm⁸⁰. A polimerização da resina acrílica foi feita em forno micro-ondas doméstico de 500 W por 20 minutos a 20% de potência, seguido de 5 minutos a 90% de potência, de acordo com as recomendações descritas pelo fabricante. Após o resfriamento das muflas em temperatura ambiente, elas foram abertas e os substratos em forma de disco foram retirados, limpos, e tiveram os excessos removidos com fresas para acabamento.

4.7.2 Deposição dos filmes finos

Neste estudo, foram depositados 4 filmes em substratos de PMMA: dióxido de silício contendo nanopartículas de prata utilizando 7 e 15 minutos de deposição (Ag/SiO₂7 e Ag/SiO₂15), prata pura (Ag) e dióxido de silício puro (SiO₂). Os filmes finos de óxido de silício contendo nanopartículas de Ag foram depositados nos substratos utilizando a técnica de co-pulverização por magnetron de radio-frequência (RF) e corrente contínua (CC), em um

sistema fechado de pulverização. Antes da deposição dos filmes, os substratos foram limpos em banho ultrassônico por 20 minutos em água destilada. As deposições foram realizadas numa câmara de vácuo cilíndrica de aço inoxidável, que foi evacuada para uma pressão de fundo de $3,1 \times 10^{-5}$ Torr. Os alvos de Si e Ag sob a forma de discos metálicos com diâmetro de 30 mm e pureza >99 % foram co-pulverizados em atmosfera de argônio puro com o fluxo de gás em 35 sccm. A distância entre os alvos e o substrato era de cerca de 70 mm. Durante todo o processo de pulverização catódica o alvo de sílica foi alimentado com uma potência de plasma de 180 W RF e o alvo de prata com potência aplicada de 360 volts CC, simultaneamente, a uma pressão de $2,8 \times 10^{-2}$ Torr. As deposições foram realizadas por dois tempos distintos, sendo um grupo submetido à deposição com duração de 7 minutos, e o outro submetido à deposição com duração de 15 minutos. Filmes apenas de Ag e SiO₂ puros foram também depositados nos substratos de PMMA. A pulverização de Ag foi efetuada em modo CC, enquanto que a pulverização de SiO₂ foi realizada em modo RF a uma potência mais elevada, devido ao baixo rendimento de pulverização catódica do alvo cerâmico SiO₂. As deposições dos filmes de Ag e SiO₂ foram realizadas durante 15 min, nas mesmas condições que para a deposição das películas de Ag-SiO₂. O fluxo de gás argônio e as potências nos eletrodos de Ag e Si foram mantidos constantes em todos os experimentos. Os substratos serão doravante designados como Ag/SiO₂ 7 para o grupo onde foi feita deposição de filmes compostos de Ag e SiO₂ durante 7 minutos; Ag/SiO₂15 para o grupo onde foi feita deposição de filmes compostos de Ag e SiO₂ durante 15 minutos; Ag para o grupo onde foi feita deposição apenas de filme de Ag; SiO₂ para o grupo onde foi feita a deposição apenas de filme de SiO₂ e PMMA para o grupo onde não foi feita deposição de filme fino (grupo controle).

4.7.3 Caracterização dos filmes finos depositados

Diferentes técnicas de caracterização foram utilizadas neste estudo. A espessura dos filmes depositados foi avaliada a partir das alturas dos degraus de película registradas, utilizando um perfilômetro de alta resolução. Para isso, as superfícies dos substratos em forma de disco foram parcialmente cobertas com uma fita adesiva resistente à plasma (Kapton) durante a deposição dos filmes, e foi removida após a deposição para obtenção de um degrau entre a parte exposta e a parte protegida do plasma. Dez leituras foram realizadas em diferentes regiões da superfície dos degraus.

A rugosidade média (R_a) de todos os substratos de PMMA (revestidos e não revestidos) foi medida com o perfilômetro Veeco Dektak 150. Para isso, uma ponta de diamante de 12,5 μm de raio e comprimento de 2000 μm , examinou 524 μm da superfície sob uma carga de 3 mg, tendo sido obtidos três Scans de cada substrato ($n = 9$).

A receptividade dos substratos Ag/SiO₂7, Ag/SiO₂15, Ag, SiO₂ e PMMA para água deionizada e diiodometano foi determinada pelo método de gota séssil em ambiente com temperatura e umidade controladas, utilizando um goniômetro Ramé-Hart 100-00. Em resumo, foram depositadas gotas de água deionizada e diiodometano a partir de uma micro-seringa calibrada sobre cada substrato ($n = 9$) e foram medidos os ângulos de contato (θ) em cada lado das gotas. As medições foram feitas em três locais representativos de cada substrato e foram, posteriormente, calculadas em média. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo da energia livre de superfície pelo software DROP Image Advance.

A estrutura química das películas depositadas foi analisada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier utilizando o método IRRAS (*Infrared Reflectance Absorbance Spectroscopy*) utilizando um sistema Jasco FTIR 410. Os espectros FTIR foram determinados em modo de transmissão, na gama de 4000-400 cm^{-1} com resolução de 1 cm^{-1} em meio diluído em KBr, recolhendo 128 espectros com resolução de 4 cm^{-1} . Para análise em FTIR, os filmes Ag/SiO₂7, Ag/SiO₂15, Ag e SiO₂ foram depositados sobre amostras de alumínio polido.

A morfologia dos substratos foi analisada por MEV-EC, operada a 2,00 kV. Para este fim, um substrato de cada grupo foi selecionado aleatoriamente, recoberto com uma fina camada de ouro e montados em *stubs* metálicos para análise.

A topografia superficial e a rugosidade dos filmes depositados foram também observadas utilizando um microscópio de força atômica em ar, com uma ponta de silício de 8 nm de raio e em “*tapping mode*”. Para análise em MFA, os substratos utilizados foram lamínulas de vidro lisas com os filmes Ag/SiO₂7, Ag/SiO₂15, Ag e SiO₂ depositados, para que apenas a topografia e rugosidade dos filmes fosse avaliada, sem que houvesse interferência da topografia superficial dos substratos de PMMA.

A análise de DRX dos filmes finos foi realizada utilizando um difratometro de raios-X Rigaku D / Max-2000 PC (Japão). A fonte de raios X foi a radiação CuK α filtrada com Ni. As medições foram realizadas numa configuração de varrimento de 2θ na gama de 5-75° C num ângulo de incidência fixo de 0,05. A tensão e a corrente aplicadas foram de 40 kV e 150 mA, respectivamente, e a taxa de varredura foi fixada a 2°/min. Para análise de DRX, os substratos utilizados foram placas de vidro com os filmes Ag/SiO₂7 e Ag/SiO₂15 depositados.

4.7.4 Atividade dos filmes finos depositados contra adesão de *C. albicans*

O efeito dos filmes finos sobre a adesão de *C. albicans* aos substratos foi avaliado utilizando uma cepa padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC 90028). A cepa de *C. albicans* foi retirada de armazenamento a -80°C e cultivada em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar contendo $5\ \mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol, e foi mantida incubada a 37°C durante 24 h. Uma alçada desta cultura foi então transferida para 10 mL de meio de cultura RPMI-1640 e o inóculo foi incubado num agitador orbital *overnight* a 37°C . Após incubação, as células foram centrifugadas a $4000\ \text{g}$ durante 5 min e lavadas duas vezes em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, pH 7,2). As células foram, então, ressuspensas em meio RPMI-1640 e uma suspensão celular de 10^7 CFU/mL foi preparada ajustando a densidade óptica da suspensão em 0,6 a 540 nm, em espectrofotômetro.

Para os experimentos, os substratos em forma de disco foram colocados, individualmente, em microplacas de 36 poços contendo 2 mL por poço da suspensão já padronizada de *C. albicans*. As placas foram incubadas a 37°C durante 90 minutos. Após a fase de adesão, as células não aderidas foram removidas dos substratos por lavagem suave duas vezes com 2 mL de PBS. Para todos os experimentos, os controles negativos foram substratos em forma de disco aos quais não foram adicionadas células.

A adesão de *C. albicans* foi avaliada através da contagem de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), microscopia eletrônica de varredura (MEV-EC) e microscopia de varredura confocal a laser.

Para a contagem de CFU, após lavagem das células não aderidas com PBS, cada substrato foi transferido para um tubo Falcon contendo 5 mL de PBS, o qual foi submetido a vortex vigorosamente durante 1 min para separação das células aderidas do substrato. Em seguida, foram feitas diluições de 10^{-1} a 10^{-4} , e alíquotas (10 μL) das suspensões de *C. albicans* foram plaqueadas em duplicata em placas SDA. Após 48 h de incubação a 37°C , o número de UFC/mL de *C. albicans* foi determinado por contagem nas placas e os resultados transformados em \log_{10} .

Microscópio eletrônico de varredura (MEV-EC) foi utilizado para analisar as características morfológicas das células de *C. albicans* aderidas nos substratos. Para isso, após a fase de adesão das células, os substratos Ag/SiO₂7, Ag/SiO₂15, Ag, SiO₂ e PMMA foram lavados duas vezes em PBS e as células foram fixadas em paraformaldeído a 2,5% durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foram desidratados através de uma série de etanol graduada (70, 85 e 100%), montados em *stubs* metálicos e revestidos com ouro.

A adesão de células de *C. albicans* nos substratos Ag/SiO₂7, Ag/SiO₂15, Ag e SiO₂ também foi analisada por microscópio confocal de varredura a laser e o kit de viabilidade bacteriana BacLight Live / Dead. As células aderidas de *C. albicans* foram coradas com corantes fluorescentes SYTO® 9 (verde) e iodeto de propídio (vermelho). Assim, as células vivas foram coradas em verde, enquanto as células mortas foram coradas em vermelho.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três ocasiões independentes. Assim, para cada substrato foram preparados 9 discos. Além disso, para análises microscópicas, foram preparados dois discos adicionais de cada substrato, um para MEV-EC e outro para microscopia confocal de varredura a laser.

5 RESULTADO

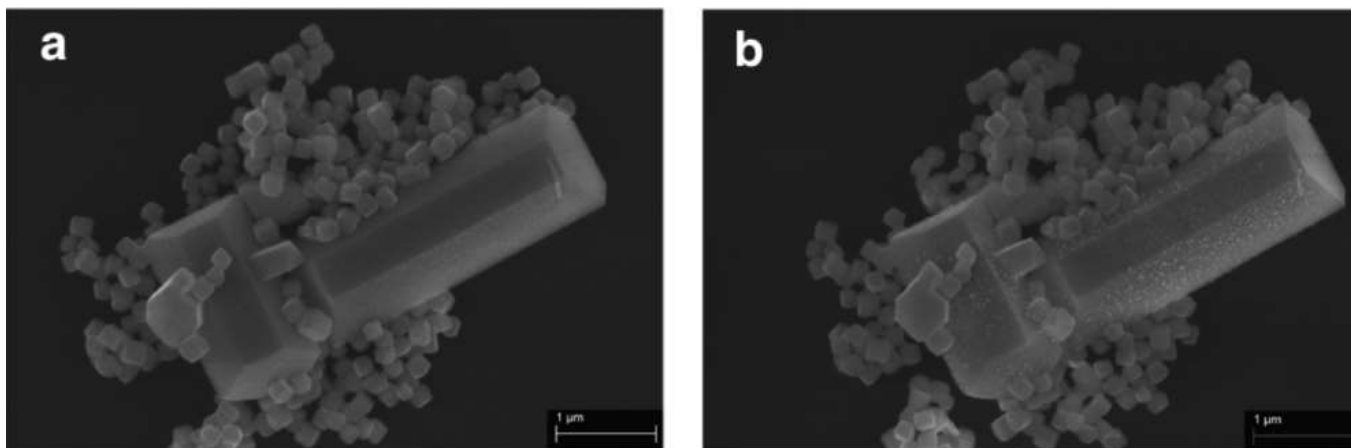
Este estudo verificou a síntese e caracterização de compostos associados à prata e avaliou o efeito antimicrobiano destes compostos em relação à inativação de SARM, *E. coli* e *C. albicans* na forma planctônica, e à inibição de formação de biofilmes desses microrganismos. Por meio da síntese de co-pulverização assistida a plasma, os revestimentos contendo Ag depositados sobre resina acrílica, foram caracterizados e avaliados quanto ao efeito na adesão de *C. albicans*.

5.1 Microcristais de α -Ag₂WO₄ com e sem Irradiação*

A Figura 2 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC). Nota-se que os microcristais de α -Ag₂WO₄ apresentam morfologia hexagonal, embora formas triangulares e cúbicas também podem ser observadas, após ajuste de foco no tempo zero (Figura 2a). A Figura 2b mostra a morfologia de microcristais de α -Ag₂WO₄ após 30 minutos de exposição ao feixe de elétrons provenientes da microscopia, onde é observado o crescimento de nanopartículas na superfície dos cristais.

* Resultados publicados em Longo, V. M., De Foggi, C. C., Ferrer, M. M., Gouveia, A. F., André, R. S., Avansi, W., ... & Hernandez, A. C. (2014). Potentiated electron transference in α -Ag₂WO₄ microcrystals with Ag nanofilaments as microbial agent. *The Journal of Physical Chemistry A*, 118(31), 5769-5778 (28).

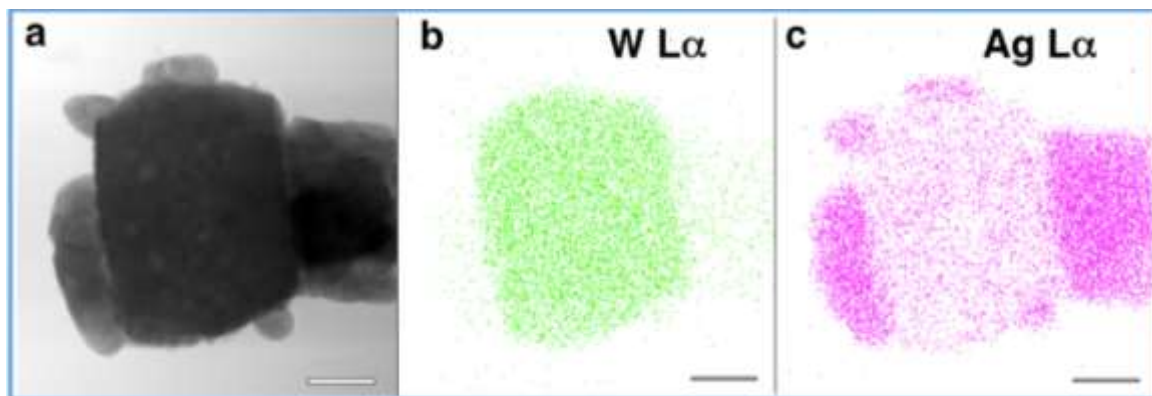
Figura 2 - Imagens de MEV-EC mostrando microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ no tempo zero (a) e após 30 minutos de irradiação com elétrons (b), onde é possível observar nanopartículas de Ag em sua superfície.



Fonte: Adaptado de Longo et al.¹¹⁰.

Para verificação da composição química dos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizados, um mapeamento de elementos químicos através de Raios-X (EDX) foi realizado em uma partícula isolada. A Figura 3a mostra uma imagem proveniente de microscopia eletrônica de transmissão de uma única partícula isolada, sobre a qual foi realizada a análise de EDX. As Figuras 3b e 3c mostram os resultados de EDX, que confirmam que as estruturas formadas após a exposição aos elétrons são compostas, principalmente, por Ag, enquanto a partícula na sua condição original (“*pristine*”) é composta, principalmente, por tungstênio (W), com menor quantidade de Ag, como esperado.

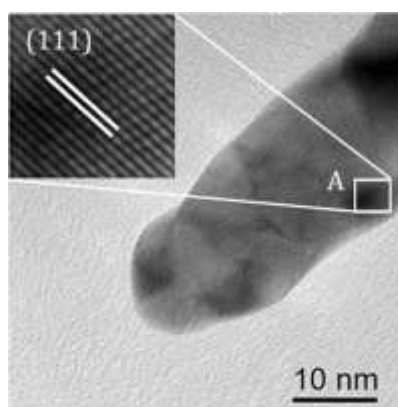
Figura 3a - Imagem de microcristal de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ isolado, obtido através de microscopia eletrônica de transmissão. As Figuras 3b e 3c representam o mapeamento realizado através do EDX, onde 3b corresponde ao tungstênio (W), e 3c à prata (Ag) (Escala: 50nm em a, b e c).



Fonte: Adaptado de Longo et al.¹¹⁰.

Análise de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) foi realizada no nanofilamento de Ag metálica, após os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ terem sido irradiados. A Figura 4 mostra uma visão aumentada da região analisada (A) e revela que os parâmetros de rede possuem em torno de $2,3\text{Å}$, o que é consistente com o plano (111) da estrutura cúbica do nanofilamento de Ag metálica.

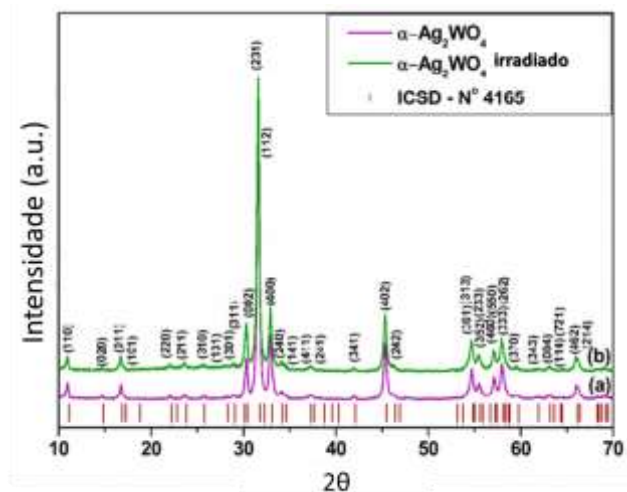
Figura 4 - Análise de HRTEM de nanofilamento de Ag metálica em amostra de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ irradiada. Em destaque na parte superior esquerda, aumento da região A.



Fonte: Adaptado de Longo et al.¹¹⁰.

A Figura 5 apresenta os padrões de DRX obtidos para os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ irradiado.

Figura 5 - Padrões de DRX dos microcristais de α -Ag₂WO₄ e α -Ag₂WO₄ irradiado.

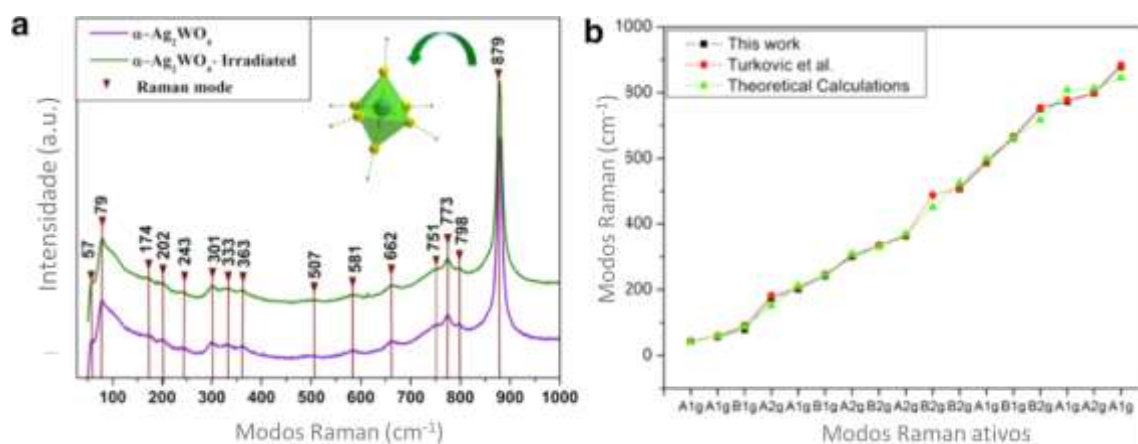


Fonte: Adaptado de Longo et al.¹¹⁰.

Ambos os cristais apresentaram picos de difração nítidos e bem definidos, o que indica ordem estrutural e cristalinidade, sem a presença de fases deletérias. Tanto o tungstato de prata, quanto o tungstato de prata com nanofilamentos, possuem estrutura ortorrômbica, com grupo espacial de $Pn2n$ ¹⁵³. Todos os picos de difração estão em concordância com o respectivo documento ICSD N°. 4165 (Figura 4).

A espectroscopia Raman para os microcristais ortorrômbicos de α -Ag₂WO₄ estão representados na Figura 6a. A Figura 6b mostra a comparação dos resultados encontrados neste estudo com àqueles relatados por Turkovic et al.¹⁶⁷ em 1977.

Figura 6 - (a) Modos Raman para microcristais de α -Ag₂WO₄ à temperatura ambiente e (b) resultados deste estudo, comparados com aqueles relatados por Turkovic et al.¹⁶⁷, em 1977.

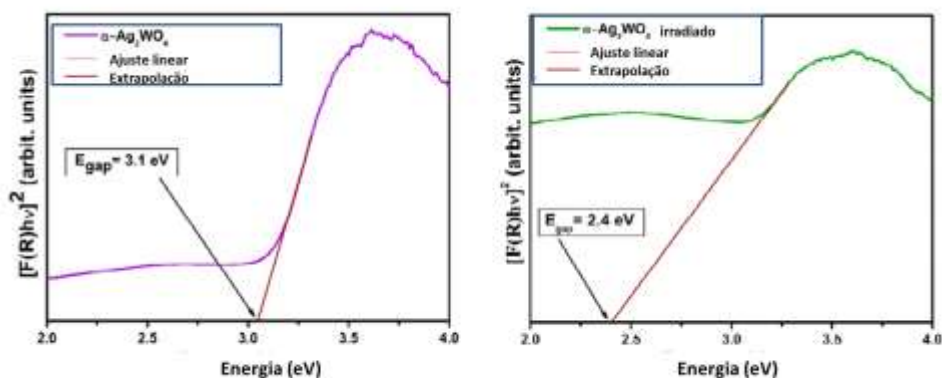


Fonte: Adaptado de Longo et al.¹¹⁰.

Modos vibracionais Raman característicos foram observados para os dois microcristais de α -Ag₂WO₄ (irradiado e não irradiado) com simetria do grupo pontual (“*point-group symmetry*”) de C_{2v}^{10} à temperatura ambiente. O baixo modo ativo translacional de A_{1g} (57 cm^{-1}) corresponde aos fônons externos ou de rede associados com o movimento do pesado cátion Ag na unidade molecular rígida. As vibrações internas são associadas com os movimentos dentro do grupo molecular [WO₆], o qual revela diversos picos correspondentes com os modos internos ativos Raman do “*cluster*” octaedro distorcido [WO₆]: A_1 , B_1 , A_2 , e B_2 . A Figura 5 também mostra que os microcristais de α -Ag₂WO₄ preparados pela síntese hidrotérmica assistida por micro-ondas possuem modos ativos Raman bem definidos relacionados às vibrações simétricas de estiramento das ligações ($\leftarrow O \leftarrow W \rightarrow O \rightarrow$) dos “*clusters*” octaedros [WO₆] evidenciada pelo modo Raman 879 cm^{-1} .

Os resultados de UV-Vis dos microcristais de α -Ag₂WO₄ e α -Ag₂WO₄ irradiado estão apresentados na Figura 7. O microcristal de α -Ag₂WO₄ não irradiado apresenta um pico de absorção bem definido, enquanto os microcristais irradiados exibem aumento suave e contínuo na absorção em função da energia, sugerindo estados localizados dentro do intervalo do gap de energia. Os gaps ópticos obtidos por extrapolação linear da região curva, de acordo com o método de Wood e Tauc¹⁸⁴ foram de 3,1 eV para os microcristais não irradiados e de 2,4 eV para aqueles submetidos à irradiação.

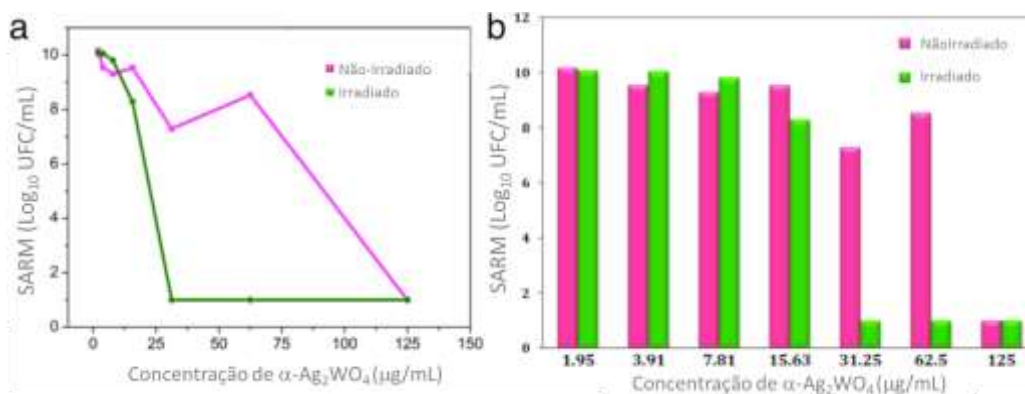
Figura 7 - Espectro de UV-Vis obtido para os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ irradiado e não-irradiado.



Fonte: Adaptado de Longo et al.¹¹⁰.

A Figura 8 revela que o microrganismo SARM foi inativado por ambos os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, sendo o efeito dependente da concentração utilizada. O valor de CIM/CBM para células planctônicas do microcristal irradiado com feixe de elétrons provenientes de microscopia foi consideravelmente menor ($31\mu\text{g/mL}$) quando comparado ao valor apresentado pelo cristal não-irradiado ($125\mu\text{g/mL}$).

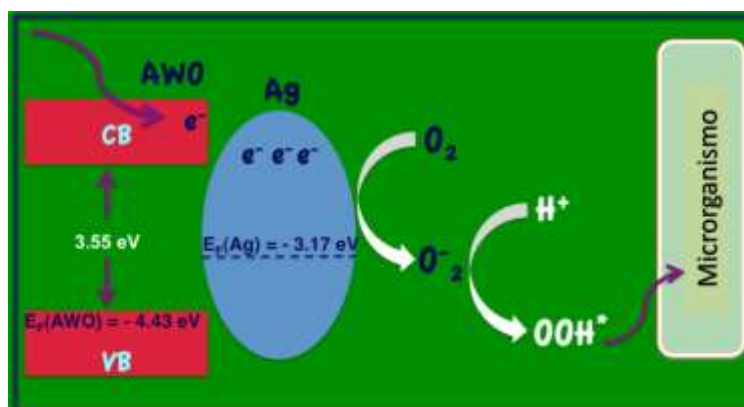
Figura 8 (a e b) - Efeito bacteriostático/bactericida dos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ irradiados e não-irradiados.



Fonte: Adaptado de Longo et al.¹¹⁰.

A Figura 9 mostra o mecanismo da atividade antibacteriana dos compostos de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ proposto, com base na estrutura da banda de energia, transferência elétron-buraco e separação no $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ com a Ag metálica.

Figura 9 - Mecanismo de ação antibacteriana proposto para os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ com nanofilamentos de Ag.



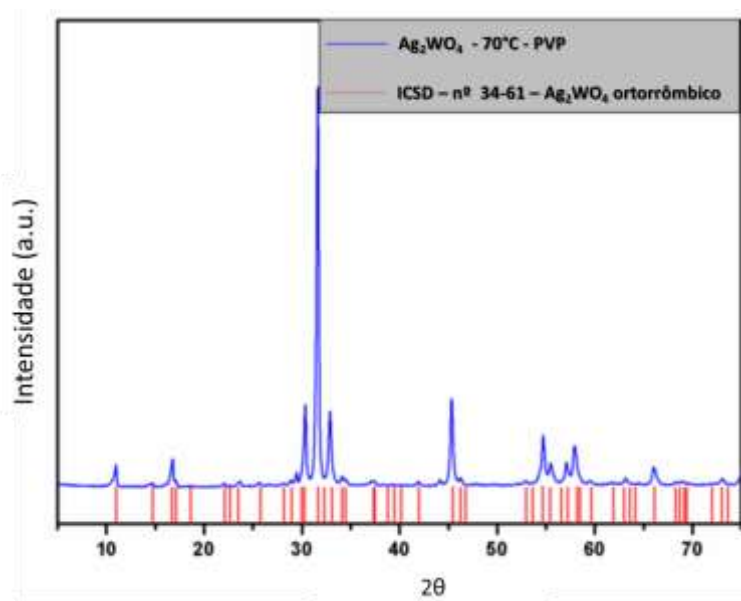
Fonte: Adaptado de Longo et al.¹¹⁰.

5.2 Microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ com Surfactante*

Os padrões de DRX dos microcristais de tungstato de prata $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ obtidos são apresentados na Figura 10. Pode ser observado que o padrão da amostra corresponde à fase pura ortorrômbica de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ como determinado pela informação dada pelo cartão n° 34-61 do “ICSD” (Inorganic Crystal Structure Database).

* Artigo publicado em Chemical Physics Letters: Ms. No.: CPLETT-16-19. Camila C Foggi, Maria Tereza Fabbro, Luís Presley Serejo dos Santos, Yuri V B de Santana, Carlos E Vergani, Ana Lucia Machado, Eloisa Cordoncillo, Juan Andrés, Elson Longo. Synthesis and evaluation of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ as novel antifungal agent.

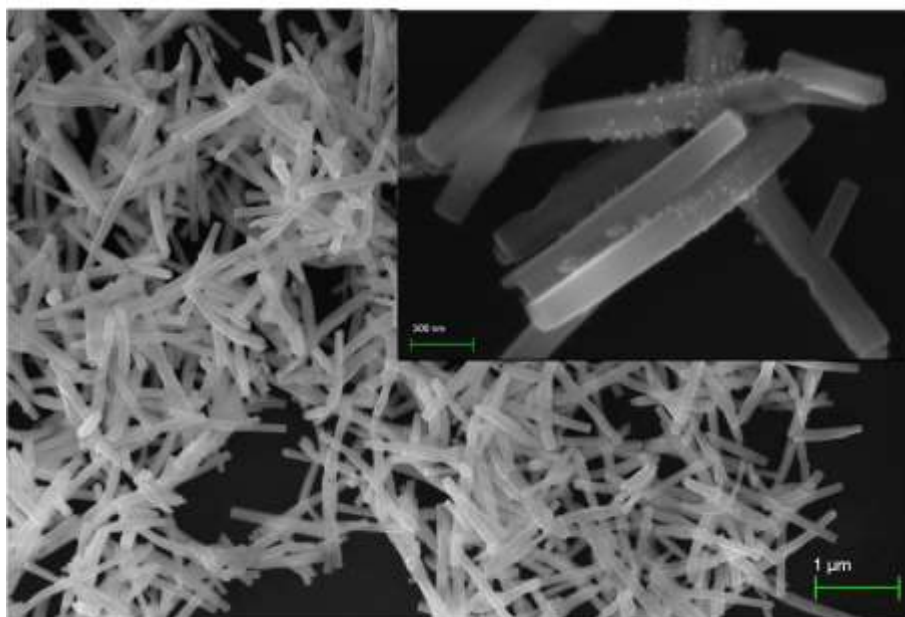
Figura 10 - Padrões de DRX dos microcristais de α - Ag_2WO_4 sintetizados pelo método de co-precipitação com surfactante PVP.



Fonte: Adaptado de Foggi et al.⁶⁷.

As imagens obtidas através de FE-SEM da amostra estão apresentadas na Figura 11. O quadro superior direito é uma imagem da amostra com maior ampliação.

Figura 11 - Imagens de FE-SEM do α -Ag₂WO₄ sintetizado pelo método de co-precipitação com polivinilpirrolidona como surfactante.

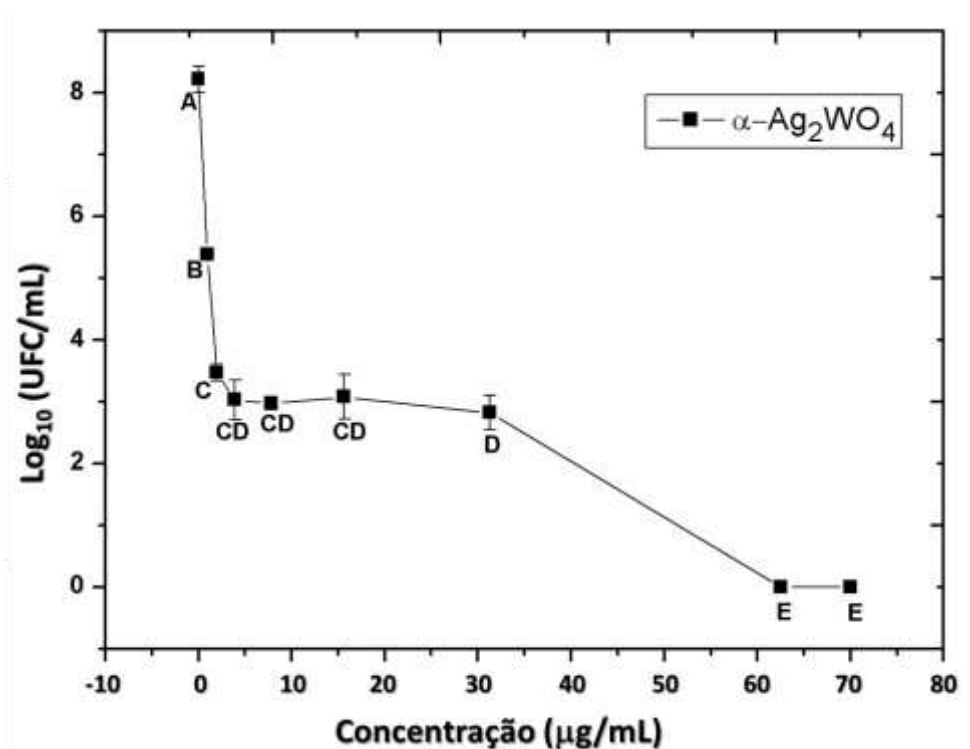


Fonte: Adaptado de Foggi et al.⁶⁷.

Pode-se observar que os microcristais de α -Ag₂WO₄ têm uma natureza aglomerada e forma alongada, semelhante a bastões, com comprimento de cerca de 1 μ m, largura de 140 nm e espessura de, aproximadamente, 120 nm.

