



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



BRUNA NATÁLIA ALVES DA SILVA PIMENTEL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CITOTOXICIDADE DE
MICROCRISTAIS DE ALFA VANADATO DE PRATA (α -AgVO₃) SINTETIZADOS
EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

Araraquara

2017



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



BRUNA NATÁLIA ALVES DA SILVA PIMENTEL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CITOTOXICIDADE DE
MICROCRISTAIS DE ALFA VANADATO DE PRATA (α -AgVO₃) SINTETIZADOS
EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

Araraquara

2017

Pimentel, Bruna Natália Alves da Silva
Avaliação da atividade antifúngica e citotoxicidade de microcristais de alfa vanadato de prata (α -AgVO₃) sintetizados em diferentes temperaturas / Bruna Natália Alves da Silva Pimentel.-- Araraquara: [s.n.], 2017.
67 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

1. Candida albicans 2 . Antifúngicos 3.Testes de toxicidade 4.
Queratinócitos I. Título

BRUNA NATÁLIA ALVES DA SILVA PIMENTEL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CITOTOXICIDADE DE
MICROCRISTAIS DE ALFA VANADATO DE PRATA (α -AgVO₃) SINTETIZADOS
EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

2º Examinador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Andréa Cândido dos Reis

Araraquara, 30 de junho de 2017

DADOS CURRICULARES

BRUNA NATÁLIA ALVES DA SILVA PIMENTEL

Nascimento	06 de novembro de 1990, São Paulo – SP
Filiação	Antonio Luiz Pimentel Maria do Carmo Alves da Silva
2009 a 2014	Curso de Graduação pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia – UFBA
2011 a 2011	Extensão Universitária em Odontologia Hospitalar no Hospital Ana Nery (HAN) pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia - UFBA
2011 a 2012	Extensão Universitária em Monitoria Voluntária nas Disciplinas de Patologia Geral e Estomatologia II da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia – UFBA
2012 a 2014	Extensão Universitária em Grupo de Pesquisa em Imaginologia Dentomaxilofacial (CEPOV) pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia – UFBA
2013 a 2014	Extensão Universitária em Monitoria Voluntária na Disciplina de Prótese Parcial Fixa II pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia – UFBA
2015 a 2017	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – UNESP
2015 a 2016	Estágio docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível I e II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - UNESP

Agradecimentos

À Deus, por me conceder o dom da vida, por me presentear com a melhor família que alguém poderia ter, por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho, por me dar forças quando eu mais precisei, por tudo que Ele tem feito por mim.

Aos meus pais, Antonio Luiz Pimentel e Maria do Carmo Alves da Silva, por sempre acreditarem e confiarem em mim, mesmo quando eu achava que não seria capaz. Obrigada por todos os ensinamentos, os incentivos e os puxões de orelha. Se sou o que sou hoje é graças a vocês!

Aos meus irmãos, Felipe, Gabriel e Júlia, por encherem minha vida de alegria e serem a minha certeza de nunca estar sozinha. Amo vocês três incondicionalmente!

Ao meu noivo, minha alma gêmea, meu melhor amigo, Hugo, por estar sempre ao meu lado independente de qualquer coisa, por me apoiar, ficar acordado nas madrugadas comigo e acompanhar as minhas loucuras. Tenho certeza de que boa parte do meu sucesso se deve ao seu apoio incondicional! Muito obrigada, meu anjo!

À minha segunda família, família do meu noivo, em especial à Maria Angela, Jorge, Mauro, Marcelo, Marcela, Maria Júlia, Helena, Celeste, que me acolheram com tanto amor e carinho, me tornando membro da família de vocês. Não tenho palavras para agradecê-los!

Aos meus amigos, Deise, Bruna, Marina, Alessandra, Filipe, Henrique, que mesmo de longe e sem saber continuam a me apoiar. Cada mensagem de vocês me dá forças para continuar minha jornada!

Aos meus Mestres e Inspiradores da Universidade Federal da Bahia, em especial ao Prof. Dr. Luciano Castellucci e à Prof^a. Dr^a. Viviane Sarmiento, vocês enxergaram um potencial em mim e me forçaram a enxergá-lo, me incentivaram ao máximo e até hoje me acompanham vibram com minhas vitórias. Serei eternamente grata a vocês!

À minha mãe de coração, Nilda, por seu amor, carinho e incentivo. Posso afirmar que minha vida passou a ter mais cores depois que te conheci!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani, por confiar em mim e compartilhar todo o seu conhecimento comigo. Obrigada pelos desafios propostos, eles com certeza me engrandeceram como pessoa e profissional!

Às minhas “orientadoras de coração” Camila Foggi e Paula Barbugli, pelo acompanhamento, pelos ensinamentos e pela amizade. Vocês foram dois anjos que Deus colocou no meu caminho!

Aos professores da Prótese Parcial Removível, Ana Cláudia, Janaína, Paula e Ewerton, e à professora Marlise, por todo o conhecimento compartilhado e pela ótima convivência.

Aos amigos que a Pós-Graduação me deu, em especial Gabriela, Suelen, Jacqueline, Camila, Beatriz, Fernanda, Jéssica, Geise e Isabel. Vocês tornaram essa caminhada mais leve e divertida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo financiamento desta pesquisa através da bolsa de mestrado (Proc. 2015/13834-2) e do CEPID (Proc. 2013/07296-2).

Aos professores da banca, por aceitarem o convite e dedicarem uma parte de seu tempo ajudando a enriquecer o meu trabalho.

Às bibliotecárias da F.O.Ar. – UNESP, pela prontidão e paciência em todos os momentos em que fui buscar auxílio.

A todos os meus mais sinceros agradecimentos e minha eterna gratidão!

“Alone we can do so little, together we can do so much!”

(Helen Keller)

Pimentel BNAS. 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.

RESUMO

Nos últimos anos, os microcristais de prata têm se tornado foco de estudos. Uma das propriedades evidenciadas destes materiais é a sua atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos, devido a presença da prata na sua composição. Neste estudo, investigou-se a atividade antifúngica de microcristais de alfa vanadato de prata (α -AgVO₃) contra *Candida albicans* (ATCC 90028) e sua citotoxicidade sobre células do tipo queratinócitos orais normais espontaneamente imortalizados (NOK-si). Os microcristais de α -AgVO₃ foram sintetizados pelo método da co-precipitação sob três diferentes temperaturas (10, 20 e 30°C) e caracterizados através de difração de raios-x, microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo e espectroscopia Raman. A atividade antifúngica foi avaliada a partir da microdiluição seriada dos microcristais (de acordo com o *Clinical & Laboratorial Standards Institute* - CLSI), onde foram determinadas as concentrações inibitória (CIM) e fungicida mínimas (CFM). Imagens de microscopia de fluorescência com os microcristais nas concentrações inibitória e fungicida mínimas foram obtidas a fim de confirmar os achados microbiológicos. A viabilidade celular de células NOK-si foi avaliada através do ensaio Alamar Blue, e imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de todos os grupos avaliados foram realizadas. Nos ensaios celulares foram utilizadas apenas quatro concentrações dos microcristais (CIM, CFM, CIM diluída 10 vezes e concentrada 10 vezes). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e então avaliados com o teste Kruskal-Wallis, seguidos do pós teste de Dunn ($\alpha = .05$), no software GraphPad Prism 7. Os três microcristais apresentaram os mesmos valores de CIM e CFM (3,90 μ g/mL e 15,62 μ g/mL, respectivamente). Ao avaliar a microscopia de fluorescência foi possível confirmar os resultados obtidos com o ensaio microbiológico, onde na CIM notou-se uma redução do número de células em comparação ao controle, e na CFM notou-se inviabilidade de todas as células. Quando avaliados com relação a citotoxicidade, os três microcristais apresentaram-se biocompatíveis nos valores de CIM, CFM e CIM diluída 10 vezes ($p < 0,05$). As imagens de MEV foram consistentes com os achados no ensaio de Alamar Blue, onde apenas observou-se morte celular na concentração CIM concentrada 10 vezes. Através da morfologia da morte celular, sugeriu-se que os microcristais avaliados causam morte celular por necrose. Os três microcristais de α -AgVO₃ mostraram resultados promissores como agentes antifúngicos contra *C. albicans* e apresentaram biocompatibilidade com o tipo celular estudado, tornando-os interessante para posteriores estudos *in vivo*.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Antifúngicos. Testes de toxicidade. Queratinócitos.

Pimentel BNAS. Evaluation of antifungal activity and cytotoxicity of alpha silver vanadate (α -AgVO₃) microcrystals synthesized in different temperatures [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

In recent years, silver microcrystals have become the focus of studies. One property of these materials is its antimicrobial activity against different microorganisms, which is due to the presence of silver in its composition. In this study the antifungal activity of alpha silver vanadate (α -AgVO₃) microcrystals against *Candida albicans* (ATCC 90028) and cytotoxicity on normal oral keratinocytes spontaneously immortalized (NOK-si) cells were investigated. The microcrystals were synthesized by co-precipitation (CP) method under three different temperatures (10, 20 and 30°C) and were characterized by x-ray diffraction, scanning electronic microscopy field emission guns and Raman spectroscopy. The antifungal activity was evaluated from serial microdilution of microcrystals (according to Clinical & Laboratorial Standards Institute - CLSI), where minimum inhibitory (MIC) and fungicide (MFC) concentrations were determined. Fluorescence microscopy images were obtained in order to confirm microbiological findings. Cell viability of NOK-si cells was evaluated by Alamar Blue assay, and scanning electron microscopy (SEM) images of all groups were performed. In these tests, only four concentrations of microcrystals (MIC, MFC, MIC 10 times diluted and MIC 10 times concentrated) were used. The results were submitted to Shapiro-Wilk's test, and then they were evaluated using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test ($\alpha = .05$), in GraphPad Prism 7 software. All three microcrystals presented the same values of MIC and MFC (3.90 μ g/mL and 15.62 μ g/mL, respectively). When evaluated fluorescence microscopy it was possible to confirm the results obtained with the microbiological assay, where at the MIC noticed a reduction in cell number when compared with the control, and at the MFC noticed unviability of all cells. When evaluated for its cytotoxicity, the three microcrystals were biocompatible in the MIC, MFC and MIC 10 times diluted values ($p < 0.05$). SEM images were consistent with the findings in the Alamar Blue assay, where cell death was observed only at MIC 10 times concentrated. Through the morphology analyses of cell death, it was observed that the microcrystals at MIC 10 times concentrated caused cell death by necrosis. The three α -AgVO₃ microcrystals showed promising results as antifungal agents against *C. albicans* and showed biocompatibility with the studied cell type, making them interesting for later in vivo studies.

Keywords: *Candida albicans*. Antifungal agents. Toxicity tests. Keratinocytes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 <i>Candida albicans</i>	13
2.2 Atividade Antimicrobiana Dos Compostos Contendo Prata	14
2.3 Biocompatibilidade Dos Compostos Contendo Prata	20
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MATERIAL E MÉTODO	24
4.1 Material	24
4.2 Método	28
4.2.1 Síntese dos microcristais	28
4.2.2 Ensaio microbiológico	29
4.2.2.1 <i>Microrganismo e condições de cultivo</i>	29
4.2.2.2 <i>Ensaio de concentrações inibitória (CIM) e fungicida (CFM) mínimas</i> .	30
4.2.2.3 <i>Microscopia de fluorescência</i>	32
4.2.3 Ensaio de biocompatibilidade <i>in vitro</i>	32
4.2.3.1 <i>Célula e condições de cultivo</i>	32
4.2.3.2 <i>Ensaio de viabilidade celular (Ensaio de Alamar Blue)</i>	33
4.2.3.3 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	34
4.2.4 Análise estatística	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Ensaio De Concentrações Inibitória (CIM) e Fungicida (CFM) Mínimas	36
5.2 Microscopia De Fluorescência	36
5.3 Ensaio De Viabilidade Celular (Ensaio De Alamar Blue)	40
5.4 Microscopia Eletrônica De Varredura (MEV)	47
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE A	63

1 INTRODUÇÃO

Infecções causadas por fungos oportunistas têm surgido como importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, e permanecem como um grande desafio. Mais de 90% das infecções fúngicas invasivas são causadas por espécies de *Candida* e, aproximadamente, 40% das infecções na corrente sanguínea são causadas por *Candida albicans*²³. *C. albicans* é um fungo comensal oportunista, o qual é frequentemente encontrado na cavidade oral^{3, 28, 29, 31} e, quando associado à fatores locais e/ou sistêmicos, como envelhecimento, doenças crônicas ou imunossupressoras, utilização de medicamentos (antibióticos de amplo espectro e imunossupressores), xerostomia, higienização precária e utilização de próteses dentárias removíveis²⁸, se torna virulento podendo causar infecções recorrentes na mucosa oral^{28, 33}, além de infecções disseminadas pelo corpo, as quais podem ser um risco para a vida³³.

Dentre as infecções bucais associadas à *Candida* spp., a estomatite protética, caracterizada por diferentes graus de inflamação da mucosa que mantém contato com a prótese, é a manifestação mais prevalente, acometendo de 60-65% dos usuários de próteses com diversas manifestações clínicas. Contudo, se os indivíduos sem sintomatologia forem levados em consideração, este número sobe para 75% dos usuários de próteses removíveis²⁸. A presença dessa patologia bucal pode contribuir para o desenvolvimento de infecções sistêmicas, sobretudo em pacientes hospitalizados, idosos e imunossuprimidos²⁹. *C. albicans* pode se desenvolver como células leveduriformes (blastóporos) ou células alongadas em forma de tubo, denominadas pseudohifas (septadas) ou hifas (não septadas)^{29, 33}. O fato deste microrganismo possuir diferentes morfologias está associado à sua virulência^{29, 33}. Quando nas formas de hifas e pseudohifas, *C. albicans* é capaz de invadir tecidos durante os estágios iniciais da infecção, além de ser importante na colonização de órgãos; enquanto que a forma de blastóporos é mais associada com a disseminação via corrente sanguínea³³.

Os fungos têm se destacado entre os microrganismos citados como causadores de doenças humanas²⁹. Um problema enfrentado pela comunidade médico/farmacêutica com relação ao desenvolvimento de novas drogas contra fungos é a similaridade destes microrganismos com as células humanas, o que diminui o

número de alvos que podem ser explorados pelos fármacos²⁹. Atualmente há uma enorme demanda por novas terapias para inativação de microrganismo patogênicos e controle de infecções devido aos problemas relacionados à resistência dos microrganismos às terapias medicamentosas existentes, além do surgimento de outras espécies resistentes^{23, 31}. Dentro desse contexto, estudos recentes têm avaliado a atividade antimicrobiana de diversas micropartículas (microcristais) contendo prata^{10, 22, 25}.

Por apresentar atividade antimicrobiana e pela baixa propensão em causar resistência dos microrganismos, a prata tem sido amplamente utilizada no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos²⁷. O mecanismo de ação antimicrobiana da prata envolve duas teorias diferentes: uma delas afirma que este metal pode reagir com a água e liberar íons, os quais se ligariam às proteínas da parede celular, causando alterações estruturais na parede celular bacteriana. Desta forma, estes materiais contendo prata inativariam os microrganismos, provavelmente, por meio da inibição da síntese de ATP, desnaturação do DNA e bloqueio das cadeias respiratórias, atuando em algumas enzimas¹⁸. A segunda teoria sugere que a prata poderia reagir com o oxigênio dissolvido na água e gerar radicais livres de oxigênio ativo, que são tóxicos para as bactérias²².

Apesar de sua excelente propriedade antimicrobiana, a depender da quantidade a prata pode ser tóxica às células dos mamíferos². Em uma tentativa de melhorar as propriedades antimicrobianas e reduzir os efeitos citotóxicos deste importante metal, a prata tem sido associada a diversos outros metais, entre eles o vanádio, com o intuito de diminuir a concentração no composto para a mínima possível. Os óxidos de vanádio e seus derivados são estruturas de interesse devido às suas atividades de oxirredução e por apresentarem estrutura em camadas¹³. Entre os diversos óxidos de vanádio existentes, o vanadato de prata (AgVO_3) tem se destacado devido às suas excelentes propriedades eletroquímica e fotofísica¹³. AgVO_3 é a forma mais comum dos óxidos de vanadato de prata no estado sólido³⁴, e pode ser encontrada em três formas diferentes: alfa (α), beta (β) e gama (γ)³⁰. O beta vanadato de prata ($\beta\text{-AgVO}_3$) é uma fase estável com grupo espacial monoclinico³⁴, sendo relatado na literatura como um material com promissora atividade antibacteriana contra algumas cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em solução^{7, 18}. Quando incorporado à resina acrílica, este microcristal demonstrou

significante redução no número de microrganismos viáveis de *C. albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*^{6, 7, 8}. Já o alfa vanadato de prata (α -AgVO₃) é uma fase metaestável, formada abaixo do ponto de fusão de forma instantânea quando o composto é resfriado de maneira lenta e congelado rapidamente³⁰. Assim, o polimorfismo se mostra prevalente neste composto. Sabe-se que o polimorfismo de um material pode resultar em diferentes propriedades para cada composto. Por se tratar de um novo microcristal, ainda pouco se sabe sobre as suas propriedades antimicrobianas e estudos microbiológicos sobre o α -AgVO₃ ainda são escassos na literatura. Oliveira et al.²⁵ (2017), avaliaram a síntese, caracterização desse microcristal sintetizado em três diferentes temperaturas e sua ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina. Os autores relataram que as diferentes temperaturas acarretaram em diferenças morfológicas dos microcristais, o que consequentemente acarretou em diferentes respostas antibacterianas, onde o microcristal sintetizado à 10°C apresentou valores de CIM e CFM de 62,5 μ g/mL e os microcristais sintetizados à 20 e 30°C apresentaram valores de CIM e CFM de 125 μ g/mL. Contudo, por se tratar de um composto relativamente novo, sua ação antifúngica ainda não foi estabelecida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com objetivo didático, a revisão da literatura abordará três aspectos separadamente: o primeiro fará referência aos trabalhos relacionados a *C. albicans*; o segundo enfocará os estudos relacionados à atividade antimicrobiana (sobretudo a atividade antifúngica) de compostos contendo prata; e o terceiro abordará os estudos relacionados à biocompatibilidade desses compostos.

2.1 *Candida albicans*

C. albicans é um fungo oportunista, o qual vive de maneira comensal no corpo humano, sobretudo na cavidade oral (Avila et al.³, 2009; Shirliff et al.³¹, 2009; Shapiro et al.²⁹, 2011; Salerno et al.²⁸, 2011). Quando a saúde do hospedeiro se encontra normal, este microrganismo não é capaz de causar maiores problemas. Contudo, desequilíbrios no sistema imunológico humano permitem que *C. albicans* cause infecções, tanto superficiais quanto invasivas, a partir da formação de biofilmes em superfícies sólidas (Avila et al.³, 2009), sendo este o agente mais comum de candidíase invasiva (Shapiro et al.²⁹, 2011; Salerno et al.²⁸, 2011). Sua alta patogenicidade se deve a diversos fatores, como capacidade de produzir biofilmes resistentes a drogas antifúngicas (Avila et al.³, 2009; Shapiro et al.²⁹, 2011) e adaptação metabólica e ao estresse durante as infecções (Shapiro et al.²⁹, 2011).

