



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



CLÁUDIA VIVIANE GUIMARÃES PELLISSARI

**BIOCOMPATIBILIDADE DE SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS PARA
PREVENÇÃO OU ELIMINAÇÃO DE BIOFILME**

Araraquara

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



CLÁUDIA VIVIANE GUIMARÃES PELLISSARI

**BIOCOMPATIBILIDADE DE SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS PARA
PREVENÇÃO OU ELIMINAÇÃO DE BIOFILME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Reabilitação Oral – Área de
Prótese, da Faculdade de Odontologia de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, para título de Mestre em
Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Janaina Habib Jorge

Araraquara

2015

Pellissari, Cláudia Viviane Guimarães

Biocompatibilidade de substâncias utilizadas para prevenção ou eliminação de biofilme / Cláudia Viviane Guimarães Pellissari. -- Araraquara: [s.n.], 2015.
144 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Janaina Habib Jorge

1. Teste de materiais. 2. Biofilmes. 3. Fotoquimioterapia
4. Nanopartículas. 5. Técnicas de cultura de células I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

CLÁUDIA VIVIANE GUIMARÃES PELLISSARI

**BIOCOMPATIBILIDADE DE SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS PARA
PREVENÇÃO OU ELIMINAÇÃO DE BIOFILME**

Dissertação para obtenção do grau de mestre

Comissão Julgadora

Presidente e Orientador: Prof^a. Dr^a. Janaina Habib Jorge

Professora Assistente Doutora do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP

2º examinador: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina

Professora Adjunto do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

3º examinador: Prof^a. Dr^a. Nara Hellen Campanha Bombarda

Professora Adjunto D do Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG.

Araraquara, 11 de setembro de 2015

Dados Curriculares

Cláudia Viviane Guimarães Pellissari

NASCIMENTO: 01 de março de 1989

FILIAÇÃO: Darcy Pellissari Neto
Cláudia Maria Guimarães Pellissari

2007-2012: Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa

2013-2015: Curso de Pós-graduação em Reabilitação Oral, Área de Concentração em Prótese nível Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2013: Estagio de Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível I, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2014-2015: Estagio de Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Dedico este trabalho:

Aos meus amados pais, **Neto** e **Sônia**, meus grandes exemplos; maiores referenciais que tenho em minha vida. Como servos do Senhor, como exemplos de honestidade, caráter, integridade, fidelidade, sabedoria e honra.

Agradeço por todo amor, carinho e zelo que vocês sempre tiveram comigo. Além de todo apoio, incentivo e confiança, sempre compreendendo a minha ausência, apesar da imensa saudade.

Sem vocês, essa realização não seria possível!

Agradecimentos Especiais

A Deus

Por ser o Deus da minha vida, por me amar incondicionalmente, por guiar meus passos, por ser o meu o refúgio, a minha força e a minha alegria. Sou grata por todas as oportunidades colocadas em meu caminho, por me capacitar a vencer cada desafio e por todos os sonhos que tem permitido tornarem-se realidade.

Aos meus pais Neto e Sônia e minha irmã Vanessa

Por acreditarem em mim, e sonharem comigo os meus sonhos, por serem os maiores incentivadores para que eu estudasse, por estarem sempre ao meu lado, pela paciência, lealdade, cumplicidade, por cuidarem de mim, por fazerem parte da minha vida e torna-la mais feliz, sem o apoio de vocês com certeza esta etapa da minha vida seria muito mais difícil. Vocês são presentes de Deus em minha vida.

A minha orientadora, Prof.^ª Dr.^ª Janaina Cabib Jorge

Pela confiança depositada em mim, por acreditar no meu potencial, pela oportunidade de ter cursado o Mestrado sob a sua orientação, por me estimular a superar minhas dificuldades, me incentivar e ter me proporcionado ensinamentos importantes para a minha formação como pesquisadora. Muito obrigada pelo apoio, amizade, carinho e paciência.

A minha amiga e irmã de coração Sarah, dona Tlomi, seu Jorge,

Deborah e Alexandre

Por me acolherem como parte da família, com tanto carinho e cuidado, por toda a parceria e amizade. Muito obrigada por me apoiarem e acreditarem em mim.

A minha amiga e irmã de coração e assistente pessoal Priscila

Entrou em minha vida de uma maneira muito sutil e hoje faz toda a diferença. Muito obrigada pelas orações, por sua amizade e por compartilhar comigo as alegrias e dificuldades no decorrer deste trabalho, sempre com palavras de apoio e incentivo.

Agradecimentos

A todos os meus netos de coração, **Guga, Kézia, Thaís, Paulo, Lina, Andrew, Jana, Lucas, Marquinhos, Mateus, Samuka, Bruna, Priscila, Gabriel, Dani, Pr. Luiz, Marcela, Nádia, Sofia, Talita, Evelin, Gustavo e Vini.** Amigos muito especiais que ganhei aqui nesta cidade. Agradeço por me acolherem aqui, me acompanharem nesta trajetória e por tornarem meus dias mais felizes.

A todas os amigos e pastores da Igreja Presbiteriana de Araraquara, que me receberam com tanto carinho e atenção.

Aos Professores da Disciplina de Prótese Removível II, pelos ensinamentos transmitidos nesse período.

Ao Professor Drº. **Romeu Magnani**, pela realização da análise estatística e por toda sua disponibilidade em me ajudar e orientar.

As minhas amigas e companheiras de mestrado **Maria Isabel e Paulinha**, pelo companheirismo e ajuda. Por abrirem mão de alguns finais de semana em prol dos meus experimentos.

A todos os docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral que contribuíram para o meu crescimento e formação.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada **Bia, Chai, Camila Foggi, Camila Zamperini, Denise, Ju Cabrini, Ju Delben, Fer Izumida, Fer Alves, Jeferson, Kassia, Maria Isabel e Paulinha**, obrigada por todos os momentos que passamos juntos, pela convivência agradável, amizade, pelas trocas de experiência e aprendizado que nos enriqueceram tanto.

Aos meus amigos da turma de mestrado da Pós-Graduação em Reabilitação Oral, **Cibele, Livia, Letícia, Helen, Rapha, Aion e Thaísa** pelo apoio e cooperação mútuos por todos os momentos de agradável convivência e companheirismo.

Aos técnicos de laboratório **Érica, Raíssa, Geisi, Sarah, Lucas e Tatiane** pela ajuda e apoio recebido durante a realização deste trabalho.

Aos coordenadores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial, aos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, pessoas amigas e prestativas.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação, pela presteza e eficiência dos serviços prestados durante todo o curso.

Aos funcionários da Biblioteca, pela atenção, educação e ajuda.

A FAPESP, pelo auxílio financeiro (processo n° 2011/21928-6) que propiciou o bom andamento desta pesquisa e também pela minha bolsa de mestrado (processo n° 2013/01844-8).

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho, e que não estão citadas nominalmente, meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!

Pellissari CVG. Biocompatibilidade de substâncias utilizadas para prevenção ou eliminação de biofilme [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2015

Resumo

Estudos têm sido conduzidos com o intuito de prevenir a formação do biofilme em biomateriais ou buscar terapias alternativas para o tratamento de doenças decorrentes da instalação do biofilme. Como terapia alternativa, este estudo avaliou (1) a citotoxicidade da terapia fotodinâmica (PDT), através da utilização de queratinócitos humanos co-cultivados com *Candida albicans*. Em relação à prevenção da formação do biofilme, (2) foi avaliada a citotoxicidade de nanopartículas (NP) de tungstato de prata (Ag_2WO_4) e de molibdato de prata (Ag_2MoO_4), em solução e como revestimento de biomateriais. No estudo 1, a co-cultura foi realizada utilizando uma membrana Transwell, em que células e micro-organismos cresceram separadamente durante 24h, e ficaram em contato por mais 24h. Após este período, a PDT foi realizada utilizando-se a curcumina como fotossensibilizador. As seguintes condições foram testadas: P+ L+; P- L+; P+ L; P- L. Além disso, como controle negativo, três membranas de cada placa foram destinadas apenas ao crescimento de micro-organismos e outros três poços para o crescimento de células separadamente, com seus respectivos meios. A proliferação celular, foi avaliada através dos testes Alamar Blue, MTT, XTT e UFC. Para o estudo 2, as NP foram sintetizadas e caracterizadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura e Difração de Raios X. A partir da confecção das NP, foram feitas as soluções e o revestimento de titânio (Ti), zircônia (Zi), resina acrílica (RA) e silicone (Si). Para a realização do teste de citotoxicidade, 100 μL da suspensão composta por $1,5 \times 10^4$ células/ml (HaCat) foram colocados em cada compartimento de uma placa com 96 orifícios, incubada em estufa com 5% de CO_2 , a 37°C por 24 horas. Após tal período de incubação, o meio de cultura foi desprezado, permanecendo as células aderidas no fundo da placa. 100 μL de meio de cultura contendo as nanopartículas em solução ou os extratos foram colocados em cada orifício da placa. A placa foi incubada por mais 24 horas. A proliferação celular foi avaliada por meio dos testes Alamar Blue, MTT e CytoTox-One. Análises quantitativas e qualitativas foram realizadas para os dois estudos. Na avaliação

quantitativa, foram utilizadas análises de variância, aplicadas sobre as porcentagens de células vivas em relação ao controle. Essa análise foi complementada por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Os resultados do metabolismo celular foram comparados com o controle negativo e os grupos foram classificados como não citotóxico (inibição menor do que 25% em relação ao grupo controle), discretamente citotóxico (inibição entre 25% e 50%), moderadamente citotóxico (inibição entre 50% e 75%) e intensamente citotóxico (inibição maior do que 75%). Para o estudo 1, no teste Alamar Blue, no que se refere aos queratinócitos, observa-se que os grupos P+L+, P+L- e P-L+ apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P-L-. Com relação à *Ca albicans*, no mesmo teste, a viabilidade celular foi menor no grupo P+L+ relativamente aos demais grupos. Para o teste MTT, o qual avaliou a viabilidade celular dos queratinócitos, observa-se que o grupo P+L+ foi estatisticamente diferente aos outros grupos. Na análise da viabilidade celular para *Ca albicans* (teste XTT) foram obtidos resultados equivalentes para os grupo P+L+ e P-L+. Para todos os testes, o grupo P-L- foi estatisticamente igual ao grupo controle, indicando que a interação celular em co-cultura não influenciou o metabolismo dos queratinócitos e *Candida albicans*. A maior redução de UFC/mL foi no grupo P+L+, com diminuição de 1,7 log₁₀ com relação ao grupo controle. Considerando-se cada grupo isoladamente para o ensaio de Alamar Blue, a PDT teve maior efeito citotóxico sobre a viabilidade celular, de forma que no grupo P+L+, para ambas células (*Ca albicans* e queratinócitos), a viabilidade celular ficou entre 50 e 75% em relação ao controle, tendo sido os grupos classificados como discretamente citotóxicos. Os demais grupos testados, tiveram uma inibição celular menor que 25%, e neste caso os grupos foram classificados como não citotóxicos. Entretanto, através dos resultados obtidos com o ensaio MTT, todos os grupos, com exceção do P-L-, foram classificados como discretamente citotóxicos, com uma viabilidade celular dos queratinócitos entre 50 e 75%. Quando avaliados os resultados do teste XTT para a *Ca albicans*, apenas o grupo P-L- foi considerado não citotóxico, enquanto os grupos P+L- e P-L+ apresentaram uma inibição intermediária entre 25 e 75% das células viáveis, classificando-se como discretamente citotóxico. Além disso, o P+L+ foi o grupo que obteve maior toxicidade, tendo sido considerado como moderadamente citotóxico. No estudo 2, ambas nanopartículas em solução foram intensamente citotóxicas para o teste Alamar Blue, apresentando uma inibição maior que 75% das

células. Entretanto, não houve diferença na citotoxicidade das nanopartículas como revestimento para a maioria dos biomateriais. Dentre os biomateriais testados, o silicone foi mais tóxico do que os outros demais materiais quando não revestidos. Portanto, pode-se concluir que no estudo 1, a PDT inibiu o metabolismo dos queratinócitos e *Candida albicans* nos diferentes testes realizados, tendo sido considerada um terapia de moderada a discretamente citotóxica. A interação celular em co-cultura não influenciou o metabolismo dos queratinócitos e *Candida albicans*. No estudo 2, as nanopartículas de Ag_2WO_4 e Ag_2MoO_4 , em solução, foram tóxicas em diferentes concentrações, sendo inviável o uso diretamente sobre as células. Os biomateriais revestidos com nanopartículas não apresentaram citotoxicidade significativa.

Palavras Chave: Teste de materiais. Biofilmes. Fotoquimioterapia. Nanopartículas.

Pellissari CVG. Biocompatibility of substances used for biofilm prevention or elimination [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2015

Abstract

Studies have been conducted in order to prevent biofilm formation on biomaterials or seek alternative therapies for the treatment of diseases caused by biofilm installation. As an alternative therapy, this study evaluated (1) the cytotoxicity of photodynamic therapy (PDT) by the use of co-cultured human keratinocytes with *Candida albicans* (Ca). In relation to prevention of biofilm formation, (2) the cytotoxicity was evaluated nanoparticles (NP) silver tungstate (Ag_2WO_4) and silver molybdate (Ag_2MoO_4), in solution and as a biomaterial coating. In study 1, the co-culture was performed using a Transwell membrane, and cells in which micro-organisms grown separately for 24 h, and were in contact for a further 24h. After this period, PDT was performed using curcumin as a photosensitizer. The following conditions were tested: P+ L+; P- L+; P+ L; P- L. In addition, as a negative control, three membranes of each plate were assigned only to the growth of microorganisms and another three wells for cell growth separately with respective means. Cell proliferation was evaluated by testing the Alamar Blue, MTT, XTT, and CFU. For the study 2, the NP were synthesized and characterized by scanning electronic microscopy and X-ray diffraction. Since the making of the NP, they were made solutions and the titanium coating (Ti), zirconium (Zi), acrylic resin (RA) and silicon (Si). To perform the cytotoxicity assay, 100 μL of suspension composed of 1.5×10^4 cells / mL (HaCaT) were placed in each compartment of a plate with 96 wells, incubated in an incubator with 5% CO_2 at 37 ° C for 24 hours. After this incubation period, the culture medium was discarded, remaining adhered cells at the bottom of the wells. 100 μL of culture medium containing the nanoparticles in solution and the extracts were placed on each plate hole. The plate was incubated for another 24 hours. Cell proliferation was assessed using the Alamar Blue test, MTT and CytoTox-One. Quantitative and qualitative analyzes were performed for the two studies. The quantitative assessment, were used analysis of variance, applied to the percentages of living cells compared to control.

This analysis was complemented by multiple comparisons by Tukey test. The cellular metabolism results were compared with the negative control and the groups were ranked as non cytotoxic (a lower inhibition than 25% compared to the control group), slightly cytotoxic (inhibition between 25% and 50%), moderately cytotoxic (inhibition between 50% and 75%) and intensely cytotoxic (greater than 75% inhibition). For study 1, the Alamar Blue assay, as regards the keratinocytes, were observed that the groups P+L+, P+L- and P-L+ present statistically significant difference from the P-L- group. Regarding the Ca, in the same test, cell viability was lower in the P+L+ group in relation to other groups. For the MTT assay, which evaluated the cell viability of the keratinocytes, it was observed that the P+L+ group was statistically different from the other groups. In the analysis of cell viability for Ca (XTT assay) were obtained similar results for the P+L+ and P-L+ groups. For all tests, the PL-group was statistically similar to the control group, indicating that the cell interaction co-culture did not influence the metabolism of keratinocytes and Ca. The greatest reduction in CFU / mL was in the P+L+ group, with decreased $1.7 \log^{10}$ compared to the control group. Considering each group separately for the Alamar Blue assay PDT had a greater cytotoxic effect on cell viability, so that the P+L+ group to both cells (Ca and keratinocytes), cell viability was between 50 and 75 % compared to the control, being both groups classified as slightly cytotoxic. The other groups tested, had less than 25% inhibition of cell, and in this case the groups were ranked as non-cytotoxic.

However, through the results obtained with MTT assay, all groups except the P-L-, were classified as discreetly cytotoxic, with a cell viability of keratinocytes between 50 and 75%. When assessing the results of the XTT test for Ca, only the P-L-group was considered non-cytotoxic, while the P+L- e P-L+ groups and showed an intermediate inhibition between 25 and 75% of viable cells and were classified as discreetly cytotoxic. In addition, the P+L+ was a group which obtained the highest toxicity and was considered as moderately cytotoxic. In study 2, both nanoparticles in solution were intensively cytotoxic to Alamar Blue test, showing greater than 75% inhibition of the cells. However, there was no difference in cytotoxicity of nanoparticles as a coating for most biomaterials. Among the tested biomaterials, silicon was more toxic than other materials when the other uncoated. Therefore, it can be concluded that in study 1, PDT inhibited the metabolism of keratinocytes, and Ca in the different tests and was considered a moderate to discreetly cytotoxic therapy. Cell interactions in co-culture

did not influence the metabolism of the keratinocytes and Ca. In study 2, Ag_2WO_4 nanoparticles and Ag_2MoO_4 , in solution, in different concentrations were toxic, and unfeasible to use directly on cells. Biomaterials coated with nanoparticles showed no significant cytotoxicity.

Key words: Materials Testing. Biofilms. Photochemotherapy. Nanoparticles.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 PROPOSIÇÃO.....	20
3 CAPÍTULO 1.....	21
4 CAPÍTULO 2.....	71
5 CONCLUSÃO.....	130
REFERÊNCIAS.....	131
ANEXOS.....	133

1- INTRODUÇÃO

Diversos são os tratamentos propostos para as infecções microbianas. O tratamento mais comumente recomendado tem sido a utilização de medicamentos antimicrobianos, os quais podem ser de aplicação tópica ou sistêmica. Porém, o uso de drogas é limitado por inúmeros fatores, como resistência dos micro-organismos, baixa solubilidade e alta toxicidade. Um dos mecanismos específicos de resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos é a formação do biofilme. Sob determinadas condições, os micro-organismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular. Essa multiplicação dá origem a colônias e quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, forma-se o biofilme^{9, 23}. Assim, biofilmes são complexos ecossistemas microbiológicos embebidos em uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície⁸.

A maioria dos micro-organismos cresce formando biofilmes estruturados sobre determinadas superfícies ao invés de se desenvolver em suspensão. Estima-se que 65% de todas as infecções microbiológicas em humanos envolvem a formação de biofilmes¹⁹. A adesão de micro-organismos na cavidade bucal é pré-requisito para a formação do biofilme bacteriano, o qual pode levar ao desenvolvimento da cárie dental e outras doenças bucais. A formação de biofilme pode resultar na tolerância dos micro-organismos a altas concentrações de vários antibióticos, o que resulta em infecções crônicas apesar do tratamento¹⁸. Sendo assim, a prevenção da formação de biofilme é considerada a medida mais eficaz a ser assumida contra os problemas relacionados às infecções.

Por esse motivo, estudos têm sido conduzidos com o intuito de prevenir a formação do biofilme em biomateriais ou buscar terapias alternativas para o tratamento de doenças decorrentes da instalação do biofilme. Em relação à prevenção da formação do biofilme, existe um significativo interesse no desenvolvimento de biomateriais antimicrobianos para aplicação nos serviços de saúde, medicina, indústrias de higiene pessoal e alimentos. Nesse contexto, as propriedades de algumas nanopartículas têm sido avaliadas. Diferentes biomateriais podem ser

revestidos com nanopartículas objetivando melhorar as suas propriedades biológicas, particularmente com relação à adesão e à proliferação de micro-organismos.

Por meio da nanotecnologia, estudos recentes têm avaliado a atividade antimicrobiana de várias nanopartículas^{1, 4-6, 10-12, 14, 20-21}. Alterações na superfície dos biomateriais para melhorar a biocompatibilidade e reduzir a atividade dos micro-organismos são altamente desejáveis. O revestimento com nanopartículas tem sido utilizado em uma série de produtos médicos, porque pode conferir aos materiais propriedades desejáveis, tais como afinidade biológica e bioatividade^{2, 16-17, 22}. Entretanto, estudos com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade de biomateriais inorgânicos revestidos com essas nanopartículas devem ser realizados, pois ainda foram pouco explorados.

Em relação às terapias alternativas, a terapia fotodinâmica (PDT) tem sido considerada um método promissor para o tratamento de infecções superficiais. O processo fotodinâmico requer a utilização de um composto químico denominado fotossensibilizador (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do FS, e a presença de oxigênio⁷. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com um FS de absorção máxima de luz específica, num processo conhecido como fotossensibilização. Em seguida, uma fonte de luz deve ser acionada para a iluminação do alvo sensibilizado. A interação da luz de comprimento de onda adequado com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas como o oxigênio singlete e radicais livres que, através de reações oxidativas são capazes de induzir a morte ou inativação celular^{7, 15}. Inicialmente, os FSs atuam sobre a membrana celular, então, há um aumento na permeabilidade celular, o que permite a penetração do FS na célula, de modo que este tenha ação sobre outras organelas intracelulares^{3, 13}. Essa terapia poderia suprir as dificuldades encontradas com os tratamentos antifúngicos convencionais. Além disso, os FSs naturais, se efetivos, poderiam auxiliar na difusão da PDT como modalidade terapêutica para o tratamento da estomatite protética. Entretanto, faltam estudos sobre a biocompatibilidade desses FSs naturais utilizados.

A avaliação da citotoxicidade de novos produtos deve ser realizada uma vez que cerca de 40% dos novos fármacos não são colocados no mercado devido aos

efeitos colaterais toxicológicos. Dessa forma, o objetivo da presente dissertação foi realizar um estudo sobre diferentes métodos de prevenção ou eliminação de biofilme em superfícies de biomateriais. Para isso, esta dissertação foi dividida em dois capítulos: Capítulo 1: Efeito citotóxico da terapia fotodinâmica, sobre células epiteliais quando em co-cultura com as espécies de *Candida*; Capítulo 2: Biocompatibilidade de nanopartículas utilizadas na prevenção da formação do biofilme.

2- PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade da terapia fotodinâmica utilizada na eliminação do biofilme por meio da utilização de células epiteliais em co-cultura com *Candida albicans* e avaliar a biocompatibilidade de biomateriais revestidos com nanopartículas de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e $\alpha\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$.

3- CAPÍTULO 1

EFEITO CITOTÓXICO DA TERAPIA FOTODINÂMICA, SOBRE CÉLULAS EPITELIAIS QUANDO EM CO-CULTURA COM AS ESPÉCIES DE *CANDIDA*¹

RESUMO

Este estudo avaliou a citotoxicidade da terapia fotodinâmica (PDT), através da utilização de queratinócitos humanos co-cultivados com *Candida albicans*. A co-cultura foi realizada utilizando uma membrana Transwell, em que células e micro-organismos cresceram separadamente durante 24h, e ficaram em contato por mais 24h. Após este período, a PDT foi realizada utilizando-se a curcumina como fotossensibilizador. As seguintes condições foram testadas: P+ L+ (grupo experimental PDT); P- L+ (grupo controle da ação da luz LED sobre as células); P+ L- (grupo controle da atividade do agente fotossensibilizador sobre as células); P- L- (grupo controle não tratado). Além disso, como controle negativo, três membranas de cada placa foram destinadas apenas ao crescimento de micro-organismos e outros três poços para o crescimento de células separadamente, com seus respectivos meios. A proliferação celular, foi avaliada através dos testes Alamar Blue, MTT, XTT e UFC. Análises quantitativas e qualitativas foram realizadas. Na avaliação quantitativa, foram utilizadas análises de variância, aplicadas sobre as porcentagens de células vivas em relação ao controle. Essa análise foi complementada por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Os resultados do metabolismo celular foram comparados com o controle negativo e os grupos foram classificados como não citotóxico (inibição menor do que 25% em relação ao grupo controle), discretamente citotóxico (inibição entre 25% e 50%), moderadamente citotóxico (inibição entre 50% e 75%) e intensamente citotóxico (inibição maior do que 75%). No teste Alamar Blue, no que se refere aos queratinócitos, observa-se que os grupos P+L+, P+L- e P-L+ apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P-L-. Com relação à *Ca albicans*, no mesmo teste, a viabilidade celular foi menor no grupo P+L+

¹ De acordo com o Guia de Trabalhos Academicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>

relativamente aos demais grupos. Para o teste MTT, o qual avaliou a viabilidade celular dos queratinócitos, observa-se que o grupo P+L+ foi estatisticamente diferente aos outros grupos. Na análise da viabilidade celular para *Ca albicans* (teste XTT) foram obtidos resultados equivalentes para os grupo P+L+ e P-L+. Para todos os testes, o grupo P-L- foi estatisticamente igual ao grupo controle, indicando que a interação celular em co-cultura não influenciou o metabolismo dos queratinócitos e *Candida albicans*. A maior redução de UFC/mL foi no grupo P+L+, com diminuição de $1,7 \log_{10}$ com relação ao grupo controle. Considerando-se cada grupo isoladamente para o ensaio de Alamar Blue, a PDT teve maior efeito citotóxico sobre a viabilidade celular, de forma que no grupo P+L+, para ambas células (*Ca albicans* e queratinócitos), a viabilidade celular ficou entre 50 e 75% em relação ao controle, tendo sido os grupos classificados como discretamente citotóxicos. Os demais grupos testados, tiveram uma inibição celular menor que 25%, e neste caso os grupos foram classificados como não citotóxicos. Entretanto, através dos resultados obtidos com o ensaio MTT, todos os grupos, com exceção do P-L-, foram classificados como discretamente citotóxicos, com uma viabilidade celular dos queratinócitos entre 50 e 75%. Quando avaliados os resultados do teste XTT para a *Ca albicans*, apenas o grupo P-L- foi considerado não citotóxico, enquanto os grupos P+L- e P-L+ apresentaram uma inibição intermediária entre 25 e 75% das células viáveis, classificando-se como discretamente citotóxico. Além disso, o P+L+ foi o grupo que obteve maior toxicidade, tendo sido considerado como moderadamente citotóxico. A PDT inibiu o metabolismo dos queratinócitos e *Candida albicans* nos diferentes testes realizados, tendo sido considerada um terapia de moderada a discretamente citotóxica.

Palavras Chave: Terapia fotodinâmica. Curcumina. Co-cultura. *Candida*.

INTRODUÇÃO

As falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos a determinadas superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação. Sob determinadas condições, os micro-organismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular. Essa multiplicação dá origem a colônias e quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, forma-se o biofilme^{14, 60}. Assim, biofilmes são complexos ecossistemas microbiológicos embebidos em uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície¹³.

A maioria dos micro-organismos cresce formando biofilmes estruturados sobre determinadas superfícies ao invés de se desenvolver em suspensão. Estima-se que 65% de todas as infecções microbiológicas em humanos envolvem a formação de biofilmes⁴⁴. A adesão de micro-organismos na cavidade bucal é pré-requisito para a formação do biofilme bacteriano, o qual pode levar ao desenvolvimento da cárie dental e outras doenças bucais.

A colonização por diferentes micro-organismos e subsequente formação do biofilme são fatores relevantes no desenvolvimento de patologias, como, por exemplo, a estomatite protética, que é a condição inflamatória eritematosa encontrada com maior frequência nos pacientes portadores de próteses removíveis parciais ou totais^{2, 11, 25}. Tal doença caracteriza-se por eritema difuso, que pode ter aspecto homogêneo ou de pontos ou áreas focais avermelhados, além de apresentar variadas alterações na textura e superfície da mucosa palatina. Essas reações inflamatórias podem ou não estar associadas às hiperplasias causadas por uma variedade de fatores relacionados à prótese, como trauma, uso contínuo, má higienização e ação de bactérias e fungos⁸.

Apesar da etiologia multifatorial, a contaminação por espécies fúngicas e sua aderência à superfície das próteses parece ser o fator primordial para o início e a propagação da estomatite protética^{2, 4, 15}. Essa relação pode ser explicada pela presença de inúmeros poros existentes na base das próteses, nos quais diferentes micro-organismos se alojam, acarretando em condições propícias para as infecções. Glass et al.²³ verificaram a presença de vários tipos de micro-organismos patogênicos e oportunistas nas bases de próteses. Várias espécies de bactérias gram-positivas e

gram-negativas foram isoladas, como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Neisseria*. Também foram encontradas espécies de fungos, como a *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida krusei* e *Candida guilliermondi* e *Aspergillus*^{5, 29}. Os autores relacionam os micro-organismos isolados com diversas doenças, ressaltando a importância da correta higienização e desinfecção das próteses bem como a possibilidade da ocorrência de infecções sistêmicas em pacientes imunossuprimidos.

Esses micro-organismos podem colonizar a cavidade bucal, uma vez que apresentam capacidade de aderência às células epiteliais e à resina da base das próteses⁴⁰. Independente do tipo de acabamento utilizado, os micro-organismos podem penetrar e sobreviver a uma profundidade que varia de 1,0 a 2,0 μm ¹⁵. Dessa forma, a prótese pode funcionar como um reservatório de micro-organismos, possibilitando a reinfecção da mucosa do paciente¹⁵.

O tratamento mais comumente recomendado para estomatite protética tem sido os antifúngicos, os quais podem ser tópicos ou sistêmicos. Os medicamentos de uso tópico, como a nistatina e o miconazol, são normalmente aplicados nos primeiros episódios de candidose de um paciente²⁵. Apesar desses tratamentos serem eficazes para aliviar os sinais e sintomas clínicos da estomatite associada a espécies de fungos, eles, frequentemente, não eliminam completamente os micro-organismos em virtude da diminuição da concentração do agente tópico nos tecidos infectados, associada aos efeitos diluentes da saliva e aos movimentos da língua⁴. Dessa forma, a re-colonização da mucosa bucal pelo micro-organismo é frequente após o tratamento, o que leva a uma infecção recorrente. Além disso, tem sido relatado que a utilização de antifúngicos tópicos e sistêmicos pode não promover efeitos desejáveis no tratamento da estomatite protética, uma vez que o agente etiológico pode desenvolver resistência a esses medicamentos. Também tem sido relatado que as espécies de *Candida* possuem a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência as drogas por meio de mutações genéticas⁵⁵. Outro fator que poderia estar relacionado ao insucesso do tratamento das infecções causadas por fungos é o fato de que as células humanas e as células fúngicas são eucarióticas, diferentemente das bactérias que são procarióticas. Além da similaridade anatômica, as células humanas e as fúngicas possuem os mesmos mecanismos de síntese de DNA, RNA e proteínas,

limitando, assim, o potencial das drogas antifúngicas, uma vez que a grande maioria dos componentes que inibe os fungos, também é tóxica às células humanas⁴⁹. Diante disso, a escolha correta do antifúngico frente ao diagnóstico adequado são fatores essenciais para o sucesso do tratamento.

Muitas vezes, o tratamento tópico pode também ser associado com o tratamento sistêmico. Dentre as drogas antifúngicas, medicamentos como nistatina e anfotericina B apresentam a mesma efetividade quando comparados aos medicamentos mais modernos como fluconazol³⁹. No entanto, cuidados devem ser tomados quando da administração desses medicamentos devido à possibilidade de interação dos antifúngicos com outras substâncias. Além disso, há relatos de recorrência de infecção após o término do tratamento com o antifúngico sistêmico, atribuída à possibilidade de sobrevivência de diferentes tipos de fungos na superfície da prótese⁵¹.

Outra alternativa para o tratamento de infecções fúngicas é a terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT). O processo fotodinâmico requer a utilização de um composto químico denominado fotossensibilizador (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do FS, e a presença de oxigênio¹². Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com um FS de absorção máxima de luz específica, num processo conhecido como fotossensibilização. Em seguida, uma fonte de luz deve ser acionada para a iluminação do alvo sensibilizado. A interação da luz de comprimento de onda adequado com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas como o oxigênio singlete e radicais livres que, através de reações oxidativas são capazes de induzir a morte ou inativação celular^{12, 32}. Inicialmente, os FSs atuam sobre a membrana celular, então, há um aumento na permeabilidade celular, o que permite a penetração do FS na célula, de modo que este tenha ação sobre outras organelas intracelulares^{6, 31}.

Um estudo sobre a efetividade da PDT mediada pelo FS Curcumina (Cur), extraído do rizoma da planta *Curcuma longa L*, na inativação de solução planctônica e biofilme de *C. albicans*, realizado por Dovigo et al.²¹, mostrou que, a associação do FS na concentração de 20µM e dose de luz de 5,28J/cm² foi efetiva para a inativação de solução planctônica, entretanto para a redução do metabolismo celular do biofilme de *C. albicans* houve a necessidade de FS na concentração de 40 µM para a mesma

dose de luz, demonstrando menor susceptibilidade dos micro-organismos a PDT quando organizados em biofilme.

Ribeiro et al.^{18, 46} realizaram estudos objetivando avaliar o efeito da PDT, associada ao Photogem®, em cultura de células L929 e MDPC-23, por meio do teste MTT. A partir dos resultados, os autores puderam concluir que o tratamento proposto causou efeitos tóxicos severos sobre culturas de células sadias, caracterizados pela redução da atividade mitocondrial. Dessa forma, outros fotossensibilizadores eficazes utilizados na PDT para a inativação de *Ca* deveriam ser avaliados em relação à citotoxicidade.