Em relação aos resultados microbiológicos, o valor de CIM obtido para os microcristais foi de 62,50 μ g/mL. Essa concentração de α -Ag₂WO₄ também inibiu completamente o crescimento de colônias de *C. albicans* (CFM = 62,50 μ g/mL). Os resultados da análise estatística mostraram efeito significativo para o fator concentração ($P = 0.0$). Redução significativa ($P < 0,05$) nos valores de \log_{10} UFC/mL comparados com o controle (de aproximadamente 8 \log_{10} UFC/mL para 5,4 \log_{10} UFC/mL) foi observada em concentrações a partir de 0,98 μ g/mL. Na concentração correspondente à metade do valor de CIM/CFM (31,25 μ g/mL), o crescimento fúngico também foi significativamente reduzido para, aproximadamente, 3 \log_{10} UFC/mL (Figura 12).

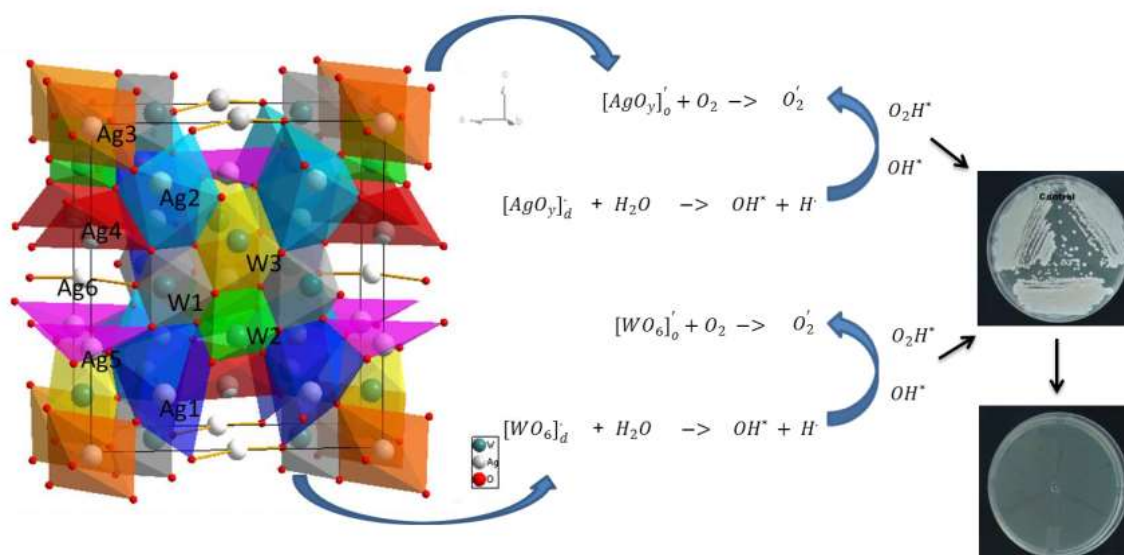
Figura 12 - Valores de \log_{10} UFC/mL obtidos para as concentrações sub-inibitórias de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.



Fonte: Adaptado de Foggi et al.⁶⁷.

A Figura 13 apresenta os possíveis mecanismos de ação dos microcristais que podem ter contribuído para o efeito antifúngico, com base na presença de “clusters” desordenados/distorcidos e ordenados.

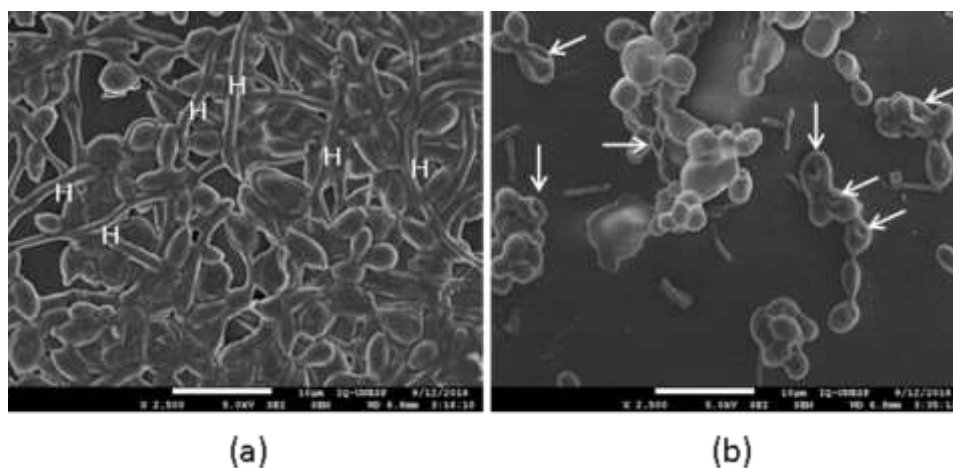
Figura 13 - Mecanismo de ação proposto para os microcristais de α - Ag_2WO_4 sintetizados por coprecipitação e com PVP. Os “clusters” octaedro $[\text{WO}_6]$ (em cinza, verde e amarelo), bipiramidal pentagonal $[\text{AgO}_7]$ (em azul), octaedro $[\text{AgO}_6]$ (em dourado), tetraedro $[\text{AgO}_4]$ (em vermelho), e angular $[\text{AgO}_2]$ (em rosa) estão apresentados como os blocos fundamentais constituintes do α - Ag_2WO_4 .



Fonte: Adaptado de Foggi et al.⁶⁷.

As imagens de MEV mostram que as células de *C. albicans* não tratadas (controle) preservaram a sua morfologia normal (Figura 14a), com agregados celulares e presença de hifas. Em contraste, as células *C. albicans* expostas aos microcristais de α - Ag_2WO_4 apresentaram superfície irregular e tamanho reduzido por perda de material (“shriveled”), com ausência de hifas (Figura 14b).

Figura 14 - Micrografias de *C. albicans* incubadas sem (a) e com os microcristais de α - Ag_2WO_4 (b). H: hifas. Setas brancas: alterações morfológicas das células de *Candida*.

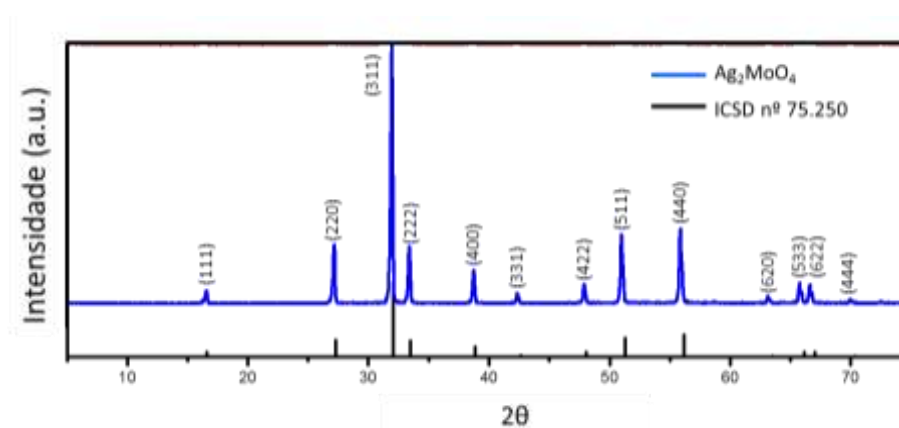


Fonte: Adaptado de Foggi et al.⁶⁷.

5.3 Microcristais de β - Ag_2MoO_4 sem Surfactante

A Figura 15 mostra os padrões de DRX dos microcristais de molibdato de prata β - Ag_2MoO_4 obtidos.

Figura 15 - Padrões de DRX dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 sintetizados por co-precipitação e sem surfactante.

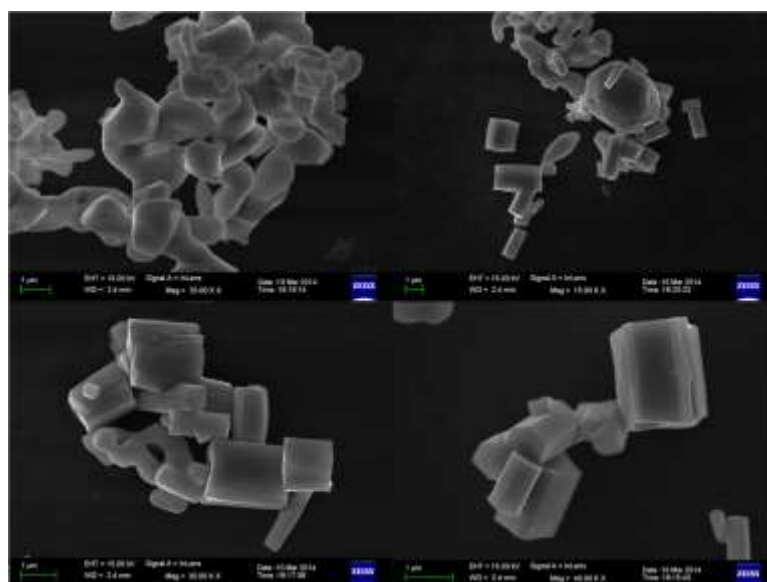


Fonte: Elaboração própria.

Pode-se observar que o padrão da amostra corresponde à fase cúbica pura de β - Ag_2MoO_4 como determinado pela informação dada pelo cartão n° 75.250 do “ICSD” (*Inorganic Crystal Structure Database*).

A microestrutura da amostra obtida através de análise por microscopia eletrônica de varredura está apresentada na Figura 16. Os microcristais apresentam morfologia irregular, com a presença de partículas com as formas cúbica e hexagonal, bem definidas e com distribuição aleatória.

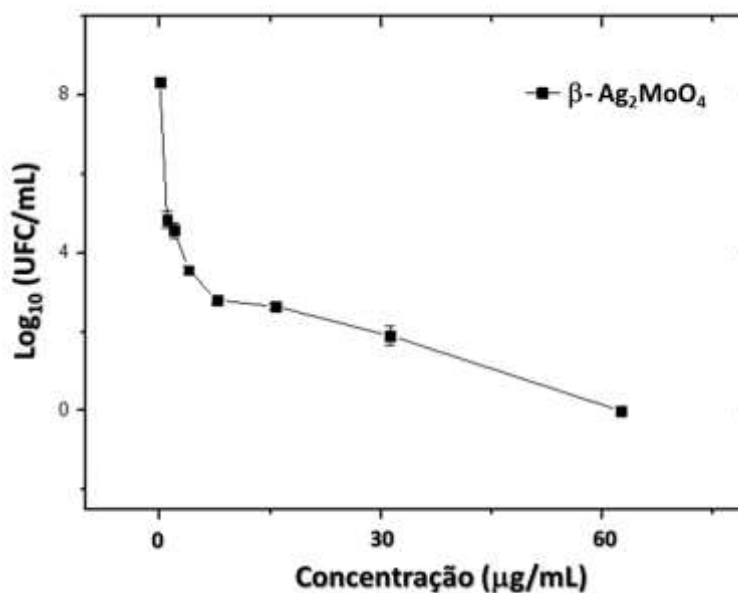
Figura 16 - Imagens de FE-SEM dos microcristais sintetizados pelo método da co-precipitação, sem surfactante.



Fonte: Elaboração própria.

A Figura 17 mostra os valores de \log_{10} encontrados para as concentrações sub-inibitórias dos microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$.

Figura 17 - Valores de \log_{10} UFC/mL obtidos para as concentrações sub-inibitórias dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 .



Fonte: Elaboração própria.

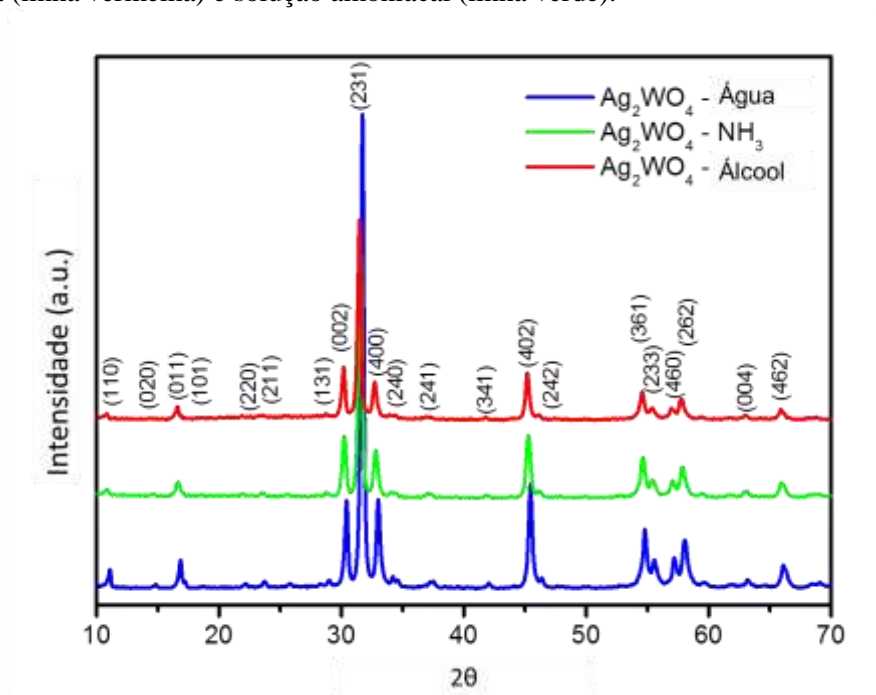
A análise da Figura 17 mostra que a CIM e a CFM foram coincidentes, e corresponderam à concentração de $62,50\mu\text{g/mL}$ de microcristais de β - Ag_2MoO_4 . Comparado com o controle ($8,3 \log_{10}$ UFC/mL), os microcristais, na concentração correspondente à metade do valor de CIM/CFM ($31,25 \mu\text{g/mL}$), também reduziram o crescimento da *C. albicans* para, aproximadamente, $2,0 \log_{10}$ UFC/mL. Pode-se observar, ainda, que, em concentrações a partir de $1,95 \mu\text{g/mL}$, os valores obtidos foram iguais ou menores que $3,5 \log_{10}$ UFC/mL.

5.4 Microcristais de α - Ag_2WO_4 em Diferentes Solventes*

Na Figura 18 estão apresentados os padrões de DRX dos microcristais de α - Ag_2WO_4 sintetizados em água, solução alcoólica e solução amoniacal.

* Artigo em revisão em Journal of Materials Science Materials in Medicine JMSM-D-16-00774. Camila C Foggi, Regiane C. de Oliveira, Maria T. Fabbro, Carlos E Vergani, Juan Andrés, Elson Longo and Ana Lucia Machado. A New Way to Enhance the Antimicrobial Activity of α - Ag_2WO_4 .

Figura 18 - Padrões de DRX dos microcristais de α - Ag_2WO_4 sintetizados em água (linha azul), solução alcoólica (linha vermelha) e solução amoniacal (linha verde).

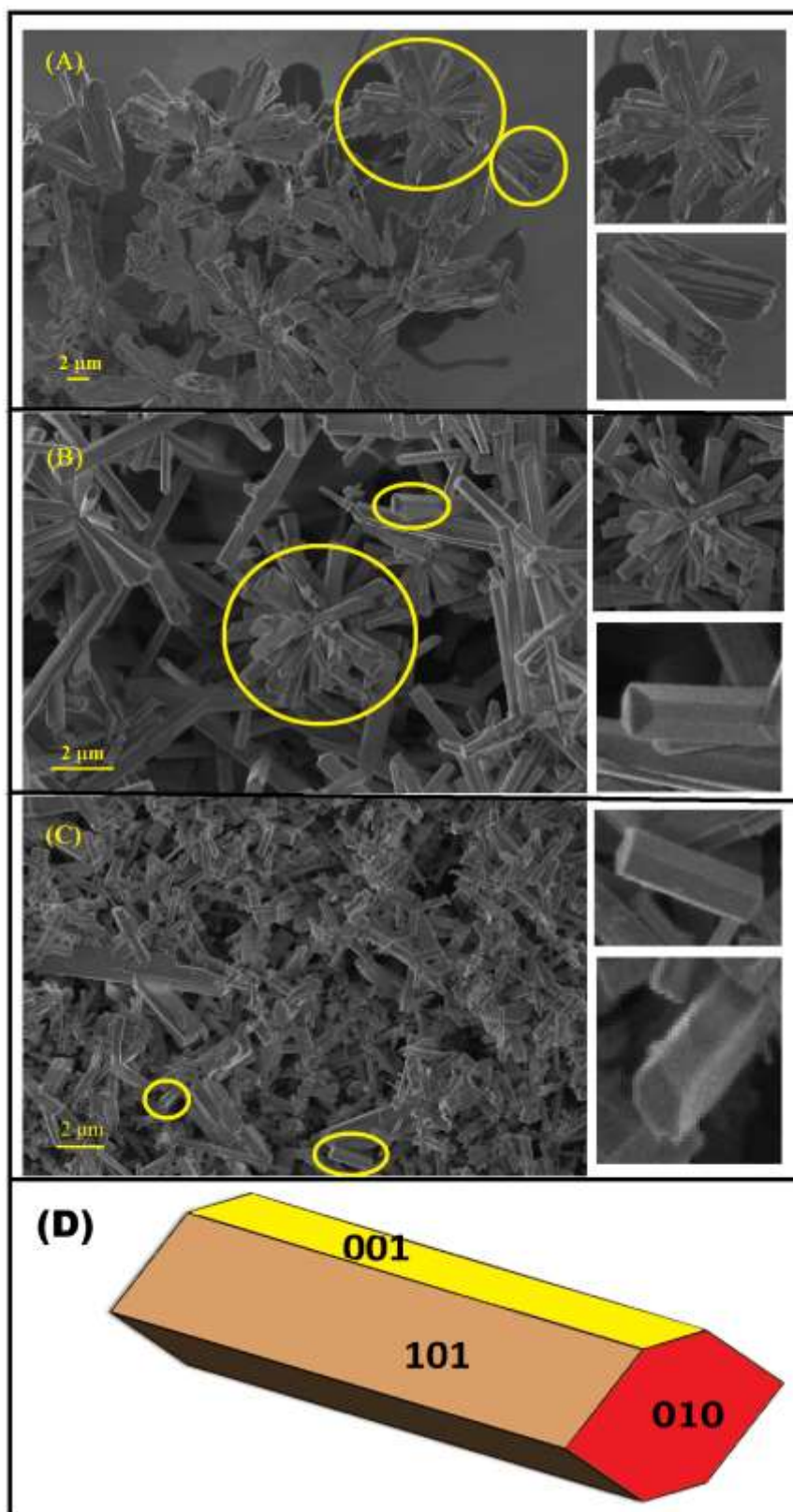


Fonte: Elaboração própria.

Os padrões de DRX revelaram que todos os picos de difração dos microcristais de α - Ag_2WO_4 podem ser indexados à estrutura ortorrômbica com grupo espacial $Pn2n$ e simetria C_{2v}^{10} , de acordo com o respectivo cartão da base de dados *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD) n.º 4165^{153, 156}.

A Figura 19 mostra as imagens de MEV de microcristais de α - Ag_2WO_4 sintetizados em água, solução amoniacal (NH_3) e solução alcoólica, e esquema ilustrativo de cristal de α - Ag_2WO_4 com os respectivos planos cristalográficos para as faces.

Figura 19 - Imagens de MEV de microcristais de α -Ag₂WO₄ sintetizados em água (A), solução amoniacal (NH₃) (B) e solução alcoólica (C). Esquema ilustrativo do microcristal de α -Ag₂WO₄ com os planos cristalográficos (001), (101), (010) para as faces em 3D (D).

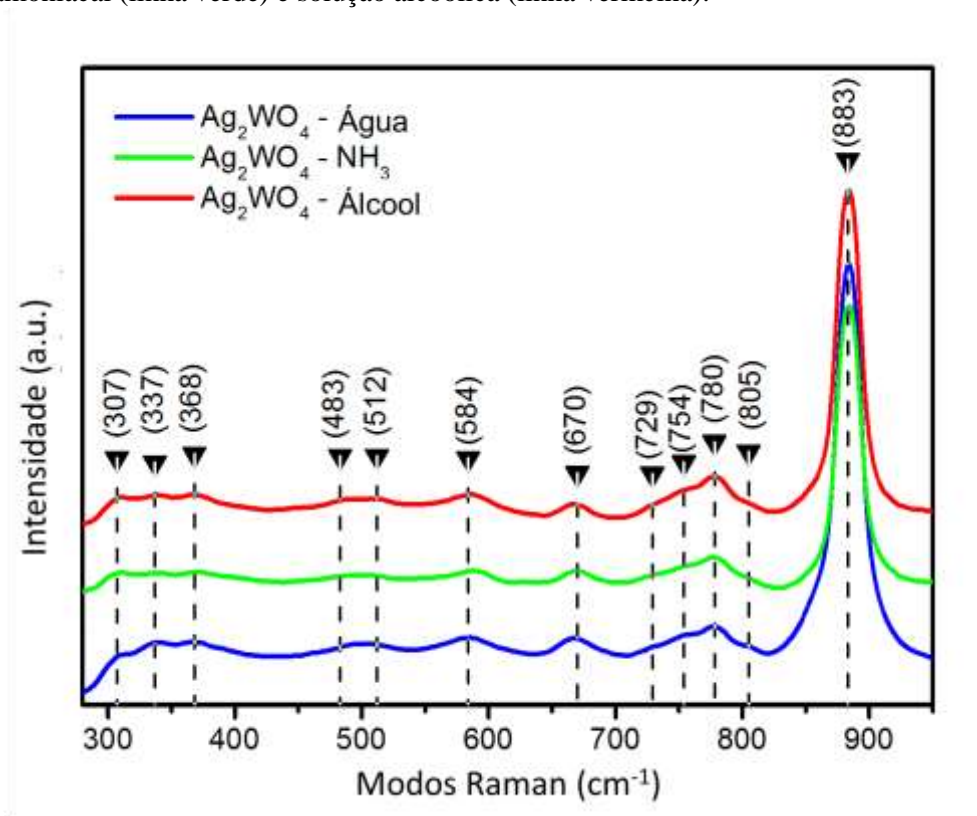


Fonte: Elaboração própria.

A análise da Figura 19 indica que, quando a síntese foi realizada em água, houve a formação de grande quantidade de microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ com estruturas similares a flores (“*flower-like*”) tridimensionais (3D). Claramente, essas estruturas são essencialmente compostas de partículas em forma de nanobastões agregados, os quais foram parcialmente orientados e unidos nas faces irregulares. Esses cristais apresentam uma natureza aglomerada e a forma de bastões hexagonais alongados, no eixo y e na direção [010]. Vários nanocristalitos nuclearam e cresceram, transformando-se em pequenos nanobastões que, com o objetivo de minimizar a energia total do sistema, tenderam a se agregar, formando 3D “*flower-like*” $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. Esse mesmo tipo de estrutura também foi obtido quando a solução amoniacal foi utilizada como solvente (Figura 18B). Entretanto, neste caso, os cristais exibiram três faces com planos cristalográficos (001), (101), (010), que foram mais definidos. Essas faces estão indicadas no esquema ilustrativo dos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na Figura 19D. Na síntese em que a solução alcoólica foi utilizada, os nanobastões de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ com três faces foram obtidos, e com os mesmos planos cristalográficos apresentados pelas estruturas de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizadas em solução amoniacal, como demonstrado pela Figura 19C.

Os espectros de Raman encontrados para os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizados em água, solução amoniacal e solução alcoólica, com os respectivos modos ativos, são apresentados na Figura 20. Existem 12 modos ativos detectados nos espectros Raman dos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ obtidos nos diferentes solventes.

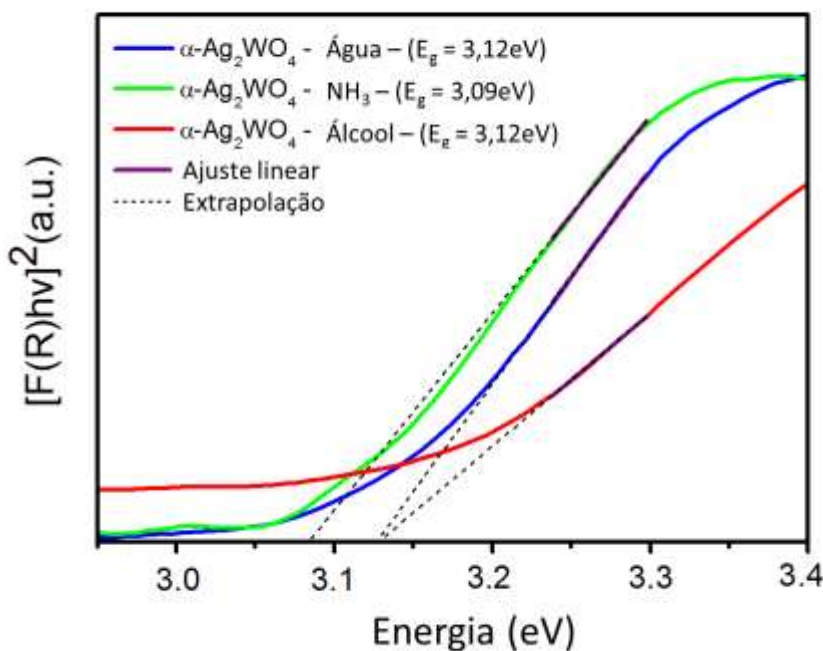
Figura 20 - Espectros de Raman dos microcristais de α - Ag_2WO_4 sintetizados em água (linha azul), solução amoniacal (linha verde) e solução alcoólica (linha vermelha).



Fonte: Elaboração própria.

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível (UV-Vis) por reflectância difusa está apresentada na Figura 21.

Figura 21 - Espectros UV-Vis dos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizados em água (linha azul), solução amoniacal (linha verde) e solução alcoólica (linha vermelha), com os respectivos, ajuste linear e extrapolação, para determinação do Gap de energia (eV).



Fonte: Elaboração própria.

A energia do gap óptico (E_{gap}) foi calculada utilizando o método proposto por Kubelka e Munk⁹⁴, que pode ser resumida pela Equação 1:

$$[F(R_{\infty})hv] = C_1(h\nu - E_{\text{gap}})^n \text{-----Eq. 1}$$

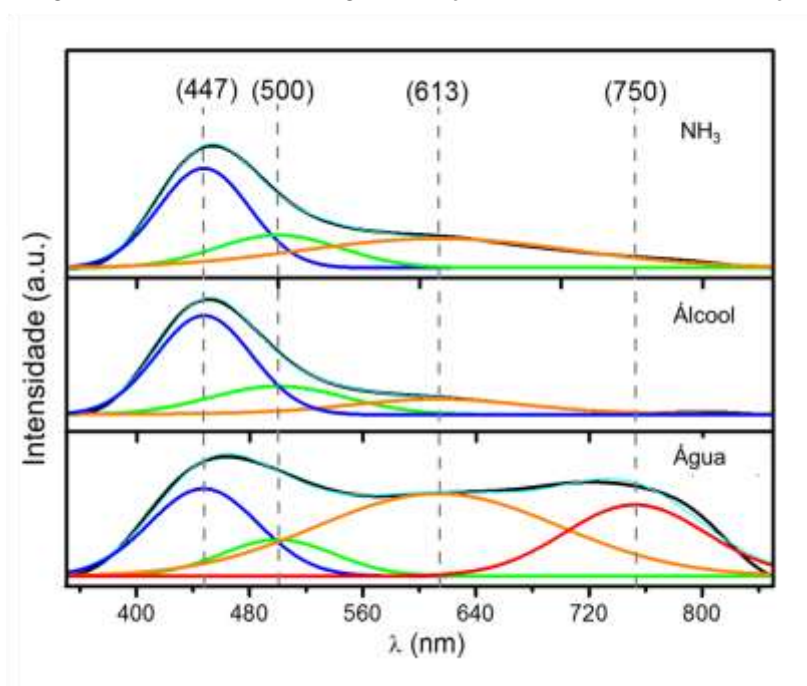
onde $F(R_{\infty})$ é a função de Kubelka-Munk, R_{∞} é a reflectância, $h\nu$ é a energia do fóton, C_1 é a constante de proporcionalidade, E_{gap} é o gap óptico, e n é a constante associada com diferentes tipos de transições eletrônicas ($n = 0,5, 2, 1,5, \text{ e } 3$ para transições do tipo direta permitida, indireta permitida, direta proibida, e indireta proibida, respectivamente).

Para o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, os espectros de absorção óptica são governados por transições eletrônicas diretas^{84, 160}. Assim, após a obtenção do valor de $F(R_{\infty})$ a partir da equação de Kubelka-Munk e plotagem do gráfico de $[F(R_{\infty})hv]^2$ como uma função de $h\nu$, os valores de E_{gap} values para o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foram calculados por meio da extrapolação da porção linear das curvas de UV-Vis. A Figura 21 mostra que os espectros de absorção na região do ultravioleta visível (UV-Vis) por reflectância difusa e os valores de gap óptico (E_{gap}) para os microcristais

de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizados em água, solução alcoólica, e solução amoniacal. Nenhuma alteração significativa foi observada nos valores de E_{gap} dos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$.

Espectros de fotoluminescência dos materiais, obtidos à temperatura ambiente, utilizando comprimento de onda de 350 nm, estão apresentados na Figura 22. Para um melhor entendimento das propriedades de fotoluminescência e sua dependência na ordem-desordem da rede, as curvas de fotoluminescência foram deconvoluídas com o programa PeakFit (SeaSolve Software Inc, Framingham, MA, EUA), como demonstrado nas Figuras 21 e 22.

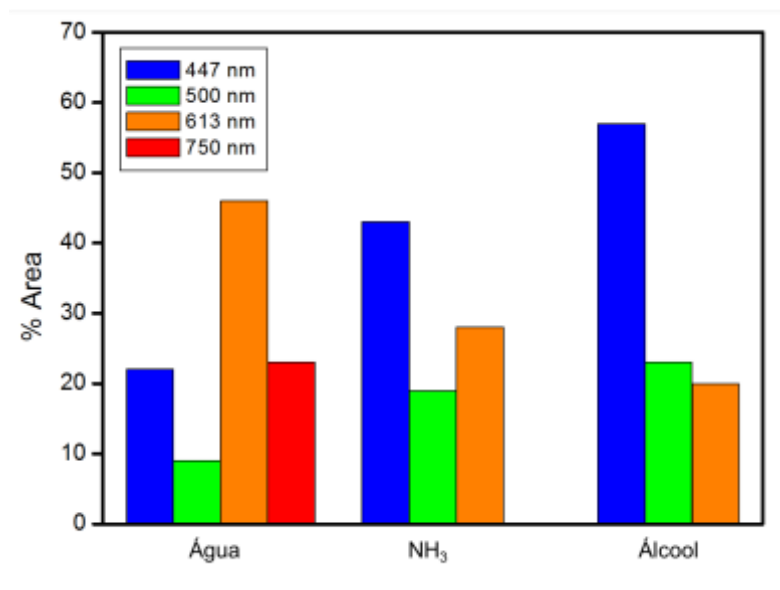
Figura 22 - Espectro de fotoluminescência e deconvolução dos picos com o programa PeakFit dos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizados em água, solução amoniacal (NH_3) e solução alcoólica.



Fonte: Elaboração própria.

As bandas de fotoluminescência do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ resultam de processos de pares de elétron-buraco gerados por luz e a transição eletrônica entre a banda de valência e a banda de condução. Os espectros exibem perfis característicos amplos como resultado dos múltiplos caminhos de relaxação, que envolvem a participação de numerosos estados de energia dentro do gap óptico. Esse comportamento é relacionado com a desordem estrutural do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e confirma a presença de níveis eletrônicos adicionais na região proibida do gap do material¹⁰⁸.

Figura 23 - Porcentagem de área obtida através da deconvolução dos espectros de fotoluminescência dos microcristais α -Ag₂WO₄ sintetizados em água, solução amoniacal (NH₃) e solução alcoólica.



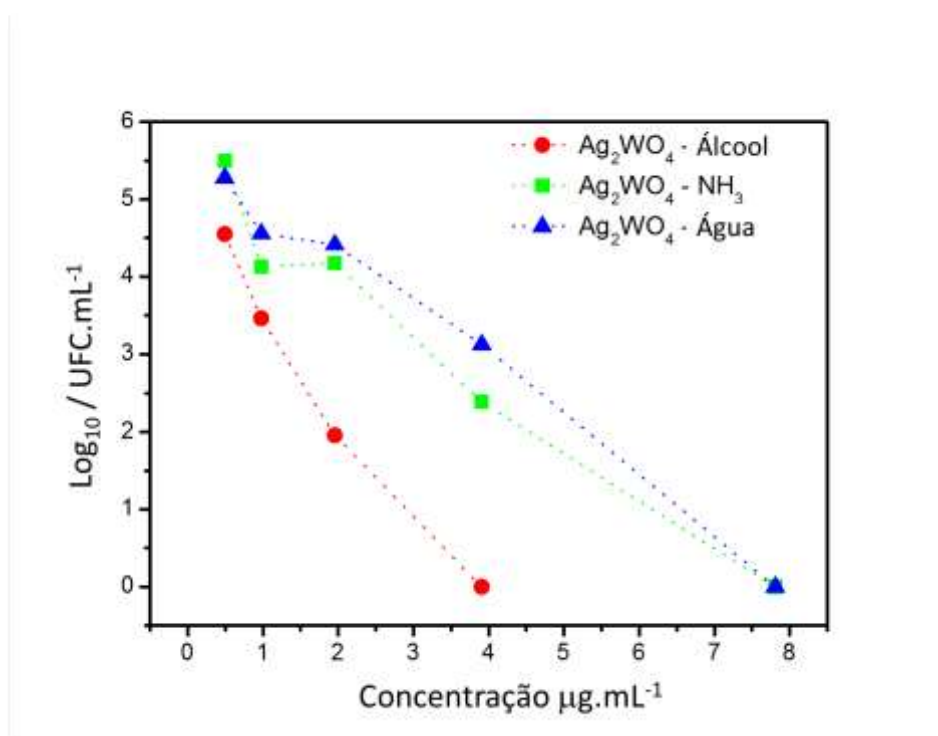
Fonte: Elaboração própria.

Os picos correspondem ao azul (447 nm), verde (510 nm), laranja (613 nm), e vermelho (750 nm), e referem-se às regiões onde ocorre a absorção máxima dos componentes. As porcentagens de contribuição de cada área para os microcristais sintetizados nos três solventes são apresentadas na Figura 23.

