



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



Lucas Portela Oliveira

Síntese, caracterização de fosfato de prata (Ag_3PO_4) e sua ação contra *Candida albicans* associado com luz LED

Araraquara

2018



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



Lucas Portela Oliveira

Síntese, caracterização de fosfato de prata (Ag_3PO_4) e sua ação contra *Candida albicans* associado com luz LED

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

Araraquara

2018

Oliveira, Lucas Portela

Síntese, caracterização de fosfato de prata (Ag_3PO_4) e sua ação contra *Candida albicans* associado com luz LED / Lucas Portela Oliveira. -- Araraquara: [s.n.], 2018

81 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

1. Biofilmes 2. Fototerapia 3. *Candida albicans*
4. Antifúngicos I. Título

Lucas Portela Oliveira

Síntese, caracterização de fosfato de prata (Ag_3PO_4) e sua ação contra *Candida albicans* associado com luz LED

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

2º Examinador: Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira

3º Examinador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Araraquara, 04 de Maio de 2018

DADOS CURRICULARES

LUCAS PORTELA OLIVEIRA

Nascimento	10/07/1991
FILIAÇÃO	Maria do Socorro Portela Mesquita Oliveira José Martins de Oliveira Filho
2011 a 2015	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade Integral Diferencial – FACID/DeVry
2013 a 2014	Estagiário em Prótese Dentária Instituto LatoSensu
2014 a 2014	Monitor da Disciplina de Prótese Fixa e Prótese Parcial Removível Faculdade Integral Diferencial - FACID/DeVry
2016 a 2018	Curso de Mestrado – Área de Prótese Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista – UNESP
2016 a 2017	Estágio docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível I e II Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - UNESP

DEDICO ESTE TRABALHO

À **DEUS**, aos **MEUS PAIS, RAFAEL, GRAÇA e PEDRO LUCAS**, por sempre se mostrarem presentes em minha vida, tanto nos momentos de alegria quanto nos de tristeza. Por mostrarem-me a verdadeira força que cada um tem dentro de si.

À minha **TIA IRENE**, por sempre me presentear com sua atenção integral e preocupação para que nada faltasse a mim. Por me dar apoio e me levantar em momentos, nos quais, necessitava de uma mão amiga.

À meus **AVÓS**, pois sem vocês, o primeiro passo não teria sido dado.

À minhas **TIAS, TIOS e PRIMOS** por se fazerem sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por ter me permitido chegar até aqui, iluminando-me com a luz do espírito santo, me dando a força necessária para não deixar que nada me faltasse. Por colocar pensamentos formadores de opiniões

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Sob direção da **Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato** e ao seu Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral, sob coordenação da **Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina**, pela oportunidade de concluir meu curso de mestrado.

Ao meu orientador

Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani, pelo apoio e por sempre ter acreditado em mim. Agradeço por mostrar-me a pesquisa como algo instigador de pensamentos, onde a busca por respostas torna-se algo incrível e agradável de ser realizado. Muito obrigado.

Aos meus pais José Martins e Portela Mesquita

Por sempre procurarem a compreensão em todas as decisões que tive que realizar. Nos momentos escuros, proporcionarem-me caminhos de luz e de força. Sem vocês eu não seria a pessoa que estou conseguindo me tornar. À vocês agradeço e dedico minha formação profissional e pessoal. Muito obrigado. Amo vocês!

Ao meu irmão Rafael Portela

Pelo apoio proporcionado a mim. Por acreditar em meu potencial. Pelas palavras de incentivo ditas com a força necessária, para eu acreditar que poderia realizar a pós-graduação.

Aos professores da pós-graduação

Por sempre me estimularem nesse universo da pesquisa e mostrar o caminho adequado a ser seguido. Pelas correções e lapidações necessárias e por acreditarem em meu desenvolvimento durante suas disciplinas.

À Camila Cristina de Foggi

Pessoa de um coração enorme e que sempre me acolheu na pesquisa como a um filho. Me ensinou, treinou, corrigiu e guiou da forma mais carinhosa e direta possível. Lutou pela obtenção de resultados satisfatórios para o desenvolvimento desta pesquisa e pela interpretação ou realização de experimentos mais complexos. Minha mãe da pós-graduação. Ter convivido com você nesses dois anos do curso de mestrado foi uma benção. Você foi uma pessoa que marcou no desenvolvimento da minha vida acadêmica e serei eternamente grato. Obrigado hoje e sempre.

À Bruna Natália Alves da Silva Pimentel e Maria Isabel Amaya

Por me ajudarem no laboratório de microbiologia e célula. Por sempre me corrigirem nos momentos adequados (principalmente nos cálculos), ouvirem minhas dúvidas, lamentações, mas também por todos os risos e momentos compartilhados. Obrigado pela força, meninas.

Ao Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF) e Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC)

Na pessoa do **Professor Dr. Elson Longo**, por disponibilizar os microcristais de fosfato de prata e os laboratórios para o pleno desenvolvimento desta pesquisa. Em especial, gostaria de agradecer ao **Marcelo de Assis** por sempre se mostrar disponível em qualquer dúvida que surgisse ou análise necessária.

Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP)

Pela pessoa do **Dr. Sebastião Pratavieira**, pelas imagens da análise de Microscopia Confocal a Laser.

À Seção de Pós-Graduação

Representada por **José Alexandre Garcia** e **Cristiano Lamounier**, pela ajuda e atenção. Vocês tornam essa caminhada mais confiante a cada passo.

Aos amigos

Em especial **Rita de Cássia, Tarcizio Brito, Guilherme Braido, Jéssica Katarine, Aryvelto Miranda, Marisa Coragem, Amanda Lima, Carmélia Lobo, José Francisco (Zé), Fernanda Alves, Beatriz Panariello, Juliana Cabrini, Kássia Dias, Gabriela Alonso, Jeffersson Gutierrez, Jéssica Bernegossi, Elkin Florez, Midian Clara, Yuliana Vega, Thais Soares e Sabrina**. Por tornarem meus dias mais alegres, leves, proporcionando a força necessária nesta caminhada. Obrigado por todo o apoio antes, durante e na finalização do curso de mestrado. Os sorrisos e as histórias não teriam a mesma graça se não fosse pelo toque especial de cada um de vocês. Amigos de vida e de alma. Levarei vocês para sempre comigo. Obrigado!

À Paula Aboud Barbugli

Pelo apoio e imagens da análise de microscopia confocal e eletrônica de varredura.

Às bolsistas de Apoio Técnico

Bruna Novelli, Geisiane Bueno, Luana Sales e Lígia Sabino pela ajuda disponibilizada no desenvolvimento da pesquisa. Pelo treinamento no laboratório, as dicas e por serem pessoas de grande coração.

Aos Funcionários

Obrigado a estes que permitiram o pleno desenvolvimento de nossas atividades e tornavam nossas vidas e aprendizado mais especial.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para execução deste trabalho. Muito obrigado!

Oliveira LP. Síntese, caracterização de fosfato de prata (Ag_3PO_4) e sua ação contra *Candida albicans* associado com luz LED [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Há diversas possibilidades para o controle microbiano, dentre elas, o uso de microcristais associados à prata (Ag), e a inativação fotodinâmica antimicrobiana (do inglês, aPDI). Devido à capacidade de fotoexcitação no comprimento de onda de luz azul, fosfato de prata (Ag_3PO_4) foi submetido à exposição a luz em 455nm. Este trabalho teve como objetivo sintetizar, caracterizar e verificar a capacidade fotocatalítica e antimicrobiana dos microcristais de Ag_3PO_4 , utilizando culturas de *C. albicans* em suspensão e biofilme, na presença e ausência de luz. Os microcristais foram sintetizados pelo método da co-precipitação, e foram determinados o “gap” de energia e o espectro de absorção do material através de análise de espectro de UV-VIS. Para caracterizar Ag_3PO_4 , realizou-se a difração de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC) e atividade fotocatalítica (degradação de rodamina) após 4 exposições à luz. Para os ensaios microbiológicos (UFC/mL), determinou-se a concentração fungicida mínima (CFM) em suspensão e biofilme, na ausência e presença de luz (55,8 J/cm²). Para análise dos resultados, aplicou-se o teste de análise de variância de dois fatores, com teste posterior de Tukey. Os resultados demonstraram que o espectro de absorção abrange a faixa azul do comprimento de onda, apesar do maior sinal estar localizado na região de luz UV. Nos espectros de DRX observou-se a produção de prata cúbica e hexagonal no decorrer das exposições, juntamente com o aumento de material amorfo. Nas imagens de MEV-EC foi observado o tamanho dos microcristais (0,12 μm), os quais apresentaram morfologia arredondada, irregular e com natureza aglomerada, degradando-se após cada exposição à luz. Observou-se um aumento na atividade fotocatalítica de Ag_3PO_4 , com aumento de velocidade na degradação do corante rodamina a cada novo ciclo. Nos testes microbiológicos em suspensão, as CFMs foram observadas (2000 e 250 $\mu\text{g/mL}$) assim como em biofilme (4000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$), na ausência e presença de luz, respectivamente. As imagens de MEV corroboraram com os dados de UFC/mL, no qual o microrganismo apresenta uma redução em seu crescimento ou deformação em sua morfologia quando comparada à sua forma arredondada padrão. Além disso, nas imagens de microscopia confocal à laser a quantidade de células mortas torna-se mais intensa à medida que as concentrações se aproximam da inibitória. Desta forma, através da síntese pelo método da co-precipitação, o microcristal de Ag_3PO_4 apresentou excelente atividade fotocatalítica em comprimento de onda de 455 nm, com potencialização da atividade antifúngica na presença de luz na faixa azul.

Palavras chave: Biofilmes. Fototerapia. *Candida albicans*. Antifúngicos.

Oliveira LP. Synthesis, characterization of silver phosphate (Ag_3PO_4) and its action against *Candida albicans* associated with LED light [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

There are several possibilities for microbial control, among them the use of microcrystals associated with silver (Ag), and antimicrobial photodynamic inactivation (aPDI). Due to the ability of photoexcitation in the blue light wavelength, silver phosphate (Ag_3PO_4) was subjected to light exposure at 455nm. Thus, the aim was to synthesize, characterize and verify the photocatalytic and antimicrobial capacity of Ag_3PO_4 microcrystals using cultures of *C. albicans* in planktonic and biofilm form, in the presence and absence of light. Microcrystals were synthesized by the co-precipitation method, the energy band gap and the absorption spectrum of the material were determined by UV-VIS spectrum analysis. To characterize Ag_3PO_4 , X-ray diffraction (XRD), field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) and photocatalytic activity (rhodamine degradation) were performed after 4 exposures to light. For the microbiological tests (CFU/mL), the minimum fungicidal concentration (MFC) in planktonic and biofilm was determined, in the absence and presence of light (55.8 J/cm^2). To analyze the results, a two-way analysis of variance (ANOVA) was applied, followed by Tukey post-test. The results showed the absorption spectrum covers the blue wavelength range, although the largest peak is located in the UV light region. The XRD spectra produced cubic and hexagonal silver during the exposures, with an increase of amorphous material. The microcrystal size was observed ($0.12 \mu\text{m}$) by FE-SEM images, with rounded and irregular morphology and agglomerated nature, degrading after each exposure to light. Besides, it was observed a gain in the photocatalytic activity of Ag_3PO_4 , with an increasing rate of degradation on rhodamine dye at each new cycle. The MFCs were observed in the planktonic microbiological tests (2000 and $250 \mu\text{g/mL}$) as well as in biofilm (4000 and $2000 \mu\text{g/mL}$), in the absence and presence of light, respectively. FE-SEM images corroborated with CFU/mL data, showing a reduction on microorganism growth or deformation in its morphology when compared to its standard rounded form. Moreover, the number of dead cells in the confocal laser microscopy images becomes more intense with the approach of inhibitory concentration. Thus, through the co-precipitation method, the microcrystal of Ag_3PO_4 showed excellent photocatalytic activity at a 455nm wavelength, with potentiation of antifungal activity in the presence of light over blue band.

Keywords: Biofilms. Phototherapy. *Candida albicans*. Antifungal agents.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	PROPOSIÇÃO	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	<i>Candida spp</i>	15
3.2	Prata e Microcristais Associados à Prata.....	17
3.3	Terapia Fotodinâmica e Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana..	20
4	MATERIAL E MÉTODO.....	23
4.1	Materiais de Consumo	23
4.2	Instrumentos	24
4.3	Equipamentos	25
4.4	Métodos	28
4.4.1	Síntese dos microcristais de fosfato de prata (Ag_3PO_4).....	28
4.4.2	Espectro UV-VIS, caracterização e morfologia dos microcristais de fosfato de prata	29
4.4.2.1	<i>Espectro de absorção</i>	29
4.4.2.2	<i>Espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível (Egap)</i> .	30
4.4.2.3	<i>Difração de raios-X</i>	30
4.4.2.4	<i>Estudo da atividade fotocatalítica do fosfato de prata (Reciclagem)</i>	31
4.4.2.5	<i>Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-EC) e tamanho do microcristal de fosfato de prata</i>	34
4.4.3	Testes microbiológicos	35
4.4.3.1	<i>Análise microbiológica em suspensão</i>	36
4.4.3.1.1	Microrganismos e condições de cultivo.....	36
4.4.3.1.2	Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos microcristais de Ag_3PO_4 sem exposição à luz	37
4.4.3.1.3	Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos microcristais de Ag_3PO_4 com exposição à luz	38
4.4.3.2	<i>Análise microbiológica de biofilme em formação</i>	39

4.4.3.2.1	Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos microcristais de Ag_3PO_4 sem exposição à luz.....	40
4.4.3.2.2	Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos microcristais de Ag_3PO_4 com exposição à luz	41
4.4.3.3	<i>Análise por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo e confocal a laser</i>	41
4.4.3.3.1	Análise dos biofilmes de <i>C. albicans</i> através da microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC)	41
4.4.3.3.2	Análise dos biofilmes de <i>C. albicans</i> através de microscopia eletrônica confocal a laser	42
4.5	Análise Estatística.....	43
5	RESULTADOS	44
5.1	Espectro de Absorção	44
5.2	Espectroscopia de Reflectância no UV-VIS.....	44
5.3	Difração de Raios-X, Morfologia dos Microcristais e Fotocatálise ..	45
5.4	Análises Microbiológicas	51
5.4.1	Concentração fungicida mínima (CFM) e análises microscópicas ..	51
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	APÊNDICE A – IMAGENS DE MEV-EC AMPLIADAS	76

1 INTRODUÇÃO

A estomatite protética afeta grande parte dos usuários de prótese removível. Sua etiologia é multifatorial, incluindo fatores demográficos (maior prevalência no gênero feminino, fumantes e portadores de doenças que comprometam o sistema imunológico) e uso da prótese (mal adaptação, aumento do tempo de uso, higiene deficiente, material rugoso na confecção da prótese e colonização microbiana na superfície da prótese, principalmente por *Candida* spp)¹.

Apesar de várias espécies de *Candida* serem encontradas na cavidade oral, destaca-se a presença de *Candida albicans* (*C. albicans*)^{2,3}. *C. albicans* vive em harmonia com outros microrganismos na cavidade oral, porém, fatores locais (má higienização da prótese ou problemas na adaptação) ou sistêmicos (vírus do HIV, câncer, má nutrição, diabetes, quimioterapia ou radioterapia) podem alterar este equilíbrio^{4,5}. Além disso, Pereira et al.⁶ demonstrou uma possível associação entre a presença de *Candida* spp. e bactérias em estomatite protética, sugerindo que esses microrganismos desempenham um papel importante no desenvolvimento e persistência dessa doença.

Atualmente são utilizadas estratégias de tratamento com agentes antifúngicos, dando destaque para miconazol⁷, nistatina e fluconazol, porém, com recorrência frequente⁸. Além disso, há uma procura por fármacos mais efetivos e que sejam menos tóxicos⁹.

Dentre as possibilidades exploradas para o controle microbiano, a utilização de microcristais associados à prata (Ag) tem sido bastante pesquisada, não somente devido à sua atividade contra bactérias, fungos e vírus, mas também à baixa propensão de induzir resistência microbiana^{10,11}. Vários compostos têm sido associados à Ag objetivando menor concentração desta. Dentre eles, destaca-se o molibdênio, formando o molibdato de prata (Ag_2MoO_4)¹², o tungstênio, formando o tungstato de prata (Ag_2WO_4)^{13,14} e o fósforo, formando o fosfato de prata (Ag_3PO_4)¹⁵.

Fosfato de prata apresenta diversas aplicabilidades tecnológicas por possuir excelentes propriedades fotoluminescentes, fotocatalíticas, atividade bacteriostática e biocompatibilidade¹⁶⁻¹⁸, sendo esta última uma importante característica para utilização do material na área biomédica. A atividade antibacteriana do Ag_3PO_4 foi constatada com os microrganismos *Escherichia coli* (*E. coli*) em solução^{17,19} e *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) por ensaio de difusão em disco²⁰.

O estudo de Jiang et al.²¹ demonstrou a capacidade antibacteriana e biocompatibilidade de fosfato de prata, no entanto, mais evidências ainda são necessárias para elucidar o mecanismo antifúngico do material contra *C. albicans*.

É conhecido que fosfato de prata apresentam capacidade de fotodegradação quando expostos à espectros de luz²², sendo uma vantagem a sua utilização quando comparado aos fotossensibilizadores orgânicos, principalmente por possuírem maior estabilidade em diferentes condições biológicas, como: pH, força iônica e pressão.²³⁻²⁵.

Há pesquisas envolvendo o uso da terapia fotodinâmica (do inglês, PDT), a qual utiliza um fotossensibilizador que, ao absorver luz incidida em comprimento de onda específico e na presença de oxigênio, gera oxigênio singleto e radicais livres, atuando na eliminação dos microrganismos²⁶. A PDT já é utilizada para tratamentos em câncer²⁷, e seu uso na odontologia abrange áreas como endodontia e periodontia, além de tratamento alternativo à estomatite protética^{26,28,29}, que visam a inativação fotodinâmica antimicrobiana (do inglês aPDI)³⁰. Há estudos que utilizam tanto a luz azul (espectro de luz seguro) quanto a vermelha^{31,32}, a depender do sinal de absorção do composto utilizado.

Apesar dos recursos terapêuticos utilizados para o tratamento da estomatite protética, sua recorrência ainda é constante. Visando a eliminação dos microrganismos presentes em sua etiologia, principalmente *C. albicans*, a aPDI apresenta-se como um possível tratamento alternativo. Porém, ainda não há na literatura uma associação entre a utilização de luz e microcristais de fosfato de prata para eliminação de *C. albicans*. O objetivo da exposição dos microcristais de Ag_3PO_4 à luz se deve à sua fotoexcitação, pretendendo obter melhores resultados através da eliminação de uma maior quantidade de microrganismos devido à liberação de espécies reativas pela partícula. Assim, um estudo in vitro é necessário para definição dos parâmetros adequados para inativação fúngica.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades dos microcristais de fosfato de prata e sua atividade antifúngica na presença e ausência de luz.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar, caracterizar e verificar a capacidade fotocatalítica dos microcristais de fosfato de prata após quatro exposições à luz azul.
- Avaliar efeito antifúngico contra culturas em suspensão e biofilmes em formação de *C. albicans*.
- Comparar o efeito antifúngico na presença e ausência de luz.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Candida* spp.

Atingindo bilhões de pessoas a cada ano, as infecções por fungo acumulam relatos da existência de mais de 600 tipos distintos, variando entre infecções na mucosa, pele, cabelo e unhas³³. Entre os fungos causadores dessas infecções, os fungos do gênero *Candida* spp. se destacam por possuírem uma relação comensalista na boca, pele e trato gastrointestinal. Porém, pode acontecer uma transição de seu estado de normalidade para uma infecção local, ou até sistêmica, podendo evoluir para infecção sanguínea conhecida como candidemia³⁴. Sua causa mais comum ocorre pela presença de *Candida* spp, com incidência crescente em países europeus e nos Estados Unidos³⁵⁻³⁷, e altas taxas de mortalidade (45-50%)³⁸.

A espécie de *Candida* mais frequentemente encontrada em pacientes com candidíase é *C. albicans*. Outras espécies (*C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) também causam infecções, no entanto, sua incidência varia de acordo com a região geográfica³⁹. Nos Estados Unidos, por exemplo, há uma maior presença de *C. glabrata*⁴⁰⁻⁴², na Ásia e América do Sul, de *C. tropicalis*⁴³, e na América do Sul, de *C. parapsilosis*^{44,45}. Infecções por *Candida* podem afetar indivíduos de diferentes idades. Em crianças, sua presença pode estar relacionada a reações alternativas ao uso de (1) antibióticos ou esteroides a longo prazo, (2) baixo peso ao nascer ou até mesmo uma (3) conduta prolongada em ambiente de terapia intensiva (UTI)⁴⁶.

Há evidências que sugerem uma associação entre bactérias e *Candida* spp., como por exemplo, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e especialmente *C. albicans*⁶. Estas estão presentes no desenvolvimento da estomatite protética na cavidade oral de pacientes usuários de prótese removível. Dentre as possíveis causas, estão a higiene deficiente, uso contínuo da prótese ou prótese mal adaptada⁴⁷.

Como revisado por Lim et al.⁴⁸, *C. albicans* é um fungo polimórfico, que pode existir tanto na forma filamentosa de hifa e pseudohifa, como de levedura, a depender do ambiente no qual está exposto. Além disso, pode variar entre fungo comensal e patogênico, dependendo dos fatores locais (uso de prótese, corticoides

e xerostomia) ou sistêmicos (vírus do HIV, leucemia, má nutrição, diabetes, quimioterapia ou radioterapia), resultando no desenvolvimento de candidíase oral⁵.

A capacidade de aderência proporcionada pelas adesinas é essencial para o microrganismo patogênico (forma de defesa do microrganismo)⁴⁹⁻⁵². Devido as adesinas estarem presentes na camada externa da parede celular, elas iniciam adesão das células planctônicas em uma superfície, sendo esta biótica ou abiótica, para formação do biofilme⁵³. Além disso, o biofilme é composto por estruturas com morfologia complexa, diferentes tipos celulares e uma matriz extracelular⁵².

Devido a sua capacidade de formação de biofilmes, *C. albicans* vem sendo frequentemente estudada^{52,54,55}. Biofilme de *C. albicans* possui sua arquitetura composta por: (1) levedura (blastóporo), (2) pseudo-hifas (forma fúngica entre blastóporos e hifas, no qual uma célula é ligada à outra, tendo um septo permanecendo entre as duas) e (3) hifas (alongada com paredes paralelas que se desenvolvem de um blastóporo)^{53,56}, tendo seu maior traço de virulência decorrente da transição da forma de levedura (planctônica) para filamentar (células alongadas)^{49,56}. Após a formação de biofilme de *C. albicans*, o próximo estágio é a invasão celular, que normalmente ocorre de duas formas: (1) endocitose induzida pela célula epitelial, a qual está mais relacionada com invasões orais, e (2) penetração ativa por hifas, sendo ambos essenciais para o dano celular. Estes mecanismos de invasão dependem da morfologia e, parcialmente, de atividades fúngicas, tais como as proteases aspárticas segregadas, responsáveis pela digestão da superfície das células epiteliais⁵⁹⁻⁶¹.