Além daquelas já mencionadas, uma das principais características da *C. albicans*, relacionada à sua virulência, é o seu polimorfismo, ou seja, sua capacidade de mudar de morfologia (Sudbery et al.³³, 2004; Shapiro et al.²⁹, 2011). *C. albicans* pode ser encontrada nas formas de levedura e filamentar (pseudo-hifa ou hifa). Quando na forma filamentar, as células de *C. albicans* encontram-se alongadas, sendo as diferenças entre seus dois tipos baseadas em seus tamanhos e formas. As células em formato de hifas são mais estreitas e possuem paredes paralelas, sem constrição no local de septação, quando comparadas às células pseudo-hifas que são mais largas e possuem constrição entre os brotos (Shapiro et al.²⁹, 2011; Sudbery et al.³³, 2004). Já as células leveduriformes possuem formato elíptico sem septação (Shapiro et al.²⁹, 2011). Algumas cepas mutantes de *C. albicans* que não são capazes de modificar sua

forma geralmente possuem patogenicidade reduzida, o que significa que ambas as formas de *C. albicans* (levedura ou filamentar) são importantes para sua virulência (Shapiro et al.²⁹, 2011). Enquanto a forma filamentar é responsável pela invasão tecidual (Sudbery et al.³³, 2004; Avila et al.³, 2009; Shapiro et al.²⁹, 2011) e infecção profundas, o formato de levedura é de suma importância na disseminação inicial e processos infecciosos (Sudbery et al.³³, 2004; Shapiro et al.²⁹, 2011).

O polimorfismo faz com que *C. albicans* interaja com diferentes células do sistema imune do hospedeiro. Já foi demonstrado que a transição de levedura para hifa promove o escape de *C. albicans* de macrófagos e neutrófilos e, apesar das células dendríticas serem capazes de fagocitar ambos os tipos morfológicos de *C. albicans*, isso ocorre por diferentes receptores e estimula diferentes respostas imunes (Shapiro et al.²⁹, 2011). Essa habilidade de *C. albicans* de mudar de forma é regulada por cascatas sinalizadoras que são controladas por diferentes estímulos do meio. Um dos estímulos mais comuns são os peptídeo-glicanos presentes no soro, os qual quando combinados com temperaturas acima de 37°C, promovem a transformação de leveduras em hifas. Outro fator ambiental importante é o pH, o qual promove a transformação de células de *C. albicans* em hifas quando estas são transferidas para um meio mais alcalino combinado com temperatura elevada. Condições onde os nutrientes do meio são limitados também podem causar a transformação das células de *C. albicans* em hifas (Sudbery et al.³³, 2004; Shapiro et al.²⁹, 2011).

2.2 Atividade Antimicrobiana Dos Compostos Contendo Prata

Nos últimos anos tem existido uma crescente demanda por novos agentes antimicrobianos devido ao desenvolvimento de resistência pelos microrganismos contra as terapias medicamentosas convencionalmente utilizadas (Masiá Canuto e Gutiérrez Rodero²³, 2002; Shirliff et al.³¹, 2011; Shapiro et al.²⁹, 2011). Nesse contexto, nos últimos anos diversos compostos contendo prata em sua composição têm sido desenvolvidos e testados contra uma gama de microrganismos, a fim de se instituir novas terapias antimicrobianas. Entre os compostos citados na literatura pode-se citar o alfa tungstato de prata (α -Ag₂WO₄) (Longo et al.²², 2014), beta vanadato de prata (β -AgVO₃) (Holtz et al.¹⁷, 2012; Castro et al.⁶, 2014; Castro et al.⁷, 2016; Castro et al.⁸, 2016), beta molibdato de prata (β -Ag₂MoO₄) (Fabbro et al.¹⁰, 2016) e alfa

vanadato de prata (α -AgVO₃) (Oliveira et al.²⁵, 2017). Esta seção irá apresentar de maneira objetiva os resultados presentes na literatura no que diz respeito à atividade antimicrobiana de compostos contendo prata.

A atividade antimicrobiana de microcristais de α -Ag₂WO₄ sintetizados pelo método hidrotermal por micro-ondas, contendo ou não nanofilamentos de prata (Ag) obtidos por irradiação com feixe de elétrons, foi avaliada contra *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA - ATCC 33591) em suspensão (Longo et al.²², 2014). Os microcristais foram caracterizados através de difração de raios-X (DRX), espectroscopia Raman, mensuração da UV-visível (UV-Vis), microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (MET-AR). A atividade antimicrobiana dos microcristais foi avaliada a partir da microdiluição seriada dos mesmos em placas de 96 poços, onde o microrganismo foi inoculado. Após 24 horas de incubação das placas, as concentrações inibitória (CIM) e bactericida (CBM) mínimas foram determinadas, onde foi considerada CIM a menor concentração que não apresentou crescimento visível do microrganismo, e CBM a menor concentração que, após plaqueamento em *Mannitol Salt Agar*, não apresentou crescimento de colônias. Os autores relataram que ambos os microcristais apresentaram efeitos bactericida e bacteriostático, sendo o microcristal irradiado quatro vezes mais eficiente (CIM/CBM α -Ag₂WO₄ não irradiado: 125 μ g/mL; CIM/CBM α -Ag₂WO₄ irradiado: 31 μ g/mL).

Segundo os autores (Longo et al.²², 2014), o aumento da atividade antimicrobiana nos microcristais irradiados poderia ser atribuído à interação entre os nanofilamentos de prata (mais oxidante) com a desordem superficial do semiconductor (tungstênio), e à interação deste conjunto com a superfície bacteriana. Ao haver a ligação entre os nanofilamentos de prata e o microcristal com a superfície da membrana plasmática da célula do microrganismo, podem ocorrer mudanças na permeabilidade devido a alterações na bomba de ATP. Quando no interior das células, a prata pode agir de diversas formas, como: (1) interagir com o fósforo presente no DNA resultando na inativação da replicação de DNA; (2) reagir com proteínas contendo enxofre e fósforo, inibindo funções enzimáticas; (3) interferir na cadeia respiratória mitocondrial, a qual reduz a atividade desidrogenase; (4) produzir espécies reativas de oxigênio (sobretudo radicais superóxidos), os quais podem reagir

com lipídios, DNA, RNA e proteínas, causando consequências severas no funcionamento celular (Longo et al.²², 2014).

Microcristais de molibdato de prata (β -Ag₂MoO₄) foram estudados pelo mesmo grupo de pesquisa, e a atividade antifúngica contra *C. albicans* (ATCC 90028) dos microcristais foi avaliada (Fabbro et al.¹⁰, 2016). Os microcristais foram sintetizados a partir do método de coprecipitação com a utilização de diferentes solventes (água, etanol e amônia), e foram caracterizados através de DRX, espectroscopia Raman, MEV-FE, MET com espectroscopia de energia dispersiva (EDS), espectroscopia de UV-vis e mensuração da fotoluminescência. A atividade antifúngica dos três microcristais foi avaliada a partir da microdiluição seriada em placas de 96 poços, onde o microrganismo foi inoculado e, após 48 horas de incubação à 35°C, as CIM e CBM dos três microcristais foram determinadas. Os autores relataram que os três microcristais apresentaram atividade fungicida/ fungistática contra *C. albicans*, sendo os microcristais sintetizados com etanol e amônia (CIM/CFM 7,81 μ /mL) mais eficientes que os microcristais sintetizados com água (15,62 μ g/mL).

Os autores (Fabbro et al.¹⁰, 2016) demonstraram, a partir das imagens de MEV-EC, que as morfologias dos microcristais sintetizados com etanol e amônia possuem ampla contribuição das superfícies planas (001) e (011), quando comparados às superfícies do microcristal sintetizado com água, onde as facetas com os átomos Ag e O estão expostos ao vácuo, o que sugere que os íons Ag estariam mais disponíveis para se difundir no meio, aumentando seu potencial devido a maior concentração de íons Ag. Os autores ainda relatam que esses resultados indicam que os microcristais de β -Ag₂MoO₄ com defeitos estruturais são capazes de inativar *C. albicans*. Segundo eles, uma possível explicação para essa inativação/ destruição está relacionada a presença de defeitos específicos (buracos) na superfície dos microcristais, que causam a transição de elétrons entre a banda de valência e a banda de condução, o que acaba por gerar radicais livres (OH* e O₂H*). Essas espécies reativas seriam as responsáveis pela inibição do crescimento e eventual morte dos fungos.

A atividade antimicrobiana de beta vanadato de prata (β -AgVO₃) foi testada contra diferentes microrganismos em quatro diferentes estudos. No primeiro deles (Holtz et al.¹⁷, 2012), beta vanadato de prata (β -AgVO₃) nanoestruturado foi sintetizado através de uma reação de precipitação simples e rápida e caracterizado através de DRX, Espectroscopia Raman, MEV e MET. Para avaliação da atividade

antibacteriana deste composto foram realizados testes de CIM/CBM contra sete cepas bacterianas diferentes (MRSA BEC 9393, MRSA Rib 1; *S. aureus* ATCC 29213; *Enterococcus faecalis* - ATCC 21814 e ATCC 29212; *Escherichia coli* - ATCC 25922; e *Salmonella enterica* - Typhimurium LT2); curva de morte de duas cepas (MRSA BEC 9393 e *E. coli* ATCC 25922) em contato com o composto na CIM; e avaliação do halo de inibição do discos de vidro recobertos por tinta comercial à base de água incorporada com 1% (m/v) do composto. Os autores relataram que β -AgVO₃ nanoestruturado apresentou atividade antibacteriana contra todas as cepas testadas, sendo o valor encontrado como CIM para MRSA BEC 9393 (3,15 μ g/mL) muito menor quando comparado ao controle Oxacilina (maior que 100 μ g/mL), um antibiótico comumente utilizado. As três cepas de *S. aureus* e *S. enterica* apresentaram mesmo valor de CIM (3,15 μ g/mL), sendo este ligeiramente mais alto que o valor obtido com *E. coli* (1 μ g/mL) e ligeiramente menor que o valor obtido com as duas cepas de *E. faecalis* (5 μ g/mL). Os autores consideraram excelente o valor de CIM contra *E. faecalis*, uma vez que algumas espécies de *Enterococcus* atuam em infecções nosocomiais.

Quando analisadas as curvas de morte das duas cepas de bactérias, os autores observaram que as curvas foram similares, de maneira que a CIM exibiu efeito bacteriostático nas duas culturas até o tempo de incubação de 10 horas. Após esse período, o composto não foi efetivo na inibição de *E. coli*, contudo promoveu efeito bacteriostático na cultura de *S. aureus* até o tempo de incubação de 24 horas. Os autores relataram algumas razões que poderiam explicar essa diminuição na atividade do composto em questão: (1) mudanças na condição de cultura variam com o tempo, e resíduos de produtos secretados pelos microrganismos poderiam interferir na atividade do composto; (2) após algumas horas β -AgVO₃ tende a ser depositada no fundo do tubo, e uma camada de células bacterianas mortas pode diminuir o contato direto da superfície do composto com as bactérias vivas, resultando em atividade antibacteriana diminuída (Holtz et al.¹⁷, 2012).

Ao analisarem a atividade antibacteriana de tinta à base de água após a incorporação do composto, os autores relataram que as amostras contendo apenas a tinta à base de água não apresentaram halo de inibição contra MRSA (BEC 9393), diferente das amostras contendo o composto incorporado à tinta, que apresentaram halo de inibição de aproximadamente 4 mm. Esse resultado foi considerado promissor

para o uso como aditivo em tintas à base de água, com potencial de uso em ambientes passíveis de contaminação (banheiros, cozinhas e ambientes hospitalares) (Holtz et al.¹⁷, 2012).

Um segundo estudo (Castro et al.⁶, 2014) avaliou a atividade antimicrobiana de β -AgVO₃ nanoestruturado em solução e incorporado em resina acrílica autopolimerizável nas concentrações 0%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5% e 10% (m/v), por meio da mensuração do halo de inibição, contra quatro microrganismos (*S. aureus* ATCC 25923, *S. mutans* ATCC 25175, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *C. albicans* ATCC 10231). Os microrganismos testados exibiram diferentes valores de CIM onde o menor valor foi obtido (31,25 μ g/mL) quando o composto foi testado contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, seguido por *C. albicans* (62,5 μ g/mL) e, por último, *S. mutans* (250 μ g/mL). Ao avaliarem o efeito antimicrobiano do composto incorporado, os autores notaram que o efeito foi dose-dependente, onde o maior halo de inibição foi observado na amostra contendo 10% (m/v) do composto contra *S. aureus* (15,6 \pm 0,6). A incorporação do composto na concentração de 10% (m/v), apresentou atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas. Os autores afirmaram que, apesar das limitações do estudo, resultados importantes foram obtidos, uma vez que β -AgVO₃ pode ser associado a resinas acrílicas com potencial atividade antimicrobiana.

A atividade antibacteriana da incorporação de β -AgVO₃ nanoestruturado em resina acrílica autopolimerizável e termopolimerizável, nas concentrações de 0%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5% e 10% contra *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *S. aureus* (ATCC 25923), foi avaliada através da mensuração da atividade metabólica dos microrganismos a partir do ensaio de XTT e do número de colônias viáveis, microscopia de varredura confocal à laser complementando as análises (Castro et al.⁷, 2016). Além disso, foram realizadas análises da força de impacto de todas as amostras. As amostras foram acondicionadas em placas de 24 poços e biofilmes de 48 horas foram desenvolvidos. Os autores relataram que a incorporação de 5% e 10% (m/v) diminuiu significativamente a atividade metabólica de *P. aeruginosa* nos dois tipos de resina acrílica, contudo o mesmo não foi observado para o biofilme de *S. aureus*. Quando avaliaram o número de colônias viáveis, os autores observaram uma diminuição significativa nas amostras contendo 5% e 10% (m/v) do composto incorporado para ambos os microrganismos. Contudo, esses percentuais de incorporação reduziram de forma significativa a força de impacto das resinas acrílicas

o que se deveu, de acordo com os autores, aos *clusters* de β -AgVO₃. Ao analisar as imagens de microscopia confocal à laser, os autores observaram alta densidade de células e grande proporção da coloração verde no grupo controle comparado aos demais grupos. A redução na viabilidade celular nas amostras contendo β -AgVO₃ nanoestruturado pôde ser observada nas amostras contendo 10% (m/v) do composto incorporado.

No quarto estudo onde a atividade antimicrobiana de β -AgVO₃ nanoestruturado foi avaliada (Castro et al.⁸, 2016), foi realizada a incorporação de 0-10% (m/v) do composto em resina acrílica autopolimerizável e termopolimerizável, e a atividade antibiofilme das amostras foi testada contra *C. albicans* e *S. mutans* através da mensuração de XTT, contagem do número de colônias viáveis e microscopia de varredura confocal à laser. Além disso, força flexural, dureza, e rugosidade superficial dos materiais foram avaliadas. As amostras foram acondicionadas em placas de 24 poços e biofilmes de 48 horas foram desenvolvidos. Os autores relataram que a incorporação de 10% (m/v) do composto reduziu significativamente a atividade metabólica de ambos os microrganismos estudados. A incorporação de 10% (m/v) do composto promoveu redução no número de colônias viáveis para *C. albicans* nos dois tipos de resina avaliados. Já para *S. mutans*, a redução foi observada a partir da incorporação de 2,5% (m/v) do composto. A incorporação do composto não afetou as propriedades mecânicas de dureza e rugosidade superficial, contudo a força flexural foi diminuída com incorporações acima de 1% (m/v). As imagens de microscopia confocal à laser, demonstraram alta densidade de células e grande proporção da coloração verde no grupo controle comparado aos demais grupos, e uma redução na viabilidade celular nas amostras contendo β -AgVO₃ nanoestruturado pôde ser observada nas amostras contendo 10% (m/v) do composto incorporado. Os autores concluíram que a incorporação de β -AgVO₃ em resina acrílica pode inibir a formação de biofilme dos principais microrganismos relacionados com próteses, contudo o uso clínico deve ser avaliado, uma vez que algumas propriedades mecânicas foram modificadas.

Recentemente, a atividade antimicrobiana de microcristais de α -AgVO₃ foi avaliada contra MRSA (ATCC 33591) em solução (Oliveira et al.²⁵, 2017). Os microcristais foram sintetizados pelo método da coprecipitação à 10, 20 e 30°C e caracterizados através de DRX com refinamento de Rietveld, espectroscopia Raman,

Uv-Vis, MEV-EC, MET, EDS, e mensuração da fotoluminescência. A atividade antibacteriana dos três microcristais foi avaliada a partir da microdiluição seriada em placas de 96 poços, onde o microrganismo foi inoculado e, após 24 horas de incubação à 37°C, as CIM e CBM dos três microcristais foram determinadas. Os autores relataram que, independentemente da temperatura utilizada na síntese dos microcristais, os três compostos apresentaram atividade bactericida e bacteriostática contra MRSA. Além disso, nos três microcristais, a concentração inibitória mínima coincidiu com a concentração bactericida mínima, sendo os valores dos microcristais sintetizados à 20°C e 30°C (125 µg/mL) maiores que aquele encontrado para o microcristal sintetizado à 10°C (62,5 µg/mL). O fato do microcristal sintetizado a 10°C possuir maior eficiência antibacteriana quando comparado aos outros dois microcristais, levou os autores a acreditarem que a atividade antibacteriana é afetada pela morfologia das partículas. Os autores ainda relataram que o mecanismo de atividade antibacteriana de um material semicondutor é atribuído ao estresse oxidativo provocado pela produção de espécies reativas de oxigênio, como OH^* , O'_2 e O_2H^* (Oliveira et al.²⁵, 2017).

2.3 Biocompatibilidade Dos Compostos Contendo Prata

Apesar de possuir ótimas e (re)conhecidas propriedades antimicrobianas, sabe-se que a prata pode ser tóxica às células dos mamíferos a depender da quantidade. Dessa forma, alguns estudos foram realizados com o intuito de avaliar o efeito citotóxico de compostos contendo prata em diversas células mamíferas. A literatura ainda é limitada no que diz respeito à estudos de citotoxicidade de compostos contendo prata, sendo os estudos envolvendo microcristais ainda mais escassos. Nesta seção, serão abordados alguns estudos sobre citotoxicidade de compostos contendo prata em diversos tipos celulares.

Partículas de prata foram avaliadas com relação à sua citotoxicidade em duas diferentes linhagens celulares: HT-1080 (fibrosarcoma humano) e A431 (carcinoma humano de pele) através do ensaio de viabilidade celular (XTT) (Arora et al.¹, 2008). As células foram cultivadas e então incubadas em meio de cultura contendo de 0,76 µg/mL a 50 µg/mL de partículas de prata por 24 horas. Os resultados do ensaio de

XTT mostraram citotoxicidade dose-dependente para os dois tipos celulares com valores IC_{50} (metade da concentração inibitória máxima) de 10,6 $\mu\text{g/mL}$ e 11,6 $\mu\text{g/mL}$, para HT-1080 e A431 respectivamente.

Outro estudo avaliou o efeito das partículas de prata em células tronco mesenquimais humanas (hMSC), através da sua exposição às partículas nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ por 1, 3 e 24 horas (Hackenberg et al.¹⁴, 2011). A citotoxicidade foi mensurada pelo teste de exclusão com azul de tripan e o teste de fluoresceína-diacetato. Nos três períodos avaliados, efeitos citotóxicos significantes foram observados apenas na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, de maneira que o percentual de células viáveis diminuiu significativamente comparado ao controle.