De acordo com os aspectos citados, a PDT parece ser um método promissor para o tratamento de infecções superficiais. Essa terapia poderia suprir as dificuldades encontradas com os tratamentos convencionais, como a resistência antifúngica. A PDT produz espécies reativas de oxigênio, as quais podem interagir com várias estruturas celulares como proteínas, membranas e ácidos nucleicos, causando danos irreversíveis aos micro-organismos³⁰. Dessa forma, somente depois da análise da biocompatibilidade, a PDT poderá ser considerada uma modalidade terapêutica para o tratamento da estomatite protética e outras infecções associadas a fungos oportunistas.

REVISÃO DE LITERATURA

Um dos métodos promissores na eliminação do biofilme é a terapia fotodinâmica (PDT), a qual requer a utilização de um composto químico denominado fotossensibilizador, a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do fotossensibilizador, e a presença de oxigênio¹². Vários estudos estão sendo conduzidos objetivando avaliar a eficácia desse método, variando-se o tipo de luz e o tipo de fotossensibilizador^{1, 7, 16, 18-22, 24, 27, 30-33, 35-38, 45-46, 57, 59}.

Os fotossensibilizadores utilizados na PDT antimicrobiana são predominantemente das famílias das porfirinas, dos fenotiazínicos, das ftalocianinas⁵⁷ e do ácido 5-aminolevulínico (ALA). Seu mecanismo de ação consiste em promover um dano inicial a membrana citoplasmática, o qual permitirá a entrada do fotossensibilizador para o interior da célula. Dovigo et al.²² avaliaram a efetividade da PDT na inativação de suspensões celulares de *C. albicans* e *C. glabrata*, ATCC e resistente a fluconazol, por meio da utilização do FS Photogem[®] e da iluminação com LEDs. Os resultados revelaram que tanto as cepas padrões quanto as resistentes a fluconazol foram efetivamente inativadas quando em solução planquitônica. Esses resultados foram confirmados por outro estudo *in vivo* realizado em modelo animal com candidose induzida, onde também foi verificada uma redução de UFC/mL utilizando a concentração de 500 mg/L de Photogem[®] com LED vermelho³⁸. Por isso, outros fotossensibilizadores têm sido estudados. Um fotossensibilizador que está sendo investigado é a curcumina, um composto de coloração amarela extraída do rizoma da planta *Curcuma longa L* (açafrão). Vários trabalhos sugerem que a curcumina possui efeito antimicrobiano que poderia ser exacerbado com a sua iluminação em comprimento de onda adequado. Em outro estudo, Dovigo et al.^{19-20, 36, 45} verificaram que a utilização da curcumina como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica promoveu a inativação da *Candida albicans* tanto na forma planctônica como em biofilme.

O estudo realizado por Andrade et al.¹ (2013) objetivou avaliar os efeitos da PDT mediada pela curcumina contra células planquitônicas e biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. Os autores observaram que houve inativação completa das células fúngicas em solução e que houve redução da viabilidade celular

das células em biofilme. Da mesma forma, Dovigo et al.²⁰ (2011) avaliaram os efeitos da PDT mediada pela curcumina contra células planquitônicas e biofilme de *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *C. glabrata*. Os autores concluíram que a baixas concentrações de curcumina quando associado com a luz, pode ser altamente eficaz para inativação de isolados de *Candida*, para ambas as formas, planctônicas e de biofilme. Também já foi demonstrada a eliminação de *C. albicans* presente em línguas de ratos. Dovigo et al.¹⁹ (2013) realizaram um estudo em que a PDT mediada pela curcumina demonstrou ser eficaz para a inativação de *C. albicans in vivo*. Apesar de serem resultados iniciais, constatou-se não haver prejuízos ao tecido do hospedeiro. Dessa forma, a utilização da PDT parece ser um campo promissor e pesquisas utilizando-se as mesmas condições do presente estudo em modelos animais e em situações clínicas deveriam ser realizadas.

A aplicação isolada do laser pode não afetar a viabilidade das células microbianas²⁷. Jackson et al.²⁷ (1999) aplicaram luz em leveduras e hifas de *Candida* spp. e houve alteração da viabilidade das mesmas. Por outro lado, a partir da análise das UFCs, observou-se que a luz, isoladamente, foi efetiva na redução do número de células fúngicas. Da mesma forma, de Souza et al.¹⁶ (2006) verificaram que a aplicação isolada do laser provocou redução das UFCs de *C. tropicalis*, o que sugere susceptibilidade desta espécie à luz laser. Tal diferença de resultados pode ser explicada em função dos testes aplicados. O teste XTT é um método colorimétrico que avalia a respiração celular por meio da função mitocondrial. Já o método de contagem de UFCs, avalia a capacidade de proliferação das células viáveis, independente do seu estado metabólico. Além disso, existem outros testes que podem mensurar a viabilidade celular, como o Alamar Blue®, que é um teste fluorimétrico⁴¹⁻⁴².

Apesar da parede celular do fungo ser diferente da estrutura celular dos mamíferos, células fúngicas e células humanas são estruturas eucarióticas. Dessa forma, substâncias medicamentosas utilizadas para combater as infecções fúngicas podem ocasionar efeitos indesejáveis sobre células do corpo humano, como as da mucosa oral. Além disso, a interação entre células fúngicas e células humanas pode ocorrer, potencializando ou inibindo o efeito de certas substâncias. Os queratinócitos, por exemplo, podem agir como imunócitos^{47, 56} e podem segregar uma variedade de citocinas pró-inflamatórias^{47, 50}. Estas citocinas desempenham um papel crítico no desenvolvimento de imunidade protetora contra patógenos intracelulares⁵⁰. Além

disso, o contato com os micro-organismos também induz as células epiteliais a produzirem uma variedade de proteínas antimicrobianas incluindo as defensinas⁵⁰. Dessa forma, a análise da biocompatibilidade de substâncias utilizadas para prevenção ou eliminação do biofilme, principalmente utilizando-se o sistema de co-cultura entre patógenos e células hospedeiras, se faz necessária. Este sistema permite o estudo das relações entre os dois organismos, em condições controladas, e pode levar à descoberta de mecanismos de interação, patogenicidade e de resistência em nível celular^{3, 52, 54, 58}.

Marinho³⁴ (2006), ao estudar o efeito da PDT sobre células epiteliais e espécies de *Candida* separadamente, observou que a viabilidade média das células epiteliais foi de 70,81%, com inativação de 29,19%, o que parece fornecer uma margem de segurança para aplicação da terapia *in vivo*. Segundo Zeina et al.⁵⁹ (2003), a PDT é um método suficientemente seletivo para inativação de fungos em infecções superficiais, já que as dosimetrias requeridas para inativação desses micro-organismos são inferiores às dosimetrias lesivas a células animais. Neste aspecto, Carmello et al.⁷ (2015), ao realizarem um estudo com o objetivo de verificar o efeito da PDT em modelos de camundongos, não constataram efeito adverso dessa terapia nas línguas de ratos. Além disso, os autores concluíram que a PDT foi efetiva na inativação de *C. albicans*.

A biocompatibilidade da fonte de luz e do fotossensibilizador, em associação ou não, também deveria ser investigada. A luz pode ser absorvida pelos componentes da cadeia respiratória, sendo que os efeitos primários ocorrem na mitocôndria⁵⁷. Um dos processos que pode ocorrer é a aceleração da transferência de elétrons e o outro é a transferência de energia ao oxigênio. Em baixas dosimetrias, o primeiro processo predomina e, em altas, o dano fotodinâmico ocorre⁵⁷. Esses fatores podem acarretar na redução da proliferação de algumas linhagens de células, tornando a terapia tóxica. Para minimizar o dano induzido aos tecidos sadios adjacentes, a fonte de luz deveria ser aplicada cuidadosamente e o fotossensibilizador, por sua vez, deveria ser aplicado topicamente apenas nas áreas infectadas^{21, 35}. Em relação ao fotossensibilizador, tem sido reportado o efeito citotóxico da curcumina sobre células cancerígenas^{35, 48}. Neste contexto, Ribeiro et al.⁴⁶ mostraram, em um estudo *in vitro*, que a citotoxicidade da curcumina na PDT não estaria somente relacionada a micro-organismos. Os autores concluíram que mais

estudos são necessários para verificar a interação desse protocolo com os tecidos vivos, avaliando-se a biocompatibilidade da curcumina com tecidos orais na PDT. A curcumina é um componente natural, de baixo peso molecular. Seu efeito antioxidante e anti-inflamatório podem explicar o efeito citotóxico desse fotossensibilizador. Levando-se em consideração os aspectos citados, alguns mecanismos da PDT ainda precisam ser esclarecidos em futuras pesquisas clínicas, como a influência da saliva na efetividade da terapia e a possibilidade de sua aplicação sem a ocorrência de efeitos colaterais aos tecidos sadios adjacentes.

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade da terapia fotodinâmica utilizada na eliminação do biofilme por meio da utilização de células epiteliais em co-cultura com *Candida albicans*.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar a biocompatibilidade da terapia fotodinâmica, mediada pelo fotossensibilizador curcumina associada a luz LED, sobre células epiteliais em co-cultura com *Candida albicans*;

2. Avaliar a biocompatibilidade e interação entre células epiteliais e *Candida albicans* em co-cultura.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAIS

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

Materiais de Consumo:

1. Acetona P.A.A.C.S., produzida pelo laboratório Qhemis, Cotia, São Paulo, Brasil.
2. Ácido clorídrico (P.A.-A.C.S.), Synth, Diadema, São Paulo, Brasil.
3. Água destilada.
4. Alamar Blue®, Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Waltham, Massachusetts, USA.
5. Alça de inoculação 1 µL, Laborplast, Cassinetta di Lugagnano, MI, Itália.
6. Alça de inoculação 10 µL, Laborplast, Cassinetta di Lugagnano, MI, Itália.
7. Alça estéril de Digalsky, Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil.
8. Álcool absoluto, Prolink, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
9. Álcool Isopropílico PA, Qhemis, Cotia, São Paulo, Brasil.
10. Células HaCaT (0341) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
11. Cepa padrão de *Candida albicans* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA (ATCC 90028).
12. Cloreto de Potássio (P.A.-A.C.S.), Synth, Diadema, São Paulo, Brasil.
13. Cloreto de Sódio (P.A.-A.C.S.), produzido pela Qhemis, Cotia, São Paulo, Brasil.
14. Cubeta de 4,5 mL, Cartel, São Paulo, SP, Brasil.
15. Curcumina/Curcumin, pureza $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.
16. D-glicose Anidra (Dextrose) P.A.-A.C.S., produzida pelo laboratório Synth, Diadema, São Paulo, Brasil.

17. Dimethyl Sulfoxido (DMSO), pureza $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.
18. Folha de alumínio, Wyda Pratic, Sorocaba, São Paulo, Brasil.
19. Fosfato de Potássio Mono. P.A.-A.C.S., Synth, Diadema, São Paulo, Brasil.
20. Fosfato de Sódio Bi básico Anidro, Synth, Diadema, São Paulo, Brasil.
21. Frasco coletor universal translúcido estéril 80 mL, Alibaba, Shanghai, China.
22. Garrafa para cultura de células 75 mL, TPP®, Trasadingen, Suíça.
23. Hidróxido de sódio(P.A.-A.C.S.), Qhemis, Cotia, São Paulo, Brasil.
24. Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – high glucose, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
25. Meio de cultura RPMI 1640, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
26. Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com cloranfenicol, Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland, EUA).
27. Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB), Difco, Detroit, EUA.
28. Menadiona, produzida por Sigma Co., St. Louis, MO, EUA.
29. Parafilm (Laboratory film 38m X 10cm), BOECO, Hamburgo, Alemanha.
30. Pipeta sorológica estéril 10mL embalada individualmente, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil.
31. Pipeta sorológica estéril 25mL embalada individualmente, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil.
32. Pipeta sorológica estéril 5mL embalada individualmente, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil.
33. Placa com 12 membranas transwell 0,4 μm Cód 3460, Corning Incorporated, New York, NY, USA.
34. Placa de 12 orifícios com fundo plano estéril, embalada individualmente, TPP, Trasadingen, Suíça.
35. Placa de 96 orifícios com fundo plano estéril, embalada individualmente, TPP, Trasadingen, Suíça.
36. Placa preta de 96 orifícios com fundo plano estéril, embalada individualmente, Thermo Scientific, Roskilde, DN, Dinamarca.
37. Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis, estéreis, J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São Jose dos Pinhais, Paraná, Brasil.

38. Placas para cultura de células 430167, Corning Incorporated, New York, NY, USA.
39. Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 μ L, Axygen Scientific, Union City, CA, EUA.
40. Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 μ L, Axygen Scientific, Union City, CA, EUA.
41. Ponteiras para pipeta 10 mL, Axygen Scientific, Union City, CA, EUA.
42. Ponteiras para pipeta 5 mL, Axygen Scientific, Union City, CA, EUA.
43. Sal de MOPS (Ácido 3-N-Morfolinopropanossulfônico), Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
44. Sal de MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Brometo], Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
45. Sal de Tetrazolium (XTT), Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
46. Sistema de filtração a vácuo com poros de 0,22 μ m, estéril e embalado individualmente, 500 mL, TPP, Trasadingen, Suíça.
47. Sistema de filtração a vácuo com poros de 0,22 μ m, estéril e embalado individualmente, 1000 mL, TPP, Trasadingen, Suíça.
48. Solução antibiótico antimicótico com Penicilina G, Estreptomicina e anfotericina, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
49. Solução de Azul de Tripán 0,4%, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
50. Soro fetal bovino estéril para cultura de células, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
51. Tripsina 0,5% e EDTA 0,2%, GIBCO Products International, Inc., Langley, OK, USA.
52. Tubo tipo eppendorf 1,5 mL, Axygen Scientific, Union City, CA, EUA.
53. Tubo tipo Falcon de 15 mL, fundo cônico, estéril cônico TPP, Trasadingen, Suíça.
54. Tubo tipo Falcon de 50 mL, fundo cônico, estéril cônico TPP, Trasadingen, Suíça.
55. Tubos criogênicos 2mL, Corning Incorporated, New York, NY, USA.
56. Tubos tipo Falcon de 50 mL, fundo cônico estéril, TPP®, Trasadingen, Suíça.

Instrumentais

1. Béquer graduado, Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil.
2. Bico de Bunsen, J. Prolab Industria e Comercio de Produtos para Laboratório Ltda., São Jose dos Pinhais, Paraná, Brasil.
3. Cabo para bisturi nº3, Golgran, Pirituba, SP, Brasil.
4. Câmara de contagem Neubauer espelhada Modelo: K5-0111, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil.
5. Erlenmeyer graduado, Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil.
6. Garrafa de vidro graduada com tampa 1000 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.
7. Garrafa de vidro graduada com tampa 250 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.
8. Garrafa de vidro graduada com tampa 500 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.
9. Lâmina de bisturi nº 11, Free-Bac, Itajaí, SC, Brasil.
10. Micropipeta de 100-1000 µL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.
11. Micropipeta de 20-200 µL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.
12. Micropipeta Multicanal HTL Discovery Comfort, 12 Canais, 20-200 µL, HTL, Warsaw, Polônia.
13. Pinça clínica, DUFLEX, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
14. Pipeta de 1-10 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.
15. Pipeta de 1-5 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.
16. Pipetador automático eppendorf Modelo: Easypet 3, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha.

Equipamentos

1. Agitador Magnético com aquecimento Modelo 78-HW-1, Biomixer.
2. Agitador tipo vórtex Modelo: VM-3000, Vixar, Plymouth, MN, USA.
3. Aparelho de ultra som, Ultrasonic Cleaner Modelo 1440D, Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
4. Autoclave horizontal de bancada Modelo AB 25. Série: 03026, Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brasil.

5. Autoclave vertical Modelo: AV 60. Nº 6614, Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brasil.
6. Balança de precisão Modelo: BG 400. Nº 016450, GEHAKA – Ind. e Com. Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil.
7. Banho maria Modelo 1102, Fanem, Guarulhos, SP, Brasil.
8. Bio Table - Aparelho de luz LED, 455 nm, desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos (IFSC) – USP São Carlos, SP, Brasil.
9. Cabina de segurança biológica (capela de fluxo laminar), Veco, Campinas, SP, Brasil.
10. Centrífuga de bancada Modelo 80-2B. Série: 5522, Centribio.
11. Centrífuga Eppendorf Modelo: 5810R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha.
12. Centrífuga Modelo: 2410, Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil.
13. Compressor e aspirador a vácuo Modelo: 089-CAL, Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil.
14. Contador de colônias CP 600 PLUS, Modelo: CP-600. Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brasil.
15. Espectrofotômetro Modelo: SP-220, Biospectro, Equipar Ltda., Curitiba, PR, Brasil.
16. Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324. Série – 9819011, Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda., Piracicaba, SP, Brasil.
17. Estufa de CO₂ Modelo 3100, Thermo Fisher Scientific, Marietta, Ohio, USA.
18. Estufa de Cultura Modelo 002 CB, Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil.
19. Estufa para secagem e esterilização Modelo: MA 033. Série: 9819, Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda., Piracicaba, SP, Brasil.
20. Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, Marietta, Ohio, USA.
21. Incubadora de bancada com agitação orbital - shaker Modelo: Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil.
22. Leitor de Microplacas Modelo EZ Read 400, Biochrom, Cambridge UK.
23. Micro aspirador a vácuo Modelo 5005, Nevoni, São Paulo, SP, Brasil.
24. Microscópio Invertido Modelo 403. Série: 1207159, Optiphase, Van Nuys, CA, USA.

25. PHmetro de bancada Modelo Q400AS. Série: 14024666. Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil.

METODOLOGIA

Agente fotossensibilizador

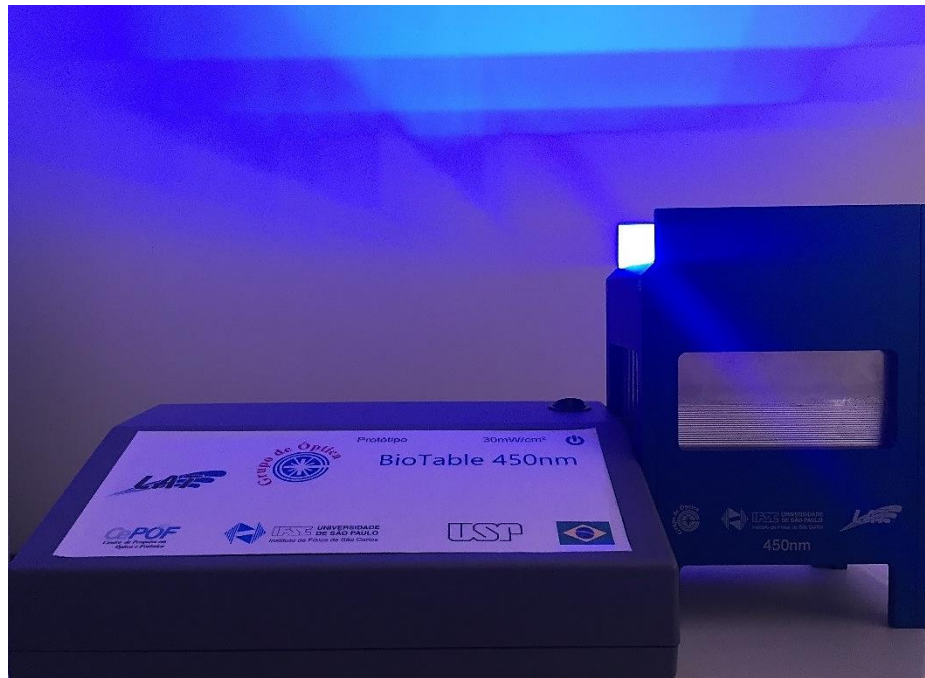
Neste estudo, o agente fotossensibilizador utilizado foi a curcumina (Cur), um composto natural de coloração amarela extraído do rizoma da planta *Curcuma longa L* (açafrão), comercializado na forma de pó amarelo-alaranjado, adquirido com pureza $\geq 95\%$ (Sigma), armazenado a temperatura de -20° C protegido da luz e de umidade. Em solução, a Cur apresenta uma banda característica de absorção de luz com pico máximo em, aproximadamente, 430 nm.

Para o preparo da solução de curcumina utilizada, foi feita uma solução mãe 0,016M. Então, desta solução, foi preparada uma solução estoque de 800 μ M, em que 100 μ L de Cur a 0,016M foram solubilizadas com 1900 μ L de DMSO. A partir dessa solução estoque, foi obtida a concentração desse estudo. As soluções de Cur foram obtidas mantendo o diluente DMSO a 10%. Para que a concentração de 40 μ M de Cur fosse alcançada, e para o volume final de 10.000 μ L (uma ocasião, aplicação de 2.000 μ L em cada orifício), foi utilizado 500 μ L de Cur 800 μ M e 9500 μ L de solução salina.

Fonte de luz

A iluminação foi realizada com aparelho de luz tipo LED idealizado e desenvolvido no Instituto de Física de São Carlos (IFSC), da Universidade de São Paulo (USP), sob coordenação e orientação do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato. Este aparelho, denominado “Bio Table” possui um comprimento de onda de 440 ± 30 nm (LEDs azuis) e potência de 22,0 mW/cm² (Figura 1).

Figura 1 - Bio Table desenvolvido no Instituto de Física de São Carlos.



É necessário considerar a potência de saída do aparelho, uma vez que, somado ao tempo de iluminação, determina a quantidade de energia aplicada sobre a amostra iluminada. Essa quantidade de energia é denominada dose de luz ou fluência, e é expressa pela energia por área (J/cm^2). A dose de luz de $5,28 J/cm^2$ foi utilizada²⁰.

Formação do biofilme

Reativação e condições de cultivo da *Candida*

Para realização do presente estudo, cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028) foram utilizadas. Os micro-organismos ficaram congelados a $-80^{\circ}C$ e estocados em meio de cultura YEPD – Yeast-Peptone-Glucose (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% D-glucose, 2% agar) até o momento de sua utilização.

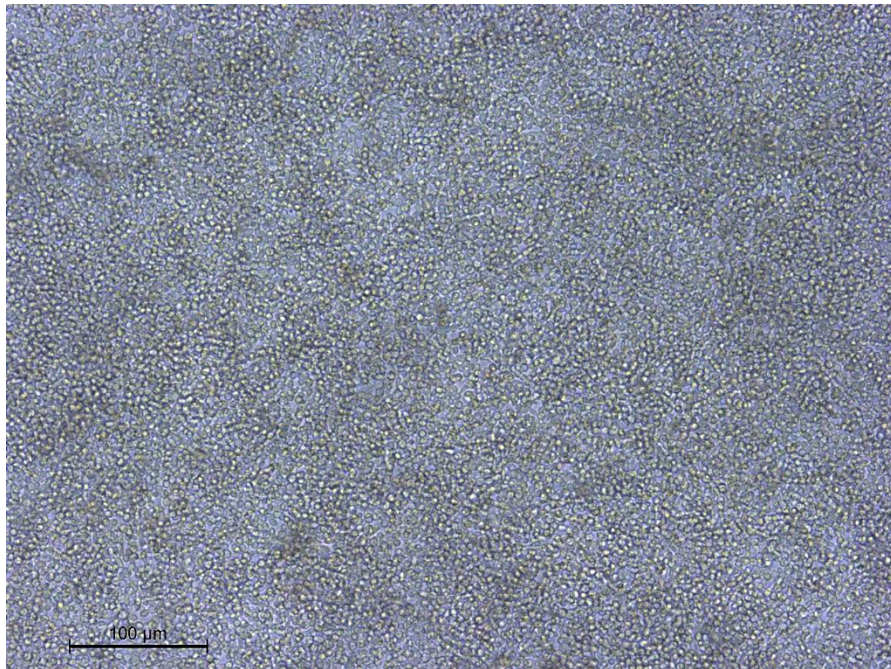
Previamente a sua utilização, as cepas de *Ca* foram descongeladas. Foram semeados $25 \mu L$ de *Ca* em placas de petri contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com cloranfenicol ($0,1g/L$). Em seguida, as placas foram incubadas a $37^{\circ}C$, por 48 horas em estufa bacteriológica.

Então, para realização do inóculo com os micro-organismos, duas alçadas de inoculação da levedura foram transferidas para 10 mL de meio de cultura caldo Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado com 100 mM de glicose, e incubadas a 37° C por 16 horas.

Decorrido o período de incubação os precipitados celulares foram centrifugados a 4000 rpm a 21°C por 5 minutos e lavados três vezes com solução salina divisora de fosfato estéril (PBS; NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7,2) por meio de agitação e centrifugação. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 (com L-glutamina e sem bicarbonato), tamponado com uma solução de MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico], em uma concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0. A densidade óptica desta suspensão foi padronizada na concentração de 1×10^7 UFC/mL. Para isto, foi utilizado o comprimento de onda de 540 nm⁴³.

Após o ajuste das concentrações, foram colocados alíquotas de 1000 µL da suspensão obtida para *Ca* sobre as membranas transwell da placa de 12 poços, e mais 1000 µL de meio de cultura RPMI estéril no fundo de poço. As placas foram incubadas por 90 minutos⁹⁻¹⁰ a 37 °C em agitação de 75 rpm (fase de adesão). Transcorrido esse período, foram realizadas 2 lavagens cuidadosas do biofilme formado sobre as membranas com 1000 µL de PBS estéril, a fim de remover as células não aderidas, tamponar o meio e remover os metabólitos. Posteriormente, 1000 µL de RPMI estéril foram adicionados sobre o biofilme no fundo de poço. As placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa de agitação orbital de 75 rpm por 24 horas. Decorrido este período, foi realizada a interação entre *Ca* e células, que cresceram em co-cultura por mais 24 horas, totalizando um biofilme de 48 horas (Figura 2).

Figura 2 - Imagem do biofilme de Ca formado sobre a membrana Transwell com microscópio óptico invertido (aumento de 20x).

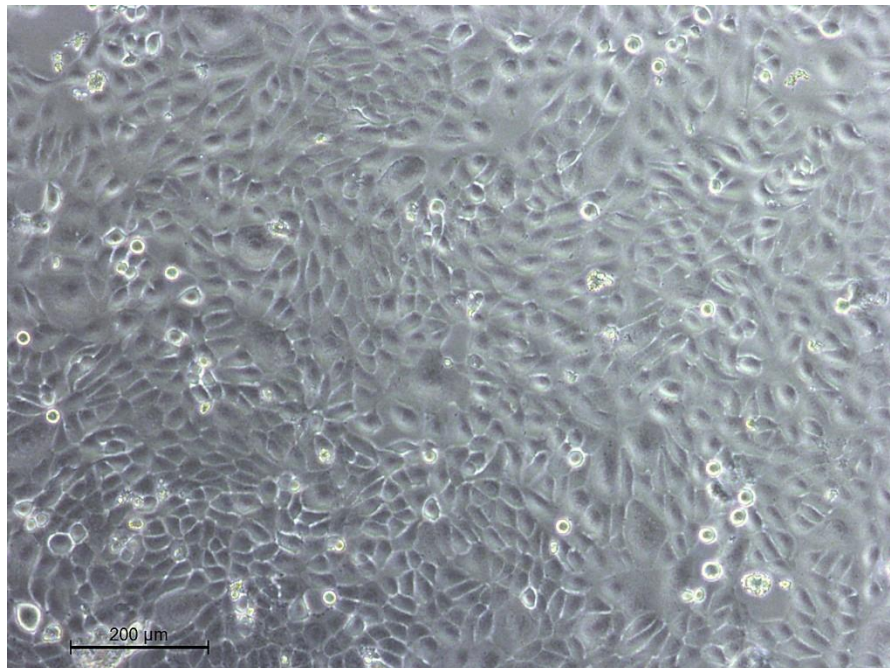


Cultura celular

Foram feitas culturas de queratinócitos humanos com a linhagem HaCaT (0341) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, cultivados em garrafas plásticas de 75 cm² em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 2,0 mmol/L⁻¹ de glutamina; contendo 10% de soro fetal bovino (SFB); 10,000 µg.mL⁻¹ de penicilina G; 10,000 µg.mL⁻¹ de estreptomicina; 25 µg.mL⁻¹ de anfotericina, em incubadora com uma atmosfera umedecida, contendo CO₂ a 5% e à temperatura de 37°C. Para manutenção da cultura, as células foram cultivadas até atingirem a confluência (90%), lavadas com tampão fosfato PBS 1X (NaCl 140 mmol.L⁻¹, KCl 3,0 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 4,30 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 1,4 mmol.L⁻¹), removidas com solução de tripsina (0,05%)/EDTA (0,53 mmol.L⁻¹) e então submetidas a centrifugação com 400 xg por 5 minutos. As células foram então ressuspensas em meio de cultura e replaqueadas em garrafas novas. O meio dos queratinócitos foi trocado a cada dois dias, e as células recultivadas, até que o número de células e a confluência adequados, fossem obtidos para a execução do experimento. Sendo que as células utilizadas estavam entre a 3^a e a 8^a passagem. As células foram contadas em câmara

de Neubauer, adicionando o corante Azul de Tripán, e plaqueadas na quantidade de 10×10^4 células/poço em placas estéreis de 12 poços. Então, as células foram incubadas em estufa contendo CO_2 a 5% e à temperatura de 37°C por 24 horas. Após este período, sobre as células foram colocadas as membranas transwell contendo o biofilme de *Ca*. Desta forma, as células permaneceram em contato através da co-cultura por mais 24 horas, totalizando um crescimento celular de 48 horas (Figura 3).

Figura 3 - Imagem de células HaCaT aderidas ao fundo do poço, com microscópio óptico invertido Leica (aumento de 10x).



Co-cultura

Para a realização do co-cultivo foram utilizadas membranas transwell de poliéster transparente com 10 μm de espessura, poros com tamanho de 0,4 μm , tratadas para aderência celular, com esterilização por radiação gama. Estas membranas permitiram uma interação entre queratinócitos e micro-organismos, sem que os mesmos estivessem sobre contato direto.

Os queratinócitos foram semeados na concentração de 10×10^4 células/poço em placas acrílicas esterilizadas de 12 compartimentos. Em seguida, as

placas foram armazenadas em incubadora na temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar. Enquanto em outra placa de cultura de 12 compartimentos, 1000 µL de suspensão fúngica (10⁷ UFC/mL) foram adicionados em cada compartimento sobre uma membrana transwell e incubada a 37°C também por 24 horas.

Após este período de incubação, foi removido o meio antigo sobre as membranas, foi realizada uma lavagem cuidadosa do biofilme com PBS, as membranas foram então removidas desta placa e transferidas para a placa com os queratinócitos aderidos, que também foi previamente lavada com PBS. Sobre a co-cultura, foi adicionado o meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB, sem a solução de antibiótico e antimicótico para não interferir no metabolismo da Ca. Desta forma, os dois tipos celulares ficaram apenas separados pela membrana, como demonstrado no esquema abaixo (Figura 4). Em co-cultura, ambas as células foram incubadas por mais 24 horas em incubadora a temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar, totalizando 48 horas de maturação dos queratinócitos e do biofilme²⁸ (Figura 5).

Figura 4 - Detalhamento do poço contendo a membrana transwell (0,4µm).

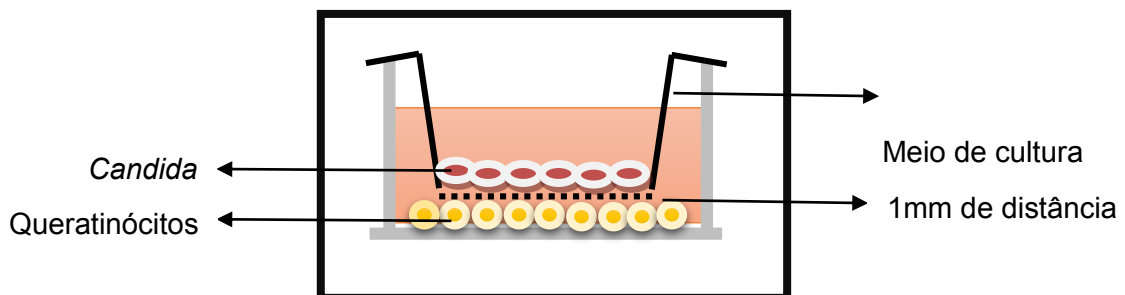
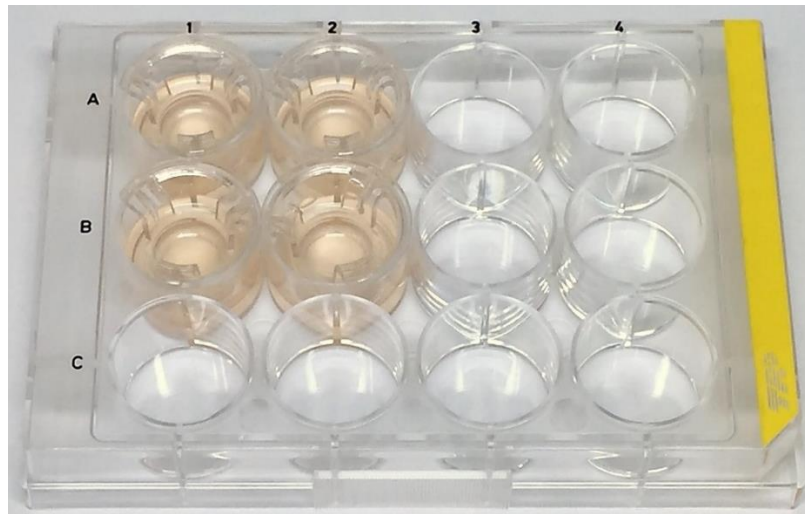


Figura 5 - Co-cultura realizada em placa de 12 poços.