Desta forma, devido à elaborada e complexa arquitetura do biofilme, como descrito acima, torna-se difícil a sua eliminação em consequência da alta resistência tanto contra fármacos antifúngicos, quanto para resposta imunológica do hospedeiro, principalmente devido a sua capacidade de transição entre a forma de leveduras e hifas e à formação de uma matriz extracelular^{62,63,48}, composta por carboidrato, proteínas, hexosamine, ácidos fosfórico e urônico⁶⁴. Além disso, a quantidade de células fúngicas, tempo de aderência, presença de saliva, incubação e exposição a carboidratos podem influenciar no desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans*, tornando-os mais resistentes a uma grande quantidade de agentes antifúngicos quando comparado à células em suspensão (planctônicas)⁶².

Portanto, as vantagens de um microrganismo formar biofilme se deve à proteção ao ambiente no qual está exposto, além de uma resistência a remoções

químicas e físicas, para que assim no estágio final de formação, ocorra a liberação de células para colonização e disseminação da infecção em outros locais⁵².

3.2 Prata e Microcristais Associados à Prata

A prata é uma das formas de metal pesado mais tóxicas presente no meio ambiente, além do mercúrio⁶⁵, no entanto é conhecida por exibir potencial antimicrobiano contra diferentes patógenos^{66,67}. O nitrato de prata, por exemplo, já foi utilizado de maneira tópica no século XIX para fins terapêuticos em ulcerações e feridas, e na confecção de fios de sutura⁶⁸. Seu mecanismo de ação consiste na desorganização de estruturas presentes na membrana celular bacteriana, levando à lise celular, podendo assim interagir com o DNA, interrompendo a síntese proteica⁶⁹.

Em estado metálico a prata é inerte, mas, ao entrar em contato com um ambiente aquoso, torna-se ionizada e pode atingir diferentes estruturas da parede celular bacteriana, sendo altamente reativa quando unida a proteínas dos tecidos⁶⁹. Há dois principais mecanismos de ação da prata utilizada para eliminação de células bacterianas: (1) através da união de íons prata a grupos tiol em enzimas, desativando-as ou (2) através da ruptura da membrana/parede celular⁷⁰.

No entanto, a prata não pode ser administrada na forma livre, devido a sua taxa de absorção no corpo humano, em torno de 18%⁷¹. Argiria, por exemplo, é uma das consequências da não excreção de prata devido a sua absorção através de mucosas ou feridas de queimaduras, no qual, a pele adquire uma coloração azulada ou acinzentada, tendo a prata depositada na pele, rim, fígado, córnea e tecidos musculares, acumulando-se no corpo^{68,72}. Uma melhor administração da prata, como agente farmacológico, ainda é desconhecida.

A possibilidade de trazer desenvolvimento tecnológico utilizando prata, para a odontologia (prótese, adesivos e implantes), ocorre através do desenvolvimento de compostos antimicrobianos^{73,74}, utilizando prata tanto na forma nanoestruturadas⁶⁹ quanto microestruturadas^{12,75,76}. Implantes dentários e *abutments*, por exemplo, quando recobertos por nanopartículas de prata, têm mostrado efeito antimicrobiano sem causar citotoxicidade ao periodonto⁶⁹. A atividade antimicrobiana se tornou evidente para fungos, através do uso de nanopartículas de prata e microcristais^{77,78}, porém, como apresentam morfologias e tamanhos diferentes, também apresentam mecanismos de ação distintos.

Em nanopartículas ocorre desintegração da membrana celular, criando caminhos através da membrana, os quais formam orifícios que desestabilizam a célula, levando-a à morte⁷⁹. Longo et al.¹³, através de dados experimentais e teóricos, descreveram o mecanismo de ação que envolve os microcristais contendo prata (neste caso, Ag_2WO_4), através do processo de transferência de elétrons: uma partícula, sendo esta um semicondutor, possui bandas de energia (valência e condução), as quais estão energeticamente bem posicionadas (menos energética e mais energética, respectivamente). A prata funciona como um gerador de elétrons entre as bandas, favorecendo a troca de energia: o elétron vai da banda de valência (BV) para a de condução (BC). Essa troca de elétrons entre as bandas, deixa um buraco no local menos energético (BV), o qual interage com a água (H_2O) presente no meio ambiente. O oxigênio (O_2), também presente no ambiente, interage com o elétron, quando o mesmo retorna da banda mais energética (BC) para a menos energética (BV). Essas interações são responsáveis por gerar radicais hidroxila (OH^\cdot) e hidroperoxila (HO_2^\cdot), os quais vão ao alcance de polissacarídeos da parede celular, lipídios e proteínas da membrana, cuja integridade é fator importante para a sobrevivência celular.

Eswar et al.⁸⁰ demonstraram que a atividade bactericida do fosfato de prata, deve-se aos íons de prata lançados pelo Ag_3PO_4 . Além disso, Oliveira et al.⁶⁶ demonstraram, em vanadato de prata (AgVO_3), que a morfologia do microcristal também interfere em sua capacidade antimicrobiana: quanto menor a energia de superfície, maior sua atividade contra o microrganismo *S. aureus* resistente à metilina (SARM).

Com relação à sua biocompatibilidade, há um caso raro relacionado à presença de alergia em pessoas ao entrarem em contato com a prata⁸¹. No entanto, estudos in vitro abordaram melhor a citotoxicidade relacionada à prata. Castro et al.⁸² avaliaram a liberação de íons e a citotoxicidade de resinas acrílicas incorporadas com AgVO_3 decorado com nanopartículas de prata. Eles observaram que resinas com concentração elevada de AgVO_3 apresentaram citotoxicidade, indicando o uso de baixas concentrações para evitar riscos aos pacientes.

Chávez⁷⁷ e Pimentel⁷⁸ avaliaram a citotoxicidade de microcristais de tungstato e molibdato de prata e microcristais de vanadato de prata sintetizados em três temperaturas distintas (10, 20 e 30°C), em fibroblastos gengivais humanos (FGH) e queratinócitos orais normais espontaneamente imortalizados (NOK-si),

respectivamente. Chávez⁷⁷ testou concentrações inibitórias mínimas previamente determinadas contra *C. albicans*, e Pimentel⁷⁸, concentrações determinadas contra SARM. Chávez⁷⁷ realizou ensaio de Alamar Blue (para verificar a viabilidade celular) e modelo de reparação tecidual (para investigar o efeito dos microcristais na cicatrização tecidual). Tanto tungstato como molibdato de prata não interferiram na viabilidade celular, porém, tungstato de prata interferiu na viabilidade dos fibroblastos gengivais, mostrando ausência de contração no modelo de reparação tecidual⁷⁷. Pimentel⁷⁸ avaliou as três sínteses de vanadato de prata através do ensaio de viabilidade celular, concluindo que, apesar das diferentes sínteses testadas, todas mantiveram a viabilidade celular⁷⁸.

Além disso, há uma preocupação relacionada à resistência que a prata pode causar em bactérias, devido ao seu uso no decorrer da história⁷². Um exemplo dessa resistência se observa na bactéria *E. coli*, a qual apresenta uma alteração em sua membrana celular, fazendo com que tenha um efluxo contínuo de íons de prata⁶⁵.

No caso específico do microcristal de Ag_3PO_4 , não há relatos sobre qualquer tipo de resistência. Além disso, o mesmo se destaca por sua atividade bacteriostática e excelente fotoexcitação perante a luz UV^{16-18,83}, apresentando rendimentos quânticos maiores que todos os fotocatalisadores de oxidação comumente conhecidos, como dióxido de titânio (TiO_2), vanadato de bismuto (BiVO_4) e trióxido de tungstênio (WO_3)⁸⁴. Wang et al.⁸⁵ afirmam que a depender da síntese do composto, sua morfologia pode ser alterada, afetando sua capacidade fotocatalítica. Apesar disso, a utilização de luz UV não é adequada para utilização na área biomédica, pois leva a uma variedade de doenças cutâneas, incluindo inflamação, envelhecimento degenerativo e câncer⁸⁶. Porém, há estudo mostrando uma maior emissão fotoluminescente de fosfato de prata na faixa azul do espectro de luz visível, o qual além de ser utilizado na odontologia é o espectro mais próximo ao de luz UV^{87,15}.

Além disso, algo que precisa ser levado em consideração é a capacidade de reutilização do microcristal ao ser incidido por luz em comprimento de onda específico^{88,89}. Em estudo realizado por Wang et al.⁸⁹, foi realizado o teste de reciclagem por três ciclos, utilizando o microcristal de fosfato de prata acoplado a nanotubos de carbono e em sua forma pura, reforçando sua capacidade para usos sucessivos.

Fosfato de prata possui diversas aplicabilidades (fabricação de sensores de gás⁹⁰, sensor fotocatalítico utilizando a luz solar⁹¹, na degradação de poluentes orgânicos²² e como conversor de CO₂ em combustível⁹²). Com relação à sua capacidade antimicrobiana, Wu et al.²⁰ conseguiram eliminar os microrganismos *E. coli* e *B. subtilis* em seus estudos utilizando o microcristal de fosfato de prata. Piccirillo et al.⁹³ avaliaram sua capacidade antibacteriana contra SARM, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) utilizando irradiação com luz branca e UV, confirmando seu potencial antibacteriano. Embora alguns estudos tenham avaliado a capacidade antimicrobiana de microcristais de Ag₃PO₄, mais evidências ainda são necessárias para elucidar o efeito antifúngico do material contra *C. albicans*.

3.3 Terapia Fotodinâmica e Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana

A PDT foi primeiramente mencionada no século XX, segundo Ribeiro⁹⁴, por Herman Von Tappeiner, orientador de Oscar Raab, cujo trabalho de doutorado observou que a união de luz com o corante acridina eliminava o microrganismo *paramecium*, ou seja, era uma reação dependente do oxigênio após a fotossensibilização: na ausência de oxigênio, corante e luz não ocasionavam em morte celular, porém, havia uma reação dependente entre ambos. Assim, pôde-se definir PDT como uma combinação entre fotossensibilizador, luz e oxigênio^{95,96}. O fotossensibilizador, ao absorver a luz incidida em comprimento de onda específico na presença de oxigênio, gera espécies reativas de oxigênio (EROs)⁹⁷ e radicais livres citotóxicos para os microrganismos²⁶.

A geração de EROs torna-se possível através de duas vias: tipo I e tipo II. O fotossensibilizador, ao ser excitado pela luz em comprimento de onda adequado, entra em estado tripleto (estado fundamental) de longa duração. Neste estado, o fotossensibilizador pode interagir com o oxigênio por transferência de energia (Tipo II), levando à produção de oxigênio singleto, ou por transferência de elétrons (Tipo I), gerando superóxidos⁹⁷.

No decorrer dos anos, muitos fotossensibilizadores foram usados, tendo como escolha aqueles que possam ter seu uso em pequena quantidade, baixa fluência de luz e não tóxico⁹⁸. O agente mais estudado é a hematoporfirina. Uma de suas limitações é a via de administração intravenosa, o que proporciona eliminação lenta, resultando em citotoxicidade prolongada. Kennedy et al.⁹⁹, divulgaram o uso

cloridrato do ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e luz visível para tratamento tópico da pele. 5-ALA foi uma revolução, pois penetrava facilmente em áreas danificadas ou anormais e rapidamente era eliminado, além de apresentar baixo peso molecular, o que lhe permite uma melhor penetração na célula.

Estudos com terapia fotodinâmica devem sempre considerar a dose (Joules por centímetro quadrado – J/cm²) e sua irradiação (miliwatts por centímetro quadrado – mW/cm²) utilizada na PDT⁹⁵. Além disso, o tempo de pré-irradiação (TPI), que corresponde ao tempo de aplicação do fotossensibilizador até sua ativação pela luz, também é algo que deve ser levado em consideração para que ocorra uma adsorção do fotossensibilizador na célula alvo antes da irradiação por luz. Esse tempo se torna necessário para que o fotossensibilizador seja absorvido pela célula a qual se pretende eliminar⁹⁸.

Assim é importante quantificar a quantidade de energia que a luz irá transferir ao fotossensibilizador, para que ocorra a reação e eliminação do microrganismo. Esta energia pode ser definida como a dose de luz que será utilizada, através da seguinte equação:

$$J/cm^2 = \frac{\text{Potência do aparelho (W) X Tempo (s)}}{\text{Área iluminada (cm}^2\text{)}}$$

Desta forma, a potência do aparelho (em Watts) é multiplicada pelo tempo (em segundos), tendo seu resultado expresso em Joules (J), dividindo-o pela área iluminada (cm²).

Um incômodo relatado no tratamento envolvendo a PDT sistêmica é a dor, sendo descrita como uma sensação de queimadura e picos de dor durante os primeiros minutos. Uma possível explicação para este tipo de sensação seria o tipo de fotossensibilizador utilizado, local da lesão, tipo de lesão e quantidade de energia liberada durante o tratamento, para as terminações nervosas⁹⁵. Alguns métodos estão sendo utilizados para redução desta dor, como ar gelado, analgésico tópico, interrupção de tratamento, hipnose, inalação de analgésico⁹⁶ e anestésico injetado⁹⁵.

PDT já é utilizada para tratamentos em câncer²⁷, queratose actínica^{96,100} e contra microrganismos (aPDI)⁹⁷, o que a torna adequada para controle de disseminação de cepas bacterianas multi-resistentes, sendo estas uma das

ameaças mais preocupantes para a saúde pública devido ao uso excessivo de antibióticos¹⁰¹.

Seu uso na odontologia abrange áreas como endodontia⁹⁸ e periodontia, além de tratamento alternativo à estomatite protética^{26,28,29}. Há estudos que utilizam tanto a faixa de luz azul, um espectro mais próximo da luz ultra violeta mas relacionado com a produção de EROs intracelular¹⁰², quanto a faixa de luz vermelha, a qual possui uma maior penetração nos tecidos na terapia fotodinâmica²⁹.

Fukui et al.¹⁰³ utilizaram comprimento de onda entre 400 nm e 700 nm para determinar qual o mais efetivo para inativação de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). Os autores observaram que houve uma redução do grupo irradiado com luz, quando comparado ao controle (sem luz) em comprimento de onda entre 400 e 410. Soukos et al.¹⁰⁴ relataram que, no comprimento de onda entre 380 e 510 nm, pode-se inativar bactérias orais em meio de cultura. Além disso, Feuerstein et al.¹⁰⁵ testaram comprimento de onda entre 400-500 nm contra *P. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e *Streptococcus faecalis* (*S. faecalis*), concluindo que a luz azul causa um efeito fototóxico, principalmente em patógenos periodontais gram-negativos.

Desta forma, a inativação fotodinâmica antimicrobiana (aPDI) vem como um tratamento alternativo aos medicamentos comumente utilizados, tendo uma maior indicação para área odontológica⁹⁷. Suas principais vantagens são: (1) alta especificidade, (2) biocompatibilidade com células humanas saudáveis, (3) baixos efeitos colaterais e (4) improváveis chances de desenvolver resistência¹⁰⁶.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Materiais de Consumo

- Água destilada;
- Água mili-Q;
- Alça de inoculação 10 μ L, estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil);
- Cloreto de Potássio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Cloreto de Sódio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Cubeta de 2 mL (Cartel, SP, Brasil);
- Cultura de *C. albicans* (ATCC 90028 - *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA);
- Frasco coletor universal translúcido estéril 80mL (Cral, Cotia, SP, Brasil);
- Glicose (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Glutaraldeído (Glutaron, RioQuímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil);
- Hidrogenofosfato de di-amônio ($[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, Emsure ACS, Darmstadt, Alemanha);
- Kit fluorimétrico Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA);
- Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland, EUA);
- Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, MI, EUA);
- Meio de cultura celular DMEM de alta glicose (meio de Eagle modificado por Dulbecco; GIBCO, Grand Island, NY, EUA);
- Microtubos tipo Eppendorfs Graduado (Axygen, Curitiba, PR, Brasil);
- Nitrato de prata (Ag_2NO_3 , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Parafilme (Laboratory Film, Chicago, IL, EUA);
- Placa de 24 poços (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);

- 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);
- Ponteiros amarelos para micropipeta 20-200 μL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- Ponteiros azuis para micropipeta 100-1000 μL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- Ponteiros brancos para micropipeta 10 μL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- Ponteiros para micropipeta 10 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- Ponteiros para micropipeta 5 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- Rhodamine B Sigma – Aldrich – (Merck – Darmstadt, Alemanha);
- Sistema de filtração a vácuo estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
- Solução tampão phosphate buffered saline (PBS – 4g NaCl, 0,12g KH_2PO_4 , 0,1g KCl e 0,72g Na_2HPO_4 / 500mL);
- Tubos tipo Falcon de 15 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
- Tubos tipo Falcon de 50 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).

4.2 Instrumentos

- Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
- Bico de Bunsen (J.Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);
- Micropipeta de 0,1-10 μL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
- Micropipeta de 100-1000 μL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
- Micropipeta de 1-10 mL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);

- Micropipeta de 1-5 mL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
- Micropipeta de 20-200 μ L (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
- Micropipeta Multicanal Discovery Comfort, 12 Canais, 20-200 μ L (HTL, Warsaw, Polônia);
- Pinça clínica (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Pipetador automático Easypet 3 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha);
- Proveta graduada (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).

4.3 Equipamentos

- Agitador de tubos Modelo: AP 56. Série: 9803 (PHOENIX - Araraquara, São Paulo, Brasil);
- Agitador magnético, MODELO TE-0851 (Tecnal – Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Aparelho de luz LED 455 nm, (LXHL-PR09, Luxeon1 III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, CA) desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos – USP São Carlos – Brasil;
- Autoclave Modelo Z-AB-19 (Phoenix Luferco, Araraquara, São Paulo, Brasil);
- Autoclave vertical Modelo: AV 60 No 6614 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil);
- Balança de precisão (GEHAKA –São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Balança de precisão Modelo: BG 400 No 016450 (Gehaka – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil);
- Bomba a vácuo (Fanen, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Câmara de fluxo laminar vertical, Modelo: PA 115. No. 12898 (Pachane Ind. e Com. Ltda, Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Centrífuga de tubos Falcon Modelo 80-2B 15 mL (Centerbio, Estados Unidos da América);
- Centrífuga de tubos Falcon Modelo: 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha);
- Centrífuga de microtubos modelo MiniSpin (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha);

- Contador de colônias CP 600 PLUS, Modelo: CP-600 (Phoenix - Araraquara, São Paulo, Brasil);
- Denton Vacuum modelo Desk V Standard (Moorestown, New Jersey, Estados Unidos da América);
- Difratorômetro Rigaku modelo DMax 2500PC (Tokio, Japão);
- Espectrofotômetro – Biospectro Modelo: SP-220 (Equipar Ltda, Curitiba, Paraná, Brasil);
- Espectrofotômetro de UV-VIS modelo V-660, JASCO (Jasco do Brasil, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Espectrômetro iHR550 (Horiba Jobin Yvon, Japão);
- Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Estufa para secagem e esterilização (MARCONI - Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Fluoroskan Ascent FL (ThermoScientific; Waltham, MA, Estados Unidos da América);
- Freezer -80°C (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos da América);
- Incubadora Modelo Forma Series II Water Jacket CO₂ incubator (ThermoScientific, Waltham, MA, Estados Unidos da América);
- Laser de íon de argônio (Melles Griot, Estados UnidosEstados Unidos da América);
- Lavadora ultrassônica digital, modelo CD-4820 (Kondortech, São Carlos, São Paulo, Brasil);
- Lavadora ultrassônica, modelo 1510 Branson (Danbury, Connecticut, Estados Unidos da América);
- Microscópio de bancada invertido (Optiphas, Van Nuys, Califórnia, Estados Unidos da América);
- Microscópio eletrônico de varredura ZEISS, Modelo Supra 35 (Jena, Turíngia, Alemanha);
- Microscópio eletrônico de varredura ZEISS por emissão de campo, modelo SIGMA (Jena, Turíngia, Alemanha)
- Microscópio de fluorescência confocal Carl Zeiss LSM 800 (Software ZEN BLUE versão 2.3 - Carl Zeiss, Jena, Alemanha);
- Microscópio de Fluorescência Modelo DFC310 FX (Leica, Wetzlar, Alemanha);

- Microscópio eletrônico de varredura Modelo JSM-6610LV (JEOL, Akishima, Tóquio, Japão);
- UV/VIS 4802 Espectrofotômetro de duplo feixe (Dayton, Nova Jersey, Estados Unidos da América).

4.4 Métodos

4.4.1 Síntese dos microcristais de fosfato de prata (Ag_3PO_4)

Este projeto de pesquisa está inserido no Centro de Pesquisa para o Desenvolvimento de Materiais Funcionais, um dos CEPIDs (Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão) apoiados pela FAPESP, sob coordenação do Prof. Dr. Elson Longo, do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (LIEC – UFSCar), São Carlos, SP.

Métodos de síntese são utilizados para obtenção de microcristais associados à prata. Os microcristais de Ag_3PO_4 foram sintetizados pelo método de co-precipitação à temperatura ambiente. Este método foi escolhido por ser um procedimento de síntese simples, versátil¹⁰⁷ e de baixo custo¹⁰⁸. Para tanto, 3×10^{-3} mol de nitrato de prata (AgNO_3) e 1×10^{-3} mol de hidrogenofosfato de diamônio ($[\text{NH}_4]_2\text{HPO}_4$), foram utilizados como precursores iniciais. Os precursores foram pesados e dissolvidos separadamente, em dois béqueres contendo água destilada, sendo AgNO_3 dissolvido em 75 mL e $[\text{NH}_4]_2\text{HPO}_4$ em 25 mL. Após a completa dissolução dos precursores, as duas soluções foram misturadas sob agitação magnética, promovendo a precipitação instantânea dos microcristais de Ag_3PO_4 com uma haste em contato com o composto (verificação de temperatura). Transcorrido 10 minutos de agitação magnética constante, o precipitado resultante foi lavado várias vezes com água destilada e acetona, a fim de remover íons remanescentes. Em seguida o composto obtido foi centrifugado e seco em estufa a 60°C . Na Figura 1 pode-se observar o pó do fosfato de prata sintetizado para os testes que foram subsequentemente realizados.

Figura 1 - Fosfato de prata em pó



Pó de fosfato de prata sintetizado pelo método da co-precipitação.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.4.2 Espectro UV-VIS, caracterização e morfologia dos microcristais de fosfato de prata

Foram determinados o espectro de absorção e o “gap” de energia através de análise de espectro de UV-VIS. A caracterização estrutural e morfológica dos microcristais de Ag_3PO_4 foi realizada através da técnica de difração de raios-X (DRX), estudo da atividade fotocatalítica e microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-EC). Para a realização de análise em MEV-EC, foi necessário o preparo de amostra em pó: alíquotas foram dispersas em água por 5 minutos, e após este período, uma gota da solução foi adicionada em um substrato de silício, o qual foi colado com fita de carbono que permaneceu em um “stub” metálico. Foi feita uma marcação com tinta de carbono para estabelecer contato entre silício e stub.

4.4.2.1 Espectro de absorção

Para determinar o espectro de absorção de fosfato de prata, amostras foram adicionadas em solução de PBS, na concentração de $3,9 \mu\text{g/mL}$. Logo em seguida 1mL era adicionado em cubeta para leitura ($n=9$) em espectrofotômetro UV-VIS 4802 com comprimentos de onda entre 200 e 700 nm.