A análise da citotoxicidade de partículas de prata de tamanhos e revestimentos diferentes foi realizada em células pulmonares humanas (BEAS-2B) através dos ensaios de viabilidade celular Alamar Blue e lactato desidrogenase (LDH) (Gliga et al.¹², 2014). As células foram expostas a partículas de prata revestidas com citrato (10, 40 e 75 nm), partículas de prata revestidas com PVP (polivinilpirrolidona) (10 nm) e partículas de prata sem revestimento (50 nm), nas concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ por 4 e 24 horas. Em ambos os ensaios de viabilidade celular, após 4 horas de exposição às partículas, nenhum sinal significativo de citotoxicidade foi observado para nenhuma das partículas avaliadas mesmo na dose mais alta. Citotoxicidade significativa somente foi observada nas partículas revestidas com citrato (10 nm) e PVP (10 nm) após 24 horas nas suas doses mais altas (20 e 50 $\mu\text{g/mL}$ no ensaio de Alamar Blue; 50 $\mu\text{g/mL}$ no ensaio de LDH). Devido ao fato da literatura relatar que algumas partículas de prata podem interagir com o ensaio de LDH inibindo a enzima lactato-desidrogenase, os autores incubaram as partículas com as células lisadas e detectaram atividade de LDH após 0, 4 e 24 horas. A redução na atividade enzimática foi mais pronunciada para as partículas de 10 nm. Por conta desse achado, os autores sugerem cautela na interpretação dos resultados de ensaios de LDH e a possibilidade de um resultado falso-negativo deve ser considerada.

Partículas de prata foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade em diferentes linhagens celulares tumorais (HeLa e U937) (Kaba, Egorova¹⁹, 2015). As partículas utilizadas foram obtidas a partir da síntese bioquímica e caracterizadas através de MET. A toxicidade das partículas de prata foi analisada através do ensaio de viabilidade celular por MTT, onde as células foram cultivadas e então incubadas em

meio de cultura contendo partículas de prata nas concentrações 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL e 8 µg/mL, e incubadas por 4 e 24 horas. Para fins de comparação, células também foram incubadas com nitrato de prata e com estabilizador das partículas (AOT à 2 mM). A viabilidade das células HeLa diminuiu a partir da concentração de 2 µg/mL e os resultados com relação ao estabilizador e nitrato de prata demonstraram que estes não exerceram influência perceptível na viabilidade celular. Também foi observado um aumento na viabilidade celular na menor concentração do estabilizador e de nitrato de prata (no período de 24 horas), indicando uma provável ação estimulante desses agentes.

Para as células U937 também foi observado uma diminuição na viabilidade celular nos dois tempos de incubação (a partir de 2 µg/mL após 4 horas de incubação; e a partir de 0,5 µg/mL após 24 horas de incubação). Um efeito tóxico significativo foi observado tanto para o as partículas quanto para o nitrato de prata, enquanto que o estabilizador apesar de apresentar um efeito tóxico pronunciado, aparentou ser menos perigoso. Os autores sugerem que a concentração da partícula que corresponde ao início da diminuição da viabilidade celular poderia ser considerada como o limiar de toxicidade, o qual pode ser utilizado como uma característica da toxicidade das partículas (Kaba, Egorova¹⁹, 2015).

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- 1 Avaliar a atividade antifúngica de microcristais de α -AgVO₃ sintetizados em três diferentes temperaturas (10, 20 e 30°C) contra *Candida albicans*;
- 2 Avaliar a viabilidade e morfologia de células do tipo queratinócitos orais normais espontaneamente imortalizados (NOK-si) após exposição aos três microcristais de α -AgVO₃ nas concentrações inibitória/fungicida mínimas, além da concentração inibitória mínima diluída 10 vezes e concentrada 10 vezes.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

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

Materiais

- 1 Água destilada;
- 2 Água mili-Q;
- 3 Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
- 4 Alça de inoculação 10 µL, estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil);
- 5 Álcool Etílico Absoluto PA 99,5 GL (Nuclear, Diadema, SP, Brasil);
- 6 Célula do tipo queratinócitos orais normais espontaneamente imortalizados (*Normal Oral Keratinocytes spontaneously immortalized* - NOK-si) gentilmente cedidos pelo Professor PhD Carlos Rossa Junior, Departamento de Periodontia, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP);
- 7 Cloreto de Potássio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- 8 Cloreto de Sódio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- 9 Cubeta de 2 mL (Cartel, SP, Brasil);
- 10 Cultura de *C. albicans* (ATCC 90028 - *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA);
- 11 Frasco coletor universal translúcido estéril 80mL (Cral, Cotia, SP, Brasil);
- 12 Garrafa para cultura Celular 75 cm² (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
- 13 Glicose (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- 14 Glutaraldeído (Glutaron, RioQuímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil);

- 15 Kit fluorimétrico Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA);
- 16 Lamínula de vidro circular 13 mm (Prolab, São Paulo, SP, Brasil);
- 17 L-Glutamina (Lonza, Basileia, Suíça);
- 18 Meio de cultura celular DMEM de alta glicose (meio de Eagle modificado por Dulbecco; GIBCO, Grand Island, NY, EUA);
- 19 Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com clorofenicol (Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA);
- 20 Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, MI, EUA);
- 21 Microtubos tipo Eppendorfs Graduado (Axygen, Curitiba, PR, Brasil);
- 22 Monovanadato de amônio (NH_4VO_3 – 99% puro, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- 23 Nitrato de prata (Ag_2NO_3 , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- 24 Parafilme (Laboratory Film, Chicago, IL, EUA);
- 25 Pipeta sorológica 10 mL (KASVI, Curitiba, PR, Brasil);
- 26 Pipeta sorológica 25 mL (KASVI, Curitiba, PR, Brasil);
- 27 Pipeta sorológica 5 mL (KASVI, Curitiba, PR, Brasil);
- 28 Placa de 24 poços (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
- 29 Placa de 96 poços preta estéril (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA);
- 30 Placa de cultura celular 100 mm x 20 mm (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
- 31 Placa de Cultura Celular 150 mm x 25 mm (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
- 32 Placas de 96 poços de fundo chato e estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
- 33 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);

- 34 Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 μ L (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- 35 Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 μ L (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- 36 Ponteiras brancas para micropipeta 10 μ L (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- 37 Ponteiras para micropipeta 10 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- 38 Ponteiras para micropipeta 5 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
- 39 Sistema de filtração a vácuo estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
- 40 Solução Azul de Tripán 0,4% (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA);
- 41 Solução de Alamar Blue (Alamar Blue™ Cell Viability Reagent, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA);
- 42 Solução de Antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- 43 Solução de tripsina com EDTA 10x (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- 44 Solução tampão de lise (Triton X-100 a 9%; Promega, Madison, WI, EUA);
- 45 Soro Fetal Bovino (FBS, GIBCO, Grand Island, NY, EUA);
- 46 Tubos tipo Falcon de 15 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
- 47 Tubos tipo Falcon de 50 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).

Instrumentos

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

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

Equipamentos

- 1 Agitador de tubos Modelo: AP 56 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);
- 2 Autoclave Modelo Z-AB-19 (Phoenix Luferco, Araraquara, SP, Brasil);
- 3 Autoclave vertical Modelo: AV 60 No 6614 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);
- 4 Balança de precisão Modelo: BG 400 No 016450 (Gehaka – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil);
- 5 Banho Maria Modelo 1102 (Fanem, São Paulo, SP, Brasil);
- 6 Bomba a vácuo (Fanem, São Paulo, SP, Brasil);
- 7 Câmara de fluxo laminar vertical, Modelo: PA 115. No. 12898 (Pachane Ind. e Com. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil);
- 8 Câmara de Neubauer (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil);
- 9 Centrífuga de tubos Falcon Modelo 80-2B 15 mL (Centerbio, EUA);
- 10 Centrífuga de tubos Falcon Modelo: 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha);
- 11 Contador manual 4 dígitos (Vonder, Curitiba, PR, Brasil);
- 12 Espectrofotômetro – Biospectro Modelo: SP-220 (Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil);
- 13 Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);

- 14 Estufa para secagem e esterilização Modelo: MA 033 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);
- 15 Fluorsokan Modelo Ascent FL (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA);
- 16 Freezer -80°C (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA);
- 17 Incubadora Modelo Forma Series II Water Jacket CO₂ incubator (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA);
- 18 Microscópio de bancada invertido (Optiphas, Van Nuys, CA, EUA);
- 19 Microscópio eletrônico de varredura Modelo JSM-6610LV (JEOL, Akishima, Tóquio, Japão);
- 20 Ultrassom (Kondortech, São Carlos, SP, Brasil).
- 21 Microscópio de Fluorescência Modelo DFC310 FX (Leica, Wetzlar, Alemanha)

4.2 Método

4.2.1 Síntese dos microcristais

Esse projeto inseriu-se no Centro de Pesquisa para o Desenvolvimento de Materiais Funcionais, um dos CEPIDS (Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão) apoiados pela FAPESP, coordenado pelo Prof. Dr. Elson Longo (Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP). Dessa forma, a síntese e a caracterização dos óxidos cerâmicos contendo prata foram realizadas no Instituto Nacional de Ciências dos Materiais em Nanotecnologia (INCTMN) e Núcleo de nanomateriais e nanotecnologia da UNESP (NNNT), pela aluna de doutorado Regiane Cristina de Oliveira, sob a supervisão do referido professor.

Os microcristais de α -AgVO₃ foram obtidos através do método de coprecipitação (CP) em diferentes temperaturas. Os precursores utilizados nestas sínteses foram nitrato de prata (AgNO₃ – 99% puro, Synth) e monovanadato de amônio (NH₄VO₃ – 99% puro, Sigma-Aldrich). Inicialmente, 1x10³ mol de NH₄VO₃ e 1x10³ mol de AgNO₃ foram dissolvidos separadamente em 35 mL de água destilada à 30°C, sob agitação magnética por 15 minutos. As duas soluções foram então misturadas rapidamente, de forma a promover a formação instantânea de precipitados sólidos de α -AgVO₃ (coloração amarela – Figura 1). A CP foi realizada nas

temperaturas de 10, 20 e 30°C. O precipitado foi centrifugado, lavado com água destilada diversas vezes e seco em forno convencional à 60°C por 12 horas. A caracterização dos microcristais (metodologia e resultados) encontra-se no APÊNDICE A.

Figura 1 – Foto dos microcristais sintetizados armazenados em microtubos. Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria.

4.2.2 Ensaio microbiológico

4.2.2.1 *Microrganismo e condições de cultivo*

Foi utilizada uma cepa padrão de *C. albicans* (*American Type Culture Collection* 90028). O microrganismo foi cultivado de acordo com curva de crescimento preestabelecida pelo laboratório de microbiologia aplicada da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP. Brevemente, o microrganismo que se encontrava congelado à -80°C foi reativado numa placa de Petri contendo *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) suplementado com 5 µg/mL de cloranfenicol, e foi mantido em estufa à 37°C por 48 horas para que houvesse o crescimento de colônias. Após esse período, o pré-inóculo foi formado da seguinte forma: 5 colônias isoladas e de tamanhos similares foram coletadas com o auxílio de uma alça de inoculação de 10 µL e inoculadas em um tubo do tipo falcon de contendo 10 mL de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) com dextrose. O tubo foi agitado vigorosamente com o auxílio de um vórtex de

bancada por 10 segundos, de maneira que as colônias fossem dispersas homogeneamente no meio, e então foi mantido em estufa à 37°C por um período *overnight* (16 horas) com a tampa ¼ de volta aberta para que houvesse a troca de gases entre o interior do tubo e a estufa. Passado esse período, o tubo foi vigorosamente agitado por 10 segundos com o auxílio de um vórtex de bancada para homogeneização do pré-inóculo, e uma alíquota de 500 µL deste tubo foi transferida para um novo tubo do tipo falcon contendo 9,5 mL de meio YNB fresco e aquecido (37°C), formando-se então o inóculo. Este tubo foi agitado por 10 segundos com o auxílio de um vórtex de bancada para homogeneização do seu conteúdo e uma alíquota de 1 mL foi transferida para uma cubeta de poliestireno de 1,5 mL e a leitura da densidade ótica (DO) inicial foi realizada através da absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm (*blank*: cubeta contendo 1 mL de meio YNB à 37°C). O tubo contendo o inóculo foi então mantido em estufa à 37°C por 9 horas com a tampa ¼ de volta aberta, para que o microrganismo atingisse a fase *mid-log* (fase de maior atividade metabólica). Após esse período, o conteúdo do tubo foi novamente homogeneizado e uma nova leitura da DO foi realizada. A $DO_{540\text{ nm}}$ final ($0,55 \pm 0,08$) foi confirmada subtraindo-se o valor da primeira leitura da segunda leitura. O tubo falcon foi então levado à centrifuga (4°C, 5000 *xg*, por 5 minutos) para que houvesse a formação do *pellet* de microrganismos. O sobrenadante foi descartado, *pellet* foi lavado com 5 mL de solução salina tamponada (PBS; pH 7,2), e o tubo foi levado novamente para centrifuga (4°C, 5000 *xg*, por 5 minutos). Esse procedimento foi realizado duas vezes, e após a última centrifugação o microrganismo foi ressuspenso em meio YNB no mesmo volume inicial (8 mL). O microrganismo foi então diluído seriadamente em YNB para que sua concentração diminuísse de 10^6 UFC/mL para $0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL (de acordo com o que estabelece o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI – M27 A2⁹).

4.2.2.2 *Ensaio de concentrações inibitória (CIM) e fungicida (CFM) mínimas*

Para os ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM), os três microcristais foram pesados em tubos do tipo falcon com o auxílio de uma balança de precisão e então diluídos em PBS estéril na concentração de 2

mg/mL. Os três tubos foram mantidos em ultrassom por 24 minutos (3 ciclos de 8 minutos cada), para que houvesse uma melhor dispersão das partículas. Os microcristais foram então inoculados em placas de 96 poços da seguinte forma: no primeiro poço foram inoculados 200 µL da suspensão de microcristais e nos poços seguintes (2 a 12) foram inoculados 100 µL de meio YNB; foi então realizada uma diluição seriada dos microcristais transferindo-se 100 µL do conteúdo do primeiro poço para o segundo poço, e assim sucessivamente, de maneira que a concentração dos microcristais caísse sempre pela metade (concentração inicial: 1000 µg/mL; concentração final: 0,488 µg/mL), até o 12º poço, onde 100 µL foram descartados. Desta forma, ao final da diluição seriada dos microcristais, todos os poços apresentavam-se com 100 µL de microcristais diluídos em meio/PBS e estavam prontos para a inoculação dos microrganismos. Uma alíquota de 100 µL da suspensão de microrganismos previamente preparados foi adicionada a cada poço contendo os microcristais. Poços contendo apenas microrganismo em meio de cultura foram utilizados como controle positivo; e poços contendo apenas o meio de cultura foram utilizados como controle negativo. O experimento foi realizado em triplicata em três ocasiões distintas (N=9). As placas foram então envoltas em filme PVC (para evitar a evaporação de todo o conteúdo dos poços) e mantidas em estufa à 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, a CIM foi determinada através de inspeção visual, no qual foi considerada a menor concentração de microcristal onde não houve crescimento aparente do microrganismo. Para determinação da CFM, foi realizado plaqueamento de todos os poços, de maneira que nos poços que não apresentaram crescimento visual do microrganismo, o plaqueamento foi feito retirando-se uma alíquota diretamente do poço; já nos poços referentes ao CIM e no poço seguinte (primeiro poço com crescimento visual de microrganismo) foram realizadas diluições seriadas decimais do conteúdo dos poços (até a diluição -6) e então foi realizado o plaqueamento de todas as diluições além do conteúdo retirado diretamente do poço. A técnica de plaqueamento escolhida foi a da microgota, onde uma alíquota de 10 µL é inoculada numa placa de SDA, formando um círculo. Todo o plaqueamento foi realizado em duplicata.

As placas de SDA foram mantidas em estufa à 37°C por 24 horas e após esse período foi realizada a contagem de colônias. O valor encontrado foi transformado para \log_{10} (UFC/mL). Esse experimento foi realizado em triplicata e em três ocasiões distintas.

4.2.2.3 Microscopia de fluorescência

Com o objetivo de verificar se as concentrações determinadas como CIM e CFM realmente condiziam com diminuição do crescimento e morte do microrganismo, foi realizada a microscopia de fluorescência. Para obtenção das imagens em microscópio de fluorescência, os microrganismos foram incubados juntamente com os microcristais conforme descrito anteriormente (item 2.2), contudo, somente nas concentrações inibitória e fungicida mínimas. O plaqueamento foi realizado em placa de 24 poços. Após 24 horas de contato do microrganismo com os microcristais, foram acrescentados 0,5 µL de cada um dos reagentes (Syto9 e iodeto de propídio) presentes no Kit LIVE/DEAD, diretamente nos poços da placa de cultura. A placa foi mantida em local escuro por 15 minutos para que as células fossem coradas. Após esse período, foi realizada a análise dos poços e aquisição das imagens em microscópio de fluorescência. Esse experimento foi realizado em duplicata, em uma única ocasião.

4.2.3 Ensaios de biocompatibilidade *in vitro*

4.2.3.1 Célula e condições de cultivo

Para a realização dos ensaios de biocompatibilidade *in vitro* foram selecionados queratinócitos orais normais espontaneamente imortalizados (*Normal Oral Keratinocytes spontaneously immortalized* - NOK-si), os quais foram gentilmente cedidos pelo Professor Dr. Carlos Rossa Junior, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP).

Para cada experimento, as células foram descongeladas e cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado com 2,0 mmol.L⁻¹ de glutamina; 10% de soro de bovino fetal, 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina G - 10 000 µg.mL⁻¹, estreptomicina - 10 000 µg.mL⁻¹ e anfotericina B - 25 µg.mL⁻¹) em incubadora com 5% de CO₂, à 37°C, em atmosfera úmida. O crescimento celular foi monitorado diariamente com o auxílio de um microscópio de bancada invertido.

As células foram cultivadas até atingirem 90% de confluência, lavadas com tampão PBS, retiradas da placa com solução de tripsina (0,005%)/EDTA (0,53 mmol.L⁻¹) e então submetidas à centrifugação a 400 xg por 5 minutos. As células foram

ressuspendidas em meio DMEM e replaqueadas. Para os experimentos, as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas de acordo com o número de células estabelecido para cada protocolo experimental. Para todos os experimentos foram usadas células entre a 3ª e a 12ª passagem.

4.2.3.2 Ensaio de viabilidade celular (Ensaio de Alamar Blue)

Para análise da viabilidade celular foi utilizado o ensaio de Alamar Blue. Este método é baseado na reação da resazurina, um corante não fluorescente azul arroxeadado, solúvel em água, estável em meio de cultura, não tóxico, que pela ação da atividade metabólica das mitocôndrias de células viáveis, é reduzido em resorufina, substância rosa e altamente fluorescente.

Para este ensaio, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 10.000 células/poço (num volume de 200 µL/poço). As placas foram então mantidas em incubadora à 37°C, contendo 5% de CO₂, numa atmosfera úmida por aproximadamente 40 horas para que houvesse a formação da monocamada de células. Após esse período, o meio no qual as células se encontravam foi removido e um novo meio contendo os microcristais nas concentrações de interesse (CIM concentrada 10 vezes - 39 µg/mL, CFM - 15,62 µg/mL, CIM - 3,9 µg/mL – e CIM diluída 10 vezes - 0,39 µg/mL) foram adicionados aos grupos experimentais. Como controle positivo, foram utilizados poços contendo células em condições padrão de cultivo, e como controle negativo, foram utilizados poços contendo células em meio DMEN contendo 2 µL/poço de solução tampão de lise. Em toda a placa experimental, o volume final em cada poço foi mantido em 200 µL nos quais foram acrescentados 20 µL de solução de Alamar Blue. As células foram mantidas em estufa de cultivo e as leituras da emissão de fluorescência foram realizadas com o auxílio do equipamento Fluoroskan com filtros de excitação em 544 nm e emissão em 590 nm, nos tempos de 4, 6, 8, 12 e 24 horas. Para cada condição experimental, foi realizado um branco correspondente, na ausência de células. Este experimento foi realizado em sextuplicata e em três ocasiões distintas.