Os resultados dos testes microbiológicos demonstraram que, independente do solvente utilizado na síntese, os microcristais de α -Ag₂WO₄ apresentaram tanto atividade fungistática quanto fungicida contra *C. albicans*. Além disso, para cada uma das três amostras de α -Ag₂WO₄, ou seja, microcristais sintetizados em água, solução alcólica e solução amoniacal, os valores de CIMs e CFMs foram coincidentes. Entretanto, quando a água e a amônia foram utilizadas como solventes, os valores de CIM/CFM foram similares (7,81 μ g/mL) e maiores que os observados para a amostra sintetizada utilizando álcool (3,90 μ g/mL) (Figura 24). É importante notar que, mesmo em concentrações menores que os valores de CIM/CFM, os microcristais de α -Ag₂WO₄ ainda foram capazes de reduzir o crescimento fúngico. Quando *C. albicans* foi incubada sem os microcristais de α -Ag₂WO₄ (controles), uma contagem de 6,1 log₁₀ UFC/mL foi obtida. A Figura 23 mostra que, na concentração correspondente à metade do CIM/CFM para a amostra sintetizada com álcool (1,95 μ g/mL), o UFC/mL de *C. albicans* foi reduzido em, aproximadamente, 4 logs (para ~ 2 log₁₀ UFC/mL). Nas concentrações de 0,98 e 0,49 μ g/mL, as contagens de *C. albicans* também foram menores que a do controle (3,5 log₁₀ CFU/mL e 4,5 log₁₀ CFU/mL, respectivamente). Embora os efeitos dos microcristais de

α -Ag₂WO₄ sintetizados em amônia e água tenham sido menos pronunciados, na concentração de 3,90 µg/mL (metade do valor de MIC/MFC), o crescimento foi reduzido para, aproximadamente, 2,4 log₁₀ CFU/mL e 3,1 log₁₀ CFU/mL, respectivamente. Comparado com o controle, redução de aproximadamente 2 logs também foi observada na concentração de 1,95 µg/mL e 0,98 µg/mL para amônia (para ~4,2 log₁₀ CFU/mL) e água (para ~4,4 log₁₀ CFU/mL).

Figura 24 - Valores de log₁₀ UFC/mL obtidos para as concentrações sub-inibitórias do α -Ag₂WO₄ sintetizados em diferentes solventes contra o microrganismo *C. albicans*. Controle = 6,1 log₁₀ UFC/mL.

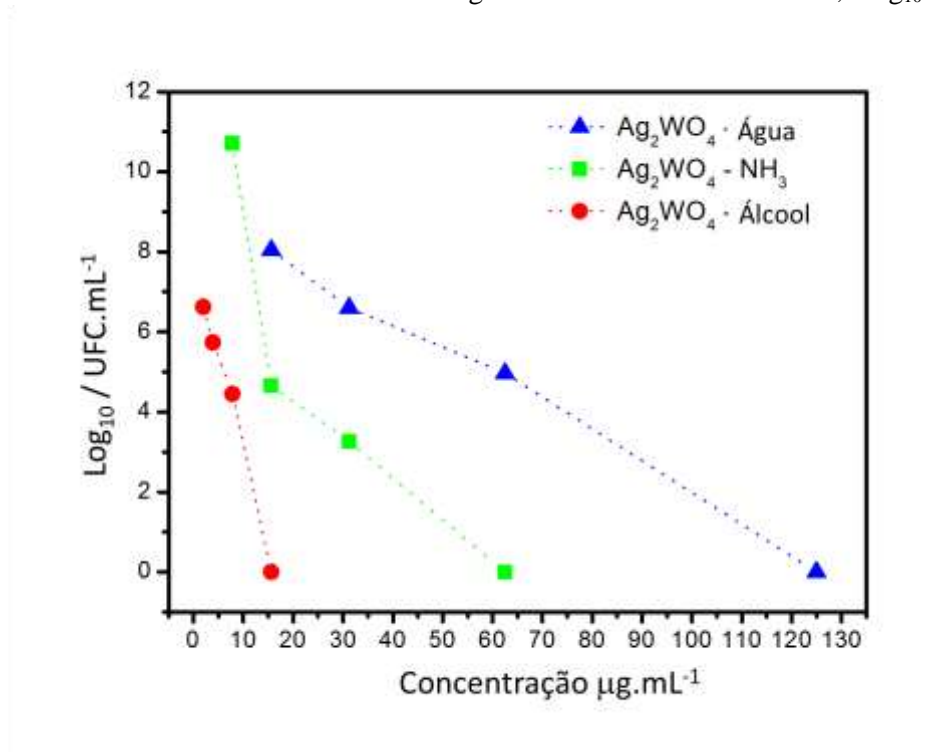


Fonte: Elaboração própria.

Os resultados dos testes realizados com SARM revelaram que para os três solventes utilizados na síntese dos microcristais de α -Ag₂WO₄, os valores de MIC foram os mesmos que os de MBC. A Figura 24 mostra que os valores CIM/CBM se apresentaram mais baixos para o microcristal sintetizado em álcool (15,62 µg/mL) quando comparado com o sintetizado em amônia (62,50 µg/mL), sendo os dois microcristais mais eficientes do que o sintetizado com água como diluente (125 µg/mL). Na concentração correspondente à metade do CIM/CBM, foi observado redução da quantidade de microrganismos viáveis em aproximadamente 5,5 logs em relação ao controle (10,0 log₁₀), para o microcristal sintetizado em álcool (valor médio de 4,4 log₁₀). A redução na concentração sub-CIM para o microcristal

em amônia foi de aproximadamente 6,7 logs (valor médio 3,2 \log_{10}) e a redução no microcristal sintetizado em água foi de aproximadamente 5 logs (valor médio 4,9 \log_{10}). Comparado com o controle, os microcristais sintetizados em álcool, nas concentrações de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ e 1,95 $\mu\text{g/mL}$, ainda promoveram redução de pelo menos 3 logs (Figura 25).

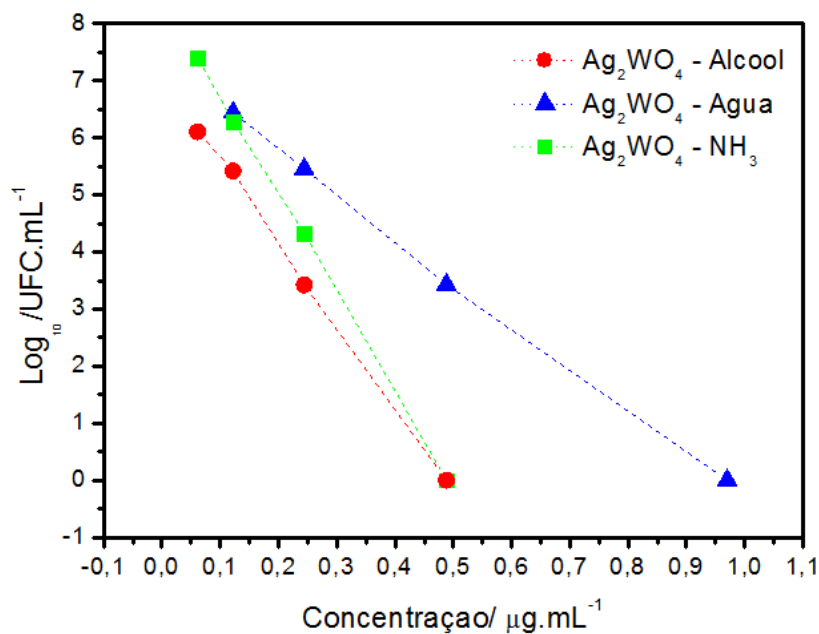
Figura 25 - Valores de \log_{10} UFC/mL obtidos para as concentrações sub-inibitórias do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizados em diferentes solventes contra o microrganismo SARM. Controle = 10,0 \log_{10} UFC/mL.



Fonte: Elaboração própria.

A Figura 26 apresenta os valores de \log_{10} CFU/mL para o microrganismo *E. coli*, quando incubado com concentrações sub-inibitórias dos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. Para os três solventes, os valores de CIM/CBM foram coincidentes. Além disso, para os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizados em álcool e amônia os valores foram semelhantes entre si (0,48 $\mu\text{g/mL}$) e inferiores em comparação aos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizado em água (0,97 $\mu\text{g/mL}$). Mesmo para concentrações inferiores ao CIM/CBM, houve redução na quantidade de microrganismos viáveis, assim como ocorreu para SARM e *C. albicans*. A redução da quantidade de *E. coli* na concentração sub-CIM para os microcristais sintetizados em água foi de aproximadamente 4 logs (de 7,2 \log_{10} para 3,4 \log_{10}), bem como para aqueles sintetizados em álcool. Para a síntese realizada em amônia, a redução foi de aproximadamente 3 logs (de 7,2 \log_{10} para 4,3 \log_{10}).

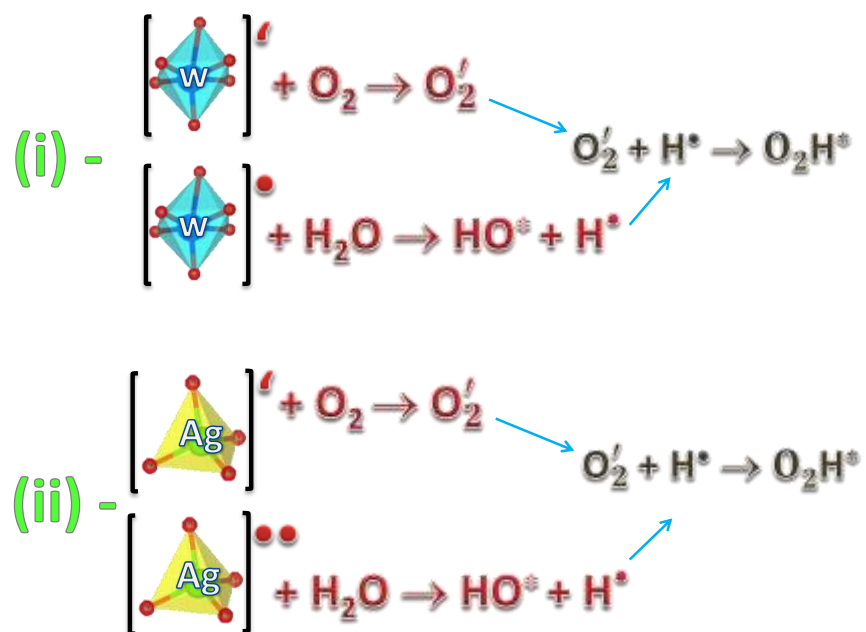
Figura 26 - Valores de \log_{10} UFC/mL obtidos para as concentrações sub-inibitórias do α - Ag_2WO_4 sintetizados em diferentes solventes contra o microrganismo *E. coli*. Controle = $7,2 \log_{10}$ UFC/mL.



Fonte: Elaboração própria.

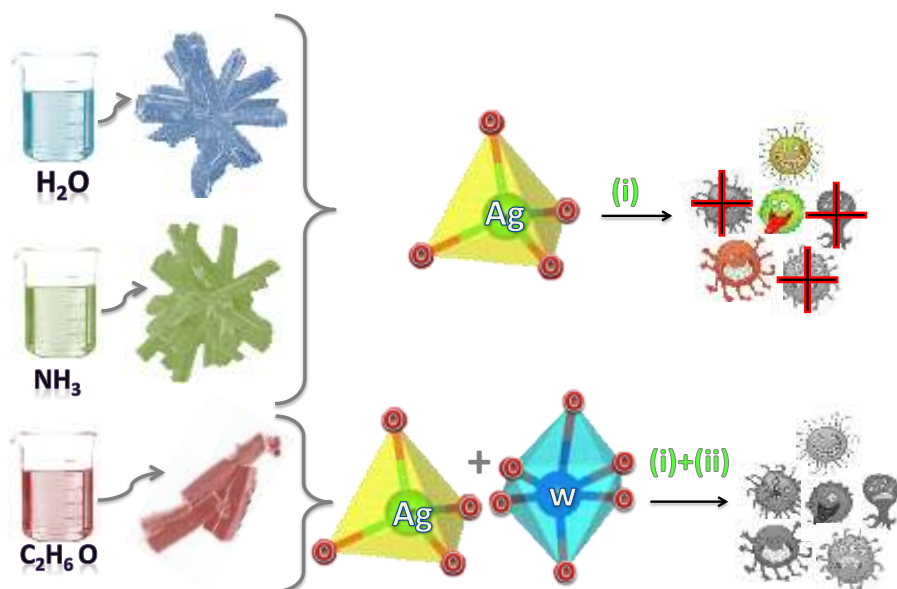
As Figuras 27 e 28 mostram os mecanismos propostos para a atividade antimicrobiana dos microcristais de α - Ag_2WO_4 sintetizados em diferentes solventes. Esses mecanismos têm como base as distorções dos “clusters” $[\text{WO}_6]$ e $[\text{AgO}_y]$, que são, respectivamente, formador e modificador da rede cristalina do α - Ag_2WO_4 , e consequente geração de radicais livres.

Figura 27 - Mecanismo proposto para a geração dos radicais oxidativos pelos microcristais de α - Ag_2WO_4 .



Fonte: Elaboração própria.

Figura 28 - Mecanismo proposto para o efeito antimicrobiano dos microcristais de α - Ag_2WO_4 , quando sintetizados em diferentes solventes.

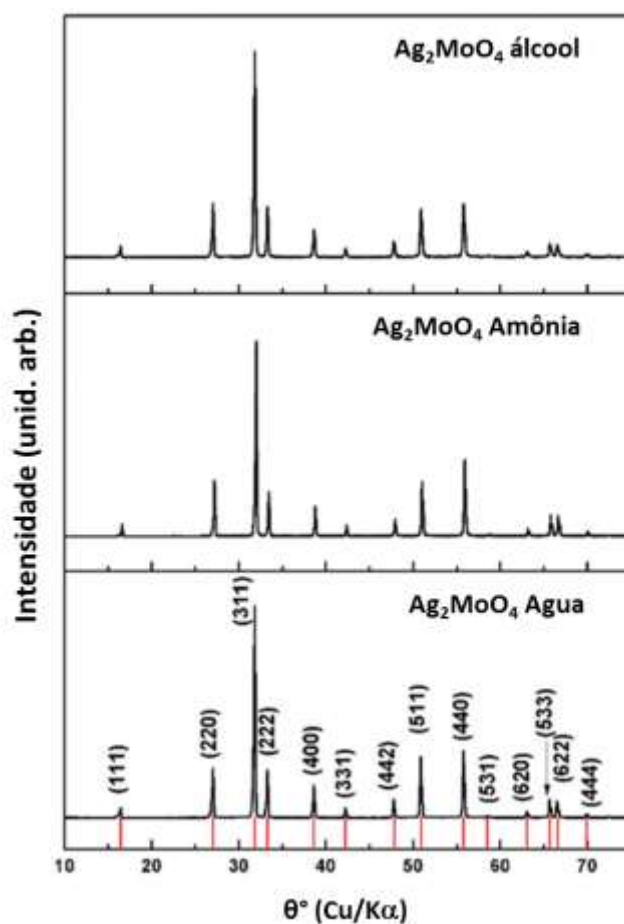


Fonte: Elaboração própria.

5.5 Microcristais de β - Ag_2MoO_4 em Diferentes Solventes

A Figura 29 mostra o padrão de DRX dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 sintetizados em água, álcool e amônia.

Figura 29 - Padrões de difração de raios X (DRX) dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 sintetizados em água, álcool e amônia.



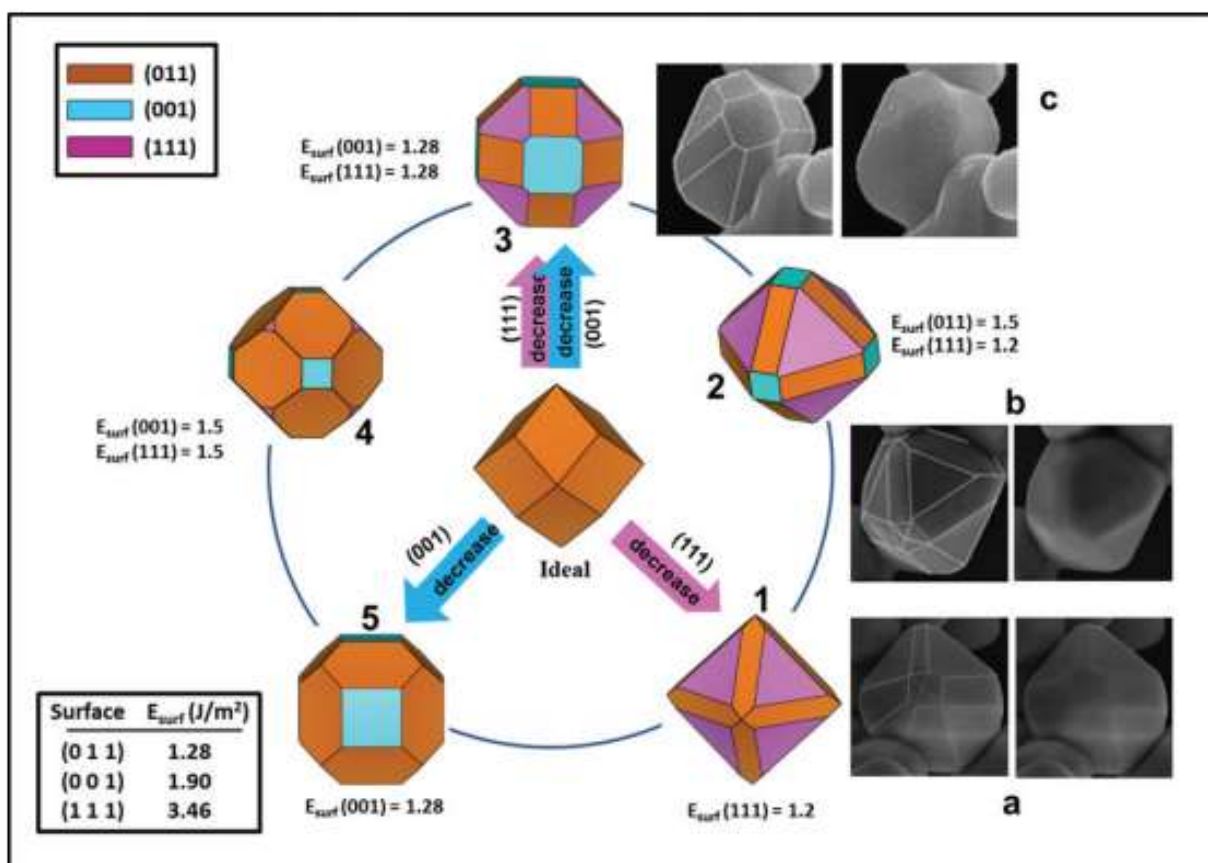
Fonte: Adaptado de Fabbro et al.⁶⁰.

Os padrões de DRX mostraram que todos os picos de difração dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 indicaram estrutura cúbica do tipo espinélio com grupo espacial ($Fd\bar{3}m$) e simetria (O_{7h}), de acordo com o respectivo cartão da base de dados Inorganic Crystal Structure Database (ICSD) n^o 28891⁵³.

As microestruturas dos compostos de β - Ag_2MoO_4 sintetizados nos três solventes foram estudadas por imagens de microscopia FE-SEM (Figura 30a, 30b e 30c), onde pode-se observar que as partículas possuem formato arredondado e com tamanho em escala

micrométrica. Na Figura 30 pode-se também observar as morfologias derivadas de cálculos teóricos, mostrando as faces ao longo dos planos cristalográficos (011), (001) e (111).

Figura 30 - Morfologias teóricas derivadas da construção de Wulff, com os respectivos valores de energia (E_{surf}) para cada uma das superfícies (011), (001) e (111), e imagens de FE-SEM dos microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ sintetizados com a) água; b) amônia; c) álcool.



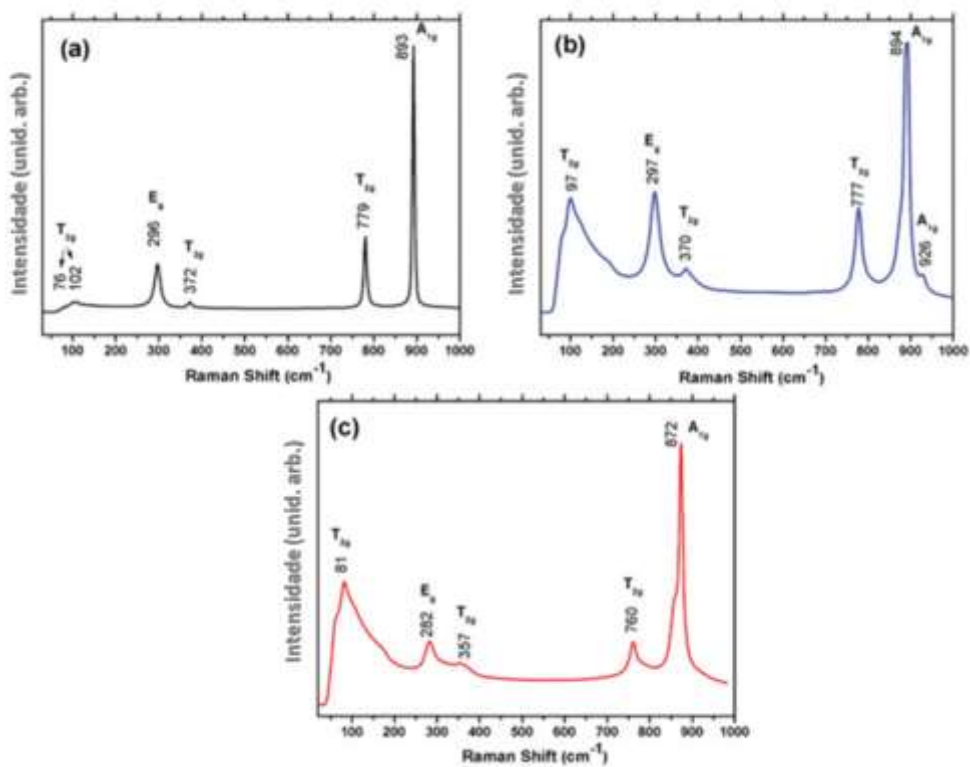
Fonte: Adaptado de Fabbro et al.⁶⁰.

Com base no teorema de Wulff, as formas de equilíbrio para esses sistemas foram obtidas a partir dos valores das suas respectivas energias de superfície. A análise da Figura 30 mostra que quando a proporção da energia de superfície variou, por meio da diminuição da energia da superfície (111) para o valor de $1,2 \text{ J m}^{-2}$, os resultados revelaram que ambas as faces (011) e (001) foram desfavorecidas e a morfologia 1 foi observada. Se, além disso, o valor da face (011) aumenta para $1,5 \text{ J m}^{-2}$, a face (001) aparece e, como resultado a morfologia 2 foi obtida. As imagens de microscopia obtidas para o $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ sintetizado em água e amônia são apresentadas na Figura 30 (a e b) e ambas podem ser relacionadas às morfologias teóricas 1 e 2. Por outro lado, quando os valores de energia de superfície para as

duas faces (001) e (111) diminuem para $1,28 \text{ J m}^{-2}$, ou seja, o mesmo valor de energia de superfície da face (011), a morfologia 3 é obtida, a qual pode ser comparada com aquela obtida experimentalmente para os microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ sintetizados utilizando etanol como solvente (Figura 30, c).

Os espectros Raman dos microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ podem ser vistos na Figura 31 e resumidos na Tabela 2. Os espectros revelam a presença de cinco modos vibracionais ativos Raman, como esperado.

Figura 31 - Espectros de Micro-Raman dos microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ sintetizados em diferentes solventes: (a) etanol, (b) amônia e (c) água.



Fonte: Adaptado de Fabbro et al.⁶⁰.

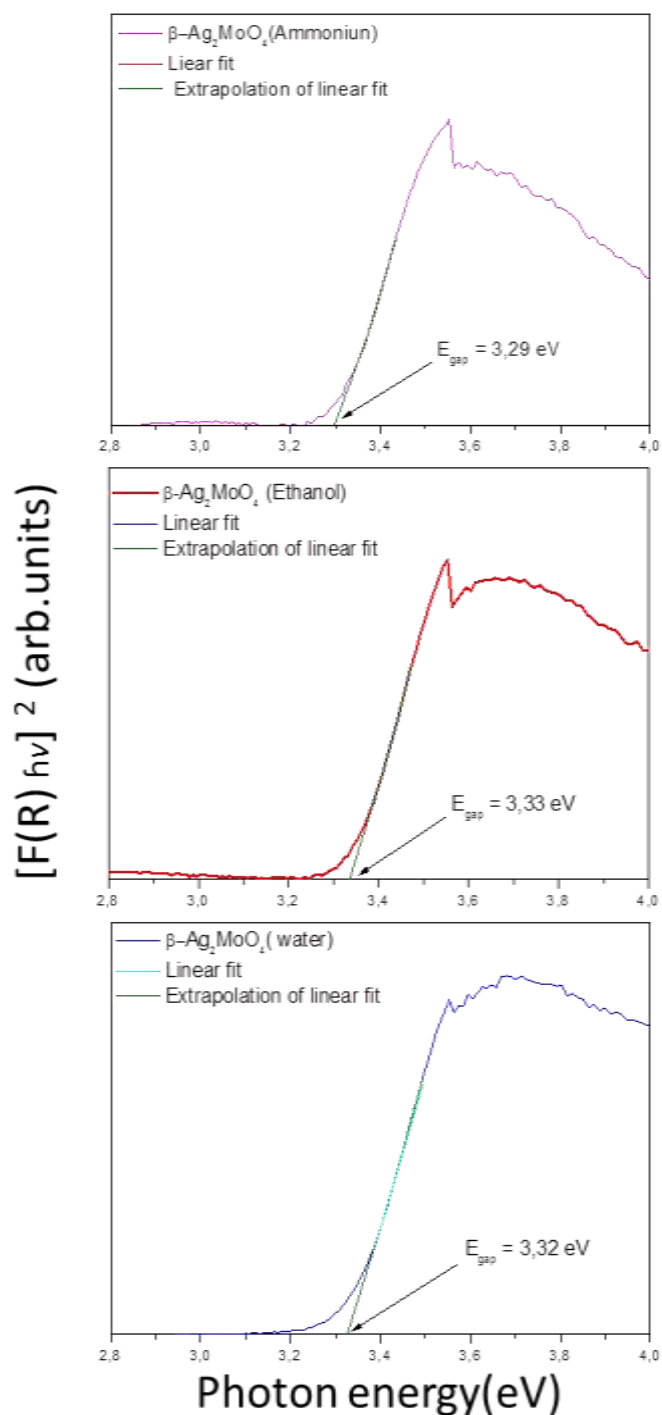
Tabela 2 - Posições relativas dos modos ativos Raman (Experimentais e Teóricos).

Simetria	Deslocamentos Raman Experimentais (cm ⁻¹)	Deslocamentos Raman Calculados (cm ⁻¹)	Número	Descrição
A_{1g}	872-926	841-921 (1)	ν_1	Estiramento simétrico MoO ₄
T_{2g}	760-777	761-776 (186)	ν_3	Estiramento assimétrico MoO ₄
T_{2g}	357-372	348-370 (186)	ν_4	
E_g	282-297	272-279 (1, 186)	ν_2	Ligação assimétrica MoO ₄
T_{2g}	76-102	89-93 (1, 186)	----	Ligação simétrica MoO ₄

Fonte: Adaptado de Fabbro et al.⁶⁰.

Os resultados das análises UV-Vis dos microcristais de β -Ag₂MoO₄ sintetizados nos diferentes solventes estão apresentados na Figura 32.

Figura 32 - Espectro de reflectância difusa de UV-Vis dos microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ sintetizados em diferentes solventes.



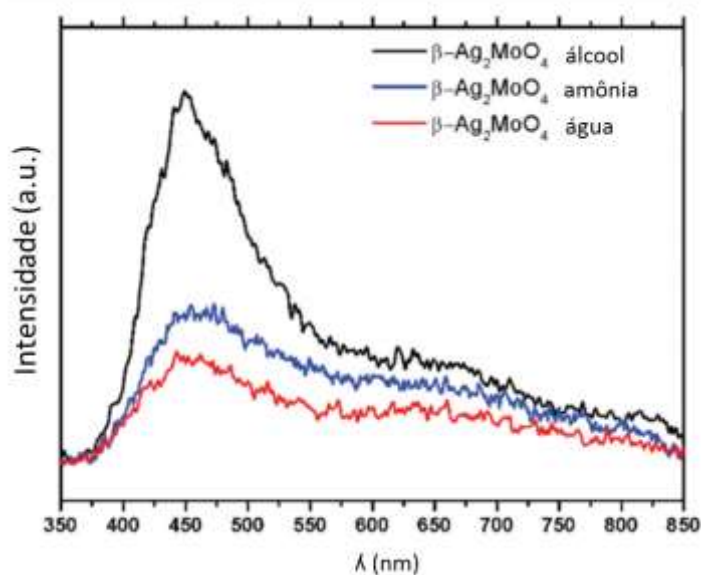
Fonte: Adaptado de Fabbro et al.⁶⁰.

A partir dos espectros de refletância obtidos por análise de UV-Vis, foi possível estabelecer a energia do gap óptico (E_{gap}) das amostras utilizando o método de Kubelka e

Munk-Aussig⁹⁴, tendo sido os valores obtidos 3,29, 3,33 e 3,32 para os microcristais sintetizados em amônia, etanol e água, respectivamente.

A Figura 33 mostra espectros de emissão de fotoluminescência dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 sintetizados em diferentes solventes. Esses resultados demonstram que o solvente afeta a variação na densidade de defeitos do material.

Figura 33 - Espectros de fotoluminescência realizados a temperatura ambiente de microcristais de β - Ag_2MoO_4 sintetizados em água (linha vermelha), álcool (linha preta) e amônia (linha azul).



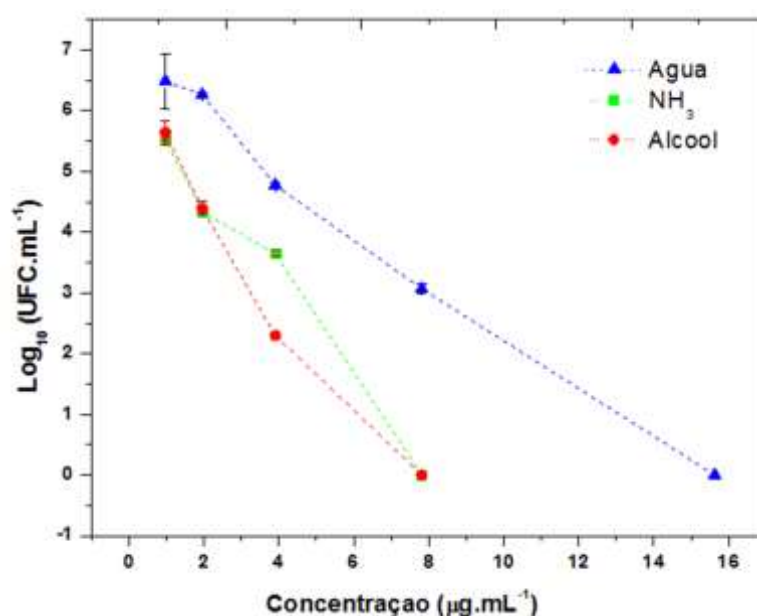
Fonte: Adaptado de Fabbro et al.⁶⁰.

O perfil de fotoluminescência mostra emissão máxima na região do azul (449 nm) e uma emissão fraca na região do laranja (650 nm).

Os resultados dos testes microbiológicos demonstraram que, independente do solvente utilizado na síntese, os microcristais de β - Ag_2MoO_4 apresentaram atividade tanto fungistática quanto fungicida contra *C. albicans*. As três amostras de β - Ag_2MoO_4 apresentaram valores de CIMs e CFMs coincidentes. Entretanto, quando o álcool e a amônia foram utilizados como solventes, os valores de CIM/CFM foram similares (7,81 $\mu\text{g/mL}$) e mais baixos que aqueles registrados para a amostra sintetizada utilizando-se água (15,62 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 34). É importante notar que, mesmo em concentrações menores que os valores de CIM/CFM, os microcristais de β - Ag_2MoO_4 ainda foram capazes de reduzir o crescimento fúngico. Quando *C. albicans* foi incubada sem os microcristais de β - Ag_2MoO_4 (controles), uma contagem de 6,6 \log_{10} UFC/mL foi obtida. A Figura 34 mostra que, nas concentrações de 1,95 $\mu\text{g/mL}$, para as amostras sintetizadas com álcool e amônia, o UFC/mL de *C. albicans* foi reduzido em,

aproximadamente, 2 logs (para $\sim 4,4 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$). Na concentração correspondente à metade do valor de CIM/CFM ($3,90 \mu\text{g/mL}$), o crescimento fúngico foi também reduzido para aproximadamente $3,5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ e $2,3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$, para os solventes amônia e álcool, respectivamente. O efeito para os microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ sintetizados em água foi menos pronunciado, e a redução do valor de $\text{log}_{10} \text{ UFC/mL}$ comparado com o controle (de $6,6 \text{ log}_{10} \text{ UFC/mL}$ para $3,0 \text{ log}_{10} \text{ UFC/mL}$) foi observada somente na concentração de $7,81 \mu\text{g/mL}$ (metade do valor de CIM/CFM).

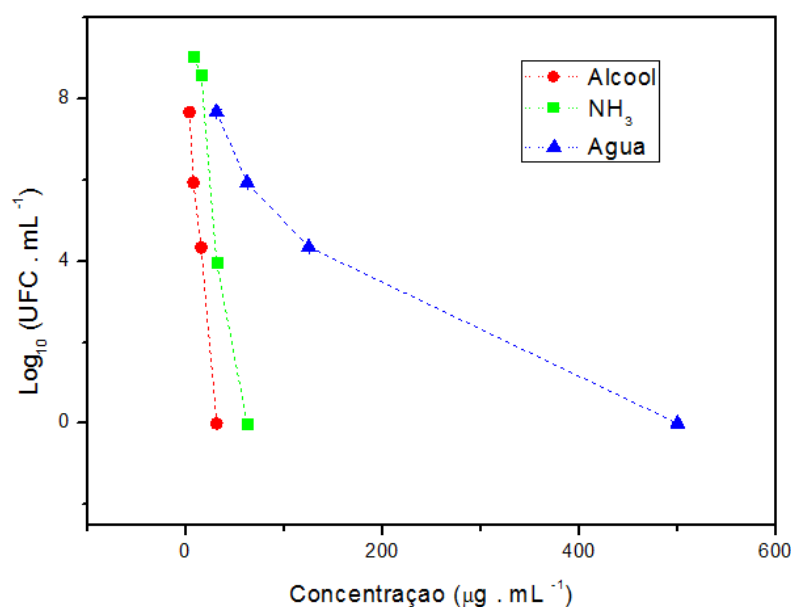
Figura 34 - Valores de $\text{log}_{10} \text{ UFC/mL}$ obtidos para as concentrações sub-inibitórias do $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ sintetizado em diferentes solventes contra o microrganismo *C. albicans*. Controle = $6,6 \text{ log}_{10} \text{ UFC/mL}$.