4.4.2.2 Espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível (E_{gap})

Para determinação do “gap” de energia foi utilizado um espectrômetro Varian Cary 5G, utilizando comprimento de onda na faixa de 200 a 800 nm, com velocidade de varredura de 600 nm/minuto, utilizando o método de Wood Tauc e a função de Kubelka-Munk^{109,110}. Ao emitir um feixe de luz, ocorre penetração ou difusão da radiação. Essa difusão que sai da amostra e retorna à superfície é chamada de reflectância difusa, sendo convertidos para função de Kubelka-Munk $[F(R_{\infty})]$ pela equação¹¹¹:

$$F(R_{\infty}) = \frac{(1-R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{K}{S},$$

Sendo “ R_{∞} ” a reflectância quando a amostra é infinitamente espessa, “ K ” o coeficiente de absorção molar e o “ S ” de espelhamento. Considerando $[F(R_{\infty})]$ proporcional ao coeficiente de absorção (α), o “gap” de energia (E_{gap}) e o α podem ser relacionados pela equação de Wood Tauc¹¹²:

$$\alpha hv = C_1(hv - E_{gap})^n,$$

Na qual, “ hv ” é a energia de um fóton, “ C_1 ” uma constante de proporcionalidade e “ n ” uma constante relacionada a transições eletrônicas. Segundo a literatura, fosfato de prata apresenta $n=2$, sendo possível determinar seu “gap” de energia quando plotar a equação $[F(R_{\infty})hv^{1/2}]$ contra “ hv ”¹¹¹.

4.4.2.3 Difração de raios-X

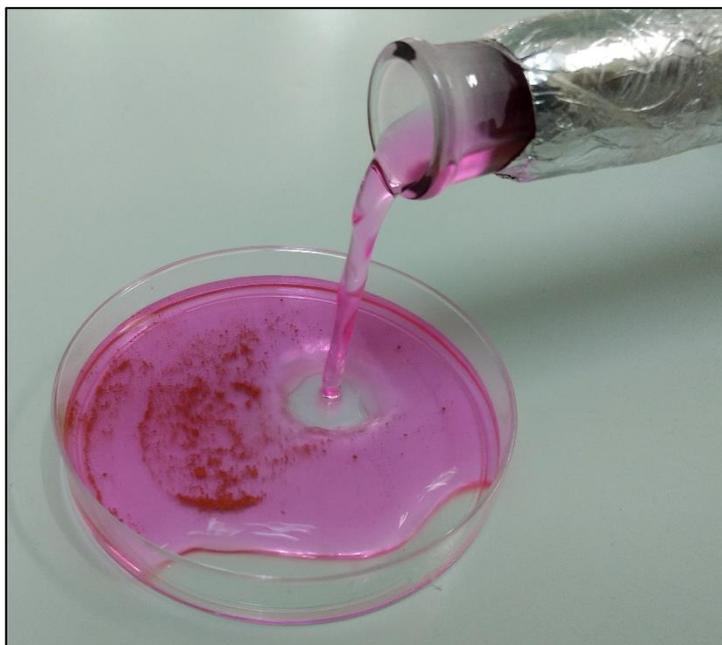
A análise de DRX proporciona informações a respeito das fases cristalográficas presentes na amostra. Dessa maneira, pode-se determinar o grau de organização estrutural a longa distância e cristalinidade do material, além da presença de fases deletérias. Essa técnica relaciona os ângulos de incidência do feixe de raios X com os espaçamentos interplanares, através da relação de Bragg^{113,114}. Microcristais foram adicionados no equipamento Rigaku, modelo DMax 2500PC (Japão), com varredura de 10 a 110° utilizando velocidade de varredura de

1°/minuto e passo angular de 0,02°, radiação CuK α ($\lambda = 1,5406\text{\AA}$). As análises de DRX foram realizadas após cada um dos quatro ciclos de utilização do microcristal.

4.4.2.4 Estudo da atividade fotocatalítica do fosfato de prata (Reciclagem)

A atividade fotocatalítica dos microcristais de Ag_3PO_4 foi testada na degradação de soluções aquosas de rodamina B sob irradiação visível¹⁵. Para tanto, 50 mg do pó de Ag_3PO_4 foi dispersado em 50 mL da solução de rodamina B 1×10^{-5} mol.L⁻¹ (Figura 2) durante 15 minutos em banho ultrassônico a 42 kHz.

Figura 2 - Fosfato de prata em contato com o corante rodamina



Dispersão do pó do fosfato de prata, sintetizado anteriormente, em contato com o corante rodamina para adsorção.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Em seguida, o sistema foi mantido sob agitação magnética com auxílio de uma barra magnética (peixinho, Figura 3) no escuro por um período de 30 minutos, de modo que fosse atingido o equilíbrio de adsorção-dessorção entre o corante e o pó e a primeira alíquota de 2 mL coletada, sendo esta denominada tempo 0 minutos. Subsequentemente foi utilizado um sistema óptico, denominado “biotable”, composto de 24 LEDs com comprimento de onda de 455 nm e potência de 31 mW/cm² para irradiação da suspensão.

Figura 3 – Sistema de rodamina com microcristais de Ag_3PO_4 em agitador magnético

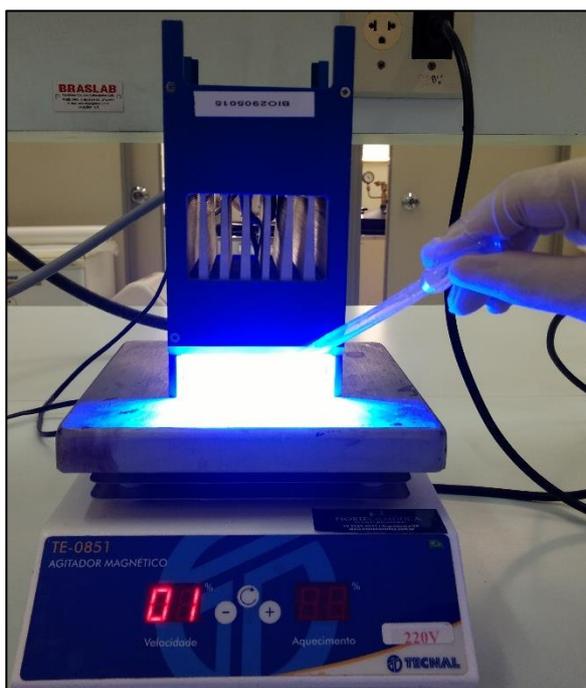


Sistema sob agitação magnética com barra magnética.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

O sistema catalítico foi mantido sob agitação constante, e alíquotas foram coletadas (Figura 4) em intervalos de tempo específicos: 0 (controle, sem a presença de Ag_3PO_4), 1 (1,86 J/cm²), 3 (5,58 J/cm²), 6 (11,16 J/cm²), 9 (16,74 J/cm²), 12 (22,32 J/cm²), 15 (27,9 J/cm²), 20 (37,2 J/cm²), 25 (46,5 J/cm²) e 30 (55,8 J/cm²) minutos.

Figura 4 – Irradiação do sistema pela Biotable em agitador magnético

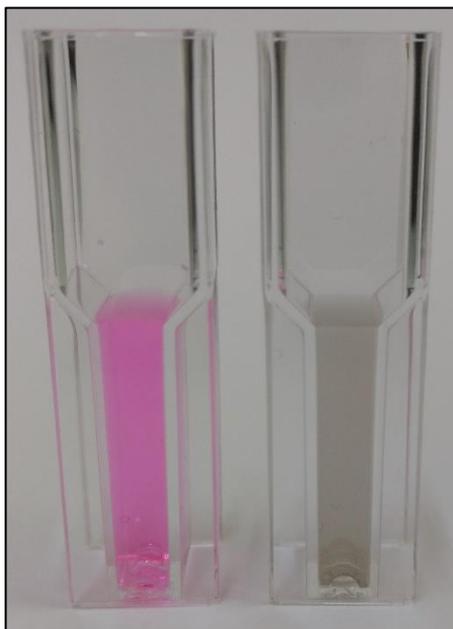


Biotable composta por 24 leds emitindo luz com comprimento de onda de 455 nm e sistema magnético para agitação constante.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

As alíquotas foram centrifugadas (MiniSpin) por 3 minutos (8300 rpm) para separar a fase líquida e essa, por sua vez, foi analisada no espectrofotômetro de UV-VIS para monitorar a banda de absorção máxima da rodamina B ($\lambda = 554$ nm). A reutilização e estabilidade dos microcristais de Ag_3PO_4 como fotocatalizador foi investigada em quatro ciclos. Para isso, após a degradação do corante, o pó residual foi lavado com água e acetona, seco em estufa e, posteriormente, reempregado em um novo teste fotocatalítico seguindo o procedimento descrito acima. Na Figura 5 pode ser observado duas cubetas com a rodamina sem sua exposição à luz e após 4 exposições à luz.

Figura 5 - Rodamina antes e após 4 exposições à luz



Corante rodamina em cubetas. A cubeta da esquerda, (coloração rosa) apresenta a rodamina antes da sua exposição à luz (455 nm). A cubeta da direita, (coloração mais cinza - transparente) apresenta o corante rodamina após os 30 minutos (55,8 J/cm²) de exposição à luz (455 nm).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

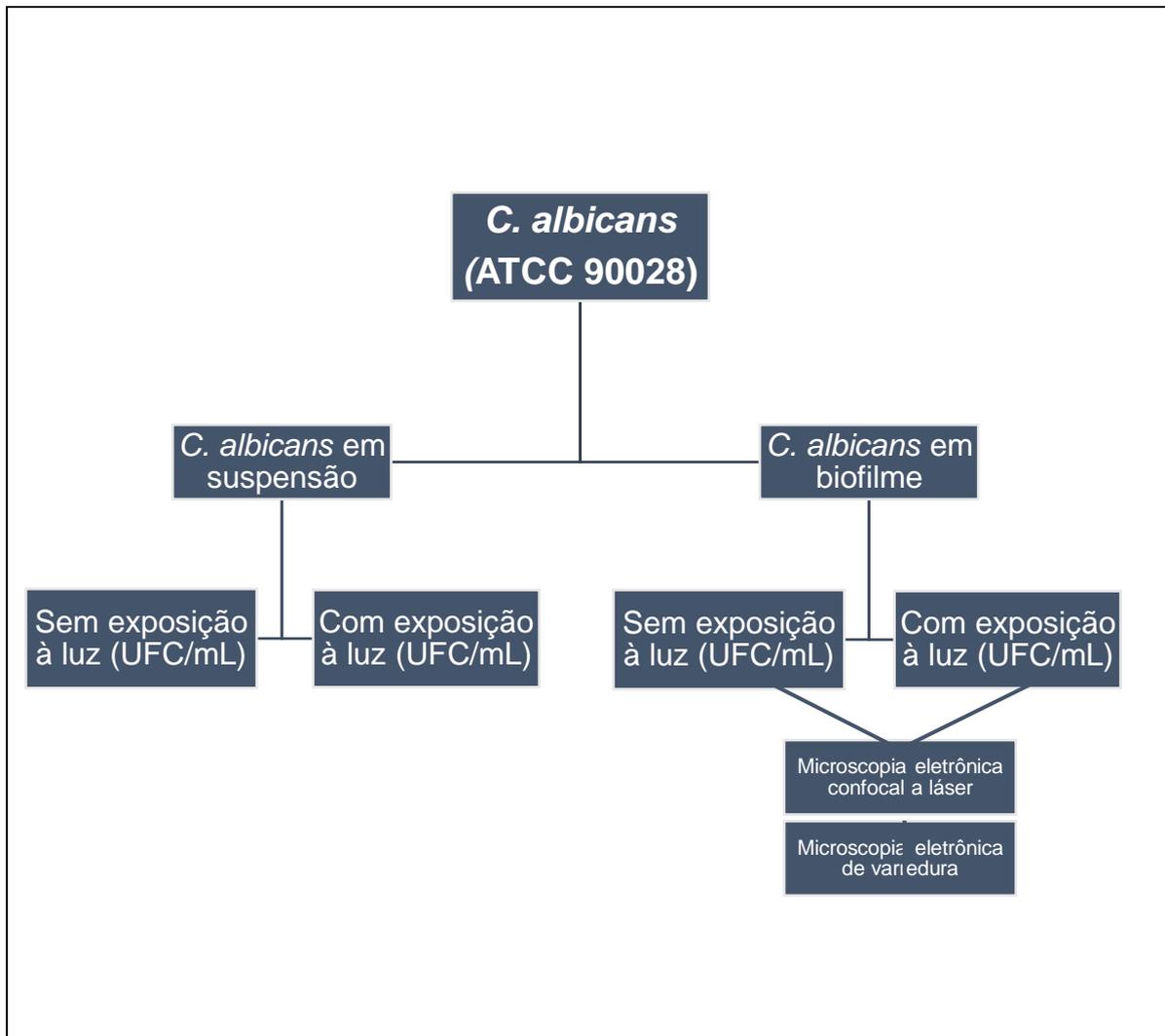
4.4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-EC) e tamanho do microcristal de fosfato de prata

As análises em MEV-EC são ferramentas importantes para estudo da morfologia, o tamanho e a distribuição das amostras avaliadas. Neste estudo, o microscópio foi operado a 30kV. Para determinação do tamanho das partículas de fosfato de prata, utilizou-se o programa Image J v.1.51j8. Foram selecionadas duas imagens de MEV-EC com magnificação de 120000x para realizar as verificações de dimensão do microcristal. Em cada imagem as medições eram realizadas em 50 partículas, chegando ao final da análise com um total de 100 medições, utilizando a escala da imagem. As imagens de MEV-EC foram realizadas após cada um dos ciclos de utilização das partículas.

4.4.3 Testes microbiológicos

A análise microbiológica deste estudo foi realizada utilizando a cepa padrão de *C. albicans* ATCC 90028 em suspensão e biofilme (48h), com e sem exposição à luz, como pode ser observado na Figura 6. Neste estudo há 4 grupos, alternando entre a presença (+) e ausência (-) da concentração (C) da partícula e luz (L).

Figura 6 - Fluxograma dos testes microbiológicos



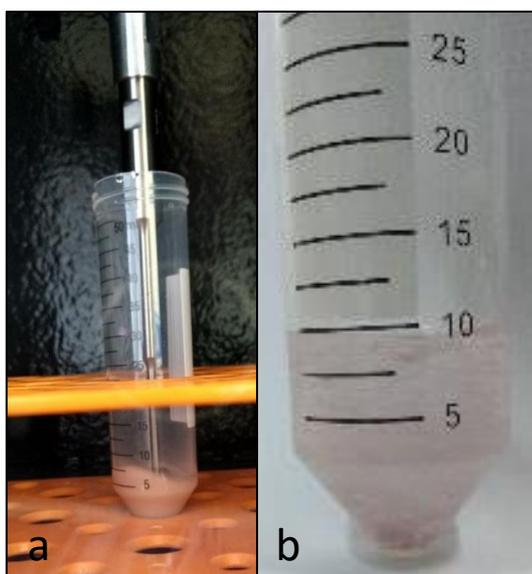
Fluxograma mostrando as etapas realizadas durante os experimentos em suspensão e biofilme

Fonte: Elaboração própria.

4.4.3.1 Análise microbiológica em suspensão

Foram realizadas análises microbiológicas em suspensão, com e sem exposição à luz com comprimento de onda máximo em 455 nm. O objetivo desse teste foi encontrar a menor concentração necessária para eliminação de *C. albicans*, e determinar a eficácia do sistema microcristal-microrganismo sob exposição da luz. O microcristal de fosfato de prata utilizava o PBS como veículo para seu manuseio e diluição para as concentrações desejadas. Antes de cada utilização, preconizou-se a utilização em sonicador por 2 minutos (Figura 7), para melhor homogeneização dos microcristais de fosfato de prata com a solução de PBS.

Figura 7 - Preparo do microcristal de fosfato de prata



Microcristal de fosfato de prata adicionado ao PBS. (a) Sonicação para uma melhor homogeneização do microcristal de Ag_3PO_4 . (b) Microcristal de fosfato de prata após a sonicação.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.4.3.1.1 Microrganismos e condições de cultivo

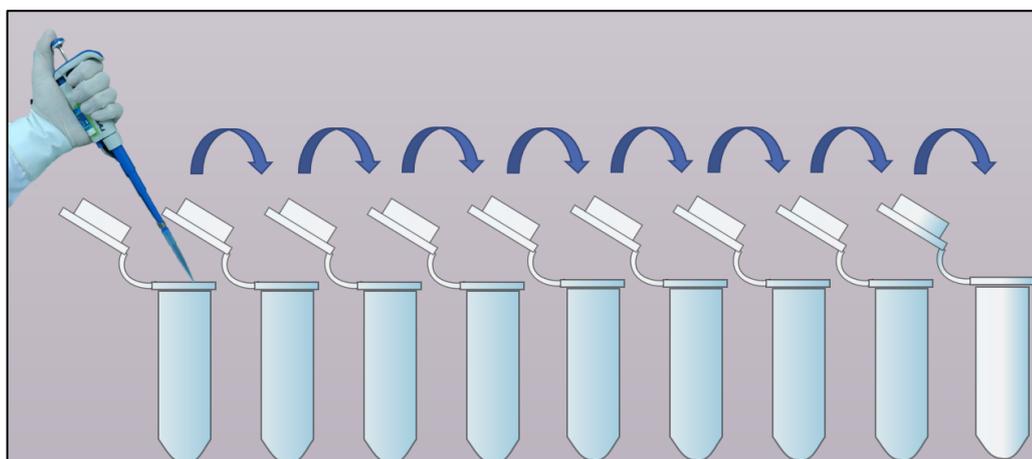
O microrganismo, congelado em meio YNB e glicerol (2x) a -80°C , foi reativado em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com $5\ \mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol, e mantido em estufa estática a 37°C , por 48h. Após esse período, 5 colônias com dimensões semelhantes foram transferidas para 5 mL de meio de cultura específico Yeast Nitrogen Base (YNB) em tubo tipo Falcon, o qual foi mantido

incubado a 37°C por 16h, sendo este processo necessário para a obtenção de um pré-inóculo. Em seguida, 500 µL do pré-inóculo foram diluídos em 9,5 mL de YNB, incubado novamente em estufa estática por 8h (até atingir a fase mid-log de crescimento) à 37°C. A concentração do inóculo foi determinada pela densidade óptica da suspensão (DO 540 nm), padronizada em espectrofotômetro em 0,55 (\pm 0,08), com concentração aproximada de $7,94 \times 10^6 \pm 4,21 \times 10^6$ UFC/mL. Esses dados foram obtidos após a determinação de curva de crescimento do microrganismo.

4.4.3.1.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos microcristais de Ag_3PO_4 sem exposição à luz

Após o crescimento fúngico atingir a concentração desejada, realizou-se a diluição do inóculo (10^6 para 10^3). Logo em seguida foram utilizadas placas de 24 poços, as quais receberam os microcristais diluídos em microtubos de 2 mL (Figura 8), com valores que iam de 2000 µg/mL a 0,9 µg/mL, juntamente com *C. albicans* na concentração de $3,7 \times 10^3$ células/mL.

Figura 8 – Diluição do fosfato de prata



Microtubos de 2 mL foram utilizados para a diluição do fosfato de prata nas concentrações desejadas para determinação da concentração fungicida mínima.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

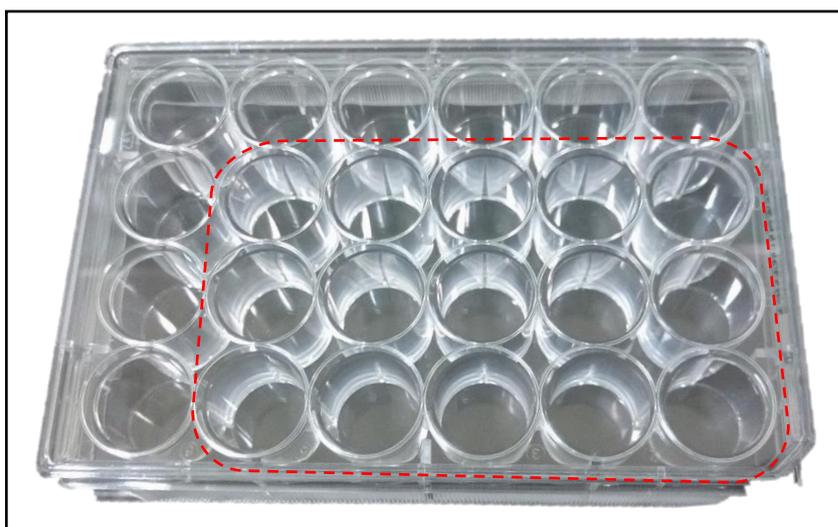
Cada poço da placa de 24 poços era composto por 250 µL de microcristal e 250 µL de suspensão de *C. albicans*, totalizando 500 µL. Logo após o contato do microrganismo com o microcristal, a placa de 24 poços era envolta de papel alumínio e permanecia em estufa estática a 37°C por 30 minutos. Este tempo justifica os 30

minutos de exposição à luz utilizados no item 4.4.2.4. Assim, cada poço foi plaqueado em duplicata pela técnica de microgota (10 μL), em placas de Petri contendo meio de cultura SDA e mantidas em estufa estática à 37°C, por 24h, para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). As análises foram realizadas em triplicata e em três ocasiões distintas.

4.4.3.1.3 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos microcristais de Ag_3PO_4 com exposição à luz

Antes da realização do experimento utilizando luz, foi preciso identificar quais poços receberiam a luz de uma maneira mais uniforme. Para tanto, utilizou-se uma placa de 24 poços (Kasvi), tendo cada poço 2 mL de corante rodamina (1×10^5) com microcristais de Ag_3PO_4 (2000 $\mu\text{g/mL}$). Logo em seguida, os poços eram expostos a um LED de comprimento de onda máximo de 455 nm (luz azul) e com intensidade de iluminação média de 31 mW/cm^2 , desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos – USP, por 1 (1,86 J/cm^2), 3 (5,58 J/cm^2) e 5 (9,3 J/cm^2) minutos. Observou-se que ocorria uma melhor distribuição da luz nos poços assinalados na Figura 9, sendo os mesmos selecionados para a realização da CFM com a utilização da luz.

Figura 9 - Placa de 24 poços

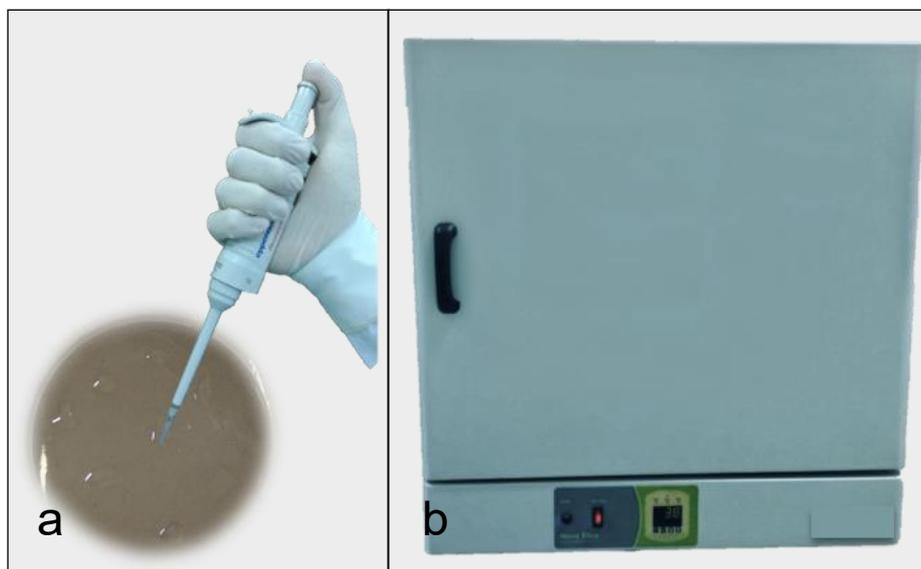


Placa de 24 poços assinalando quais poços possuíam uma distribuição de luz mais homogênea.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Os procedimentos de crescimento de *C. albicans*, diluição do microcristal, concentração em cada poço e contato entre microcristal-microrganismo, foram os mesmos já citados nos itens 4.4.3.1.1 e 4.4.3.1.2. Desta forma, após cada poço estar composto por microcristal de fosfato de prata (250 μL) em diluição seriada e *C. albicans* (250 μL , 10^3 UFC/mL), a placa de 24 poços foi exposta à uma luz LED (455 nm) por 30 minutos (55,8 J/cm²). Logo em seguida, cada poço foi plaqueado em duplicata pelo método de gotejamento (10 μL), em placas de Petri contendo meio de cultura SDA e então mantidas em estufa estática à 37°C por 24h (Figura 10), para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). As análises foram realizadas em triplicata e em três ocasiões distintas.