4.2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para analisar a morfologia das células em contato com os microcristais nas concentrações avaliadas, realizou-se a microscopia eletrônica de varredura. Para tanto, as células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro acondicionadas em placa de 24 poços na concentração de 100.000 células/poço (num volume de 500 µL/poço). A placa foi mantida em incubadora à 37°C, contendo 5% de CO₂, numa atmosfera úmida por 24 horas para formação da monocamada de células. Após esse período, o meio no qual as células se encontravam foi removido e um novo meio contendo os microcristais nas concentrações de interesse (39 µg/mL, 15,62 µg/mL, 3,9 µg/mL e 0,39 µg/mL) foram adicionados aos grupos experimentais. Como controle positivo de células vivas foram utilizadas células em condições padrão de cultivo (DMEM), e como controle negativo a morte celular foi induzida por 03 reagentes: (1) 5 µL de Triton X-100 a 9% em 500 µL de DMEM para indução de necrose¹⁶; (2) 250 µL de H₂O₂ a 30% em 250 µL de PBS para indução de necrose²⁴; (3) 500 µL de DMEM suplementado com 10 µL de camptotecina a 1mM para indução de apoptose⁴. As lamínulas referentes aos grupos experimentais e controle positivo foram incubadas por 24 horas em incubadora à 37°C, com 5% de CO₂, em atmosfera úmida. As lamínulas referentes ao controle negativo foram incubadas nas mesmas condições, contudo em tempos diferentes (tampão de lise: 5 minutos; camptotecina: 4 horas; H₂O₂: 20 minutos).

Decorrido o período de incubação estabelecido para cada amostra, as mesmas foram preparadas para análise em MEV. Para isso, as células foram fixadas nas lamínulas com 500 µL de glutaraldeído à 2,5% por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas três lavagens com 500 µL de PBS e então procedeu-se com a desidratação gradual das amostras, primeiro com 500 µL de álcool 70% (por 1 hora), então com 500 µL de álcool 90% (por 1 hora) e por fim 500 µL de álcool absoluto (5 vezes por 30 minutos). As amostras foram então mantidas em dessecador à vácuo contendo sílica por 5 a 7 dias para, então, serem analisadas em MEV. No dia das análises, as amostras foram posicionadas e fixadas em *stubs* metálicos e recobertas com ouro. Esse experimento foi realizado com amostras únicas e em duas ocasiões distintas.

4.2.4 Análise estatística

No presente estudo experimental *in vitro* foram consideradas para análise as seguintes variáveis dependentes de interesse:

- ✓ Número de colônias viáveis (UFC/mL; CFM)
- ✓ Emissão de fluorescência da atividade metabólica (Alamar Blue)

O fator de variação (variável independente) considerado nas análises deste estudo foram:

- ✓ Concentração dos microcristais (1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL, 7,81 µg/mL, 3,90 µg/mL, 1,95 µg/mL, 0,97 µg/mL e 0,488 µg/mL para os ensaios de CIM e CFM por meio de UFC/mL; e 39 µg/mL, 15,62 µg/mL, 3,9 µg/mL e 0,39 µg/mL para o ensaio de Alamar Blue);

Para a análise estatística os resultados referentes à contagem do número de colônias viáveis foram previamente transformados em logarítimo na base 10 (Log_{10} UFC/mL) para que a distribuição dos dados fosse normalizada. Todos os resultados obtidos foram avaliados com relação à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($\alpha = .05$).

Para o ensaio microbiológico (CFM) e o ensaio de Alamar Blue em tempos separados, apenas um fator de variação foi considerado: a concentração de $\alpha\text{-AgVO}_3$. Como os pressupostos de normalidade não foram atingidos, foi realizado o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste “*post-hoc*” de Dunn para análise de múltiplas comparações ($\alpha = .05$).

Todos os testes do presente estudo foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., Califórnia, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios De Concentrações Inibitória (CIM) e Fungicida (CFM) Mínimas.

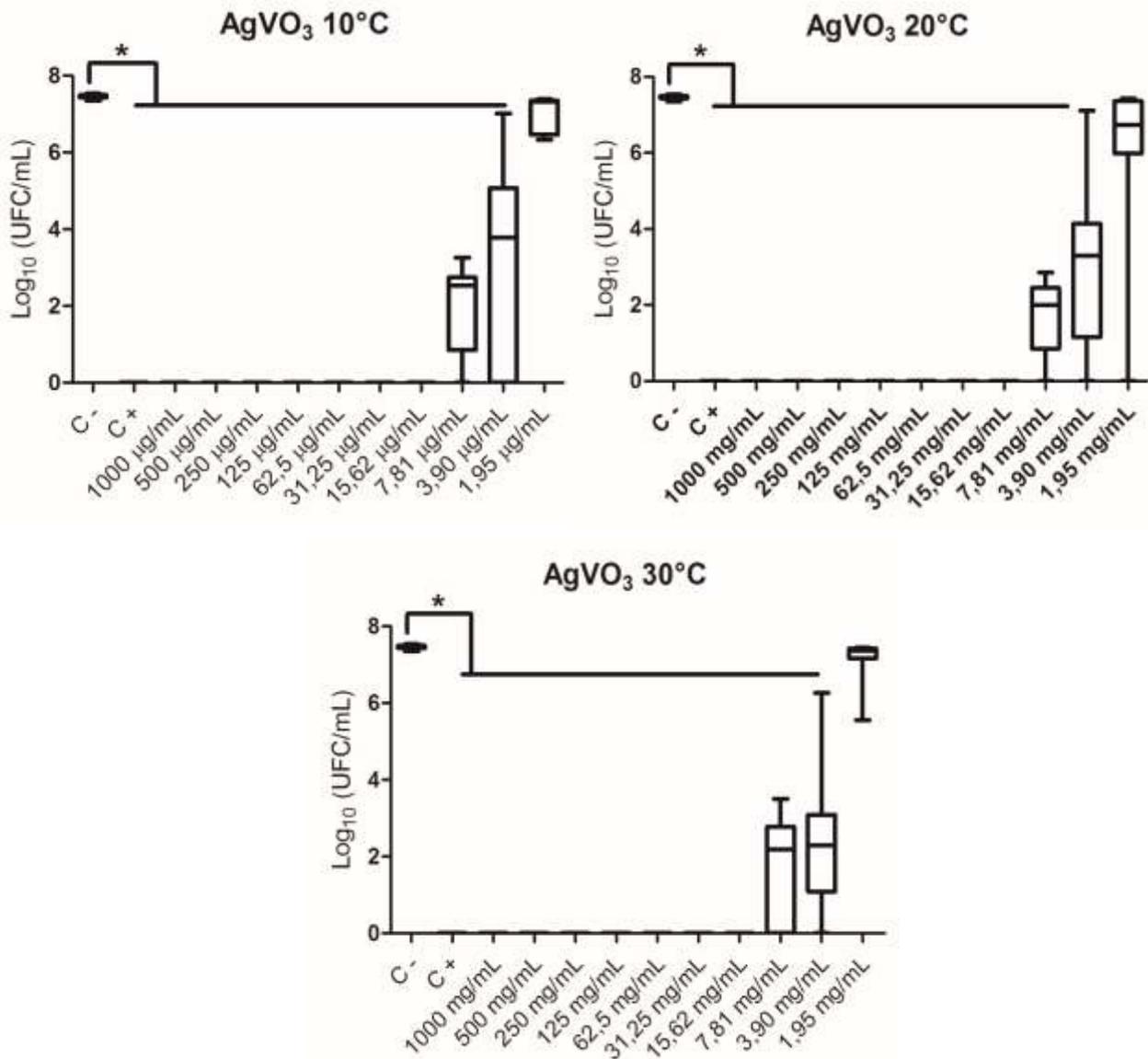
A determinação dos valores de CIM foi feita por inspeção visual, onde foi considerado o poço com menor concentração de microcristais onde não houve crescimento visual do microrganismo, ou seja, o meio presente no poço encontrava-se translúcido. O valor da CIM para os três microcristais (α -AgVO₃ à 10, 20 e 30°C) foi exatamente o mesmo: 3,9 µg/mL.

A determinação dos valores de CFM foi realizada através da contagem de colônias viáveis após o plaqueamento onde foi considerada como CFM a menor concentração onde não houve crescimento de colônias. O valor de CFM para os três microcristais (α -AgVO₃ à 10, 20 e 30°C) foi exatamente o mesmo: 15,62 µg/mL (Figura 2). Contudo, nas concentrações 7,81 µg/mL e 3,9 µg/mL (CIM), é possível notar redução no valor de UFC/mL.

5.2 Microscopia De Fluorescência

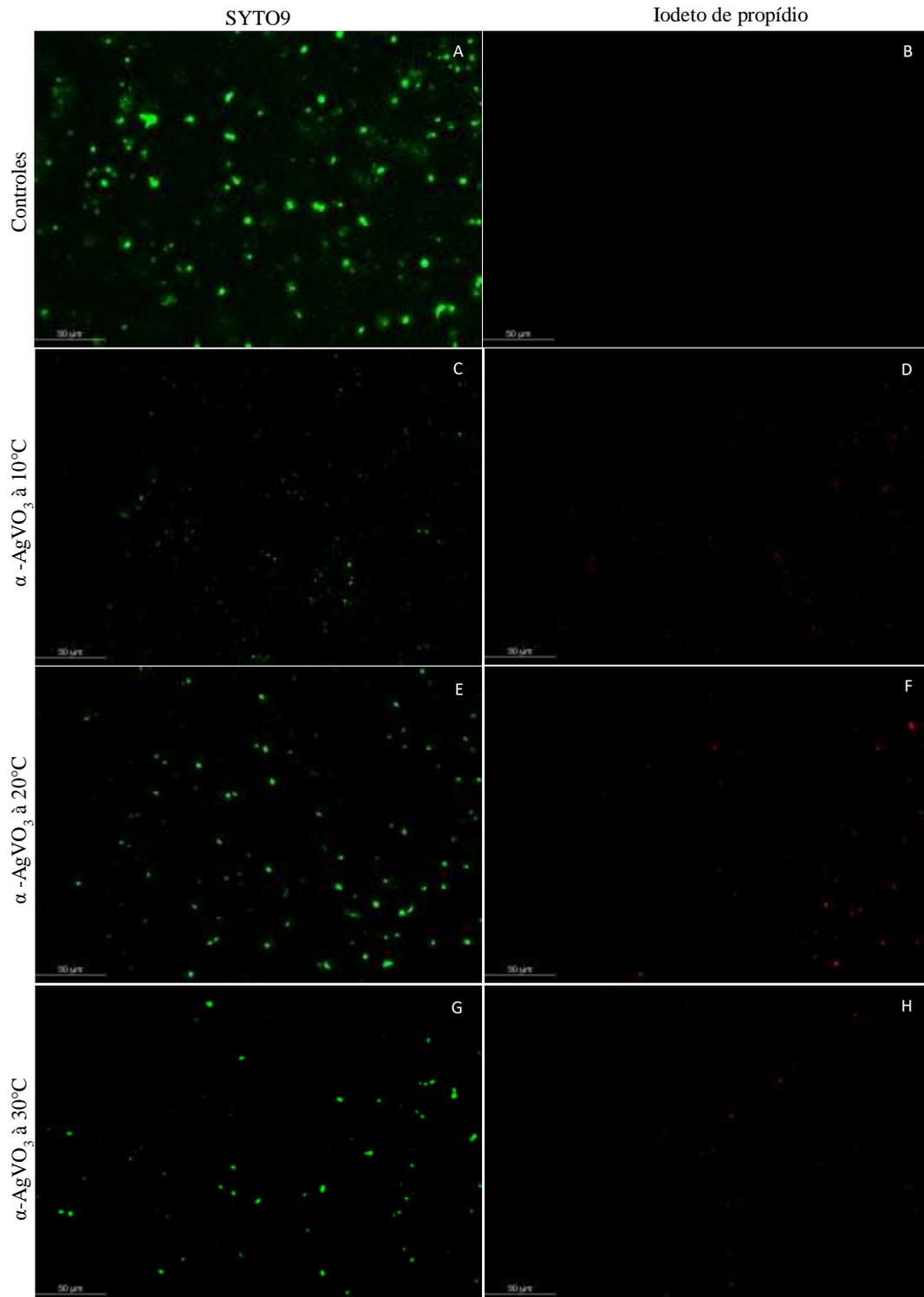
A microscopia de fluorescência foi utilizada para avaliar a viabilidade celular das suspensões celulares de *C. albicans* após 24 horas de contato com os três microcristais de α -AgVO₃ nas concentrações previamente determinadas como CIM e CFM. Todas as imagens obtidas estavam de acordo com os achados prévios de CIM e CFM. É possível notar que nas imagens referentes à CIM (Figura 3), existem algumas células vivas de *C. albicans*, enquanto que nas imagens referentes à CFM (Figura 4) não foi possível identificar nenhum microorganismo vivo.

Figura 2 - Valores médios de \log_{10} (UFC/mL) de suspensões de *C. albicans* tratadas com diferentes concentrações de α -AgVO₃ obtidas a 10°C (gráfico superior à esquerda); 20°C (gráfico superior à direita); 30°C (gráfico inferior). Barras de erro: desvio padrão. (N = 9); * p < 0,0001 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle (C +). Araraquara, 2017.



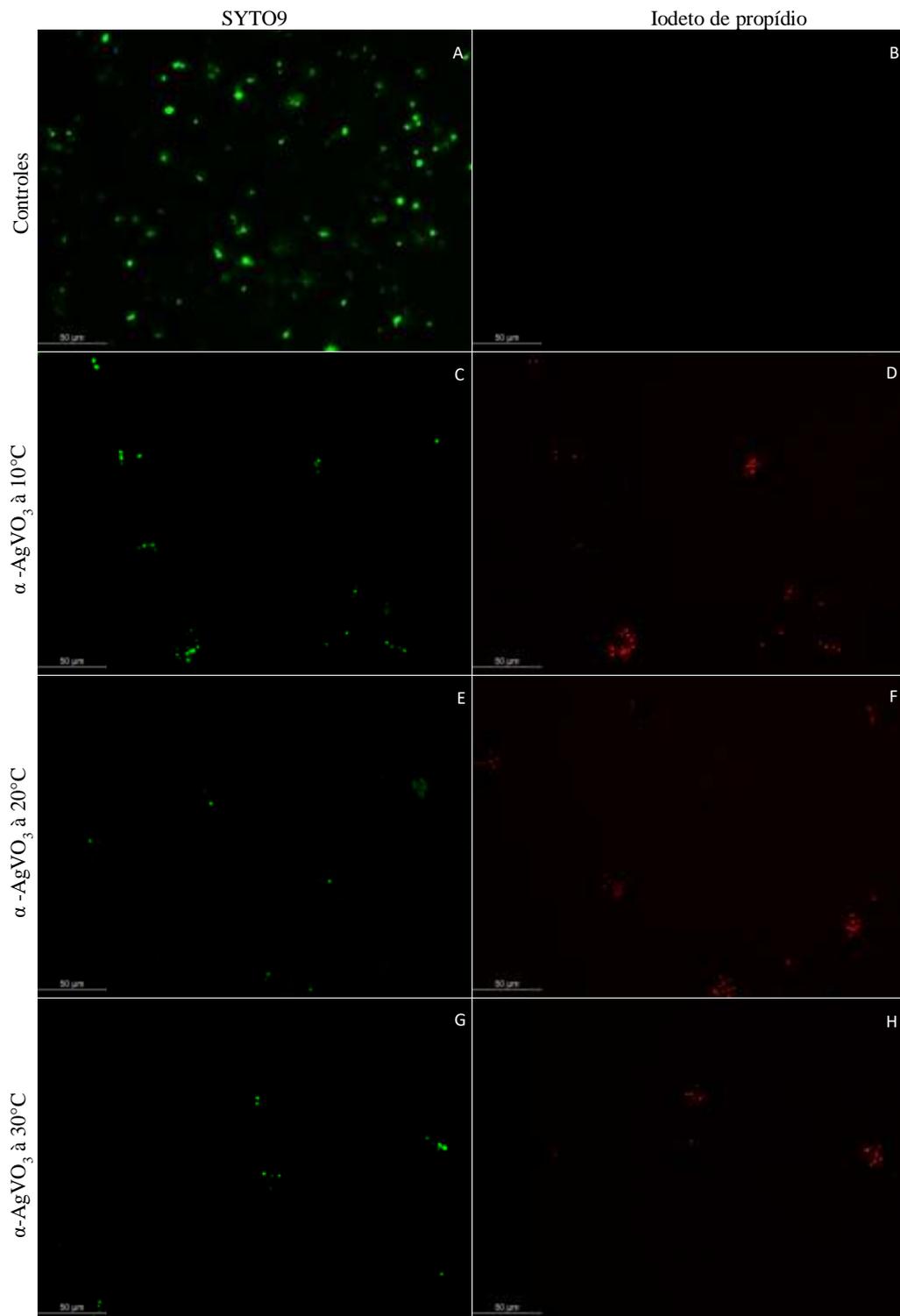
Fonte: Elaboração própria.

Figura 3 - Microscopia de fluorescência de *C. albicans* após 24 horas em contato com os microcristais na CIM. (A) Controle positivo (*C. albicans* em meio de cultura); (B) Controle negativo; (C e D) α -AgVO₃ à 10°C; (E e F) α -AgVO₃ à 20°C; (G e H) α -AgVO₃ à 30°C. (ampliação de 40x).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Microscopia de fluorescência de *C. albicans* após 24 horas em contato com os microcristais na CFM. (A) Controle positivo (*C. albicans* em meio de cultura); (B) Controle negativo; (C e D) α -AgVO₃ à 10°C; (E e F) α -AgVO₃ à 20°C; (G e H) α -AgVO₃ à 30°C. (ampliação de 40x).

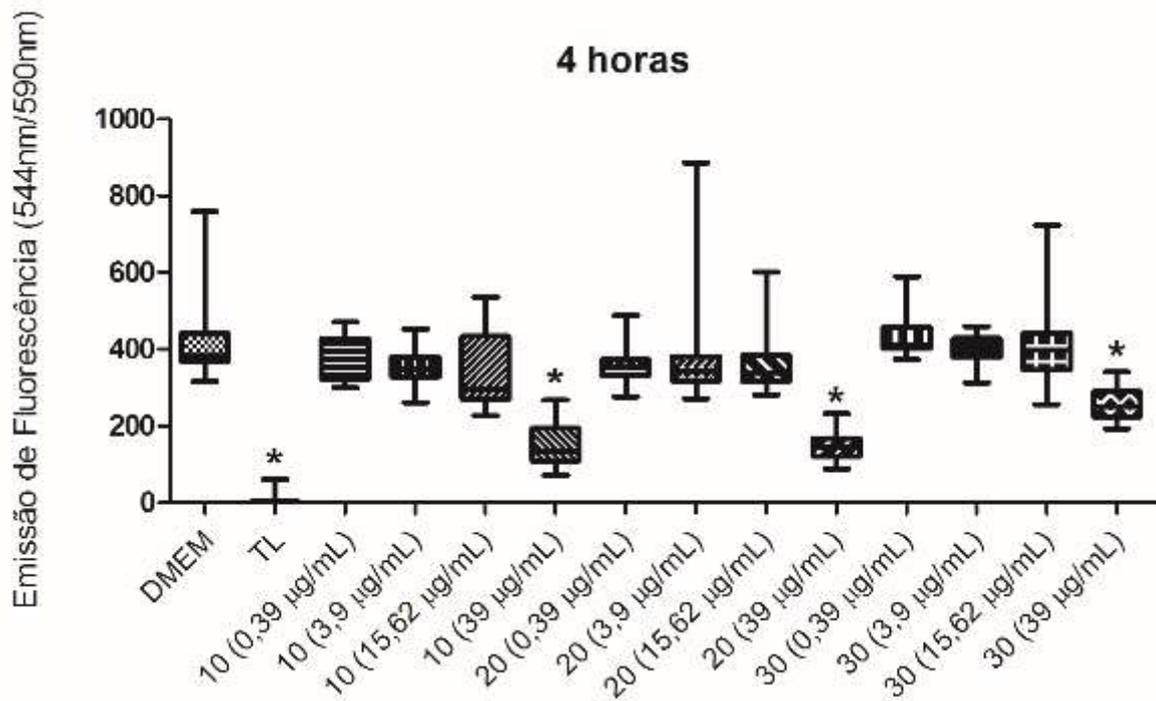


Fonte: Elaboração própria.