Fonte: Adaptado de Fabbro et al.⁶⁰.

Os microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ também foram efetivos contra o microrganismo SARM e, para os três solventes utilizados, os valores de CIM foram os mesmos que os de CBM. Quando os microcristais foram sintetizados com álcool, o valor de CIM/CMB ($31,25 \mu\text{g/mL}$) foi menor do que o observado para aqueles sintetizados em amônia ($62,50 \mu\text{g/mL}$), e ambos foram mais efetivos do que a amostra sintetizada com água ($500 \mu\text{g/mL}$). A Figura 35 também mostra que, comparado com o controle ($8,8 \text{ log}_{10} \text{ UFC/mL}$), na metade dos valores de CIM/CBM, o crescimento de SARM foi reduzido em, aproximadamente, 4 logs para os microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ sintetizados com álcool (para $4,3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$), 5 logs para os microcristais sintetizados com amônia (para $3,9 \text{ log}_{10} \text{ UFC/mL}$) e 4 logs quando a água foi utilizada como solvente (para $4,3 \text{ log}_{10} \text{ UFC/mL}$).

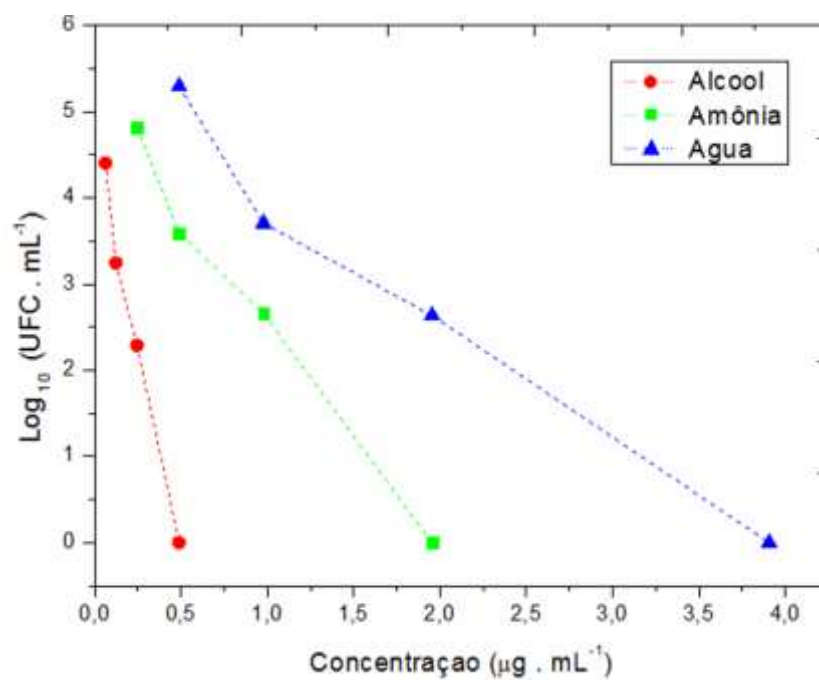
Figura 35 - Valores de \log_{10} UFC/mL obtidos para as concentrações sub-inibitórias do β - Ag_2MoO_4 sintetizado em diferentes solventes contra o microrganismo SARM. Controle = $8,8 \log_{10}$ UFC/mL.



Fonte: Elaboração própria.

Para *E. coli*, os microcristais de β - Ag_2MoO_4 sintetizados usando álcool apresentaram valores de CIM/CBM ($0,49 \mu\text{g}/\text{mL}$) menores que os observados para aqueles sintetizados com amônia ($1,95 \mu\text{g} / \text{mL}$) e água ($3,91 \mu\text{g}/\text{mL}$). A incubação das bactérias na presença dos microcristais em concentrações correspondentes à metade dos valores de CIMs produziu redução no crescimento bacteriano em relação ao controle ($7,3 \log_{10}$ UFC/mL) de aproximadamente 5 logs para os microcristais sintetizados em álcool, água e amônia (Figura 36).

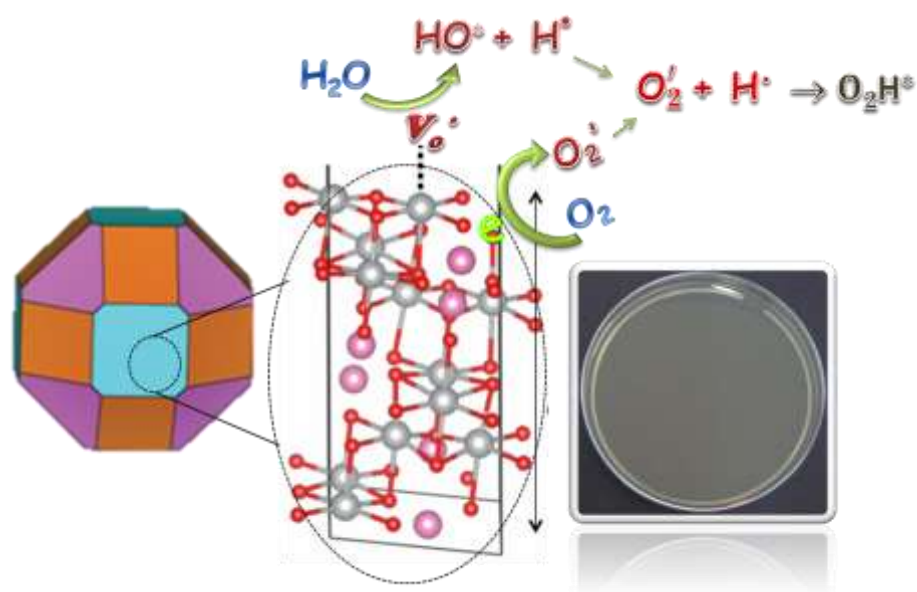
Figura 36 - Valores de \log_{10} UFC/mL obtidos para as concentrações sub-inibitórias do β - Ag_2MoO_4 sintetizado em diferentes solventes contra o microrganismo *E. coli*. Controle = $7,3 \log_{10}$ UFC/mL



Fonte: Elaboração própria.

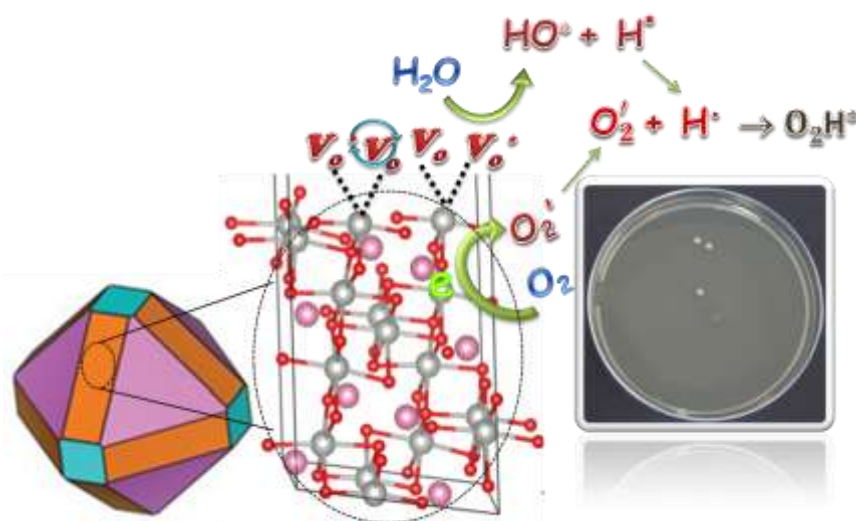
Nas Figuras 37, 38 e 39, estão ilustradas as faces cristalográficas dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 , as ligações dos “clusters” expostos em cada superfície, bem como os mecanismos de geração de espécies reativas.

Figura 37 - Esquema ilustrativo das ligações dos “clusters” expostos e produção de espécies reativas para a faceta (001) nos microcristais de β - Ag_2MoO_4 sintetizados em álcool.



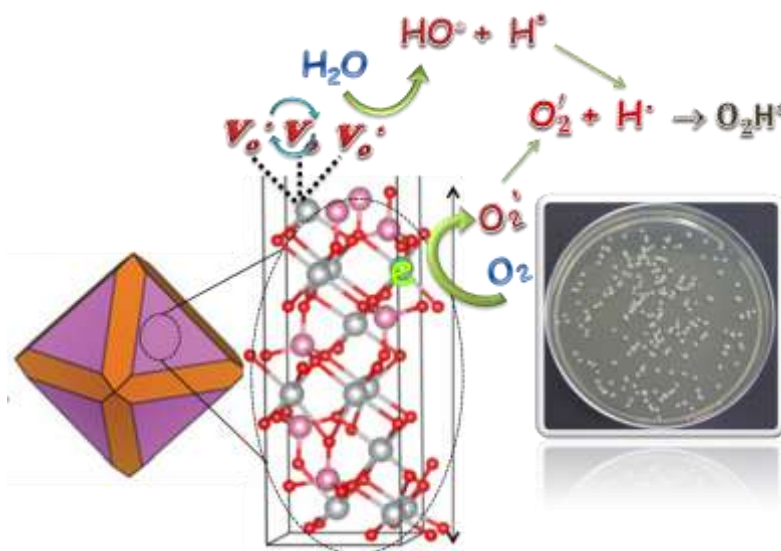
Fonte: Elaboração própria.

Figura 38 - Esquema ilustrativo das ligações dos “clusters” expostos e produção de espécies reativas para a faceta (011) nos microcristais de β - Ag_2MoO_4 sintetizados em amônia.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 39 - Esquema ilustrativo das ligações dos “clusters” expostos e produção de espécies reativas para a faceta (111) nos microcristais de β - Ag_2MoO_4 sintetizados em água.



Fonte: Elaboração própria.

As Figuras 37, 38 e 39 mostram que as superfícies (111) são terminadas em molibdênio e oxigênio enquanto as superfícies (001) e (011) são terminadas em oxigênio e prata. Além da configuração atômica das facetas expostas, o solvente utilizado na síntese tem um grande efeito na reatividade e estabilização das superfícies.

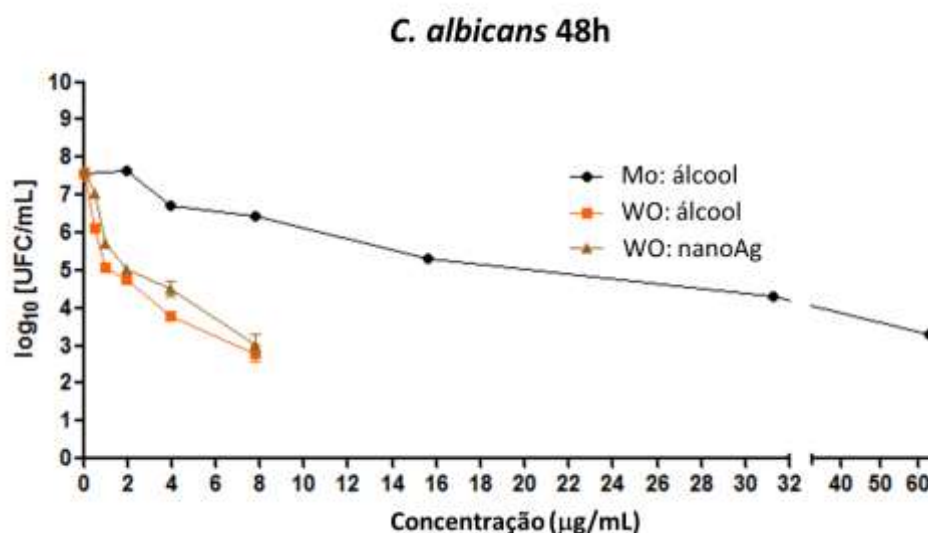
5.6. Ação de Compostos (Óxidos Bimetálicos) Associados à Prata Contra Biofilmes

Os compostos selecionados para a avaliação em relação à inibição da formação de biofilmes foram os microcristais de α - Ag_2WO_4 irradiado (com nanofilamentos de prata na superfície), α - Ag_2WO_4 e β - Ag_2MoO_4 , ambos sintetizados em meio alcoólico, devido ao seu melhor desempenho contra os microrganismos na forma planctônica^{60, 110}. Os resultados das caracterizações desses microcristais já foram previamente apresentados nos itens 5.1, 5.4 e 5.5. A seguir, serão apresentados os resultados relativos aos testes microbiológicos realizados com *C. albicans*, SARM e *E. coli*. Na apresentação desses resultados, os microcristais α - Ag_2WO_4 irradiado, α - Ag_2WO_4 e β - Ag_2MoO_4 , ambos sintetizados em meio alcoólico, serão designados pelas seguintes siglas: WO: NanoAg, WO: álcool e Mo: álcool.

As Figuras 40 e 41 mostram os resultados obtidos com o fungo *C. albicans* a partir da contagem de UFC e das medições de peso seco, respectivamente. Nota-se que a formação de biofilme de *C. albicans* foi completamente inibida pelos três microcristais, mas a

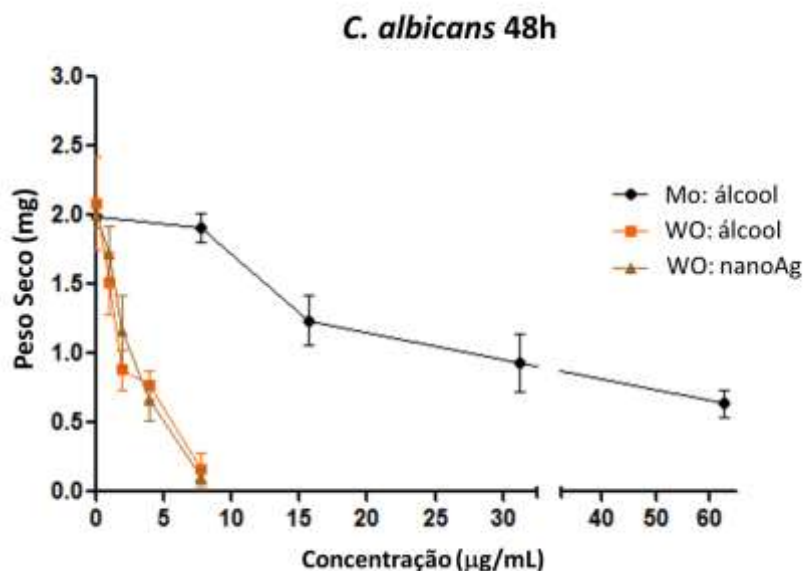
concentração necessária foi superior para Mo: álcool (125 $\mu\text{g/mL}$) do que para WO:nanoAg e WO:álcool, que foram efetivos na mesma concentração (15,62 $\mu\text{g/mL}$). Os controles (*C. albicans* incubados sem os microcristais) resultaram em biofilmes com número de células viáveis de $\sim 7,5 \log_{10}$ UFC/mL. A Figura 40 mostra também que, em concentrações correspondentes à metade daquelas necessárias para inibir a formação de biofilme de *C. albicans* (62,50 $\mu\text{g/mL}$ para Mo:álcool e 7,81 $\mu\text{g/mL}$, para WO:nanoAg e WO:álcool), os valores foram reduzidos para 3,3 \log_{10} UFC/mL, 3,0 \log_{10} UFC/mL e 2,80 \log_{10} UFC/mL, respectivamente. Os microcristais de WO:nanoAg e WO:álcool foram capazes de promover reduções de ≥ 2 logs mesmo quando testados em baixa concentração (1,95 $\mu\text{g/mL}$), enquanto 15,62 $\mu\text{g/mL}$ de Mo:álcool foram necessários para obter redução similar. Diminuição do peso seco também foi observada em relação aos controles ($\sim 2,00$ mg/2mL), com valores de 0,64 mg/2mL para Mo:álcool (62,50 $\mu\text{g/mL}$), 0,11 mg/2mL para WO:nanoAg (7,81 $\mu\text{g/mL}$) e 0,16 mg/2 mL para WO:álcool (7,81 $\mu\text{g/mL}$). A Figura 41 também demonstra que os microcristais WO:álcool e WO:nanoAg na concentração de 1,95 $\mu\text{g/mL}$ provocaram redução de, aproximadamente, 60% e 40%, respectivamente, no peso seco de biofilme de *C. albicans*.

Figura 40 - Células viáveis (\log_{10} UFC/mL) de biofilmes de 48 h de *C. albicans* desenvolvidos com diversas concentrações dos microcristais WO:nanoAg, WO:álcool e Mo:álcool.



Fonte: Elaboração própria.

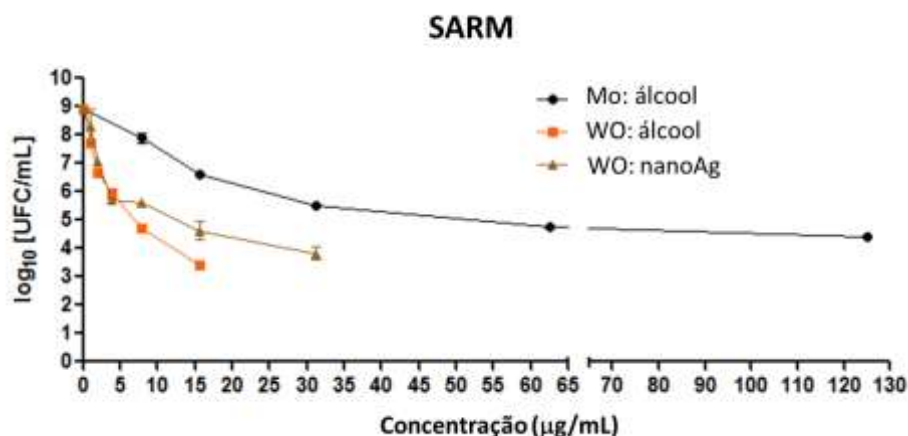
Figura 41 - Peso seco (mg/2mL) de biofilmes de 48 h de *C. albicans* desenvolvidos com diversas concentrações dos microcristais WO: nanoAg, WO: álcool e Mo: álcool.



Fonte: Elaboração própria.

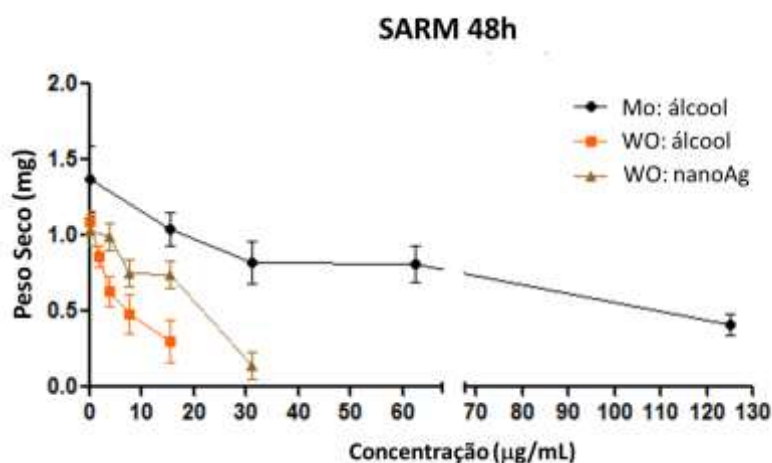
Como pode ser observado nas Figuras 42 e 43, a formação de biofilme de SARM foi totalmente inibida pelos três microcristais avaliados, porém em diferentes concentrações: 250 µg/mL, 62,50 µg/mL e 31,25 µg/mL para Mo:álcool, WO:nanoAg e WO:álcool, respectivamente. A Figura 42 demonstra que, na metade dessas concentrações, os microcristais ainda causaram inibição significativa da formação de biofilme, com valores mais baixos (Mo:álcool = 4,4 log₁₀ UFC/mL, WO:nanoAg = 3,8 log₁₀ UFC/mL, WO:álcool = 3,4 log₁₀ UFC/mL) em comparação com o controle (8,9 log₁₀ UFC/mL). Reduções maiores ou iguais a 4 logs foram observadas, em comparação com os controles, para os microcristais de WO:álcool, mesmo na concentração de 7,81 µg/mL, enquanto redução similar foi obtida apenas a 15,62 µg/mL para a amostra de WO:nanoAg e a 62,50 µg/mL para o Mo:álcool. Em relação ao peso seco, resultados semelhantes foram verificados (Figura 43). Mo:álcool a 125 µg/mL, WO:nanoAg a 31,25 µg/mL e WO:álcool a 15,62 µg/mL resultaram em biofilmes com peso seco de 0,41 mg/2 mL, 0,14 mg/2 mL, 0,30 mg/2 mL, valores que foram inferiores aos observados para o controle (1,16 mg/2 mL). Na concentração de 7,81 µg/mL, os microcristais de WO:álcool ainda reduziram o peso seco do biofilme de SARM para 0,48 mg/2 mL.

Figura 42 - Células viáveis (\log_{10} UFC/mL) de biofilmes de 48 h de SARM desenvolvidos com diversas concentrações dos microcristais WO:nanoAg, WO:álcool e Mo:álcool.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 43 - Peso seco (mg/2mL) de biofilmes de 48 h de SARM desenvolvidos com diversas concentrações dos microcristais WO:nanoAg, WO:álcool e Mo:álcool.

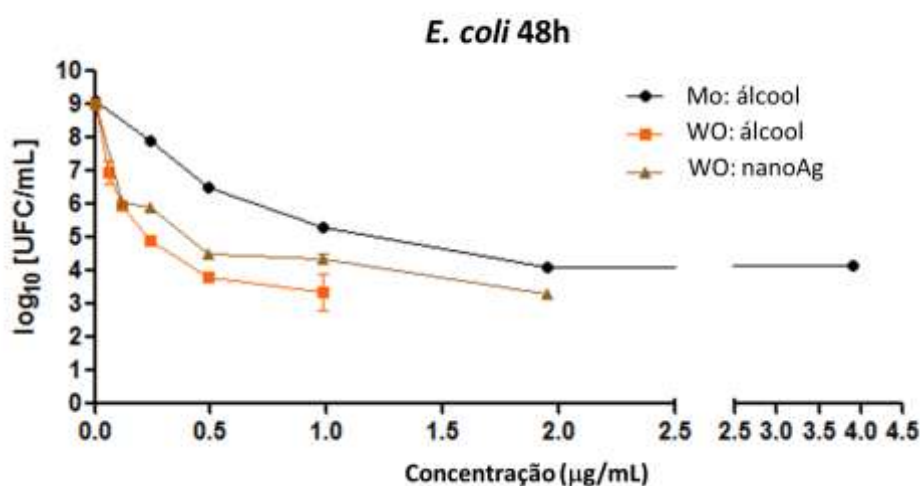


Fonte: Elaboração própria.

As concentrações necessárias para inibir completamente a formação de biofilmes de *E. coli* foram 7,81 µg/mL para Mo:álcool, 3,90 µg/mL para WO:nanoAg e 1,95 µg/mL para WO:álcool (Figura 44). Em metade dessas concentrações, os microcristais Mo:álcool, WO:nanoAg e WO:álcool diminuíram o número de células viáveis para 4,1 \log_{10} UFC/mL, 3,3 \log_{10} UFC/mL e 3,3 \log_{10} UFC/mL, que são inferiores àqueles obtidos para os controles (~9 \log_{10} UFC/mL). Mesmo em concentrações tão baixas quanto 0,24 µg/mL (WO:álcool), 0,49 µg/mL (WO:nanoAg) e 1,95 µg/mL (Mo:álcool), os microcristais foram capazes de promover redução igual ou maior que 4 logs. A Figura 45 mostra que os três microcristais também reduziram o peso seco do biofilme de *E. coli* em comparação com os controles (1,02

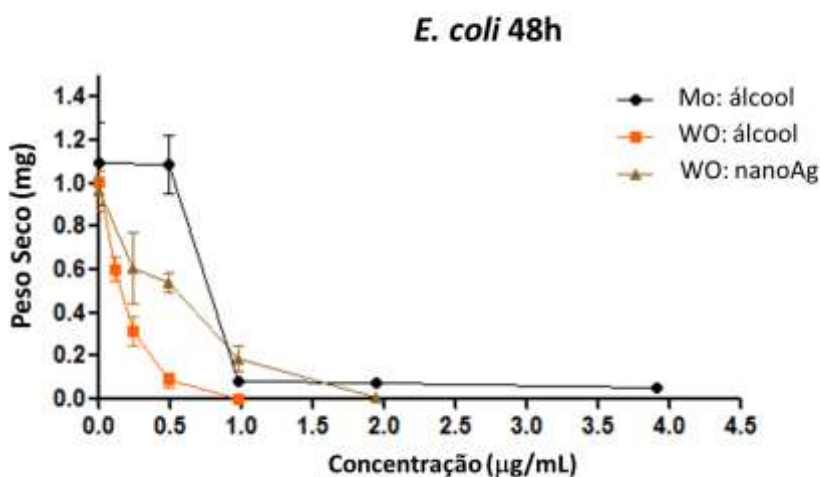
mg/2 mL), com valores de 0,0562 mg/2 mL para Mo:álcool (a 3,90 $\mu\text{g/mL}$), 0,0067 mg/2 mL para WO:nanoAg (a 1,95 $\mu\text{g/mL}$) e 0,0046 mg/2 mL para WO:álcool (a 0,98 $\mu\text{g/mL}$). Reduções de, aproximadamente, 90% e 70% no peso seco do biofilme foram observados para os microcristais WO:álcool em concentrações muito baixas de 0,49 $\mu\text{g/mL}$ e 0,24 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 44 - Células viáveis (\log_{10} UFC/mL) de biofilmes de 48 h de *E. coli* desenvolvidos com diversas concentrações dos microcristais WO:nanoAg, WO:álcool e Mo:álcool.



Fonte: Elaboração própria.

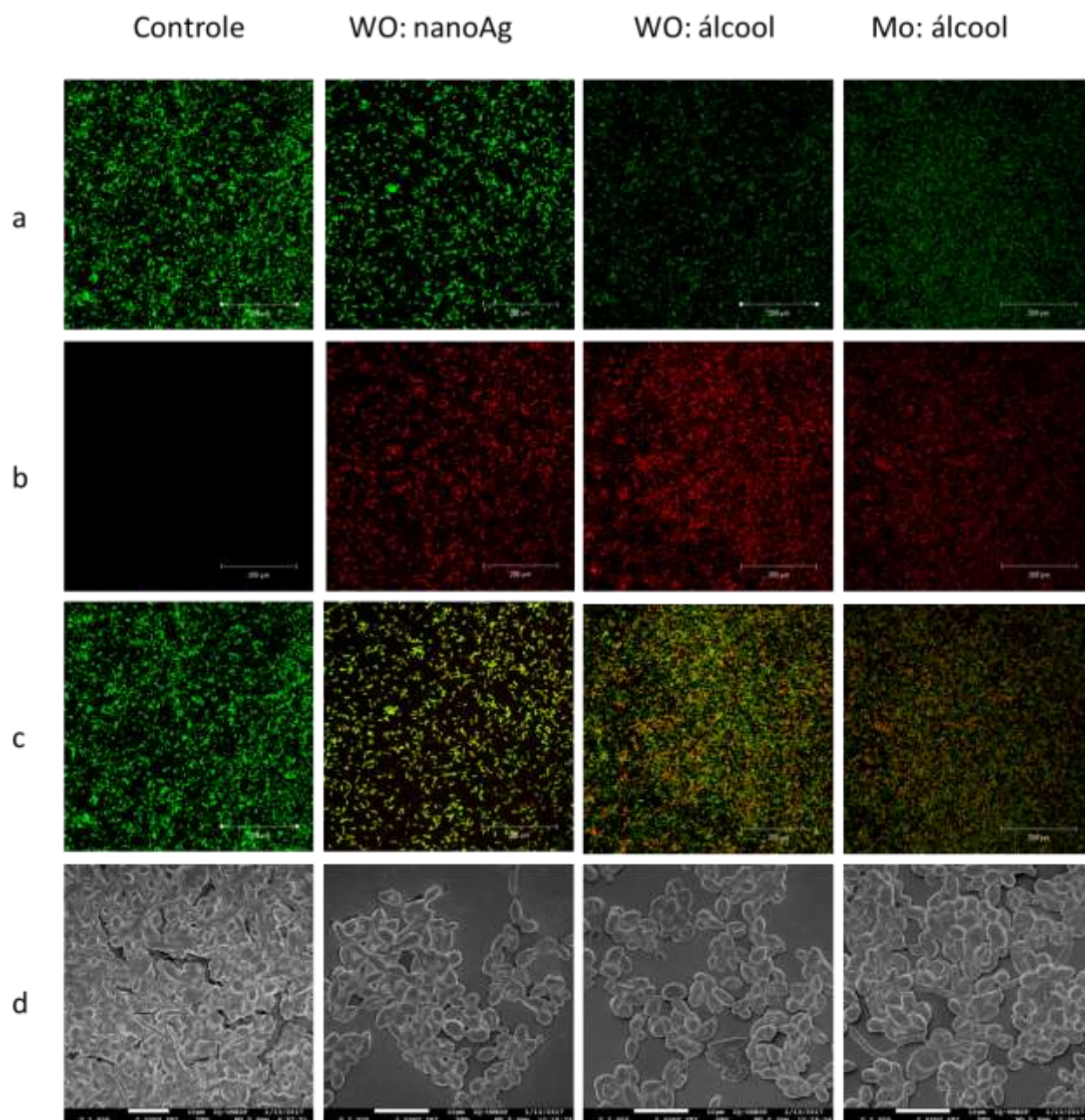
Figura 45 - Peso seco (mg/2mL) de biofilmes de 48 h de *E. coli* desenvolvidos com diversas concentrações dos microcristais WO:nanoAg, WO:álcool e Mo:álcool.



Fonte: Elaboração própria.

A Figura 46 apresenta as análises de microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes de *C. albicans* submetidos aos microcristais nas concentrações sub-inibitórias e controle, onde não houve contato do microrganismo com os microcristais. Para as imagens de microscopia confocal, as regiões de fluorescência verde indicam bactérias vivas e fluorescência vermelha representam células mortas. Quando é feita a intersecção das imagens, a sobreposição das células vivas e mortas é visualizada com a cor amarela. Pode-se observar nas imagens de microscopia confocal que os biofilmes submetidos a tratamento com os microcristais apresentam grande número de células coradas em vermelho, em comparação com o grupo controle. Embora todos os microcristais tenham diminuído a quantidade de células viáveis dos biofilmes, o WO:álcool proporcionou redução acentuada em comparação com o controle, sendo o efeito mais pronunciado entre os três compostos avaliados. Esses resultados são confirmados nas micrografias obtidas através de MEV (Figuras 46 d). Pode-se verificar, no controle (d), um biofilme denso, cobrindo toda a superfície e com a presença de células de *C. albicans* na forma de hifas. Em contraste, nas imagens relativas aos microcristais WO:nanoAg e WO:álcool observa-se acentuada diminuição na densidade dos biofilmes e áreas com ausência de células, e, principalmente, redução na quantidade de hifas em relação ao grupo controle. Além disso, pode-se observar a presença de células morfológicamente alteradas, fatos não observados para os microcristais de Mo:álcool que, embora tenham apresentado efeito inibitório sobre *C. albicans*, o biofilme formado ainda apresenta hifas e células morfológicamente normais.

Figura 46 - Microscopia confocal de varredura a laser (a – células vivas; b – células mortas e c – biofilme completo) e microscopia eletrônica de varredura (d) de biofilmes de *C. albicans* formados na presença dos microcristais WO:nanoAg, WO:álcool e Mo:álcool, e controle.

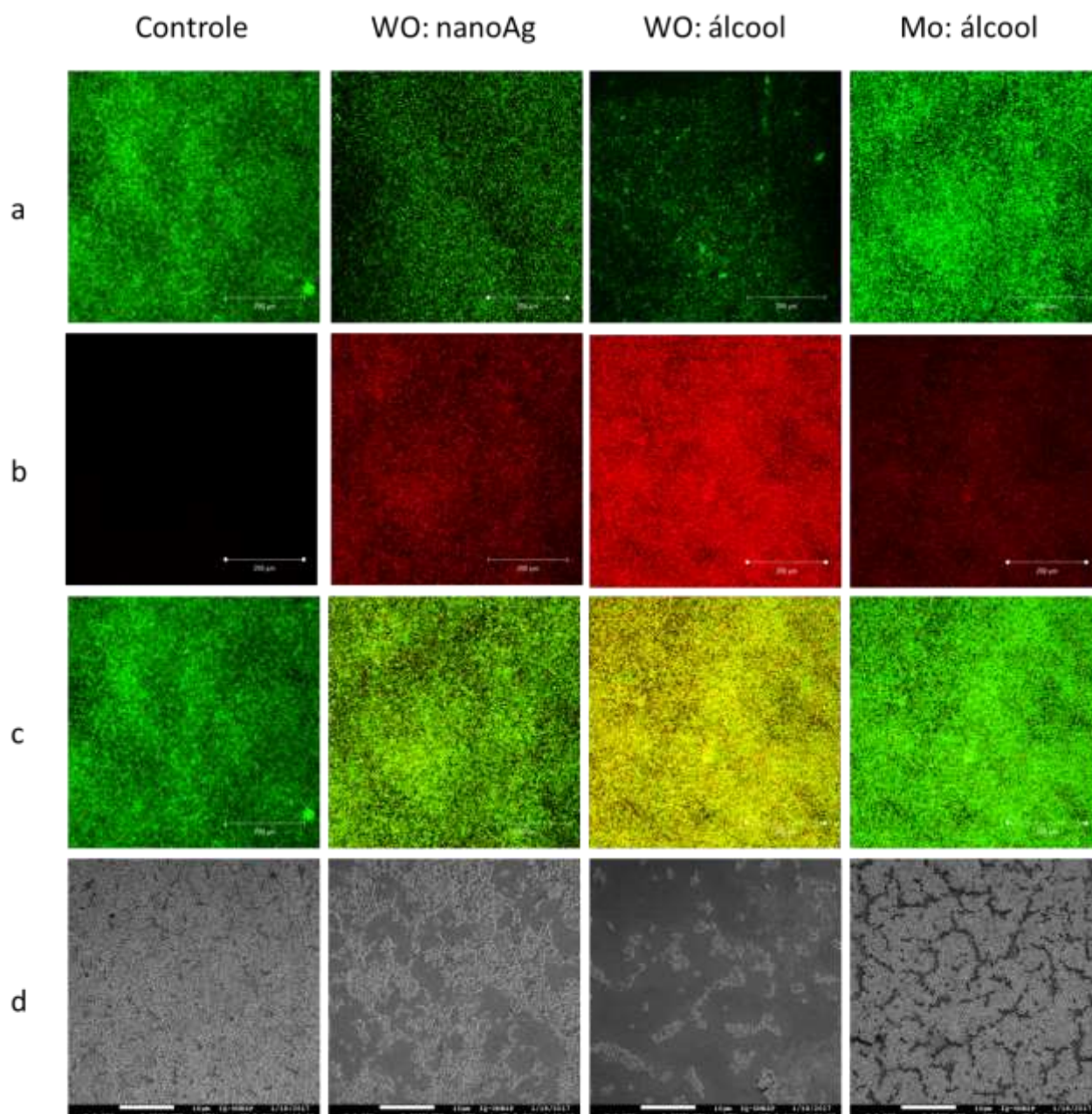


Fonte: Elaboração própria.