Figura 10 - Plaqueamento e crescimento em estufa



Plaqueamento em placas de Petri contendo SDA, pelo método de gotejamento (a), para posterior crescimento em estufa estática (b) à 37°C por 24h.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.4.3.2 Análise microbiológica de biofilme em formação

Foram realizadas análises da atividade antifúngica do Ag_3PO_4 em biofilme, com e sem exposição à luz com comprimento de onda máximo de 455 nm. O objetivo desse teste foi determinar a menor concentração necessária para interferir na formação de biofilme da *C. albicans* e verificar a eficácia da exposição à luz sobre o sistema microcristal-microrganismo. As condições de cultivo de *C.*

albicans seguiram as já descritas no item 4.4.3.1.1, no entanto, com concentração de $1,52 \times 10^6$ UFC/mL.

4.4.3.2.1 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos microcristais de Ag_3PO_4 sem exposição à luz

Após atingida a DO, foram utilizadas placas de 24 poços (TPP), as quais receberam *C. albicans* (2 mL). Em seguida, a placa era levada para uma estufa orbital (37°C , 75 rpm), por 90 minutos, para obtenção de uma adesão inicial¹¹⁵. Passado este tempo, cada poço era lavado (2x) com PBS (2 mL) para retirar os microrganismos fracamente aderidos e, logo em seguida, ressuspensos com meio YNB (1 mL) e microcristais diluídos em PBS (1 mL), totalizando ao final 2 mL em cada poço, com diferentes concentrações¹¹⁶. A placa era envolvida por papel alumínio e incubada em estufa orbital (37°C , 75 rpm), por 48 h (Figura 11).

Após este período, a placa era retirada da estufa orbital, lavada com PBS (2 mL, 3x) e ressuspensa com YNB (2 mL).

Figura 11 - Estufa orbital utilizada para desenvolvimento do biofilme



Placa de 24 poços em estufa orbital (37°C , 75 rpm) e envolta por papel alumínio, por 48 h.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Para a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL), os biofilmes foram desprendidos do fundo da placa com auxílio de uma ponteira estéril, e alíquotas de 20 μL dos biofilmes desprendidos foram diluídos de forma seriada em PBS (10^{-1} a 10^{-4}). Então, alíquotas de 10 μL de cada diluição (10^0 a 10^{-4}) foram semeadas em placas de Petri, pelo método de gotejamento (10 μL), contendo SDA.

Os procedimentos de semeadura foram realizados em duplicata e, a seguir, incubados a 37°C por 24h para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Os valores de UFC/mL foram estimados de acordo com a fórmula: $UFC/mL = \text{número de colônias} \times 10^n/q$. Nessa fórmula, 'n' equivale ao valor absoluto da diluição escolhida (de 0 a 4) e 'q' equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas ($1,0 \times 10^{-2}$ mL). Poços contendo apenas *C. albicans* e meio de cultura foram controles negativos. As análises foram realizadas em triplicata e em três ocasiões distintas.

4.4.3.2.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos microcristais de Ag_3PO_4 com exposição à luz

A metodologia para crescimento do microrganismo e formação da fase de adesão é a mesma descrita no item 4.4.3.2.1. Neste ponto, após adição dos microcristais (1 mL) em contato com o biofilme em fase de adesão (1 mL), totalizando 2 mL por poço, a placa de 24 poços era irradiada com uma luz LED (455 nm) por 30 minutos ($55,8 \text{ J/cm}^2$). Os poços selecionados para exposição à luz foram os mesmos do item 4.4.3.1.3. A placa, então, era envolvida por papel alumínio e incubada em estufa orbital (37 °C, 75 rpm), por 48h. Os procedimentos de lavagem, desprendimento e plaqueamento, já foram descritos no item 4.4.3.2.1.

4.4.3.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo e confocal a laser

Análises realizadas para observar o comportamento do biofilme, na presença e ausência de luz azul, em contato com o microcristal de fosfato de prata.

4.4.3.3.1 Análise dos biofilmes de *C. albicans* através da microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC)

Para essa análise, discos de poliestireno foram recortados do fundo de uma placa de 24 poços (marca TPP) com $n=2$, para serem utilizados juntamente com o biofilme durante seu crescimento, em fundo de placa, seguindo-se as mesmas condições descritas no item 4.4.3.1.1 e 4.4.3.2.1 (nesta etapa, seguiu-se

até a incubação do biofilme por 48h), com concentração aproximada de $1,51 \times 10^6$ UFC/mL. Para desinfecção dos discos recortados do fundo de placa, estes foram adicionados em um béquer contendo 200 mL de água destilada estéril. Logo em seguida, permaneceram em micro-ondas por 3 minutos, utilizando uma potência de 645 W.

Após 48h de incubação, cada poço foi lavado com PBS (3x) e em seguida, os discos que permaneceram em fundo de poço durante todo o crescimento do biofilme, foram imersos por 20 minutos em glutaraldeído 2,5%, e em seguida desidratados em etanol de forma seriada (70%, 80%, 90% e 100%), permanecendo por 20 minutos em cada concentração, secos em temperatura ambiente e mantidos em dessecador a vácuo até o momento da análise. Para a seguinte análise, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura ZEISS, modelo SIGMA, equipado com canhão de elétrons por emissão de campo (MEV-EC) com alta tensão extra (EHT) de 2,00 kV. As imagens obtidas utilizaram ampliações de 500x, 2000x e 2500x e dispersão do comprimento de onda (WDS) de 7 e 7,1 mm. Antes da observação em microscópio, as amostras foram montadas em *stubs* metálicos por 120 segundos e recobertas com ouro.

4.4.3.3.2 Análise dos biofilmes de *C. albicans* através de microscopia eletrônica confocal a laser

Para analisar a viabilidade dos biofilmes formados em placas de 24 poços (n=2), seguiu-se o protocolo de crescimento, descrito no item 4.4.3.1.1, com concentração aproximada de 1×10^7 UFC/mL. Após 48 h de incubação com as partículas, o biofilme foi lavado (3x) e marcado com os fluoróforos "Syto 9" e iodeto de propídio, presentes no kit LIVE/DEAD e preparados de acordo com as instruções do fabricante. Seguiu-se com a lavagem (1x) para remoção do excesso dos fluoróforos. Os biofilmes foram mantidos em PBS (500 μ L) para visualização no microscópio de fluorescência confocal Carl Zeiss LSM 800, com lasers de 488 nm (excitação)/561 nm (emissão) para o iodeto de propídeo, e 488 nm (excitação)/525 nm (emissão) para o SYTO 9 na objetiva de 20x. As imagens foram analisadas no software ZEN BLUE versão 2.3 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

4.5 Análise Estatística

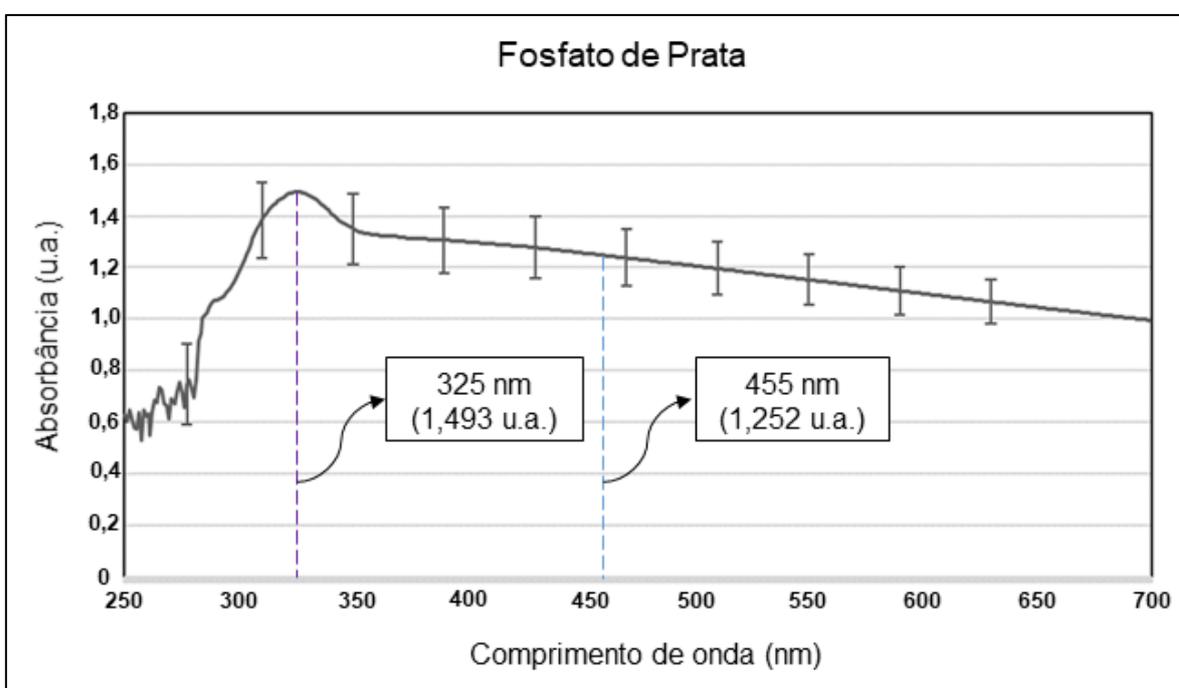
A avaliação proposta neste trabalho, com base em medições de UFC/mL, foi realizada por análises de variância de dois fatores: luz (ausente ou presente) e concentrações de Ag_3PO_4 . Essas análises foram complementadas por comparações múltiplas de médias pelo teste de Tukey. Foram realizadas também análises de variâncias auxiliares em relação somente à luz ausente. Para viabilizá-las, as contagens de colônias foram transformadas em logaritmos decimais, de modo a obter homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos. Essas condições foram comprovadas pelos testes de Levene e de Shapiro-Wilk, respectivamente. Adotou-se o nível de significância de 5% para a tomada de decisão.

5 RESULTADOS

5.1 Espectro de Absorção

O espectro de absorção de Ag_3PO_4 (Figura 12) demonstrou valores de absorvância máxima de 1.493 u.a. no comprimento de onda de 325 nm (fora da região azul), diferente dos valores utilizados no desenvolvimento desta pesquisa (1,252 u.a., 455 nm).

Figura 12 - Espectro de absorção óptica do Fosfato de Prata (Ag_3PO_4)



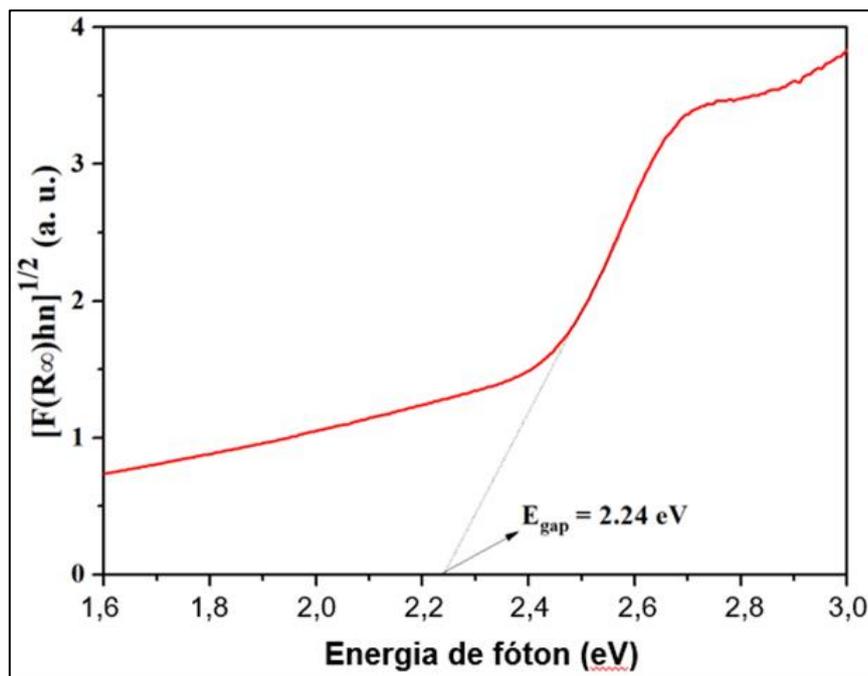
Determinação do sinal de maior absorção óptica.

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Espectroscopia de Reflectância no UV-VIS

A Figura 13 apresenta os espectros de reflectância difusa de UV-VIS e valor de E_{gap} do Ag_3PO_4 . O microcristal de fosfato de prata, sintetizado pelo método da co-precipitação, apresentou um gap de energia de 2,24 eV (Figura 13), segundo os cálculos realizados pelas equações de Kubelka-Munk [$F(R^\infty)$] e Wood Tauc ($\propto h\nu$), descritas acima.

Figura 13 - Espectro de reflectância difusa de UV-VIS e valor de “E_{gap}” do microcristal de Ag₃PO₄



Energia de fóton transmitida, entre as bandas de valência e condução, pelo microcristal de fosfato de prata.

Fonte: Elaboração própria.

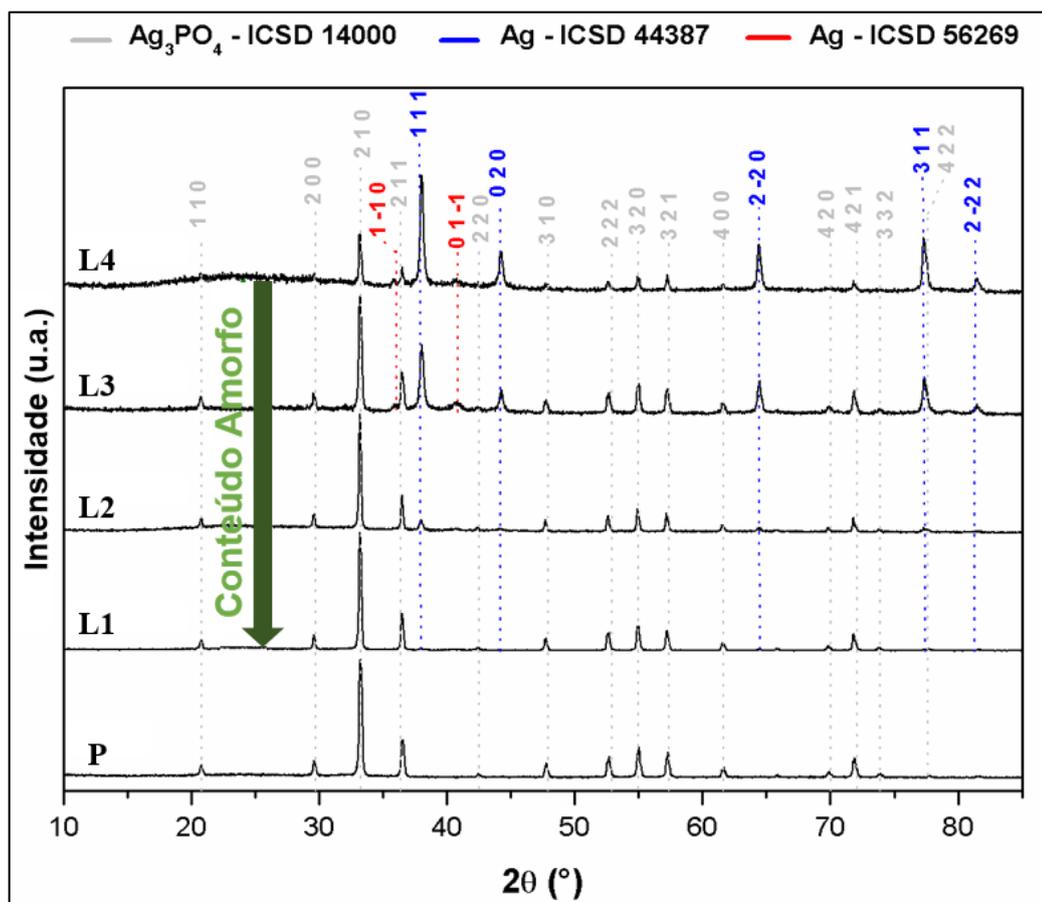
5.3 Difração de Raios-X, Morfologia dos Microcristais e Fotocatálise

Análise dos difratogramas obtidos através da DRX revelou que o material antes de ser utilizado possui alta cristalinidade, com ausência de fases deletérias, devido à definição nítida dos sinais do difratograma (Figura 14). À medida que os ciclos estão sendo realizados, observa-se a formação de Ag metálica cúbica e hexagonal, identificados através dos sinais indexados em “Inorganic Crystal Structure Database” (ICSD) 44387 e 56269, respectivamente. Ag cúbica está presente desde o primeiro ciclo, e sua presença torna-se mais intensa conforme o material vai sendo reutilizado. No quarto ciclo, observa-se a presença de maior quantidade de Ag cúbica que Ag₃PO₄ antes da utilização (observar intensidade do sinal 111).

A partir do 3º ciclo, observou-se uma pequena quantidade de Ag hexagonal, aumentando na 4ª exposição à luz. Além disso, há um halo de amorfização presente, o qual aumenta proporcionalmente ao número de ciclos, mostrando uma menor cristalinidade do sistema. Isso ocorre através da irradiação do

material à luz, onde o metal Ag, dentro da estrutura de Ag_3PO_4 , é reduzido, dando origem à Ag metálica do sistema. Este processo favorece a decomposição de Ag_3PO_4 , dando origem ao material amorfo, reduzindo a cristalinidade do sistema final, como pode ser observado na Figura 14.

Figura 14 - Difração de raios-X (DRX)

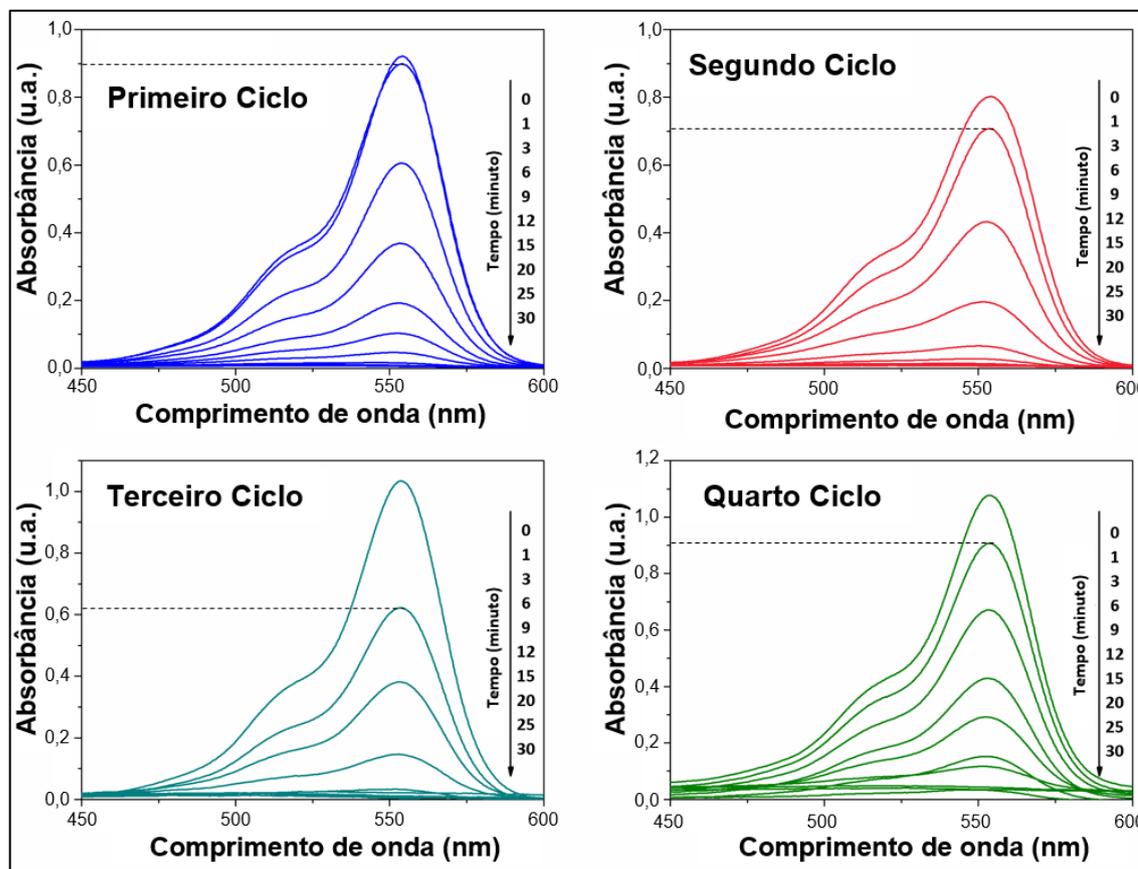


Padrões da DRX de Ag_3PO_4 após quatro exposições à luz. (P) Pó puro. (L1; L2; L3; L4) Número de exposições à luz.

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 15 mostra a evolução da atividade fotocatalítica de fosfato de prata após quatro exposições à luz azul (455 nm), como descrito no item 4.4.2.4, diluído em corante rodamina B, a qual possui absorvância máxima entre os comprimentos de onda de 500 e 600 nm¹¹⁷. Através do espectrofotômetro de UV-VIS, observou-se que a cada novo ciclo ocorre uma diminuição da taxa de absorvância no corante Rodamina B (Figura 15), com exceção do quarto ciclo que apresentou valores de absorvância mais altos, semelhantes ao primeiro ciclo.

Figura 15 – Espectros de absorção de UV-VIS após atividade fotocatalítica do Ag_3PO_4 no decorrer do tempo.