Condições experimentais avaliadas

Para avaliar o efeito citotóxico da terapia fotodinâmica (PDT) sobre células epiteliais em co-cultura com Ca, as seguintes condições experimentais foram testadas:

P+ L+ (grupo experimental PDT) - neste grupo, a solução de Cur na concentração de 40 μM , foi adicionada sobre a co-cultura na placa de 12 compartimentos. A placa foi deixada em repouso no escuro durante 20 minutos para promover a sensibilização das amostras (tempo de pré-incubação). Após esse período, a placa foi colocada sobre o aparelho de iluminação LED. O aparelho foi então, acionado e todos os orifícios da placa foram iluminados uniforme e simultaneamente com dose de luz de 5,28 J/cm^2 e um tempo de iluminação equivalente a esta dose de luz, que foi de 4 minutos.

P- L+ (grupo controle da ação da luz LED sobre as células) - Nesta condição experimental, foram incluídas amostras que não foram submetidas aos procedimentos de sensibilização com o fotossensibilizador. O mesmo volume de PBS, equivalente ao volume que seria de Cur, foi adicionado sobre cada poço contendo a co-cultura. A placa permaneceu em repouso no escuro durante 20 minutos sobre a bancada. Após esse período, a placa foi colocada sobre o aparelho de iluminação LED. O aparelho foi então, acionado e todos os orifícios da placa foram iluminados uniforme e simultaneamente durante 4 minutos com dose de luz de 5,28 J/cm^2 .

P+ L- (grupo controle da atividade do material fotossensibilizador sobre as células) - Neste grupo, a solução de Cur na concentração de 40 μM foi adicionada a placa de 12 compartimentos contendo o co-cultivo. A placa foi deixada em repouso no escuro durante 20 minutos, para promover a sensibilização das amostras (tempo de incubação). Entretanto, após esse período, a placa foi deixada sobre a bancada, na ausência de luz, pelo tempo equivalente à dose de luz aplicada nas amostras irradiadas (4 minutos).

P- L- (grupo controle não tratado) - nesta condição experimental, foram incluídas amostras que não foram submetidas aos procedimentos de sensibilização com o fotossensibilizador, ou irradiação com a luz LED. O mesmo volume equivalente ao que seria de Cur, foi adicionado de PBS sobre cada poço contendo a co-cultura. Estes poços também permaneceram em repouso no escuro durante 20 minutos sobre a bancada. Após esse período, a placa também foi deixada sobre a bancada, na ausência de luz, pelo tempo equivalente à dose de luz aplicada nas amostras irradiadas.

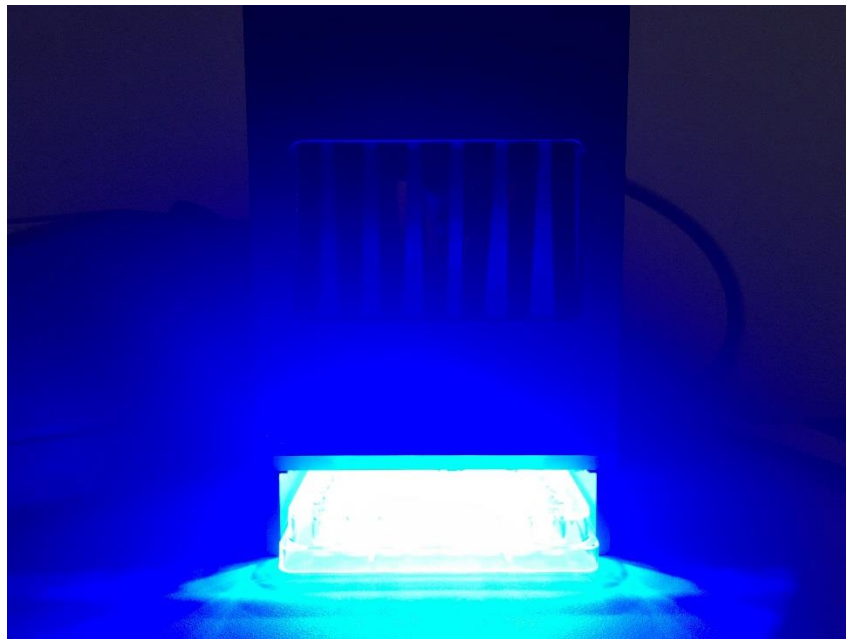
Além disso, como controle negativo, três membranas de cada placa foram destinadas apenas ao crescimento de micro-organismos e outros três poços para o crescimento de células separadamente, com seus respectivos meios. Com o objetivo de avaliar o crescimento isolado desses tipos celulares e a possível interação entre eles.

Realização da PDT

Após o período de 24 horas de incubação dos queratinócitos e leveduras em co-cultivo, as células HaCaT e o biofilme foram cuidadosamente lavados com PBS. Sobre as células e biofilmes correspondentes aos grupos P+L+ e P+L- foram colocados alíquotas de 1000 μL do fotossensibilizador Cur na concentração de 40 μM . Em seguida, as placas foram envolvidas por papel alumínio, permanecendo nesta condição durante 20 minutos (tempo de pré-irradiação). Após este período as placas dos grupos P+L+ foram iluminadas com LED (~440nm) a uma potência de 5,28 J/cm², durante 4 minutos. As placas referentes ao grupo P+L- permaneceram sobre a bancada envolvida por papel alumínio por mais 4 minutos (tempo correspondente ao

período de iluminação com a luz LED). Para o grupo P-L- foi colocada uma alíquota de 1000 μ L de PBS sobre o co-cultivo, e a placa foi incubada no escuro por 20 minutos, em seguida, permaneceu sobre a bancada por 4 minutos (tempo correspondente ao período de iluminação). Já para o grupo DMSO foi adicionada uma alíquota de 1000 μ L de PBS com 3% de DMSO sobre o co-cultivo, e a placa foi incubada no escuro por 20 minutos, em seguida, permaneceu sobre a bancada por mais 4 minutos (tempo correspondente ao período de iluminação). Para o grupo P-L+, foram colocados 1000 μ L de PBS sobre a co-cultura, a placa foi incubada no escuro por 20 minutos, e em seguida, foi iluminada com luz LED por 4 minutos (Figura 6).

Figura 6 - Iluminação da placa com Bio Table.



Após a realização de todos os procedimentos relacionados aos diferentes grupos experimentais, os testes para a análise viabilidade celular dos micro-organismos e dos queratinócitos foram realizados em três ocasiões distintas e em triplicata, totalizando nove poços para cada condição (n=9).

Testes realizados para análise da viabilidade celular

Avaliação da atividade mitocondrial dos queratinócitos (Teste MTT)

Para a análise do metabolismo celular, atividade mitocondrial dos queratinócitos foi avaliada. O ensaio de MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Brometo], consiste na detecção da viabilidade celular, de acordo com a capacidade de conversão do sal tetrazólio MTT em um produto de coloração roxa que pode ser medido em espectrofotômetro. O princípio deste método, consiste no fato de que as células viáveis possuem mitocôndrias competentes, que promovem a respiração celular e liberam no meio, espécies redutoras provenientes de cadeia respiratória celular, o que promove a redução do sal do MTT amarelo no produto corado, roxo⁵³.

Para a realização do teste, após a aplicação da PDT, para cada grupo, a membrana transwell foi removida de cada compartimento, removendo-se, assim, o biofilme de *Candida*. Em seguida, os queratinócitos foram lavados com 1000 µL de PBS, foi adicionado 800 µL de solução de MTT (5,0 mg/ mL⁻¹) em cada poço, e as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar, por 4 horas no escuro. Após tal período, os cristais de formazan foram solubilizados em 500 µL de 2-propanol acidificado com 0,04N de HCl. Após agitação e verificação da homogeneidade das soluções, alíquotas de 150 µL de cada compartimento, em quadruplicata, foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos para a realização da leitura. A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada sobre um comprimento de onda de 570 nm em leitor Reader 400 EZ.

Avaliação da atividade mitocondrial das células fúngicas (Teste XTT)

O ensaio de XTT avalia a presença de micro-organismos por meio da atividade metabólica das células. O teste com XTT baseia-se na habilidade das enzimas desidrogenases mitocondriais de micro-organismos metabolicamente ativos converterem o sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor amarela) em um produto solúvel em água - formazan (cor laranja), o que é mensurado em espectrofotômetro. A solução

de XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) - 5 - [(phenylamino) carbonyl] - 2H - tetrazolium hydroxide), foi preparada utilizando-se água ultrapura a uma concentração de 1 mg/mL e mantida a -70°C até o momento dos experimentos. A solução de menadiona foi preparada em acetona a 0,4 mM imediatamente antes de cada experimento. A solução de XTT preparada em todos os experimentos constituiu de PBS com 200 mM de glicose, solução de XTT previamente preparada e menadiona, na seguinte proporção: 158 μL , 40 μL e 2 μL , respectivamente. Para o ensaio, 800 μL da solução de XTT foram adicionados sobre o biofilme formado nas membranas transwell, previamente lavados com 1000 μL de PBS, e incubadas a 37°C por 3 horas no escuro. Após esse período, 150 μL do produto da degradação do XTT foram transferidos em quadruplicata para uma placa de 96 poços e foi efetuada a leitura no leitor de microplacas Reader 400 EZ com filtro 492 nm.

Avaliação da proliferação celular por meio do teste Alamar Blue®

A proliferação celular dos queratinócitos e da Ca foi também avaliada com a utilização do teste Alamar Blue®. O ensaio apresenta um indicador de crescimento fluorimétrico com base na detecção de atividade metabólica. Especificamente, o sistema incorpora um indicador de oxidação-redução (REDOX), que gera um produto fluorescente e muda de cor em resposta à redução química. O crescimento celular contínuo mantém um ambiente reduzido, enquanto a inibição de crescimento mantém um ambiente oxidado. A redução relacionada com o crescimento faz com que o indicador REDOX oxidado (não-fluorescente, azul) mude para a forma reduzida (fluorescente, vermelho).

A membrana transwell foi transferida para uma nova placa estéril de 12 poços, de forma que o teste foi realizado de forma separada para as células, aderidas ao fundo da placa, e para o biofilme de Ca, sobre a membrana. Para realização do teste, o meio presente em ambas as células foi removido, as células foram lavadas uma vez com 1000 μL de PBS e foram acrescentados 100 μL da solução de Alamar Blue diluídos em 900 μL de RPMI com 10% de SFB, totalizando 1000 μL da solução em cada poço. As amostras foram, então, incubadas protegidas da luz, a 37°C com 5% de CO_2 e 95% de ar por 4 horas. Decorrido este tempo, uma alíquota de 150 μL

de cada poço foi transferida, em quadruplicata, para uma placa preta estéril de 96 compartimentos com fundo plano. Imediatamente após a leitura de fluorescência das amostras foi realizada através do Fluoroskan Ascent FL com um filtro de 544 nm de emissão e 590 nm de transmissão.

Contagem do número de colônias viáveis (ufc/mL)

Para a quantificação das células fúngicas, após os tratamentos descritos, as membranas contendo o biofilme foram separadas das células em co-cultura, sendo que a membrana foi removida do suporte, com o auxílio de um cabo de bisturi com uma lâmina nº 11 estéril. Cada membrana removida foi colocada em tubo Falcon com PBS estéril e sonicada em aparelho ultrassônico por 5 minutos para o total desprendimento dos fungos. Em seguida, o processo de diluição seriada foi realizado em PBS estéril por meio da transferência de 100 µL da solução original para tubos contendo 900 µL da mesma solução. As diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram obtidas e uma alíquota de 25 µL de cada diluição foi semeada, em duplicata, em um dos quadrantes de uma placa de Petri contendo SDA com cloranfenicol. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, as placas foram posicionadas sobre um contador de colônias digital e o número de colônias determinado. Os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) foram calculados de acordo com a seguinte fórmula: $\text{ufc/mL} = \text{número de colônias} \times 10^n / q$. Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição escolhida (de 0 a 4) e q equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas (0,025 mL = 25 µL).

Análise dos resultados

Para avaliar a citotoxicidade da Terapia Fotodinâmica, sobre células epiteliais quando em co-cultura com as espécies de *Candida*, foram realizadas duas análises separadamente, uma quantitativa e outra qualitativa. Na avaliação quantitativa, foram utilizadas análises de variância, aplicadas sobre as porcentagens

de células vivas em relação ao controle. Essa análise foi complementada por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. As condições de homogeneidade de variâncias e de normalidade dos resíduos foram provadas, respectivamente, pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk. Adotou-se o nível de significância de 5% para a tomada de decisão (tabelas contendo as análises estatísticas encontram-se no Anexo 1).

Além disso, para complementar a análise estatística, os resultados de cada grupo experimental foram comparados com o grupo controle (considerado 100% de viabilidade) e os materiais e tratamentos propostos foram classificados de acordo com o efeito citotóxico em (análise qualitativa) seguindo as Normas da ISO 10993-5 de 2009²⁶: não citotóxico (inibição menor do que 25% em relação ao grupo controle), discretamente citotóxico (inibição entre 25% e 50% em relação ao grupo controle), moderadamente citotóxico (inibição entre 50% e 75% em relação ao grupo controle) e intensamente citotóxico (inibição maior do que 75% em relação ao grupo controle).

RESULTADOS

Análise Quantitativa

Na Tabela 1 apresentam-se as médias e desvios padrão de porcentagens de células vivas em relação ao controle (considerado 100% de viabilidade). Para cada teste, exceto para o Alamar Blue, foi aplicada uma análise de variância para avaliar as porcentagens, obtendo-se sempre significância estatística ($p < 0,01$). Aplicou-se o teste de Tukey para a comparação de médias duas a duas com o resultado resumido na mesma Tabela 1. Para o método Alamar Blue foi aplicada uma análise de variância de dois fatores: tipo de célula e tratamento. Neste caso, houve efeito significativo da interação (p), a qual foi avaliada por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. O resultado também está resumido na Tabela 1.

Tabela 1 – Médias e desvios padrão de porcentagens em relação ao controle obtidas pelos diferentes testes

Tratamento	Alamar		MTT	XTT
	Querat %	<i>Candida</i> % [†]	%	%
P+L+	72,2 (1,4) ^a	66,1 (3,6) ^a	51,7 (3,9) ^a	39,9 (7,2) ^a
P+L-	76,0 (4,4) ^a	81,1 (4,2) ^b	64,3 (4,6) ^b	61,3 (8,5) ^b
P-L+	76,9 (2,3) ^a	83,9 (3,7) ^b	62,3 (3,0) ^b	52,2 (2,4) ^{ab}
P-L-	94,0 (0,8) ^b	94,0 (1,4) ^c	76,3 (4,9) ^b	90,3 (5,0) ^c
Controle	100,0 ^b	100,0 ^c	100,0 ^c	100,0 ^c

Médias acompanhadas de letras iguais na coluna não são significativamente diferentes (teste de Tukey: $p > 0,05$).

† média de *Candida* sempre igual à média de Queratinócitos para o mesmo tratamento.

A partir da análise dos resultados da Tabela 1, observa-se que, para o teste Alamar Blue, a média de viabilidade celular para *Ca albicans* não foi diferente da encontrada para os queratinócitos. Além disso, no que se refere aos queratinócitos, ainda para o mesmo teste, observa-se que os grupos P+L+ (grupo experimental PDT),

P+L- (grupo controle da atividade do material fotossensibilizador sobre as células) e P-L+ (grupo controle da ação da luz LED sobre as células) apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P-L- (grupo controle não tratado). Com relação à *Ca albicans*, no teste Alamar Blue, a viabilidade celular foi menor no grupo P+L+ relativamente aos demais grupos. Os grupos P+L- e P-L+ foram equivalentes entre si e todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P-L-.

Para o teste MTT, o qual avaliou a viabilidade celular dos queratinócitos, observa-se que o grupo P+L+ foi estatisticamente diferente aos outros grupos. Os grupos P+L- e P-L+ não apresentaram diferença entre si e foram semelhantes ao grupo P-L-. Na análise da viabilidade celular para *Ca albicans* (teste XTT) foram obtidos resultados equivalentes para os grupo P+L+ e P-L+. Entretanto o grupo P-L+ foi significativamente igual ao grupo P+L-, sendo que todos os grupos foram diferentes do P-L-. Para todos os testes, o grupo P-L- foi estatisticamente igual ao grupo controle, indicando que a interação celular em co-cultura não influenciou o metabolismo dos queratinócitos e *Candida albicans*.

Os dados de unidades formadoras de colônias por mL estão apresentados numericamente na Tabela 2 e representados graficamente na Figura 7. Para essa análise, o número de colônias de *C. albicans* (UFC/ mL-1) foi transformado em logaritmo na base 10 (Log10). A análise de variância aplicada sobre os dados transformados mostrou efeito significativo de tratamento ($p < 0,001$). Para identificar os tratamentos diferentes foi aplicado o teste de Tukey, com o resultado mostrado na Tabela 2.

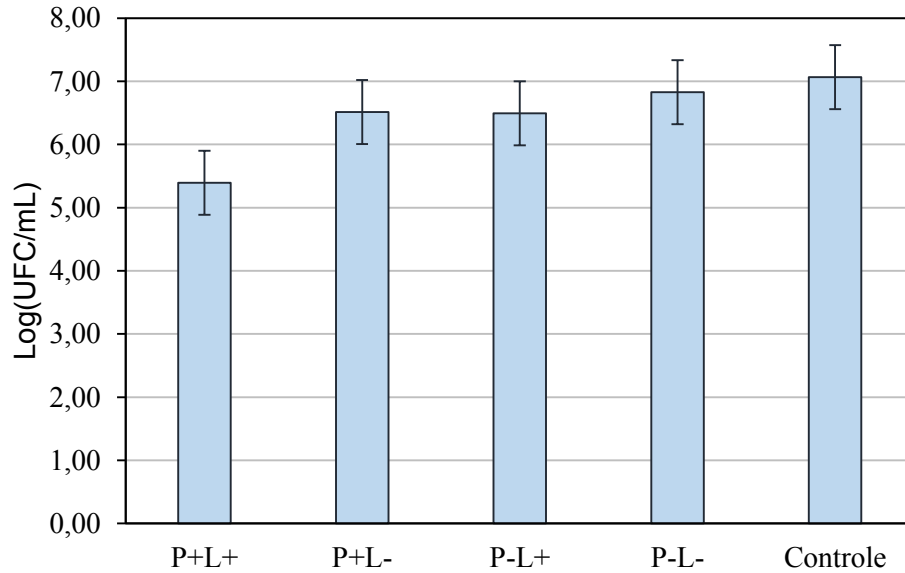
Tabela 2 - Médias de UFC/ mL (Log_{10}) e desvio padrão dos valores obtidos para cada grupo.

Tratamento	(UFC/ mL)	
	Log_{10}	
P+L+	5,39 (0,15)	a
P+L-	6,51 (0,25)	b
P-L+	6,49 (0,18)	b
P-L-	6,83 (0,33)	b
Controle	7,07 (0,48)	b

Médias acompanhadas de letras iguais na coluna não são significativamente diferentes (teste de Tukey: $p > 0,05$)

Quanto aos resultados presentes na Tabela 2, verifica-se que a maior redução de UFC/mL foi no grupo P+L+, com diminuição de 1,7 log_{10} com relação ao grupo controle. Os grupos P+L-, P-L+, P-L- e controle não foram estatisticamente diferentes entre si. Os valores em logaritmo (Log_{10}) das UFC/ mL para *Ca albicans* apresentam-se, resumidamente, na Figura 7.

Figura 7 - Médias amostrais de Log_{10} (ufc/mL) e intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras verticais) para *Candida*.



As Figuras de 8 a 10 apresentam, respectivamente, os resultados de fluorescência e absorbância do metabolismo celular através dos testes Alamar Blue (queratinócitos e *Candida*), MTT (queratinócitos) e XTT (*Ca albicans*).

Figura 8 - Médias amostrais de viabilidade celular (queratinócitos e *Candida*), em fluorescência, e intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras verticais) relativas ao teste Alamar Blue.

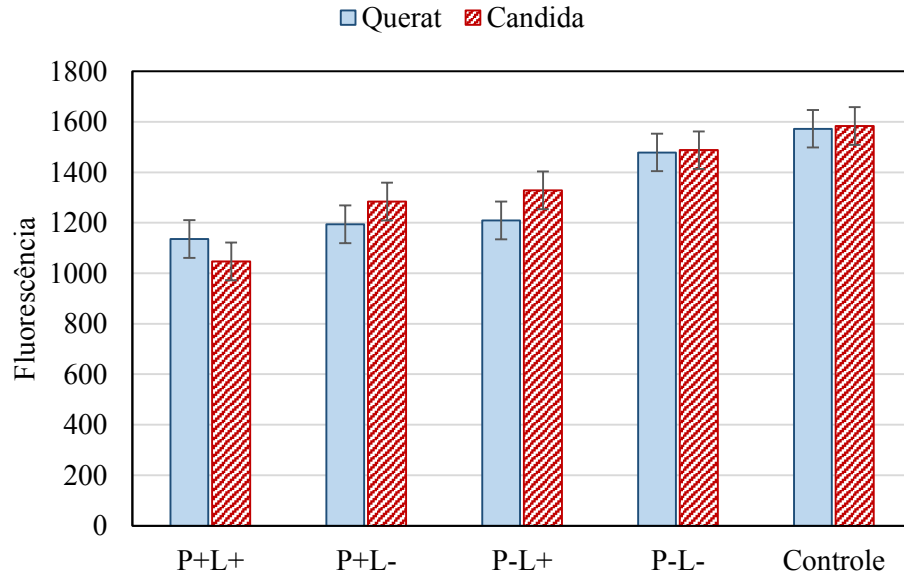


Figura 9 - Médias amostrais de viabilidade celular (queratinócitos), em absorbância, e intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras verticais) no teste MTT.

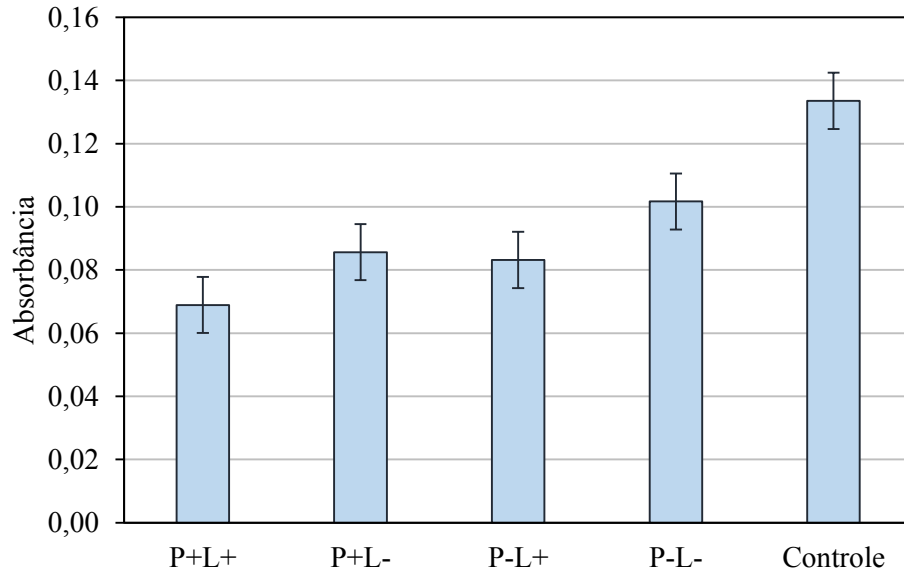
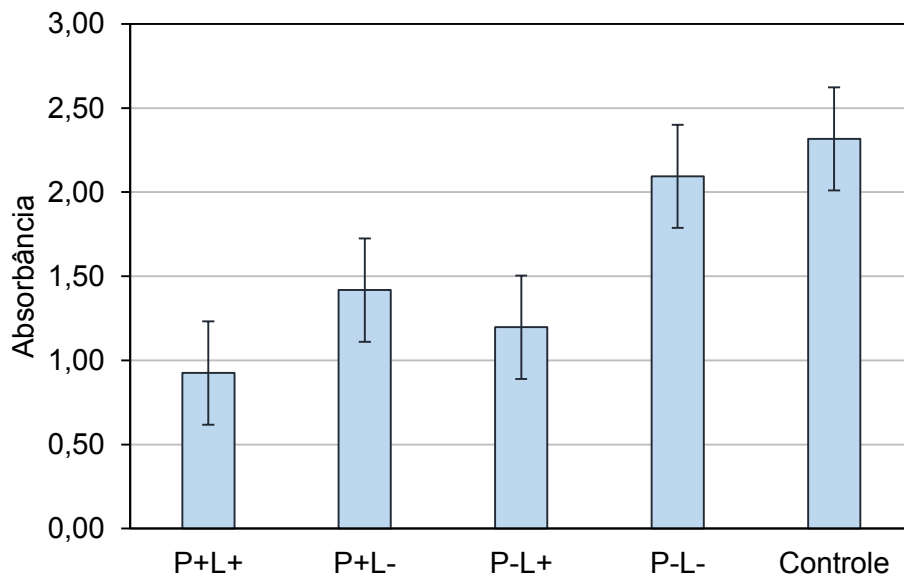


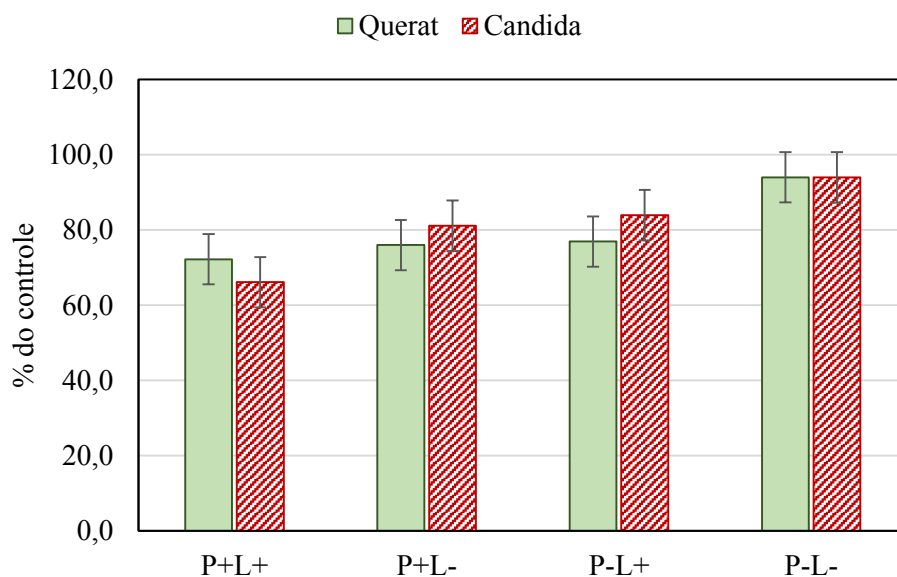
Figura 10 - Médias amostrais de viabilidade celular (*Candida*), em absorbância, e intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras verticais) no teste XTT.



Análise Qualitativa

Após a avaliação estatística dos resultados, comparando-se com o controle (considerado 100% de viabilidade celular), os grupos foram classificados de acordo com o efeito citotóxico em: não citotóxico (inibição menor do que 25% em relação ao grupo controle), discretamente citotóxico (inibição entre 25% e 50% em relação ao grupo controle), moderadamente citotóxico (inibição entre 50% e 75% em relação ao grupo controle) e intensamente citotóxico (inibição maior do que 75% em relação ao grupo controle), seguindo as Normas da ISO 10993-5 de 2009⁶⁰, e estão descritos nas Figuras de 11 a 13.

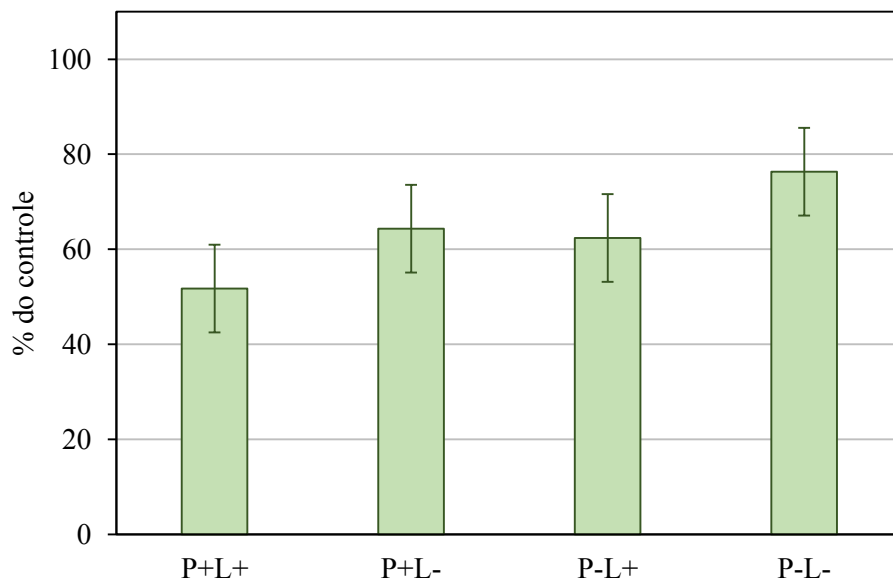
Figura 11 - Médias amostrais de porcentagem de células viáveis (queratinócitos e *Candida*) em relação ao grupo controle para o teste Alamar Blue (as barras verticais indicam os intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais).



Assim, considerando-se cada grupo isoladamente para o ensaio de Alamar Blue, a PDT teve maior efeito citotóxico sobre a viabilidade celular, de forma que no grupo P+L+, para ambas células (Ca e queratinócitos), a viabilidade celular ficou entre 50 e 75% em relação ao controle, tendo sido os grupos classificados como

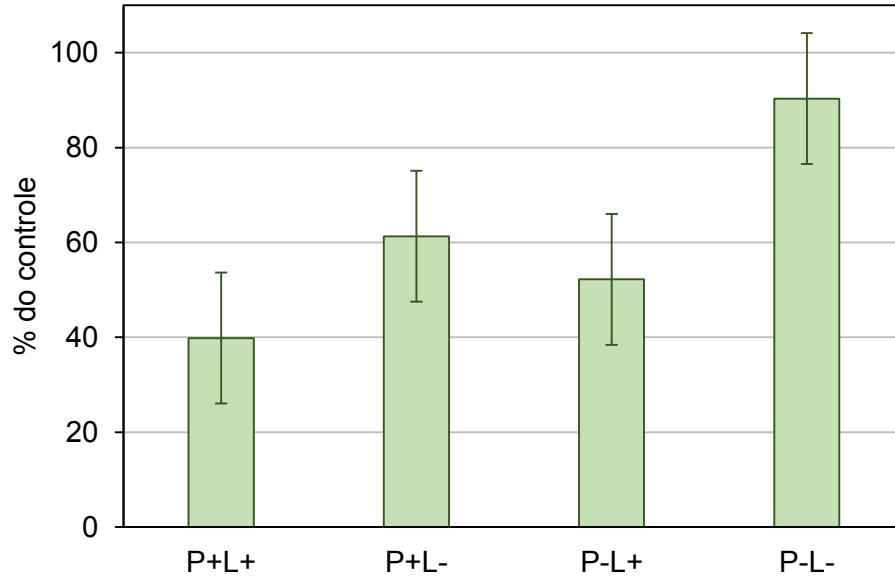
discretamente citotóxicos. Os demais grupos testados, tiveram uma inibição celular menor que 25%, e neste caso os grupos foram classificados como não citotóxicos.

Figura 12 - Porcentagem de células viáveis (queratinócitos) em relação ao grupo controle para o teste MTT (as barras verticais indicam os intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais).



Entretanto, através dos resultados obtidos com o ensaio MTT, todos os grupos, com exceção do P-L- (não citotóxico), foram classificados como discretamente citotóxicos, com uma viabilidade celular dos queratinócitos entre 50 e 75%.

Figura 13 - Porcentagem de células viáveis (*Candida*) em relação ao grupo controle para o teste XTT (as barras verticais indicam os intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais).



Quando avaliados os resultados do teste XTT para a *Ca albicans*, apenas o grupo P-L- foi considerado não citotóxico, enquanto os grupos P+L- e P-L+ apresentaram uma inibição intermediária entre 25 e 50% das células viáveis, classificando-se como discretamente citotóxico. Além disso, o P+L+ foi o grupo que obteve maior toxicidade, tendo sido considerado como moderadamente citotóxico.

DISCUSSÃO

Apesar da parede celular do fungo ser diferente da estrutura celular dos mamíferos, células fúngicas e células humanas são estruturas eucarióticas. Dessa forma, substâncias medicamentosas utilizadas para combater as infecções fúngicas podem ocasionar efeitos indesejáveis sobre células do corpo humano, como as da mucosa oral. Além disso, a interação entre células fúngicas e células humanas pode ocorrer, potencializando ou inibindo o efeito de certas substâncias. Os queratinócitos, por exemplo, podem agir como imunócitos^{47, 56} e segregar uma variedade de citocinas pró-inflamatórias^{50, 56}. Estas citocinas desempenham um papel crítico no desenvolvimento de imunidade protetora contra patógenos intracelulares⁴⁷. Além disso, o contato com os micro-organismos também induz as células epiteliais a produzirem uma variedade de proteínas antimicrobianas incluindo as defensinas⁴⁷. Para isto, o desenvolvimento de novas técnicas de cultura celular tem sido impulsionado pela necessidade de reproduzir um ambiente que lembra o estado *in vivo* tanto quanto possível para permitir o crescimento de células especializadas. Dessa forma, o sistema de co-cultura entre patógenos e células hospedeiras permite o estudo das relações entre os dois organismos, em condições controladas, e pode levar à descoberta de mecanismos de interação, patogenicidade e de resistência em nível celular²⁸.