Nos biofilmes de SARM (Figura 47), pode-se observar, por meio das análises em microscópio confocal, que os biofilmes submetidos aos microcristais apresentam grandes quantidades de células mortas (b), que são acentuadamente maiores em relação ao controle. À medida que ocorre o aumento das células mortas, há também a diminuição das células viáveis coradas em verde (a), especialmente no grupo WO:álcool. A redução das células viáveis do biofilme foi menos pronunciada para o Mo:álcool. Essas informações são confirmadas pelas

micrografias obtidas em MEV (d), onde se observa um biofilme robusto e contínuo no grupo controle, com distribuição em toda a superfície, e redução de ordem crescente para os microcristais Mo:álcool, WO:nanoAg e, finalmente, WO:álcool, que demonstrou maior capacidade de inibir a formação do biofilme de SARM.

Figura 47 - Microscopia confocal de varredura a laser (a) – células vivas; b – células mortas e c – biofilme completo) e microscopia eletrônica de varredura (d) de biofilmes de SARM formados na presença dos microcristais WO:nanoAg, WO:álcool e Mo:álcool, e controle.

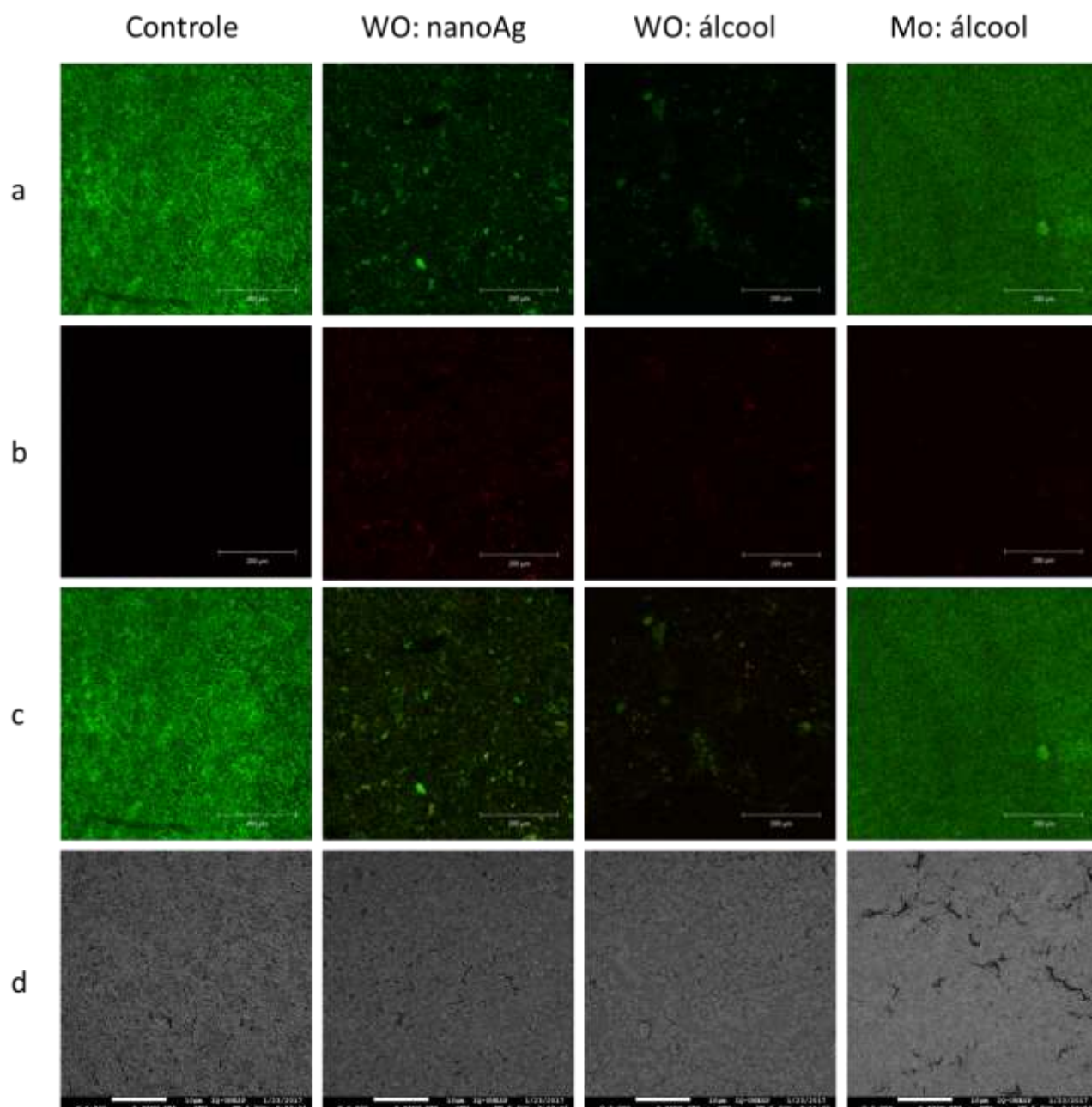


Fonte: Elaboração própria.

As análises microscópicas de fluorescência e de varredura dos biofilmes de *E. coli* são apresentadas na Figura 48. Para o Mo:álcool pode-se observar presença predominante de células viáveis, semelhante ao controle (a), e pequena quantidade de células mortas (b). Nas imagens relativas aos efeitos de WO:nanoAg e WO:álcool, embora o número de células mortas (b) também seja pequeno, houve diminuição considerável da quantidade de células

vivas (a) o que demonstra que esses dois microcristais influenciaram a quantidade de matriz extracelular e a estrutura do biofilme de *E. coli*. Esses aspectos podem ser verificados, particularmente, na análise do biofilme completo de *E. coli* (c), evidenciado pela intersecção das imagens a e b do WO:álcool, quando comparado ao controle e ao Mo:álcool. As informações são confirmadas pelas micrografias de MEV, onde se observa descontinuidade do biofilme submetido aos microcristais de WO:álcool, que apresenta-se composto por microcolônias de bactérias, intercaladas por áreas menos colonizadas.

Figura 48 - Microscopia confocal de varredura a laser (a – células vivas; b – células mortas e c – biofilme completo) e microscopia eletrônica de varredura (d) de biofilmes de *E. coli* formados na presença dos microcristais WO:nanoAg, WO:álcool e Mo:álcool, e controle.



Autor: Camila Cristina De Foggi

5.7 Revestimentos Contendo Ag Depositados à Plasma

Foram determinadas as propriedades físico-químicas dos revestimentos contendo Ag depositados à plasma.

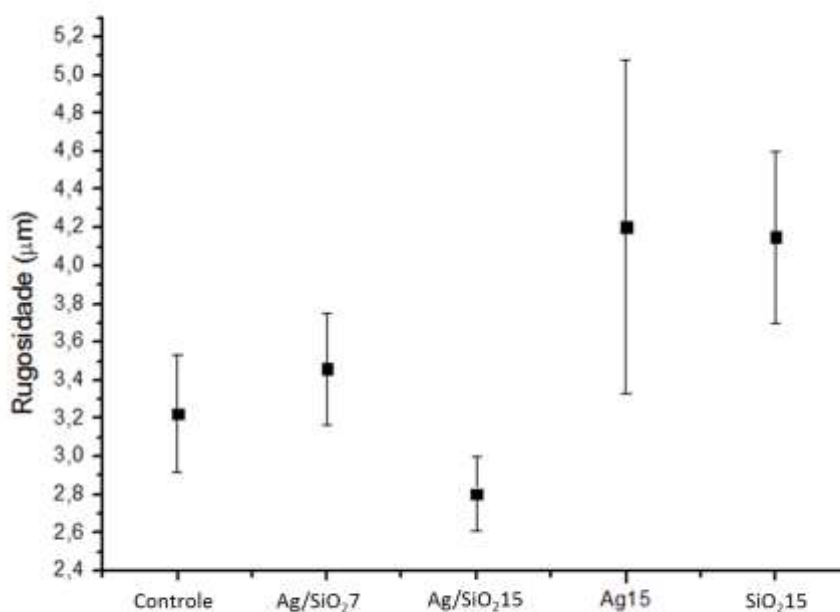
Espessura

A espessura dos filmes não pôde ser determinada pelo perfilômetro Veeco, uma vez que não foi possível detectar a formação de degrau entre as superfícies dos corpos-de-prova que foram expostas e aquelas que foram protegidas durante a deposição a plasma. Isso ocorreu, provavelmente, pela pequena espessura dos filmes depositados.

Rugosidade

Os resultados de rugosidade dos filmes são apresentados na Figura 49. Os filmes Ag/SiO₂7, Ag e SiO₂ aumentaram a rugosidade da superfície (Ra = 3,4 µm, Ra = 4,2 µm e Ra 4,1 µm, respectivamente), enquanto que o filme Ag/SiO₂15 diminuiu (Ra = 2,8 µm), em comparação com o grupo controle (PMMA) sem revestimento.

Figura 49 - Médias e desvios-padrão da rugosidade média (Ra-µm) dos filmes depositados Ag/SiO₂7, Ag/SiO₂15, Ag, SiO₂ e PMMA (Controle).

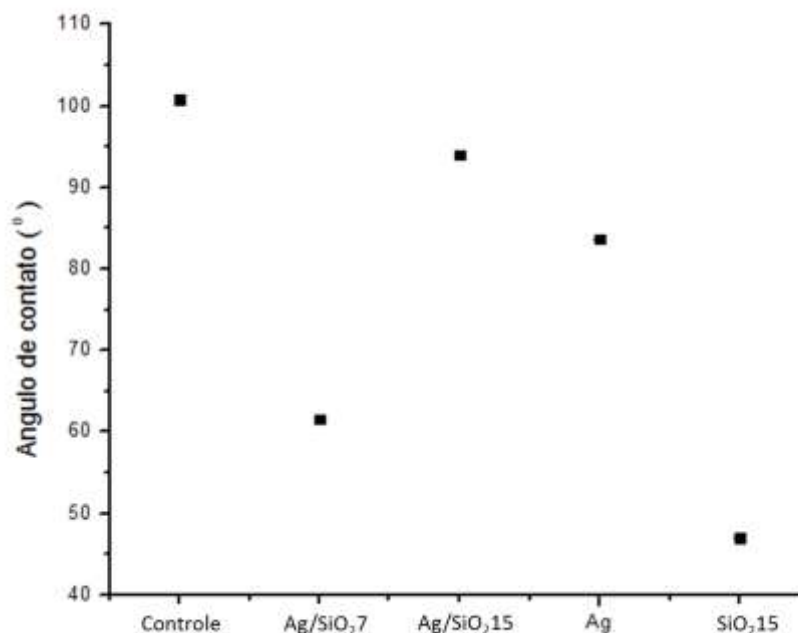


Fonte: Elaboração própria.

Ângulos de contato

Os ângulos de contato com a água dos filmes depositados e PMMA sem revestimento são apresentados na Figura 50. Pode-se observar que todos os filmes são mais hidrofílicos em comparação com o PMMA sem revestimento, que apresentou maior valor de ângulo de contato com a água ($100,83^\circ \pm 0,09$). A Figura 50 também mostra aumento nos ângulos de contato à medida que o tempo de deposição foi aumentado de 7 ($61,57^\circ \pm 0,07$) para 15 min ($93,97^\circ \pm 0,01$), tornando o filme Ag/SiO₂15 mais hidrofóbico. Para os filmes Ag e SiO₂, pode-se observar diminuição no ângulo de contato (Ag $83,66^\circ \pm 0,03$; SiO₂ $47,01^\circ \pm 0,03$) em relação ao grupo PMMA, sendo o filme de Ag mais hidrofóbico entre eles.

Figura 50 - Médias do ângulo de contato ($^\circ$) dos filmes depositados Ag/SiO₂7, Ag/SiO₂15, Ag, SiO₂ e PMMA (Controle).



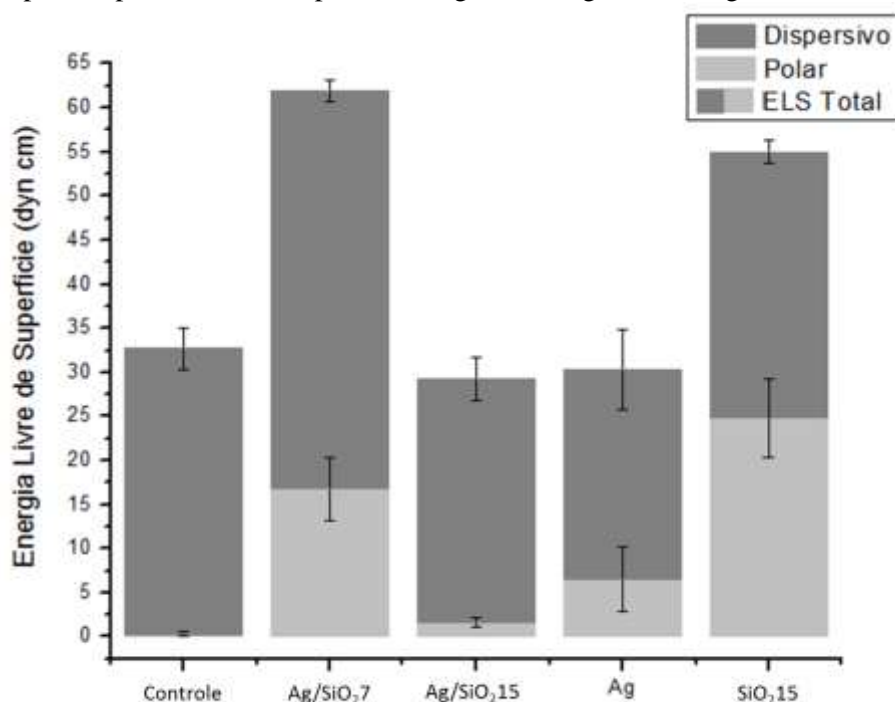
Fonte: Elaboração própria.

Energia livre de superfície

A energia livre de superfície total, E_T , bem como os seus componentes polar, E_P , e dispersivo, E_D , são apresentados na Figura 51. O filme Ag/SiO₂15 e o controle (PMMA sem revestimento) apresentaram valores semelhantes de componentes polares e dispersivos, bem como de E_T . Além disso, a maior contribuição da componente dispersiva em relação à polar

revela maior afinidade para os fluidos apolares. Os valores de E_T , E_P e E_D do filme Ag/SiO_2 7 foram todos mais elevados do que os valores apresentados para o controle, mas a contribuição da componente dispersiva também indicou maior afinidade para os fluidos apolares. Para o filme Ag , embora a E_T seja semelhante ao controle, os valores de E_P e E_D foram ligeiramente superiores e inferiores, respectivamente, aos do controle. O filme de SiO_2 mostrou aumento de E_T e E_P em comparação com o controle, enquanto o valor de E_D foi semelhante. A contribuição das componentes polares e dispersivas revelou a afinidade do filme de SiO_2 com os líquidos polares e apolares.

Figura 51 - Médias e desvios-padrão de energia livre de superfície (dyn/cm) e dos componentes dispersivos e polares para os filmes depositados Ag/SiO_2 7, Ag/SiO_2 15, Ag , SiO_2 e PMMA (Controle).

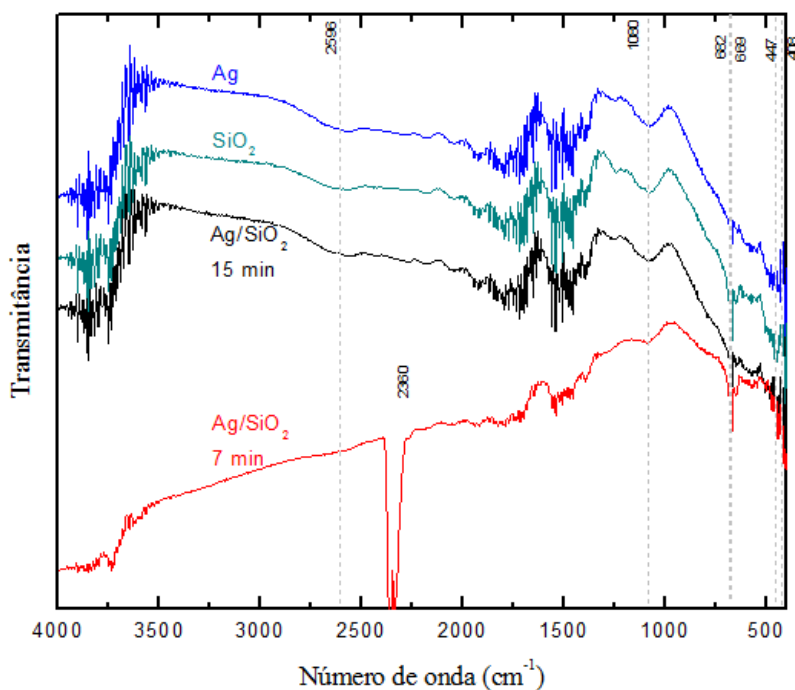


Fonte: Elaboração própria.

Espectros de infravermelho – FTIR

A Figura 52 apresenta os espectros de infravermelho obtidos através de análise em FTIR. Pode-se observar picos presentes na região de 900, 1.063, 1.135, entre 1000 e 1250, e entre 2000 e 2250 cm^{-1} .

Figura 52 - Espectros de infravermelho obtidos através de análise em FTIR para os filmes depositados Ag/SiO₂7, Ag/SiO₂15, Ag e SiO₂.

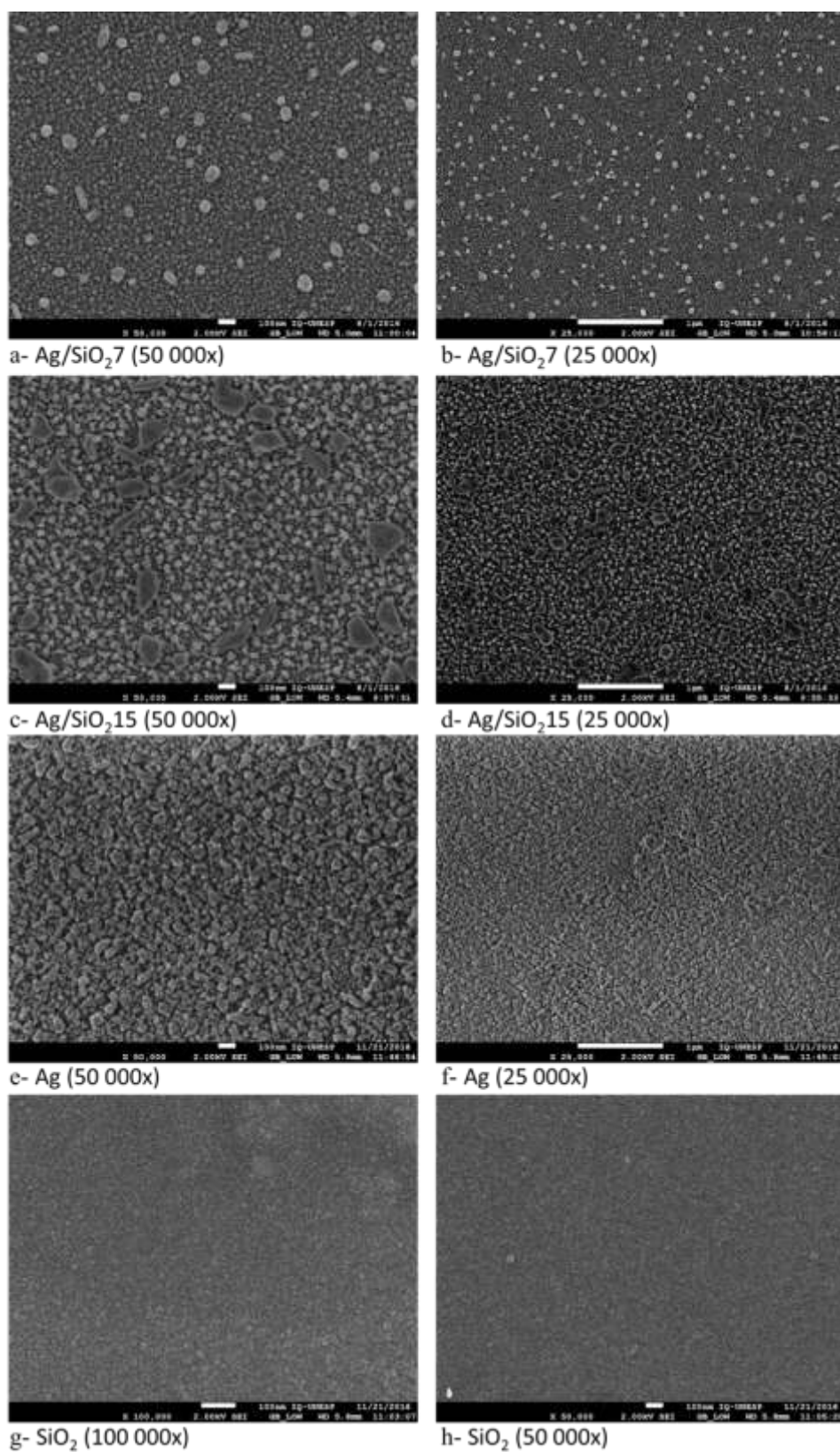


Fonte: Elaboração própria.

Análises MEV-EC

As micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura dos filmes depositados são apresentadas na Figura 53. Pode-se observar a presença de grãos em dois tamanhos diferentes nos filmes Ag/SiO₂7 (Figuras 53a e b) e Ag/SiO₂15 (Figuras 53c e d), apresentando uma camada de SiO₂ inferior, com grânulos pequenos, recoberta com nanopartículas de Ag na superfície. As Figuras g e h são referentes ao filme de SiO₂, onde podemos observar grânulos com tamanho muito inferior em relação às nanopartículas de Ag contidas nas Figuras 53e e f, sendo necessário maior aumento (50 000 e 100 000x) para possibilitar sua visualização.

Figura 53 - Micrografias das superfícies dos filmes avaliados, em aumentos de 25 000x e 50 000x para os filmes Ag/SiO₂7, Ag/SiO₂15 e Ag e em aumento de 50 000x e 100 000x para o filme SiO₂.

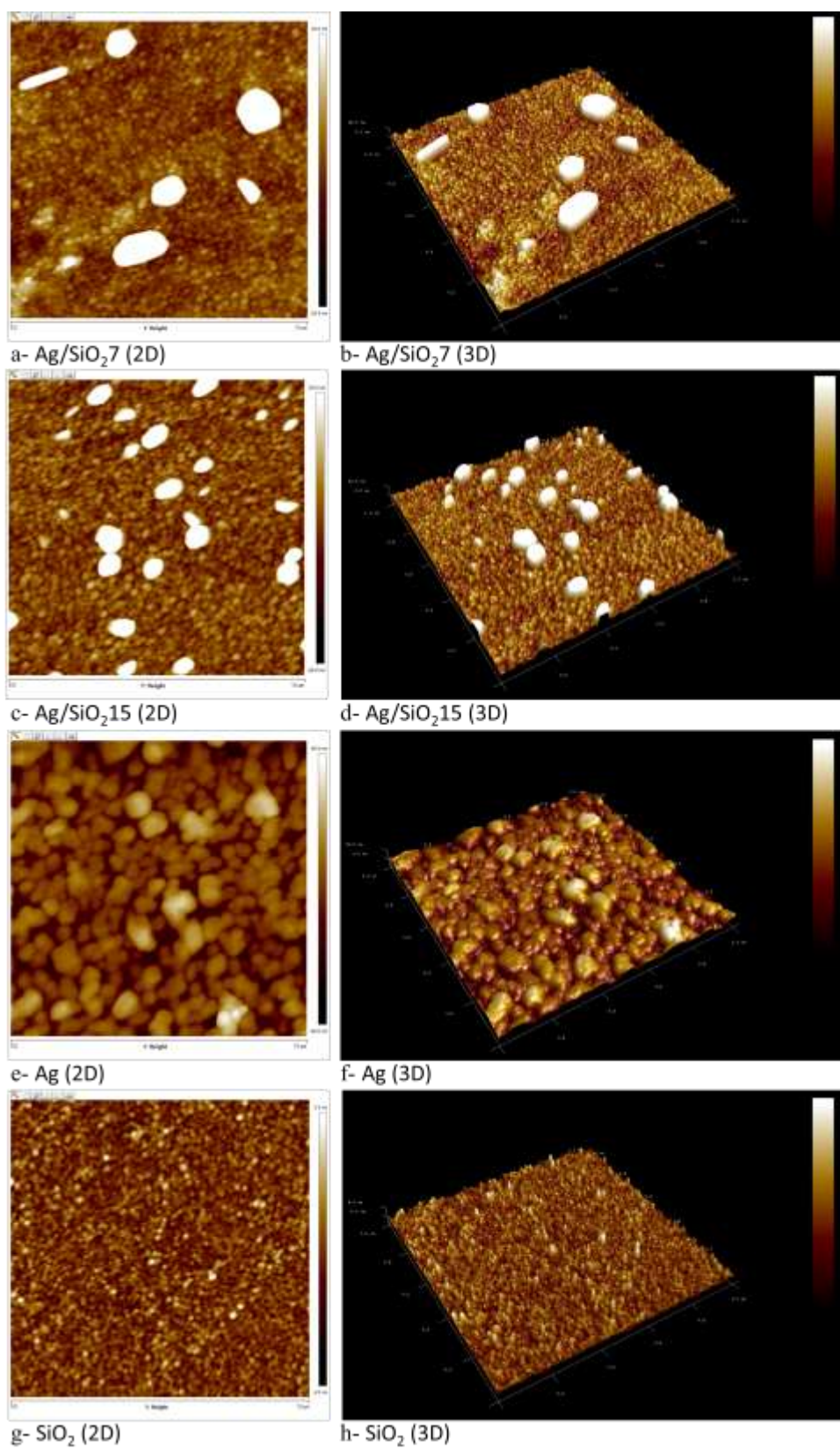


Fonte: Elaboração própria.

Microscopia de força atômica – MFA

A Figura 54 apresenta as imagens de microscopia de força atômica obtidas para os filmes depositados. Através dessa ferramenta, as topografias superficiais e rugosidades dos filmes propostos podem ser analisadas. As rugosidades dos filmes são apresentadas no Quadro 1.

Figura 54 - Topografias superficiais ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$) dos filmes Ag/SiO₂7 (a e b), Ag/SiO₂15 (c e d), Ag (e e f) e SiO₂ (g e h) analisados por MFA.



Fonte: Elaboração própria.

Quadro 1 - Rugosidade média (Ra) topográfica dos filmes Ag/SiO₂7, Ag/SiO₂15, Ag e SiO₂ obtidas através de microscopia de força atômica.

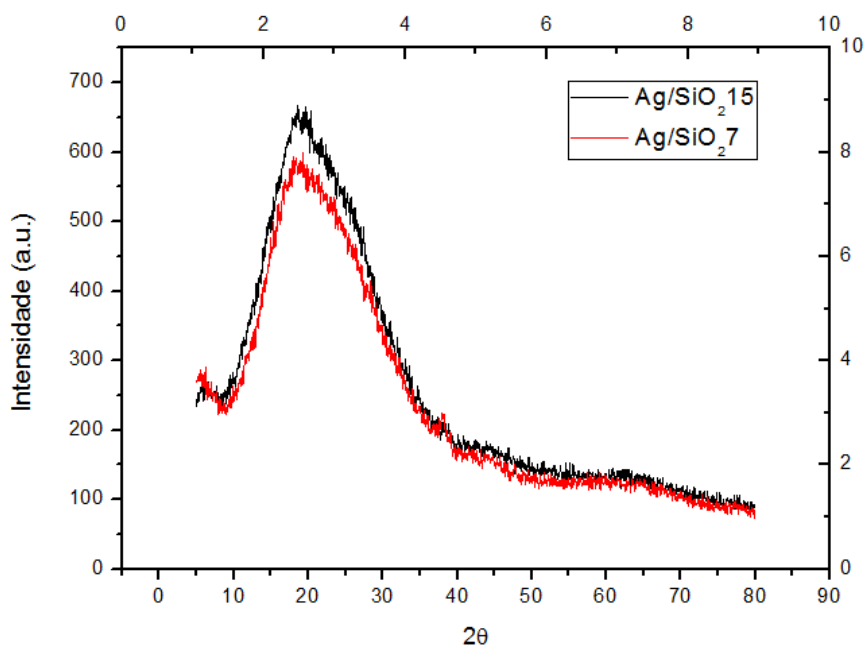
Filmes	Rugosidade média - Ra (nm)
Ag/SiO ₂ 7	4,94
Ag/SiO ₂ 15	4,56
Ag	7,36
SiO ₂	0,76

Fonte: Elaboração própria.

Difração de raios-X – DRX

A Figura 55 apresenta difratogramas de raios-X provenientes da análise dos filmes de Ag/SiO₂7 e Ag/SiO₂15 depositados em estrutura inerte (placas de vidro). Pode-se notar que a estrutura de todos os filmes se apresenta na fase amorfa.

Figura 55 - Difratogramas de raios-X dos filmes de Ag/SiO₂7 e Ag/SiO₂15.

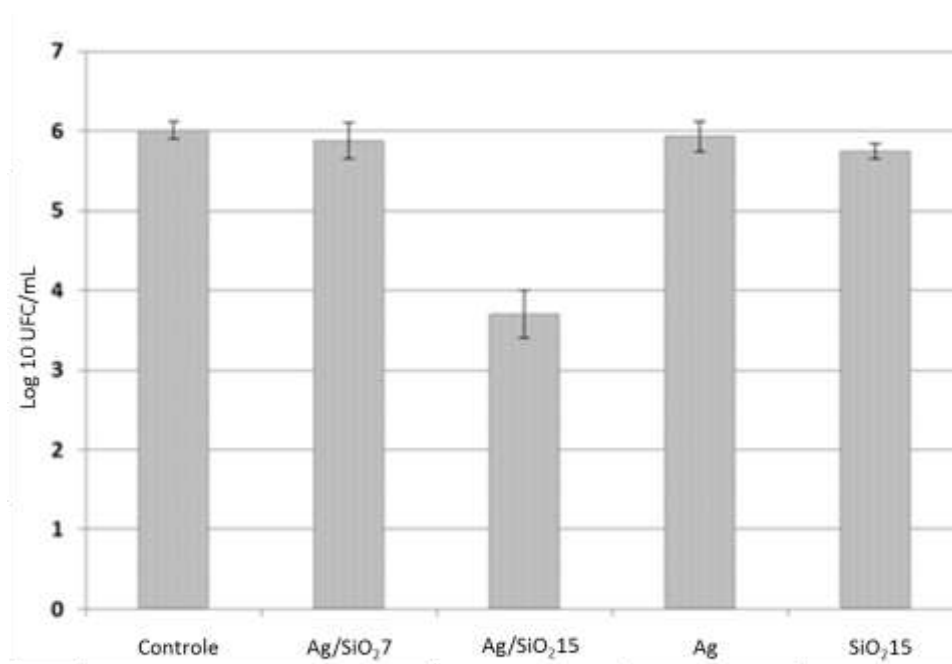


Fonte: Elaboração própria.

Atividade dos filmes finos na adesão de *C. albicans*

Os resultados da contagem de UFC são apresentados na Figura 56. As médias de Log_{10} UFC/mL de *C. albicans* observadas para os filmes Ag/SiO₂7, Ag e SiO₂ foram semelhantes e não diferentes do grupo controle (PMMA não revestido). Em contraste, o filme Ag/SiO₂15 promoveu redução no número de células viáveis de *C. albicans* em mais de 2 logs em comparação com o controle (6 log_{10} UFC/mL).

Figura 56 - Log_{10} UFC/mL de *C. albicans* para o substrato de PMMA não revestido (controle) e os filmes depositados.