5.3 Ensaio de Viabilidade Celular (Ensaio de Alamar Blue)

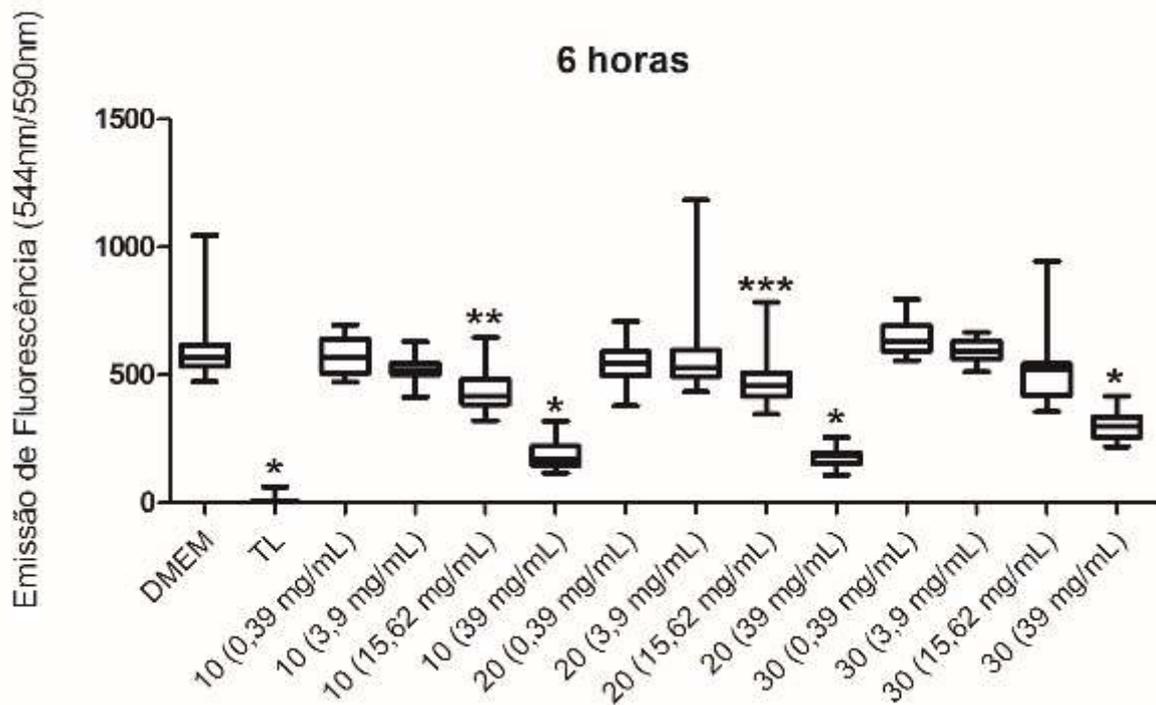
A partir da análise estatística dos resultados de viabilidade celular com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi possível observar que, nos três microcristais, as concentrações de interesse, 3,9 µg/mL e 15,62 µg/mL, correspondentes à CIM e CFM respectivamente, não foram capazes de reduzir o metabolismo celular nos tempos 4 e 24 horas (Figuras 5 e 9). Quando avaliou-se os tempos de 6, 8 e 12 horas, foi possível notar diferença estatisticamente significativa com relação ao controle na concentração de 15,62 µg/mL (Figuras 6, 7 e 8) (AgVO₃ sintetizado a 10°C: p=0,0163; p=0,0421; p=0,0150, respectivamente; AgVO₃ sintetizado a 20°C: p=0,0269; p=0,0147; p=0,0133, respectivamente), exceto no microcristal sintetizado a 30°C (p=0,9999; p=0,5177; p=0,2753, respectivamente). Em todos os períodos avaliados foi possível verificar que a concentração 39 µg/mL (CIM concentrada em 10 vezes) apresentou ampla redução da viabilidade celular (p<0,0001), e a concentração 0,39 µg/mL (CIM diluída em 10 vezes) não alterou em nenhum dos tempos avaliados o metabolismo celular (p>0,9999) (Figuras 5, 6, 7, 8 e 9). Na Figura 10 estão representadas as imagens da placa de 24 poços contendo as células em contato com os microcristais em diferentes concentrações nos diferentes tempos. Nota-se a degradação da rezasurina em resorufina ao longo do tempo de incubação.

Figura 5 - Valores médios de emissão de fluorescência das células NOK-si após 4 horas de contato com os microcristais α -AgVO₃ sintetizados à 10, 20 e 30°C, nas concentrações 0,39 μ g/mL (CIM 10 vezes diluída), 3,9 μ g/mL (CIM), 15,62 μ g/mL (CFM) e 39 μ g/mL (CIM 10 vezes concentrada). DMEM é o controle negativo (meio de cultura celular); TL é o controle positivo (tampão de lise:Triton X-100 0,2%). Barras de erro: desvio padrão. (N = 18); * $p < 0,0001$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (DMEM). Araraquara, 2017.



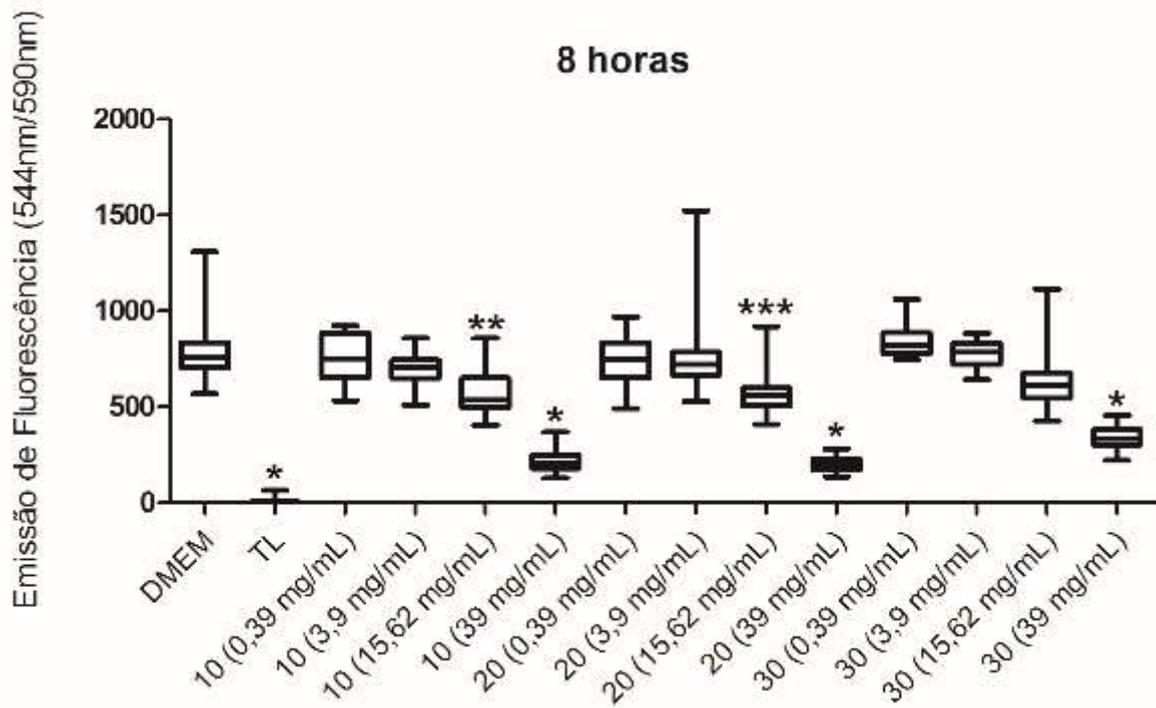
Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 - Valores médios de emissão de fluorescência das células NOK-si após 6 horas de contato com os microcristais α -AgVO₃ sintetizados à 10, 20 e 30°C, nas concentrações 0,39 μ g/mL (CIM 10 vezes diluída), 3,9 μ g/mL (CIM), 15,62 μ g/mL (CFM) e 39 μ g/mL (CIM 10 vezes concentrada). DMEM é o controle negativo (meio de cultura celular); TL é o controle positivo (tampão de lise:Triton X-100 0,2%). Barras de erro: desvio padrão. (N = 18); * p<0,0001; ** p=0,0163; *** p=0,0269 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (DMEM). Araraquara, 2017.



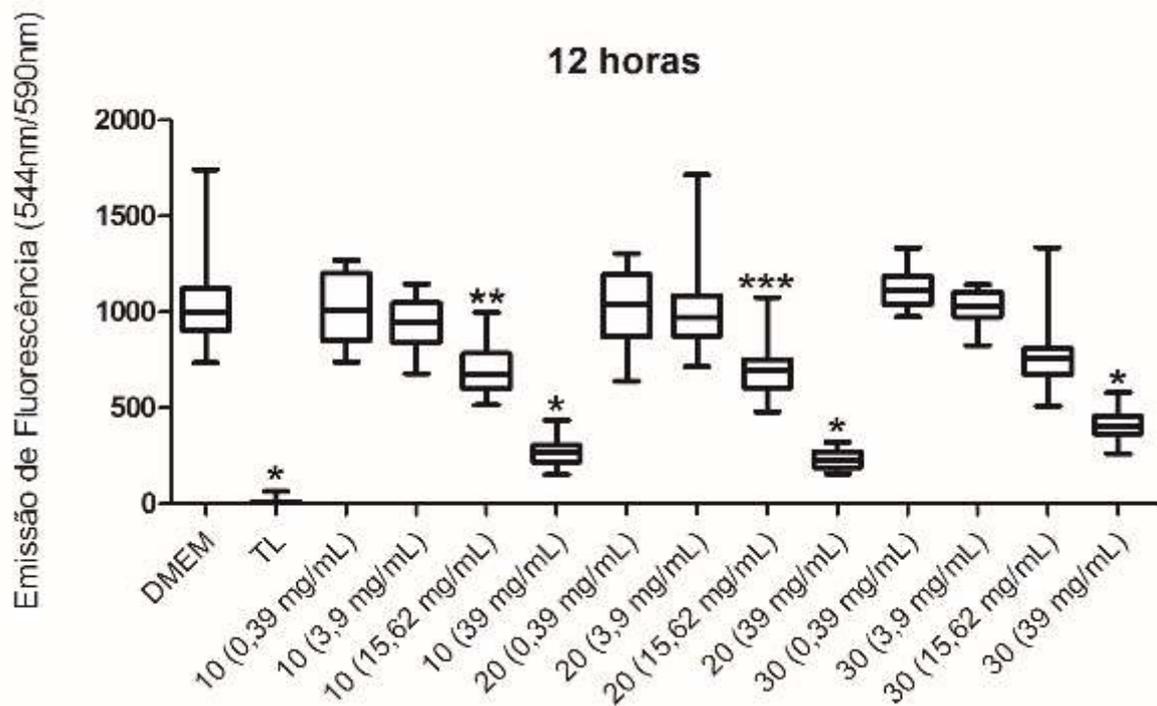
Fonte: Elaboração própria.

Figura 7 - Valores médios de emissão de fluorescência das células NOK-si após 8 horas de contato com os microcristais α -AgVO₃ sintetizados à 10, 20 e 30°C, nas concentrações 0,39 μ g/mL (CIM 10 vezes diluída), 3,9 μ g/mL (CIM), 15,62 μ g/mL (CFM) e 39 μ g/mL (CIM 10 vezes concentrada). DMEM é o controle negativo (meio de cultura celular); TL é o controle positivo (tampão de lise:Triton X-100 0,2%). Barras de erro: desvio padrão. (N = 18); * p<0,0001; ** p=0,0421; *** p=0,0147 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (DMEM). Araraquara, 2017.



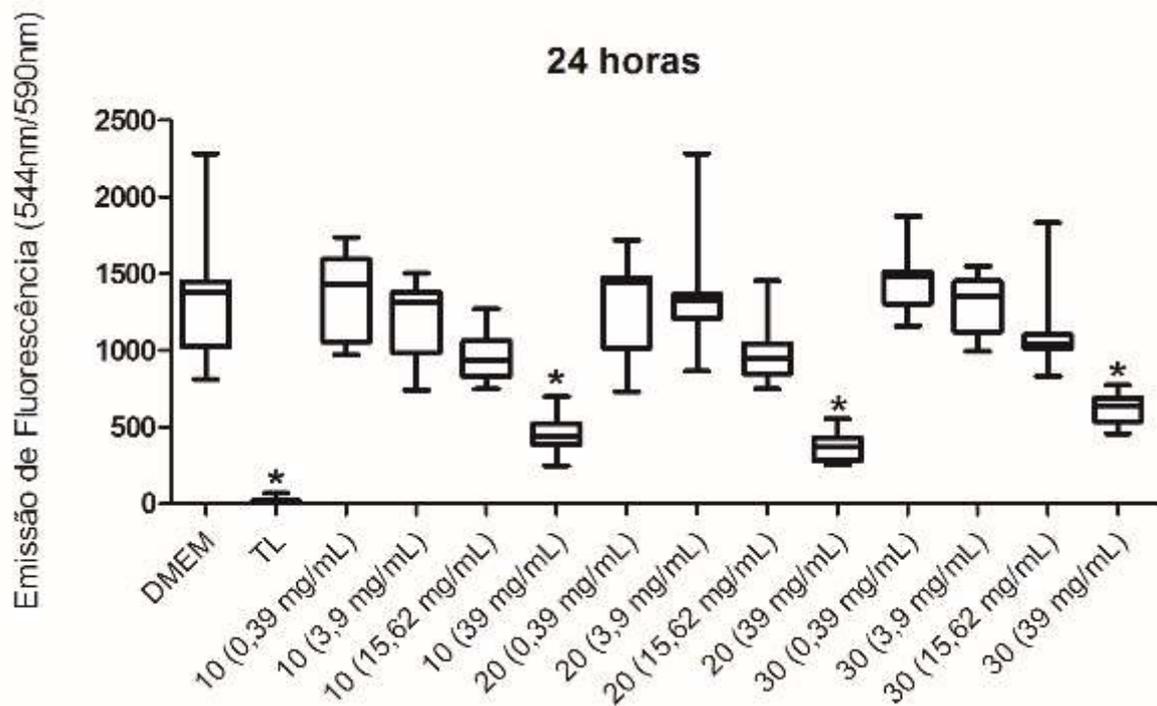
Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 - Valores médios de emissão de fluorescência das células NOK-si após 12 horas de contato com os microcristais α -AgVO₃ sintetizados à 10, 20 e 30°C, nas concentrações 0,39 μ g/mL (CIM 10 vezes diluída), 3,9 μ g/mL (CIM), 15,62 μ g/mL (CFM) e 39 μ g/mL (CIM 10 vezes concentrada). DMEM é o controle negativo (meio de cultura celular); TL é o controle positivo (tampão de lise:Triton X-100 0,2%). Barras de erro: desvio padrão. (N = 18); * p<0,0001; ** p=0,0150; *** p=0,0133 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (DMEM). Araraquara, 2017.



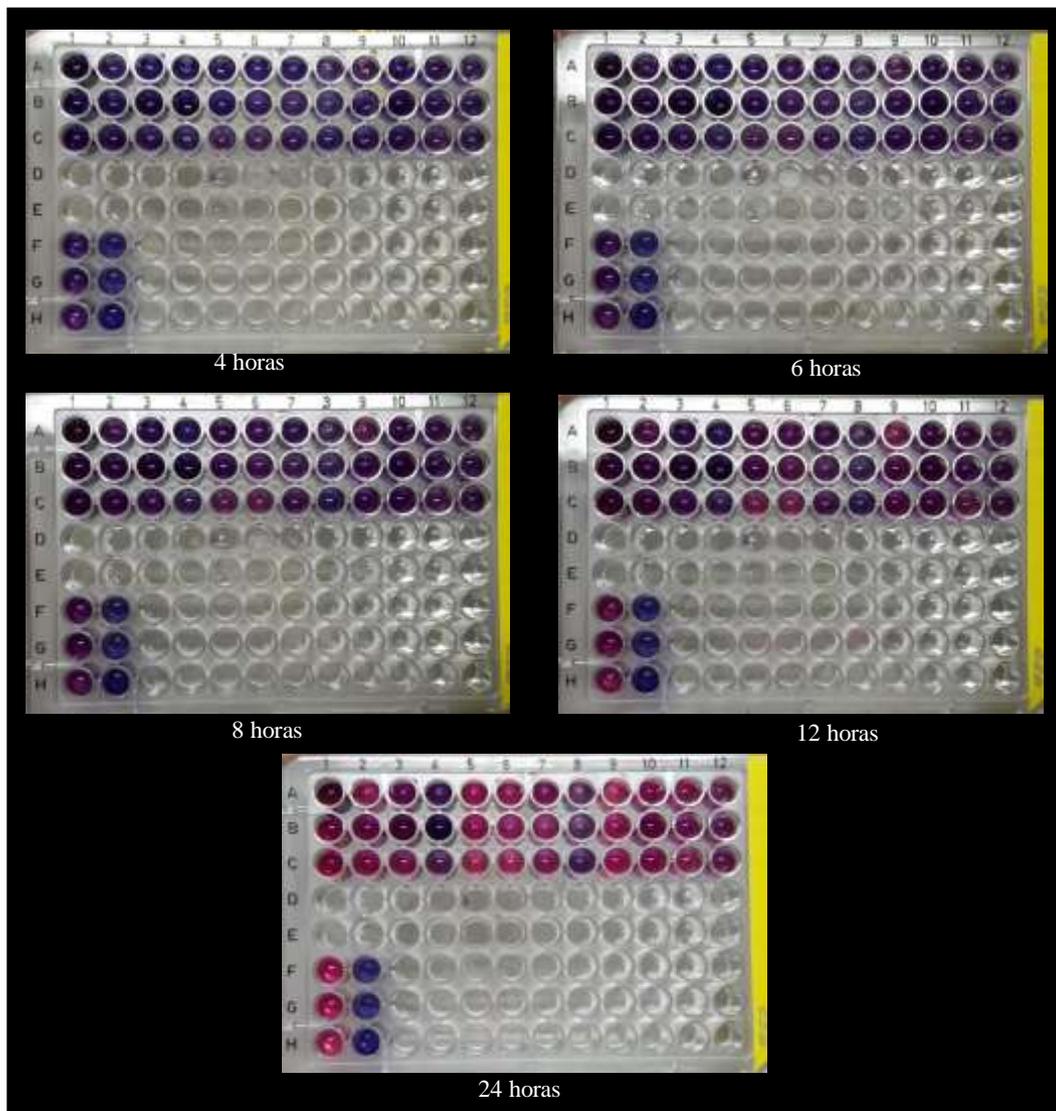
Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 - Valores médios de emissão de fluorescência das células NOK-si após 24 horas de contato com os microcristais α -AgVO₃ sintetizados à 10, 20 e 30°C, nas concentrações 0,39 μ g/mL (CIM 10 vezes diluída), 3,9 μ g/mL (CIM), 15,62 μ g/mL (CFM) e 39 μ g/mL (CIM 10 vezes concentrada). DMEM é o controle negativo (meio de cultura celular); TL é o controle positivo (tampão de lise:Triton X-100 0,2%). Barras de erro: desvio padrão. (N = 18); * p<0,0001 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (DMEM). Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 – Imagens das placas de 24 poços contendo as células NOK-si em contato com os microcristais em diferentes concentrações nos diferentes tempos avaliados. (Linhas A, B e C) coluna 1: α -AgVO₃ à 10°C na concentração de 0,39 μ g/mL; coluna 2: α -AgVO₃ à 10°C na concentração de 3,9 μ g/mL; coluna 3: α -AgVO₃ à 10°C na concentração de 15,62 μ g/mL; coluna 4: α -AgVO₃ à 10°C na concentração de 39 μ g/mL; coluna 5: α -AgVO₃ à 20°C na concentração de 0,39 μ g/mL; coluna 6: α -AgVO₃ à 20°C na concentração de 3,9 μ g/mL; coluna 7: α -AgVO₃ à 20°C na concentração de 15,62 μ g/mL; coluna 8: α -AgVO₃ à 20°C na concentração de 39 μ g/mL; coluna 9: α -AgVO₃ à 30°C na concentração de 0,39 μ g/mL; coluna 10: α -AgVO₃ à 30°C na concentração de 3,9 μ g/mL; coluna 11: α -AgVO₃ à 30°C na concentração de 15,62 μ g/mL; coluna 12: α -AgVO₃ à 30°C na concentração de 39 μ g/mL; (Linhas F, G e H) coluna 1: DMEM - controle negativo (meio de cultura celular); coluna 2: TL - controle positivo (tampão de lise: Triton X-100 0,2%).