Existem algumas vantagens de estudar as interações em co-cultura, tais como a capacidade de manipular as células num ambiente definido e adequado para obter e estudar tipos de células específicos, além de permitir uma co-infecção e interação direta entre as células e micro-organismos, bem como os metabólitos produzidos³. Além disso, o modelo de co-cultivo permite uma co-infecção e uma interação entre células e micro-organismos de forma bem controlada, já que outras formas de co-cultivo são realizadas apenas com o sobrenadante filtrado do micro-organismo, em que ocorre somente a interação das proteínas e metabólitos liberados no meio com as células ou tecido⁵⁴. Com a co-cultura, há uma interação direta entre os diferentes tipos celulares, sejam eles queratinócitos, fungos ou bactérias, bem como promove uma interação entre seus metabólitos produzidos com monitoramento adequado, sem causar danos as células.

Existem também outras maneiras de se realizar o co-cultivo. As células, por exemplo, podem ser colocadas em contato direto, em monocamadas, ou ainda separadas por membranas, Villar et al.⁵² (2012) realizaram um estudo com monocamadas de células de forma direta em co-cultura e observaram que nesse modelo a *Candida* induz uma rápida apoptose celular. Por outro lado, o uso de suportes permeáveis com membranas micro porosas permitem que as células realizem atividades metabólicas de uma forma mais natural. Por isso, este sistema de co-cultura tem se tornado um método padrão. Estes suportes permeáveis geram melhorias significativas na cultura de células polarizadas, uma vez que permitem a absorção e secreção de moléculas tanto na superfície basal quanto apical⁵⁸.

Por essa razão, este estudo inovador avaliou a citotoxicidade da terapia fotodinâmica (PDT), através da utilização de queratinócitos humanos em co-cultura com *Candida albicans*. Os resultados deste estudo mostraram ausência de interferência no processo metabólico entre as células em co-cultura, uma vez que não foram observadas diferenças entre os grupos controle (células cultivadas isoladamente) e o grupo P-L- (células em co-cultura sem PDT). Porém, estudos em tecidos reconstituídos infectados por *Ca* são sugeridos para confirmar esses resultados. Além disso, a liberação de citocinas específicas envolvidas neste processo, também deveria ser considerada em estudos futuros.

Os parâmetros utilizados neste estudo, foram previamente estabelecidos baseados em estudos realizados em nosso laboratório²⁰. Assim, para a PDT foram utilizados o tempo de 20 minutos de pré-incubação, iluminação LED com dose de luz de 5,28 J/cm² e um tempo de iluminação equivalente a esta dose de luz, que foi de 4 minutos²⁰. A partir da análise dos resultados observou-se que, para ambas as células, o grupo P+L+ (grupo experimental PDT) apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P-L- (grupo controle não tratado). Nos testes Alamar Blue e MTT, a viabilidade celular ficou entre 50 e 75% em relação ao controle, tendo sido a PDT classificada como discretamente citotóxica. Já no teste XTT, a viabilidade celular da *Ca* ficou entre 25 e 50%, sendo a PDT classificada como moderadamente citotóxica em relação ao controle. Verificou-se também que a maior redução de UFC/mL foi no grupo P+L+, com diminuição de 1,7 log₁₀ com relação ao grupo controle. Reação fototóxica e química induz a produção de espécies reativas de oxigênio que provocam o dano oxidativo nas células-alvo, incluindo as células

microbianas e células humanas ²⁴. Estes resultados estão de acordo com outros estudos. O estudo realizado por Andrade et al.¹ (2013) objetivou avaliar os efeitos da PDT mediada pela curcumina contra células planquitônicas e biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. Os autores observaram que houve inativação completa das células fúngicas em solução e que houve redução da viabilidade celular das células em biofilme. Da mesma forma, Dovigo et al.²⁰ (2012) avaliaram os efeitos da PDT mediada pela curcumina contra células planquitônicas e biofilme de *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *C. glabrata*. Os autores concluíram que a baixas concentrações de curcumina pode ser altamente eficaz para inativação de isolados de *Candida*, quando associado com a luz de excitação para ambas as formas, planctônicas e de biofilme. Diferente do estudo realizado por Demidova e Hamblin¹⁷ (2005), em que a presença da membrana nuclear, maior o tamanho das células fúngicas e o reduzido número de alvos para o oxigênio singlete por unidade de volume da célula, foram descritas como exigência para uma concentração mais elevada de fármaco fotossensível e doses de luz mais elevadas para inativar o fungo.

Neste estudo, a PDT foi tóxica para os queratinócitos, estão em desacordo com alguns estudos realizados previamente. Dovigo et al.¹⁹ (2013) concluíram que a PDT mediada pela curcumina provou ser eficaz para a inativação de *C. albicans in vivo*, sem prejudicar o tecido do hospedeiro dos animais. Da mesma forma, Carmello et al.⁷ (2015), ao realizarem um estudo com o objetivo de verificar o efeito da PDT em modelos de ratos, não constataram efeito adverso dessa terapia nas línguas de ratos. Além disso, os autores concluíram que a PDT foi efetiva na inativação de *C. albicans*. Marinho³⁴ (2006), ao estudar o efeito da PDT sobre células epiteliais e espécies de *Candida* separadamente, observou que a viabilidade média das células epiteliais foi de 70,81%, com inativação de 29,19%, o que parece fornecer uma margem de segurança para aplicação da terapia *in vivo*. Segundo Zeina et al.⁵⁹ (2003), a PDT é um método suficientemente seletivo para inativação de fungos em infecções superficiais, já que as dosimetrias requeridas para inativação desses microrganismos são inferiores às dosimetrias lesivas a células animais. É importante salientar que, embora tenhamos utilizado o modelo de co-cultura, este foi um estudo realizado *in vitro*, no qual não foram simuladas condições encontradas clinicamente. Além disso, o tipo de fotossensibilizador e a fonte de luz são fatores que poderiam explicar as diferenças entre os estudos. Dessa forma, apesar dos resultados terem demonstrado

que a PDT possa representar uma alternativa promissora para o tratamento da candidose, a interpretação dos dados deve ser feita com cautela. Alguns aspectos dessa modalidade terapêutica ainda precisam ser esclarecidos em futuras pesquisas clínicas, como a influência da saliva na efetividade da terapia e a possibilidade de sua aplicação sem a ocorrência de efeitos colaterais aos tecidos sadios adjacentes.

Os resultados deste estudo mostraram também que, para todos os testes, os grupos P+L- e P-L+ diminuíram o número de células viáveis em relação ao grupo controle, apesar de terem sido classificadas como não citotóxicas no teste Alamar Blue. A luz pode ser absorvida pelos componentes da cadeia respiratória, sendo que os efeitos primários ocorrem na mitocôndria³⁰. Um dos processos que pode ocorrer é a aceleração da transferência de elétrons e o outro é a transferência de energia ao oxigênio. Em baixas dosimetrias, o primeiro processo predomina e, em altas, o dano fotodinâmico ocorre³⁰. Esses fatores poderiam explicar a redução da proliferação dos queratinócitos e das células de *Ca albicans* observada neste estudo. Para minimizar o dano induzido aos tecidos sadios adjacentes, a fonte de luz deveria ser aplicada cuidadosamente e o fotossensibilizador, por sua vez, deveria ser aplicado topicamente apenas nas áreas infectadas^{34,57}. Os resultados do presente estudo estão de acordo com outros resultados. Jackson et al.²⁷ (1999) aplicaram luz em leveduras e hifas de *Candida* sp. e, a partir da análise das UFCs, observou-se que a luz, isoladamente, foi efetiva na redução do número de células fúngicas. Da mesma forma, de Souza et al.¹⁶ (2006) verificaram que a aplicação isolada do laser provocou redução das UFCs de *C. tropicalis*, o que sugere susceptibilidade desta espécie à luz laser. Por outro lado, alguns autores verificaram que a aplicação isolada do laser não afeta a viabilidade das células microbianas^{27, 57, 48}. Tais diferenças poderiam ser explicadas em função da fonte e dose de luz aplicadas nos diferentes estudos. Também se observou que a curcumina, na ausência de luz (P+L-), inibiu o crescimento celular de ambas as células quando em co-cultura. A curcumina é um componente natural, de baixo peso molecular, que possui efeito antioxidante e anti-inflamatório. Além disso, tem sido reportado o efeito citotóxico sobre células cancerígenas^{33, 35}. Esses efeitos sobre células inflamatórias e cancerígenas poderiam explicar o efeito citotóxico encontrado no presente estudo. Por outro lado, em estudos anteriores^{7, 19, 38} demonstrou-se que a utilização da luz LED ou PS separadamente, não causou qualquer dano às células

fúngicas. O tipo de fotossensibilizador e a fonte de luz são fatores que poderiam explicar as diferenças entre os estudos.

No presente estudo, os testes MTT (o qual mediu a viabilidade dos queratinócitos) e XTT (o qual mediu a viabilidade celular das células fúngicas) demonstraram resultados mais significativos de morte celular em comparação com o teste Alamar Blue (realizados para ambas as células). Através dos resultados obtidos com o ensaio MTT, todos os grupos, com exceção do P-L-, foram classificados como discretamente citotóxicos, com uma viabilidade celular dos queratinócitos entre 50 e 75%. Quando avaliados os resultados do teste XTT para a Ca, apenas o grupo P-L- foi considerado não citotóxico, enquanto os grupos P+L- e P-L+ apresentaram uma inibição intermediária entre 25 e 50% das células viáveis, classificando-se como discretamente citotóxico. Além disso, o P+L+ foi o grupo que obteve maior toxicidade, tendo sido considerado como moderadamente citotóxico. Já no teste Alamar Blue, considerando-se cada grupo isoladamente, a PDT teve maior efeito citotóxico sobre a viabilidade celular, de forma que no grupo P+L+, para ambas células (Ca e queratinócitos), a viabilidade celular ficou entre 50 e 75% em relação ao controle, tendo sido os grupos classificados como discretamente citotóxicos. Os demais grupos testados, tiveram uma inibição celular menor que 25%, e neste caso os grupos foram classificados como não citotóxicos. Todos os testes utilizados avaliam o metabolismo celular por meio da atividade mitocondrial. A diferença entre os testes é que o Alamar Blue é um teste fluorimétrico, enquanto que os testes MTT e XTT são colorimétricos. De acordo com Nociari et al.⁴¹ para avaliar a citotoxicidade dos variados tipos celulares, o ensaio de Alamar Blue é um procedimento extremamente simples, realizado em somente uma etapa, reprodutível, econômico, e não tóxico. O procedimento único passo permite a medição de grande número de amostras e contribui para a elevada precisão da técnica⁴². Além de permitir a realização do teste para queratinócitos e fungos na mesma amostra. Levando em conta as vantagens descritas, a maior citotoxicidade dos testes MTT e XTT encontrada no presente estudo poderia ser explicada em função da sensibilidade e alta variabilidade desses testes. No que se diz respeito à medida das UFCs, foi possível observar resultados bem semelhantes com o teste Alamar Blue, diferindo dos dados resultantes do teste XTT. O teste XTT é um método colorimétrico que avalia a respiração celular por meio da função mitocondrial e que o método de contagem de UFCs avalia a capacidade de

proliferação das células viáveis, independente do seu estado metabólico, sendo, assim, um método mais sensível. Por todos os aspectos descritos anteriormente, pode-se sugerir que o teste Alamar Blue produziu resultados mais confiáveis do que os demais testes. É também importante ressaltar a necessidade de se utilizar diferentes parâmetros para a análise da citotoxicidade, considerando que as substâncias citotóxicas podem agir de diferentes maneiras sobre o metabolismo celular. Além disso, como os resultados dos testes iniciais de citotoxicidade apresentam limitações quanto à sua correlação direta com situações clínicas, pesquisas clínicas in vivo também são sugeridas.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que:

1. A PDT inibiu o crescimento dos queratinócitos e *Candida albicans* nos diferentes testes realizados, tendo sido considerada um terapia de moderada a discretamente citotóxica;

2. A interação celular em co-cultura não influenciou o metabolismo dos queratinócitos e *Candida albicans*;

REFERÊNCIAS²

1. Andrade MC, Ribeiro AP, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, et al. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(2): 200–10.
2. Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J.* 1979; 147(10): 267-72.
3. Arnold JT, Kaufman DG, Seppälä M, Lessey BA. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod.* 2001; 16(5): 836-45.
4. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist.* 2001; 21(1): 4-8.
5. Berdicevsky I, Ben-Aryeh H, Szargel R, Gutman D. Oral candida of asymptomatic denture wearers. *Int J Oral Surg.* 1980; 9(2): 113-5.
6. Böcking T, Barrow KD, Netting AG, Chilcott TC, Coster HG, Höfer M. Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 2000; 267(6): 1607-18.
7. Carmello JC, Pavarina AC, Oliveira R, Johansson B. Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2015; 15(4): 1-9.
8. Castro AL. *Estomatologia*. 3ed. São Paulo: Santos; 2000.
9. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001; 183 (18): 5385-94.
10. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80 (3): 903-8.
11. Coelho CM, Sousa YT, Dare AM. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(2): 135-9.
12. Colussi VC, Nicola EM, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Rev Assoc Med Bras.* 1996; 42(4): 229-36.

² De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

13. Costa ETR. Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável [dissertação]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1999.
14. Costerton JW, Marrie TJ, Cheng K. Phenomena of bacterial adhesion. In: Savage DC, Fletcher M, ed. Bacterial adhesion. London: Plenum Press; 1985. p. 3-43.
15. Davenport JC. The denture surface. *Br Dent J.* 1972; 133(3): 101-5.
16. de Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AO. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B.* 2006; 83(1): 34-8.
17. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6): 2329-35.
18. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008; 163(1): 1-12.
19. Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Bagnato VS, Pavarina AC. Curcumin-mediated photodynamic therapy inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol.* 2013; 51(3): 243-51.
20. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(9): 927-34.
21. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol.* 2011; 87(4): 895-903.
22. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, Adriano CS, Bagnato VS. Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by photogem(®). *Braz J Microbiol.* 2010; 41(1): 42-9.
23. Glass RT, Bullard JW, Hadley CS, Mix EW, Conrad RS. Partial spectrum of microorganisms found in dentures and possible disease implications. *J Am Osteopath Assoc.* 2001; 101(2): 92-4.
24. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3 (1): 436–50.
25. Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc.* 1992; 123(1): 46-51.
26. International Standard. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices – part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva:ISO; 2009.
27. Jackson Z, Meghji S, MacRobert A, Henderson B, Wilson M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers Med Sci.* 1999; 14(2): 150-7.

28. Jayatilake JA, Samaranayake LP. Experimental superficial candidiasis on tissue models. *Mycoses*. 2010; 53(4): 285-95.
29. Jorge Júnior J, de Almeida OP, Bozzo L, Scully C, Graner E. Oral mucosal health and disease in institutionalized elderly in Brazil. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1991; 19(3): 173-5.
30. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989; 56(5): 691-704.
31. Lambrechts SA, Aalders MC, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(5): 2026-34.
32. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova*. 2000; 23(2): 237-43.
33. Manju S, Sreenivasan K. Synthesis and characterization of a cytotoxic cationic polyvinylpyrrolidone-curcumin conjugate. *J Pharm Sci*. 2011; 100 (2): 504-11.
34. Marinho SA. Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida* sp. e de células epiteliais: estudo in vitro. [tese]. Porto Alegre: Faculdade de Odontologia – PUCRS; 2006.
35. Mehta K, Pantazis P, McQueen T, Aggarwal BB. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. *Anticancer Drugs*. 1997; 8(5): 470-81.
36. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(10): 380-8.
37. Mima EG, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. on dentures: in vitro study. *Photomed Laser Surg*. 2011; 29(12): 827-33.
38. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(3): 392-401.
39. Muzyka BC, Glick M. A review of oral fungal infections and appropriate therapy. *J Am Dent Assoc*. 1995; 126(1): 63-72.
40. Nikawa H, Iwanaga H, Kameda M, Hamada T. In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture-lining materials. *J Prosthet Dent*. 1992; 68(5): 804-8.
41. Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 1998; 213(2): 157-67.

42. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000; 267(17): 5421-6.
43. Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton JW, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* - *Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59(3): 493-503.
44. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science.* 1999; 283(5409): 1837-9.
45. Ribeiro AP, Pavarina AC, Dovigo LN, Brunetti IL, Bagnato VS, Vergani CE, et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(2): 391-8.
46. Ribeiro AP, Pavarina AC, Trindade FZ, Inada NM, Bagnato VS, de Souza Costa CA. Photodynamic therapy associating Photogem and blue LED on L929 and MDPC-23 cell culture. *Cell Biol Int.* 2010; 34(4): 343-51.
47. Rouabhia M. Interactions between host and oral commensal microorganisms are key events in health and disease status. *Can J Infect Dis.* 2002; 13(1):47-51.
48. Rovaldi CR, Pievsky A, Sole NA, Friden PM, Rothstein DM, Spacciapoli P. Photoactive porphyrin derivative with broadspectrum activity against oral pathogens in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(12): 3364-7.
49. Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol.* 2005; 129(5): 569-82.
50. Sonis S, Edwards L, Lucey C. The biological basis for the attenuation of mucositis: the example of interleukin-11. *Leukemia.* 1999; 13 (6): 831-4.
51. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. Novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol.* 2003; 47: 321-6.
52. Villar CC, Chukwuedum Aniemeke J, Zhao XR, Huynh-Ba G. Induction of apoptosis in oral epithelial cells by *Candida albicans*. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27(6): 436-48.
53. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 1991; 51(10): 2515-20.
54. Wagener J, Weindl G, de Groot PW, de Boer AD, Kaesler S, Thavaraj S, et al. Glycosylation of *Candida albicans* cell wall proteins is critical for induction of innate immune responses and apoptosis of epithelial cells. *PLoS One.* 2012; 7(11): 50-8.
55. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 382-402.

56. Wilmer JL, Burleson FG, Kayama F, Kanno J, Luster MI. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. *J Invest Dermatol.* 1994; 102(6): 915-22.
57. Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med.* 1993; 22 (8): 354-7.
58. Yin X, Tian W, Wang L, Wang J, Zhang S, Cao J, Yang H. Radiation quality-dependence of bystander effect in unirradiated fibroblasts is associated with TGF- β 1-Smad2 pathway and miR-21 in irradiated keratinocytes. *Sci Rep.* 2015; 16(5):11373-9.
59. Zeina B, Greenman J, Corry D, Purcell WM. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol.* 2002; 146(4): 568-73.
60. Zottola EA. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry? *Food Technology.* 1994; 48(7): 107-14.

4- CAPÍTULO 2

BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOPARTÍCULAS UTILIZADAS NA PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME³

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade de nanopartículas de tungstato de prata (Ag_2WO_4) e de molibdato de prata (Ag_2MoO_4), em solução e como revestimento de biomateriais, a fim de torná-las viáveis para o uso clínico na prevenção de biofilmes. A nanopartícula de Ag_2WO_4 foi sintetizada através de método hidrotérmico e caracterizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura e Difração de Raios X. A nanopartícula de Ag_2MoO_4 foi sintetizada através do método da co-precipitação, e foi caracterizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura e Difração de Raios X. A partir da confecção das nanopartículas, foram feitas as soluções e o revestimento de titânio (Ti), zircônia (Zi), resina acrílica (RA) e silicone (Si). Para a realização do teste de citotoxicidade, 100 μL da suspensão composta por $1,5 \times 10^4$ células/ml (HaCat) foram colocados em cada compartimento de uma placa com 96 orifícios, incubada em estufa com 5% de CO_2 , a 37°C por 24 horas. Após tal período de incubação, o meio de cultura foi desprezado, permanecendo as células aderidas no fundo da placa. 100 μL de meio de cultura contendo as nanopartículas em solução ou os extratos foram colocados em cada orifício da placa. A placa foi incubada por mais 24 horas. A proliferação celular foi avaliada por meio dos testes Alamar Blue, MTT e CytoTox-One. Por imagens de MEV-FEG foi possível observar que as amostras sintetizadas de Ag_2WO_4 apresentam morfologia de bastões com face hexagonal, com comprimento médio de aproximadamente 1,5 μm . A amostra apresentou rápido crescimento de prata metálica quando bombardeada por elétrons no microscópio. A maior parte da amostra de Ag_2MoO_4 apresentou morfologia cúbica e hexagonal, porém foram observadas algumas partículas com morfologia irregular. Apresentaram, também, partículas de prata metálica em sua superfície. Ambas

³ De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

nanopartículas em solução foram intensamente citotóxicas para o teste Alamar Blue, apresentando uma inibição maior que 75% das células. Entretanto, não houve diferença na citotoxicidade das nanopartículas como revestimento para a maioria dos biomateriais. Dentre os biomateriais testados, o silicone foi mais tóxico do que os outros demais materiais quando não revestidos. Portanto, pode-se concluir que as nanopartículas de Ag_2WO_4 e Ag_2MoO_4 , em solução, foram tóxicas em diferentes concentrações, sendo inviável o uso diretamente sobre as células. Os biomateriais revestidos com nanopartículas foram menos citotóxicas.

Palavras Chave: Citotoxicidade. Nanopartículas. Biofilme.

INTRODUÇÃO

Diversos são os tratamentos propostos para as infecções microbianas. O tratamento mais comumente recomendado tem sido a utilização de medicamentos antimicrobianos, os quais podem ser de aplicação tópica ou sistêmica. Porém, o uso de drogas é limitado por inúmeros fatores, como resistência dos micro-organismos, baixa solubilidade e alta toxicidade. Um dos mecanismos específicos de resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos é a formação do biofilme. O biofilme é uma comunidade de micro-organismos incorporada em uma matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares⁴². A formação de biofilme pode resultar na tolerância dos micro-organismos a altas concentrações de vários antibióticos, o que resulta em infecções crônicas apesar do tratamento⁵². Sendo assim, a prevenção da formação de biofilme é considerada a medida mais eficaz a ser assumida contra os problemas relacionados às infecções.

Uma das estratégias mais promissoras para superar a resistência microbiana é a utilização de nanopartículas⁵². Recentemente, têm sido desenvolvidos métodos para encapsular o agente antimicrobiano em nanopartículas de polímeros biodegradáveis que podem, então, ser utilizados em ambientes fisiológicos. Além disso, uma vez que a nanopartícula é colocada sobre uma superfície para um tratamento, o agente antimicrobiano pode ser liberado mais lentamente, por difusão através da matriz polimérica, por degradação da matriz polimérica, ou por uma combinação de difusão e degradação¹⁴.

Dentro desse contexto, por meio da nanotecnologia, estudos recentes têm avaliado a atividade antimicrobiana de várias nanopartículas^{2,4-5, 9, 18-19, 24, 35, 60, 62}. Assim sendo, uso de nano ou micropartículas como transportadores de drogas ou proteínas recentemente ganhou atenção substancial, uma vez que elas são projetadas para melhorar os efeitos farmacológicos e terapêuticos, reduzindo os efeitos secundários tóxicos e aumentando a vida útil dos componentes ativos. Nano ou micropartículas permitem a liberação contínua e controlada de drogas terapêuticas, diminuindo, assim, as doses dos medicamentos sistêmicos. A liberação dos fármacos pelas nanopartículas pode ser desencadeada por estímulos físicos ou químicos, tais como pH, força iônica, temperatura, campo magnético ou moléculas biológicas.

Além disso, alterações na superfície dos biomateriais para melhorar a biocompatibilidade e reduzir a atividade dos micro-organismos são altamente desejáveis. O revestimento com nanopartículas tem sido utilizado em uma série de produtos médicos, porque pode conferir aos materiais propriedades desejáveis, tais como afinidade biológica e bioatividade^{3, 46-47, 70}. Aplicações desta tecnologia incluem a purificação de água, limpeza do ar, superfícies auto-esterilizantes e auto-limpantes, tais como os utilizados em biossensores, cateteres, marcapassos e órgãos artificiais (como próteses maxilofaciais e ortopédicas)^{18, 20, 24, 34}. Em aparelhos dentários e médicos, diferentes biomateriais, como silicone, polimetilmetacrilato, cerâmicas e ligas de titânio, poderiam ser revestidos, objetivando melhorar as suas propriedades biológicas, especialmente de adesão e proliferação de microorganismos^{8, 13, 27-30, 33, 45, 53, 71}. Por exemplo, o uso de biomateriais implantáveis tem se tornado uma parte integrante da cirurgia estética e reconstrutiva da face. Atualmente, o silicone tem sido o material de escolha para a confecção das próteses faciais por apresentarem propriedades superiores como textura similar à da pele, maciez e facilidade de trabalho³⁹. Os metais são usados para dispositivos de fixação da fratura, enquanto que os polímeros são usados principalmente para substituição óssea ou de tecidos moles.

Uma camada de TiO_2 sobre um substrato de polimetilmetacrilato pode permitir o desenvolvimento de um novo tipo de prótese, que é mais higiênica e mais fácil de limpar³¹. Do mesmo modo, foi observado sucesso na utilização de tubos e cateteres de silicone medicinal revestidos com TiO_2 ^{50, 69}. Recobrimentos de hidroxiapatita têm sido usados amplamente para reparação de ossos⁷³. Já as cerâmicas não possuem atividade antibacteriana e, assim, micro-organismos facilmente proliferam em sua superfície, especialmente em ambiente úmido. A existência e reprodução de micro-organismos na superfície das cerâmicas podem prejudicar a saúde das pessoas. Portanto, a preparação do filme antibacteriano sobre a superfície de cerâmicas, bem como a investigação de sua atividade antibacteriana tem significado prático⁶⁰. Neste aspecto, Sun et al.⁶⁰ observaram em seu estudo que a superfície de cerâmicas revestidas com nanopartículas de Ag-TiO_2 tiveram alta atividade antimicrobiana. Também³⁷, foi estudado o revestimento de fibras de seda, com nanopartículas de prata, que além de um efeito antimicrobiano, conferiram ao material melhores propriedades mecânicas e controlaram sua degradação. Neste aspecto, há necessidade de se avaliar a biocompatibilidade de diferentes biomateriais

revestidos com nanopartículas com o objetivo de aprimorar e inovar as técnicas de controle e/ou eliminação do biofilme microbiano.

REVISÃO DE LITERATURA

As superfícies com propriedades antimicrobianas são altamente desejadas em aplicações que requerem uma barreira protetora contra a infecção. Neste contexto, as nanopartículas representam uma das estratégias mais promissoras para superar a resistência microbiana, uma vez que utilizam diferentes mecanismos para inibir o crescimento de micro-organismos^{52, 54, 65}.

Um exemplo de nanopartículas muito utilizada é a de TiO_2 . Em um processo conhecido como fotocatalise, TiO_2 é ativado em potentes espécies oxidativas quando expostas à luz UV, obtendo características antivirais, antibacterianas bem como ações fungicida¹⁹. É conhecido que, sob iluminação de luz UV, o TiO_2 possui poder oxidante, com a ação combinada de radicais hidroxila (OH) produzidos pela oxidação de radicais de água e de superóxido (O_2), produzido por redução de oxigênio⁴⁹⁻⁵⁰. Supõe-se que as espécies extremamente reativas, tais como íons superóxido e radicais hidroxila, gerados na luz UV irradiada da superfície de TiO_2 , ataque os fosfolipídios poli-insaturados na membrana celular das bactérias, ocasionando sua morte. Assim, tais revestimentos também têm atraído grande interesse em termos do potencial de aplicação prática oferecidas por suas propriedades antimicrobiana e anti-incrustantes, como TiO_2 que induz a oxidação por excitação causada por radiação UV. No entanto, ainda existem problemas básicos a serem resolvidos para melhorar a atividade fotocatalítica do TiO_2 , uma vez que essa nanopartícula é apenas ativada por luz UV⁶⁸. Assim, este fato praticamente limita o uso da luz solar ou à luz visível como uma fonte de irradiação em reações de fotocatalise em TiO_2 . Muitos estudos estão sendo desenvolvidos para melhorar a atividade fotocatalítica das nanopartículas de TiO_2 por meio da deposição de metais nobres. Os metais depositados na superfície do TiO_2 podem facilitar a captura de elétrons, aumentando a capacidade de absorção de luz visível das partículas de TiO_2 ⁶⁸. As nanopartículas de TiO_2 associadas a metais nobres ativada pela luz visível podem significar a redução permanente do número de micro-organismos patogênicos em superfícies que normalmente podem ser contaminadas por eles. A redução das bactérias pelo processo induzido por luz ambiente seria útil em hospitais, laboratórios de microbiologia, locais de processamento de alimentos,

indústria farmacêutica e onde há uma forte exigência de superfícies limpas e esterilizadas.

Nanopartículas de metais nobres, como Ag e Au são conhecidos por apresentar efeito catalítico sobre superfícies específicas. Uma vez que as partículas de prata podem atuar como armadilhas para captura de elétrons, um aumento considerável na atividade fotocatalítica do TiO_2 tem sido observado com a deposição de prata em titânia (AgTiO_2)⁹. Neste aspecto, tem sido verificado que o AgTiO_2 mostrou um aumento de 30% na degradação fotocatalítica sob irradiação de luz visível, em comparação com o TiO_2 puro⁶¹. Além de sua aplicação promissora na detecção química e biológica, Ag é um dos metais com maior potencial antibacteriano, potencializando a ação das nanopartículas de TiO_2 ⁷⁴.

Assim, a atividade antibacteriana das nanopartículas de AgTiO_2 está diretamente relacionada à nanopartículas de Ag. Para explicar o mecanismo da ação antimicrobiana da Ag, existem duas teorias diferentes. Uma teoria defende que a prata pode reagir com a água e liberar íons, os quais combinam com íons sulfidrídicos na parede celular de bactérias, resultando em bloqueio do processo respiratório. A segunda teoria sugere que a prata pode reagir com o oxigênio dissolvido na água e gerar radicais livres do oxigênio ativo, que são tóxicos para as bactérias⁷.

Outras nanopartículas estudadas também demonstraram efeito antimicrobiano. Longo et al.³⁵ (2014) verificaram que as nanopartículas de Ag_2WO_4 , em solução, foram capazes de inativar MRSA e que este efeito foi dose-dependente. No mesmo ano, Wady et al.⁶⁵ desenvolveram uma solução AgNPs. Esta solução foi testada contra *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Staphylococcus aureus*, e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Pôde-se observar que a solução de AgNPs exibiu atividade antimicrobiana considerável contra importantes fungos e bactérias patogênicas, associados a várias doenças bucais e sistêmicas, e tem potencial como agente antimicrobiano. Já em 2013, Zamperini et al.⁷² testaram o efeito antimicrobiano da hidroxiapatita pura (HA) e da hidroxiapatita sobreposta com nanopartículas de prata (HA@Ag). A atividade antifúngica foi testada sobre células de *Candida albicans*. Os resultados obtidos mostraram que a HA@Ag teve efeitos fungistático e fungicida contra células planctônicas de *C. albicans*. Além disso, a solução de AH@Ag em concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, and 250 $\mu\text{g/mL}$ mL

também exibiu atividade antibiofilme, afetando principalmente a produção de matriz extracelular.

Porém, a utilização das nanopartículas deve ser vista com cautela, uma vez que os mesmos mecanismos de morte de micro-organismos podem ocasionar a morte de células do corpo humano, limitando suas indicações. Estudos indicam que a esclerose sistêmica, artrite reumatóide, lúpus eritematoso e doença renal crônica podem ser causados pela exposição à nanopartículas¹⁵⁻⁵⁸. Dessa forma, estudos que avaliam a biocompatibilidades de diferentes nanopartículas são necessários¹⁰.

Han et al.²² (2014) observaram que nanopartículas de prata a 25 µg/ml diminuíram a viabilidade celular em 50 % em relação ao controle. Estes resultados podem ser explicados, em parte, em função da liberação de íons prata. Nanopartículas de prata têm atividade antibacteriana promissora por combater a adesão bacteriana e a formação de biofilme, mas o pequeno tamanho e elevada mobilidade requer preocupações de segurança, devido ao aumento do potencial citotóxico⁵⁵. Em estudo recente desenvolvido por Longo et al.³⁶ (2013), foi constatado o crescimento de prata metálica na superfície dos cristais de tungstato. Os fios de prata nascem como resultado de uma reação de eletrossíntese, na qual os elétrons gerados pelos microscópios interagem com os íons de prata do tungstato para fazer a redução da prata metálica. Segundo os autores, este processo pode ser aplicado para o controle de outras propriedades, como a atividade microbiana e fotodegradação. *“Com a irradiação a propriedade bactericida aumenta sua eficiência três vezes em comparação ao método atual de deposição.”*

Pesquisas têm mostrado que as nanopartículas de prata podem agir na membrana celular, causando alterações na estrutura e, conseqüentemente, morte celular^{44, 59}. Além disso, as nanopartículas podem causar danos ao DNA e aumentar as espécies reativas de oxigênio, levando à morte celular^{38, 1}. Outro fato conhecido que pode levar à morte celular é que nanopartículas de prata com tamanho de 20 nm ou menos pode entrar na célula sem endocitose, sendo distribuídas no interior do citoplasma^{17, 21}. Como tendência geral, tem sido assumido que as nanopartículas de prata podem se unir à superfície da membrana celular, o que provoca a desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, a morte celular¹¹. Por outro lado, Panacek et al.⁵¹ (2006) propuseram que essas nanopartículas podem penetrar no interior das

bactérias e causar dano celular por interação com compostos de enxofre e de fósforo, tais como proteínas e DNA.