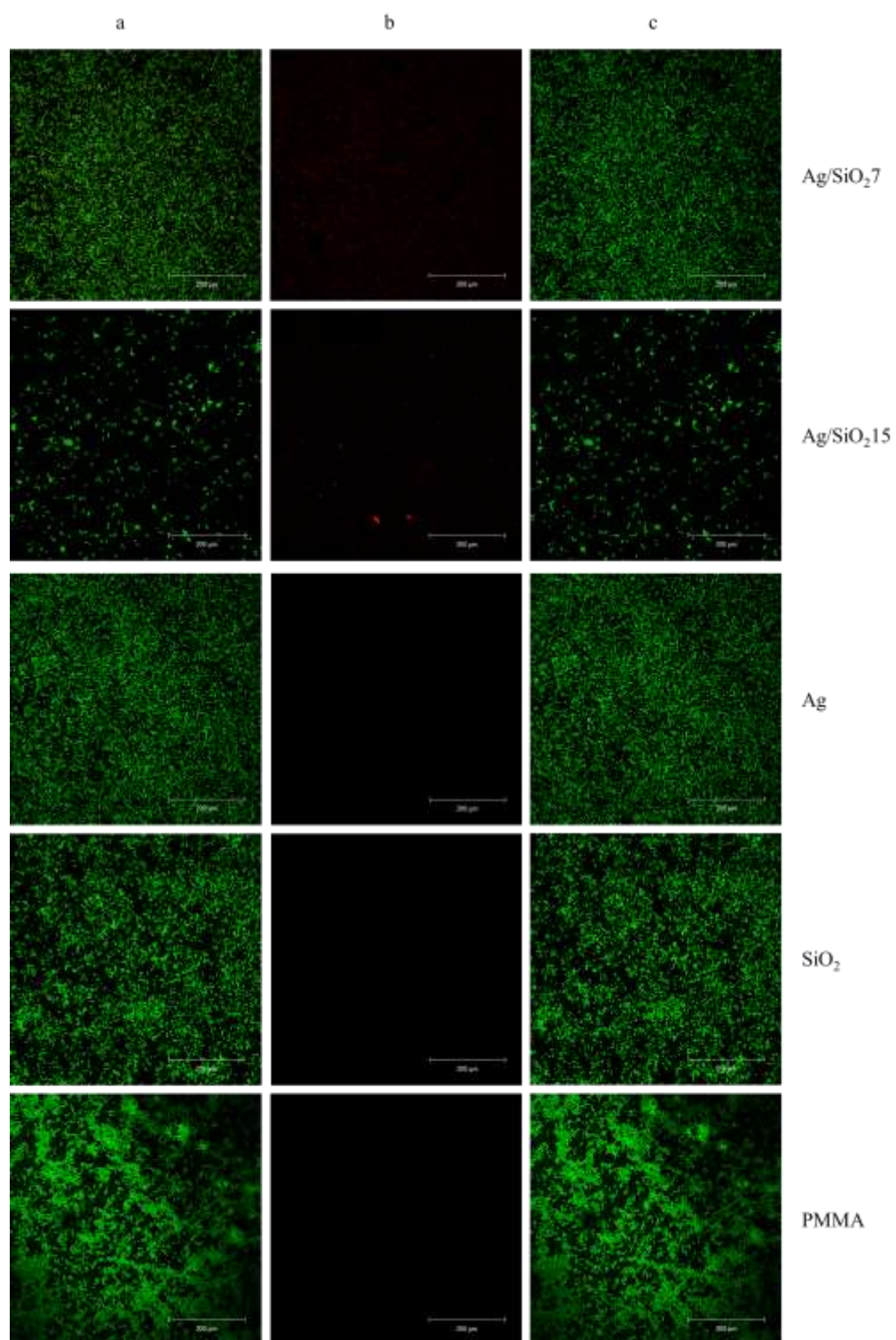


Fonte: Elaboração própria.

Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) e coloração Live / Dead

As imagens das células de *C. albicans* aderidas nos substratos não revestidos (controle) e revestidos com os filmes finos, coradas com o kit Live/Dead podem ser visualizadas na Figura 57. A primeira coluna (a) mostra as células vivas, coradas em verde, a segunda coluna (b), as células mortas, coradas em vermelho, e a terceira coluna (c) mostra a intersecção das duas imagens anteriores, para cada condição experimental.

Figura 57 - Imagens de microscopia confocal a laser de células de *C. albicans* coradas com Live/Dead, aderidas em superfícies de PMMA, revestidas ou não (controle). a= células vivas (em verde); b= células mortas (em vermelho); c= intersecção das células vivas e mortas.

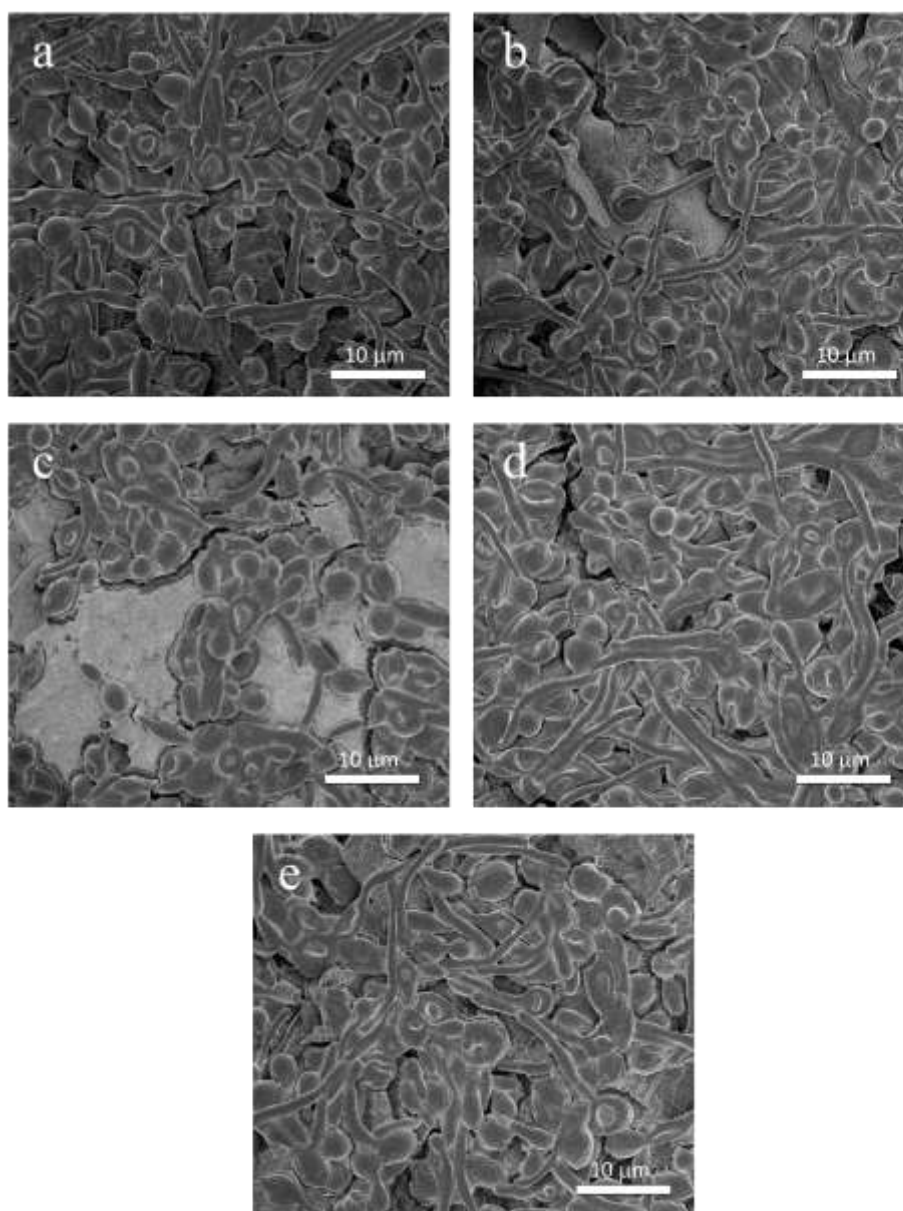


Fonte: Elaboração própria.

MEV – EC

As Figuras 58 mostram as imagens das células de *C. albicans* aderidas nos substratos de PMMA não revestidos (controle – Figura 58a) e revestidos com Ag/SiO₂7 (Figura 58b), Ag/SiO₂15 (Figura 58c), Ag (Figura 58d) e SiO₂ (Figura 58e). Todas as imagens apresentam aumento de 1500x. Podemos observar menor quantidade de células aderidas nos substratos revestidos com o filme Ag/SiO₂15 em relação aos demais.

Figura 58 - Imagens de MEV-EC de *C. albicans* sobre (a) PMMA não revestido, (b) filme de Ag/SiO₂7, (c) filme de Ag/SiO₂15, (d) filme de Ag e (e) filme de SiO₂.



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Microcristais de α -Ag₂WO₄ com e sem irradiação

No estudo dos microcristais de α -Ag₂WO₄ submetidos ou não à irradiação, as imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo revelaram, claramente, o crescimento de nanopartículas na superfície dos cristais, após a irradiação. Os resultados de HRTEM e EDX também confirmaram o crescimento de Ag metálica na superfície dos cristais de α -Ag₂WO₄ irradiados (Figuras 2 a 4). De acordo com o Longo et al.¹⁰⁵, em 2013, quantidade adequada de feixe de elétrons induz um fluxo axial contínuo de partículas de Ag metálica na superfície de α -Ag₂WO₄, sendo esse processo altamente reprodutível. A exposição ao feixe de elétrons de microscopia eletrônica de transmissão pode modificar estruturas amorfas ou nanocristalinas de materiais sólidos. Recentemente, utilizando o método de redução química, Tsuji et al.¹⁶⁶, em 2012, monitoraram a rápida transformação das diversas nanoestruturas com Ag, de íons Ag⁺ para Ag⁰ em solução, por meio do efeito plasmônico de superfície, dependente do tempo de exposição aos elétrons. Em outro estudo, Yasuda et al.¹⁹², em 1995, utilizando imagens in situ de microscopia eletrônica de transmissão, relataram a redução de óxido de índio processado a 820°C em índio metálico e espécies intermetálicas (PdIn₃). No caso do α -Ag₂WO₄, sua estrutura cristalina contém diferentes aglomerados (“clusters”), [WO₆], AgO₇], [AgO₆], AgO₄] e AgO₂]. Dessa maneira, o excesso de elétrons proveniente de irradiação induz modificações estruturais e eletrônicas nos cristais instáveis de α -Ag₂WO₄, e forma os nanofilamentos metálicos de Ag¹⁰⁵. Um fato importante no crescimento dos nanofilamentos na superfície dos microcristais é a inexistência de interface entre ambos, ou seja, é um material contínuo. Essa característica confere propriedades especiais e únicas a esse material, que não representa uma estrutura decorada ou heteroestrutura, mas sim uma estrutura contínua formada por compostos semicondutores e um metal.

Foi observado que é difícil obter informações conclusivas sobre a existência de nanopartículas de Ag nos microcristais de α -Ag₂WO₄ irradiados a partir das mensurações de DRX, como já relatado por Wang et al.¹⁷⁹. Da mesma forma, foi verificado que a espectroscopia Raman não foi capaz de detectar mudanças significativas entre as duas amostras (irradiada e não irradiada), embora as análises por imagens demonstrem, claramente, que existem diferenças entre as suas superfícies. Esse tipo de análise é importante para distinguir modificações estruturais de nanomateriais, porém, à medida que os cristais crescem,

essas alterações são menos acentuadas. Assim, a formação da fase cúbica de Ag metálica não é detectada, tendo em vista que a técnica Raman é uma análise intrínseca da parte interna do material. Os modos ativos Raman obtidos confirmaram que os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ são estruturalmente ordenados a curto alcance, porém os picos apresentados são relativamente largos, o que indica certo nível de desordem estrutural. Os resultados deste estudo estão de acordo com aqueles relatados na literatura¹⁶⁷. Entretanto, somente 15 modos ativos Raman foram observados, sendo 2 a menos que aqueles detectados por Turkovic et al.¹⁶⁷, (Figura 6), fato que pode ser explicado por um sinal Raman baixo. Pequenos deslocamentos (“shifts”) nas posições Raman observadas podem resultar de diferentes fatores como métodos de preparação, tamanho médio dos cristais, forças de interação entre os íons, ou o grau de ordem estrutural da rede¹⁴⁸.

A análise de UV-Vis mostrou acentuada redução no gap óptico nos microcristais irradiados, que pode ser atribuída ao efeito plasmônico dos nanofilamentos de Ag, à presença dessa nova estrutura na superfície, criando novos níveis localizados no gap óptico, ou, mais provavelmente, associação desses dois fatores. Os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ irradiado e não irradiado apresentaram uma interação local na região do gap óptico que, possivelmente, facilitou a hibridização entre os band gaps do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e da Ag metálica resultando na redução de 0.7 eV para o band gap total. Além disso, o aumento contínuo e suave da absorção em função da energia é relacionado com níveis eletrônicos localizados no gap óptico, que são introduzidos pelo efeito dos nanofilamentos de Ag na superfície.

Os resultados de atividade antibacteriana contra células planctônicas do microrganismo SARM revelaram que a concentração mínima inibitória/bactericida do microcristal irradiado foi consideravelmente menor (quatro vezes) em relação ao não irradiado. Os melhores resultados antibacterianos obtidos estão relacionados com o efeito plasmon de superfície dos nanofilamentos de Ag, o que gera elevado campo eletromagnético localizado. A interação da superfície dos microcristais e nanofilamentos com a superfície das células bacterianas gera um distúrbio por oxidação.

Para explicar a atividade dos microcristais na inativação da bactéria SARM, foi proposto um modelo que considera o mecanismo de transferência de carga (Figura 9). Neste modelo, o semiconductor $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ age como produtor e dissipador de elétrons, e a Ag atua como transportadora dessas cargas, o que aumenta a vida útil do sistema elétron-buraco. Os elétrons gerados nos microcristais de tungstato de prata são transferidos para os nanofilamentos de Ag, e esse acúmulo de elétrons aumenta o potencial negativo da Ag, o que resulta no aumento da transferência de energia do nível mais energético do sistema (nível de

Fermi) para a banda de condução do sistema. Todo esse processo dificulta a recombinação (estabilização) do sistema elétron-buraco. Com a manutenção desse processo, altamente energético, a atividade bactericida é aumentada nos microcristais que possuem os nanofilamentos de Ag metálica, quando comparados com os microcristais sem os nanofilamentos. Dessa forma, a interação entre o semicondutor e a Ag metálica promove o aprisionamento e a condução de pares de elétrons (e^-) e buracos (h^+), mesmo na ausência de luz. Num segundo estágio, a superfície da Ag^0 e do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ interage com H_2O e/ou O_2 dependendo do meio. Os radicais OH^* e HO_2^* gerados irão atacar, indiscriminadamente, polissacarídeos, lipídeos e proteínas da membrana celular, alterando sua integridade, que é fundamental para a sobrevivência do microrganismo¹⁵⁵. Além disso, pequena quantidade de Ag metálica pode ser oxidada na sua interface com o meio aquoso, gerando íons Ag^+ que, da mesma forma que as nanopartículas de Ag, apresentam alta afinidade para reagir com compostos sulfúricos ou que contem enxofre, existentes dentro ou fora da membrana, afetando a viabilidade celular.

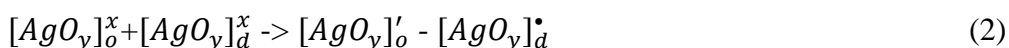
Microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ com surfactante

Para o microcristal $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizado pelo método da co-precipitação e utilizando PVP, os picos de difração na análise de DRX demonstraram que o material não apresenta fases deletérias secundárias, possui alta cristalinidade e ordem estrutural. As imagens de microscopia eletrônica de varredura dos microcristais, onde se pode observar a microestrutura e morfologia da amostra obtida, demonstraram que os microcristais apresentaram-se como aglomerados de bastões alongados. Com relação à ação dos microcristais sobre *C. albicans*, foram propostos alguns mecanismos que podem ter contribuído para o efeito antifúngico observado. O $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ é formado por vários “clusters” (Figura 13) como octaedro [WO_6], deltaedro [AgO_7], octaedro [AgO_6], tetraedro [AgO_4], e angular [AgO_2], nos quais, as ligações Ag-O e W-O e os ângulos de ligação O-Ag-O e O-W-O são livres para alongar/encurtar e dobrar, respectivamente, resultando na variação dos comprimentos e ângulos das ligações, bem como em rotações dos “clusters” [AgO_y] ($y = 2, 4, 6$ e 7) e [WO_6], que são responsáveis pela estrutura eletrônica de Ag_2WO_4 . Esses aspectos podem ter um impacto importante na estrutura cristalina, assim como nos dipolos e nas estruturas eletrônicas de banda, influenciando, assim, o comportamento dos carregadores das cargas geradas, incluindo excitação, transferência e reação de redução, em todo o processo fotocatalítico^{7, 30, 102}. Isto ocorre pelo fato de que, as rotações dos “clusters” influenciam o comprimento das

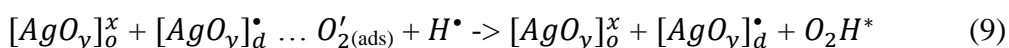
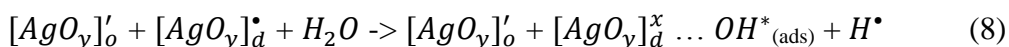
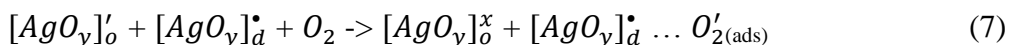
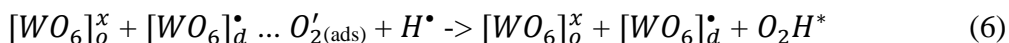
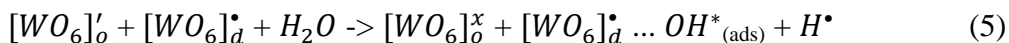
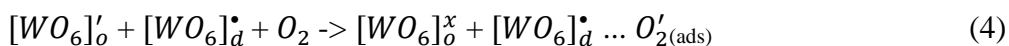
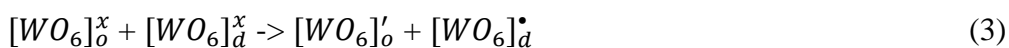
ligações Ag-O e W-O bem como os ângulos das ligações Ag-O-Ag e W-O-W, devido ao deslocamento dos íons de oxigênio das bordas (“edges”) das estruturas ideais. Conseqüentemente, as posições dos átomos de O, W, e Ag são variáveis, levando a distorções dos “clusters”⁷. Com base nesse comportamento, o modelo que tem sido proposto para os cristais de α -Ag₂WO₄ é que eles são compostos por diferentes tipos de “clusters” distorcidos ([WO₆]_d, [AgO₇]_d, [AgO₆]_d, [AgO₄]_d, e [AgO₂]_d) e ordenados ([WO₆]_o, [AgO₇]_o, [AgO₆]_o, [AgO₄]_o, e [AgO₂]_o)¹¹⁰. Os defeitos superficiais/estruturais, que são causados pelos “clusters” distorcidos [WO₆]_d/[AgO_y]_d (y = 7, 6, 4 e 2) podem polarizar a rede e levar a transições eletrônicas entre os “clusters” desordenados/distorcidos e os ordenados.

Outro aspecto que tem sido observado é que, diferentes morfologias, possuem facetas expostas diferentes que, por sua vez, podem modular o comportamento antimicrobiano do material¹⁴⁰. Neste estudo, as faces expostas de α -Ag₂WO₄ são (010), (100), (001), (101), (110) e (011). É importante notar que as faces expostas (001) e (101) são terminadas em O- e Ag, que representam as superfícies mais estáveis de α -Ag₂WO₄¹⁴². A maior atividade das superfícies (001) e (101) pode ser atribuída ao arranjo global dos átomos de Ag nesses planos e na subcamada, o que, provavelmente, poderia resultar em interações eletrônicas favoráveis, criando um sítio no substrato para a ligação com O₂ e H₂O e a subsequente formação de radicais reativos¹⁴⁰.

Com base nesses aspectos, os seguintes processos podem ocorrer nos cristais de α -Ag₂WO₄, conforme expresso pelas equações (2-9) (elaboração própria):



Onde y= 2, 4, 6 e 7



Nessas equações, x indica “clusters” neutros, (') o “cluster” com um elétron, (•) o “cluster” com um buraco, e (*) os radicais reativos. Assim, sugere-se que os defeitos na

superfície cristalina com a presença de átomos de Ag com relação ao “cluster” ideal (ordenado), bem como a estrutura eletrônica dos “clusters” desordenados $[WO_6]_a^*$ e $[AgO_y]_a^*$ e ordenados $[WO_6]_o'$ e $[AgO_y]_o'$, desempenham papel importante na produção dos radicais OH^* e O_2H^* , quando esses cristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ interagem com oxigênio (O_2) e/ou água (H_2O) (Figura 13). Esses radicais são espécies oxidativas que podem ter participado das reações químicas que levaram à inativação do fungo *C. albicans*, conforme já relatado para a bactéria SARM.

As células de *C. albicans* incubadas com ou sem os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, sintetizados por co-precipitação e surfactante PVP, foram também analisadas por microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo. Foi verificado que, comparado com o controle, os microcristais causaram alterações morfológicas significativas nas células. Além disso, as imagens mostraram a ausência de hifas (Figura 14b). Sabe-se que *C. albicans* pode mudar sua morfologia de levedura para as formas de pseudohifa ou hifa⁸⁹. Essa capacidade de alterar a morfologia é considerada um importante fator de virulência, tendo em vista que as hifas são responsáveis pela infecção no hospedeiro e são capazes de invadir os tecidos¹⁹⁴.

Outros pesquisadores têm realizado estudos sobre o efeito de nanopartículas de prata em fungos. Entre eles, Panacek et al.¹³⁰ avaliaram a atividade antifúngica das nanopartículas de prata contra *Candida* spp. Para as duas cepas clínicas de *C. albicans*, os valores de CIM foram de 0,21 mg/L e 0,42 mg/L, mostrando que as nanopartículas apresentaram efeitos iguais ou melhores que os obtidos com antifúngicos comercialmente disponíveis (anfotericina B, itraconazol e fluconazol), que apresentaram valores de CIM entre 0,5 mg/L e 1,5 mg/L. Foi verificado, também, que as nanopartículas mataram todas as leveduras testadas, porém em concentração mais elevada (CFM = 27 mg/L). Mais recentemente, nanopartículas de prata foram sintetizadas utilizando extrato de folhas de plantas e testadas quanto à sua atividade antifúngica⁸³. Os valores de CIM e CFM obtidos para a mesma cepa de *C. albicans* utilizada do presente trabalho (ATCC 90028) foram 60 $\mu\text{g/mL}$ e 120 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. É importante salientar que, enquanto nanopartículas de prata pura foram avaliadas nos estudos citados, nesta investigação foi utilizado um composto contendo prata ($\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$), e os valores de CIM e CFM foram coincidentes (62,50 $\mu\text{g/mL}$). Com base no peso molecular de cada componente, foi possível calcular a quantidade de prata presente nos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na concentração de CIM/CFM, que foi de 0,029 $\mu\text{g/mL}$. Assim, quando os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ são utilizados, as concentrações de prata são significativamente mais baixas quando comparadas àquelas relatadas na literatura^{83, 130}. Consequentemente, os

microcristais de α -Ag₂WO₄ apresentados têm uma propensão mais baixa para induzir efeito citotóxico a células de mamíferos¹³¹.

Microcristais de β -Ag₂MoO₄

Neste estudo, microcristais de β -Ag₂MoO₄ sintetizados pelo método da co-precipitação e sem surfactante também foram investigados. Os picos de difração nos padrões de DRX demonstraram que o material não apresentou fases deletérias secundárias, possuiu alta cristalinidade e ordem estrutural. Conforme as micrografias obtidas pela análise em MEV, foi observado que os microcristais de β -Ag₂MoO₄ apresentaram morfologia irregular. Além disso, foi possível notar a presença de partículas cúbicas e hexagonais que, embora bem definidas, apresentaram distribuição aleatória, não havendo predominância na morfologia. Tem sido relatado que o controle da morfologia de materiais funcionais complexos desempenha papel significativo na determinação das suas propriedades físicas e químicas⁶¹, entre elas a fotoluminescência e a atividade antimicrobiana⁶⁰. O teste microbiológico demonstrou que os cristais sintetizados de β -Ag₂MoO₄ apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans*, com valores de CIM e CFM coincidentes (62,50 µg/mL). Em concentrações abaixo da CIM/CFM, houve reduções na quantidade de microrganismos viáveis quando em comparação com o controle positivo, indicando que os microcristais possuem capacidade de inibição de crescimento fúngico, mesmo em concentrações menores.

Microcristais de α -Ag₂WO₄ em diferentes solventes

É de conhecimento que os cristais podem ser sintetizados em uma grande variedade de formas e estruturas por meio da modificação dos parâmetros experimentais, tais como surfactante e seleção do solvente⁶¹. Assim, neste estudo, microcristais de α -Ag₂WO₄ foram também sintetizados pelo método da co-precipitação utilizando três diferentes solventes: água, solução alcoólica e solução amoniacal. As intensidades relativas e os picos de difração acentuados indicaram que as amostras de α -Ag₂WO₄ obtidas nos três solventes são cristalinas, sem a presença de fases secundárias, sugerindo estrutura ordenada a longo alcance. Além disso, os picos nos espectros Raman (Figura 20) indicaram, claramente, que a estrutura do α -Ag₂WO₄ é similar àquela reportada na literatura e apresenta boa ordem estrutural e simetria a curto alcance^{102, 106, 156, 191}. O pico mais intenso em 883 cm⁻¹ corresponde ao estiramento simétrico (“*symmetric stretching*”) das ligações O–W–O nos “*clusters*” [WO₆]¹⁰⁶ e os modos

de flexão (“*bending*”) da unidade Ag–O–W^{102, 156}. Os modos ativos entre 805 e 483 cm⁻¹ podem ser atribuídos à vibração nos “*clusters*” [WO₆], enquanto aquelas de 368 a 307 cm⁻¹ podem ser atribuídas aos modos externos de vibração dos “*clusters*” [AgO_y] (y = 7, 6, 4, e 2)¹⁹¹.

As imagens de MEV-EC são de fundamental importância para a compreensão do processo de evolução morfológica dos microcristais de α -Ag₂WO₄ com a variação dos solventes. Gong et al.⁶⁹ e Chen et al.³⁵ explicaram que a formação de morfologias de nanobastões está associada com o mecanismo de agregação orientada, que envolve a auto-organização espontânea de partículas adjacentes ao longo de uma orientação cristalográfica comum. Por conseguinte, os três solventes utilizados como meios de reação produziram morfologias distintas nos cristais de α -Ag₂WO₄ obtidos. Verificou-se que a polaridade dos solventes afeta os produtos, direcionando a homogeneização dos reagentes no meio reacional, a quantidade de formação de núcleos e a fusão e a direção preferencial dos núcleos de crescimento. Isto ocorre porque, quando a reação acontece em água e solução amoniacal, os reagentes dispersam-se mais homogeneamente do que em solução alcoólica e o crescimento do núcleo do cristal é submetido a menos confinamento numa gota do solvente em ebulição. Portanto, o α -Ag₂WO₄ é passível de formar a morfologia semelhante à flor em água e em solução amoniacal (Figuras 19A e 19B), mas forma nanobastões quando a solução alcoólica é utilizada como solvente (Figura 19C). Existem diferenças na morfologia semelhante à flor dos microcristais de α -Ag₂WO₄ obtidos quando se utiliza água e solução amoniacal porque a taxa de reação é maior em água pura e, portanto, maior quantidade de defeitos superficiais está presente. A solução amoniacal provoca diminuição da velocidade de reação devido à complexação de prata pela amônia e, assim, forma flores com superfície mais definida.

Os valores de gap óptico dos microcristais α -Ag₂WO₄, estimados a partir dos espectros UV-Vis, não mostraram alterações significativas nos valores de E_{gap} quando utilizados os três solventes: água (3,12 eV), solução amoniacal (3,09 eV) e solução alcoólica 3,12 eV). No entanto, de acordo com Wood e Tauc, a existência de um decaimento exponencial, denominado cauda de Urbach, nas curvas de absorção de UV-Vis está relacionada com a densidade dos diferentes estados de energia no intervalo de banda¹⁶⁸. Quanto menor a inclinação da extrapolação linear realizada nesta cauda, mais desordenado o material se encontra. Os resultados demonstraram que o α -Ag₂WO₄ obtido em água e solução amoniacal exibiram inclinações semelhantes na curva de UV-Vis, que foram menores que a inclinação da extrapolação linear observada para o α -Ag₂WO₄ sintetizado com álcool (Figura 21). Portanto, pode-se concluir que quando a síntese é realizada utilizando solução alcoólica como

solvente, os microcristais de α -Ag₂WO₄ apresentaram maior densidade de defeitos do que aqueles obtidos utilizando água e solução amoniacal.

Para um melhor entendimento das propriedades ópticas das amostras preparadas, mensurações de fotoluminescência (PL) foram realizadas. Uma vez que a borda de absorção dos microcristais de α -Ag₂WO₄ sintetizados em diferentes solventes é, aproximadamente, 3,10 eV (400 nm) (Figura 22), de acordo com a hipótese de Longo et al.¹⁰⁷ o mecanismo desencadeante da fotoluminescência não é um processo banda a banda. Essas observações confirmam o fato de que a PL está diretamente associada com os estados localizados existentes no intervalo de banda, que são causados por quebras na simetria de rede devido à desordem estrutural.

Como mencionado anteriormente, o α -Ag₂WO₄ é composto por “clusters” [WO₆] e [AgO_y] (y = 2, 4, 6 e 7) numa rede cristalina¹³⁵. Esta estrutura ortorrômbica também pode ser entendida em termos de uma rede de “clusters” [WO₆] e [AgO_y], unidos entre si por ligações fortes [... [WO₆] - [AgO_y] - [WO₆] ...)^{107, 168}. Portanto, em nosso estudo, assumimos que as ligações entre os “clusters” [WO₆] e [AgO_y] na estrutura são diferentes devido às distorções nos “clusters” complexos [WO₆], que podem promover ligeira deformação nas ligações Ag-O e W-O. Além disso, essas distorções são capazes de induzir uma ruptura de simetria na rede, o que leva ao aparecimento de novos níveis intermediários dentro do intervalo de banda e gradientes de carga entre os “clusters”, levando à polarização e à formação dos “clusters” [WO₆]/[WO₆]' ou [AgO_y]/[AgO_y]'.

De acordo com o modelo proposto por Longo et al.¹⁰⁶ de banda larga, os “clusters” octaédricos [WO₆] distorcidos, classificados como defeitos superficiais, geram emissões na região da luz azul e podem estar relacionados aos picos a 447 e 500 nm. Os picos 613 e 750 nm, associados às emissões na região da luz vermelha, estão relacionados aos “clusters” [AgO_y] com vacâncias de Ag ou O. Quando se utiliza solução alcoólica como solvente, as distorções nos “clusters” [WO₆] são mais pronunciadas, uma vez que a contribuição de níveis mais energéticos é evidenciada pelas áreas dos componentes azul e verde (Figura 23), o que está de acordo com os resultados apresentados pelos espectros de reflectância difusa UV-Vis. Utilizando a solução amoniacal como solvente, há diminuição no componente azul, devido à redução de defeitos energéticos, e aumento na contribuição de defeitos mais profundos associados com transições eletrônicas nas regiões vermelhas, devido a aumento na quantidade de “clusters” distorcidos tetraédricos [AgO_y]. Para os microcristais α -Ag₂WO₄ sintetizados em água, a absorção máxima em laranja torna-se mais pronunciada, e aparece um novo componente na região da luz vermelha, com o aumento da contribuição de defeitos mais

profundos. Consequentemente, a água promove maior distorção nos “clusters” tetraédricos $[AgO_y]$, que está associado a menor quantidade de defeitos energéticos. As diferenças nos perfis de fotoluminescência dos cristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foram significativas e podem ser explicadas pelas diferenças nos defeitos de superfície, causadas pelos solventes, que influenciam a fixação (aglomeração), formação de cristais e processos de crescimento pela dinâmica das colisões partícula-partícula. No entanto, outros fatores também podem estar envolvidos, tais como o grau de agregação, a orientação entre as partículas, as variações na morfologia, a distribuição do tamanho das partículas e os defeitos superficiais (Figura 19 A-C). Todos esses fatores influenciam a emissão de fotoluminescência.

Vale ressaltar que a eficiência antibacteriana dos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizados utilizando solução alcoólica foi maior do que a das outras amostras. Isso pode ser atribuído a dois fatores: (I) Roca et al.¹⁴⁰ observaram que a face (010) dos cristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ apresenta baixa energia superficial ($0,20 \text{ J/m}^2$), conforme determinado pelos cálculos teóricos, e são mais eficientes para a inativação de bactérias que as demais faces. Como mostrado anteriormente nas imagens de MEV-EC (Figura 19 A-C), a solução de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizada em álcool exibe maior quantidade da face (010), em comparação com o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizado utilizando solução amoniacal e água. Uma vez que a formação de morfologia semelhante a flores diminui a quantidade de face (010) exposta, os microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizados utilizando álcool têm eficiência antibacteriana mais elevada do que os outros microcristais. (II) Para o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, o átomo de W é classificado como formador de rede, enquanto o átomo de Ag é classificado como modificador de rede. Sabe-se que, neste composto, o átomo de W forma “clusters” $[WO_6]$ octaédricos, e o átomo Ag forma “clusters” $[AgO_y]$ ($y = 2, 4, 6$ e 7). A capacidade de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ para gerar pares de elétrons-buracos é devido a defeitos intrínsecos que ocorrem por meio de distorções ou vacâncias nos “clusters” $[WO_6]$ (defeitos superficiais) e $[AgO_y]$ (defeitos mais profundos)¹⁴⁰. Conforme ilustrado nas Figuras 12, 26 e 27, os “clusters” distorcidos $[WO_6]$, com vacâncias de átomos de O ($[WO_6]'$), interagem com H_2O dando origem a OH^* e H^* . Enquanto os “clusters” distorcidos $[WO_6]$ com elétrons em excesso ($[WO_6]''$), reagem com O_2 e geram O_2' . Então, o O_2' e H^* recém-formados, reagem para formar O_2H^* . O $[AgO_y]$, com vacâncias V_O^{**} , age de forma semelhante^{6, 60, 109, 140}.

De acordo com a literatura, os radicais OH^* e O_2H^* , são os principais responsáveis pela morte microbiana. Esses radicais tem a capacidade de interagir com os componentes das células bacterianas, incluindo a parede celular de peptidoglicano, membrana plasmática, DNA citoplasmático e proteínas bacterianas, e também pode induzir o colapso das membranas bacterianas^{109, 126, 189, 190, 199}. Para os microcristais $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizados utilizando solução

amoniacal e água, a absorção máxima está na região do vermelho, conforme observado pelos espectros de fotoluminescência e deconvolução (Figuras 22 e 23), de modo que só possuem “clusters” distorcidos $[AgO_y]$ (modificador de rede), que estão disponíveis para produzir pequena quantidade de radicais OH^* e O_2H^* . Por outro lado, o α - Ag_2WO_4 sintetizado em solução alcoólica apresenta maior quantidade de defeitos, na região azul e vermelha do espectro (Figura 23). Desse modo, tanto o “cluster” distorcido $[WO_6]$ como o $[AgO_y]$, que são formador e modificador de rede, respectivamente, atuam em conjunto para produzir grande quantidade de radicais OH^* e O_2H^* . Como resultado, os microcristais de α - Ag_2WO_4 sintetizados utilizando solução alcoólica como solvente apresentaram maior eficiência antibacteriana contra *C. albicans*, SARM e *E. coli*, quando comparado aos outros microcristais (Figura 28).