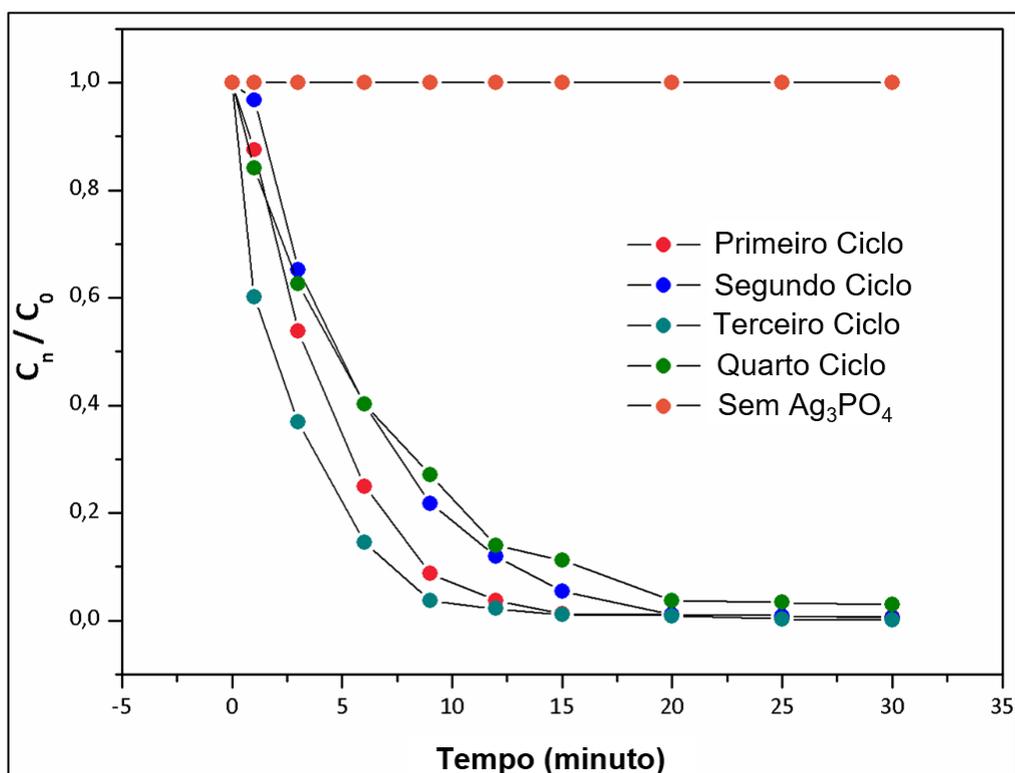


Estudo da atividade fotocatalítica do fosfato de prata após quatro exposições à luz.

Fonte: Elaboração própria.

Isto indica que uma alta taxa de corante rodamina está sendo degradada no decorrer dos 30 minutos de exposição à luz ($55,8 \text{ J/cm}^2$). Através do gráfico representado na Figura 16, é possível observar os tempos específicos de degradação total da rodamina, tais como 15 (1° e 3° ciclos) e 20 minutos (2° e 4° ciclos). Essa degradação ocorre através da diminuição da concentração do corante rodamina (C_n) até atingir o valor zero (C_0), representado pelo eixo Y. Além disso, tem-se o controle, representando a rodamina B sem a presença do fosfato de prata e, portanto, descoloração de forma mais lenta. Assim esses resultados confirmam que a degradação do corante ocorre principalmente devido à atividade de Ag_3PO_4 na presença de luz (455 nm).

Figura 16 - Curva de degradação

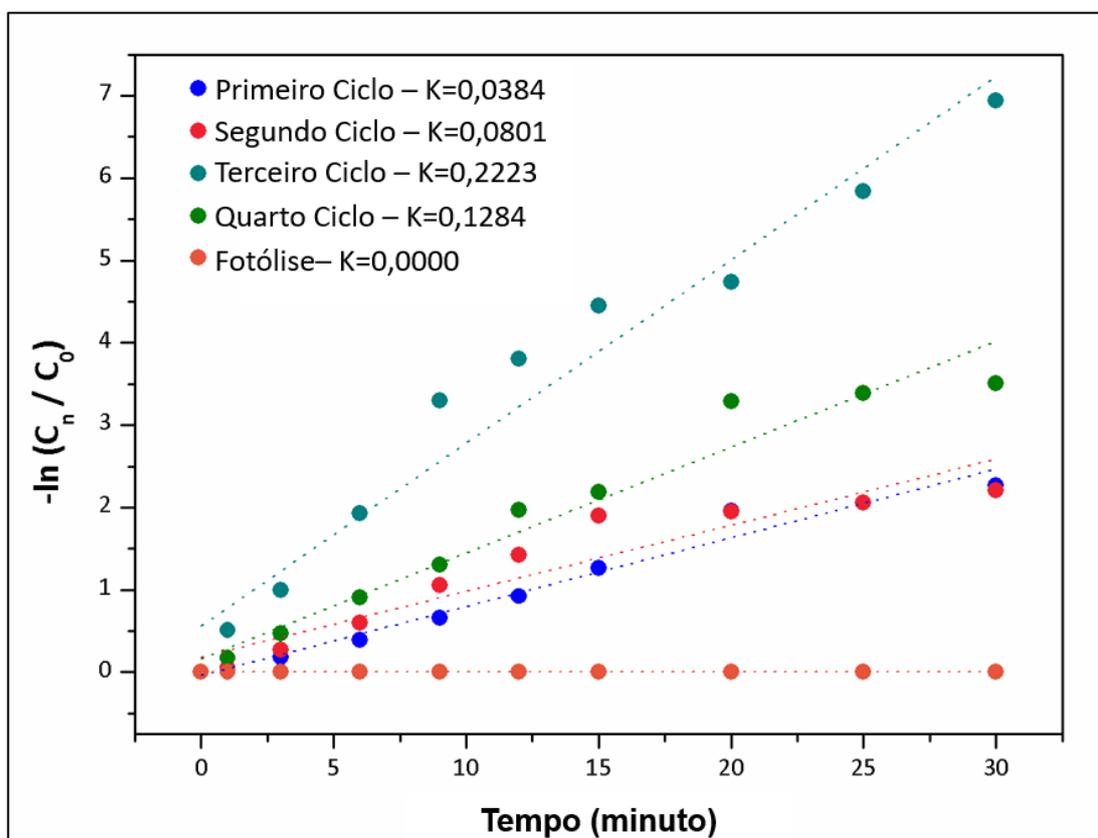


Curva de descoloração (cor rosa para transparente) em função do tempo, após cada ciclo de exposição à luz.

Fonte: Elaboração própria.

Confirmando os resultados obtidos anteriormente, a Figura 17 demonstra a velocidade de degradação a cada ciclo realizado através da constante de velocidade (K). Assim, conclui-se que o terceiro ciclo exposto à luz (455 nm) apresentou a maior constante de velocidade ($K=0,2223 \text{ min}^{-1}$), portanto o mais rápido a degradar o corante rodamina quando comparado aos demais ciclos.

Figura 17 - Velocidade de Degradação

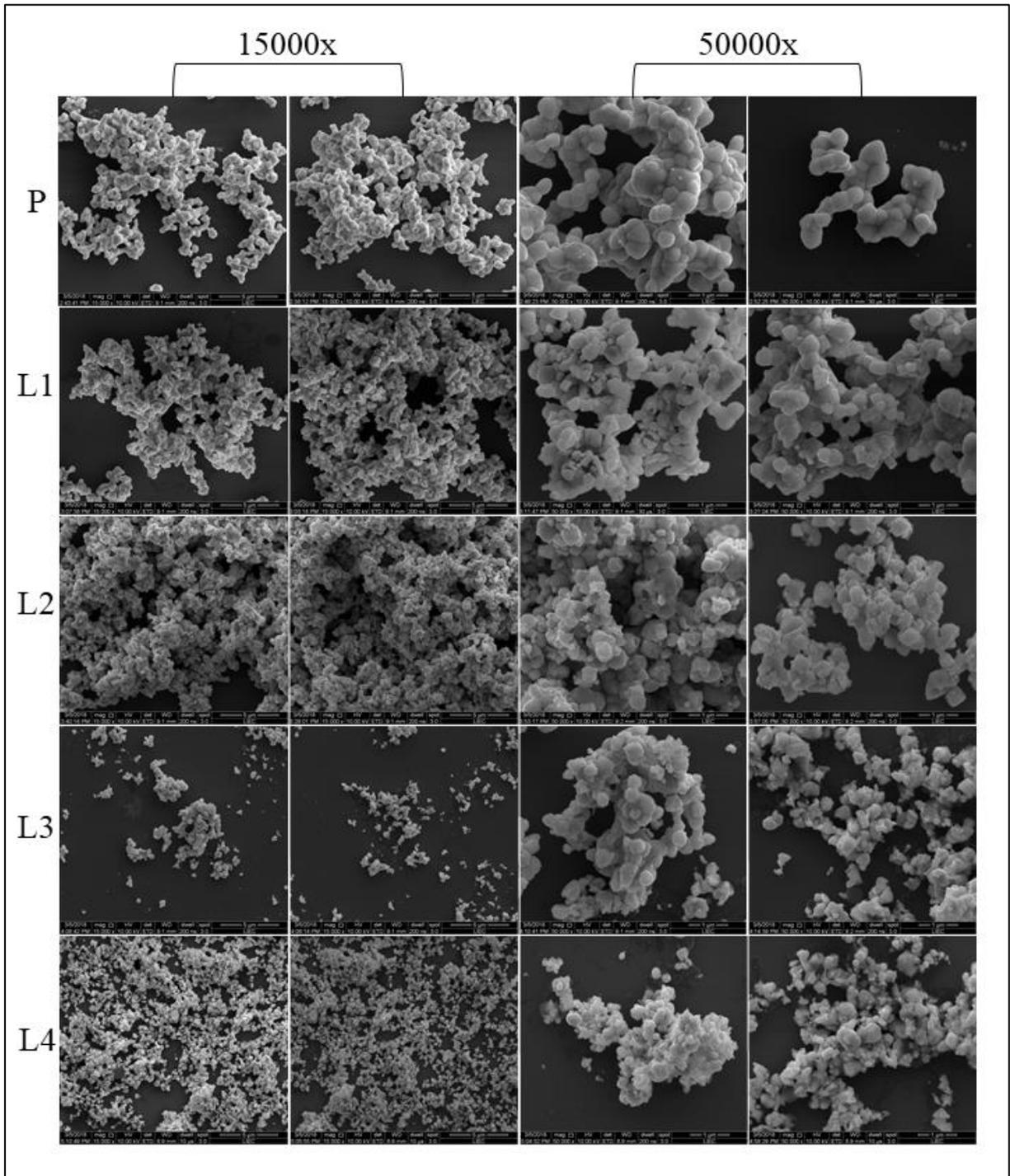


Análise da velocidade de degradação da rodamina após cada ciclo de exposição à luz. Considere K como constante de velocidade (min^{-1}).

Fonte: Elaboração própria.

Através da análise das imagens de MEV-EC (Figura 18), observou-se que as partículas sem ciclos de exposição à luz, possuem um tamanho de $0,12 \mu\text{m}$, degradando-se à medida que as exposições à luz ocorrem. No microcristal ainda sem exposição à luz (P) o mesmo apresenta um formato arredondado e irregular. No entanto, após cada exposição à luz (L1; L2; L3; L4) a partícula se degrada, com formatos nitidamente irregulares e mais aglomeradas, com produção de prata em sua superfície (Apêndice A).

Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo do Ag_3PO_4



MEV-EC do Ag_3PO_4 em diferentes magnificações. (P) Ag_3PO_4 sem exposição à luz (455 nm); (L1; L2; L3; L4) Números de exposições à luz.

Fonte: Elaboração própria.

5.4 Análises Microbiológicas

5.4.1 Concentração fungicida mínima (CFM) e análises microscópicas

Nas tabelas 1 e 2 são mostradas as médias e desvios padrão de logaritmos decimais de UFC/mL para avaliar a atividade antifúngica do Ag_3PO_4 , em diferentes concentrações, na presença ou ausência de luz (455 nm), contra o microrganismo *C. albicans* ATCC 90028, em suspensão e em biofilme, respectivamente. Destaque-se que foi somada uma unidade a cada contagem original para o cálculo de logaritmos, devido à presença de contagens nulas.

Em relação aos dados em suspensão, como primeira etapa, foi realizada uma análise de variância de dois fatores, luz (ausente ou presente) e concentrações de Ag_3PO_4 iniciando em 125 $\mu\text{g/mL}$ e diminuindo até a 0 $\mu\text{g/mL}$ (controle). Houve evidencia de efeito significativo da interação desses fatores sobre o log UFC/mL ($p < 0,001$). Então, o teste de Tukey foi aplicado para a comparação múltipla de médias com o resultado exposto na Tabela 1. Voltando a atenção para a comparação entre usar ou não a luz em uma mesma concentração, nas concentrações 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, as médias de log UFC/mL na presença da luz foram significativamente maiores do que as com luz ausente, mas equivalentes nas concentrações restantes. Em relação aos resultados da coluna de luz ausente, as médias de contagens foram equivalentes nas concentrações 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, diminuindo nas concentrações menores de Ag_3PO_4 . Quanto à luz presente, na concentração 125 $\mu\text{g/mL}$ a média de contagem foi significativamente menor do que nas concentrações menores restantes.

Como segunda etapa, observa-se que na concentração 500 $\mu\text{g/mL}$ ou maiores a inibição do microrganismo foi total sempre que a luz estava presente, mas na ausência da luz a inibição só foi total na maior concentração de Ag_3PO_4 , igual a 2000 $\mu\text{g/mL}$. Na ausência da luz, com as concentrações 500, 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$, uma análise de variância mostrou que as contagens foram equivalentes ($p = 0,485$).

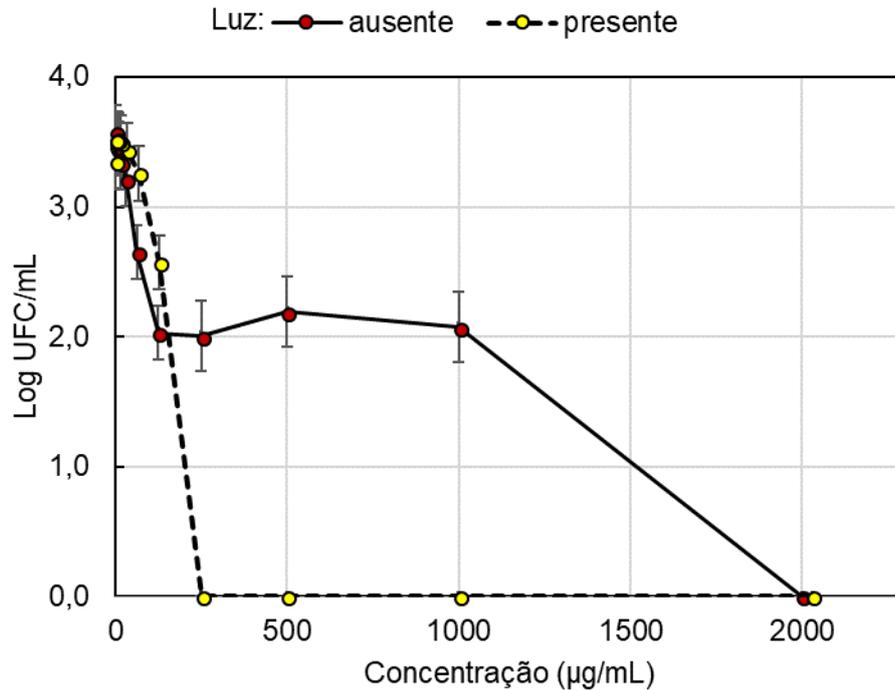
Tabela 1 - CFM em *C. albicans* em suspensão

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Luz		
	Ausente	Presente	
2000	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	
1000	2,07 (0,20) a	0,00 (0,00)	*
500	2,19 (0,16) a	0,00 (0,00)	*
250	2,00 (0,13) a	0,00 (0,00)	*
125	2,03 (0,08) a	2,57 (0,06) a	*
62,5	2,65 (0,19) a	3,26 (0,04) b	*
31,25	3,21 (0,08) b	3,44 (0,04) bc	
15,62	3,34 (0,14) c	3,49 (0,09) bc	
7,8	3,45 (0,11) cd	3,52 (0,08) c	
3,9	3,45 (0,03) cd	3,52 (0,07) c	
1,9	3,47 (0,02) cd	3,51 (0,06) c	
0,9	3,51 (0,03) d	3,52 (0,08) c	
0 (controle)	3,57 (0,03) d	3,35 (0,07) bc	

Média (desvios padrão) de Log UFC/mL de cultura de *C. Albicans* em suspensão, submetida a diferentes concentrações de Ag_3PO_4 na ausência ou presença de luz (455 nm). A presença de asterisco (*) demonstra que as médias entre luz ausente ou presente são significativamente diferentes (Teste de Tukey: $p < 0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais, em uma mesma coluna, não são significativamente diferentes (Teste de Tukey: $p > 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 19 estão representadas as médias amostrais de log UFC/mL, juntamente com intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais. Esses intervalos, baseados nos desvios padrão das análises de variância, estimam a precisão sobre as médias. Além disso, permitem uma boa visualização dos resultados das análises de variância, no sentido de que, quanto maior a sobreposição, menor a evidência de diferença entre médias.

Figura 19 - CFM em *C. albicans* em suspensão

Média amostral (símbolo) e intervalo de confiança de 95% (barra de erro) Log UFC/mL de cultura de *C. Albicans* em suspensão, submetida a diferentes concentrações de Ag_3PO_4 na ausência ou presença de luz

Fonte: Elaboração própria.

Examinando os dados em biofilme (Tabela 2), foi realizada, em primeiro lugar, uma análise de variância de dois fatores, luz (ausente ou presente) e concentrações de Ag_3PO_4 de 1000 µg/mL a 0 µg/mL (controle). Houve evidencia de efeito significativo da interação desses fatores sobre o log UFC/mL ($p= 0,003$). Então, o teste de Tukey foi aplicado para a comparação múltipla de médias (tomando concentração 1000 µg/mL e menores), com o resultado exposto na Tabela 2 - CFM em *C. albicans* em biofilme.

Na concentração 1000 µg/mL, com a luz presente, a média de log UFC/mL foi significativamente menor do que com a luz ausente, sendo equivalentes nas demais concentrações. Em relação à luz ausente, as médias de contagens foram equivalentes em todas as concentrações a partir de 1000 µg/mL, sendo que na presença de luz, na concentração 1000 µg/mL a média foi menor e as restantes maiores e equivalentes entre si.

Em segundo lugar, observa-se nas concentrações 4000 µg/mL, com luz ausente ou presente, e 2000 µg/mL com luz presente, total inibição do

microrganismo. Na ausência da luz, com a concentração 2000 µg/mL, uma análise de variância mostrou equivalência da média com todas as outras médias das concentrações menores que ela ($p= 0,465$).

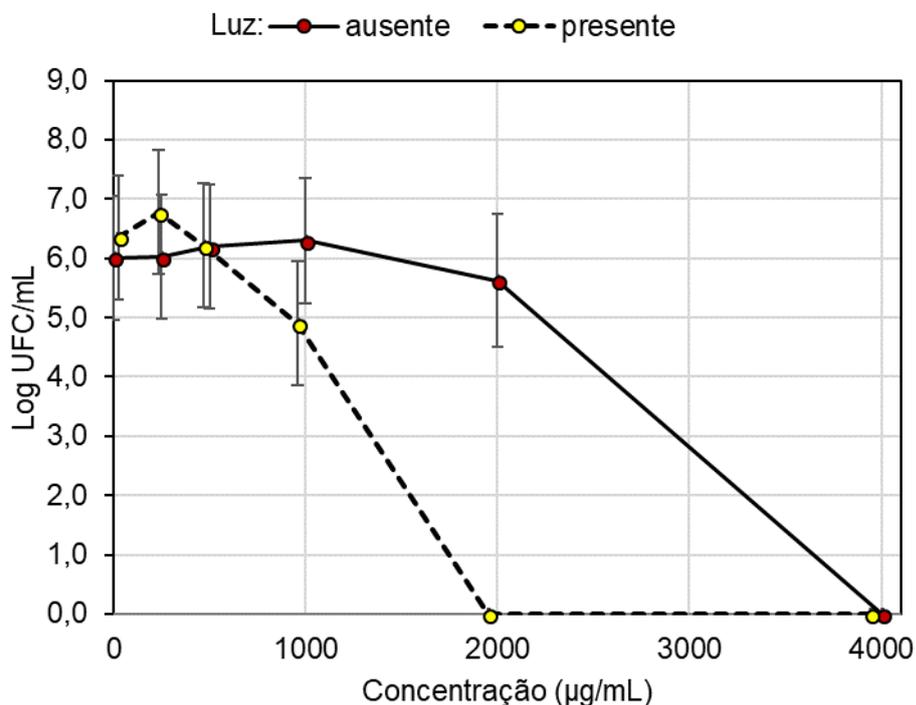
Tabela 2 - CFM em *C. albicans* em biofilme

Concentração (µg/mL)	Luz	
	Ausente	Presente
4000	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
2000	5,62 (0,58) ^a	0,00 (0,00)
1000	6,29 (0,43) ^a	4,90 (0,79) ^{a *}
500	6,19 (0,32) ^a	6,22 (0,20) ^b
250	6,02 (0,33) ^a	6,77 (0,10) ^b
0	6,01 (0,52) ^a	6,35 (0,29) ^b

Médias entre luz ausente ou presente significativamente diferentes (Teste de Tukey: $p<0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais em uma mesma coluna não são significativamente diferentes (Teste de Tukey: $p>0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 20 - CFM em *C. albicans* em biofilme estão representadas as médias amostrais de log UFC/mL, acompanhadas de intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais. Como afirmado anteriormente, esses intervalos, baseados nos desvios padrão das análises de variância, estimam a precisão sobre as médias.

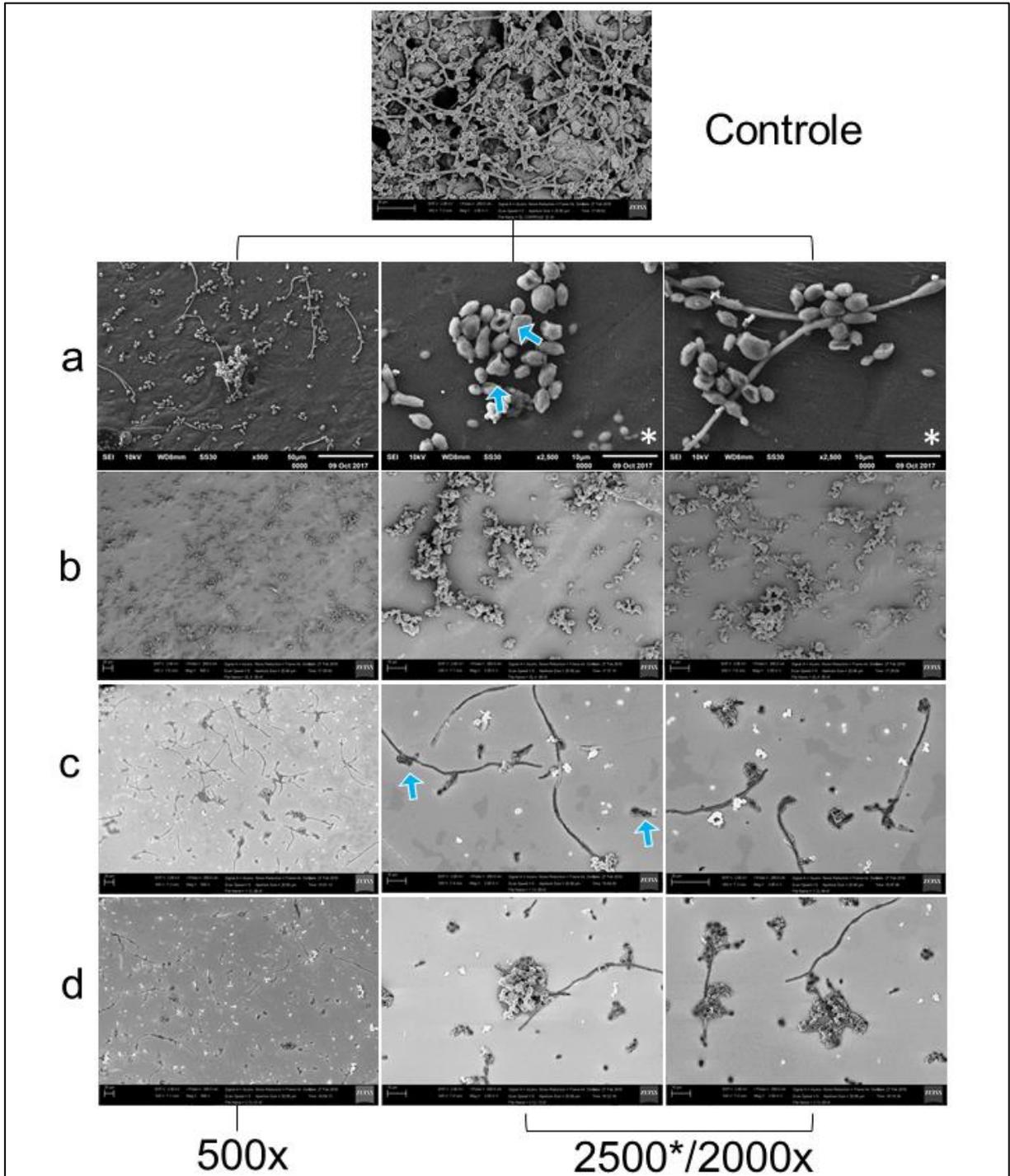
Figura 20 - CFM em *C. albicans* em biofilme

Média amostral (símbolo) e intervalo de confiança de 95% (barra de erro) Log (UFC/mL) de cultura de *C. Albicans* em biofilme, submetida a diferentes concentrações de Ag_3PO_4 na ausência ou presença de luz

Fonte: Elaboração própria.