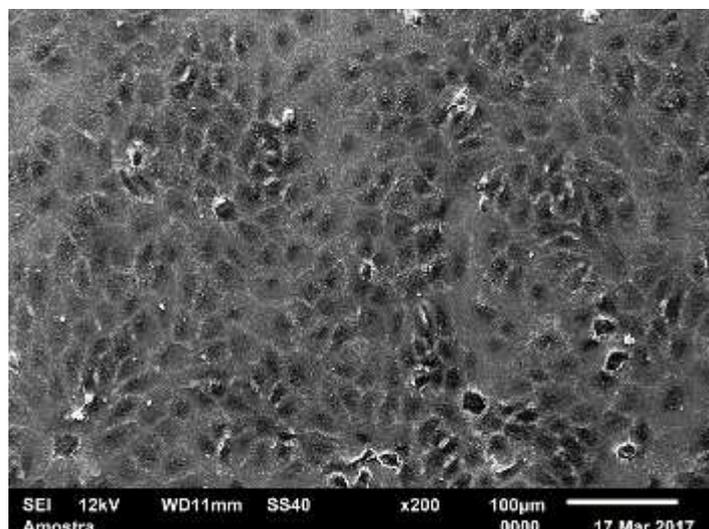


Fonte: Elaboração própria.

5.4 Microscopia Eletrônica De Varredura (MEV)

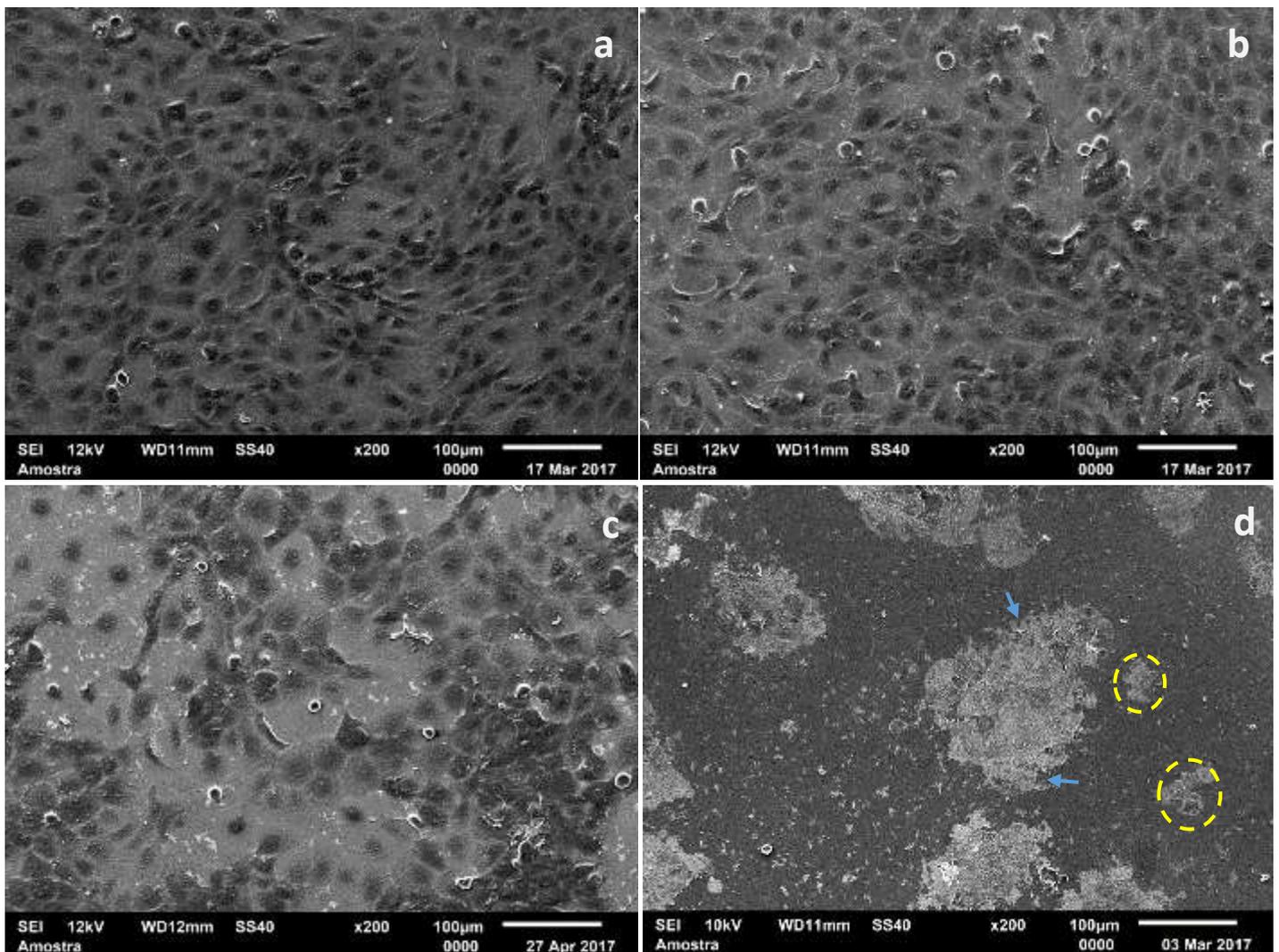
A morfologia das células analisadas por MEV apresentaram padrão diretamente relacionado aos resultados obtidos pelo ensaio de Alamar Blue. Nota-se que nas concentrações 0,39 µg/mL, 3,9 µg/mL e 15,62 µg/mL, (CIM diluída 10 vezes, CIM e CFM, respectivamente) a morfologia celular se mostrou muito semelhante ao controle positivo de células vivas (DMEM – Figura 11), o que sugere a biocompatibilidade dos microcristais nas condições estudadas, mesmo após 24 horas de contato (Figuras 12a, 12b, 12c, 13a, 13b, 13c, 14a, 14b e 14c). As células expostas à concentração tóxica dos microcristais revelada pelo Alamar Blue, 39 µg/mL (CIM concentrada 10 vezes) (Figuras 12d, 13d e 14d), apresentaram morfologia muito sugestiva de morte celular por necrose, devido à grande similaridade com a morfologia de necrose celular induzida pelos controles Triton X-100 e H₂O₂ (Figura 15); neste caso foi possível observar alterações celulares características do processo necrótico como aumento do volume citoplasmático, núcleo picnótico (o núcleo celular apresenta volume reduzido e cromatina condensada), em cariorrexe (fragmentação do núcleo picnótico) ou em cariólise (dissolução da cromatina), membrana celular danificada e extravasamento celular. Por outro a morte celular apoptótica induzida pelo controle camptotecina foi caracterizada por células com membrana íntegra, citoplasma reduzido e formação de corpos apoptóticos.

Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células NOK-si cultivadas em meio DMEM. (Ampliação de 200x). Araraquara, 2017.



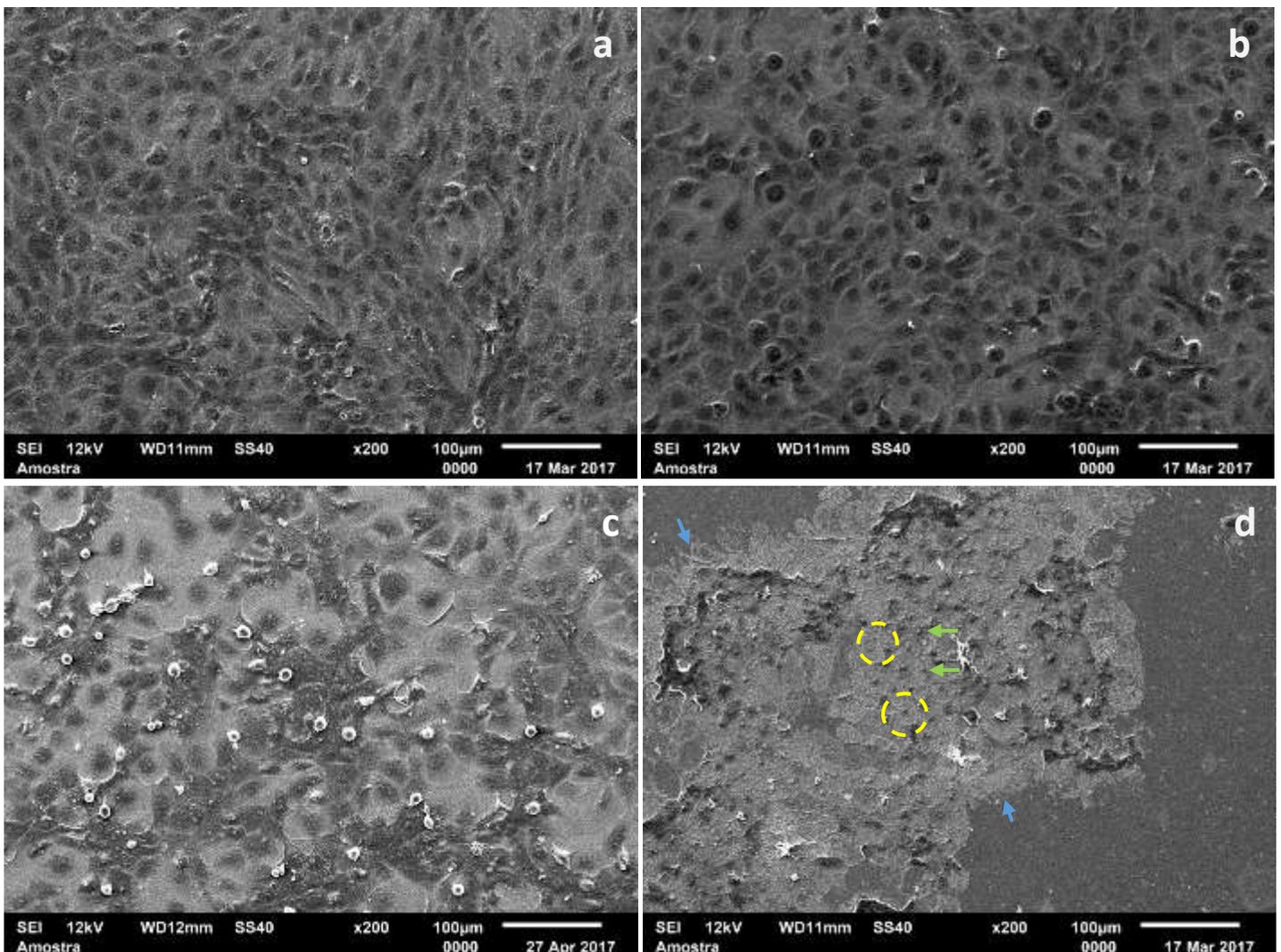
Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 – Imagens de Microscopia eletrônica de varredura de células NOK-si após 24 horas de contato com diferentes concentrações de α -AgVO₃ à 10°C. Em (a) células incubadas com microcristal na concentração de 0,39 μ g/mL (CIM diluída 10 vezes); em (b) células incubadas com microcristal na concentração de 3,9 μ g/mL (CIM); em (c) células incubadas com microcristal na concentração de 15,62 μ g/mL (CFM); em (d) células incubadas com microcristal na concentração de 39 μ g/mL (CIM concentrada 10 vezes). Setas em azul indicam o rompimento da membrana plasmática; tracejados amarelos indicam o aumento de volume do citoplasma. (Ampliação de 200x). Araraquara, 2017.



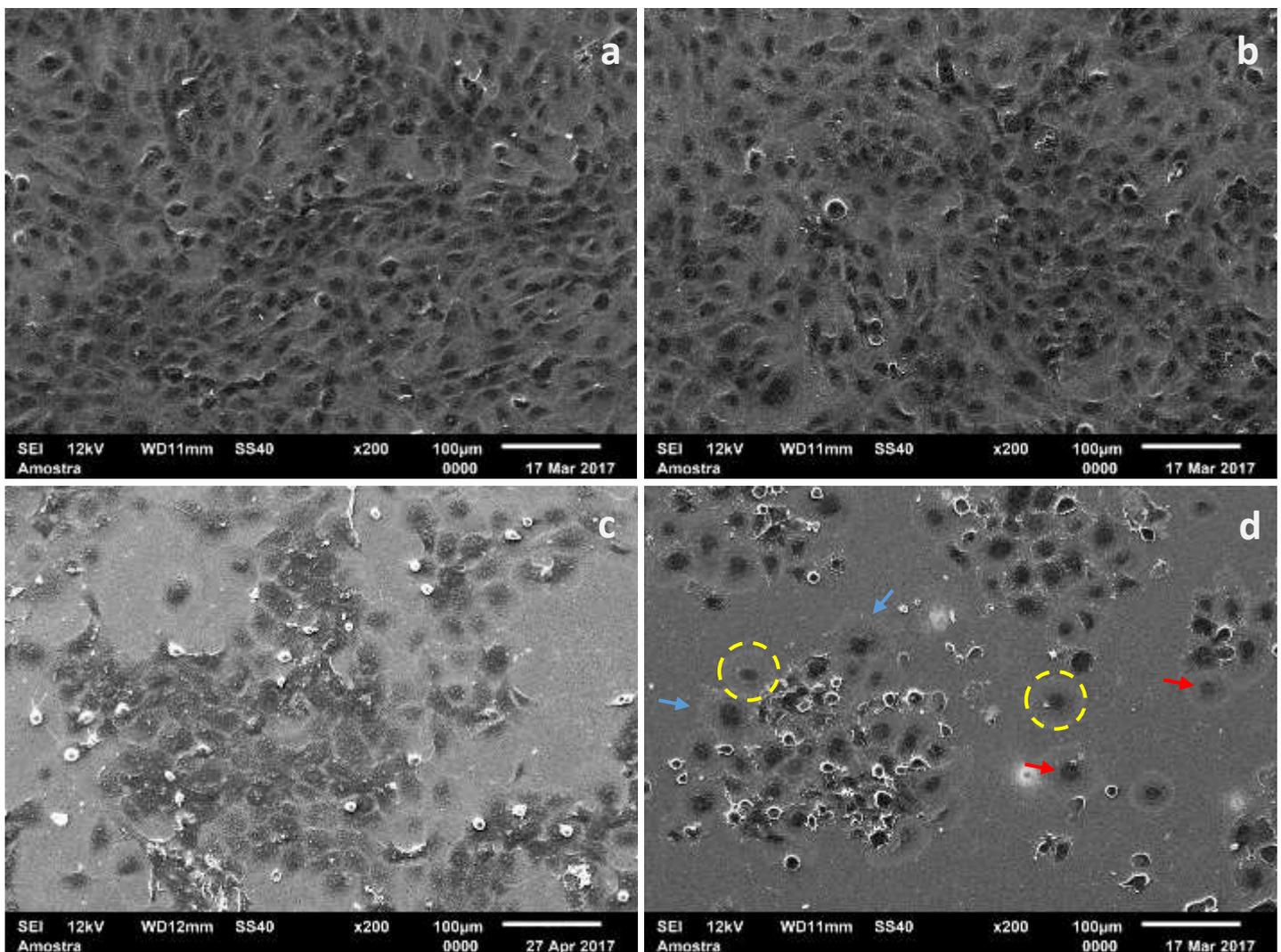
Fonte: Elaboração própria.

Figura 13 - Imagens de Microscopia eletrônica de varredura de células NOK-si após 24 horas de contato com diferentes concentrações de α -AgVO₃ à 20°C. Em (a) células incubadas com microcristal na concentração de 0,39 μ g/mL (CIM diluída 10 vezes); em (b) células incubadas com microcristal na concentração de 3,9 μ g/mL (CIM); em (c) células incubadas com o microcristal na concentração de 15,62 μ g/mL (CFM); em (d) células incubadas com microcristal na concentração de 39 μ g/mL (CIM concentrada 10 vezes). Setas em azul indicam o rompimento da membrana plasmática, setas em verde indicam núcleo celular picnótico; tracejados amarelos indicam o aumento de volume do citoplasma. (Ampliação de 200x). Araraquara, 2017.