Com base no peso molecular de cada componente, calculou-se o teor de prata dos microcristais de α - Ag_2WO_4 , nas concentrações CFM/CBM. Para *C. albicans*, os valores de prata foram 0,0018 $\mu g/mL$ para α - Ag_2WO_4 sintetizado em solução alcoólica e 0,0036 $\mu g/mL$ para os sintetizados em água e solução amoniacal. No caso da bactéria SARM, as quantidades de prata presentes foram 0,0072 $\mu g/mL$, 0,029 $\mu g/mL$ e 0,057 $\mu g/mL$, para os microcristais obtidos em solução alcoólica, solução amoniacal e água, respectivamente. Com relação a *E. coli*, os microcristais de α - Ag_2WO_4 sintetizados em álcool e amônia possuem o mesmo conteúdo de prata (0,00023 $\mu g/mL$), que é menor do que o observado quando a água foi usada na síntese (0,00045 $\mu g/mL$). Pode verificar-se que as quantidades de prata presentes em todos os microcristais de α - Ag_2WO_4 sintetizados são muito baixas. Além disso, como mencionado anteriormente, o álcool produziu microcristais α - Ag_2WO_4 com maior atividade antifúngica/antibacteriana diminuindo, consideravelmente, as concentrações necessárias para matar os três microrganismos e, conseqüentemente, a quantidade de prata utilizada.

Microcristais de β - Ag_2MoO_4 em diferentes solventes

O impacto dos solventes na morfologia, e o papel desta nas propriedades do material, também foram investigados para microcristais de β - Ag_2MoO_4 , que foram sintetizados em água, álcool e amônia. Os padrões de DRX mostraram que os compostos obtidos são constituídos pela fase β - Ag_2MoO_4 , sem nenhuma fase secundária. Esses microcristais proporcionaram picos bem definidos e estreitos, que indicam ordem estrutural e cristalinidade a longa distância. Esses resultados experimentais estão de acordo com estudos prévios que

mostraram a formação de fase cúbica do tipo espinélio, quando o pH era próximo de 7^{93, 101, 152}, condições de pH similares às utilizadas no presente estudo.

Nas micrografias obtidas por MEV-EC, pode-se observar que os microcristais de β - Ag_2MoO_4 são arredondados e com tamanho em escala micrométrica. Essa microestrutura contrasta com a que foi recentemente relatada para amostras obtidas com o método hidrotermal assistido por micro-ondas, no qual microcristais de tamanho pequeno e com forma homogênea (similares a cubos) foram obtidas somente quando a temperatura do processamento foi aumentada para 160°C⁷¹. Micropartículas arredondadas, como as obtidas neste estudo, foram também observadas utilizando o método hidrotermal assistido por micro-ondas, porém com a presença de PVP e em temperatura de 180°C¹⁰⁰. O crescimento de nanofios de β - Ag_2MoO_4 em pH 4⁵¹ e mesmo em pH 2³⁷ tem sido relatado, enquanto outros observaram que, nesta faixa de pH, di- e/ou tri molibdatos $\text{Ag}_2\text{Mo}_2\text{O}_7$, e $\text{Ag}_2\text{Mo}_3\text{O}_{10}$ foram obtidos^{101, 152}. Complementando as análises de microscopia, cálculos teóricos, que tem sido utilizados para simular e prever a morfologia dos materiais^{60, 61, 71}, também foram realizados. Foi determinado que a morfologia ideal para o β - Ag_2MoO_4 é dominada pela orientação (011), nas suas três possibilidades equivalentes, (011), (110), e (101) considerando a simetria cúbica (Figura 30). Foi possível determinar, ainda, que a morfologia mais estável para o β - Ag_2MoO_4 pode ocorrer quando a energia da superfície é de 1,90; 1,28 e 3,46 J/m² para as faces (001), (011) e (111), respectivamente. Os resultados obtidos mostraram boa concordância entre as morfologias teóricas calculadas e aquelas obtidas experimentalmente, ou seja, os microcristais obtidos exibiram as faces (001), (011) e (111). Além disso, a energia de superfície de uma ou mais dessas faces foi alterada, em função do solvente utilizado (Figura 30), evidenciando que a forma dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 está estreitamente relacionada com o ambiente químico da reação. Assim, este estudo mostrou que a morfologia experimental pode ser modulada por meio de ajuste da estabilidade de superfície, que é dependente do solvente. Nesse sentido, a morfologia pode ser modulada alterando-se as energias de superfície das diferentes faces expostas, durante o processo de crescimento dos microcristais, modificando, dessa forma, as propriedades do material.

De acordo com considerações teóricas realizadas por Beltrán et al.²⁰, em 2014, molibdatos com estrutura espinélio apresentam cinco modos ativos Raman:

$$\Gamma = A_{1g} + E_g + 3T_{2g} \quad (10)$$

Os deslocamentos Raman encontrados neste estudo estão em concordância com valores previamente reportados na literatura^{12, 20, 65, 142}. Os espectros mostram que os picos relativos ao T_{2g} aparecem divididos, o que sugere a criação, nas amostras obtidas, de defeitos locais afetando principalmente os íons Ag^+ : parece razoável supor que alguns desses íons podem ter se deslocado do centro do seu arranjo octaedro, especialmente quando próximos da superfície dos microcristais.

A partir dos espectros de refletância obtidos por análise de UV-Vis, foi possível estabelecer a energia do gap óptico (E_{gap}) dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 sintetizados em água, álcool e amônia. Em estudos prévios, foram observados valores de 3,15 eV para o “band gap” direto de amostras de β - Ag_2MoO_4 preparadas por co-precipitação (pH 4; 70°C)⁵¹ e “band gaps” indiretos na faixa de 3,24-3,31 eV para amostras obtidas pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas e temperaturas variando de 100 a 160°C⁷¹. O valor de 3,32 eV observado no presente estudo é próximo daquele obtido para o “gap” indireto relatado por Li et al.¹⁰⁰, que foi de 3,37 eV para amostra de β - Ag_2MoO_4 preparada a 180°C por método hidrotermal assistido por micro-ondas. Esses resultados indicam a existência de níveis intermediários de energia dentro do intervalo de banda dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 sintetizados em diferentes solventes, que podem ser associados com a desordem estrutural dos “clusters” tetraedro $[MoO_4]$ e octaedro $[AgO_6]$.

Os espectros de emissão de fotoluminescência dos microcristais sintetizados mostraram dois picos, sendo um de emissão máxima na região do azul e outro mais fraco na região do laranja. Nota-se diferença entre os perfis de emissão entre os microcristais sintetizados nos três solventes, sendo o pico de emissão máxima mais acentuado quando a síntese foi realizada em etanol. A rede dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 pode se apresentar em diferentes níveis de distorção nos “clusters” complexos $[AgO_6]$ e $[MoO_4]$, que são responsáveis pelas emissões de fotoluminescência. A transferência de carga entre os “clusters” nos microcristais de β - Ag_2MoO_4 , que contém mais de um tipo de “cluster”, é descrita por excitações que envolvem transições eletrônicas de um “cluster” para outro. Portanto, a principal diferença nos espectros de fotoluminescência entre os microcristais pode ser atribuída à proporção entre os “clusters” ordenados $[MoO_4]_o/[AgO_6]_o$ e desordenados $[MoO_4]_d/[AgO_6]_d$. O efeito de ordem e desordem é produzido pelo solvente, que induz a formação de diferentes dipolos permanentes, que traz como consequência cristais com diferentes polarizações. Dessa forma, essa transferência de carga entre os “clusters” leva à formação de diferentes níveis na região proibida do intervalo de banda. Esse fenômeno de ordem/desordem tem sua origem na organização dos cristais, que sofre variação dependendo

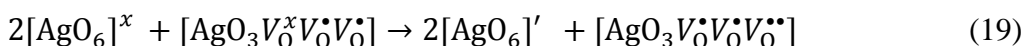
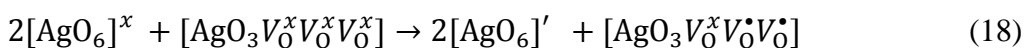
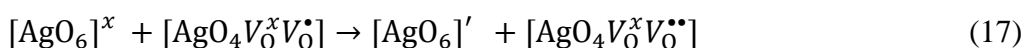
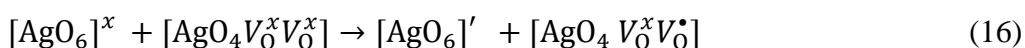
das interações entre os “clusters” $[\text{MoO}_4]$ e $[\text{AgO}_6]$, formador e modificador de rede, respectivamente. Esse efeito de ordem/desordem na constante de rede promove a transferência de carga eletrônica entre os “clusters” ordenados e desordenados, que é possível de acordo com as seguintes equações⁶⁰:



Da mesma forma como considerado para o tungstato de prata, esses clusters complexos induzem defeitos profundos ou superficiais que podem modificar as propriedades dos microcristais de $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$. Como observado pelos perfis obtidos (Figura 33), as propriedades de fotoluminescência dos microcristais foram diferentes dependendo do solvente, indicando que nas amostras esses “clusters” tem interações elétron-buraco mais ou menos efetivas, porque eles se encontram em diferentes estados excitados.

A inativação dos microrganismos *C. albicans*, SARM e *E. coli* podem ser explicadas devido à presença de defeitos específicos nas superfícies dos microcristais, que podem polarizar as estruturas e levar a transições eletrônicas entre os “clusters” desordenados $[\text{MoO}_4]_d$ e $[\text{AgO}_6]_d$ e os ordenados $[\text{MoO}_4]_o$ e $[\text{AgO}_6]_o$, que também produzem radicais livres OH^\bullet e $\text{O}_2\text{H}^\bullet$. Essas espécies oxidantes podem causar a inibição de crescimento de microrganismos, e também sua morte.

O mecanismo da atividade antimicrobiana do semiconductor é atribuído, principalmente, ao estresse oxidativo causado pelas espécies OH^\bullet , O_2^\bullet e $\text{O}_2\text{H}^\bullet$ (espécies reativas) em contato com a parede celular do microrganismo^{47, 99}, geradas quando os “clusters” $[\text{AgO}_3 \cdot 3\text{V}_0^x]$, $[\text{AgO}_4 \cdot 2\text{V}_0^x]$, $[\text{AgO}_5 \cdot \text{V}_0^x]$, $[\text{AgO}_6]^x$ e $[\text{MoO}_4]_o^x$, que constituem a estrutura do $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$, são excitados (equações 13-19) (elaboração própria):



Os “clusters” $[AgO_5V_O^\bullet]$, $[AgO_5V_O^{\bullet\bullet}]$, $[AgO_4V_O^xV_O^\bullet]$, $[AgO_4V_O^xV_O^{\bullet\bullet}]$, $[AgO_3V_O^xV_O^\bulletV_O^\bullet]$, e $[AgO_3V_O^\bulletV_O^\bulletV_O^{\bullet\bullet}]$ transferem um buraco para a água, que se decompõe em radical hidroxila e próton (OH^\bullet e H^\bullet). Simultaneamente, os “clusters” $[AgO_4V_O^xV_O^\bullet]$, $[AgO_3V_O^\bulletV_O^\bulletV_O^{\bullet\bullet}]$, $[AgO_3V_O^xV_O^\bulletV_O^\bullet]$, $[AgO_4V_O^xV_O^{\bullet\bullet}]$, $[MoO_4]_o'$, e $[AgO_6]'$ transferem um elétron para a molécula de oxigênio (O_2) e produz O_2' , que interage com o próton, formando o radical O_2H^\bullet .

Outro aspecto a ser considerado é a morfologia dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 , que foram obtidas com os diferentes solventes (Figura 30). Quando a água foi utilizada como solvente, os microcristais não apresentaram a face (001). Porém, quando o solvente utilizado foi a amônia, essa face apareceu na morfologia e, finalmente, nos microcristais sintetizados em álcool, a superfície (001) tornou-se mais aparente. É importante destacar que as faces (001) e (011) do β - Ag_2MoO_4 são terminadas em oxigênio e prata, enquanto a face (111) é terminada em molibdênio e oxigênio¹⁴². Na superfície (111) os átomos de prata são coordenados a três átomos de oxigênio, para formar “clusters” complexos $[AgO_3 \cdot 3V_O^x]$, e os átomos de molibdênio são coordenados com apenas um oxigênio (desfavorecendo sua estabilidade). As superfícies (011) possuem os átomos de prata rodeados por quatro átomos de oxigênio, resultando nos “clusters” complexos $[AgO_4 \cdot 2V_O^x]$, enquanto os átomos de prata das superfícies (001) são coordenados a cinco átomos de oxigênio, formando os “clusters” complexos $[AgO_5 \cdot V_O^x]$, que são mais estáveis (Figuras 37 a 39).

Os resultados dos testes microbiológicos mostraram que a eficiência antimicrobiana dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 variou com o solvente, e aumentou na seguinte ordem: água < amônia < álcool. Assim, o aparecimento da superfície (001) aumentou a eficiência dos microcristais contra os microrganismos avaliados. Uma possível explicação proposta neste estudo, para os resultados obtidos, é a de que o mecanismo dos microcristais de β - Ag_2MoO_4 para a inativação dos microrganismos está relacionado, principalmente, à presença dos “clusters” complexos $[AgO_5 \cdot V_O^x]$.

Nos “clusters” $[AgO_4V_O^xV_O^\bullet]$ e $[AgO_3V_O^xV_O^\bulletV_O^\bullet]/[AgO_3V_O^xV_O^\bulletV_O^\bullet]$ pode ocorrer a combinação interna entre elétron e buraco, enquanto em $[AgO_5V_O^\bullet]$ a vacância é separada do elétron, uma vez que o elétron está localizado em um “cluster” complexo $[AgO_6]'$ organizado. Isso justifica o fato de que $[AgO_5V_O^\bullet]$ são mais reativos e assim, mais eficazes para as aplicações antimicrobianas. Além disso, as superfícies (001) apresentam baixa energia superficial ($E_{suf} = 1,28 \text{ J/m}^2$), como determinado pelos cálculos teóricos e, portanto, são mais

facilmente polarizadas e capazes de gerar as espécies reativas OH^* , O_2^* e O_2H^* , que podem resultar na morte celular.

Ação de compostos (óxidos bimetálicos) associados à prata contra biofilmes

Devido à resistência aumentada dos microrganismos, quando organizados na forma de biofilmes, os microcristais que apresentaram melhores resultados contra os microrganismos, na forma planctônica, tiveram sua capacidade de prevenir a formação de biofilmes avaliada contra *C. albicans*, SARM e *E. coli*. Os microcristais selecionados foram $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ irradiado, $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$, ambos sintetizados em álcool, que foram denominados, no capítulo resultados, pelas siglas WO: nanoAg, WO: álcool e Mo: álcool, respectivamente.

A Microscopia Eletrônica de Varredura é um método eficaz que permite a caracterização morfológica e estrutural de biofilmes microbianos⁹⁰. Entretanto, nesta técnica há a necessidade do preparo da amostra previamente a observação no microscópio, que consiste na fixação do biofilme, desidratação com séries de etanol com concentrações crescentes, e posterior secagem em câmara a vácuo. Embora essas etapas possam resultar em alterações dos biofilmes, é possível extrair dados muito importantes das imagens obtidas, como a morfologia das células que permaneceram aderidas, distribuição e área de cobertura do biofilme. Devido às limitações da microscopia eletrônica de varredura, informações provenientes de análises em microscópio confocal a laser foram utilizadas para complementar o estudo dos biofilmes. A microscopia de luz é a técnica amplamente utilizada para ensaios de biofilme in vitro, onde pode-se avaliar a adesão dos microrganismos, distribuição, estrutura do biofilme e viabilidade celular⁹⁰.

Os três microcristais selecionados, mostraram atividade antimicrobiana contra as bactérias SARM e *E. coli* e a levedura *C. albicans*. No entanto, independentemente do microcristal utilizado, as concentrações necessárias para inibir a formação de biofilmes de *E. coli* foram sempre inferiores às necessárias para SARM e *C. albicans*. Esses resultados podem estar relacionados com as diferenças na estrutura celular externa, isto é, a parede celular, que é uma estrutura dinâmica que proporciona proteção contra o ambiente hostil, aderência às superfícies e manutenção da integridade e da forma da célula⁷². Para ambas as bactérias, *E. coli* e SARM, a parede celular contém uma camada de peptidoglicano. No entanto, nas bactérias gram negativas como a *E. coli*, a camada de peptidoglicano é fina (7-8 nm) e localizada no espaço periplasmático entre a membrana externa e a membrana interna (citoplasmática)¹⁵⁹. A membrana externa contém lipopolissacarídeos e proteínas que

aumentam a carga negativa da célula¹⁵⁹. Além disso, as bactérias *E. coli* possuem, dentro do espaço periplásmico, superóxido dismutase que pode atuar sobre O^{2-} gerado pelos microcristais, resultando na formação de H_2O_2 que permeia a célula mais facilmente do que O^{2-} e, assim, oxida os sistemas ativos da célula^{10, 70}. Em contraste, a bactéria gram-positiva SARM não possui membrana externa, mas apresenta uma parede celular mais espessa de peptidoglicano (20-50 nm), atravessada por cadeias de ácido teicóico. Os ácidos teicóicos ligados e inseridos no peptidoglicano são denominados como ácidos teicóicos da parede, enquanto aqueles designados como ácidos lipoteicóicos, estendem-se para dentro da membrana citoplasmática^{25, 134}. Além disso, a largura do espaço periplásmico entre a membrana citoplasmática e a parede celular é menor que aquele do periplasma típico de bactérias gram-negativas¹¹⁵.

No caso da *C. albicans*, a parede celular é uma estrutura de duas camadas com a camada interna composta por polissacáridos de glucose, principalmente β (1, 3) -glucano e uma quantidade menor de β (1, 6) -glucano. Essa camada também contém quitina, um polímero de β -1,4-N-acetilglucosamina linear. Os polissacarídeos de manose, ligados à proteína, formando uma barreira de manoproteína, são localizados na camada externa, atuando como filtro para materiais de alto peso molecular^{31, 92, 114, 144}. Além disso, como organismo eucariótico, a *C. albicans* tem um núcleo distinto com o material genético, protegido pela membrana nuclear⁷⁰ como uma barreira adicional contra a difusão, que contribui para maior resistência a danos no DNA. E, ainda, sabe-se que a forma filamentosa de *C. albicans* contém mais quitina na parede celular do que a sua forma de levedura (blastocôndia), e tem sido relatado que as paredes das células organizadas em biofilme são duas vezes mais espessas e contêm mais carboidratos e β (1, 3) -glucano que as células planctônicas¹²⁵. Todas essas diferenças nas estruturas e composições das paredes celulares podem ter contribuído, pelo menos em parte, para a maior susceptibilidade da bactéria Gram-negativa *E. coli* aos microcristais Mo:álcool, WO:álcool e WO:nanoAg, em comparação com a bactéria gram-positiva SARM e a levedura *C. albicans* observadas nesta investigação.

Revestimentos contendo Ag depositados à plasma

O revestimento de materiais com compostos contendo prata constitui uma alternativa para o controle da adesão microbiana nas superfícies^{1, 33, 81, 118, 161}, e pode ser realizado por meio da deposição de filmes finos.

Os resultados deste estudo mostraram que, utilizando a técnica de co-pulverização catódica em plasma de argônio, foi possível obter filmes finos sobre substratos de resina acrílica à base de PMMA que resultaram em alterações nas características superficiais (Figuras 49 a 51). Foi observado que, o filme SiO₂ apresentou-se hidrofílico (menor ângulo de contato e maior energia livre de superfície) enquanto o controle PMMA, foi hidrofóbico. Já para o filme de Ag, os valores obtidos foram próximos aos do PMMA, indicando hidrofobicidade. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que, ao analisarem filmes de SiO₂¹⁵⁸ e de Ag⁵⁴ depositados por pulverização catódica, verificaram valores de ângulo de contato, mensurados com água, em torno de 40° e de 90°, respectivamente, que são similares aos observados na presente investigação. Para os filmes Ag/SiO₂7 e Ag/SiO₂15, nota-se que, à medida que o tempo de deposição aumentou, houve também aumento na hidrofobicidade das superfícies, provavelmente pela maior quantidade de prata depositada, conforme constatado nas análises de microscopia (MEV e MFA). As características físicas e químicas da superfície dos materiais como rugosidade, hidrofobicidade e energia livre de superfície, tem sido correlacionadas com a adesão de microrganismos, dentre eles a *C. albicans*^{175, 176}. Entretanto, outros estudos relatam que não há relação entre eles^{46, 66}. No presente estudo, não foi possível estabelecer correlação entre a adesão de células de *C. albicans* e a energia livre de superfície ou a hidrofobicidade dos substratos, tendo em vista que os valores de UFC/mL observados tanto para o filme hidrofílico SiO₂ como para os hidrofóbicos Ag Ag/SiO₂7, foram iguais aos do controle (PMMA hidrofóbico). Entretanto, pode-se observar que a rugosidade do filme Ag/SiO₂15, depositado sobre a resina acrílica, foi menor em relação aos demais substratos, o que sugere que esse fator pode ter influenciado na habilidade da *C. albicans* de se aderir sobre essa superfície.

Os resultados de FTIR apresentados na Figura 52 demonstram que os picos presentes na região de 1.135 cm⁻¹ são atribuídos a um ângulo maior das ligações Si-O-Si (ângulo aproximado de 150°). O pico centrado em 1.063 cm⁻¹ pode ser atribuído ao alongamento de ligações Si-O-Si e diminuição do ângulo das ligações, sendo menos pronunciado no filme Ag/SiO₂7. A intensidade das ligações Si – H (picos entre 2000 e 2250 cm⁻¹) também foi menos acentuada no grupo Ag/SiO₂7 em relação aos demais. Essas ligações estão relacionadas com a densidade dos filmes: como o filme Ag/SiO₂7 foi depositado durante menor tempo em relação aos demais, apresenta menor densidade dessas ligações⁴⁰. Os múltiplos picos encontrados entre 1250 e 1000 cm⁻¹ (em menor quantidade em Ag/ SiO₂7) podem ser atribuídos às ligações Si-O-Si e Si-CH₂-Si. A presença da ligação Si-CH₂-Si representa uma reação incompleta de oxidação, e indica a presença de hidrocarbonetos na

reação. Os picos em torno de 900 cm^{-1} podem ser atribuídos às ligações Si-H. Embora não tenha sido depositado SiO_2 no filme Ag, quando o plasma é acionado, dentro da câmara à vácuo é criado um ambiente altamente reativo, onde se encontram os dois alvos (Ag e SiO_2) e, embora em menor quantidade, o alvo de SiO_2 pode desprender átomos, mesmo que não esteja ativo com RF. Assim, a presença das ligações envolvendo Si no filme Ag pode ser explicada.

A microscopia de força atômica é um instrumento capaz de detectar a topografia superficial a nível atômico, por meio da mensuração dos movimentos de uma sonda de varredura sobre a superfície do filme depositado. Um sensor registra os movimentos da sonda, e envia as informações ao computador⁹, formando assim uma imagem tridimensional da topografia superficial da amostra analisada. Além da topografia superficial, pode-se mensurar a rugosidade média apenas dos filmes depositados. As imagens obtidas por meio dessa técnica evidenciaram, para os filmes finos Ag/ SiO_2 7 e Ag/ SiO_2 15, a formação de “ilhas” de distribuição aleatória, localizadas sobre uma camada homogênea e densa de pequenas partículas de SiO_2 . Essas “ilhas” são nanopartículas de Ag, e se apresentam em maior quantidade no filme Ag/ SiO_2 15, devido ao maior tempo de deposição em comparação com o filme Ag/ SiO_2 7. As nanopartículas de Ag apresentam diferentes tamanhos e morfologias, fato que pode ser explicado pela teoria da nucleação. Conforme os átomos de Ag vão sendo depositados, por migração destes formam-se ilhas na superfície do SiO_2 , sendo essa formação dependente da taxa de deposição¹³⁸, que varia conforme os parâmetros utilizados durante o processo de pulverização catódica. No filme Ag as imagens revelaram uma camada homogênea de partículas de Ag que, embora estejam em escala nanométrica, são maiores em relação às aquelas visualizadas no filme SiO_2 . A rugosidade também variou entre os filmes depositados, sendo o Ag o mais rugoso e o SiO_2 o mais liso, estando de acordo com o tamanho das partículas presentes, que influenciam diretamente na rugosidade superficial. Os filmes Ag/ SiO_2 7 e Ag/ SiO_2 15 apresentaram valores médios de rugosidades semelhantes entre si e intermediários em relação aos demais, devido à presença tanto de partículas de Ag quanto de SiO_2 .

Considerando-se que, no filme Ag, foi utilizado o plasma de corrente contínua, há uma diferença no grau de ionização em comparação aos filmes Ag/ SiO_2 7 e Ag/ SiO_2 15, que foram depositados, simultaneamente, empregando tanto corrente contínua como rádio-frequência. Esse fato explica a diferença na morfologia das nanopartículas que compõem o filme Ag, em relação aos demais. O mesmo ocorre para o filme SiO_2 , que foi depositado somente com plasma de rádio-frequência. Os resultados deste estudo estão em concordância com Armelão et al.¹¹ (2006) que explica os processos envolvidos na nucleação e no crescimento de

nanopartículas de prata sobre a sílica: (I) no início do processo de pulverização catódica, os átomos de Ag são distribuídos na superfície, em locais distantes entre si. Se o tempo de pulverização é baixo, há quantidade baixa de Ag depositada, o que gera nanopartículas pequenas (devido ao pouco tempo para nucleação) e predominância de morfologia esférica. (II) com o aumento de tempo de deposição, há aumento progressivo no teor de Ag depositada; esse fenômeno produz partículas maiores, com tamanhos variados e morfologia irregular.

Uma das ferramentas importantes para a caracterização de nanomateriais e filmes finos é a difração de raios-X. Os difratogramas obtidos para os filmes Ag/SiO₂7 e Ag/SiO₂15 mostraram ausência de picos que sejam claramente visíveis e bem definidos. Pode-se observar também um pico largo para as duas amostras, localizados em $2\theta = 26^\circ$, que corresponde à sílica amorfa¹⁹. Não foram encontrados picos relacionados à prata, provavelmente devido ao tamanho e a pouca quantidade das partículas.

Alguns estudos tem demonstrado a ação de nanopartículas de Ag na inativação de microrganismos, em especial *C. albicans*¹¹⁷. Devido a aderência das células fúngicas às bases de próteses ser o primeiro passo para a colonização e o desenvolvimento de infecção, este estudo investigou o efeito de filmes finos contendo Ag na adesão de *C. albicans*. Foi verificado que o filme Ag/SiO₂15 proporcionou diminuição de mais de 2 logs na contagem de colônias em comparação com os demais grupos, incluindo o controle. Esse resultado foi confirmado pelas micrografias obtidas através de MEV, que revelaram menor quantidade de células aderidas ao substrato de resina onde foi depositado o filme Ag/SiO₂15. Os valores de log₁₀ UFC/mL foram similares entre o PMMA (controle) e os filmes Ag e SiO₂, indicando que os componentes Ag e SiO₂ isolados, não são responsáveis pela diminuição da adesão microbiana. Isso porque, para que esses filmes tenham funcionalidade catalítica ou antibacteriana, é necessário que haja superfícies das partículas expostas¹¹, o que não ocorre no filme de Ag, onde temos um filme contínuo. Portanto, esse efeito só é possível quando temos uma camada de SiO₂ com nanopartículas de Ag na superfície, como observado para o filme Ag/SiO₂15.

As análises em microscopia confocal evidenciaram grande quantidade de células de *C. albicans* viáveis aderidas em todos os filmes, com exceção de Ag/SiO₂15, que apresenta menor quantidade de células coradas em verde, comparado com o PMMA sem revestimento (controle). As imagens obtidas também revelaram a presença de células mortas (coradas em vermelho) para os filmes AgSiO₂7 e AgSiO₂, o que não ocorreu para o controle e para os filmes Ag e SiO₂. Esses resultados indicam que, além da morte dos microrganismos aderidos, também houve diminuição da adesão de *C. albicans* principalmente no filme Ag/SiO₂15, que

podem estar associados com a menor rugosidade superficial, em comparação com o grupo controle e os demais filmes avaliados, bem como com a maior quantidade de nanopartículas de Ag na superfície.

O mecanismo de ação antimicrobiana das nanopartículas de Ag ainda não é totalmente conhecido⁴. Entretanto, várias interações entre as nanopartículas de prata e as bactérias já são conhecidas⁵⁶, como alterações estruturais e danos na membrana¹²⁹, com a formação de “pits”¹¹⁹ e modificações na permeabilidade e na força proton motora¹²³. Kim et al.⁸⁸ (2009) observaram também efeito antifúngico de nanopartículas de Ag contra *C. albicans*, causando despolarização da membrana, alterações na parede celular e poros na membrana plasmática. Proteínas importantes contendo enxofre e demais elementos contendo fósforo, tais como o DNA, são também locais preferenciais de ligação para as nanopartículas de Ag^{123, 129}, podendo inibir a capacidade de replicação⁹⁸. A atuação dos íons Ag também tem sido sugerida para a atividade antimicrobiana^{87, 173} por meio da inibição de funções enzimáticas⁸⁷ e cadeia respiratória mitocondrial⁹⁸ e produção de espécies reativas de oxigênio^{79, 87, 96}, com consequente danos⁸⁷ e despolarização da membrana⁹⁶, fragmentação do núcleo⁷⁹, interação com lipídeos, DNA, RNA e proteínas, e severas alterações nas funções celulares²⁸.

Os resultados obtidos nas duas etapas desta pesquisa permitiram concluir que a atividade antimicrobiana mais efetiva foi observada com os microcristais de α -Ag₂WO₄ sintetizados em álcool e com o filme Ag/SiO₂15.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais avaliadas, os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Os métodos hidrotermal assistido por micro-ondas e co-precipitação e a variação das condições de síntese permitiram a obtenção dos óxidos bimetálicos α - Ag_2WO_4 e β - Ag_2MoO_4 com diferentes morfologias, faces cristalográficas e propriedades, conforme demonstrado pelas técnicas de caracterizações utilizadas.
- Os testes microbiológicos realizados com células planctônicas e biofilmes de *C. albicans*, SARM e *E. coli* evidenciaram que todos os microcristais apresentaram atividade antimicrobiana, tendo sido o α - Ag_2WO_4 o mais efetivo, e a bactéria *E. coli* a mais susceptível aos compostos avaliados.
- Os resultados da segunda etapa deste estudo mostraram que a técnica de co-pulverização catódica a plasma permitiu a deposição dos filmes Ag/SiO_2 7, Ag/SiO_2 15, Ag e SiO_2 sobre a resina acrílica para base de prótese (PMMA).
- As técnicas de caracterização utilizadas demonstraram que os filmes depositados apresentaram características e propriedades distintas, e os testes microbiológicos evidenciaram que o filme Ag/SiO_2 15 foi o mais efetivo na redução da adesão de *C. albicans* à resina acrílica.

REFERÊNCIAS*

1. Agarwala M, Barman T, Gogoi D, Choudhury B, Pal AR, Yadav R. Highly effective antibiofilm coating of silver–polymer nanocomposite on polymeric medical devices deposited by one step plasma process. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014; 102(6): 1223-35.
2. Akova M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*. 2016; 7(3): 252-66.
3. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*. 2006; 55(8): 999-1008.
4. Allaker R. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res*. 2010; 89(11): 1175-86.
5. Anand KKH, Mandal BK. Activity study of biogenic spherical silver nanoparticles towards microbes and oxidants. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2015; 135: 639-45.
6. André RS, Zamperini CA, Mima EG, Longo VM, Albuquerque AR, Sambrano JR, et al. Antimicrobial activity of TiO₂: Ag nanocrystalline heterostructures: Experimental and theoretical insights. *Chem Phys*. 2015; 459: 87-95.
7. Andrés J, Gracia L, Gonzalez-Navarrete P, Longo VM, Avansi Jr W, Volanti DP, et al. Structural and electronic analysis of the atomic scale nucleation of Ag on α -Ag₂WO₄ induced by electron irradiation. *Sci Rep*. 2014; 4: 5391.
8. Andrés J, Ferrer MM, Garcia L, Beltran A, Longo VM, Cruvinel GH, et al. A combined experimental and theoretical study on the formation of Ag filaments on β -Ag₂MoO₄ induced by electron irradiation. *Part Part Syst Charact*. 2015; 32: 646-51.
9. Angulo Abanto JR. Estudio de la evolución de la morfología superficial y cristalización de películas delgadas de Ag/SiO₂ tratadas termicamente [trabalho de conclusão de curso de Física]. Peru: Universidad Nacional Mayor De San Marcos; 2016.
10. Applerot G, Lellouche J, Lipovsky A, Nitzan Y, Lubart R, Gedanken A, et al. Understanding the antibacterial mechanism of CuO nanoparticles: revealing the route of induced oxidative stress. *Small*. 2012; 8(21): 3326-37.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptados das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

11. Armelao L, Barreca D, Bottaro G, Gasparotto A, Gross S, Maragno C, et al. Recent trends on nanocomposites based on Cu, Ag and Au clusters: a closer look. *Coord Chem Rev.* 2006; 250(11): 1294-314.
12. Arora A, Nithya R, Misra S, Yagi T. Behavior of silver molybdate at high-pressure. *J Solid State Chem.* 2012; 196: 391-7.
13. Baino F, Potestio I. Orbital implants: State-of-the-art review with emphasis on biomaterials and recent advances. *Mater Sci Eng C.* 2016; 69: 1410-28.
14. Balagna C, Ferraris S, Perero S, Miola M, Baino F, Coggiola A, et al. Silver nanocluster/silica composite coatings obtained by sputtering for antibacterial applications. In: Njuguna J, eds. *Structural nanocomposites. Engineering materials.* Berlin: Springer; 2013. p. 225-47.
15. Ballhausen B, Kriegeskorte A, Schleimer N, Peters G, Becker K. The mecA homolog mecC confers resistance against β -lactams in *Staphylococcus aureus* irrespective of the genetic strain background. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(7): 3791-8.
16. Bao ZY, Lei DY, Dai J, Wu Y. In situ and room-temperature synthesis of ultra-long Ag nanoparticles-decorated Ag molybdate nanowires as high-sensitivity SERS substrates. *Appl Surf Sci.* 2013; 287: 404-10.
17. Bassetti M, Righi E, Carnelutti A. Bloodstream infections in the Intensive Care Unit. *Virulence.* 2016; 7(3): 267-79.
18. Bazaka K, Jacob MV, Crawford RJ, Ivanova EP. Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. *Acta Biomater.* 2011; 7(5): 2015-28.
19. Belahmar A, Chouiyakh A. Sputtering synthesis and thermal annealing effect on gold nanoparticles in Al₂O₃ matrix. *J Nanosci Nanotechnol.* 2016; 2(2): 100-3.
20. Beltrán A, Gracia L, Longo E, Andres J. First-principles study of pressure-induced phase transitions and electronic properties of Ag₂MoO₄. *J Phys Chem C.* 2014; 118(7): 3724-32.
21. Bhattacharya S, Ghosh A. Silver molybdate nanoparticles, nanowires, and nanorods embedded in glass nanocomposites. *Phys Rev B.* 2007; 75(9): 092103.
22. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13(1): 42-51.