Outros exemplos de nanopartículas eficazes contra micro-organismos são aquelas que contêm molibdato e o tungstato em sua composição. O molibdato e o tungstato são oxianions de molibdênio e de tungstênio, respectivamente, os quais são elementos químicos metálicos¹². De acordo com Dunnick et al.¹⁶ (2014), óxidos metálicos são conhecidos pelas suas propriedades semi-condutoras, o que permite a transferência de elétrons entre o nanomaterial e ambientes aquosos. Esta transferência de elétrons pode também desempenhar um papel na toxicidade das nanopartículas. Em relação ao tungstato de prata, Dunnick et al.¹⁶ (2014) verificaram que, na concentração de 50 µg/ml, o tungstato de prata causou dano celular. Os resultados mostraram que a forma e tamanho pode desempenhar um papel importante na determinação de reatividade e citotoxicidade dessas nanopartículas. Os resultados também indicaram que as características químicas e variabilidade dessas nanopartículas pouco influenciaram na toxicidade celular. Em relação ao Molibdato de Prata, nenhum estudo que avaliasse a sua citotoxicidade foi encontrado na literatura.

Os achados na literatura nos alerta para o uso das nanopartículas, as quais podem causar riscos para a saúde humana em função do seu tamanho reduzido⁴¹, o que permite atravessar as barreiras celulares naturais, contribuindo para seu efeito citotóxico. Investigações são necessárias para compreender os complexos mecanismos de toxicidade das nanopartículas para as células^{43, 67}.

PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a biocompatibilidade de biomateriais revestidos com nanopartículas de α -Ag₂WO₄ e α -Ag₂MoO₄, afim de torná-los viáveis para o uso clínico na prevenção de biofilmes.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar a citotoxicidade de nanopartículas de α -Ag₂WO₄ e α -Ag₂MoO₄ em solução;
2. Avaliar a citotoxicidade do titânio revestido com nanopartículas de α -Ag₂WO₄ e α -Ag₂MoO₄;
3. Avaliar a citotoxicidade da zircônia revestida com nanopartículas de α -Ag₂WO₄ e α -Ag₂MoO₄;
4. Avaliar a citotoxicidade de uma resina acrílica revestida com nanopartículas de α -Ag₂WO₄ e α -Ag₂MoO₄;
5. Avaliar a citotoxicidade de um silicone de adição revestido com nanopartículas de α -Ag₂WO₄ e α -Ag₂MoO₄;

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAIS

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

Materiais de Consumo

1. Água deionizada.
2. Água destilada.
3. Alamar Blue®, Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Waltham, Massachusetts, USA.
4. Álcool absoluto, Prolink, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
5. Álcool Isopropílico PA, Qhemis, Cotia, São Paulo, Brasil.
6. Catalizador Universal Indurent Gel, Zhermack, Badia Polesine, RO, Itália.
7. Células HaCaT (0341) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
8. Cloreto de Potássio (P.A.-A.C.S.), Synth, Diadema, São Paulo, Brasil.
9. Cloreto de Sódio (P.A.-A.C.S.), produzido pela Qhemis, Cotia, São Paulo, Brasil.
10. CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay, Promega, Madison, WI, USA.
11. Dimethyl Sulfóxido (DMSO), pureza $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.
12. Dodecil sulfato de sódio (SDS) ($C_{12}H_{25}SO_4Na$) 99% de pureza, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.
13. Folha de alumínio, Wyda Pratic, Sorocaba, São Paulo, Brasil.
14. Fosfato de Potássio Mono. P.A.-A.C.S., Synth, Diadema, São Paulo, Brasil.
15. Fosfato de Sódio Bi básico Anidro, Synth, Diadema, São Paulo, Brasil.
16. Garrafa para cultura de células 75 mL, TPP®, Trasadingen, Suíça.

17. Gesso pedra tipo III Herodent, Vigodent SA Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
18. Isolante Cel-Lac, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
19. Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – high glucose, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
20. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99,5% de pureza, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
21. Nitrato de prata (AgNO_3) 99,8% de pureza, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
22. Parafilm (Laboratory film 38m X 10cm), BOECO, Hamburgo, Alemanha.
23. Pipeta sorológica estéril 10mL embalada individualmente, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil.
24. Pipeta sorológica estéril 25mL embalada individualmente, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil.
25. Pipeta sorológica estéril 5mL embalada individualmente, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil.
26. Placa de 96 orifícios com fundo plano estéril, embalada individualmente, TPP, Trasadingen, Suíça.
27. Placa preta de 96 orifícios com fundo plano estéril, embalada individualmente, Thermo Scientific, Roskilde, DN, Dinamarca.
28. Placas para cultura de células 430167, Corning Incorporated, New York, NY, USA.
29. Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 μL , Axygen Scientific, Union City, CA, EUA.
30. Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 μL , Axygen Scientific, Union City, CA, EUA.
31. Resina acrílica polimerizada por micro-ondas Vipi Wave, VIPI Indústria e Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil.
32. Sal de MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Brometo], Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
33. Silicone de Adição Express XT, 3M Espe, Saint Paul, MN, Estados Unidos.
34. Silicone de condensação Laboratorial Zetalabor, Zhermack, Badia Polesine, RO, Itália.

35. Solução antibiótico antimicótico com Penicilina G, Estreptomicina e anfotericina, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
36. Solução de Azul de Tripán 0,4%, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
37. Soro fetal bovino estéril para cultura de células, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
38. Super Bonder, Loctite, Henkel Ltda., Itapevi, SP, Brasil.
39. Tripsina 0,5% e EDTA 0,2%, GIBCO Products International, Inc., Langley, OK, USA.
40. Tubo tipo eppendorf 1,5 mL, Axygen Scientific, Union City, CA, EUA.
41. Tubo tipo Falcon de 15 mL, fundo cônico, estéril cônico TPP, Trasadingen, Suíça.
42. Tubo tipo Falcon de 50 mL, fundo cônico, estéril cônico TPP, Trasadingen, Suíça.
43. Tubos criogênicos 2mL, Corning Incorporated, New York, NY, USA.
44. Tubos tipo Falcon de 50 mL, fundo cônico estéril, TPP®, Trasadingen, Suíça.
45. Tungstato de sódio di-hidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 99,5% de pureza, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.
46. Vaselina Sólida, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
47. Vidro, Vidroplan ACP Comércio de Vidros Ltda. Araraquara, SP, Brasil.

Instrumentais

1. Béquer graduado, Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil.
2. Bico de Bunsen, J.Prolab Industria e Comercio de Produtos para Laboratório Ltda., São Jose dos Pinhais, Paraná, Brasil.
3. Câmara de contagem Neubauer espelhada Modelo: K5-0111, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil.
4. Esculpidor Lecron, Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
5. Espátula nº 36, Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
6. Garrafa de vidro graduada com tampa 1000 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.
7. Garrafa de vidro graduada com tampa 250 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.
8. Garrafa de vidro graduada com tampa 500 mL, Boeco, Hamburgo, Alemanha.

9. Grau e espátula para gesso.
10. Matriz metálica em forma de disco com 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.
11. Micropipeta de 100-1000 μL , Boeco, Hamburgo, Alemanha.
12. Micropipeta de 20-200 μL , Boeco, Hamburgo, Alemanha.
13. Micropipeta Multicanal HTL Discovery Comfort, 12 Canais, 20-200 μL , HTL, Warsaw, Polônia.
14. Mufla para micro-ondas STG, VIPI Indústria e Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil.
15. Pinça clínica, Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
16. Pipetador automático eppendorf Modelo: Easypet 3, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha.
17. Placa de vidro grossa polida, Jon, São Paulo, SP, Brasil.
18. Ponta de Tungstênio Maxicut 1508, Edenta, Switzerland, Suíça.
19. Pote Paladon, Jon, São Paulo, SP, Brasil.
20. Tesoura Cirúrgica 11,5cm reta, Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil.
21. Tubos de ensaio, Boeco, Hamburgo, Alemanha.

Equipamentos

1. Agitador Magnético com aquecimento Modelo 78HW-1, Biomixer, São Paulo, SP, Brasil.
2. Agitador tipo vórtex Modelo: VM-3000, Vixar, Plymouth, MN, USA.
3. Aparelho de ultra som, Ultrasonic Cleaner Modelo 1440D, Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
4. Autoclave horizontal de bancada Modelo AB 25. Série: 03026, Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil.
5. Balança de precisão Modelo: BG 400. N° 016450, GEHAKA – Ind. e Com. Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil.
6. Banho maria Modelo 1102, Fanem, Guarulhos, SP, Brasil.
7. Cabina de segurança biológica (capela de fluxo laminar), Veco, Campinas, SP, Brasil.

8. Centrífuga de bancada Modelo 80-2B. Série: 5522, Centribio, São Paulo, SP, Brazil.
9. Difractômetro D/Max-2500PC, Rigaku, Japão.
10. Espectroscópio micro- Raman Modelo LabRAM RH 800 mm, Horiba, Jobin-Yvon, França.
11. Estufa de CO₂ Modelo 3100, Thermo Fisher Scientific, Marietta, Ohio, USA.
12. Estufa de Cultura Modelo 002 CB, Fanem Ltda, São Paulo, SP, Brasil.
13. Fluoroscân Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, Marietta, Ohio, USA.
14. Leitor de Microplacas Modelo EZ Read 400, Biochrom, Cambridge, UK.
15. MEV-FEG Modelo F50, FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA.
16. Micro aspirador a vácuo Modelo 5005, Nevoni, São Paulo, SP, Brasil.
17. Micro-ondas Brastemp Crisp 27, Brastemp, Manaus, AM, Brasil.
18. Microscópio Invertido Modelo 403. Série: 1207159, Optiphase, Van Nuys, CA, USA.
19. PHmetro de bancada Modelo Q400AS. Série: 14024666. Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil.
20. Prensa hidráulica PM 2000, Vipi Delta, Pirassununga, São Paulo, SP, Brasil.

METODOLOGIA

Síntese das Nanopartículas

Síntese de α -Ag₂WO₄ – Método Hidrotérmico assistido por micro-ondas

Para a síntese deste material, o procedimento de síntese típico de cristal α -Ag₂WO₄ foi seguido: 1×10^{-3} mol tungstato de sódio di-hidratado (Na₂WO₄•2H₂O, 99,5% de pureza, Sigma-Aldrich) e 2×10^{-3} mol de nitrato de prata (AgNO₃, 99,8% de pureza, Sigma -Aldrich) foram dissolvidos separadamente em tubos de ensaio contendo 50 mL de água deionizada. Antes da adição dos sais, 0,5 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) (C₁₂H₂₅SO₄Na, 99% de pureza, Sigma-Aldrich) foi dissolvido em ambos os tubos. A suspensão combinada de 100 mL foi transferida para uma autoclave de etileno propileno fluorado (PTFE), sem agitação. A autoclave foi então selada e colocada num dispositivo assistido por micro-ondas durante a síntese

hidrotérmica. As amostras $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foram preparadas a uma temperatura de 70°C durante 1 h. Os cristais $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ obtidos se apresentaram na forma de um pó fino com coloração bege claro. Então os precipitados foram recolhidos e lavados várias vezes com acetona e secos à temperatura ambiente durante 6 h.

Síntese de $\alpha\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ – Método de Co-precipitação

O $\alpha\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ foi preparado por co-precipitação a partir de sais de sódio em soluções aquosas de pH 4 (ácido nítrico e água destilada). Para isto, 1 mmol de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99,5% de pureza, Sigma Aldrich) foi dissolvido em 50 ml de solução de pH 4 (solução A). Separadamente, 2 mmol de AgNO_3 (99,8% de pureza, Sigma Aldrich) foram dissolvidos em mais 50 ml de solução aquosa a pH 4 (solução B). Estas duas soluções foram aquecidas a 70°C ; então, a solução B foi adicionada à solução A com agitação magnética vigorosa, o que tornou a solução cinza escuro. A mistura foi mantida a 70°C durante 10 min com agitação. Em seguida, o precipitado foi separado por centrifugação, lavado várias vezes com água deionizada e etanol, e secos a 70°C durante 24 horas.

Caracterização das Nanopartículas

As amostras foram caracterizadas por difração de raio-X (DRX), utilizando um difractômetro D/Max-2500PC (Rigaku, Japão) com radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) na gama 2θ de 10° a 70° na rotina normal, com uma velocidade de varrimento de $2^\circ/\text{min}$ e de 10° a 110° com uma velocidade de varrimento de $1^\circ/\text{min}$ na rotina de Rietveld, ambos com um passo de $0,02^\circ$. Medições de espectroscopia micro-Raman (RM) foram registadas utilizando um modelo LabRAM RH 800 mm (Horiba, Jobin-Yvon, França). Espectros Raman de alta resolução foram registados com um laser He-Ne a $632,81 \text{ nm}$ (modelo DU420AOE325 CCD) que operam em $25\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ e mantendo a sua potência de saída máxima a 6 mW . Uma lente com $50\text{-}\mu\text{m}$ foi usada para evitar o sobreaquecimento da amostra. Espectros FTIR foram registados $250\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ utilizando pastilhas de KBr e um espectrofotômetro Bomem-Michelson em modo de transmissão (modelo MB-102). Foram registados espectros de UV-vis utilizando um espectrofotômetro Varian (modelo Cary 5G) no modo de reflectância

difusa. As formas e os tamanhos dos microcristais α -Ag₂WO₄ foram observadas com MEV-FEG (Modelo Inspeccionar F50, FEI Company, Hillsboro, OR) operando a 10 kV. Análises de MEV foram realizadas com um microscópio Philips CM200-funcionando a 200 kV.

Confecção dos corpos de prova

Titânio

As amostras de titânio comercialmente puro, na forma de disco com 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, foram doados pela empresa "Conexão Sistemas de Prótese".

Zircônia

As amostras de zircônia, na forma de disco com 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, foram confeccionadas por meio do sistema de software Ceramil Motion (AmannGirrbach;<http://www.amanngirrbach.com/us/company/about-amanngirrbach/>). Esse sistema permitiu a fresagem das amostras em zircônia nas dimensões necessárias para a pesquisa. Por meio dessa programação, os dados foram enviados para o equipamento de fresagem, que realizou a confecção dos corpos de prova em forma de discos.

Resina Acrílica

Para a confecção dos corpos de prova foi utilizada a resina para base de próteses Vipi Wave, cor-de-rosa, polimerizada por micro-ondas e matrizes metálicas vazadas, com 10 orifícios em forma de disco, cada um com 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.

Para o posicionamento e inclusão da matriz em mufla específica para micro-ondas, a mufla foi isolada com Cel-lac e preenchida com gesso pedra tipo III, sobre o qual, foi imediatamente, posicionada uma placa de vidro. Após a presa do gesso, a matriz metálica contendo 10 orifícios foi fixada no vidro com Super Bonder, e ao redor desta matriz foi colocado silicone de condensação, proporcionado e manipulado de acordo com as instruções do fabricante, os excessos foram removidos

com estilete. Sobre esta matriz foi fixada outra placa de vidro. Posteriormente, a contra- mufla foi posicionada e preenchida com gesso pedra, finalizando a inclusão. Então a mufla foi levada à prensa hidráulica e submetida à pressão de 0,5 toneladas até a presa total do gesso.

Após a presa, a mufla foi aberta e a matriz isolada com vaselina, então a resina foi proporcionada e manipulada de acordo com as instruções do fabricante (14 g de pó e 6,5 mL de líquido). Após o período de incorporação e homogeneização, a resina foi inserida nos orifícios da matriz na fase plástica. Em seguida, a mufla foi posicionada sobre a prensa hidráulica e submetida à pressão de 0,5 toneladas por 30 minutos. Logo após, foi iniciado o processo de polimerização em micro-ondas de acordo com as instruções do fabricante que consistiu de 20 minutos na potência baixa (nível 2), adicionados de 5 minutos na potência alta (nível 9) do aparelho. Após a polimerização, cada mufla foi deixada sobre a bancada para resfriamento por 30 minutos e, em seguida, colocou-se em água corrente por 15 minutos. Então, suas partes foram separadas e as amostras desincluídas, sendo os excessos laterais removidos com o auxílio de uma ponta Maxicut (n°1508) em baixa rotação. Os corpos de prova foram, então, deixados em água destilada, em estufa a 37° C, por 48 horas, para a liberação de monômero residual.

Silicone de Adição

Os corpos de prova foram confeccionados com silicone de adição Express XT, a partir de matrizes metálicas vazadas, em forma de discos, contendo no seu interior orifícios medindo 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. O material foi proporcionado e manipulado de acordo com instruções do fabricante. Após a manipulação, os materiais foram inseridos nas matrizes e prensados manualmente entre duas placas de vidro esterilizadas com duas folhas de acetato, também esterilizadas, interpostas até o término da polimerização (Figura 1). Finalmente, o excesso de material de cada amostra foi recortado com tesoura esterilizada.

Figura 1 - Silicone de adição inserido na matriz metálica, após a prensagem e polimerização.



Preparo das soluções das nanopartículas de α -Ag₂WO₄ e α -Ag₂MoO₄

Além da avaliação da biocompatibilidade das amostras dos biomateriais após revestimento com nanopartículas, a citotoxicidade das mesmas em solução também foi analisada. O preparo dessas soluções foi realizado de forma que cada pó sintetizado, após esterilização, foi disperso em água destilada estéril em um tubo Falcon, com a concentração final de 1 mg / mL. Para a realização do experimento de biocompatibilidade, uma diluição seriada com o meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino foi feita, até atingir as concentrações de 0,25mg/ml e 0,125mg/ml para ambas as nanopartículas. Estas concentrações foram selecionadas pois foram as mínimas concentrações inibitórias (MIC) determinadas após testes microbiológicos prévios.

Revestimento das amostras

Para a realização dos revestimentos ("coatings") nos discos de titânio e zircônia, foi utilizada a técnica de precipitação, na qual soluções das nanopartículas de tungstato de prata e de molibdato de prata na concentração de 1 mg/ mL em álcool isopropílico foram submetidas ao ultrassom por 20 minutos. Em seguida, 5 μ L da suspensão foram gotejados sobre a superfície dos discos. Após secagem, o gotejamento foi repetido por 5 vezes. Após deposição das 5 camadas, as amostras

foram tratadas termicamente a 250° C por 2 horas (Figura 2) Da mesma forma, foi realizado o revestimento sobre os corpos de prova de resina acrílica e silicone, seguindo os mesmos passos, com a diferença de que após a deposição das 5 camadas da nanopartículas, as amostras foram tratadas termicamente a 100° C por 2 horas (Figura 3).

Figura 2 - Corpos de prova em zircônia revestidos com α -Ag₂WO₄



Figura 3 - Corpos de prova em silicone de adição revestidos com α -Ag₂WO₄



Desinfecção das amostras

Previamente a confecção dos extratos, os corpos de prova, com ou sem o revestimento, foram colocados em sacos plásticos estéreis fechados hermeticamente, e deixados em banho de ultrassom por 30 minutos. Após este período, foram expostos a luz ultravioleta, em capela de fluxo laminar por mais 1 hora de cada lado da amostra⁵⁶.

Confecção dos Extratos

Para a análise do efeito citotóxico dos biomateriais após revestimento com as nanopartículas foram obtidos extratos das substâncias hidrossolúveis dessas amostras^{56-57, 25-26}. Para isso, três corpos de prova de cada biomaterial (revestidos ou não com diferentes nanopartículas), após desinfetados, foram colocados dentro de tubos Falcon com 2,5 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, e incubados a 37° C por 24 horas²⁵⁻²⁶. Durante esse período de incubação, as substâncias provavelmente tóxicas foram difundidas para o meio de cultura, formando, assim, os extratos utilizados nos testes de citotoxicidade. Um tubo Falcon contendo apenas 2,5 mL de meio de cultura foi armazenado sob as mesmas condições, servindo, assim, como grupo controle negativo.

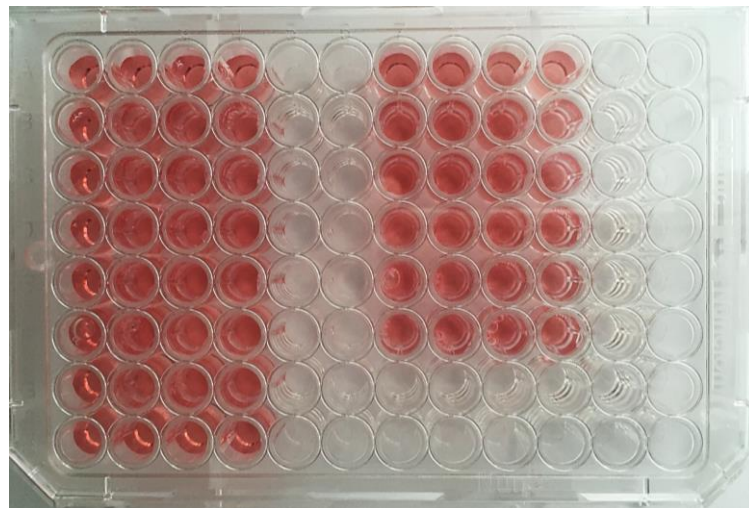
Cultura de células

Foram feitas culturas de queratinócitos humanos com a linhagem HaCaT (0341) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, cultivados em garrafas plásticas de 75 cm² em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 2,0 mmol/L⁻¹ de glutamina; contendo 10% de soro fetal bovino (SFB); 10,000 µg.mL⁻¹ de penicilina G; 10,000 µg.mL⁻¹ de estreptomicina; 25 µg.mL⁻¹ de anfotericina, em incubadora com uma atmosfera umedecida, contendo CO₂ a 5% e à temperatura de 37°C. Para manutenção da cultura, as células foram cultivadas até atingirem a confluência (90%), lavadas com tampão fosfato PBS 1X (NaCl 140 mmol.L⁻¹, KCl 3,0 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 4,30 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 1,4 mmol.L⁻¹), removidas com solução de tripsina (0,05%)/EDTA (0,53 mmol.L⁻¹) e então submetidas a centrifugação com 400 xg por 5 minutos. As células foram então ressuspensas em meio de cultura e replaqueadas em garrafas novas. O meio dos queratinócitos foi trocado a cada dois dias, e as células recultivadas até que o número de células e a confluência adequados fossem obtidos para a execução do experimento. As células utilizadas estavam entre a 3^a e a 8^a passagem. As células foram contadas em câmara de Neubauer, adicionando o corante Azul de Tripán, e plaqueadas na quantidade de 1,5 x 10⁴ células/poço em placas estéreis de 96 poços (Figura 4). Então, as células foram

incubadas em estufa contendo CO₂ a 5% e à temperatura de 37°C por 24 horas. Após este período, as células entraram em contato com os extratos e foram incubadas por mais 24 horas, totalizando um crescimento celular de 48 horas.

É importante salientar que todos os procedimentos foram realizados em área asséptica dentro da capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70%. Além disso, os materiais utilizados, com exceção das células e meio de cultura, foram desinfetados previamente em luz ultravioleta durante 20 minutos dentro da capela de fluxo laminar.

Figura 4 - Células plaqueadas na quantidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço em placa estéril de 96 poços.



Condições experimentais avaliadas

Nanopartículas de α -Ag₂WO₄ e α -Ag₂MoO₄ em Solução

Após 24 horas de crescimento dos queratinócitos semeados na concentração de $1,5 \times 10^4$ células/poço em placas acrílicas esterilizadas de 96 compartimentos, foi realizada uma lavagem das células aderidas com 150 μ L de PBS 1x, e as soluções das nanopartículas (item 5.2.4) nas concentrações de 0,25mg/ml e

0,125mg/ml foram colocadas diretamente sobre as células. As placas foram armazenadas em incubadora na temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar por mais 24 horas. Para cada grupo experimental, foram destinados quatro compartimentos da placa (análise em quadruplicata), sendo que a análise foi desenvolvida em três ocasiões distintas.

Grupos Avaliados

- Ag₂WO₄ 0,25 mg /mL – Solução de tungstato de prata na concentração de 0,25 mg /mL.
- Ag₂WO₄ 0,125 mg/ mL – Solução de tungstato de prata na concentração de 0,125 mg/ mL.
- Ag₂MoO₄ 0,25 mg /mL – Solução de molibdato de prata na concentração de 0,25 mg /mL.
- Ag₂MoO₄ 0,125 mg /mL – Solução de molibdato de prata na concentração de 0,125 mg /mL.
- Controle Negativo – Controle de células que não foram expostas à solução de nanopartículas.

Nanopartículas como revestimento de biomateriais

Após 24 horas de incubação das células em placas com 96 orifícios, o meio de cultura presente sobre as células foi desprezado, permanecendo apenas as células aderidas no fundo da placa. Posteriormente foi feita uma lavagem das células com 150 µL de PBS 1x. Então, 75 µL de meio de cultura novo foram colocados em cada orifício da placa, juntamente com mais 75 µL do meio de cultura contendo os extratos obtidos dos corpos de prova (item 5.2.7). A placa foi incubada por mais 24 horas em estufa com 5% de CO₂, à temperatura de 37° C. Para cada grupo experimental, foram destinados quatro compartimentos da placa (análise em quadruplicata), sendo que a análise foi desenvolvida em três ocasiões distintas.

Grupos Avaliados

- Ag_2WO_4 Ti - Nanopartícula de Tungstato de prata revestindo os corpos de prova do biomaterial Titânio (Ti);
- Ag_2WO_4 Zi - Nanopartícula de Tungstato de prata revestindo os corpos de prova do biomaterial Zircônia (Zi);
- Ag_2WO_4 RA - Nanopartícula de Tungstato de prata revestindo os corpos de prova do biomaterial Resina Acrílica (RA);
- Ag_2WO_4 Si - Nanopartícula de Tungstato de prata revestindo os corpos de prova do biomaterial Silicone (Si);
- Ag_2MoO_4 Ti - Nanopartícula de Molibdato de prata revestindo os corpos de prova do biomaterial Titânio (Ti);
- Ag_2MoO_4 Zi - Nanopartícula de Molibdato de prata revestindo os corpos de prova do biomaterial Zircônia (Zi);
- Ag_2MoO_4 RA - Nanopartícula de Molibdato de prata revestindo os corpos de prova do biomaterial Resina Acrílica (RA);
- Ag_2MoO_4 Si - Nanopartícula de Molibdato de prata revestindo os corpos de prova do biomaterial Silicone (Si);
- Controle Ti - Corpos de prova do biomaterial Titânio, sem revestimento de nanopartículas (grupo controle do biomaterial Ti);
- Controle Zi - Corpos de prova do biomaterial Zircônia, sem revestimento de nanopartículas (grupo controle do biomaterial Zi);
- Controle RA - Corpos de prova do biomaterial Resina Acrílica, sem revestimento de nanopartículas (grupo controle do biomaterial RA);
- Controle Si - Corpos de prova do biomaterial Silicone, sem revestimento de nanopartículas (grupo controle do biomaterial Si);
- Controle Negativo – Controle de células que receberam apenas o meio de cultura suplementado com SFB e solução de antibiótico e antimicótico.

Testes realizados para análise da citotoxicidade

Avaliação da atividade mitocondrial dos queratinócitos (Teste MTT)

Para a análise do metabolismo celular, atividade mitocondrial dos queratinócitos foi avaliada. O ensaio de MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Brometo], consiste na detecção da viabilidade celular, de acordo com a capacidade de conversão do sal tetrazólio MTT em um produto de coloração roxa que pode ser medido em espectrofotômetro. O princípio deste método, consiste no fato de que as células viáveis possuem mitocôndrias competentes, que promovem a respiração celular e liberam no meio, espécies redutoras provenientes de cadeia respiratória celular, o que promove a redução do sal do MTT amarelo no produto corado, roxo⁶⁴.

Para a realização do teste, as células, após o contato com as soluções ou extratos das nanopartículas, foram lavadas com 150 μL de PBS. Em seguida, foi adicionado 150 μL de solução de MTT ($5,0 \text{ mg/ mL}^{-1}$) em cada poço, e as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO_2 e 95% de ar, por 4 horas no escuro. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados em 75 μL de 2-propanol acidificado com 0,04N de HCl. Após agitação e verificação da homogeneidade das soluções, foi realizada a leitura de absorvância em comprimento de onda de 570 nm em leitor Reader 400 EZ.

Avaliação da proliferação celular por meio do teste Alamar Blue

A proliferação celular dos queratinócitos também será avaliada com a utilização do teste Alamar Blue[®] (Figura 5). O ensaio apresenta um indicador de crescimento fluorimétrico com base na detecção de atividade metabólica. Especificamente, o sistema incorpora um indicador de oxidação-redução (REDOX), que gera um produto fluorescente e muda de cor em resposta à redução química. O crescimento celular contínuo mantém um ambiente reduzido, enquanto a inibição de crescimento mantém um ambiente oxidado. A redução relacionada com o crescimento

faz com que o indicador REDOX oxidado (não-fluorescente, azul) mude para a forma reduzida (fluorescente, vermelho).

Após 48 horas de crescimento dos queratinócitos (24 horas para adesão ao fundo da placa e 24 horas em contato com os extratos) em cada condição experimental, o meio presente nas células foi removido, as células foram lavadas uma vez com 150 μL de PBS e foi acrescentado por 15 μL da solução de Alamar Blue diluída em 135 μL de DMEM com 10% de SFB, totalizando 150 μL da solução em cada poço. As amostras foram, então, incubadas protegidas da luz, a 37°C com 5% de CO_2 e 95% de ar, durante 4 horas. Decorrido este tempo, o conteúdo dos poços foi transferido para uma placa preta estéril de 96 compartimentos com fundo plano e imediatamente foi realizada a leitura de fluorescência das amostras através do Fluoroskan Ascent FL com um filtro de 544 nm de emissão e 590 nm de transmissão.

Figura 5 - Reagente Alamar Blue®



Análise da integridade da membrana

O ensaio de integridade de membrana, por meio da utilização do Kit CytoTox-ONE™ (Figura 6), é um método homogêneo, fluorimétrico para estimar o número de células não viáveis presentes em placas de múltiplos poços. Mede a liberação de lactato desidrogenase (LDH) a partir de células com uma membrana danificada. LDH liberado para o meio de cultura é medido com um composto enzimático (diaforase) que resulta na conversão de resazurina em resorufina. Sendo que a quantidade de fluorescência produzida é proporcional ao número de células lisadas.

Figura 6 - Kit reagente CytoTox-One™



O ensaio foi realizado após a incubação de 48 horas das células (24 horas para adesão ao fundo da placa e 24 horas em contato com os extratos), de acordo com os grupos experimentais descritos. A placa de cultura de células foi retirada da estufa de CO₂ e foram acrescentados 3 µL da solução de lise em cada poço. Então, a placa foi colocada por 30 min na estufa a 22°C. Após 30 min, foram adicionados 150 µL do reagente em cada poço, e a placa incubada novamente a 22° C por 10 mais minutos, na ausência de luz. Decorrido esse tempo, foram colocados 75µL de “stop solution” em todos os poços e o conteúdo foi homogeneizado levemente. Este conteúdo, presente em cada poço, foi transferido para uma placa preta estéril de 96 compartimentos com fundo plano e imediatamente foi realizada a leitura de fluorescência das amostras através do Fluoroskan Ascent FL com um filtro de 544 nm de emissão e 590 nm de transmissão.

Para este teste, além dos grupos controles citados anteriormente, um grupo controle apenas com o reagente e o meio de cultura foi necessário, pois o meio de cultura suplementado com SFB pode conter quantidades significativas de LDH, e alterar o resultado do teste. O valor de fluorescência determinado a partir deste controle foi usado para normalizar os valores de fluorescência obtidos a partir de outras amostras. Para que os valores fossem normalizados, houve necessidade da aplicação de uma fórmula apresentada pelas recomendações do fabricante, onde os valores de fluorescência encontrados foram aplicados na fórmula a seguir.

$$\text{Percentual de Citotoxicidade} = 100 \times \frac{(\text{Experimental} - \text{Controle do Meio de Cultura})}{(\text{Controle negativo} - \text{Controle do Meio de Cultura})}$$

Análise dos resultados

Foram realizadas duas análises separadamente, uma quantitativa e outra qualitativa. Na análise quantitativa, os resultados do número de células viáveis, obtidos nos diferentes testes (teste MTT, Alamar Blue e CytoTox-One) foram tabulados e submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Levene) para verificar a distribuição dos dados amostrais. Com base nos resultados observados por meio desses testes, o método estatístico mais adequado. Para avaliar a citotoxicidade de biomateriais revestidos com nanopartículas de Ag_2WO_4 e Ag_2MO_4 foram utilizadas análises de variância de dois fatores: biomaterial e revestimento, aplicadas sobre as porcentagens de células vivas em relação ao controle. Essa análise foi complementada por comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Adotou-se o nível de significância de 5% para a tomada de decisão (tabelas contendo as análises estatísticas encontram-se no Anexo 2).