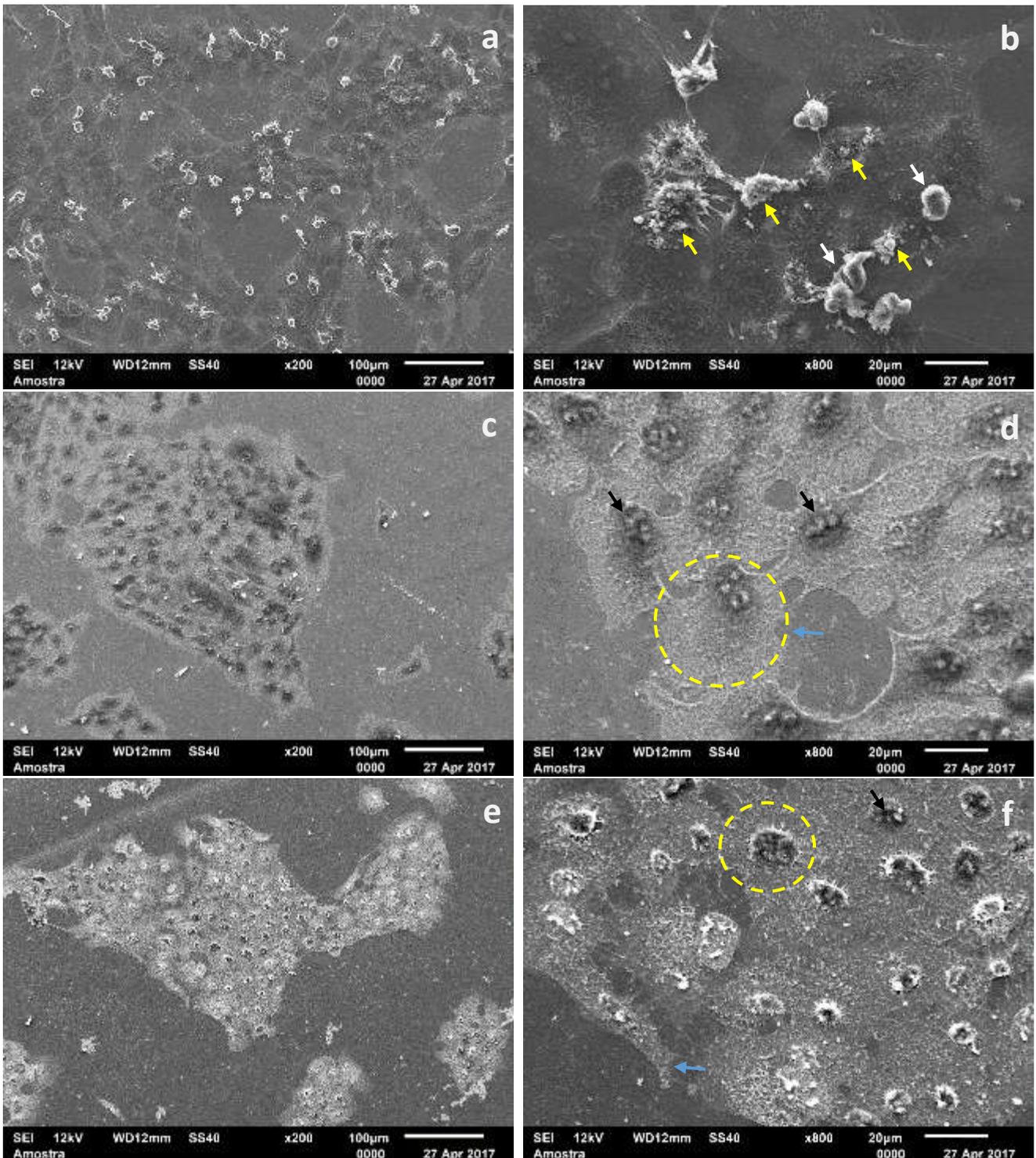
Fonte: Elaboração própria.

Figura 14 - Imagens de Microscopia eletrônica de varredura de células NOK-si após 24 horas de contato com diferentes concentrações de α -AgVO₃ à 30°C. Em (a) células incubadas com microcristal na concentração de 0,39 μ g/mL (CIM diluída 10 vezes); em (b) células incubadas com microcristal na concentração de 3,9 μ g/mL (CIM); em (c) células incubadas com microcristal na concentração de 15,62 μ g/mL (CFM), em (d) células incubadas com microcristal na concentração de 39 μ g/mL (CIM concentrada 10 vezes). Setas em azul indicam o rompimento da membrana plasmática, setas em vermelho indicam núcleo celular em cariólise; tracejados amarelos indicam o aumento de volume do citoplasma. (Ampliação de 200x). Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 – Imagens de Microscopia eletrônica de varredura de células NOK-si após após contato com camptotecina (a, b); H_2O_2 (c, d); e Triton X-100 (e, f). Setas amarelas indicam corpos apoptóticos, setas brancas indicam a manutenção da integridade da membrana, setas azuis indicam o rompimento da membrana plasmática, setas pretas indicam núcleo em cariorrexe, tracejados amarelos indicam o aumento de volume do citoplasma. (Ampliação de 200x na primeira coluna e de 800x na segunda coluna). Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, os microcristais contendo prata têm sido amplamente estudados devido às suas qualidades melhoradas quando comparados com nanopartículas contendo prata, especialmente no que se refere à biocompatibilidade. Essas partículas de metais em maior tamanho contendo prata conseguiram manter as propriedades positivas das nanopartículas de prata, como ação contra fungos e bactérias, e possibilitaram a melhora na biocompatibilidade dos compostos, uma vez que a quantidade de prata foi reduzida para a mínima necessária e, devido ao maior tamanho das partículas, menor permeabilização para o interior das células mamíferas ^{10, 11, 22, 25}.

Sabe-se que a prata vem sendo utilizada em diversos campos desde a antiguidade, como por exemplo na medicina, em utensílios de cozinha, jóias, roupas e até mesmo para melhorar a qualidade da água, tendo os estudos para avaliar seus efeitos em microrganismos e em células mamíferas sido intensificados nos últimos anos^{1, 2, 6-8,10-12, 14, 17, 19, 22, 25}. A grande maioria dos estudos publicados aborda a atividade antimicrobiana e biocompatibilidade de nanopartículas de prata, sendo os estudos sobre microcristais ainda escassos. Gliga et al.¹² (2014), chamam a atenção para um fato importante: a comparação entre os achados da literatura deve ser feita com muita cautela pois os materiais investigados são diferentes em cada estudo (fabricados de diferentes formas e grau de pureza, com diferentes tamanhos, testados em linhagens celulares diferentes sob diferentes condições de cultivo e, muitas vezes, sem o uso de materiais de referência). Devido a esses diversos fatores, são reportados na literatura achados contraditórios no que diz respeito às concentrações efetivas contra microrganismos e concentrações que podem ser consideradas biocompatíveis.

Neste estudo, microcristais α -AgVO₃ foram sintetizados através do método de CP sob três diferentes temperaturas (10, 20 e 30°C) e a atividade antifúngica dos três compostos foi avaliada contra *C. albicans* (90028) em suspensão. Além disso, a biocompatibilidade foi testada em células do tipo queratinócitos orais normais (NOK-si).

Embora os microcristais tenham sido sintetizados em diferentes temperaturas, o que lhes conferiu diferentes morfologias, os três apresentaram os mesmos valores

de CIM e CFM (3,90 $\mu\text{g/mL}$ e 15,62 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Esse achado foi interessante, uma vez que diferenças morfológicas relatadas na literatura tendem a produzir diferentes respostas microbiológicas. Num estudo recentemente publicado pelo grupo de pesquisa em que estamos inseridos²⁵, os mesmos microcristais aqui utilizados foram testados contra *S. aureus* resistente à metilina e apresentaram diferentes valores de concentração inibitória (CIM) e bactericida (CBM) mínimas de acordo com as diferentes morfologias dos microcristais. O valor de CIM/CBM, quando testados os microcristais sintetizados à 10°C, de formato filamentosos, se apresentou menor (62,5 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado aos valores de CIM/CBM (125 $\mu\text{g/mL}$) dos microcristais sintetizados à 20°C e 30°C, morfologicamente semelhantes a flores 3D. Diferenças entre os valores de CIM e CFM/CBM encontrados para os dois microrganismos estudados podem ser explicadas devido às diferenças morfológicas e estruturais entre os dois microrganismos. Em bactérias Gram-positivas, como o SARM, não há membrana externa, a parede celular de peptidoglicano é espessa, variando em torno de 20-50 nm, e cadeias de ácido teicóico atravessam a parede celular^{5, 26}. Essa espessura pode ter contribuído para a maior resistência desse microrganismo contra o tratamento utilizado. Além disso, devido às concentrações necessárias para eliminar *C. albicans* serem menores, possivelmente a diferença entre os três microcristais pode não ter sido detectada.

De acordo com a literatura, os radicais OH^* , O_2 e HO_2^* , são os principais responsáveis pela morte microbiana de culturas submetidas à tratamento com microcristais associados à prata²⁵. Esses radicais gerados atuam sobre componentes importantes do microrganismo, como polissacarídeos, lipídeos e proteínas da membrana celular, alterando sua integridade, fator fundamental para a sobrevivência do microrganismo²². No caso do $\alpha\text{-AgVO}_3$, esses radicais são formados quando os “clusters” complexos transferem um buraco para a molécula de água presente no meio, que se decompõe em radicais hidroxila e prótons (OH^* e H^*). Simultaneamente, os “clusters” carregados com elétrons o transferem para as moléculas de oxigênio (O_2), formando O_2' , que interage com o próton, formando o radical HO_2^* . Oliveira et al.²⁵ (2017) propuseram um mecanismo de ação de inativação de microrganismos, baseado em cálculos teóricos da energia específica das superfícies (001) e (011) dos cristais. De acordo com a representação de Wulff, essas faces específicas apresentam baixas energias superficiais ($E_{\text{surf}} = 0,24 \text{ J/m}^2$ e $0,12 \text{ J/m}^2$, respectivamente), sendo, portanto, mais facilmente polarizadas, permitindo a

formação de espécies reativas, e eliminando o microrganismo SARM de maneira mais eficaz²⁵. No presente trabalho, não foi encontrada correlação entre diferentes morfologias dos microcristais e atividade antifúngica contra *C. albicans*.

Atualmente, um número reduzido de estudos que avaliem a atividade antifúngica de microcristais contendo prata pode ser encontrado na literatura. Um estudo publicado em 2016 por autores do nosso grupo de pesquisa¹⁰ avaliou a atividade de microcristais de β -Ag₂MoO₄ contra *C. albicans*. Os autores relataram que houve inibição do crescimento e ação fungicida quando o microcristal em questão encontrava-se numa concentração de 15,62 µg/mL. Outro estudo de pesquisadores do nosso grupo¹¹ investigou a ação de microcristais de α -Ag₂WO₄ contra *C. albicans* com a mesma metodologia utilizada neste trabalho. Os autores verificaram que a CIM e a CFM foram as mesmas (7,81 µg/mL). Estudos que abordem a atividade antifúngica dos microcristais de α -AgVO₃ não foram encontrados na literatura. A partícula quimicamente mais semelhante relatada na literatura, β -AgVO₃ (Castro et al., 2014)⁶, inibiu o crescimento de *C. albicans* na concentração de 62,5 µg/mL. É provável que essa alta concentração implique em maior toxicidade, contudo os autores do estudo não realizaram esta análise. No presente estudo, o microcristal apresentou CIM 16 vezes menor do que o encontrado no estudo de Castro et al.⁶ (2014).

Os achados na microscopia de fluorescência estavam de acordo com os achados nos ensaios microbiológicos, onde na CIM dos três microcristais foi possível notar redução no número de células quando comparadas ao controle. Já nas imagens dos microcristais na CFM em contato com o microrganismo, foi possível notar a ausência de células viáveis, o que também corroborou com os resultados dos ensaios microbiológicos.

O efeito destes três microcristais sobre a biocompatibilidade *in vitro* nos queratinócitos orais (NOK-si) foi avaliada, inicialmente, pela viabilidade celular pelo ensaio de Alamar Blue. Nestes experimentos, os três microcristais se mostraram biocompatíveis com o tipo celular estudado, nas concentrações de interesse (3,9 µg/mL e 15,62 µg/mL, CIM e CFM respectivamente). Não houve qualquer diminuição da viabilidade celular após contato com os microcristais na CIM em todos os tempos analisados (Figuras 5, 6, 7, 8 e 9). Já na CFM, os microcristais foram biocompatíveis nos tempos de 4 e 24 horas (Figuras 5 e 9). Isto pode ser devido, primeiramente à um curto período de exposição (4 horas), o qual seria insuficiente para indução da morte celular com 15,62 µg/mL de microcristais; e pela recuperação das células com 24

horas de contato com os microcristais, ou seja, a diminuição da viabilidade celular induzida pela concentração fungicida estaria mais relacionada à diminuição do metabolismo celular do que à indução de morte propriamente dita. Por outro lado, a concentração 39 µg/mL (CIM concentrada 10 vezes) apresentou-se altamente citotóxica para os queratinócitos estudados, em todos os tempos analisados (Figuras 5, 6, 7, 8 e 9). Em termos comparativos, atualmente não existem estudos na literatura que abordam o efeito citotóxico de microcristais de α -AgVO₃ em suspensão (associados ou não à prata).

Num estudo realizado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa¹⁵, a viabilidade celular de células do tipo fibroblasto gengival humano (FGH) foi avaliada após o contato destas células com dois diferentes microcristais: α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄. Nas concentrações de interesse (7,81 µg/mL para α -Ag₂WO₄; 15,62 µg/mL para β -Ag₂MoO₄), ambos os microcristais se apresentaram citocompatíveis com o tipo celular estudado. As concentrações de interesse utilizadas nestes estudos foram referentes às CIM/CFM destes microcristais contra *C. albicans* (ATCC 90028), determinadas em outros dois estudos do grupo^{10,11}.

A literatura existente aborda o efeito citotóxico de nanopartículas de prata, de forma que uma comparação direta com os resultados obtidos neste estudo se torna difícil de ser realizada. Além disso, a literatura não apresenta concordância no que diz respeito à citotoxicidade dos materiais em questão. Outros estudos presentes na literatura abordam o efeito citotóxico de nanopartículas de prata em diferentes linhagens celulares. Em 2008, Arora et al.¹, avaliaram o efeito de nanopartículas de prata em dois diferentes tipos de células (HT-1080 e A431, células derivadas da derme humana e epiderme humana, respectivamente). Os autores demonstraram que os valores de IC₅₀ eram 10,6 µg/mL e 11,6 µg/mL para HT-1080 e A431, respectivamente. Hackenberg et al.¹⁴ (2011) demonstraram que após a exposição a nanopartículas de prata durante 1, 3 e 24 horas, a viabilidade celular de células tronco mesenquimais humanas (hMSCs) diminuiu significativamente em relação ao controle e efeitos citotóxicos significativos foram observados na concentração de 10 µg/mL. Kaba e Egorova¹⁹ (2015) estudaram os efeitos tóxicos de nanopartículas de prata em dois tipos de células diferentes: HeLa e U937 (linhagens de células tumorais). Foi observado que a viabilidade celular diminuiu em concentrações muito baixas de nanopartículas de prata (2 µg/mL), após incubação de 4 horas e que, após 24 horas, a concentração de nanopartículas que diminuiu a viabilidade celular para as células

HeLa foi a mesma (2 µg/mL), enquanto que aquela para as células U937 diminuiu (0,5 µg/mL).

Morfologicamente, os queratinócitos se apresentam como células poligonais em monocamada, com citoplasma e núcleo preservados. Essas características estão evidentes nas microscopias eletrônicas de varredura realizadas neste estudo, onde a monocamada de células NOK-si mantiveram suas características quando em contato com os microcristais de α -AgVO₃ sintetizados à 10, 20 e 30°C, nas concentrações de interesse (3,9 µg/mL e 15,62 µg/mL). É possível, entretanto, notar a ocorrência de alterações morfológicas ao manter as células NOK-si em contato com a concentração de microcristais mais elevada (39 µg/mL). Nesta última concentração, as células se apresentaram tumeficadas e com a membrana plasmática rompida, características consistentes com morte celular por necrose (representada pelas imagens de indução de morte celular com H₂O₂ e solução tampão de lise – Triton X-100). Este tipo de morte celular é um processo patológico e desordenado, onde os fatores responsáveis pela morte resultam em lesão celular irreversível, com aumento no volume citoplasmático, ruptura da membrana celular, inchaço de organelas citoplasmáticas, perda dos componentes intracelulares e moderada condensação da cromatina²². Diferentemente da morte celular por necrose, na morte celular por apoptose (representada pelas imagens de indução de morte celular com camptotecina), a célula se apresenta arredondada, com retração dos pseudópodes, redução do volume celular (picnose), cromatina condensada, e *blebbing* (formação de bolhas) da membrana plasmática, mantendo sua integridade até o estágio final de morte²¹.

Apesar dos resultados promissores aqui relatados, esse estudo possui algumas limitações. Por se tratar de um estudo *in vitro* inicial são necessários outros ensaios mais complexos para melhor compreender o mecanismo de ação dos microcristais aqui estudados. A avaliação da ação destes microcristais em biofilmes simples e multiespécie, bem como sua ação sobre células em tecido devem ser realizadas. Estudos futuros devem focar na avaliação destes microcristais *in vivo*, bem como no seu mecanismo de ação.

Para que haja um avanço considerável no campo de materiais em microescala, já que as pesquisas nesta área ainda são incipientes, é preciso que haja uma padronização no que diz respeito aos ensaios a serem realizados (quer seja com microrganismos, quer seja com células mamíferas), maior transparência com relação às metodologias e materiais utilizados, além de adequadas caracterizações dos

compostos a serem avaliados, de forma que os achados relatados por um grupo de pesquisa possam ser extrapolados para outros grupos.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados aqui relatados, foi possível concluir que:

1. Os três microcristais estudados (α -AgVO₃ a 10, 20 e 30°C) apresentaram atividade fungistática e fungicida contra *C. albicans*.
2. Os três microcristais, nas concentrações inibitória (CIM) e fungicida (CFM) mínimas (3,9 µg/mL e 15,62 µg/mL, respectivamente) apresentaram-se biocompatíveis.
3. A maior concentração avaliada (39 µg/mL) causou a morte de células NOK-si e, por meio da análise em microscopia eletrônica de varredura, é possível sugerir que os microcristais de α -AgVO₃ causaram morte celular por necrose.

REFERÊNCIAS*

- 1 Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies. *Toxicol Lett.* 2008;179(2):93-100. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.04.009.
- 2 AshaRani PV, Mun GLK, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.* 2009;3(2):279-90. doi: 10.1021/nn800596w.
- 3 Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanente guest. *DNA Cell Biol.* 2009;28(8):405-11. doi: 10.1089/dna.2009.0874.
- 4 BDBioscience – Support protocol BD [homepage na internet] [acesso em 2017 abr 1]. Disponível em: http://www.bdbiosciences.com/in/resources/protocols/cell_death.jsp.
- 5 Brown S, Santa Maria Jr JP, Walker S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2013;67:313-36. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155620.
- 6 Castro DT, Holtz RD, Alves OL, Watanabe E, Valente MLC, Silva CHL et al. Development of a novel resin with antimicrobial properties for dental application. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(5):442-9.
- 7 Castro DT, Valente MLC, Agnelli JAM, Silva CHL, Watanabe E, Siqueira RL et al. In vitro study on the antibacterial properties and impact strength of dental acrylic resins modified with a nanomaterial. *J Prosthet Dent.* 2016;115(2):238-46. doi: 10.1016/j.prosdent.2015.09.003.
- 8 Castro DT, Valente MLC, Silva CHL, Watanabe E, Siqueira RL, Schiavon MA et al. Evaluation of antibiofilm and mechanical properties of new nanocomposites based on acrylic resins and silver vanadate nanoparticles. *Arch Oral Biol.* 2016;67:46-53. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.03.002.
- 9 CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard, 3rd ed. CLSI Document M27-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. [homepage na internet] [acesso em 2016 abr 1]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPAS1M27-A2.pdf

* 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-marco-2015.pdf>

- 10 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. *Dalton Trans.* 2016;45(26):10736-43. doi: 10.1039/c6dt00343e.
- 11 Foggi CC. Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de óxidos bimetálicos e de revestimentos depositados a plasma sobre resina acrílica. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.
- 12 Gliga AR, Skoglund S, Wallinder IO, Fadeel B, Karlsson HL. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:11. doi: 10.1186/1743-8977-11-11.
- 13 Guicun L, Kun C, Congsheng Y, Hongrui P. One-step synthesis of Ag nanoparticles supported on AgVO₃ nanobelts. *Mater Lett.* 2007;62(4):735-8.
- 14 Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Hummel S, Technau A, Froelich K et al. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol Lett.* 2011;201(1):27-33. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.12.001.
- 15 Haro Chávez NL. Efeito citotóxico de microcristais de Tungstato de prata e de Molibdato de prata em fibroblastos gengivais humanos cultivados em monocamada e em equivalente dermal [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.
- 16 Hoffman R. In vitro toxicology and cellular fate determination using promega's cell-based assays. *Cell Notes Issue.* 2002. [homepage na internet] [acesso em 2017 abr 1]. Disponível em: <https://www.promega.com.br/resources/pubhub/cellnotes/in-vitro-toxicology-and-cellular-fate-determination-using-promega-cell-based-assays/>
- 17 Holtz RD, Lima BA, Souza Filho AG, Brocchi M, Alves OL. Nanostructured silver vanadate as a promising antibacterial additive to water-based paints. *Nanomedicine.* 2012;8(6):935-40. doi: 10.1016/j.nano.2011.11.012.
- 18 Hyeyoung K, Jyongsik J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir.* 2008;24(5):2051-6. doi: 10.1021/la703085e.