23. Boles BR, Horswill AR. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol.* 2011; 19(9): 449-55.
24. Bou-Antoun S, Davies J, Guy R, Johnson AP, Sheridan EA, Hope RJ. Descriptive epidemiology of *Escherichia coli* bacteraemia in England, april 2012 to march 2014. *Euro Surveill.* 2016; 21(35).
25. Brown S, Santa Maria Jr JP, Walker S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2013; 67: 313-36.
26. Bueno M, Urban V, Barbério G, Silva W, Porto V, Pinto L, et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. *Oral Dis.* 2015; 21(1): 57-65.
27. Burnham JP, Lane MA, Kollef MH. Impact of sepsis classification and multidrug resistance status on outcome among patients treated with appropriate therapy. *Crit Care Med.* 2015; 43(8): 1580.
28. Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol.* 2010; 3(1): 3-8.
29. Cag Y, Caskurlu H, Fan Y, Cao B, Vahaboglu H. Resistance mechanisms. *Ann Transl Med.* 2016; 4(17): 326.
30. Cavalcante L, Almeida M, Avansi Jr W, Tranquilin R, Longo E, Batista N, et al. Cluster coordination and photoluminescence properties of α - Ag_2WO_4 microcrystals. *Inorg Chem.* 2012; 51(20): 10675-87.
31. Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008; 72(3): 495-544.
32. Chahoud J, Kanafani ZA, Kanj SS. Management of candidaemia and invasive candidiasis in critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 42: S29-S35.
33. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 2010; 28(11): 580-8.
34. Chandra J, Mukherjee P, Leidich S, Faddoul F, Hoyer L, Douglas L, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001;80(3):903-8.
35. Chen D, Tang K, Li F, Zheng H. A simple aqueous mineralization process to synthesize tetragonal molybdate microcrystallites. *Cryst Growth Des.* 2006; 6(1): 247-52.

36. Chen H, Xu Y. Photoactivity and stability of Ag₂WO₄ for organic degradation in aqueous suspensions. *Appl Surf Sci.* 2014; 319: 319-23.
37. Cheng L, Shao Q, Shao M, Wei X, Wu Z. Photoswitches of one-dimensional Ag₂MO₄ (M= Cr, Mo, and W). *J Phys Chem C.* 2009; 113(5): 1764-8.
38. Choi O, Hu Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ Sci Technol.* 2008; 42(12): 4583-8.
39. Chook SW, Chia CH, Zakaria S, Ayob MK, Chee KL, Huang NM, et al. Antibacterial performance of Ag nanoparticles and AgGO nanocomposites prepared via rapid microwave-assisted synthesis method. *Nanoscale Res Lett.* 2012; 7(1): 541.
40. Clergereaux R, Calafat M, Benitez F, Escaich D, de Larclause IS, Raynaud P, et al. Comparison between continuous and microwave oxygen plasma post-treatment on organosilicon plasma deposited layers: effects on structure and properties. *Thin Solid Films.* 2007; 515(7): 3452-60.
41. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – seventh edition. [internet]. 7th ed. Wayne: CLSI; 2006. [acesso 2016 Dec 18]. Disponível em: <http://demo.nextlab.ir/getattachment/737fedd6-3926-4099-b6c8-19aa279bfd1f/CLSI-M7-A7.aspx>
42. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard – third edition. [internet]. 3rd ed. Wayne: CLSI; 2008. [acesso em 2016 Dec 18]. Disponível em: https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf.
43. Cui X, Yu SH, Li L, Biao L, Li H, Mo M, et al. Selective synthesis and characterization of single- crystal silver molybdate/tungstate nanowires by a hydrothermal process. *Chemistry.* 2004; 10(1): 218-23.
44. Cunha F, Sczancoski J, Nogueira Id, de Oliveira V, Lustosa S, Longo E, et al. Structural, morphological and optical investigation of β -Ag₂MoO₄ microcrystals obtained with different polar solvents. *CrystEngComm.* 2015; 17(43): 8207-11.
45. Da Silva LF, Catto AC, Avansi W, Cavalcante LS, Andrés J, Aguir K, et al. A novel ozone gas sensor based on one-dimensional (1D) α -Ag₂WO₄ nanostructures. *Nanoscale.* 2014; 6(8): 4058-62.
46. Da Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly (methyl methacrylate) resin surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 94(1): 149-56.

47. Dalrymple OK, Stefanakos E, Trotz MA, Goswami DY. A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection. *Appl Catal B*. 2010;98(1):27-38.
48. De Castro DT, Valente ML, Agnelli JAM, da Silva CHL, Watanabe E, Siqueira RL, et al. In vitro study of the antibacterial properties and impact strength of dental acrylic resins modified with a nanomaterial. *J Prosthet Dent*. 2016; 115(2): 238-46.
49. de Castro DT, Valente ML, da Silva CH, Watanabe E, Siqueira RL, Schiavon MA, et al. Evaluation of antibiofilm and mechanical properties of new nanocomposites based on acrylic resins and silver vanadate nanoparticles. *Arch Oral Biol*. 2016; 67: 46-53.
50. de Kraker ME, Wolkewitz M, Davey PG, Grundmann H, Group BS. The clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(4): 1598-605.
51. De Santana YV, Gomes JEC, Matos L, Cruvinel GH, Perrin A, Perrin C, et al. Silver molybdate and silver tungstate nanocomposites with enhanced photoluminescence. *Nanomater Nanotechnol*. 2014; 4: 22.
52. Der Mee-Marquet V, Laure N, Blanc DS, Gbaguidi-Haore H, Dos santos Borges S, Viboud Q, et al. Marked increase in incidence for bloodstream infections due to *Escherichia coli*, a side effect of previous antibiotic therapy in the elderly. *Front Microbiol*. 2015; 6: 646.
53. Donohue J, Shand Jr W. The determination of the interatomic distances in silver molybdate, Ag_2MoO_4 . *J Am Chem Soc*. 1947; 69(2): 222-3.
54. Dutheil P, Thomann A-L, Lecas T, Brault P, Vayer M. Sputtered Ag thin films with modified morphologies: influence on wetting property. *Appl Surf Sci*. 2015; 347: 101-8.
55. Dutta DP, Singh A, Ballal A, Tyagi AK. High adsorption capacity for cationic dye removal and antibacterial properties of sonochemically synthesized Ag_2WO_4 nanorods. *Eur J Inorg Chem*. 2014; 2014(33): 5724-32.
56. Eckhardt S, Brunetto PS, Gagnon J, Priebe M, Giese B, Fromm KM. Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chem Rev*. 2013; 113(7): 4708-54.
57. Emami E, Kabawat M, Rompre PH, Feine JS. Linking evidence to treatment for denture stomatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Dent*. 2014; 42(2): 99-106.

58. Enoch DA, Mlangeni DA, Ekundayo J, Aliyu M, Sismey AW, Aliyu SH, et al. Gram negative bacteraemia—are they preventable and what will E. coli surveillance add? *J Infect Prev.* 2013; 14(2): 54-9.
59. Epstein JB. Diagnosis and treatment of oropharyngeal candidiasis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2003; 15(1): 91-102.
60. Fabbro MT, Foggi CC, Santos LP, Gracia L, Perrin A, Perrin C, et al. Synthesis, antifungal evaluation and optical properties of silver molybdate microcrystals in different solvents: a combined experimental and theoretical study. *Dalton Trans.* 2016; 45(26): 10736-43.
61. Fabbro MT, Saliby C, Rios LR, La Porta FA, Gracia L, Li MS, et al. Identifying and rationalizing the morphological, structural, and optical properties of-Ag₂MoO₄ microcrystals, and the formation process of Ag nanoparticles on their surfaces: combining experimental data and first-principles calculations. *Sci Technol Adv Mater.* 2015; 16(6): 065002.
62. Ferraris S, Perero S. Smart and composite inorganic coatings obtained by sputtering: a promising solution for numerous application fields. In: Montemor MF. *Smart composite coatings and membranes: transport, structural, environmental and energy applications.* Cambridge: Woodhead Publishing; 2015. p.33.
63. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(9): 563-75.
64. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9): 623-33.
65. Fodjo EK, Li D-W, Marius NP, Albert T, Long Y-T. Low temperature synthesis and SERS application of silver molybdenum oxides. *J Mater Chem A.* 2013; 1(7): 2558-66.
66. Foggi CC, Machado AL, Zamperini CA, Fernandes D, Wady AF, Vergani CE. Effect of surface roughness on the hydrophobicity of a denture- base acrylic resin and *Candida albicans* colonization. *J Investig Clin Dent.* 2016; 7(2): 141-8.
67. Foggi CC, Fabbro MT, Santos LPS, Santana YVB, Vergani CE, Machado AL, et al. Synthesis and evaluation of α -Ag₂WO₄ as novel antifungal agent. *Chem Phys Lett.* 2017; 674: 125-9.
68. Gasch O, Camoez M, Domínguez M, Padilla B, Pintado V, Almirante B, et al. Predictive factors for early mortality among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68(6): 1423-30.

69. Gong Q, Qian X, Ma X, Zhu Z. Large-scale fabrication of novel hierarchical 3D CaMoO_4 and SrMoO_4 mesocrystals via a microemulsion-mediated route. *Cryst Growth Des.* 2006; 6(8): 1821-5.
70. Gort AS, Ferber DM, Imlay JA. The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1999; 32(1): 179-91.
71. Gouveia A, Sczancoski J, Ferrer M, Lima A, Santos M, Li MS, et al. Experimental and theoretical investigations of electronic structure and photoluminescence properties of $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ microcrystals. *Inorg Chem.* 2014; 53(11): 5589-99.
72. Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol.* 2012; 15(4): 406-12.
73. Gupta SK, Ghosh P, Sudarshan K, Gupta R, Pujari P, Kadam R. Multifunctional pure and Eu^{3+} doped $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$: photoluminescence, energy transfer dynamics and defect induced properties. *Dalton Trans.* 2015; 44(44): 19097-110.
74. Hani U, G Shivakumar H, Vaghela R, Osmani AM, Shrivastava A. Candidiasis: a fungal infection-current challenges and progress in prevention and treatment. *Infect Disord Drug Targets.* 2015; 15(1): 42-52.
75. Hauser J, Zietlow J, Köller M, Esenwein S, Halfmann H, Awakowicz P, et al. Enhanced cell adhesion to silicone implant material through plasma surface modification. *J Mater Sci Mater Med.* 2009; 20(12): 2541-8.
76. Hernando-Amado S, Blanco P, Alcalde-Rico M, Corona F, Reales-Calderón JA, Sánchez MB, et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug Resist Updat.* 2016; 28: 13-27.
77. Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M, Sasaki T, Morimoto Y, Sekiguchi A, et al. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *J Infect Chemother.* 2014; 20(10): 593-601.
78. Hogan B, Rakotozandrindrainy R, Al-Emran H, Dekker D, Hahn A, Jaeger A, et al. Prevalence of nasal colonisation by methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthcare workers and students in Madagascar. *BMC Infect Dis.* 2016; 16(1): 420.
79. Hwang Is, Lee J, Hwang JH, Kim KJ, Lee DG. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS J.* 2012; 279(7): 1327-38.

80. Izumida FE, Moffa EB, Vergani CE, Machado AL, Jorge JH, Giampaolo ET. In vitro evaluation of adherence of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Streptococcus mutans* to an acrylic resin modified by experimental coatings. *Biofouling*. 2014; 30(5): 525-33.
81. Kamikawa Y, Hirabayashi D, Nagayama T, Fujisaki J, Hamada T, Sakamoto R, et al. In vitro antifungal activity against oral *Candida* species using a denture base coated with silver nanoparticles. *J Nanomater*. 2014; 2014: 48.
82. Kharade RR, Mali SS, Patil SP, Patil KR, Gang MG, Patil PS, et al. Enhanced electrochromic coloration in Ag nanoparticle decorated WO₃ thin films. *Electrochim Acta*. 2013; 102: 358-68.
83. Khatoon N, Mishra A, Alam H, Manzoor N, Sardar M. Biosynthesis, characterization, and antifungal activity of the silver nanoparticles against pathogenic *Candida* species. *Bionanoscience*. 2015; 5(2): 65-74.
84. Kim DW, Cho IS, Lee S, Bae ST, Shin SS, Han GS, et al. Photophysical and photocatalytic properties of Ag₂M₂O₇ (M= Mo, W). *J Am Ceram Soc*. 2010; 93(11): 3867-72.
85. Kim J-H, Lee M-A, Han G-J, Cho B-H. Plasma in dentistry: a review of basic concepts and applications in dentistry. *Acta Odontol Scand*. 2014; 72(1): 1-12.
86. Kim J-H, Lee S-M, Jun B-H, Choi H-J, Kim J-S, Cho M-H, et al. Multiplex detection and imaging of cancer markers based on surface-enhanced raman spectroscopic nanoparticle probes (SERS Dots). *Nanomedicine*. 2007; 3(4): 341.
87. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007; 3(1): 95-101.
88. Kim K-J, Sung WS, Suh BK, Moon S-K, Choi J-S, Kim JG, et al. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals*. 2009; 22(2): 235-42.
89. Kim SW, Joo YJ, Kim J. Asc1p, a ribosomal protein, plays a pivotal role in cellular adhesion and virulence in *Candida albicans*. *J Microbiol*. 2010; 48(6): 842-8.
90. Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endod Topics*. 2010; 22(1): 58-78.
91. Klustersky J, Ameye L, Maertens J, Georgala A, Muanza F, Aoun M, et al. Bacteraemia in febrile neutropenic cancer patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 30: 51-9.

92. Klis F, De Groot P, Hellingwerf K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2001; 39(1): 1-8.
93. Kohlmuller R, Faurie J. Etude des systemes $\text{MoO}_3\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ et $\text{MoO}_3\text{-MO}$ (M-Cu, Zn, Cd). *Bull Soc Chim Fr*. 1968; (11): 4379-82.
94. Kubelka P, Munk F. An article on optics of paint layers. *Z Tech Phys*. 1931; 12: 593-601.
95. Lam OL, Bandara H, Samaranyake LP, McGrath C, Li LS. Oral health promotion interventions on oral yeast in hospitalised and medically compromised patients: a systematic review. *Mycoses*. 2012; 55(2): 123-42.
96. Lee W, Kim K-J, Lee DG. A novel mechanism for the antibacterial effect of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biometals*. 2014; 27(6): 1191-201.
97. Lemos PS, Altomare A, Gouveia AF, Nogueira IC, Gracia L, Llusar R, et al. Synthesis and characterization of metastable $\beta\text{-Ag}_2\text{WO}_4$: an experimental and theoretical approach. *Dalton Trans*. 2016; 45(3): 1185-91.
98. Li W-R, Xie X-B, Shi Q-S, Duan S-S, Ouyang Y-S, Chen Y-B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals*. 2011; 24(1): 135-41.
99. Li Y, Zhang W, Niu J, Chen Y. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles. *Acs Nano*. 2012; 6(6): 5164-73.
100. Li Z, Chen X, Xue Z-L. Microwave-assisted hydrothermal synthesis of cube-like $\text{Ag-Ag}_2\text{MoO}_4$ with visible-light photocatalytic activity. *Sci China Chem*. 2013; 56(4): 443-50.
101. Lin J, Wang Q, Zheng Y, Zhang Y. Supersonic microwave co-assistance (SMC) efficient synthesis of red luminescent Eu^{3+} activated silver molybdates and their phase-dependent evolution processes. *CrystEngComm*. 2013; 15(28): 5668-72.
102. Lin Z, Li J, Zheng Z, Yan J, Liu P, Wang C, et al. Electronic reconstruction of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ nanorods for visible-light photocatalysis. *ACS Nano*. 2015; 9(7): 7256-65.
103. Liu E-y, Wang W-z, Gao Y-m, Jia J-h. Tribological properties of adaptive Ni-based composites with addition of lubricious Ag_2MoO_4 at elevated temperatures. *Tribol Lett*. 2012; 47(1): 21-30.
104. Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H, et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res*. 2006; 5(4): 916-24.

105. Longo E, Cavalcante LS, Volanti DP, Gouveia A, Longo V, Varela JA, et al. Direct in situ observation of the electron-driven synthesis of Ag filaments on α -Ag₂WO₄ crystals. *Sci Rep.* 2013; 3: 1676.
106. Longo E, Volanti DP, Longo VM, Gracia L, Nogueira IAC, Almeida MA, et al. Toward an understanding of the growth of Ag filaments on α -Ag₂WO₄ and their photoluminescent properties: a combined experimental and theoretical study. *J Phys Chem C.* 2014; 118(2): 1229-39.
107. Longo V, Cavalcante LD, De Figueiredo A, Santos L, Longo E, Varela JA, et al. Highly intense violet-blue light emission at room temperature in structurally disordered SrZrO₃ powders. *Appl Phys Lett.* 2007; 90(9): 091906.
108. Longo VM, Cavalcante LS, Paris EC, Sczancoski JC, Pizani PS, Li MS, et al. Hierarchical assembly of CaMoO₄ nano-octahedrons and their photoluminescence properties. *J Phys Chem C.* 2011; 115(13): 5207-19.
109. Longo VM, Picon FC, Zamperini C, Albuquerque AR, Sambrano JR, Vergani CE, et al. Experimental and theoretical approach of nanocrystalline TiO₂ with antifungal activity. *Chem Phys Lett.* 2013; 577: 114-20.
110. Longo VM, De Foggi CC, Ferrer MM, Gouveia AF, André RS, Avansi W, et al. Potentiated electron transference in α -Ag₂WO₄ microcrystals with Ag nanofilaments as microbial agent. *J Phys Chem A.* 2014; 118(31): 5769-78.
111. Lutz W, Sanderson W, Scherbov S. The coming acceleration of global population ageing. *Nature.* 2008; 451(7179): 716-9.
112. Machado JDC, Suen VMM, de Castro Figueiredo JF, Marchini JS. Biofilms, infection, and parenteral nutrition therapy. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2009; 33(4): 397-403.
113. Martinez-Gutierrez F, Boegli L, Agostinho A, Sánchez EM, Bach H, Ruiz F, et al. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling.* 2013; 29(6): 651-60.
114. Masuoka J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(2): 281-310.
115. Matias VR, Beveridge TJ. Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2006; 188(3): 1011-21.

116. Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S-i, Tsuchido T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(7): 4278-81.
117. Mendieta I, Nuñez-Anita RE, Cajero-Juárez M, Castaño VM. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 4777-86.
118. Mercier-Bonin M, Duviau M-P, Ellero C, Lebleu N, Raynaud P, Despax B, et al. Dynamics of detachment of *Escherichia coli* from plasma-mediated coatings under shear flow. *Biofouling.* 2012; 28(9): 881-94.
119. Mirzajani F, Ghassempour A, Aliahmadi A, Esmaeili MA. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Res Microbiol.* 2011; 162(5): 542-9.
120. Misra S, Jayaraman V, Gnanasekaran T, editors. Electrical conductivity and ammonia sensing characteristics of nanocrystalline silver molybdates synthesized by solution chemistry route. *Nanoscience, Technology and Societal Implications (NSTSI) International Conference*; 2011 Dec 8-10; Bhubaneswar, India. New Jersey: IEEE; 2011. p. 1-6.
121. Monteiro D, Silva S, Negri M, Gorup L, Camargo E, Oliveira R, et al. Silver colloidal nanoparticles: effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Appl Microbiol.* 2013; 114(4): 1175-83.
122. Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD, Sofair AN, Huie-White S, Wilcox S, et al. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005; 26(6): 540-7.
123. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005; 16(10): 2346.
124. Nakamura I, Fukushima S, Hayakawa T, Sekiya K, Matsumoto T. The additional costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units. *Am J Infect Control.* 2015; 43(10): 1046-9.
125. Nett JE, Crawford K, Marchillo K, Andes DR. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(8): 3505-8.
126. Ninganagouda S, Rathod V, Singh D, Hiremath J, Singh AK, Mathew J. Growth kinetics and mechanistic action of reactive oxygen species released by silver nanoparticles from *Aspergillus niger* on *Escherichia coli*. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 9.

127. O'donnell LE, Millhouse E, Sherry L, Kean R, Malcolm J, Nile CJ, et al. Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Res.* 2015; 15(7): fov077.
128. Paharik AE, Horswill AR. The staphylococcal biofilm: adhesins, regulation, and host response. *Microbiol Spectr.* 2016; 4(2).
129. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(6): 1712-20.
130. Panáček A, Kolář M, Večeřová R, Pucek R, Soukupová J, Kryštof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials.* 2009; 30(31): 6333-40.
131. Panáček A, Smékalová M, Večeřová R, Bogdanová K, Röderová M, Kolář M, et al. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant enterobacteriaceae. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016; 142: 392-9.
132. Paredes D, Ortiz C, Torres R. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157: H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Nanomed.* 2014; 9(1717): e29.
133. Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1391.
134. Percy MG, Gründling A. Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2014; 68: 81-100.
135. Phuruangrat A, Thongtem T, Thongtem S. Synthesis of lead molybdate and lead tungstate via microwave irradiation method. *J Cryst Growth.* 2009; 311(16): 4076-81.
136. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol.* 2012; 2012: 528521
137. Randall CP, Oyama LB, Bostock JM, Chopra I, O'Neill AJ. The silver cation (Ag⁺): antistaphylococcal activity, mode of action and resistance studies. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68(1): 131-8.
138. Ratsch C, Venables J. Nucleation theory and the early stages of thin film growth. *J Vac Sci Technol A.* 2003; 21(5): S96-S109.

139. Riu M, Chiarello P, Terradas R, Sala M, Garcia-Alzorritz E, Castells X, et al. Cost attributable to nosocomial bacteremia. Analysis according to microorganism and antimicrobial sensitivity in a university hospital in Barcelona. *PLoS One*. 2016; 11(4): e0153076.
140. Roca R, Sczancoski JC, Nogueira IC, Fabbro MT, Alves H, Gracia L, et al. Facet-dependent photocatalytic and antibacterial properties of α -Ag₂WO₄ crystals: combining experimental data and theoretical insights. *Catal Sci Technol*. 2015; 5(8): 4091-107.
141. Roca RA, Gouveia AF, Lemos PS, Gracia L, Andrés J, Longo E. Formation of Ag nanoparticles on β -Ag₂WO₄ through electron beam irradiation: a synergetic computational and experimental study. *Inorg Chem*. 2016; 55(17): 8661-71.
142. Roca RA, Sczancoski JC, Nogueira IC, Fabbro MT, Alves HC, Gracia L, et al. Facet-dependent photocatalytic and antibacterial properties of γ -Ag₂WO₄ crystals: combining experimental data and theoretical insights. *Catal Sci Technol*. 2015; 5(8): 4091-107.
143. Rosa R, Wawrzyniak A, Sfeir M, Smith L, Abbo LM. Performance of processes of care and outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Hosp Med*. 2016; 11(1): 27-32.
144. Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6(1): 14-29.
145. Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate Immunity and Saliva in *Candida albicans*-mediated Oral Diseases. *J Dent Res*. 2016; 95(4): 365-71.
146. San-Miguel MA, Da Silva EZ, Zanetti SM, Cilense M, Fabbro MT, Gracia L, et al. In situ growth of Ag nanoparticles on α -Ag₂WO₄ under electron irradiation: probing the physical principles. *Nanotechnology*. 2016; 27(22): 225703.
147. Saraiva G, Paraguassu W, Maczka M, Freire P, Lima J, Paschoal C, et al. Temperature-dependent Raman scattering studies of Na₂MoO₄. *J Raman Spectrosc*. 2008; 39(7): 937-41.
148. Sczancoski J, Cavalcante L, Joya M, Varela JA, Pizani P, Longo E. SrMoO₄ powders processed in microwave-hydrothermal: synthesis, characterization and optical properties. *Chem Eng J*. 2008; 140(1): 632-7.
149. Sczancoski J. Study on the optical and morphological properties of SrMoO₄ powders processed by hydrothermal systems [tese de doutorado]. São Carlos: Faculdade de Ciências Exatas e da Terra da UFSCar; 2011.

150. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol.* 2016; 121(2): 309-19.
151. Silva MJ, Oliveira DG, Marcillo OO, Neppelenbroek KH, Lara VS, Porto VC. Effect of denture- coating composite on *Candida albicans* biofilm and surface degradation after disinfection protocol. *Int Dent J.* 2016; 66(2): 86-92.
152. Singh DP, Sirota B, Talpatra S, Kohli P, Rebholz C, Aouadi S. Broom-like and flower-like heterostructures of silver molybdate through pH controlled self assembly. *J Nanopart Res.* 2012; 14(4): 781.
153. Skarstad P, Geller S. (W4O16) 8- Polyion in the high temperature modification of silver tungstate. *Mater Res Bull.* 1975; 10(8): 791-9.
154. Sollid J, Furberg A, Hanssen A, Johannessen M. *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infect Genet Evol.* 2014; 21: 531-41.
155. Stark G. Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membr Biol.* 2005; 205(1): 1-16.
156. Stone D, Liu J, Singh DP, Muratore C, Voevodin AA, Mishra S, et al. Layered atomic structures of double oxides for low shear strength at high temperatures. *Scr Mater.* 2010; 62(10): 735-8.
157. Sundaram R, Nagaraja K. Solid state electrical conductivity and humidity sensing studies on metal molybdate-molybdenum trioxide composites (M= Ni²⁺, Cu²⁺ and Pb²⁺). *Sens Actuators B Chem.* 2004; 101(3): 353-60.
158. Takeda S, Fukawa M. Surface OH groups governing surface chemical properties of SiO₂ thin films deposited by RF magnetron sputtering. *Thin Solid Films.* 2003; 444(1): 153-7.
159. Tamayo L, Azócar M, Kogan M, Riveros A, Páez M. Copper-polymer nanocomposites: An excellent and cost-effective biocide for use on antibacterial surfaces. *Mater Sci Eng C.* 2016; 69: 1391-409.
160. Tang J, Ye J. Correlation of crystal structures and electronic structures and photocatalytic properties of the W-containing oxides. *J Mater Chem.* 2005; 15(39): 4246-51.
161. Tarquinio KM, Kothurkar NK, Goswami DY, Sanders Jr RC, Zaritsky AL, LeVine AM. Bactericidal effects of silver plus titanium dioxide-coated endotracheal tubes on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine.* 2010; 5: 177-83.

162. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(3): 207-17.
163. Thomas A, Janáky C, Samu GF, Huda MN, Sarker P, Liu JP, et al. Time- and energy- efficient solution combustion synthesis of binary metal tungstate nanoparticles with enhanced photocatalytic activity. *ChemSusChem*. 2015; 8(10): 1652-63.
164. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28(3): 603-61.
165. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis*. 2016; 74(4): ftw018.
166. Tsuji M, Gomi S, Maeda Y, Matsunaga M, Hikino S, Uto K, et al. Rapid transformation from spherical nanoparticles, nanorods, cubes, or bipyramids to triangular prisms of silver with PVP, citrate, and H₂O₂. *Langmuir*. 2012; 28(24): 8845-61.
167. Turkovič A, Fox DL, Scott JF, Geller S, Ruse GF. High temperature Raman spectroscopy of silver tetratungstate, Ag₈W₄O₁₆. *Mater Res Bull*. 1977; 12(2): 189-95.
168. Urbach F. The long-wavelength edge of photographic sensitivity and of the electronic absorption of solids. *Phys Rev*. 1953; 92(5): 1324.
169. Van den Berg A, Juffermans C. The polymorphism of silver tungstate Ag₂WO₄. *J Appl Crystallogr*. 1982; 15(1): 114-6.
170. Van der Maarel- Wierink CD, Vanobbergen JN, Bronkhorst EM, Schols JM, de Baat C. Oral health care and aspiration pneumonia in frail older people: a systematic literature review. *Gerodontology*. 2013; 30(1): 3-9.
171. Vasudev MC, Anderson KD, Bunning TJ, Tsukruk VV, Naik RR. Exploration of plasma-enhanced chemical vapor deposition as a method for thin-film fabrication with biological applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013; 5(10): 3983-94.
172. Vasudevan A, Memon BI, Mukhopadhyay A, Li J, Tambyah PA. The costs of nosocomial resistant gram negative intensive care unit infections among patients with the systemic inflammatory response syndrome-a propensity matched case control study. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2015; 4(1): 3.
173. Vazquez-Muñoz R, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *PLoS One*. 2014; 9(10): e108876.

174. Vega NM, Gore J. Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. *Curr Opin Microbiol.* 2014; 21: 28-34.
175. Verran J, Lees G, Shakespeare AP. The effect of surface roughness on the adhesion of *Candida albicans* to acrylic. *Biofouling.* 1991; 3(3): 183-91.
176. Wady A, Machado AL, Zucolotto V, Zamperini C, Berni E, Vergani CE. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Microbiol.* 2012; 112(6): 1163-72.
177. Wady AF, Machado AL, Foggi CC, Zamperini CA, Zucolotto V, Moffa EB, et al. Effect of a Silver Nanoparticles Solution on *Staphylococcus aureus* and *Candida spp.* *J Nanomater.* 2014; 2014: 128.
178. Wang J-T, Hsu L-Y, Lauderdale T-L, Fan W-C, Wang F-D. Comparison of outcomes among adult patients with nosocomial bacteremia caused by methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a retrospective cohort study. *PloS One.* 2015; 10(12): e0144710.
179. Wang P, Huang B, Qin X, Zhang X, Dai Y, Whangbo M-H. Ag/AgBr/WO₃H₂O: visible-light photocatalyst for bacteria destruction. *Inorg Chem.* 2009; 48(22): 10697-702.
180. Wang QP, Guo XX, Wu WH, Liu SX, editors. Preparation of fine Ag₂WO₄ antibacterial powders and its application in the sanitary ceramics. *Adv Mat Res.* 2011; 284-286: 1321-5.
181. Wang X, Fu C, Wang P, Yu H, Yu J. Hierarchically porous metastable β-Ag₂WO₄ hollow nanospheres: controlled synthesis and high photocatalytic activity. *Nanotechnology.* 2013; 24(16): 165602.
182. Willers C, Wentzel JF, du Plessis LH, Gouws C, Hamman JH. Efflux as a mechanism of antimicrobial drug resistance in clinical relevant microorganisms: the role of efflux inhibitors. *Expert Opin Ther Targets.* 2017; 21(1): 23-36.
183. Wojcieszak D, Mazur M, Kaczmarek D, Mazur P, Szponar B, Domaradzki J, et al. Influence of the surface properties on bactericidal and fungicidal activity of magnetron sputtered Ti–Ag and Nb–Ag thin films. *Mater Sci Eng C.* 2016; 62: 86-95.
184. Wood D, Tauc J. Weak absorption tails in amorphous semiconductors. *Phys Rev B.* 1972; 5(8): 3144.
185. World Health Organization. Antimicrobial resistance: 2014 global report on surveillance [internet]. Geneva: WHO; 2014 [acesso 2016 dec 18]. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

186. Wyckoff RW. The crystal structure of silver molybdate. *J Am Chem Soc.* 1922; 44(9): 1994-8.
187. Xie Q, Ding T, Yang G. Rehabilitation of oral function with removable dentures—still an option? *J Oral Rehabil.* 2015; 42(3): 234-42.
188. Xu D, Cheng B, Zhang J, Wang W, Yu J, Ho W. Photocatalytic activity of Ag_2MO_4 (M= Cr, Mo, W) photocatalysts. *J Mater Chem A.* 2015; 3(40): 20153-66.
189. Xu J-W, Gao Z-D, Han K, Liu Y, Song Y-Y. Synthesis of magnetically separable $\text{Ag}_3\text{PO}_4/\text{TiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ heterostructure with enhanced photocatalytic performance under visible light for photoinactivation of bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014; 6(17): 15122-31.
190. Yamanaka M, Hara K, Kudo J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(11): 7589-93.
191. Yan T, Li L, Tong W, Zheng J, Wang Y, Li G. CdWO_4 polymorphs: Selective preparation, electronic structures, and photocatalytic activities. *J Solid State Chem.* 2011; 184(2): 357-64.
192. Yasuda K, Hirano Y, Kamino T, Yaguchi T, Hirokawa K. Observation of vaporization in palladium-indium intermetallic compounds by graphite furnace atomic absorption spectrometry using transmission electron microscopy. *Anal Sci.* 1995; 11(3): 437-40.
193. Yu T, Kim H, Hwang K, Lee J-M, Cho J, Lee J. Computed tomography findings associated with bacteremia in adult patients with a urinary tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016; 35(11): 1883-7.
194. Zamperini C, André R, Longo V, Mima E, Vergani CE, Machado AL, et al. Antifungal applications of Ag-decorated hydroxyapatite nanoparticles. *J Nanomater.* 2013; 2013: 7.
195. Zamperini C, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Rangel E, Cruz N. Evaluation of fungal adherence to plasma- modified polymethylmethacrylate. *Mycoses.* 2011; 54(5): e344-e51.
196. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(10): 763-70.

197. Zhang R, Cui H, Yang X, Tang H, Liu H, Li Y. Facile hydrothermal synthesis and photocatalytic activity of rod-like nanosized silver tungstate. *Micro Nano Lett.* 2012; 7(12): 1285-8.
198. Zhang X-Y, Wang J-D, Liu J-K, Yang X-H, Lu Y. Construction of silver tungstate multilevel sphere clusters by controlling the energy distribution on the crystal surface. *Cryst Eng Comm.* 2015; 17(5): 1129-38.
199. Zhao G, Stevens SE. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals.* 1998; 11(1): 27-32.

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 10 de março de 2019
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 10 de março de 2017.
CAMILA CRISTINA DE FOGGI