Nas imagens de MEV-EC (Figura 21), o microrganismo apresenta uma deformação em sua morfologia quando comparada à sua forma arredondada padrão, conforme mostrado pelas setas (Figura 21a e Figura 21c). Além disso, há uma redução de *C. albicans* na magnificação de 500x, quando comparada ao controle (sem Ag_3PO_4).

Figura 21 - MEV-EC de biofilme com Ag_3PO_4



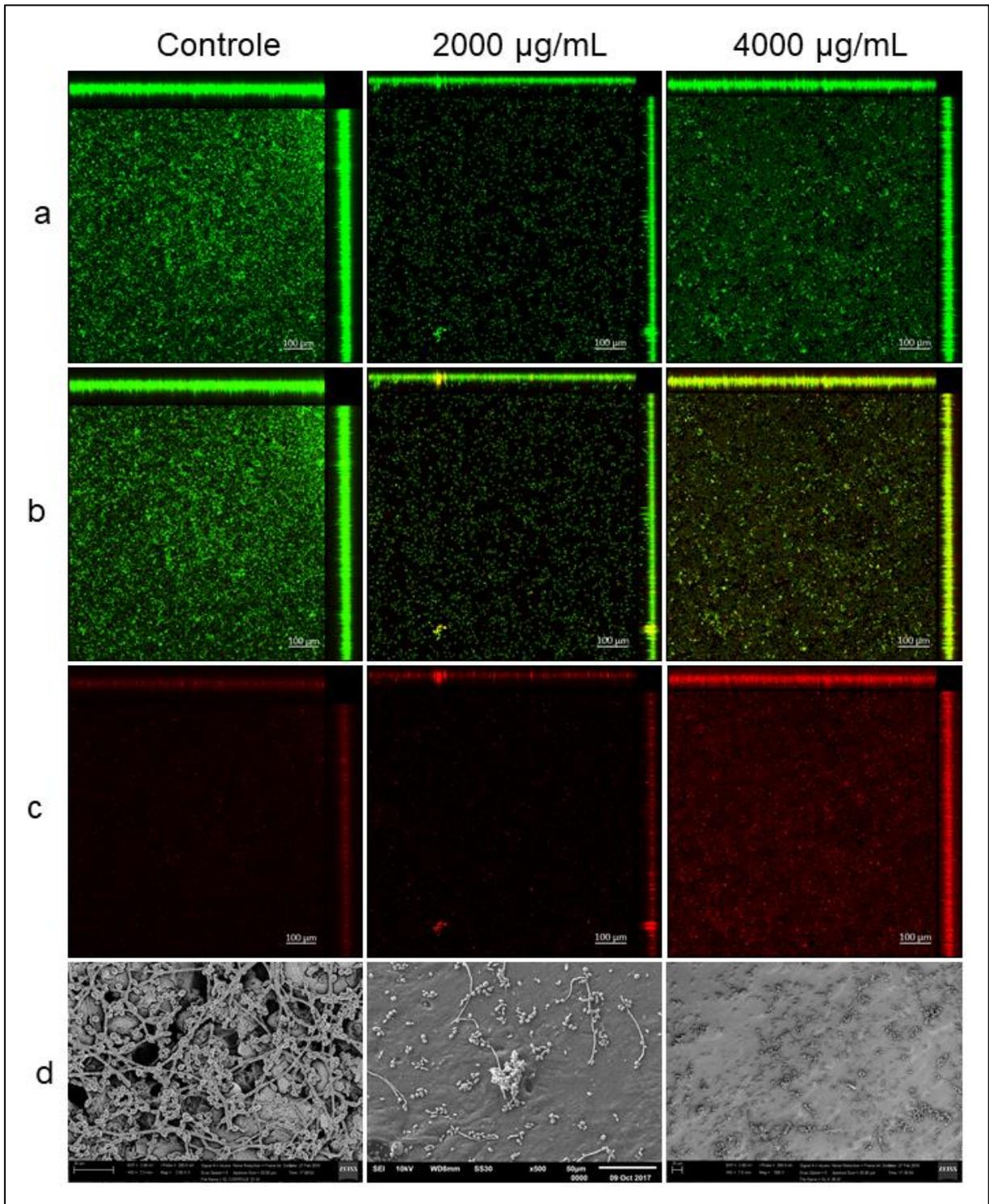
Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo de biofilme em formação, tratado com Ag_3PO_4 na ausência (a,b) e presença de luz (c,d). (a) 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (b) 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (c) 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (d) 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Fonte: Elaboração própria.

Nas imagens de microscopia confocal à laser (Figura 22 e Figura 23), a coloração vermelha (células mortas) torna-se mais intensa à medida que as

concentrações aumentaram (subinibitórias para inibitória), sendo inversamente proporcional à coloração verde (células vivas). Além disso, o grupo controle demonstrou um conjunto de microrganismos vivos e aglomerados. Nas demais concentrações utilizadas, esta aglomeração diminuiu à medida que as concentrações aumentam, apresentando mais espaçamento, o que pode ser característico da redução do microrganismo. Esses dados estão de acordo com as imagens de MEV-EC (Figura 21) e os dados da UFC (Tabela 2 e Figura 20).

Figura 22 – Micrografias obtidas através de microscopia confocal em biofilme na ausência de luz



Microscopia confocal (a – *C. albicans* vivo; b – Vivos e mortos; c – *C. albicans* morto) e MEV-EC (d) do biofilme de *C. albicans* formado na presença de fosfato de prata sem luz.

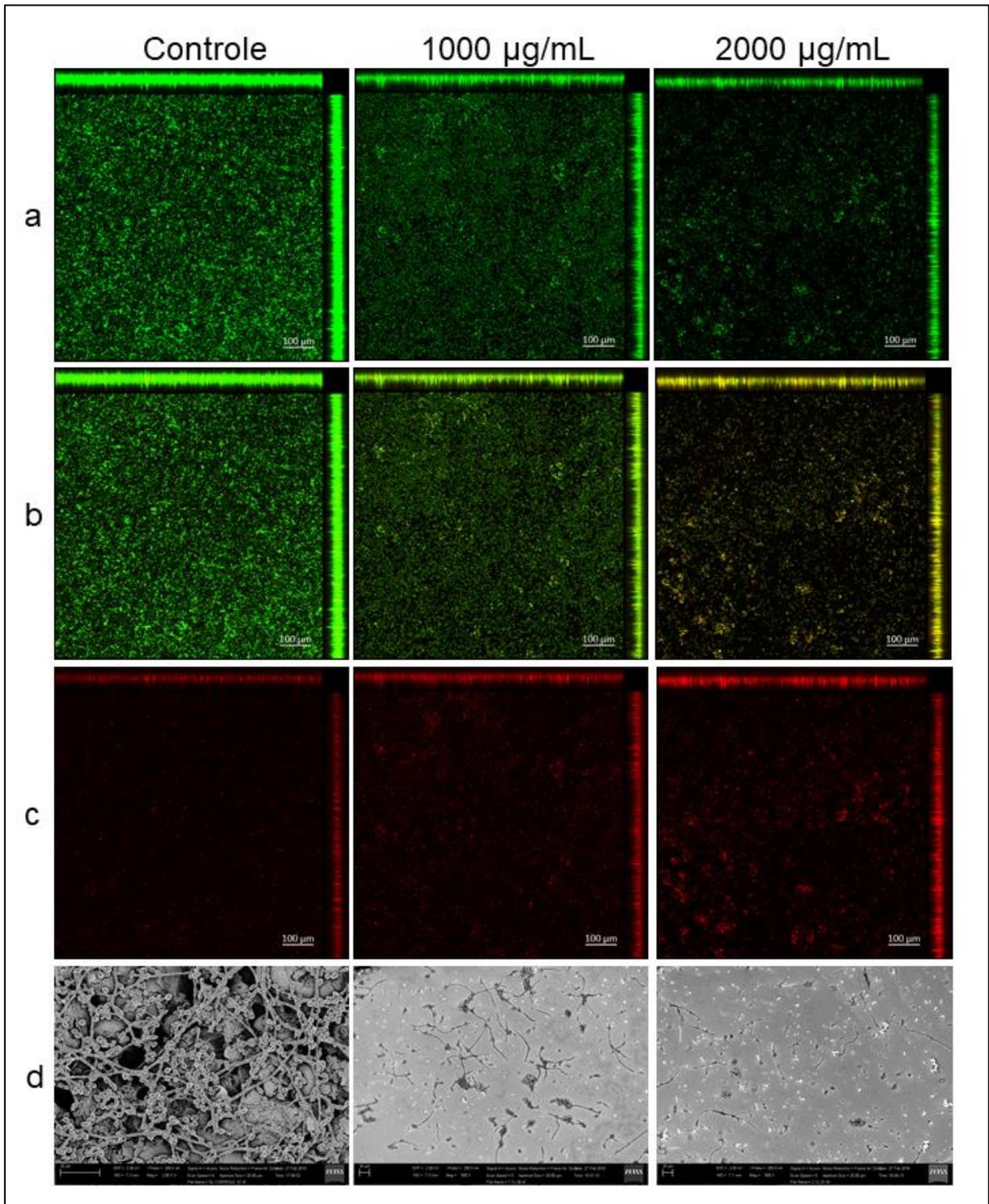
Fonte: Elaboração própria.

No entanto, as imagens de microscopia confocal da CI na ausência e presença de luz (Figura 22 e Figura 23) apresentam uma tonalidade de verde mais

escura, quando comparado ao grupo controle, o qual exibe uma tonalidade de verde mais clara e intensa. Esta diferença deve ser devido à alta concentração de microcristais (4000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$), os quais podem ter sido marcados com fluoróforos (Syto 9 e iodeto de propídio), apresentando diferentes tonalidades de cor (mais claro e mais escuro).

Os mesmos resultados podem ser observados em imagens de microscopia confocal com os microcristais em contato com *C. albicans*, na presença de luz. Embora as imagens demonstrem uma grande tonalidade de células vivas (pontos verdes), muitas células mortas podem ser observadas em quase a mesma proporção. Isso pode ser explicado, como descrito acima, através de uma possível marcação de Ag_3PO_4 , pois ao observar as imagens de MEV-EC e confocal (Figura 21 e Figura 23), há uma redução significativa de microrganismos ($p < 0,001$) em contato com Ag_3PO_4 , concordando com os dados apresentados no gráfico da Figura 19.

Figura 23 – Micrografias obtidas através de microscopia confocal em biofilme na presença de luz



Microscopia confocal (a – *C. albicans* vivo; b – Vivos e mortos; c – *C. albicans* morto) e MEV-EC (d) do biofilme de *C. albicans* formado na presença de fosfato de prata com luz.

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Dentre os materiais associados à Ag, o fosfato de prata é um dos mais versáteis, podendo ser utilizado como degradante de poluentes orgânicos²² na fabricação de sensores de gás⁹⁰, sensores solares fotocatalíticos⁹¹, conversores de CO₂ em combustível⁹² e agente fotocatalítico. Dependendo dos parâmetros utilizados na síntese, como temperatura e surfactantes, várias morfologias podem ser obtidas, como poliedros, círculos e também partículas com morfologia irregular, sendo a característica de fotocatalise dependente da morfologia do material⁸⁵.

Ag₃PO₄ é um excelente agente fotocatalítico, exibindo fantástica atividade durante a presença de luz⁸⁴, especialmente na luz UV, por absorver mais luz nesse comprimento de onda, como demonstrado na Figura 12. Neste estudo, utilizou-se um comprimento de onda na faixa de luz visível (azul) devido a este comprimento de onda ser utilizado comumente na odontologia e pelas evidências de produção de espécies reativas produzidas por esta faixa de luz azul¹⁰².

Apesar da região com maior sinal estar fora da região de luz azul, as partículas conseguiram ser estimuladas na presença desta luz, com uma absorbância de 1,252 u.a. com comprimento de onda de 455 nm, pois a energia de fóton da luz utilizada é maior que o “gap” energético do fosfato de prata. Esta informação vai de acordo com os resultados encontrados por Seo et al.¹⁹, os quais demonstraram que o fosfato de prata não é tão eficaz quando irradiado com luz vermelha, devido à sua energia de fóton não ser superior ao “gap” de energia do Ag₃PO₄.

À medida que o fosfato de prata está sendo irradiado com o comprimento de onda mais próximo da luz UV (máxima absorção), maior será a sua eficácia. Isto ocorre devido ao “GAP” presente no microcristal de fosfato de prata e o fóton de energia emitido pela luz. O intervalo energético presente no gap do fosfato de prata (band gap) é 2,24 eV (Figura 13). Sendo GAP a diferença de energia entre as bandas de valência e de condução de um semicondutor (Ag₃PO₄), os elétrons presentes na banda de valência (VB) são excitados energeticamente para a banda de condução (CB) quando a energia de fóton fornecida é superior ao gap do semicondutor⁸⁴, tornando-se fotoexcitável.

Para obter a energia do fóton no comprimento de onda usado, tem-se a relação Planck-Einstein, dada pela fórmula $E = hf^{118}$, onde f é a frequência de

oscilação e h uma constante Planck ($h = 4,14 \times 10^{-15}$ eV.s). Na física, no estudo da ondulatória, a velocidade da luz tem uma relação com o comprimento de onda e a frequência, expressada pela fórmula $c = \lambda \cdot f$ ¹⁹. A partir desta equação, a frequência ($f = c/\lambda$) é substituída na relação Planck-Einstein para encontrar uma nova equação e calcular a energia a partir do comprimento de onda ($E = hc/\lambda$). Sendo h e c duas constantes, tem-se uma equação alternativa para calcular a energia do fóton, dada por $E = 12400/\lambda$, em eV, tendo o valor de comprimento de onda λ necessariamente em Å-angstrom¹⁸.

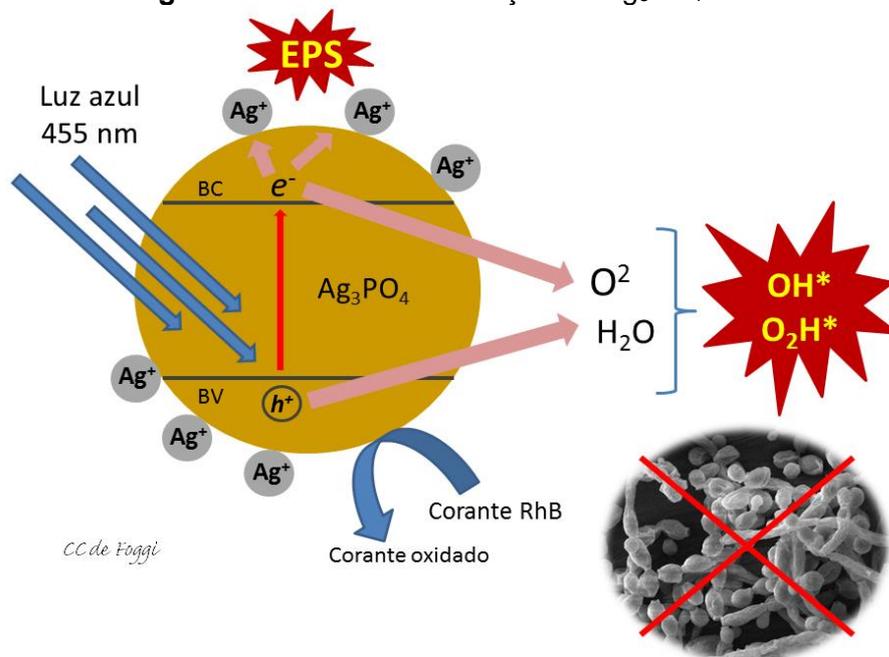
Assim, a energia de fóton da luz, com comprimento de onda 455 nm, é dada por 2,72 eV. Desta forma, o microcristal pode ser estimulado pela luz utilizada, sendo sua energia de fóton (2,72 eV) maior que o gap de energia do microcristal de fosfato de prata (2,24 eV)⁸⁴, sendo representativo nos testes microbiológicos deste estudo e nos de Seo et al.¹⁹.

Após cada exposição à luz, a degradação de Ag_3PO_4 ocorre gradualmente, como demonstrado nas imagens MEV-EC (Figura 18). Ao serem degradados, Ag_3PO_4 produz EROs, além da liberação de íons de prata⁸⁰, que a medida que o Ag_3PO_4 vai sendo iluminado, sua degradação vai ocorrendo, liberando íons de prata para o meio. Esses resultados corroboram com os dados fornecidos pelo ensaio de DRX, em que pode-se constatar as alterações ocorridas no “bulk” a longo alcance. Conforme as partículas vão sendo utilizadas, há um aumento na sua fase amorfa, e conseqüente diminuição da fase cristalina. A amorfização estrutural das amostras foram diretamente proporcionais à alteração morfológica do material. Adicionalmente, a amorfização também foi diretamente proporcional à capacidade fotocatalítica do material, sugerindo que a desorganização estrutural a longo alcance está relacionada com sua maior eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio. Dessa maneira, sugere-se que determinado grau de desordem, tanto estrutural quanto morfológico, é desejável para que ocorra maior eficiência do sistema.

Observou-se que a atividade fotocatalítica no corante rodamina diminui a cada novo ciclo (Figura 15), concordando com Chen et al.⁸⁸, com exceção do 4º ciclo. No entanto ocorre um aumento na velocidade de degradação do corante rodamina (Figura 16 e Figura 17). É conhecido que a fotocatalise ocorre quando a partícula é excitada no comprimento de onda adequado, fazendo com que elétrons migrem da banda de valência para a banda de condução e vice-versa, formando um

buraco. O elétron reage com o oxigênio do ar, e o buraco reage com H_2O , formando assim espécies reativas de oxigênio, como o O_2^- , O_2H e o radical OH^{120} . Quanto maior a facilidade do elétron se movimentar entre as camadas eletrônicas, maior será a geração de EROs, sendo a ordem estrutural determinante para que isso ocorra. Essas espécies reativas, além de fotodegradarem o corante rodamina, também são responsáveis pela inativação de microrganismos, dentre eles *C. albicans*. A Figura 24 apresenta o mecanismo de ação das partículas de Ag_3PO_4 quando submetidos à irradiação com luz azul (455 nm). Conforme as partículas são irradiadas, alterações morfológicas acontecem na superfície do material, sendo responsáveis pela liberação de íons Ag^+ , que são microbicidas. Além disso, a energia fornecida pela luz facilita a migração dos elétrons entre as camadas eletrônicas. Os buracos e elétrons quando reagem com H_2O e O_2 , respectivamente, são responsáveis pela geração de EROs, também microbicidas. Concomitantemente, o material sofre desordem estrutural a cada nova utilização, aumentando a geração de EROs, o que explica o comportamento fotocatalítico do Ag_3PO_4 ao decorrer dos ciclos.

Figura 24 - Mecanismo de ação do Ag_3PO_4



Mecanismo de ação de fotodegradação e inativação microbiana dos microcristais de Ag_3PO_4 sintetizados, submetidos à irradiação com luz (455 nm). EPS: efeito plasmônico de superfície; e^- : elétron; h^+ : buraco; BC: banda de condução; BV: banda de valência.

Fonte: Elaborado por Camila Cristina de Foggi, adaptado de Martin et al.⁸⁴

Dessa maneira, a irradiação por luz azul (455 nm) favorece a produção de EROs, atuando diretamente em uma maior velocidade de degradação do corante rodamina a cada novo ciclo de exposição à luz, e conseqüentemente na eliminação de *C. albicans*, quando comparado ao seu efeito antimicrobiano sem luz. Uma vez que a luz proporciona uma maior energia de fótons quando comparada ao gap energético presente no fosfato de prata, há uma maior recombinação de pares de elétrons e buracos, os quais reagem com o ar e a água, e geram radicais livres, especialmente superóxidos¹³.

Pesquisas foram realizadas avaliando a taxa de crescimento do microrganismo na presença de Ag_3PO_4 ¹⁷. No entanto, até o presente momento não há estudos na literatura relacionando a sua ação tanto contra biofilme como na presença do fungo *C. albicans*, como apresentado pelo presente estudo. Os altos valores de concentração inibitória e subinibitória observados no biofilme quando comparados a suspensão, se devem à sua maior complexidade e presença de uma matriz extracelular, sendo esta uma resistência inerente de biofilmes⁵⁵.

7 CONCLUSÃO

- O microcristal de fosfato de prata, sintetizado pelo método de co-precipitação, após quatro exposições de luz com comprimento de onda máximo a 455 nm, demonstrou a formação de prata cúbica (a partir de 1 exposição) e hexagonal (após 3 exposições);
- O microcristal de fosfato de prata apresentou uma morfologia arredonda e irregular, acentuando-se à cada nova exposição à luz;
- Observou-se um aumento na atividade fotocatalítica de Ag_3PO_4 , com aumento de velocidade na degradação do corante rodamina a cada novo ciclo, com exceção do 4º ciclo;
- Nos testes microbiológicos, o fosfato de prata apresentou atividade antifúngica tanto para a forma planctônica quanto para o biofilme em formação de *C. albicans*.
- A atividade antifúngica foi mais efetiva na presença de luz, com concentrações mais baixas quando comparadas a concentrações mais altas do microcristal na ausência de luz.
- Fosfato de prata possui atividade antifúngica, com efeito potencializado, na presença de luz na faixa azul.