Para complementar a análise estatística, os resultados de cada grupo experimental foram comparados com o grupo controle (considerado 100% de viabilidade) e os materiais e tratamentos propostos foram classificados de acordo com o efeito citotóxico em (análise qualitativa)⁶⁵: não citotóxico (inibição menor do que 25%

em relação ao grupo controle), discretamente citotóxico (inibição entre 25% e 50% em relação ao grupo controle), moderadamente citotóxico (inibição entre 50% e 75% em relação ao grupo controle) e intensamente citotóxico (inibição maior do que 75% em relação ao grupo controle).

RESULTADOS

Análise quantitativa da citotoxicidade das amostras revestidas

Na Tabela 1 são mostradas as médias e desvios padrão de porcentagens de células vivas relativamente ao controle (considerado 100% células vivas). Para cada teste foi aplicada uma análise de variância, obtendo-se sempre significância estatística da interação entre o tipo de revestimento e biomaterial ($p < 0,01$). Isso significa que o revestimento depende do biomaterial e, então, foi aplicado o teste de Tukey para a comparação de médias de porcentagens. O resultado dessas comparações, para cada método, está resumido na Tabela 1. É importante salientar que, para o teste CytoTox-One, os dados foram subtraídos de 100% para determinação do número de células vivas, uma vez que o teste determina o número de células mortas por meio da quantificação de LDH liberado.

Tabela 1 – Média (desvio padrão) de porcentagens de viabilidade celular em relação ao controle, obtidas nos diferentes testes, de acordo com o biomaterial e o revestimento empregado.

Método	Biomaterial	Revestimento		
		Tungstato	Molibdato	Sem revestimento
Alamar	Ti	77,3 (2,6) ^{bA}	73,3 (1,8) ^{aA}	96,9 (2,1) ^{cB†}
	Zi	73,4 (1,2) ^{bA}	69,2 (1,2) ^{aA}	88,6 (1,3) ^{bB}
	RA	76,7 (1,6) ^{bA}	74,3 (1,0) ^{aA}	88,6 (1,8) ^{bB}
	Si	57,9 (1,7) ^{aA}	69,5 (2,2) ^{aB}	80,3 (3,9) ^{aC}
MTT	Ti	73,7 (2,8) ^{bA}	76,3 (3,4) ^{cAB}	84,2 (0,3) ^{aB}
	Zi	63,7 (2,6) ^{aA}	61,2 (2,8) ^{aA}	85,2 (5,4) ^{aB}
	RA	72,5 (3,9) ^{abA}	71,0 (1,2) ^{bcA}	82,6 (3,1) ^{aB}
	Si	64,4 (4,9) ^{aA}	65,9 (0,8) ^{abA}	77,2 (2,2) ^{aB}
CytoTox One	Ti	66,8 (0,8) ^{bA}	63,5 (1,8) ^{cA}	86,4 (2,2) ^{bB}
	Zi	63,7 (4,0) ^{bB}	53,3 (2,1) ^{abA}	75,2 (2,2) ^{aC}
	RA	65,1 (1,6) ^{bB}	59,2 (1,4) ^{bcA}	81,6 (1,1) ^{bC}
	Si	51,4 (2,2) ^{aA}	50,1 (1,5) ^{aA}	71,3 (0,9) ^{aB}

Médias acompanhadas de letras iguais (maiúsculas na linha ou minúsculas na coluna), de acordo com o teste, não são significativamente diferentes (teste de Tukey: $p > 0,05$)

† não difere significativamente do controle de células vivas

De acordo com a Tabela 1, observa-se que, no teste Alamar Blue, todos os biomateriais, revestidos com ambas as nanopartículas, foram estatisticamente diferentes do grupo de amostras sem revestimento. Em relação ao tipo de revestimento, somente as amostras de silicone revestidas com molibdato de prata foram diferentes das amostras de silicone revestidas com tungstato de prata. Em relação ao tipo de biomaterial, as amostras de silicone revestidas com tungstato de prata foram diferentes dos demais biomateriais. Dentro do grupo dos biomateriais sem revestimento, somente o titânio foi considerado estatisticamente igual ao controle de células vivas (considerado 100%) e diferente dos demais grupos, os quais foram semelhantes entre si.

No teste MTT, todos os biomateriais, revestidos com ambas as nanopartículas, foram estatisticamente diferentes do grupo de amostras sem revestimento. Além disso, as amostras de titânio revestidas com molibdato de prata foram diferentes das amostras de titânio revestidas com tungstato de prata. Essas mesmas amostras foram estatisticamente diferentes dos demais biomateriais revestidos com a mesma nanopartículas. Observou-se também que todos os biomateriais foram estatisticamente diferentes do grupo controle de células vivas.

Todos os biomateriais, revestidos com ambas as nanopartículas, foram estatisticamente diferentes do grupo de amostras sem revestimento também para o teste CytoTox-One. Além disso, as amostras de resina acrílica e de zircônia revestidas com molibdato de prata foram diferentes das mesmas amostras revestidas com tungstato de prata. Ainda para o mesmo teste, observou-se também que, em relação ao tipo de biomaterial, as amostras de silicone revestidas com tungstato de prata foram diferentes dos demais biomateriais. Dentro do grupo dos biomateriais sem revestimento, as amostras de titânio não diferiram estatisticamente das amostras de resina acrílica e as amostras de zircônia não diferiram estatisticamente das amostras de silicone. Porém, todos os biomateriais foram estatisticamente diferentes do grupo controle de células vivas.

Nas Figuras de 7 a 9 estão representados os resultados da viabilidade celular de acordo com a fluorescência e a absorbância nos testes Alamar Blue, MTT e CytoTox-One, respectivamente.

Figura 7 - Viabilidade celular no teste Alamar Blue.

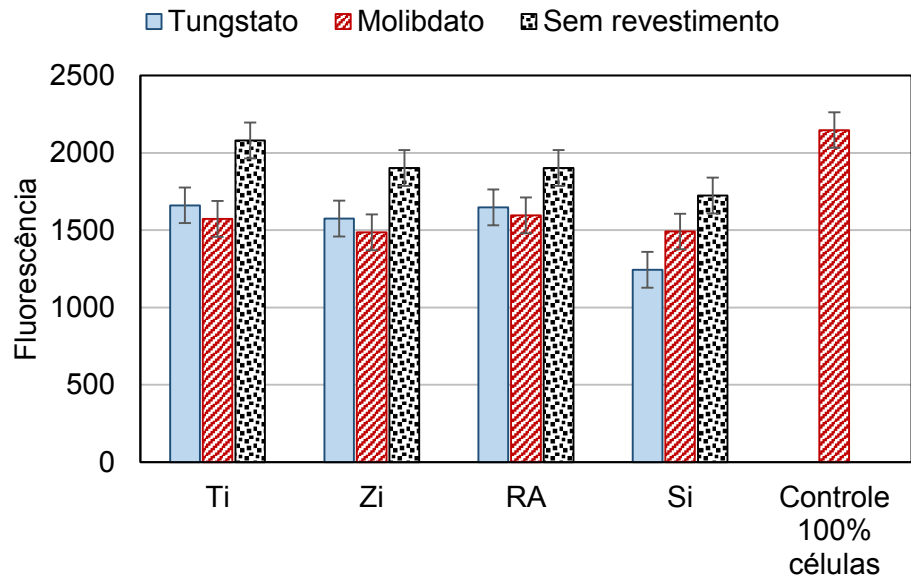


Figura 8 - Viabilidade celular no teste MTT.

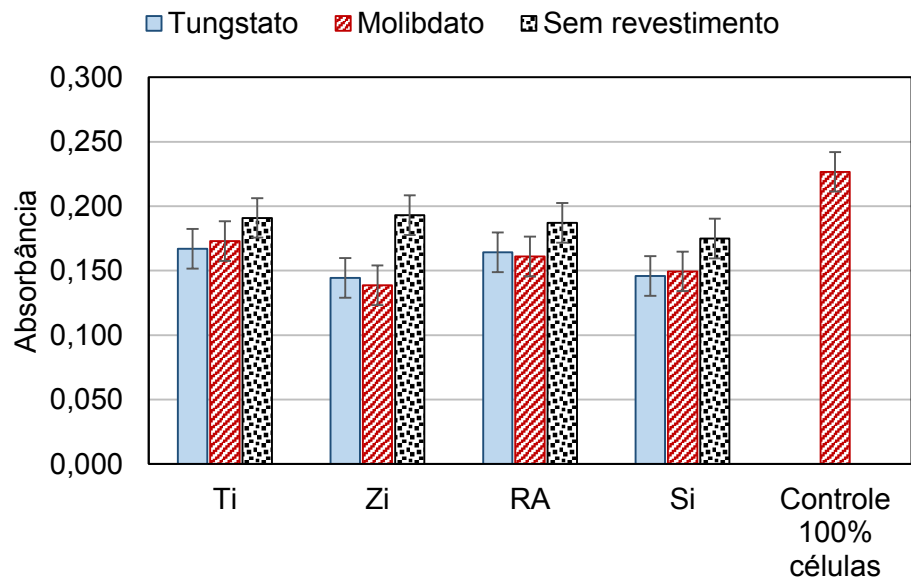
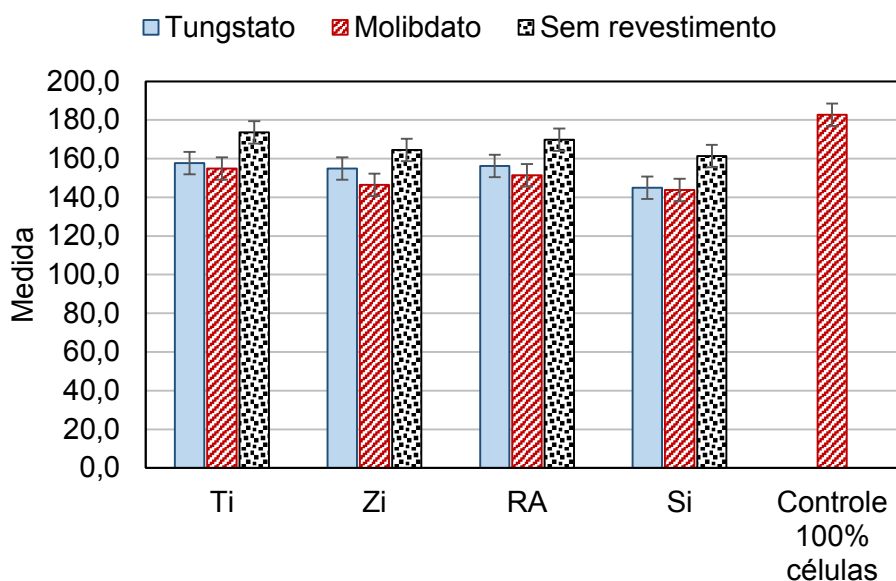


Figura 9 - Viabilidade celular no teste Cyto Tox One.



Análise qualitativa da citotoxicidade das amostras revestidas

Para complementar os resultados das análises de variância, os resultados de cada grupo experimental foram comparados com o controle de células vivas (considerado 100% de viabilidade celular) e os grupos foram classificados como⁶⁵: não citotóxico (inibição menor do que 25% em relação ao grupo controle), discretamente citotóxico (inibição entre 25% e 50% em relação ao grupo controle), moderadamente citotóxico (inibição entre 50% e 75% em relação ao grupo controle) e intensamente citotóxico (inibição maior do que 75% em relação ao grupo controle).

Nas Figuras de 10 a 12, estão representados os resultados de porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células vivas, nos testes Alamar Blue, MTT e CytoTox-One, respectivamente.

Figura 10 - Porcentagem de viabilidade celular no teste Alamar Blue.

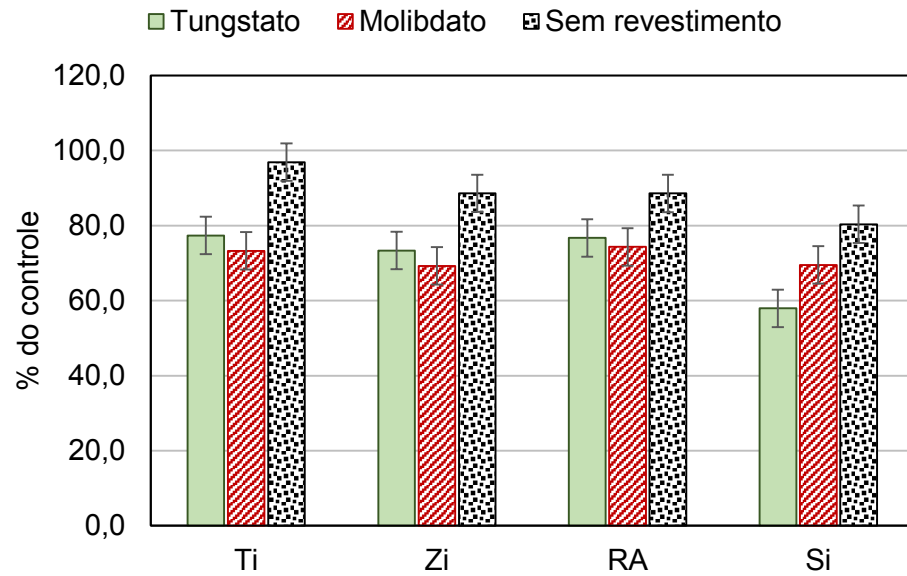


Figura 11 - Porcentagem de viabilidade celular no teste MTT.

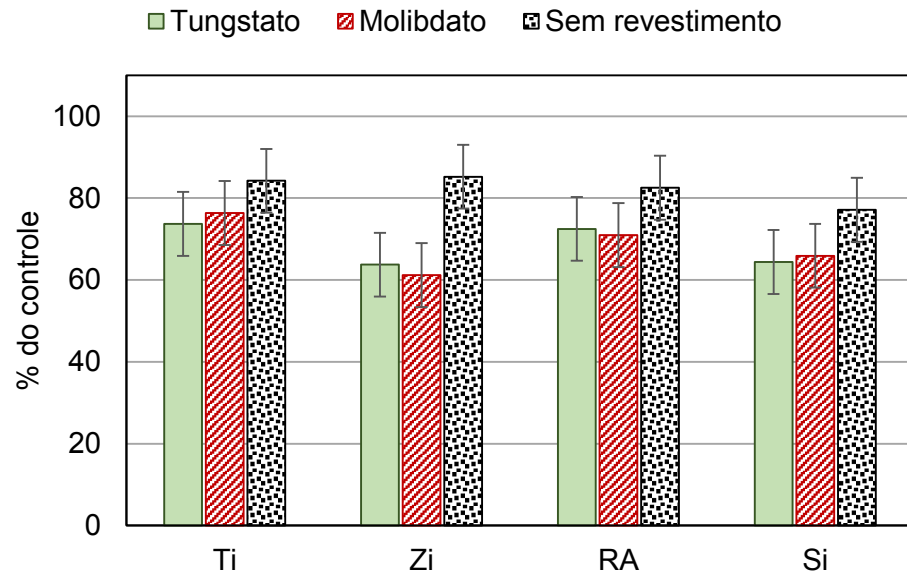
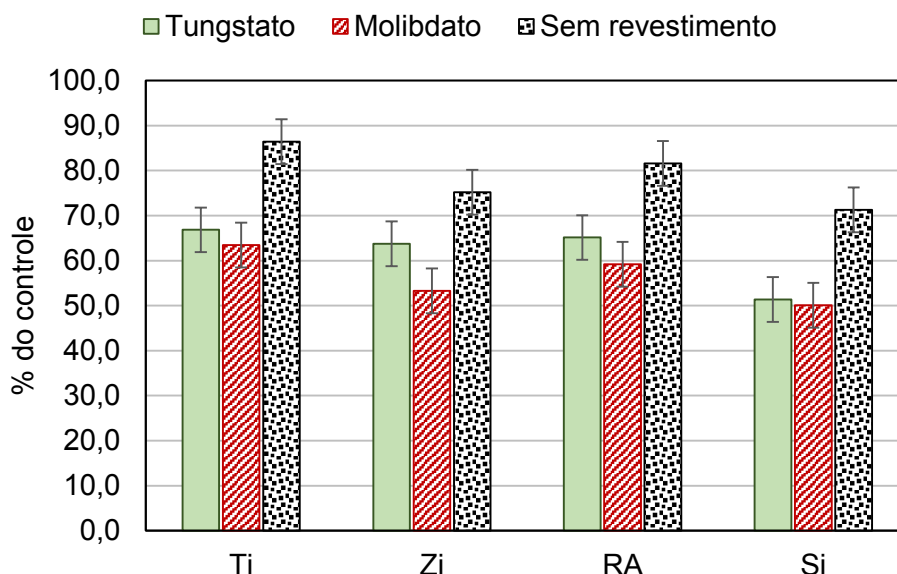


Figura 12 - Porcentagem de viabilidade celular no teste CytoTox-One.



Por essa análise, foi possível observar que, no teste Alamar Blue, todos os biomateriais sem revestimento foram classificados como não citotóxicos. A mesma classificação foi dada para as amostras de titânio revestidas com tungstato de prata. Os demais biomateriais revestidos com ambas as nanopartículas foram classificados como discretamente citotóxicos. Também no teste MTT, todos os biomateriais sem revestimento foram classificados como não citotóxicos. As amostras de titânio revestidas com molibdato de prata também foram classificadas como não citotóxicas. Todos os demais grupos foram classificados como discretamente citotóxicos pois inibiram o crescimento celular entre 25 e 50% em relação ao grupo controle. No teste CytoTox-One, todos os grupos inibiram em maior quantidade a proliferação celular em comparação aos testes Alamar Blue e MTT, sendo, portanto, mais sensível. Neste teste, somente as amostras de titânio, zircônia e resina acrílica, sem revestimento, foram classificadas como não citotóxicas. Os demais grupos foram classificados como discretamente citotóxicos, tendo sido observada maior redução do número de células para as amostras de silicone, independentemente do tipo de revestimento.

Análise qualitativa das imagens obtidas com microscopia óptica invertida das amostras revestidas

As figuras 13 a 25 apresentam imagens obtidas com microscópio óptico invertido Leica, e demonstram a viabilidade celular das amostras testadas.

Figura 13 - Microscopia óptica invertida das amostras de Titânio revestidas com Ag_2WO_4 (Aumento de 10x).

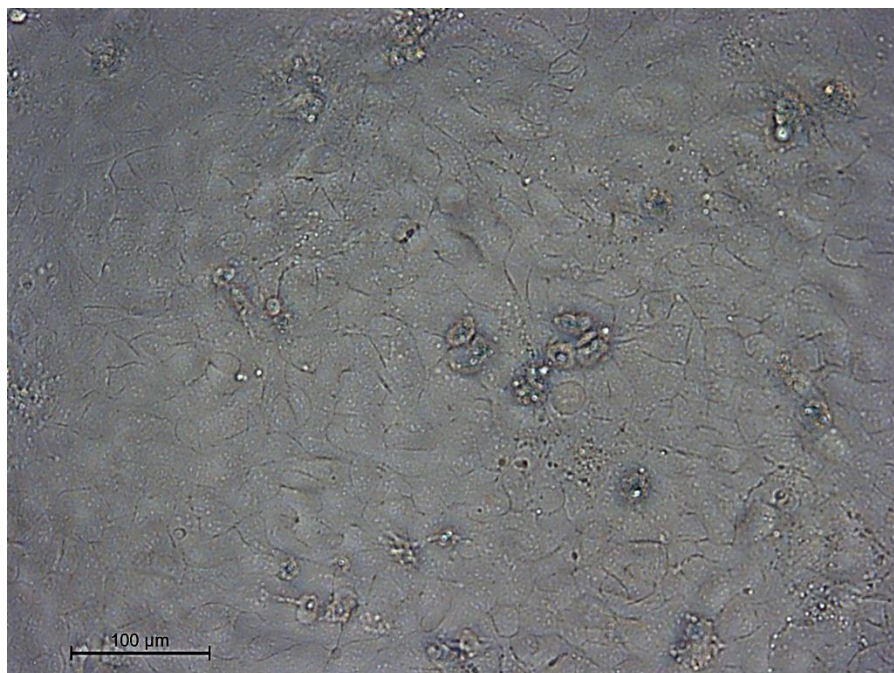


Figura 14 - Microscopia óptica invertida das amostras de Zircônia revestidas com Ag_2WO_4 (Aumento de 10x).

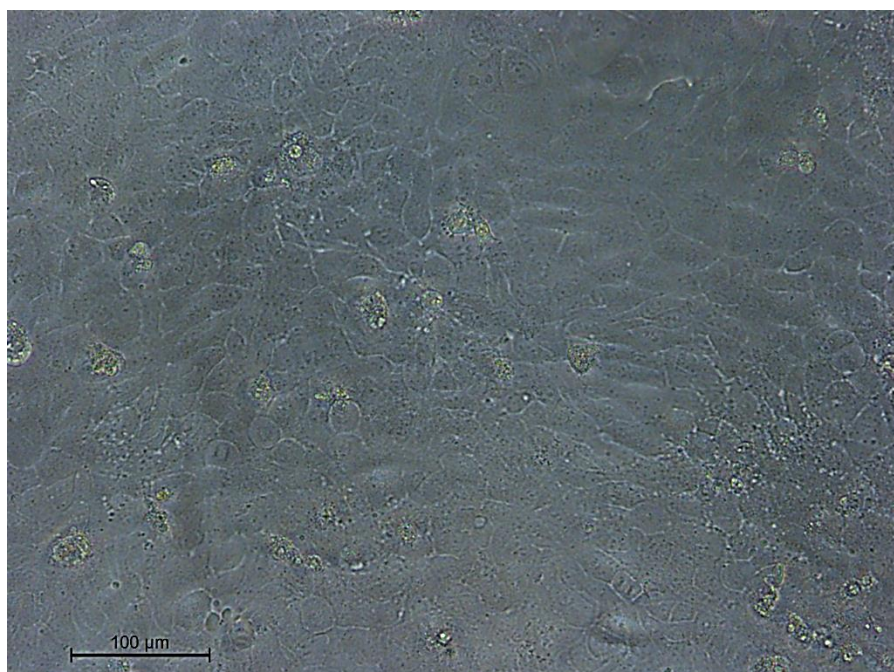


Figura 15 - Microscopia óptica invertida das amostras de Resina Acrílica revestidas com Ag_2WO_4 (Aumento de 10x).

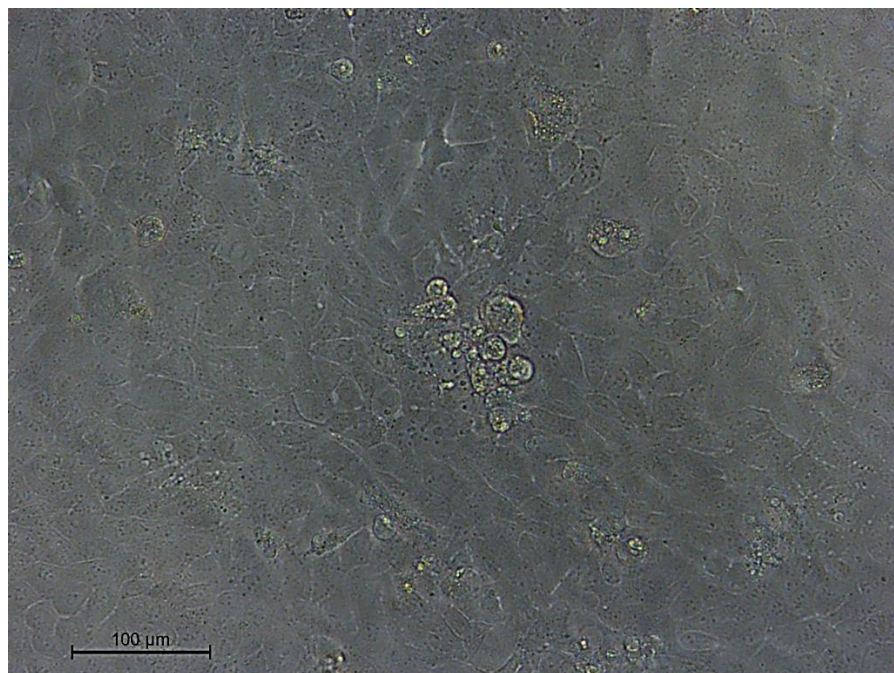


Figura 16 - Microscopia óptica invertida das amostras de Silicone revestidas com Ag_2WO_4 (Aumento de 10x).

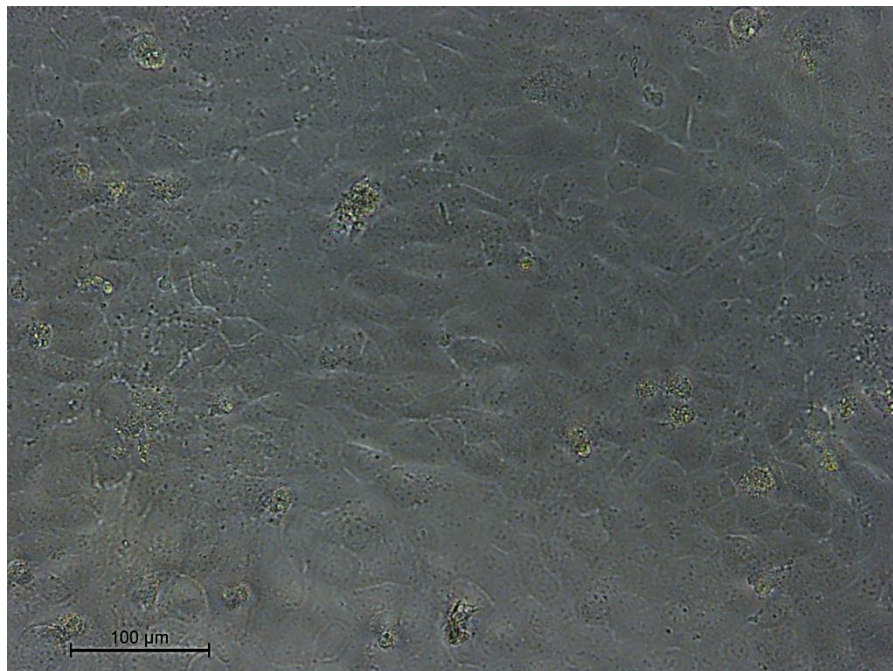


Figura 17 - Microscopia óptica invertida das amostras de Titânio revestidas com Ag_2MoO_4 (Aumento de 10x).

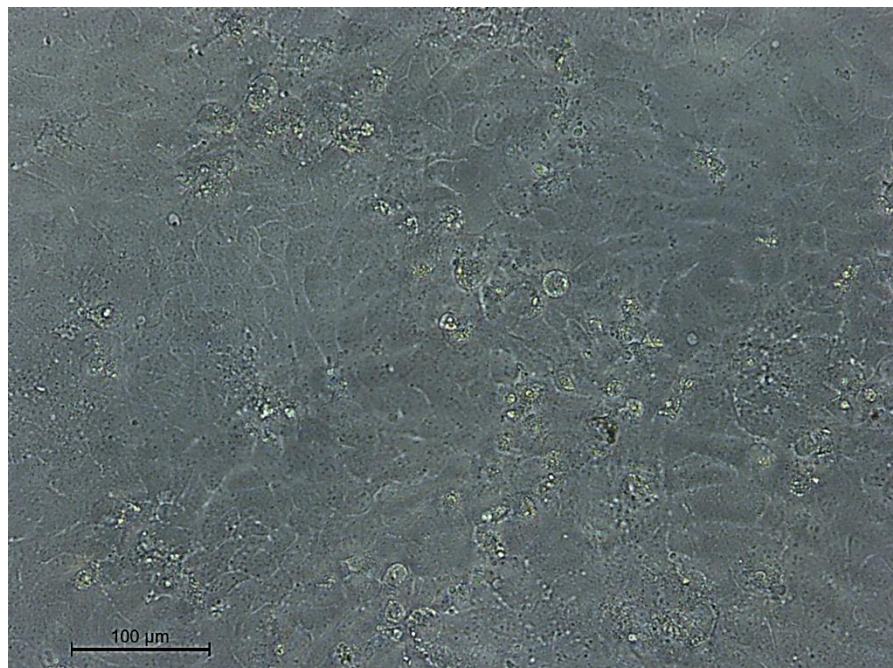


Figura 18 - Microscopia óptica invertida das amostras de Zircônia revestidas com Ag_2MoO_4 (Aumento de 10x).

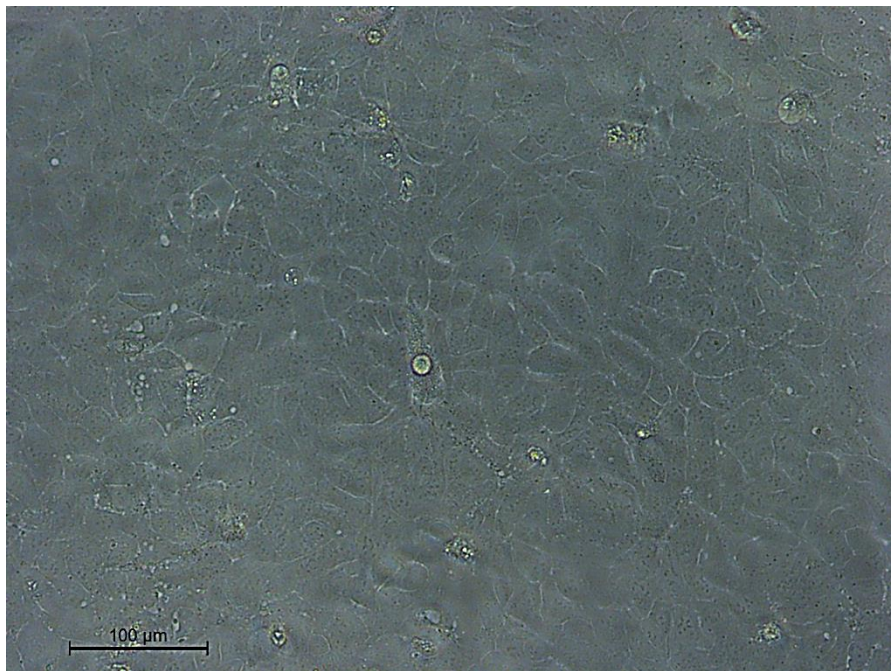


Figura 19 - Microscopia óptica invertida das amostras de Resina Acrílica revestidas com Ag_2MoO_4 (Aumento de 10x).

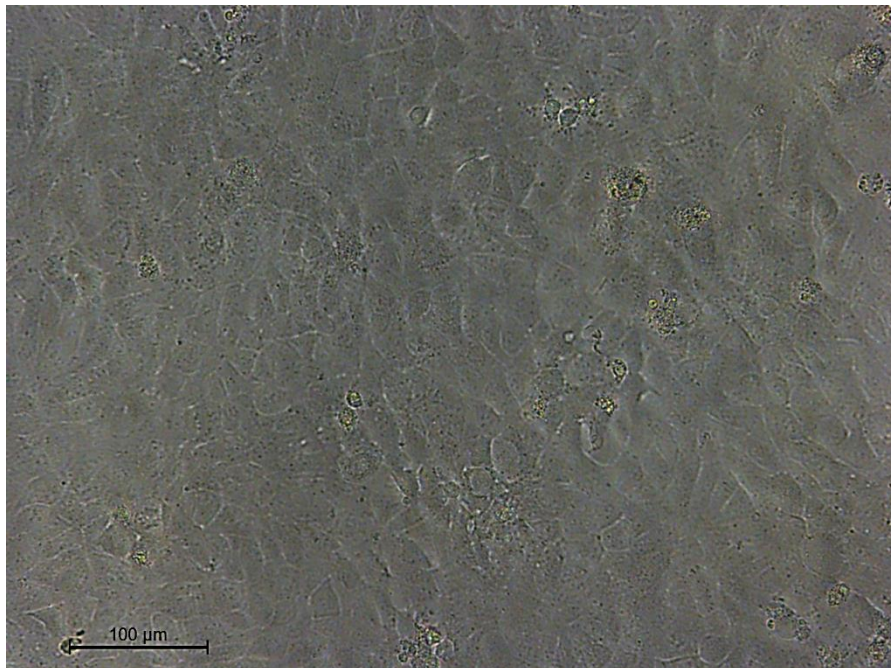


Figura 20 - Microscopia óptica invertida das amostras de Silicone revestidas com Ag_2MoO_4 (Aumento de 10x).

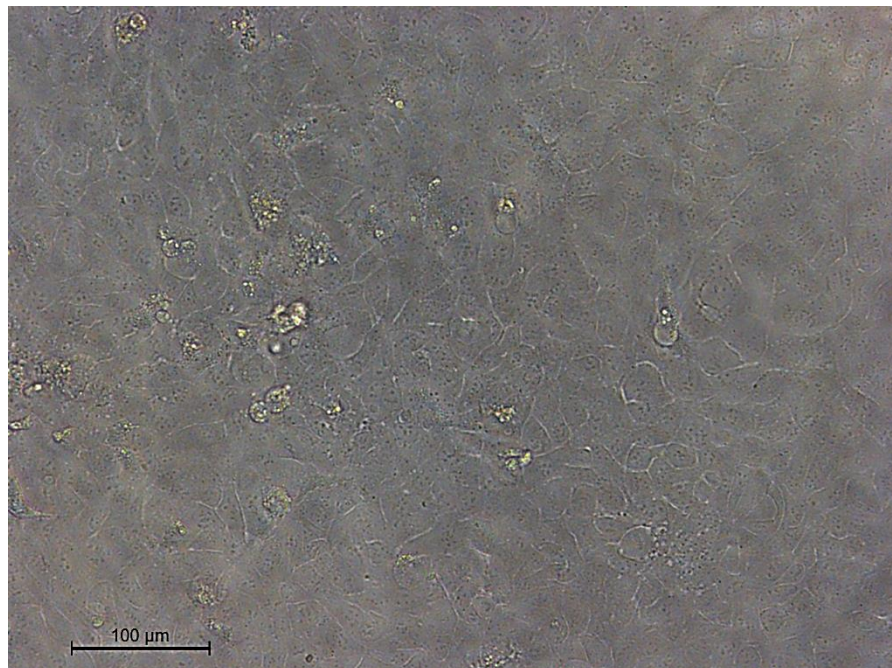


Figura 21 - Microscopia óptica invertida das amostras de Titânio sem revestimento (Aumento de 10x).