- 19 Kaba SI, Egorova EM. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. *Nanotechnol Sci Appl*. 2015;8:19-29. doi: 10.2147/NSA.S78134.
- 20 Kong X, Guo Z, Zeng C, Huang J, Cao L, Li, L et al. Soft Chemical in situ synthesis, formation mechanism and electrochemical performances of 1D bead-like AgVO₃ nanoarchitectures. *J Mater Chem A*. 2015;3:18127-35.
- 21 Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009;16(1):3–11.
- 22 Longo VM, 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.
- 23 Masiá Canuto M, Gutiérrez Rodero F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(9):550-63.
- 24 Mohammad AMA, Arulmozhi DK, Xiaohu F, Schultz R. Hydrogen peroxide-induced necrotic cell death in cardiomyocytes is independent of matrix metalloproteinase-2. *Toxicol In Vitro*. 2013;27(6):1686-92. doi: 10.1016/j.tiv.2013.04.013.
- 25 Oliveira RC, Foggi CC, Teixeira MM, 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. doi: 10.1021/acsami.7b00920.
- 26 Percy MG, Gründling A. Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2014;68:81-100. doi: 10.1146/annurev-micro-091213-112949.
- 27 Randall CP, Oyama LB, Bostock JM, Chapra I, O'Neill AJ. The silver cation (Ag⁺): antistaphylococcal activity, mode of action and resistance studies. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(1):131-8. doi: 10.1093/jac/dks372.
- 28 Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(2):e139-43.
- 29 Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75(2):213-67. doi: 10.1128/MMBR.00045-10.

- 30 Shigeharu K, Kosaku M, Haruo A. Crystal structure of alpha-AgVO₃ and phase relation of AgVO₃. *J Solid State Chem.* 1999;142(2):360-7.
- 31 Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;299(1):1-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01668.x
- 32 Singh DP, Polychronopoulou K, Rebholz C, Aouadi SM. Room temperature synthesis and high temperature frictional study of silver vanadate nanorods. *Nanotechnology.* 2010;21(32):325601. doi: 10.1088/0957-4484/21/32/325601.
- 33 Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2004;12(7):317-24.
- 34 Takeuchi KJ, Marschlok AC, Davis SM, Leising RA, Takeuchi ES. Silver vanadium oxides and related battery applications. *Coord Chem Rev.* 2001;219:283-310.

APÊNDICE A

1 CARACTERIZAÇÃO DOS MICROCRISTAIS

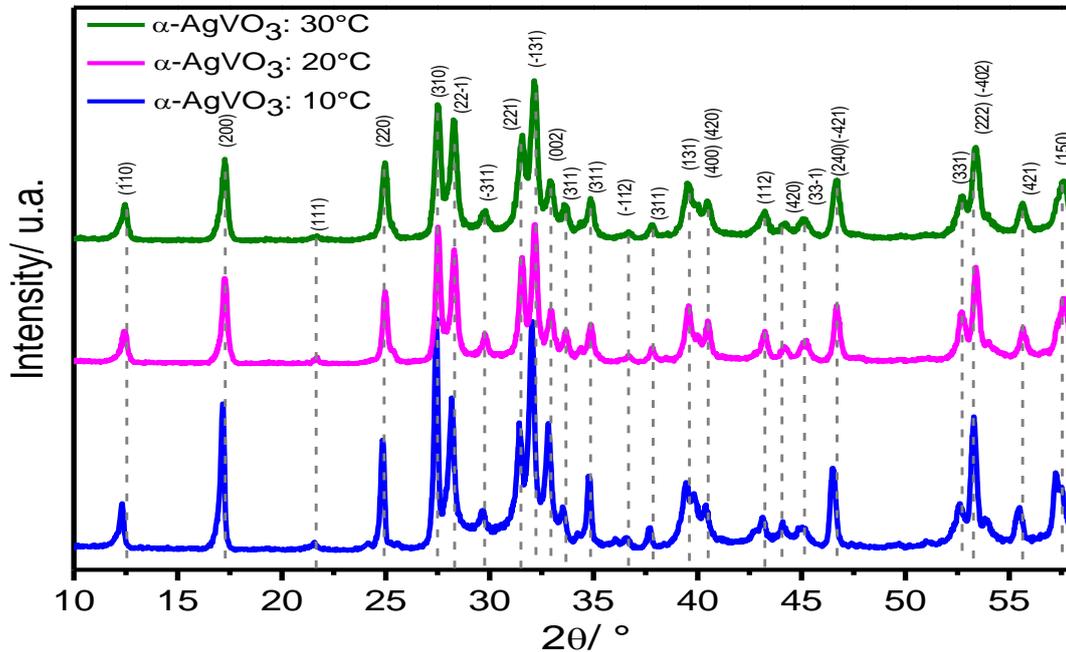
1.1 Metodologia

Os três microcristais foram caracterizados por difração de raios-X (DRX) utilizando um sistema Rigaku-DMax / 2500PC (Japão) com radiação Cu K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) para o intervalo de 2θ de 10° a 80° , com uma velocidade de varrimento de $0,02^\circ/\text{min}$. As morfologias foram investigadas através de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC) Supra 35-VP Carl Zeiss (Alemanha) operado em 15 KV. A espectroscopia Raman foi realizada em espectrômetro (Horiba Jobin-Yvon, Japão) acoplado a um detector CCD Synapse e um laser de íons de argônio, operado a 532 nm, com potência máxima de 1,2 mW. Os espectros foram mensurados para o intervalo de 5 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} . Todas as caracterizações foram realizadas a temperatura ambiente²⁵.

1.2 Resultados

Os padrões de DRX dos microcristais de $\alpha\text{-AgVO}_3$ obtidos por CP em diferentes temperaturas são apresentados na Figura A1. As amostras preparadas a 10°C , 20°C e 30°C apresentaram picos análogos, que foram indexados como fase monoclinica do $\alpha\text{-AgVO}_3$, de acordo com o *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD) n. 50645. A partir da análise das imagens obtidas dos padrões de DRX foi possível observar elevada pureza de fase nas três amostras, uma vez que os picos das amostras preparadas se apresentavam análogos. A baixa resolução dos picos demonstra que todos os microcristais de $\alpha\text{-AgVO}_3$ obtidos pelo método da CP não foram totalmente cristalizados e, portanto, apresentam distúrbios estruturais a longo alcance.

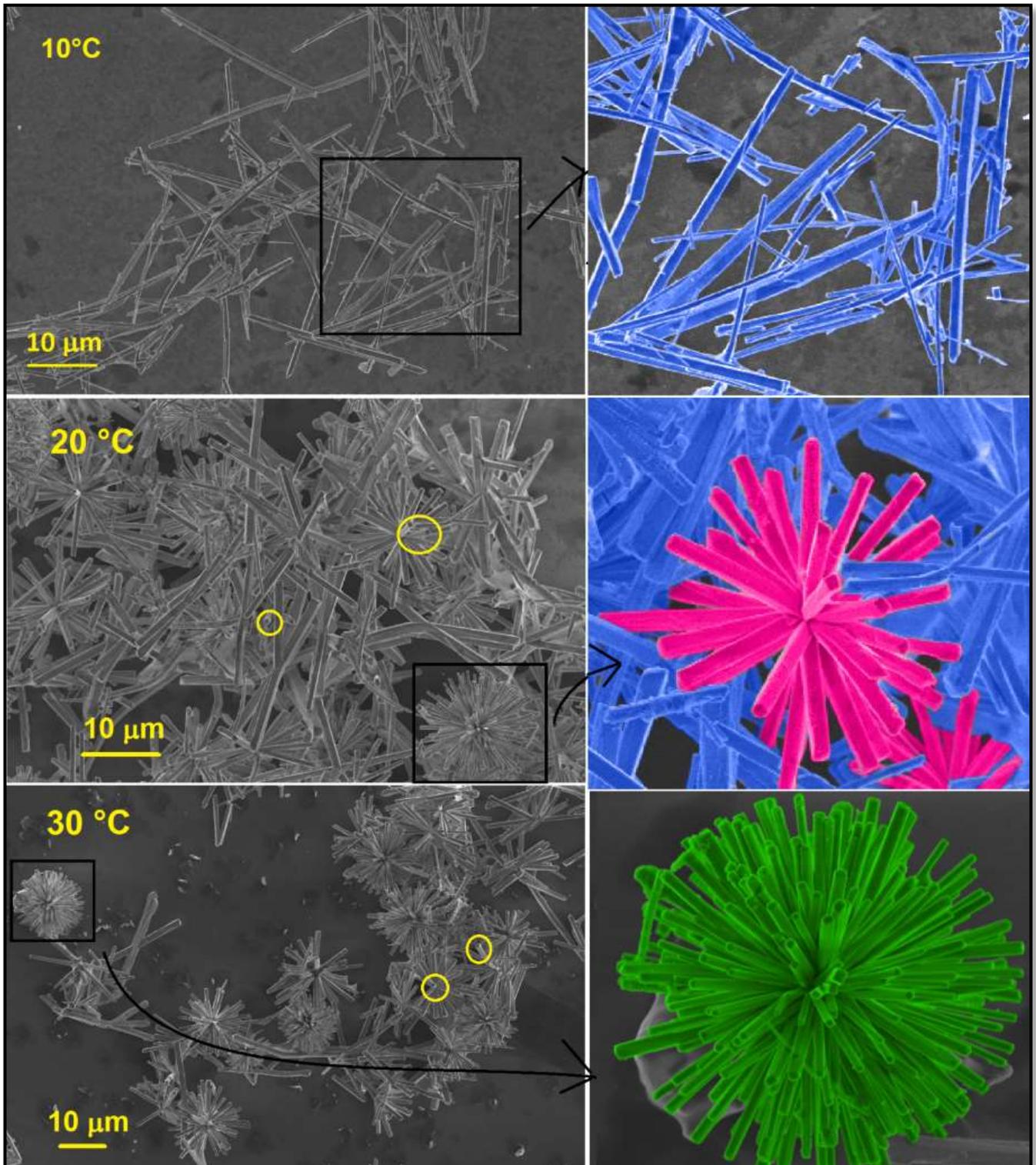
Figura A1 – Padrões de DRX dos microcristais de α -AgVO₃ obtidos pelo método de co-precipitação à 10, 20 e 30°C.



Fonte: Oliveira RC, Foggi CC, Teixeira MM, 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 ²⁵.

A morfologia das estruturas de α -AgVO₃ foram investigadas e são apresentadas na Figura A2. Pode-se observar diferença na estruturação e tamanho das partículas, de acordo com as temperaturas utilizadas na síntese. Quanto maior a temperatura utilizada, mais organizados os microcristais se apresentam. A Figura A2 indica a formação de uma grande quantidade de microbastões de α -AgVO₃ na síntese realizada a 10°C. Estes cristais tem faces definidas e são alongados no eixo y na direção [110]. O diâmetro dos bastões é uniforme em todos os seus comprimentos. Nos microcristais sintetizados à 20°C, pode-se ver que os microbastões começam a se aglomerar, e algumas microesferas são formadas devido a interações moleculares. Nos microcristais sintetizados à 30°C, cristais de α -AgVO₃ com morfologias semelhantes a flores aparecem em predominância.

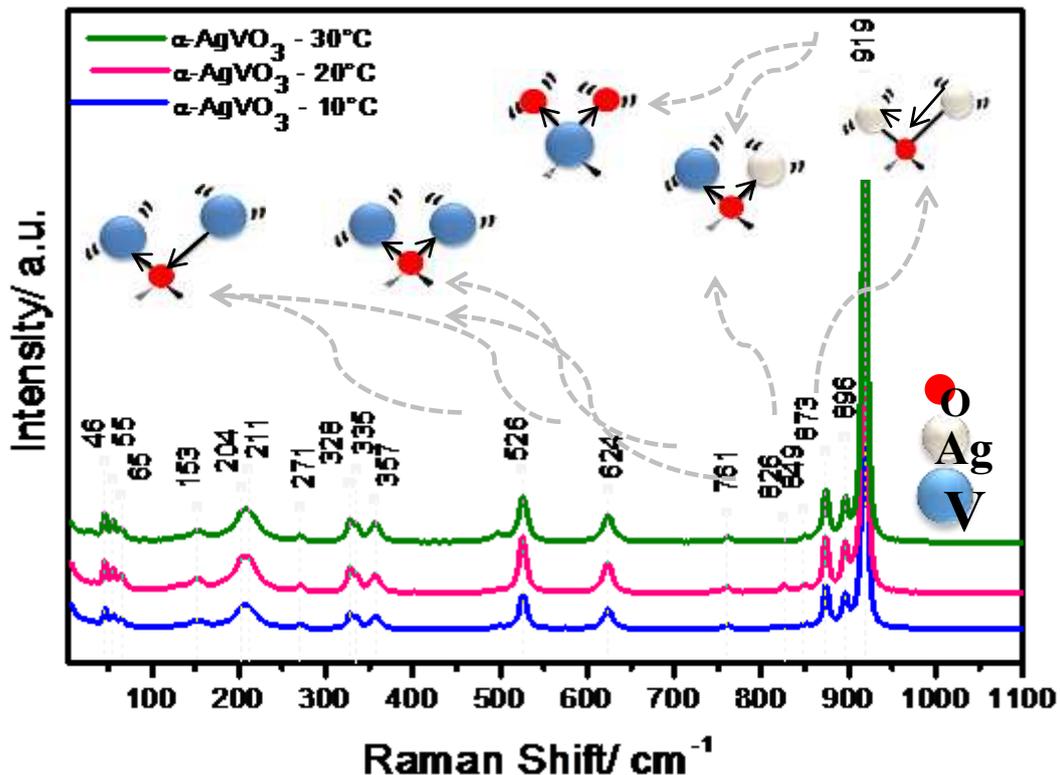
Figura A2 – Imagens de MEV-EC dos microcristais de α -AgVO₃ obtidos pelo método da co-precipitação à 10, 20 e 30°C.



Fonte: Oliveira RC, Foggi CC, Teixeira MM, 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 ²⁵.

A Figura A3 mostra os espectros de Raman onde foram observados 18 modos Raman ativos. O pico mais forte em 919 cm^{-1} pode originar-se do alongamento entre as vibrações V-O-Ag ou O-V-O. A banda a 896 cm^{-1} pode ser ligada às vibrações de estiramento das ligações Ag-O-Ag, enquanto as bandas em 886 e 873 cm^{-1} podem ser ligados a vibrações de estiramento das ligações V-O-Ag. As ligações entre V-O-V estão relacionadas às bandas que aparecem em 849 , 826 , 761 , 730 , 624 , e 526 cm^{-1} , relacionados aos modos de alongamento assimétrico e simétrico. A Figura A4 apresenta os dados experimentais e os modos Raman ativos comparados com a literatura. Pode-se observar que ambos apresentam concordância, porém pode-se observar uma pequena diferença entre os dados apresentados na literatura e neste estudo.

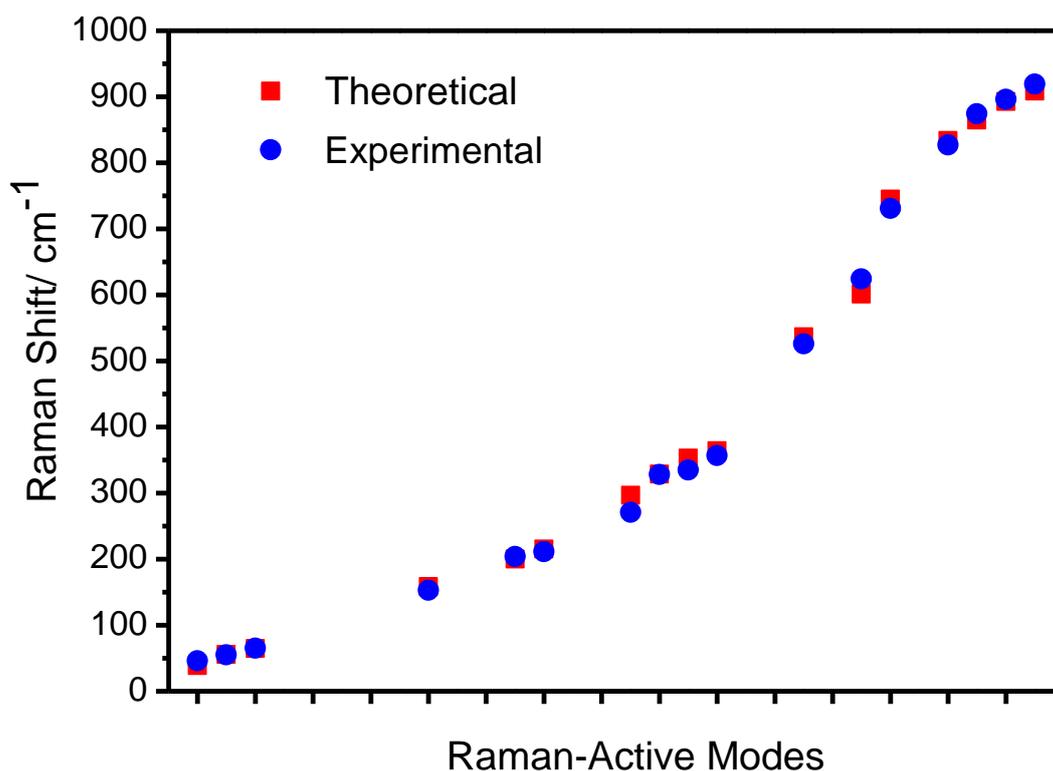
Figura A3 – Espectroscopia Raman dos microcristais de $\alpha\text{-AgVO}_3$ obtidos pelo método da co-precipitação à 10 , 20 e 30°C .



Fonte: Oliveira RC, Foggi CC, Teixeira MM, Silva MDP, Assis M, Francisco EM et al., Mechanism of antibacterial activity via morphology change of $\alpha\text{-AgVO}_3$: Theoretical and Experimental Insights. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2017 ²⁵.

Os espectros de Raman experimentais dos microcristais de α -AgVO₃ estão em concordância com a literatura^{20, 32}, porém, pode-se observar uma pequena diferença entre os dados apresentados na literatura e neste estudo, provavelmente por conta das diferentes temperaturas utilizadas durante a síntese dos microcristais. Ao analisar as imagens de MEV-EC, foi possível observar uma diferença na morfologia e tamanho das partículas, quando sintetizadas nas diferentes temperaturas. A formação de flores e estruturação de α -AgVO₃ pode ter sido influenciada pelo solvente (H₂O), precursores (NH₄⁺ e NO₃⁻), e temperatura envolvida na reação²⁵.

Figura A4 – Comparação entre os espectros de Raman de α -AgVO₃ Experimentais e Teóricos.



Fonte: Oliveira RC, Foggi CC, Teixeira MM, 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 ²⁵.

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 30 de junho de 2019

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 30 de junho de 2017

BRUNA NATÁLIA ALVES DA SILVA PIMENTEL