REFERÊNCIAS*

1. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011; 20(4): 251–60.
2. Brawner DL, Cutler JE. Oral *Candida albicans* isolates from non hospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol*. 1989; 27(6): 1335–41.
3. Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W, Fiedoruk K, Sciepek M, Zaremba ML, et al. Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. *Adv Med Sci*. 2006; 51 Suppl 1: 77–80.
4. Lynch DP. Oral candidiasis: history, classification, and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994; 78(2): 189–93.
5. Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clin Dermatol*. 2016; 34(4): 487–94.
6. Pereira CA, Toledo BC, Santos CT, Pereira Costa ACB, Back-Brito GN, Kaminagakura E, et al. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 76(4): 419–24.
7. Zhang L-W, Fu J-Y, Hua H, Yan Z-M. Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2016; 22(3): 185–95.
8. Sesma N, Morimoto S. Estomatite protética: etiologia, tratamento e aspectos clínicos. *J Biodentistry Biomater*. 2011; 1(2): 24–9.
9. Andriole VT. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2000; 16(3): 317–21.
10. 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.
11. 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.
12. Fabbro MT, Foggi CC, Santos LPS, 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. *Dalt Trans*. 2016; 45(26): 10736–43.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. 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.
14. Longo E, Cavalcante LS, Volanti DP, Gouveia AF, Longo VM, 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.
15. Botelho G, Andres J, Gracia L, Matos LS, Longo E. Photoluminescence and photocatalytic properties of Ag₃PO₄ microcrystals: an experimental and theoretical investigation. *Chempluschem*. 2016; 81(2): 202–12.
16. Ando Y, Miyamoto H, Noda I, Sakurai N, Akiyama T, Yonekura Y, et al. Calcium phosphate coating containing silver shows high antibacterial activity and low cytotoxicity and inhibits bacterial adhesion. *Mater Sci Eng C*. 2010; 30(1): 175–80.
17. Liu JK, Luo CX, Wang JD, Yang XH, Zhong XH. Controlled synthesis of silver phosphate crystals with high photocatalytic activity and bacteriostatic activity. *Crystengcomm*. 2012; 14(24): 8714–21.
18. Botelho G, Sczancoski JC, Andres J, Gracia L, Longo E. Experimental and theoretical study on the structure, optical properties, and growth of metallic silver nanostructures in Ag₃PO₄. *J Phys Chem C*. 2015; 119: 6293–306.
19. Seo Y, Yeo BE, Cho YS, Park H, Kwon C, Huh YD. Photo-enhanced antibacterial activity of Ag₃PO₄. *Mater Lett*. 2017; 197: 146–9.
20. Wu A, Tian C, Chang W, Hong Y, Zhang Q, Qu Y, et al. Morphology-controlled synthesis of Ag₃PO₄ nano/microcrystals and their antibacterial properties. *Mater Res Bull*. 2013; 48(9): 3043–8.
21. Jiang J, Li L, Li K, Li G, You F, Zuo Y, et al. Antibacterial nanohydroxyapatite/polyurethane composite scaffolds with silver phosphate particles for bone regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2016; 27(16): 1584–98.
22. Zhu C, Zhang L, Jiang B, Zheng J, Hu P, Li S, et al. Fabrication of Z-scheme Ag₃PO₄/MoS₂ composites with enhanced photocatalytic activity and stability for organic pollutant degradation. *Appl Surf Sci*. 2016; 377: 99–108.
23. Yan F, Kopelman R. The embedding of meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin into silica nanoparticle platforms for photodynamic therapy and their singlet oxygen production and pH-dependent optical properties. *Photochem Photobiol*. 2003; 78(6): 587–91.
24. Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic therapy: past, present and future. *Chem Rec*. 2017; 17(8): 775–802.

25. Zeng L, Pan Y, Tian Y, Wang X, Ren W, Wang S, et al. Doxorubicin-loaded NaYF₄: Yb/Tm-TiO₂ inorganic photosensitizers for NIR-triggered photodynamic therapy and enhanced chemotherapy in drug-resistant breast cancers. *Biomaterials*. 2015; 57: 93–106.
26. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*. 2011; 55(1): 143–66.
27. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JHM, Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist*. 2006; 11(9): 1034–44.
28. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007; 86(8): 694–707.
29. Mima EG de O, Pavarina AC, Silva MM, Ribeiro DG, Vergani CE, Kurachi C, et al. Denture stomatitis treated with photodynamic therapy: five cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; 112(5): 602–8.
30. Lambrechts S a G, Aalders MCG, Marle J Van. Mechanistic Study of the Photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(5): 2026–34.
31. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93(2): 155–60.
32. Dovigo LN, Pavarina AC, De Oliveira Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*. 2011; 54(2): 123–30.
33. Brown GD, Denning DW, Levitz SM. Tackling human fungal infections. *Science*. 2012; 336(6082): 647.
34. Berkow EL, Lockhart SR. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect Drug Resist*. 2017; 10: 237–45.
35. Chow JK, Golan Y, Ruthazer R, Karchmer AW, Carmeli Y, Lichtenberg D, et al. Factors associated with candidemia caused by non-*albicans* *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(8): 1206–13.
36. Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Coretti C, Cuna T, et al. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection*. 2013; 41(3): 645–53.
37. Ericsson J, Chryssanthou E, Klingspor L, Johansson AG, Ljungman P, Svensson E, et al. Candidaemia in Sweden: a nationwide prospective observational survey. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19(4): E218-21.

38. Leroy O, Gangneux J-P, Montravers P, Mira J-P, Gouin F, Sollet J-P, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med*. 2009; 37(5): 1612–8.
39. Wiederhold NP. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect Drug Resist*. 2017; 10: 249–59.
40. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis*. 2013; 56(12): 1724–32.
41. Beyda ND, John J, Kilic A, Alam MJ, Lasco TM, Garey KW. FKS mutant *Candida glabrata*: risk factors and outcomes in patients with candidemia. *Clin Infect Dis*. 2014; 59(6): 819–25.
42. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surv. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(9): 3254–9.
43. Tan BH, Chakrabarti A, Li RY, Patel AK, Watcharananan SP, Liu Z, et al. Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: a laboratory-based surveillance study. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21(10): 946–53.
44. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis*. 2010; 14(11): e954-66.
45. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: a narrative review. *Eur J Intern Med*. 2016; 34: 21–8.
46. Green L, Dolen WK. Chronic Candidiasis in children. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017; 17(5): 31.
47. Budtz-Jørgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1975; 3(3): 115–9.
48. Lim CS-Y, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(1): 21–31.
49. Mafojane T, Shangase SL, Patel M. The effect of subinhibitory concentrations of gentian violet on the germ tube formation by *Candida albicans* and its adherence to oral epithelial cells. *Arch Oral Biol*. 2017; 82: 1–5.
50. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001; 9(7): 327–35.

51. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10(3): 359–83.
52. Desai J V., Mitchell AP. *Candida albicans* biofilm development and its genetic control. *Microbiol Spectr*. 2015; 3(3): 99–114.
53. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 75(2): 213–67.
54. Jung S-I, Rodriguez N, Irrizary J, Liboro K, Bogarin T, Macias M, et al. Yeast casein kinase 2 governs morphology, biofilm formation, cell wall integrity, and host cell damage of *Candida albicans*. *PLoS One*. 2017; 12(11): e0187721.
55. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015; 69: 71–92.
56. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004; 12(7): 317–24.
57. Ernst JF. Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology*. 2000;146(Pt 8):1763–74.
58. Mitchell AP. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 1998; 1(6): 687–92.
59. Dalle F, Wächtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*. 2010; 12(2): 248–71.
60. Moreno-Ruiz E, Galán-Díez M, Zhu W, Fernández-Ruiz E, D'Enfert C, Filler SG, et al. *Candida albicans* internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Cell Microbiol*. 2009; 11(8): 1179–89.
61. Martin R, Wächtler B, Schaller M, Wilson D, Hube B. Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol*. 2011; 301(5): 417–22.
62. Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol*. 2009; 35(4): 340–55.
63. Chanda W, Joseph TP, Wang W, Padhiar AA, Zhong M. The potential management of oral candidiasis using anti-biofilm therapies. *Med Hypotheses*. 2017; 106: 15–8.
64. 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(Pt 8): 999–1008.
65. Maillard J-Y, Hartemann P. Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Crit Rev Microbiol*. 2013; 39(4): 373–83.

66. de Oliveira RC, de Foggi CC, Teixeira MM, da Silva MDP, Assis M, Francisco EM, et al. Mechanism of antibacterial activity via morphology change of α -AgVO₃: theoretical and experimental insights. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017; 9(13): 11472–81.
67. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, et al. Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Lett Appl Microbiol*. 2012; 54(5): 383–91.
68. Politano AD, Campbell KT, Rosenberger LH, Sawyer RG. Use of silver in the prevention and treatment of infections: silver review. *Surg Infect (Larchmt)*. 2013; 14(1): 8–20.
69. Noronha VT, Paula AJ, Durán G, Galembeck A, Cogo-Müller K, Franz-Montan M, et al. Silver nanoparticles in dentistry. *Dent Mater*. 2017; 33(10): 1110–26.
70. Marx DE, Barillo DJ. Silver in medicine: the basic science. *Burns*. 2014; 40(S1): S9–18.
71. Hadrup N, Lam HR. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver--a review. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2014; 68(1): 1–7.
72. Sterling JP. Silver-resistance, allergy, and blue skin: truth or urban legend? *Burns*. 2014; 40 Suppl 1: S19-23.
73. Gray E, Taylor L. Using silver to help combat *Campylobacter* and other bacteria. *Perspect Public Health*. 2013; 133(6): 292–3.
74. Wright JB, Lam K, Hansen D, Burrell RE. Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. *Am J Infect Control*. 1999; 27(4): 344–50.
75. Moura JVB, Freitas TS, Cruz RP, Pereira RLS, Silva ARP, Santos ATL, et al. β -Ag₂MoO₄ microcrystals: characterization, antibacterial properties and modulation analysis of antibiotic activity. *Biomed Pharmacother*. 2017; 86: 242–7.
76. de Foggi CC, de Oliveira RC, Fabbro MT, Vergani CE, Andres J, Longo E, et al. Tuning the morphological, optical, and antimicrobial properties of α -Ag₂WO₄ microcrystals using different solvents. *Cryst Growth Des*. 2017; 17(12): 6239-46.
77. Chávez N. Efeito citotóxico de microcristais de tungstato de prata e de molibdato de prata em fibroblastos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2017.
78. Pimentel BNA da S. Avaliação da atividade antifúngica e citotoxicidade de microcristais de alfa vanadato de prata (α -AgVO₃) sintetizados em diferentes temperaturas [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2017.

79. Rai M, Birla S, Ingle AP, Gupta I, Gade A, Abd-Elsalam K, et al. Nanosilver: an inorganic nanoparticle with myriad potential applications. *Nanotechnol Rev.* 2014; 3(3). [Acesso em: 23 Jul. 2017] Disponível em: <https://www.degruyter.com/view/j/ntrev.2014.3.issue-3/ntrev-2014-0001/ntrev-2014-0001.xml?intcmp=trendmd>.
80. Eswar NK, Ramamurthy PC, Madras G. Enhanced sunlight photocatalytic activity of Ag₃PO₄ decorated novel combustion synthesis derived TiO₂ nanobelts for dye and bacterial degradation. *Photochem Photobiol Sci.* 2015; 14(7): 1227–37.
81. Özkaya E. A rare case of allergic contact dermatitis from silver nitrate in a widely used special patch test marker. *Contact Dermatitis.* 2009; 61(2): 120–2.
82. de Castro DT, Valente ML da C, Aires CP, Alves OL, dos Reis AC. Elemental ion release and cytotoxicity of antimicrobial acrylic resins incorporated with nanomaterial. *Gerodontology.* 2017; 34(3): 320–5.
83. Huang K, Lv Y, Zhang W, Sun S, Yang B, Chi F, et al. One-step synthesis of Ag₃PO₄/Ag photocatalyst with visible-light photocatalytic activity. *Mater Res.* 2015; 18(5): 939–45.
84. Martin DJ, Liu G, Moniz SJ a., Bi Y, Beale AM, Ye J, et al. Efficient visible driven photocatalyst, silver phosphate: performance, understanding and perspective. *Chem Soc Rev.* 2015; 44: 3–5.
85. Wang B, Wang L, Hao Z, Luo Y. Study on improving visible light photocatalytic activity of Ag₃PO₄ through morphology control. *Catal Commun.* 2015; 58: 117–21.
86. Lwood JME, Opson JJ. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer.* 1997; 73(2): 198–203.
87. Mamalis A, Koo E, Jagdeo J. Resveratrol prevents reactive oxygen species-induced effects of light-emitting diode-generated blue light in human skin fibroblasts. *Dermatol Surg.* 2016; 42(6): 727–32.
88. Chen X, Dai Y, Wang X, Guo J, Liu T, Li F. Synthesis and characterization of Ag₃PO₄ immobilized with graphene oxide (GO) for enhanced photocatalytic activity and stability over 2,4-dichlorophenol under visible light irradiation. *J Hazard Mater.* 2015; 292: 9–18.
89. Wang Z, Yin L, Zhang M, Zhou G, Fei H, Shi H, et al. Synthesis and characterization of Ag₃PO₄/multiwalled carbon nanotube composite photocatalyst with enhanced photocatalytic activity and stability under visible light. *J Mater Sci.* 2014; 49(4): 1585–93.
90. Ponomareva VG, Lavrova GV, Hairetdinov EF. Hydrogen sensor based on antimonium pentoxide-phosphoric acid solid electrolyte. *Sensors Actuators B Chem.* 1997; 40(2–3): 95–8.

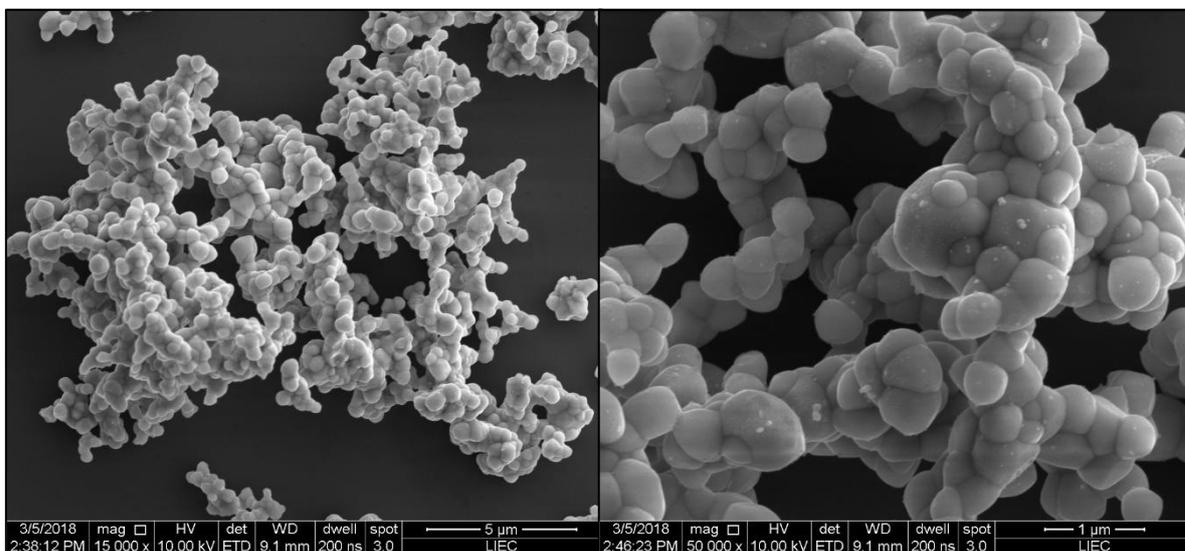
91. Cui X, Tian L, Xian X, Tang H, Yang X. Solar photocatalytic water oxidation over Ag₃PO₄/g-C₃N₄ composite materials mediated by metallic Ag and graphene. *Appl Surf Sci*. 2018; 430: 108–15.
92. He Y, Wang Y, Zhang L, Teng B, Fan M. A new application of Z-Scheme Ag₃PO₄/g-CeN₄ composite in converting CO₂ to fuel. *Environ Sci Technol*. 2015; 49(1): 649-56.
93. Piccirillo C, Pinto RA, Tobaldi DM, Pullar RC, Labrincha JA, Pintado MME, et al. Light induced antibacterial activity and photocatalytic properties of Ag/Ag₃PO₄ -based material of marine origin. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2015; 296: 40–7.
94. Ribeiro JN, Flores AV, Mesquita RC, Nicola JH, Nicola EMD. Terapia fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. *Physicae*. 2005; 5(5). [Acesso em: 28 Set. 2017]. Disponível em: <https://physicae.ifi.unicamp.br/physicae/article/view/physicae.5.2>
95. Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic therapy. *Dermatol Clin*. 2014; 32(3): 415–25.
96. Fink C, Enk A, Gholam P. Photodynamic therapy--aspects of pain management. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2015; 13(1): 15–22.
97. Sperandio FF, Huang Y-Y, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2013; 8(2): 108–20.
98. Trindade AC, De Figueiredo JAP, Steier L, Weber JBB. Photodynamic therapy in endodontics: a literature review. *Photomed Laser Surg*. 2015; 33(3): 175–82.
99. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1990; 6(1–2): 143–8.
100. Tschen EH, Wong DS, Pariser DM, Dunlap FE, Houlihan A, Ferdon MB, et al. Photodynamic therapy using aminolaevulinic acid for patients with nonhyperkeratotic actinic keratoses of the face and scalp: phase IV multicentre clinical trial with 12-month follow up. *Br J Dermatol*. 2006; 155(6): 1262–9.
101. Berg K. Resistance mechanisms in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2015; 14(8): 1376–7.
102. Lockwood DB, Wataha JC, Lewis JB, Tseng WY, Messer RLW, Hsu SD. Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. *Dent Mater*. 2005; 21(7): 683–8.
103. Fukui M, Yoshioka M, Satomura K, Nakanishi H, Nagayama M. Specific-wavelength visible light irradiation inhibits bacterial growth of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2008; 43(2): 174–8.

104. Soukos NS, Som S, Abernethy AD, Ruggiero K, Dunham J, Lee C, et al. Phototargeting oral black-pigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(4): 1391–6.
105. Feuerstein O, Persman N, Weiss EI. Phototoxic effect of visible light on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: an in vitro study. *Photochem Photobiol.* 2004; 80(3): 412–5.
106. Javed F, Samaranayake LP, Romanos GE. Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence. *Photochem Photobiol Sci.* 2014; 13(5): 726–34.
107. Varshney D, Verma K. Effect of stirring time on size and dielectric properties of SnO₂ nanoparticles prepared by co-precipitation method. *J Mol Struct.* 2013; 1034: 216–22.
108. Sreedevi A, Priyanka KP, Babitha KK, Aloysius Sabu N, Anu TS, Varghese T. Chemical synthesis, structural characterization and optical properties of nanophase α -Ag₂WO₄. *Indian J Phys.* 2015; 89(9): 889–97.
109. Nowak M, Kauch B, Szperlich P. Determination of energy band gap of nanocrystalline SbSI using diffuse reflectance spectroscopy. *Rev Sci Instrum.* 2009; 80(4): 46107.
110. Philips-Invernizzi B. Bibliographical review for reflectance of diffusing media. *Opt Eng.* 2001; 40(6): 1082-92.
111. Tolvaj L, Mitsui K, Varga D. Validity limits of Kubelka–Munk theory for DRIFT spectra of photodegraded solid wood. *Wood Sci Technol.* 2011; 45(1): 135–46.
112. Wood DL, Tauc J. Weak absorption tails in amorphous semiconductors. *Phys Rev B.* 1972; 5(8): 3144–51.
113. Campos AB. Preparação e caracterização de pós cerâmicos de Ca(Mo,W)O₄ obtidos pelo método dos precursores poliméricos [Tese de Doutorado]. Araraquara: Instituto de Química da Unesp; 2007.
114. Cavalcante LS. Ordem-desordem: uma avaliação estrutural do Ba(ZrxTi1-x)O₃ [Tese de Doutorado]. São Carlos: Instituto de Química da UFSCar; 2009.
115. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80(3): 903–8.
116. Martinez-Gutierrez F, Olive PL, Banuelos A, Orrantia E, Nino N, Sanchez EM, et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine* 2010; 6(5): 681–8.
117. Ali R, Abdul-Munem O, Abd A. Study the spectroscopic characteristics of rhodamine B dye in ethanol and methanol mixture and calculation the quantum efficiency. *Csw-JournalOrg.* 2012; 9(2): 352–8.

118. Nussenzveig HM. Curso de física básica. São Paulo: Edgard Blücher; 2010. 437 p.
119. Bonjorno RA, Bonjorno JR, Bonjorno V, Ramos CM. Física completa. 2. ed. São Paulo: FTD; 2001. 551 p.
120. Ohtani B. Preparing articles on photocatalysis—beyond the illusions, misconceptions, and speculation. Chem Lett. 2008; 37(3): 216–29.

APÊNDICE A – IMAGENS DE MEV-EC AMPLIADAS

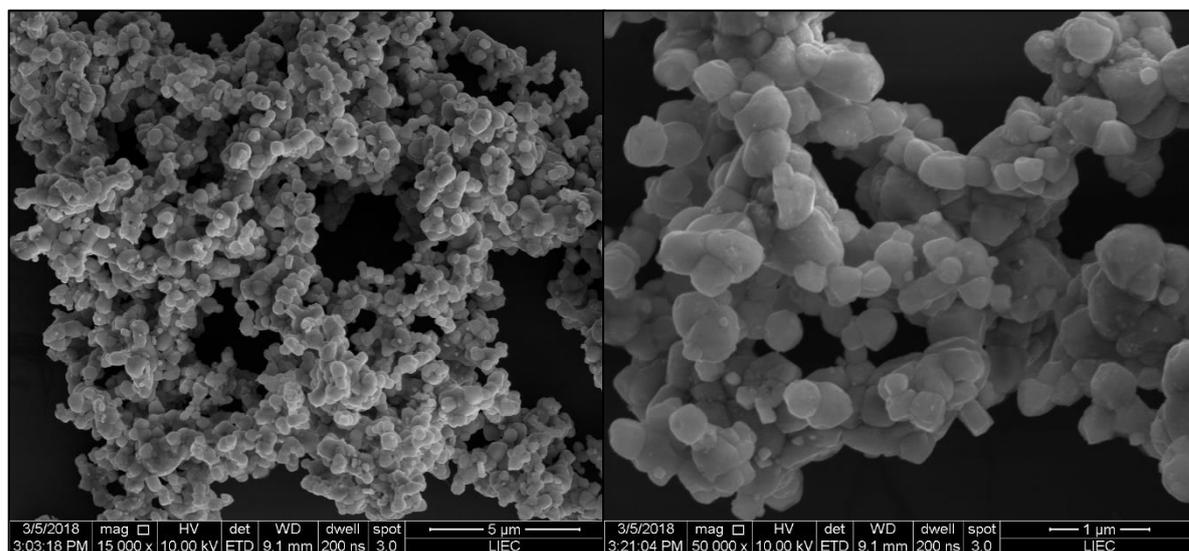
Figura A1 - Fosfato de prata puro



Fosfato de prata na forma pura, sem exposição à luz.