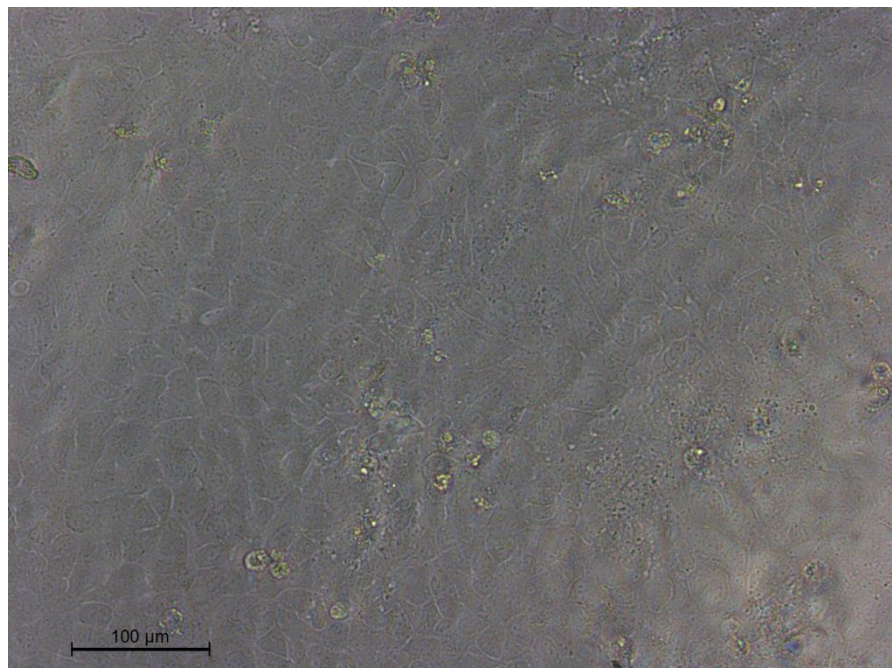


Figura 22 - Microscopia óptica invertida das amostras de Zircônia sem revestimento (Aumento de 10x).

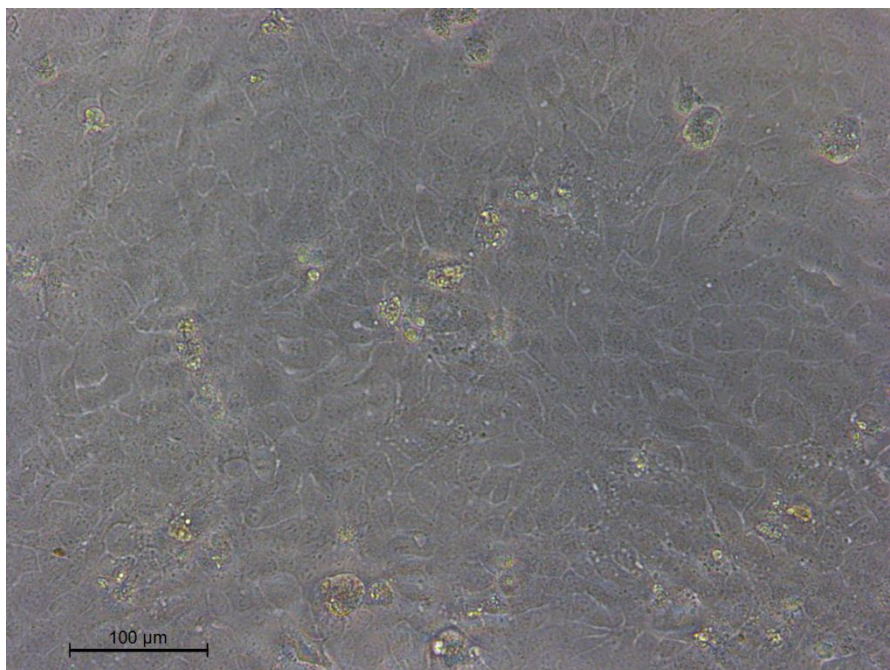


Figura 23 - Microscopia óptica invertida das amostras de Resina Acrílica sem revestimento (Aumento de 10x).

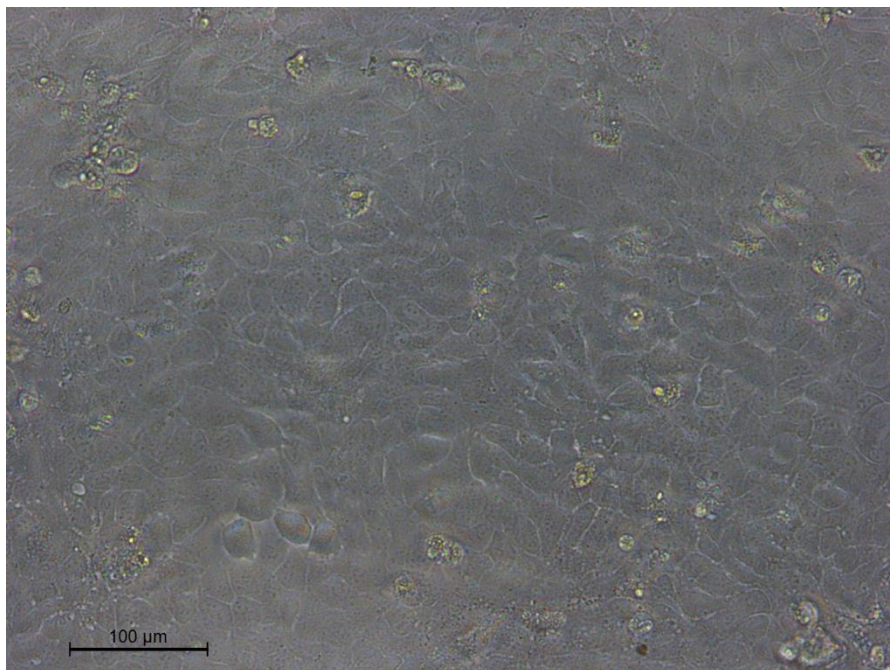


Figura 24 - Microscopia óptica invertida das amostras de Silicone sem revestimento (Aumento de 10x).

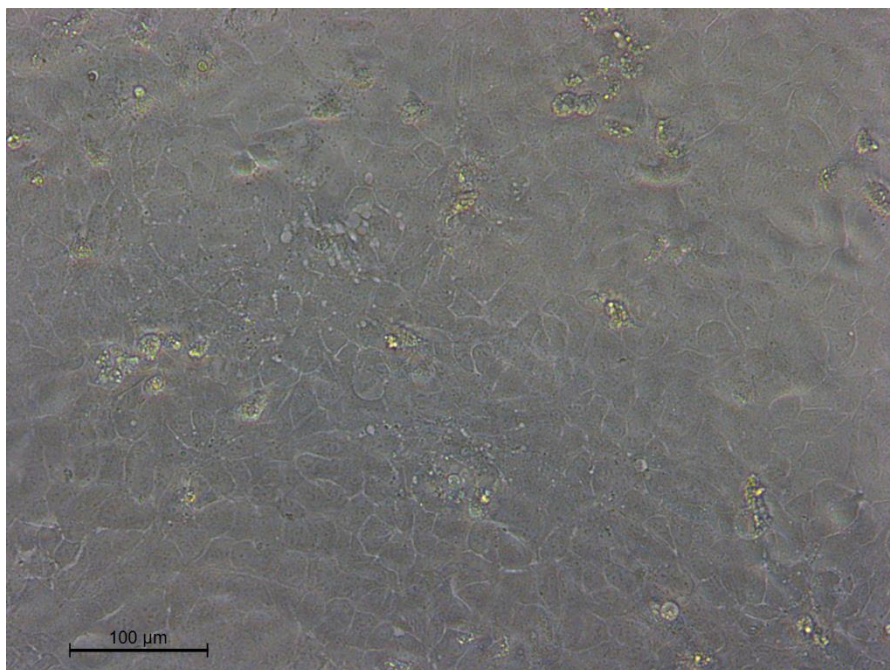
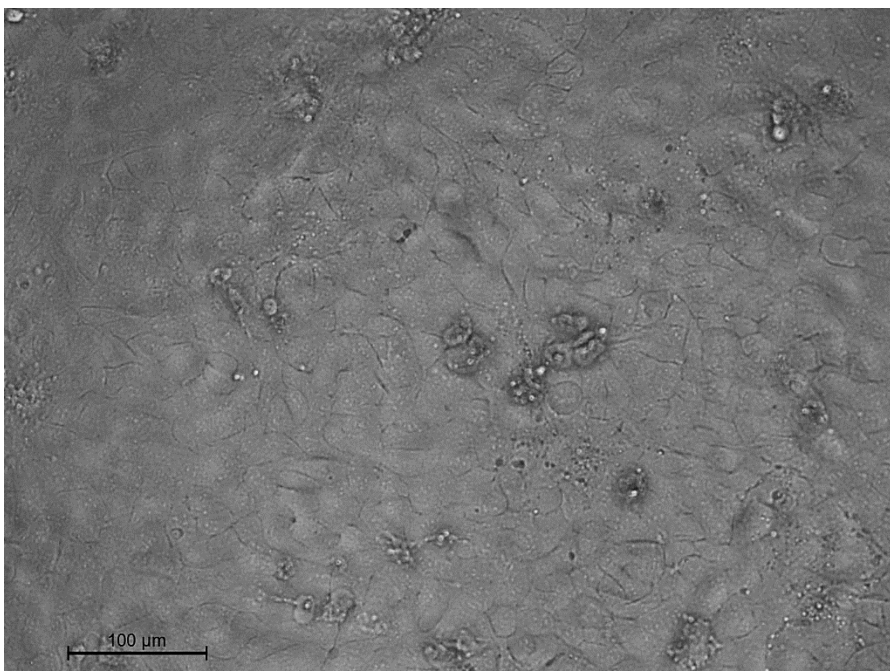


Figura 25 - Grupo controle negativo (Aumento de 10x).



Análise quantitativa e qualitativa da citotoxicidade das nanopartículas de α - Ag_2WO_4 e α - Ag_2MoO_4 em solução

Este estudo também avaliou a citotoxicidade das nanopartículas em solução nas concentrações de 0,25 mg /mL e 0,125 mg /mL, as quais foram consideradas as concentrações inibitórias mínimas em estudos anteriores.

A Tabela 2 e a Figura 26 mostram os resultados de fluorescência para o teste Alamar Blue. Na Figura 27, apresentam-se os valores em porcentagem da viabilidade celular para cada grupo em relação ao controle de células vivas (considerado 100% de viabilidade)

Tabela 2 - Viabilidade celular no teste Alamar Blue.

Nanopartícula	Concentração		
Tungstato	C.25	41,1 (3,0)	a
	C.125	44,3 (6,7)	a
Molibdato	C.25	39,8 (2,7)	a
	C.125	36,6 (1,0)	a
Controle			
100% células		1982,6 (28,3)	b

Médias acompanhadas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Figura 26 - Viabilidade celular no teste Alamar Blue.

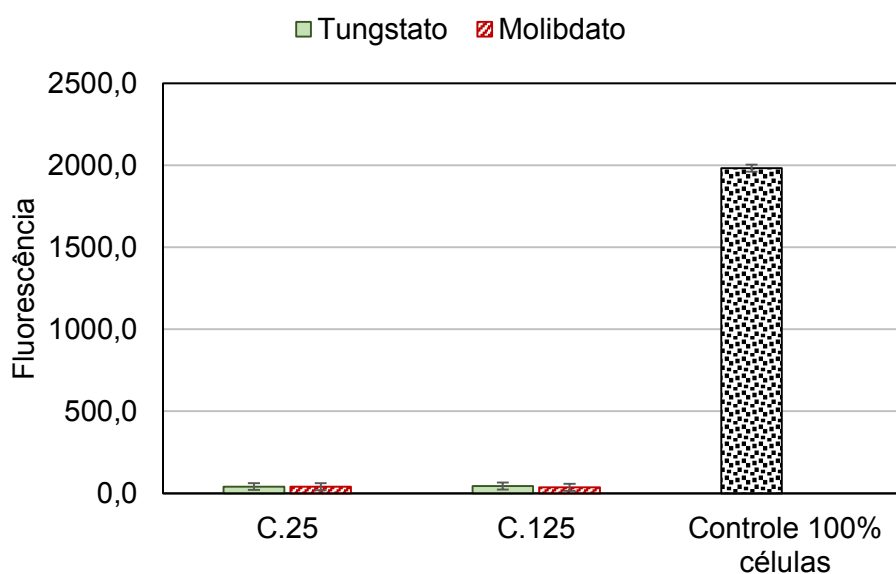
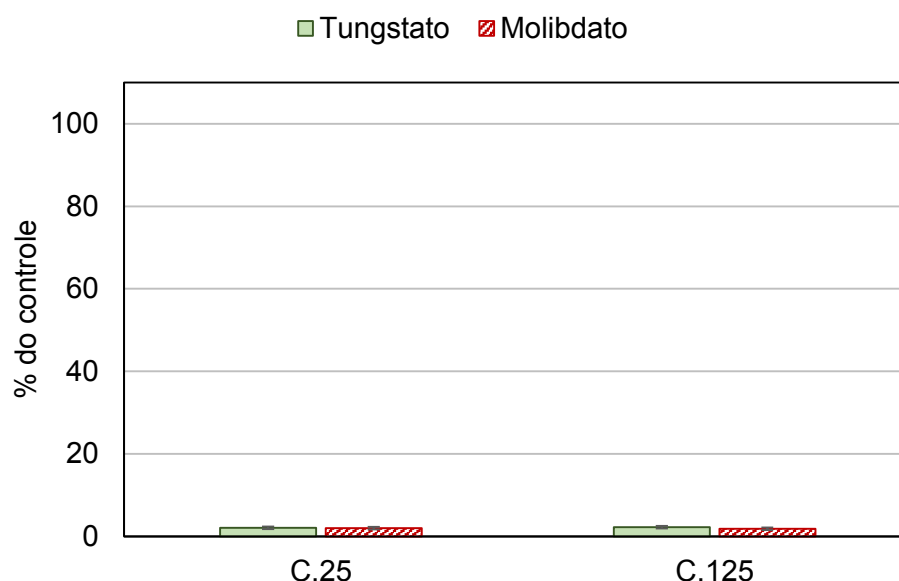


Figura 27 - Porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle no teste Alamar Blue.



A partir da análise dos resultados do teste Alamar Blue, observou-se que as nanopartículas em solução, em ambas as concentrações, foram intensamente citotóxicas, com morte celular de quase 100% das células. Assim, os demais testes (MTT e CytoTox-One) não foram realizados por terem sido considerados desnecessários.

Síntese das nanopartículas de α -Ag₂WO₄ e α -Ag₂MoO₄ em solução

Em relação à síntese, a nanopartícula de Ag₂WO₄ foi sintetizada através de método hidrotérmico e caracterizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura e Difração de Raios X^{11,59}. Por imagens de MEV-FEG foi possível observar que as amostras sintetizadas de Ag₂WO₄ apresentam morfologia de bastões com face hexagonal, com comprimento médio de aproximadamente 1,5 μ m (Figura 28). A amostra apresentou rápido crescimento de prata metálica quando bombardeada por elétrons no microscópio. A nanopartícula de Ag₂MoO₄ foi sintetizada através do método da co-precipitação, e foi caracterizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura e Difração de Raios X^{11,59}. A maior parte da amostra de Ag₂MoO₄

apresentou morfologia cúbica e hexagonal, porém foram observadas algumas partículas com morfologia irregular (Figura 29). Apresentaram, também, partículas de prata metálica em sua superfície.

Figura 28 - Imagens de MEV-FEG das amostras sintetizadas de Ag_2WO_4 .

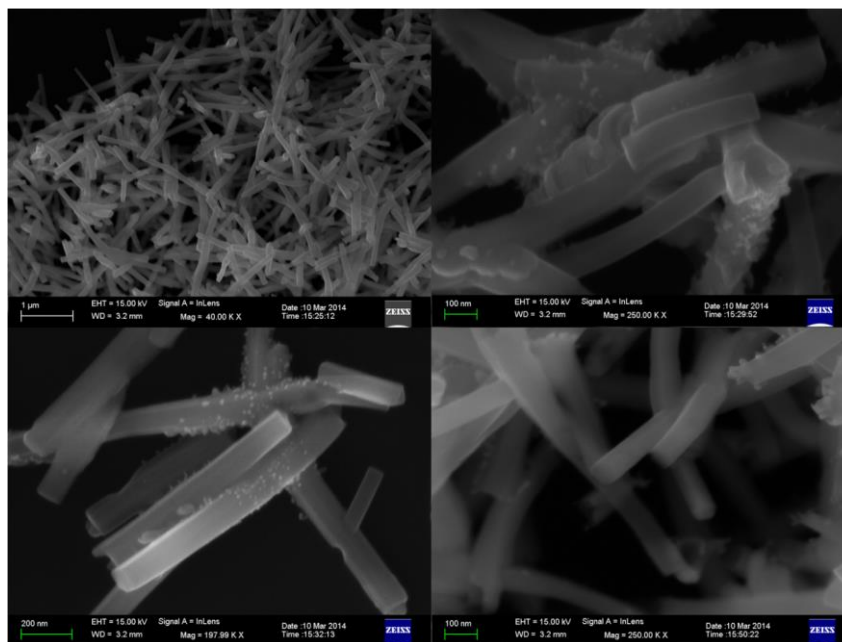
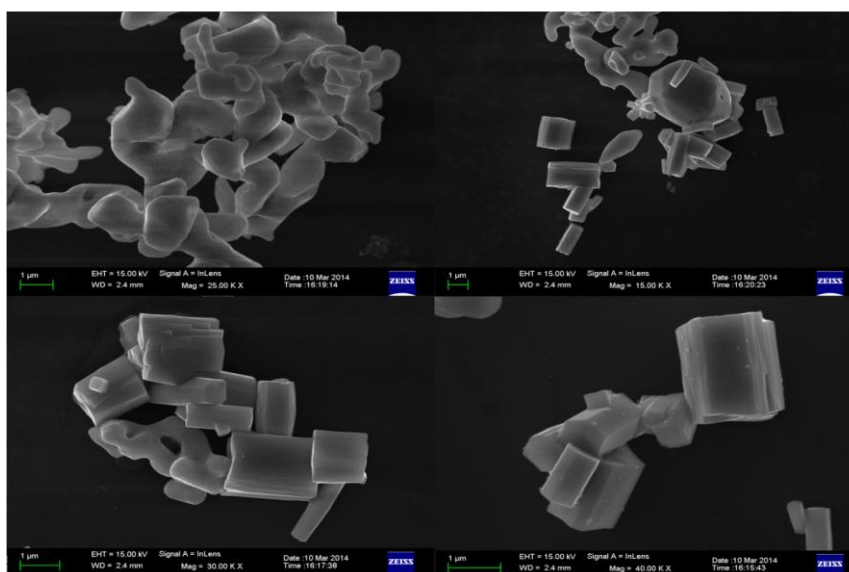


Figura 29 - Imagens de MEV-FEG das amostras sintetizadas de Ag_2MoO_4 .



DISCUSSÃO

As superfícies com propriedades antimicrobianas são altamente desejadas em aplicações que requerem uma barreira protetora contra a infecção. Neste contexto, as nanopartículas representam uma das estratégias mais promissoras para superar a resistência microbiana, uma vez que utilizam diferentes mecanismos para inibir o crescimento de micro-organismos^{52,54, 65}. Longo et al.³⁵ (2014) verificaram que as nanopartículas de Ag_2WO_4 , em solução, foram capazes de inativar MRSA e que este efeito foi dose-dependente. Porém, a utilização das nanopartículas deve ser vista com cautela, uma vez que os mesmos mecanismos de morte de micro-organismos podem ocasionar a morte de células do corpo humano, limitando suas indicações.

Estudos indicam que a esclerose sistêmica, artrite reumatóide, lúpus eritematoso e doença renal crônica podem ser causados pela exposição à nanopartículas^{15, 58}. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a biocompatibilidade de nanopartículas de Tungstato de Prata (Ag_2WO_4) e Molibdato de Prata (Ag_2MoO_4), em solução e após revestimentos de biomateriais, a fim de torná-las viáveis para o uso clínico na prevenção de biofilmes. Para isso, o teste de citotoxicidade, utilizando-se cultura de células, foi selecionado por ser considerado relativamente simples, reproduzível, efetivo e controlado³². Além disso, com o objetivo de obter informações mais completas sobre a citotoxicidade dos materiais, foram utilizados diferentes métodos, como os testes MTT, Alamar Blue e CytoTox-One.

No teste MTT, o sal metiltetrazolium é incorporado à cultura de células. A enzima desidrogenase succínica das células viáveis quebra a estrutura do sal tetrazolium, produzindo cristais de formazan na cor azul, determinando, dessa forma, valores relativos à intensidade da cor azul em espectrofotômetro específico com comprimento de onda determinado. Quanto maior a atividade mitocondrial, maior será a intensidade da luz azul e, assim, maior o número de células viáveis. O Alamar Blue é um teste simples e rápido, em que 10% da solução comercialmente disponível são adicionados ao meio de cultura celular e medidos tanto por colorimetria ou fluorimetria⁴⁸. No entanto, maior sensibilidade é conseguida utilizando a propriedade fluorescente. O teste Alamar Blue não é tóxico e não interfere na viabilidade celular, como ocorre com o Azul de Trypan⁴³. Além disso, não se faz necessário eliminar as

células para obter medições, como ocorre com o teste MTT⁶². O teste com o reagente CytoTox-One mede a liberação de LDH (lactato desidrogenase) das células com membranas danificadas. A produção do produto fluorescente é proporcional à quantidade de LDH liberada. Este processo é acompanhado por um rápido declínio da viabilidade celular. Este método é rápido e facilmente adaptável para diferentes tipos de células e condições de ensaio⁶⁷.

No presente estudo, o teste MTT e o teste Alamar Blue apresentaram resultados bastante semelhantes entre si. Já o teste CytoTox-One pareceu ser mais sensível do que os outros testes. Isso demonstra que, em alguns grupos, mesmo as células estando com a atividade mitocondrial preservada, alterações na membrana ocorreram, uma vez que houve a liberação de LDH. Tang et al⁶³, (1999) realizaram um estudo pelo qual foram comparadas diferentes metodologias que avaliam a citotoxicidade de materiais. O estudo mostrou que a utilização de diferentes métodos proporciona informações mais completas sobre a citotoxicidade dos materiais. Além disso, de acordo com Ciapetti et al.¹⁰ a adoção de vários métodos de ensaio proporciona melhores resultados na avaliação da citotoxicidade. Além disso, a escolha de três métodos diferentes garante que os resultados são válidos devido à liberação de produtos a partir dos materiais, o que poderia causar interferência com um único teste²⁵⁻²⁶.

Os resultados do presente estudo mostraram que as soluções de nanopartículas de Tungstato de Prata e Molibdato de Prata, em ambas as concentrações (25 µg/mL e 12,5 µg/mL), inibiram a proliferação celular em mais de 75%, em comparação ao controle para o teste Alamar Blue, tendo sido consideradas intensamente citotóxicas. Assim, os demais testes (MTT e Cyto Tox One) não foram realizados por terem sido considerados desnecessários. Esses resultados estão de acordo com Han et al.²¹ (2014), os quais observaram que nanopartículas de prata a 25 µg/ml diminuíram a viabilidade celular em 50 % em relação ao controle. Estes resultados podem ser explicados, em parte, em função da liberação de íons prata. Nanopartículas de prata têm atividade antibacteriana promissora por combater a adesão bacteriana e a formação de biofilme, mas o pequeno tamanho e elevada mobilidade requer preocupações de segurança, devido ao aumento do potencial citotóxico⁵⁵. Em estudo recente desenvolvido por Longo et al.³⁶ (2013), foi constatado o crescimento de prata metálica na superfície dos cristais de tungstato. Os fios de

prata nascem como resultado de uma reação de eletrossíntese, na qual os elétrons gerados pelos microscópios interagem com os íons de prata do tungstato para fazer a redução da prata metálica. Segundo os autores, este processo pode ser aplicado para o controle de outras propriedades, como a atividade microbiana e fotodegradação. “Com a irradiação a propriedade bactericida aumenta sua eficiência três vezes em comparação ao método atual de deposição.” Pesquisas têm mostrado que as nanopartículas de prata podem agir na membrana celular⁷², causando alterações na estrutura e, conseqüentemente, morte celular. Além disso, as nanopartículas podem causar danos ao DNA e aumentar as espécies reativas de oxigênio, levando à morte celular^{1, 38}. Outro fato conhecido que pode levar à morte celular é que nanopartículas de prata com tamanho de 20 nm ou menos pode entrar na célula sem endocitose, sendo distribuídas no interior do citoplasma¹⁷⁻²¹. Como tendência geral, tem sido assumido que as nanopartículas de prata podem se unir à superfície da membrana celular, o que provoca a desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, a morte celular¹¹. Por outro lado, Panacek et al.⁵¹ (2006) propuseram que essas nanopartículas podem penetrar no interior das bactérias e causar dano celular por interação com compostos de enxofre e de fósforo, tais como proteínas e DNA. Além disso, quando as nanopartículas são colocadas em meio de cultura, formam complexos de nanopartículas e proteínas⁶. A formação desses complexos também pode atuar no efeito citotóxico em decorrência da interação da camada proteica do complexo com as células em cultura⁶⁶.

O molibdato e o tungstato são oxianions de molibdênio e de tungstênio, respectivamente, os quais são elementos químicos metálicos. De acordo com Dunnick et al.⁶⁰ (2014), óxidos metálicos são conhecidos pelas suas propriedades semicondutoras, o que permite a transferência de elétrons entre o nanomaterial e ambientes aquosos. Esta transferência de elétrons pode também desempenhar um papel na toxicidade das nanopartículas aqui estudadas. Em relação ao tungstato de prata, nossos resultados estão de acordo com Dunnick et al.¹⁶ (2014), os quais verificaram que, na concentração de 50 µg/ml, o tungstato de prata causou dano celular. Os resultados mostraram que a forma e tamanho pode desempenhar um papel importante na determinação de reatividade e citotoxicidade dessas nanopartículas. Os resultados também indicaram que as características químicas e variabilidade dessas nanopartículas pouco influenciaram na toxicidade celular. Em

relação ao Molibdato de Prata, nenhum estudo que avaliasse a sua citotoxicidade foi encontrado na literatura, inviabilizando as comparações.

Em relação ao grupo de biomateriais sem revestimento com as nanopartículas, os resultados mostraram que, nos testes Alamar Blue e MTT, todos os biomateriais foram classificados como não citotóxicos. Adicionalmente, no teste Alamar Blue, as amostras de titânio promoveram crescimento celular semelhante ao grupo controle. Já no teste CytoTox-One somente as amostras de titânio, zircônia e resina acrílica foram classificadas como não citotóxicas. As amostras de silicone não revestidas foram classificadas como discretamente citotóxicos. Neste grupo, a biocompatibilidade dos materiais isoladamente pode ser avaliada.

No caso do titânio, vários estudos reportaram algumas de suas propriedades favoráveis, como excelente resistência à corrosão e biocompatibilidade^{8, 45}, estando de acordo com os resultados do presente estudo. Em relação à zircônia, testes de biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* tem mostrado resultados positivos^{13, 45, 53}. Estudos prévios comprovaram a citotoxicidade das resinas acrílicas²⁷⁻³⁰. Nos nossos resultados, porém, em todos os testes realizados, as amostras de resinas acrílicas foram classificadas como não citotóxicas, pois inibiram menos de 25% o crescimento celular em relação ao controle. Uma vez que o efeito citotóxico das resinas acrílicas está diretamente associado ao conteúdo de monômero residual, as diferenças encontradas entre os estudos poderiam ser explicadas em função do tempo de armazenamento e tipo de processamento das amostras. No presente estudo, as amostras ficaram armazenadas por 48 horas antes da realização dos testes. O tempo de armazenamento em água pode influenciar na biocompatibilidade dos materiais²⁷. Além disso, uma resina acrílica termopolimerizável por micro-ondas foi utilizada no presente estudo. Estudos anteriores comprovaram que esse tipo de processamento aumenta a conversão do monômero em polímero⁷¹ e, conseqüentemente, pode diminuir sua citotoxicidade. Silicones são amplamente usados na área médica e odontológica e, por isso, sua biocompatibilidade também deveria ser investigada. Os resultados do presente estudo mostraram que as amostras de silicone, sem revestimento, diminuíram a viabilidade celular nos diferentes testes, estando de acordo com estudo prévio³³. Porém, estes resultados estão em desacordo com os encontrados por Ciapetti et al.¹⁰, os quais verificaram que os silicones de adição testados não foram tóxicos às células L929. Contudo, esses

mesmos autores relataram que a citotoxicidade dos silicones pode aumentar de acordo com o tempo de exposição aos tecidos. Assim, os silicones utilizados para próteses faciais, por exemplo, deveriam ser selecionados com cautela. Neste contexto, Hensten-Pettersen e Hulterström²³ concluíram que os silicones indicados para próteses faciais foram tóxicos tanto para células humanas como para os fibroblastos de ratos.

Atualmente, muitos estudos têm sido publicados a respeito do efeitos tóxicos das nanopartículas, enquanto os dados sobre a toxicidade quando usados como revestimentos sobre biomateriais são deficientes. Quando os biomateriais foram revestidos com nanopartículas de molibdato de prata ou tungstato de prata, observou-se que, para a maioria das amostras, em todos os testes realizados, houve uma inibição celular entre 25 e 50% em relação ao grupo controle, sendo os grupos classificados como discretamente citotóxico. Levando-se em consideração os aspectos acima descritos, embora a técnica de precipitação tenha sido usada para o revestimento das amostras, a citotoxicidade encontrada foi, provavelmente, devido à liberação das nanopartículas que revestiam os biomateriais durante a confecção dos extratos. Os mesmos efeitos descritos em relação às nanopartículas em solução podem ter ocasionado a citotoxicidade das amostras revestidas após a liberação das partículas. Apesar de algumas propriedades benéficas, como o efeito antimicrobiano, as nanopartículas podem ser liberadas no meio como partículas individuais ou em aglomerados e podem, potencialmente, exercer efeitos nocivos na saúde humana e esses estes efeitos tendem a aumentar de acordo com o tempo^{44, 59}. Estudos para avaliar o efeito citotóxico dos biomateriais revestidos com as nanopartículas em função do tempo de armazenamento deveriam ser conduzidos para a possível elaboração de um protocolo que diminuísse a sua citotoxicidade. Além disso, estudos que determinam a concentração e o tipo de partículas liberadas também deveriam ser realizados.

Uma das limitações do presente estudo é o fato da análise da biocompatibilidade dos materiais ter sido feita por meio da utilização de extratos. Essa metodologia, também chamada de método indireto, é comumente usada em testes de citotoxicidade. Os extratos contém as substâncias liberadas pelos biomateriais as quais podem causar danos às células⁴⁰. Porém, testes *in vivo* com o contato direto das substâncias avaliadas com o tecido poderiam trazer resultados mais relevantes a

respeito da biocompatibilidade desses biomateriais. Por outro lado, os resultados do presente estudo apresentam informações valiosas a respeito da citotoxicidade dos biomateriais revestidos com nanopartículas e trazem a vantagem de reduzir a experimentação com animais¹⁰. Outra vantagem é que, com o método de confecção de extratos, o provável efeito citotóxico em tecidos distantes dos materiais pode ser investigada, como ocorre, por exemplo, no meio bucal.