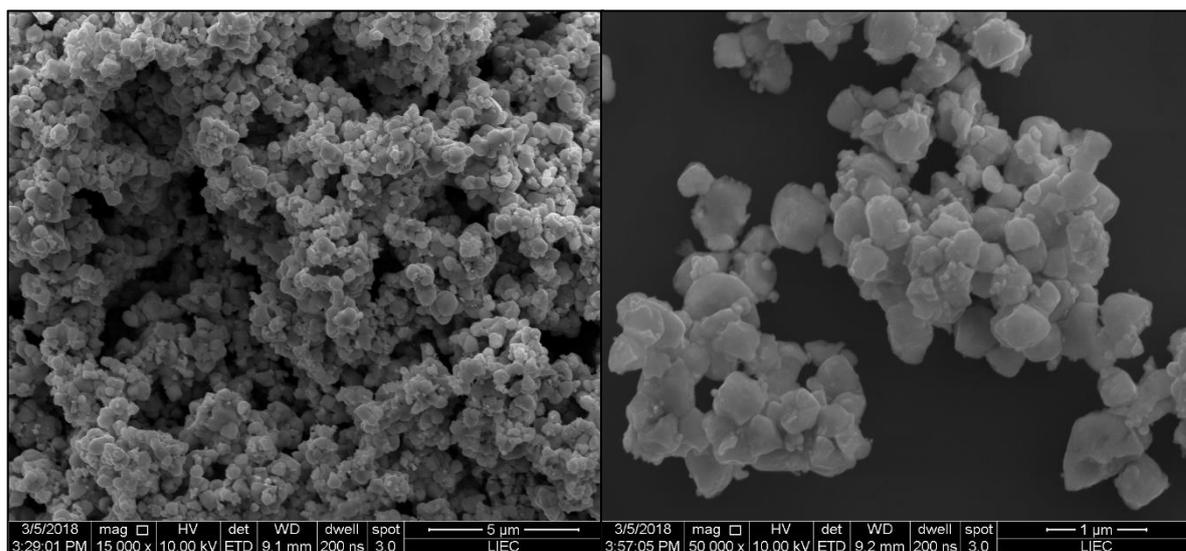
Fonte: Elaboração própria.

Figura A2 - Fosfato de prata após 1 exposição à luz



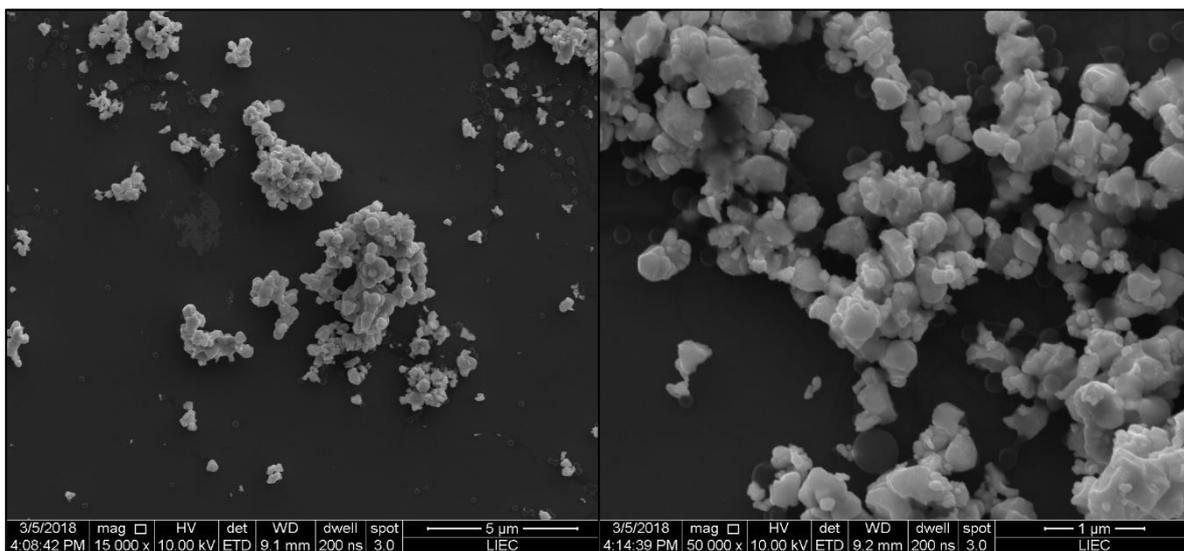
Fosfato de prata após 1 exposição de luz azul (455 nm) por 30 minutos (55,8 J/cm²).

Fonte: Elaboração própria.

Figura A3 - Fosfato de prata após 2 exposições à luz

Fosfato de prata após 2 exposições de luz azul (455 nm) por 30 minutos (55,8 J/cm²).

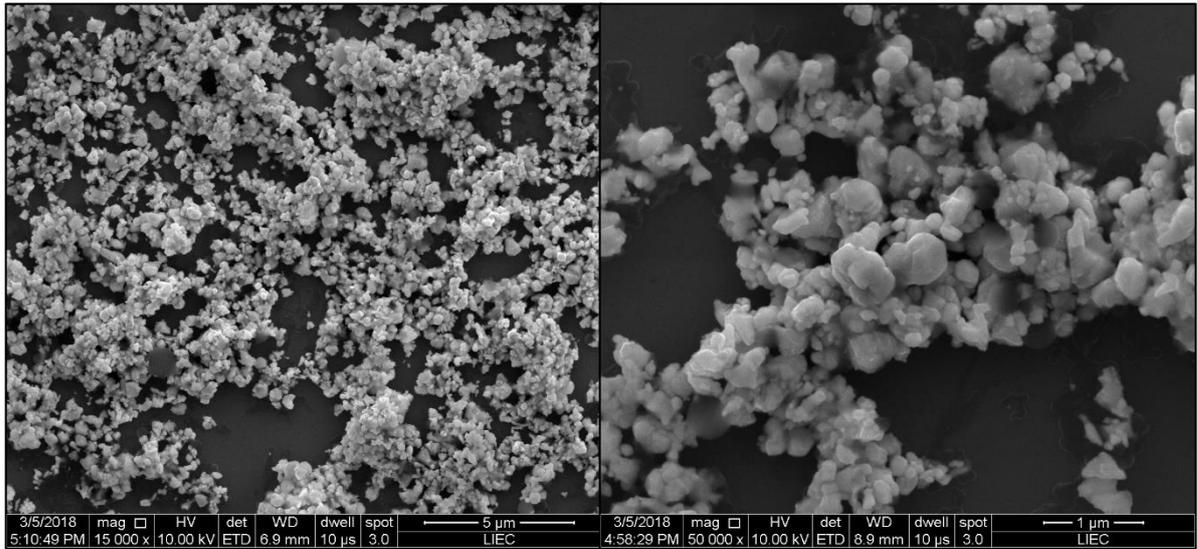
Fonte: Elaboração própria.

Figura A4 - Fosfato de prata após 3 exposições à luz

Fosfato de prata após 3 exposições de luz azul (455 nm) por 30 minutos (55,8 J/cm²).

Fonte: Elaboração própria.

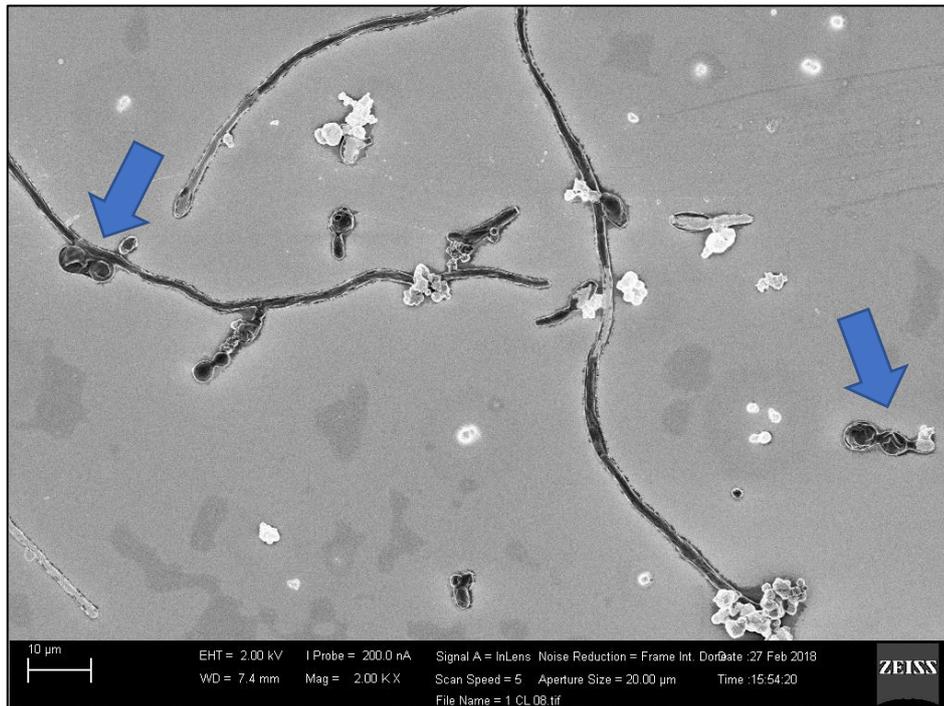
Figura A5 - Fosfato de prata após 4 exposições à luz



Fosfato de prata após 1 exposição de luz azul (455 nm) por 30 minutos (55,8 J/cm²).

Fonte: Elaboração própria.

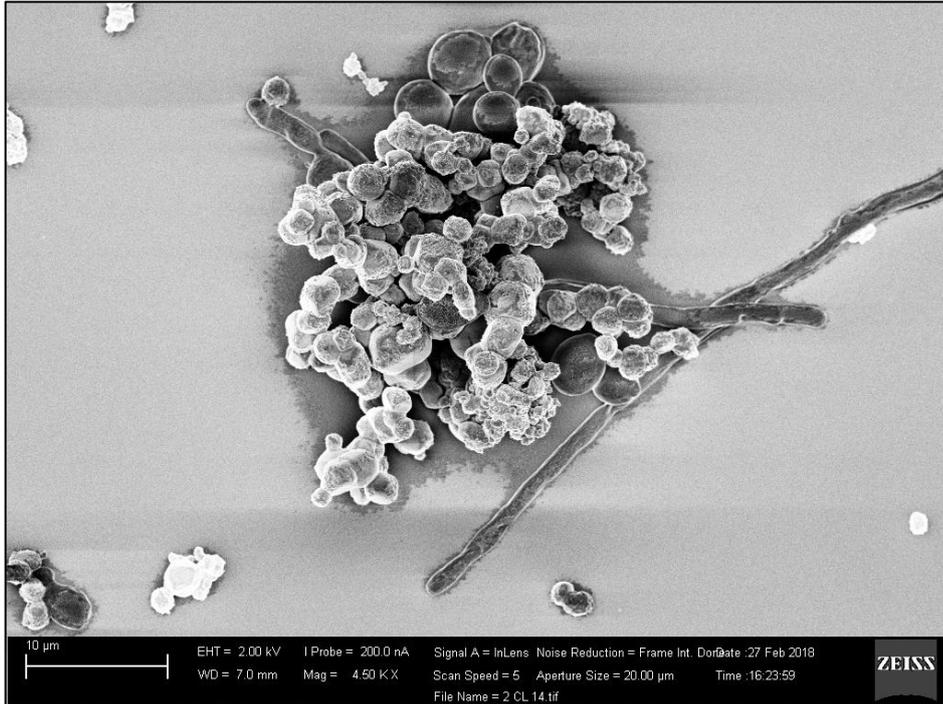
Figura A6 – Biofilme exposto à luz (1000 µg/mL)



Biofilme de *C. albicans*, na concentração de 1000 µg/mL, após exposição à luz por 30 minutos (55,8 J/cm²). Observa-se alteração na morfologia celular como indicado pelas setas.

Fonte: Elaboração própria.

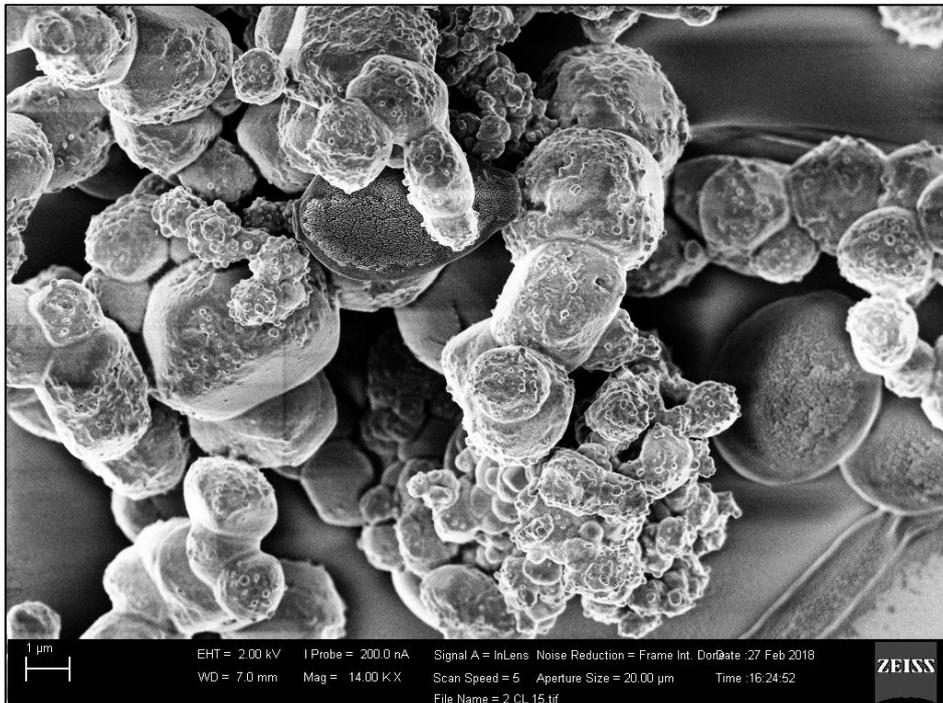
Figura A7 - Biofilme exposto à luz (2000 µg/mL)



Biofilme de *C. albicans*, na concentração de 2000 µg/mL, após exposição à luz por 30 minutos (55,8 J/cm²). Observa-se uma maior quantidade de fosfato de prata envolta de *C. albicans*.

Fonte: Elaboração própria.

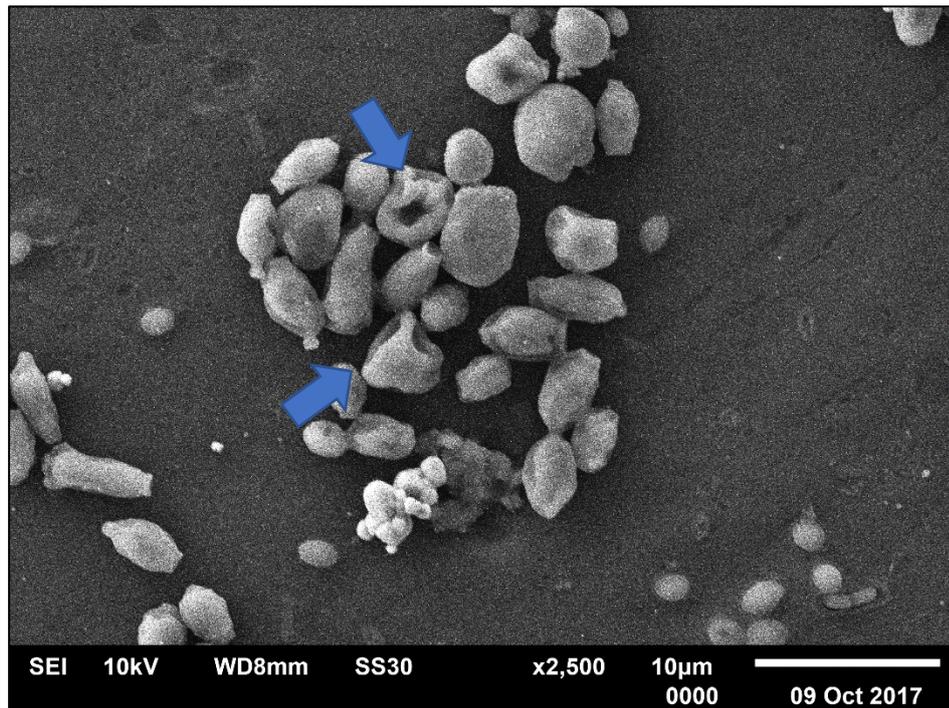
Figura A8 - Biofilme na presença de luz com maior magnificação (14000x)



Biofilme de *C. albicans*, em uma imagem de MEV-EC com maior magnificação, mostrando o contato direto com o fosfato de prata.

Fonte: Elaboração própria.

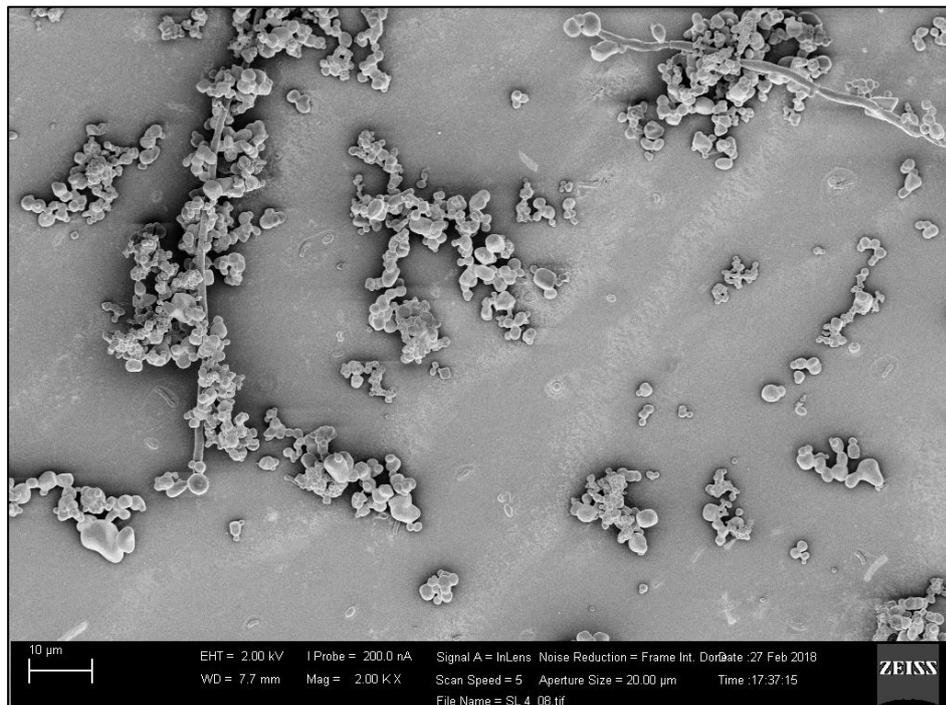
Figura A9 - Biofilme não exposto à luz (2000 $\mu\text{g/mL}$)



Biofilme de *C. albicans*, na concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$. Observa-se alteração na morfologia celular como indicado pelas setas.

Fonte: Elaboração própria.

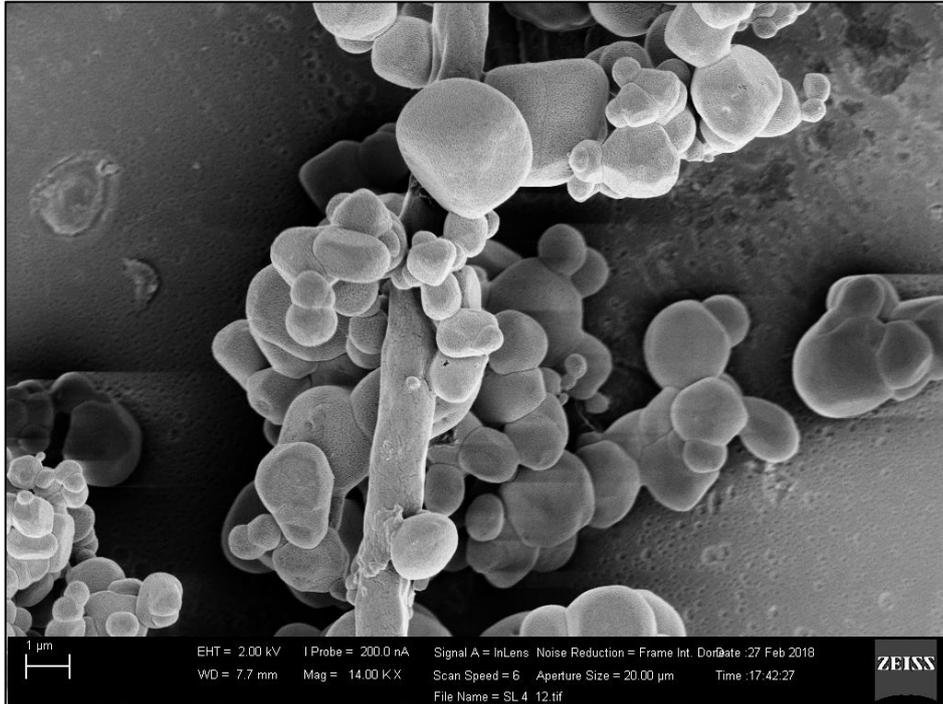
Figura A10 - Biofilme não exposto à luz (4000 $\mu\text{g/mL}$)



Biofilme de *C. albicans*, na concentração de 4000 $\mu\text{g/mL}$. Observa-se uma grande quantidade de fosfato de prata em contato com *C. albicans*.

Fonte: Elaboração própria.

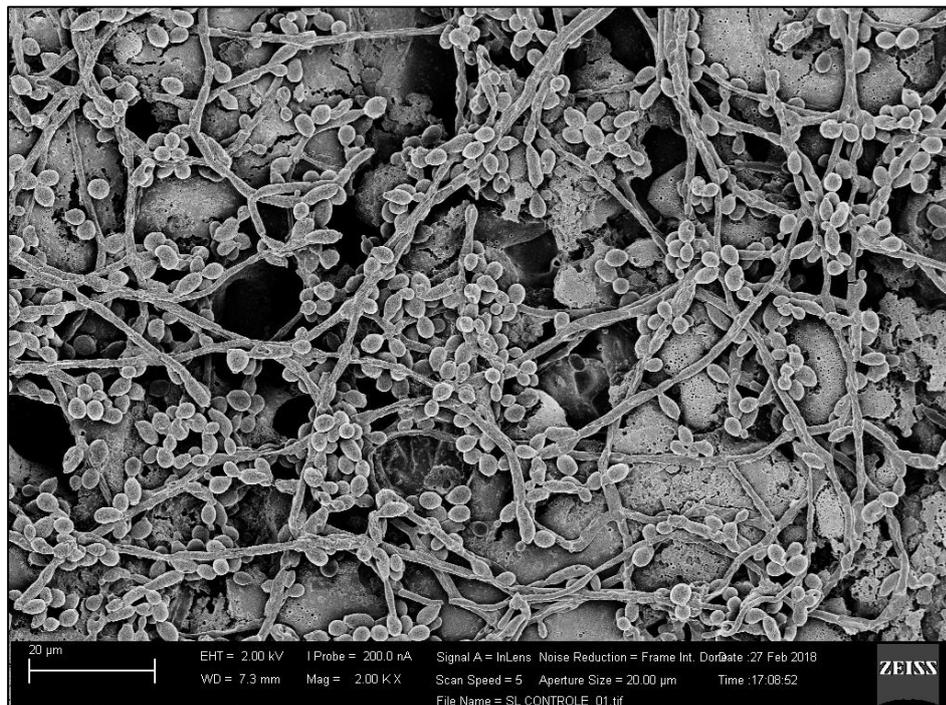
Figura A11 - Biofilme na ausência de luz com maior magnificação (14000x)



Biofilme de *C. albicans*, em uma imagem de MEV-EC com maior magnificação, mostrando o contato direto do microrganismo com o fosfato de prata.

Fonte: Elaboração própria.

Figura A12 - Controle negativo de tratamento



Controle negativo de tratamento, ou seja, *C. albicans* sem a presença de fosfato de prata.

Fonte: Elaboração própria.

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de
defesa**

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 04 de Maio de 2018.

Lucas Portela Oliveira