Apesar das limitações do presente estudo, os resultados aqui descritos nos alerta para o uso das nanopartículas, as quais podem causar riscos para a saúde humana em função do seu tamanho reduzido⁴¹, o que permite atravessar as barreiras celulares naturais, contribuindo para seu efeito citotóxico. Assim, futuros estudos são indicados para compreender os complexos mecanismos de toxicidade das nanopartículas para as células. Além disso, a internalização e a localização intracelular das nanopartículas de tungstato de prata e molibdato de prata deveria ser avaliada por meio de microscopia eletrônica de transmissão em estudos futuros.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que:

1. As nanopartículas de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e $\alpha\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ em solução, em diferentes concentrações, foram intensamente citotóxicas quando analisadas no teste Alamar Blue;
2. Não houve diferença entre a citotoxicidade das nanopartículas como revestimento para a maioria dos biomateriais;
3. O silicone foi mais tóxico do que os outros biomateriais quando não revestidos;
4. O teste CytoTox-One, o qual avalia a morte celular, foi mais sensível do que os testes Alamar Blue e

REFERÊNCIAS⁴

1. Ahlberg S, Meinke MC, Werner L, Epple M, Diendorf J, Blume-Peytavi U, et al. Comparison of silver nanoparticles stored under air or argon with respect to the induction of intracellular free radicals and toxic effects toward keratinocytes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014; 88(3): 651-7.
2. Appendini P, Hotchkiss JH. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Sci Technol.* 2002; 3(2): 113–26.
3. Areva S, Paldan H, Peltola T, Närhi T, Jokinen M, Lindén M. Use of sol-gel-derived titania coating for direct soft tissue attachment. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 70(2): 169-78.
4. Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF, Fiévet F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett.* 2006; 6(4): 866-70.
5. Brody AL. Nano food packaging technology. *Food Technol.* 2003; 57(12): 52–4.
6. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, et al. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007; 104: 2050–5.
7. Chi GJ, Yao SW, Fan J, Zhang G, Wang HZ. Antibacterial activity of anodized aluminum with deposited silver. *Surf and Coat Technol.* 2002; 157(2-3): 162–5.
8. Choy MT, Tang CY, Chen L, Wong CT, Tsui CP. In vitro and in vivo performance of bioactive Ti6Al4V/TiC/HA implants fabricated by a rapid microwave sintering technique. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014; 42: 746-56.
9. Chuang HY, Chen DH. Fabrication and photocatalytic activities in visible and UV light regions of Ag@TiO₂ and NiAg@TiO₂ nanoparticles. *Nanotechnology.* 2009; 20(10): 10570-4.
10. Ciapetti G, Granchi D, Stea S, Savarino L, Verri E, Gori A, Savioli F, Montanaro L. Cytotoxicity testing of materials with limited in vivo exposure is affected by the duration of cell-material contact. *J Biomed Mater Res.* 1998; 42(4): 485-90.

⁴ De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

11. Dal Lago V, de Oliveira LF, Goncalves KD, Kobarg, J, Cardoso MB. Size-selective silver nanoparticles: future of biomedical devices with enhanced bactericidal properties. *J Mater Chem*. 2011; 21(1): 12267-73.
12. De Santana YVB, Gomes JEC, Matos L, Cruvinel GH, Perrin A, Andrès J, et al. Silver molybdate and silver tungstate nanocomposites with enhanced photoluminescence. *Nanomater Nanotechnol*. 2014; 4(22):1-10.
13. Depprich R, Ommerborn M, Zipprich H, Naujoks C, Handschel J, Wiesmann HP, et al. Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. *Head Face Med*. 2008; 4: 29-33.
14. Ditto AJ, Shah PN, Lopina ST, Yun YH. Nanospheres formulated from L-tyrosine polyphosphate as a potential intracellular delivery device. *Int J Pharm*. 2009; 368(1-2): 199-206.
15. Donaldson K, Borm Pja. The quartz hazard: a variable entity. *Ann Occup Hyg* 1998; 42(5): 287-94.
16. Dunnick KM, Badding MA, Schwegler-Berry D, Patete JM, Koenigsmann C, Wong SS, et al. The effect of tungstate nanoparticles on reactive oxygen species and cytotoxicity in raw 264.7 mouse monocyte macrophage cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2014; 77(20): 1251-68.
17. Edetsberger M, Gaubitzer E, Valic E, Waigmann E, Kohler G. Detection of nanometer-sized particles in living cells using modern fluorescence fluctuation methods. *Biochem Biophys Res Comm*. 2005; 332(1): 109–16.
18. Fujishima A, Rao TN, Tryk DA. Titanium dioxide photocatalysis, *J Photochem Photobiol C: Photochem Rev*. 2000; 1(1): 1-21.
19. Fujishima A. *TiO₂ Photocatalysis: fundamentals and applications*. Tokyo: BKC; 1999.
20. Hagfeldt A, Grätzel M. Light-induced redox reactions in nanocrystalline systems. *Chem Rev*. 1995; 95: 49–68.
21. Han JW, Gurunathan S, Jeong JK, Choi YJ, Kwon DN, Park JK, et al. Oxidative stress mediated cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in human lung epithelial adenocarcinoma cell line. *Nanoscale Res Lett*. 2014; 9(1): 459-64.
22. Han W, Wang YD, Zheng, YF. In vitro biocompatibility study of nano TiO₂ materials. *Adv Mater Res*. 2008; 47-50(2):1438-41.

23. Hensten-Pettersen A, Hulterström A. Assessment of in vitro cytotoxicity of four RTV-silicone elastomers used for maxillo-facial prostheses. *Acta Odontol Scand.* 1980; 38(3): 163-7.
24. Hu C, Tang YC, Wang YZ, Wong PK. Characterization and photocatalytic activity of noble-metal-supported surface bond-conjugation TiO₂/SiO₂ for the destruction of azo dye. *Applied Catalysis B: Environmental.* 2003; 40(1): 131-40.
25. International Standard. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices – part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISO; 2009.
26. International Standard. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices – part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISO; 2007.
27. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Pavarina AC, Machado AL, Carlos IZ. Effect of microwave postpolymerization treatment and of storage time in water on the cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins. *Quintessence Int.* 2009; 40(10): 93-100.
28. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology.* 2007; 24(1): 52-7.
29. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(3): 203-7.
30. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont.* 2004;17(3): 340-4..
31. Kado D, Sakurai K, Sugiyama T, Ueda T. Evaluation of cleanability of a titanium dioxide (TiO₂)-coated acrylic resin denture base. *Prosthodont Res Prac.* 2005; 4(1): 69-76.
32. Kedjarune U, Charoenworluk N, Koontongkaew S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aust Dent J.* 1999; 44(1): 25-30.
33. Kowalczyk D, Przekora A, Ginalska G. Biological safety evaluation of the modified urinary catheter. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015; 49: 274-80.

34. Li XZ, Li FB. Study of Au/Au(3+)-TiO₂ photocatalysts toward visible photooxidation for water and wastewater treatment. *Environ Sci Technol*. 2001; 35(11): 2381-7.
35. Longo VM, De Foggi CC, Ferrer MM, Gouveia AF, André RS, Avansi W, et al. Potentiated electron transference in α -Ag₂WO₄ microcrystals with Ag nanofilaments as microbial agent. *J Phys Chem A*. 2014; 118(31): 5769-78.
36. Longo E, Volanti DP, Longo VM, Gracia L, Nogueira IC, Almeida MAP, et al. Toward an understanding of the growth of Ag filaments on α -Ag₂WO₄ and their photoluminescent properties: a combined experimental and theoretical study. *J Phys Chem*. 2013; 118 (2): 1229-39.
37. Lu Z, Xiao J, Wang Y, Meng M. In situ synthesis of silver nanoparticles uniformly distributed on polydopamine-coated silk fibers for antibacterial application. *J Colloid Interface Sci*. 2015; 452(1): 8–14.
38. Ma Z, Ji H, Tan D, Teng Y, Dong G, Zhou J, et al. Silver nanoparticles decorated, flexible SiO₂ nanofibers with long-term antibacterial effect as reusable wound cover. *Colloids Surf*. 2011; 387(1-3): 57–64.
39. Martins APVB, Barbosa CMR. Associação de técnicas para reconstrução de deformidade nasal. *Rev Odontol Bras Central*. 2014; 23(1): 64-9.
40. Mast F, Hoschitzky JAR, Van Blitterswijk CA, Huysmans HA. In vitro biocompatibility of EPM and EPDM rubbers. *J Mater Sci Mater Med*. 1997; 8: 5–9.
41. Miethling-Graff R, Rumpkera R, Richtera M, Verano-Bragab T, Kjeldsenb F, Brewerc J, et al. Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol in Vitro*. 2014; 28(7): 1280-9.
42. Miller JK, Neubig R, Clemons CB, Kreider KL, Wilber JP, Young GW, et al. Nanoparticle deposition onto biofilms. *Ann Biomed Eng*. 2013; 41(1): 53-67.
43. Misra SK, Philip SE, Chrzanowski W, Nazhat SN, Roy I, Knowles JC, et al. Incorporation of vitamin E in poly(3hydroxybutyrate)/Bioglass composite films: effect on surface properties and cell attachment. *J R Soc Interface*. 2009; 6(33): 401-9.
44. Mohiti-Asli M, Pourdeyhimi B, Lobo EG. Novel, silver-ion-releasing nanofibrous scaffolds exhibit excellent antibacterial efficacy without the use of silver nanoparticles. *Acta Biomater*. 2014;10(5): 2096-104.

45. Möller B, Terheyden H, Açil Y, Purcz NM, Hertrampf K, Tabakov A, et al. A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an in vivo and in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 41(5): 638-45.
46. Moritz N, Areva S, Wolke J, Peltola T. TF-XRD examination of surface-reactive TiO₂ coatings produced by heat treatment and CO₂ laser treatment. *Biomaterials*. 2005; 26(21): 4460-7.
47. Moritz N, Jokinen M, Peltola T, Areva S, Yli-Urpo A. Local induction of calcium phosphate formation on TiO₂ coatings on titanium via surface treatment with a CO₂ laser. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 65(1): 9-16.
48. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000; 267(17):5421-6.
49. Ohko Y, Iuchi K, Niwa C, Tatsuma T, Nakashima T, Iguchi T, et al. 17 beta-estradiol degradation by TiO₂ photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity. *Environ Sci Technol*. 2002; 36(19): 4175-81.
50. Ohko Y, Utsumi Y, Niwa C, Tatsuma T, Kobayakawa K, Satoh Y, et al. Self-sterilizing and selfcleaning of silicone catheters coated with TiO₂ photocatalyst thin films: a preclinical work. *J Biomed Mater Res: Appl Biomater*. 2001; 58(1): 97–101.
51. Panacek A, Kvítek L, Pruček R, Kolar M, Vecerova R, Pizúrova N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B*. 2006; 110(33): 16248-53.
52. Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013; 65(13-14): 1803-15.
53. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials* 1999; 20: 1–25.
54. Qian Ping WXXG, Wei HW, Shu XL. Preparation of fine Ag₂WO₄ antibacterial powders and its application in the sanitary ceramics. *Adv Mater Res*. 2011; 284(1): 1321-5.
55. Qin H, Cao H, Zhao Y, Zhu C, Cheng T, Wang Q, et al. In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. *Biomaterials*. 2014; 35(33): 9114-25.

56. Retamoso LB, da Cunha Tde M, Pithon MM, dos Santos RL, Martins FO, Romanos MT, et al. In vitro cytotoxicity of self-curing acrylic resins of different colors. *Dental Press J Orthod*. 2014; 19(4): 66-70.
57. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont* 1997; 10: 73-7.
58. Shi X, Castranova V, Halliwell B, Vallyathan V. Reactive oxygen species and silica-induced carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 1998; 1(3): 181-97.
59. Smulders S, Luyts K, Brabants G, Golanski L, Martens J, Vanoirbeek J, Hoet PH. Toxicity of nanoparticles embedded in paints compared to pristine nanoparticles, in vitro study. *Toxicol Lett*. 2015; 232(2): 333-9.
60. Sun SQ, Sun B, Zhang WQ, Wang D. Preparation and antibacterial activity of Ag-TiO₂ composite film by liquid phase deposition (LPD) method. *Bull Mater Sci*. 2008; 31(1): 61-6.
61. Sung-Suh HM, Choi JR, Hah HJ, Koo MS, Bae YC. Comparison of Ag deposition effects on the photocatalytic activity of nanoparticulate TiO₂ under visible and UV light irradiation. *J Photochem Photobiol A: Chem*. 2004; 163(1-2): 37-44.
62. Tang H, Doerksen RJ, Tew GN. Synthesis of urea oligomers and their antibacterial activity. *Chem Commun (Camb)*. 2005; (12): 1537-9.
63. Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res*. 1999; 45(3): 214-22.
64. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*. 1991; 51(10): 2515-20.
65. Wady AF, Machado AL, De Foggi CC, Zamperini CA, Zucolotto V, Moffa EB, et al. Effect of a Silver Nanoparticles Solution on *Staphylococcus aureus* and *Candida* spp. *J Nanomater*. 2014; 2014(1): 1-7.
66. Walkey CD, Olsen JB, Song F, Liu R, Guo H, Olsen DWH, et al. Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano*. 2014; 8: 2439-55.
67. Wiegand C, Hipler UC. Methods for the measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration processes. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*. 2008; 3(1): Doc12.

68. Xin B, Jing L, Ren Z, Wang B, Fu H. Effects of simultaneously doped and deposited Ag on the photocatalytic activity and surface states of TiO₂. *J Phys Chem B*. 2005; 109(7): 2805-9.
69. Yao Y, Ohko Y, Sekiguchi Y, Fujishima A, Kubota Y. Self-sterilization using silicone catheters coated with Ag and TiO₂ nanocomposite thin film. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008; 85(2): 453-60.
70. Yerby SA, Paal AF, Young PM, Beaupré GS, Ohashi KL, Goodman SB. The effect of a silane coupling agent on the bond strength of bone cement and cobalt-chrome alloy. *J Biomed Mater Res*. 2000; 49(1): 127-33.
71. Yunus N, Harrison A, Huggett R. Effect of microwave irradiation on the flexural strength and residual monomer levels of an acrylic resin repair material. *J Oral Rehabil*. 1994; 21(6): 641-8.
72. Zamperini CA, André RS, Longo VM, Mima EG, Vergani CE, Machado AL, et al. Antifungal applications of Ag-decorated hydroxyapatite nanoparticles. *J Nanomater*. 2013; 2013(1): 2-9.
73. Zhao X, Liua X, Dinga C, ChubPK. In vitro bioactivity of plasma-sprayed TiO₂ coating after sodium hydroxide treatment. *Surf Coat Technol*. 2006; 200(18-19): 5487–92.
74. Zielińska A, Kowalska E, Sobczak JW, Łacka I, Gazda M, Ohtani B, et al. Silver-doped TiO₂ prepared by microemulsion method: Surface properties, bio- and photoactivity. *Sep Purif Technol*. 2010; 72(3): 309–18.

5- CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que:

1. A interação celular em co-cultura não influenciou o metabolismo dos queratinócitos e *Candida albicans*;

2. A PDT inibiu o crescimento dos queratinócitos e *Candida albicans* nos diferentes testes realizados, tendo sido considerada um terapia de moderada a discretamente citotóxica;

3. Não houve diferença na citotoxicidade das nanopartículas como revestimento para a maioria dos biomateriais;

4. Diferentes parâmetros para a análise da citotoxicidade deveriam ser utilizados uma vez que as substâncias citotóxicas podem agir de diferentes maneiras sobre o metabolismo celular.

REFERÊNCIAS⁵

- 1- Appendini P, Hotchkiss JH. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Sci Technol*. 2002; 3(2): 113–26.
- 2- Areva S, Paldan H, Peltola T, Närhi T, Jokinen M, Lindén M. Use of sol-gel-derived titania coating for direct soft tissue attachment. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 70(2): 169-78.
- 3- Böcking T, Barrow KD, Netting AG, Chilcott TC, Coster HG, Höfer M. Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 2000; 267(6): 1607-18.
- 4- Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF, Fiévet F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett*. 2006; 6(4): 866-70.
- 5- Brody AL. Nano food packaging technology. *Food Technol*. 2003; 57(12): 52–4.
- 6- Chuang HY, Chen DH. Fabrication and photocatalytic activities in visible and UV light regions of Ag@TiO₂ and NiAg@TiO₂ nanoparticles. *Nanotechnology*. 2009; 20(10): 1050-4.
- 7- Colussi VC, Nicola EM, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Rev Assoc Med Bras*. 1996; 42(4): 229-36.
- 8- Costa ETR. Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável [dissertação]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1999.
- 9- Costerton JW, Marrie TJ, Cheng K. Phenomena of bacterial adhesion. In: Savage, D.C., Fletcher, M, ed. *Bacterial adhesion*. London: Plenum Press; 1985. p. 3-43.
- 10- Fujishima A, Rao TN, Tryk DA. Titanium dioxide photocatalysis, *J Photochem Photobiol C: Photochem Rev*. 2000; 1(1): 1-21
- 11- Fujishima A. *TiO₂ Photocatalysis: fundamentals and applications*. Tokyo: BKC; 1999.

⁵De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

- 12- Hu C, Tang YC, Wang YZ, Wong PK. Characterization and photocatalytic activity of noble-metal-supported surface bond-conjugation TiO₂/SiO₂ for the destruction of azo dye. *Appl Catal B*. 2003; 40(1): 131-40.
- 13- Lambrechts SA, Aalders MC, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(5): 2026-34.
- 14- Longo VM, De Foggi CC, Ferrer MM, Gouveia AF, André RS, Avansi W, et al. Potentiated electron transference in α -Ag₂WO₄ microcrystals with Ag nanofilaments as microbial agent. *J Phys Chem A*. 2014; 118(31): 5769-78.
- 15- Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova*. 2000; 23(2): 237-43.
- 16- Moritz N, Areva S, Wolke J, Peltola T. TF-XRD examination of surface-reactive TiO₂ coatings produced by heat treatment and CO₂ laser treatment. *Biomaterials*. 2005; 26(21): 4460-7.
- 17- Moritz N, Jokinen M, Peltola T, Areva S, Yli-Urpo A. Local induction of calcium phosphate formation on TiO₂ coatings on titanium via surface treatment with a CO₂ laser. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 65(1): 9-16.
- 18- Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013; 65(13-14): 1803-15.
- 19- Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*. 1999; 283(5409): 1837-9.
- 20- Sun SQ, Sun B, Zhang WQ, Wang D. Preparation and antibacterial activity of Ag-TiO₂ composite film by liquid phase deposition (LPD) method. *Bull Mater Sci* 2008; 31(1): 61-6.
- 21- Tang H, Doerksen RJ, Tew GN. Synthesis of urea oligomers and their antibacterial activity. *Chem Commun (Camb)*. 2005; (12): 1537-9.
- 22- Yerby SA, Paal AF, Young PM, Beaupré GS, Ohashi KL, Goodman SB. The effect of a silane coupling agent on the bond strength of bone cement and cobalt-chrome alloy. *J Biomed Mater Res*. 2000; 49(1): 127-33.
- 23- Zottola EA. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry? *Food Technol*. 1994; 48(7): 107-14.

Tukey HSD test														
	Célula	Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	Média	
1	Querat	P+L+		0,904	0,174	0,000	0,000	0,056	0,001	0,000	0,000	0,000	1136	a
2	Querat	P+L-	0,904		0,893	0,000	0,000	0,003	0,009	0,000	0,000	0,000	1194	a
3	Querat	P-L+	0,174	0,893		0,000	0,000	0,000	0,162	0,005	0,000	0,000	1209	a
4	Querat	P-L-	0,000	0,000	0,000		0,038	0,000	0,000	0,000	1,000	0,015	1478	b
5	Querat	Controle	0,000	0,000	0,000	0,038		0,000	0,000	0,000	0,078	1,000	1572	c
6	Candida	P+L+	0,056	0,003	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	1047	a
7	Candida	P+L-	0,001	0,009	0,162	0,000	0,000	0,000		0,764	0,000	0,000	1284	b
8	Candida	P-L+	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,764		0,000	0,000	1328	b
9	Candida	P-L-	0,000	0,000	0,000	1,000	0,078	0,000	0,000	0,000		0,033	1488	c
10	Candida	Controle	0,000	0,000	0,000	0,015	1,000	0,000	0,000	0,000	0,033		1583	c

Resumo

Tratamento	Querat		Candida		
P+L+	1136	a	1047	a	
P+L-	1194	a	1284	b	*
P-L+	1209	a	1328	b	*
P-L-	1478	b	1488	c	
Controle	1572	c	1583	c	

Metodologia estatística para o teste MTT

Univariate Tests of Significance for Absorbância - Método MTT						
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p	
Tratamento	0,00714	4	0,00178	118,25	0,000	*
Error	0,00015	10	0,00002			

Levene's Test for Homogeneity of Variances				
Variável	MS Effect	MS Error	F	p
Absorbância	0,000009	0,000003	2,518	0,108

Tests of Normality						
Variável	N	max D	K-S p	Lilliefors p	W	p
Resíduo	15	0,142	p > .20	p > .20	0,959	0,668

Tukey HSD test							
Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{6}	Média	
1 P+L+		0,003	0,008	0,000	0,000	0,069	a
2 P+L-	0,003		0,930	0,077	0,000	0,086	bc
3 P-L+	0,008	0,930		0,023	0,000	0,083	b
4 P-L-	0,000	0,077	0,023		0,000	0,102	c
6 Controle	0,000	0,000	0,000	0,000		0,134	d

Metodologia estatística para o teste XTT

Univariate Tests of Significance for Absorbância - Método XTT						
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p	
Tratamento	4,06051	4	1,01513	50,15	0,000	*
Error	0,18219	9	0,02024			

Levene's Test for Homogeneity of Variances				
Variável	MS Effect	MS Error	F	p
Absorbância	0,008	0,003	2,793	0,092

Tests of Normality						
Variável	N	max D	K-S p	Lilliefors p	W	p
Resíduo	14	0,101	p > .20	p > .20	0,974	0,929

Tukey HSD test							
Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{6}	Média	
1 P+L+		0,014	0,301	0,000	0,000	0,925	a
2 P+L-	0,014		0,478	0,002	0,000	1,418	b
3 P-L+	0,301	0,478		0,001	0,000	1,197	ab
4 P-L-	0,000	0,002	0,001		0,374	2,094	c
6 Controle	0,000	0,000	0,000	0,374		2,317	c

Metodologia estatística para o teste UFC

Univariate Tests of Significance for Log(UFC) - Método UFC					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Tratamento	6,57540	4	1,64380	18,05	0,000*
Error	1,36640	15	0,09110		

Levene's Test for Homogeneity of Variances

Variável	MS Effect	MS Error	F	p
Log(UFC)	0,039	0,024	1,613	0,222

Tests of Normality

Variável	N	max D	K-S p	Lilliefors p	W	p
Resíduo	20	0,198	p > .20	p < ,05	0,936	0,200

Tukey HSD test

	Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{6}	Média	
1	P+L+		0,001	0,001	0,000	0,000	5,394	a
2	P+L-	0,001		1,000	0,592	0,124	6,514	b
3	P-L+	0,001	1,000		0,533	0,104	6,493	b
4	P-L-	0,000	0,592	0,533		0,800	6,829	b
6	Controle	0,000	0,124	0,104	0,800		7,066	b

ANEXO 2

Metodologia estatística para o teste Alamar Blue (nanopartículas em solução)

Univariate Tests of Significance for Fluorescência - Método Alamar

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Nanopartícula	59,63	1	59,63	0,34	0,570
Concentração	0,00	1	0,00	0,00	1,000
Interação	30,88	1	30,88	0,18	0,681
Error	1728,42	10	172,84		

Levene's Test for Homogeneity of Variances

	MS Effect	MS Error	F	p
Fluorescência	224,921	21,646	10,391	0,001

Tests of Normality

Variável	N	max D	K-S p	Lilliefors p	W	p
Resíduo	15	0,284	p < ,15	p < ,01	0,804	0,004

Tukey HSD test

Nanopartícula		{1}	{2}	{3}	Média	
1 Tungstato			0,830	0,000	42,7	a
2 Molibdato		0,830		0,000	38,2	a
4 Controle células	100%	0,000	0,000		1982,6	b

Concentração		{1}	{2}	{3}	Média	
1 C.25			1,000	0,000	40,5	a
2 C.125		1,000		0,000	40,4	a
5 Controle células	100%	0,000	0,000		1982,6	b

Tukey HSD test

Nanopartícula	Tratamento		{1}	{2}	{5}	{6}	{13}	Média	
1 Tungstato	C.25			0,998	1,000	0,993	0,000	41,1	a
2 Tungstato	C.125		0,998		0,993	0,949	0,000	44,3	a
5 Molibdato	C.25		1,000	0,993		0,998	0,000	39,8	a
6 Molibdato	C.125		0,993	0,949	0,998		0,000	36,6	a
13 Controle células	100% Controle células	100%	0,000	0,000	0,000	0,000		1982,6	b

Metodologia estatística para o teste Alamar Blue (Capítulo 2: nanopartículas como revestimento)

Metodologia estatística para o teste Alamar Blue (nanopartículas como revestimento)

Univariate Tests of Significance for Fluorescência - Método Alamar

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Nanopartícula	1081397,65	2	540698,82	271,35	0,000
Biomaterial	409843,41	3	136614,47	68,56	0,000
Interação	153152,85	6	25525,48	12,81	0,000
Error	51809,08	26	1992,66		

Levene's Test for Homogeneity of Variances

	MS Effect	MS Error	F	p
Fluorescência	536,901	397,932	1,349	0,252

Tests of Normality

Variável	N	max D	K-S p	Lilliefors p	W	p
Resíduo	39	0,112	p > .20	p > .20	0,970	0,363

Tukey HSD test

Nanopartícula		{1}	{2}	{3}	{4}	Média	
1	Tungstato		0,993	0,000	0,000	1531,9	a
2	Molibdato	0,993		0,000	0,000	1536,9	a
3	Sem revestimento	0,000	0,000		0,000	1902,0	b
4	Controle 100% células	0,000	0,000	0,000		2146,9	b

Biomaterial		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	Média	
1	Ti		0,000	0,086	0,000	0,000	1771,4	c
2	Zi	0,000		0,056	0,000	0,000	1654,6	b
3	RA	0,086	0,056		0,000	0,000	1715,2	bc
4	Si	0,000	0,000	0,000		0,000	1486,6	a
5	Controle 100% células	0,000	0,000	0,000	0,000		2146,9	d

Tukey HSD test																Média
Nanopartícula	Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}		
1	Tungstato	Ti	0,503	1,000	0,000	0,472	0,003	0,845	0,005	0,000	0,000	0,000	0,865	0,000	1661	b
2	Tungstato	Zi	0,503	0,730	0,000	1,000	0,454	1,000	0,545	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	1575	b
3	Tungstato	RA	1,000	0,730	0,000	0,700	0,008	0,963	0,011	0,000	0,000	0,000	0,666	0,000	1648	b
4	Tungstato	Si	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1244	a
5	Molibdato	Ti	0,472	1,000	0,700	0,000	0,485	1,000	0,577	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000	1573	a
6	Molibdato	Zi	0,003	0,454	0,008	0,000	0,485	0,179	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1486	a
7	Molibdato	RA	0,845	1,000	0,963	0,000	1,000	0,179	0,233	0,000	0,000	0,000	0,066	0,000	1596	a
8	Molibdato	Si	0,005	0,545	0,011	0,000	0,577	1,000	0,233	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1492	a
9	Sem revestimento	Ti	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,818	2080	c
10	Sem revestimento	Zi	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	1,000	0,003	0,000	1902	b
11	Sem revestimento	RA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	1,000	0,000	0,003	0,000	1902	b
12	Sem revestimento	Si	0,865	0,018	0,666	0,000	0,016	0,000	0,066	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	1724	a
13	Controle células	100% Controle células	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,818	0,000	0,000	0,000	2147	c

			1	2	3	Média	
Ti	1	Tungstato		0,472	0,000	1661	A
	2	Molibdato	0,472		0,000	1573	A
	3	Sem revestimento	0,000	0,000		2080	B
Zi	1	Tungstato		0,454	0,000	1575	A
	2	Molibdato	0,454		0,000	1486	A
	3	Sem revestimento	0,000	0,000		1902	B

			1	2	3	Média	
RA	1	Tungstato		0,963	0,000	1648	A
	2	Molibdato	0,963		0,000	1596	A
	3	Sem revestimento	0,000	0,000		1902	B
Si	1	Tungstato		0,000	0,000	1244	A
	2	Molibdato	0,000		0,000	1492	B
	3	Sem revestimento	0,000	0,000		1724	C

Metodologia estatística para o teste MTT (nanopartículas como revestimento)

Univariate Tests of Significance for Absorbância - Método MTT

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Nanopartícula	0,01	2	0,00	109,42	0,000
Biomaterial	0,00	3	0,00	23,93	0,000
Interação	0,00	6	0,00	6,12	0,000
Error	0,00	26	0,00		

Levene's Test for Homogeneity of Variances

	MS Effect	MS Error	F	p
Absorbância	0,000	0,000	1,832	0,095

Tests of Normality

Variável	N	max D	K-S p	Lilliefors p	W	p
Resíduo	39	0,097	p > .20	p > .20	0,958	0,153

Tukey HSD test

Nanopartícula	{1}	{2}	{3}	{4}	Média	
1 Tungstato		1,000	0,000	0,000	0,155	a
2 Molibdato	1,000		0,000	0,000	0,155	a
3 Sem revestimento	0,000	0,000		0,000	0,186	b
4 Controle 100% células	0,000	0,000	0,000		0,227	c

Biomaterial	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	Média	
1 Ti		0,000	0,203	0,000	0,000	0,177	b
2 Zi	0,000		0,002	0,950	0,000	0,159	a
3 RA	0,203	0,002		0,000	0,000	0,171	b
4 Si	0,000	0,950	0,000		0,000	0,157	a
5 Controle 100% células	0,000	0,000	0,000	0,000		0,227	c

Tukey HSD test

	Nanopartícula	Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	Média	
1	Tungstato	Ti		0,005	1,000	0,009	0,988	0,000	0,985	0,051	0,002	0,001	0,016	0,909	0,000	0,167	b
2	Tungstato	Zi	0,005		0,018	1,000	0,000	0,990	0,082	0,997	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,144	a
3	Tungstato	RA	1,000	0,018		0,037	0,831	0,001	1,000	0,169	0,001	0,000	0,004	0,600	0,000	0,164	b
4	Tungstato	Si	0,009	1,000	0,037		0,001	0,947	0,150	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,146	a
5	Molibdato	Ti	0,988	0,000	0,831	0,001		0,000	0,429	0,003	0,042	0,015	0,211	1,000	0,000	0,173	c
6	Molibdato	Zi	0,000	0,990	0,001	0,947	0,000		0,005	0,589	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,139	a
7	Molibdato	RA	0,985	0,082	1,000	0,150	0,429	0,005		0,491	0,000	0,000	0,001	0,231	0,000	0,161	bc
8	Molibdato	Si	0,051	0,997	0,169	1,000	0,003	0,589	0,491		0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,149	ab
9	Sem revestimento	Ti	0,002	0,000	0,001	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000		1,000	1,000	0,098	0,000	0,191	ab
10	Sem revestimento	Zi	0,001	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000	0,000	1,000		0,986	0,037	0,000	0,193	b
11	Sem revestimento	RA	0,016	0,000	0,004	0,000	0,211	0,000	0,001	0,000	1,000	0,986		0,399	0,000	0,187	ab
12	Sem revestimento	Si	0,909	0,000	0,600	0,000	1,000	0,000	0,231	0,001	0,098	0,037	0,399		0,000	0,175	a
13	Controle células	100% Controle células	100%	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,227	d

			1	2	3	Média	
Ti	1	Tungstato		0,988	0,002	0,167	A
	2	Molibdato	0,988		0,042	0,173	A
	3	Sem revestimento	0,002	0,042		0,191	B
Zi	1	Tungstato		0,990	0,000	0,144	A
	2	Molibdato	0,990		0,000	0,139	A
	3	Sem revestimento	0,000	0,000		0,193	B

			1	2	3	Média	
RA	1	Tungstato		1,000	0,004	0,164	A
	2	Molibdato	1,000		0,001	0,161	A
	3	Sem revestimento	0,004	0,001		0,187	B
Si	1	Tungstato		1,000	0,000	0,146	A
	2	Molibdato	1,000		0,001	0,149	A
	3	Sem revestimento	0,000	0,001		0,175	B

Metodologia estatística para o teste CytoTox-One (nanopartículas como revestimento)

Univariate Tests of Significance for Fluorescência - Método CytoTox

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Nanopartícula	2162,25	2	1081,13	215,12	0,000
Biomaterial	734,96	3	244,99	48,75	0,000
Interação	62,18	6	10,36	2,06	0,093
Error	130,67	26	5,03		

Levene's Test for Homogeneity of Variances

	MS Effect	MS Error	F	p
Fluorescência	1,556	1,009	1,542	0,172

Tests of Normality

Variável	N	max D	K-S p	Lilliefors p	W	p
Resíduo	39	0,107	p > .20	p > .20	0,977	0,600

Tukey HSD test

Nanopartícula	{1}	{2}	{3}	{4}	Média	
1 Tungstato		0,001	0,000	0,000	153,4	b
2 Molibdato	0,001		0,000	0,000	149,1	a
3 Sem revestimento	0,000	0,000		0,000	167,3	c
4 Controle 100% células	0,000	0,000	0,000		182,8	d

Biomaterial	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	Média	
1 Ti		0,000	0,069	0,000	0,000	162,1	c
2 Zi	0,000		0,009	0,000	0,000	155,3	b
3 RA	0,069	0,009		0,000	0,000	159,1	c
4 Si	0,000	0,000	0,000		0,000	150,0	a
5 Controle 100% células	0,000	0,000	0,000	0,000		182,8	d

Tukey HSD test

Nanopartícula		Tratamento		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	Médi a	
1	Tungstato	Ti			0,948	1,000	0,000	0,939	0,000	0,077	0,000	0,000	0,04 3	0,000	0,733	0,000	157,7	b
2	Tungstato	Zi		0,948		1,000	0,001	1,000	0,005	0,751	0,000	0,000	0,00 1	0,000	0,072	0,000	155,0	b
3	Tungstato	RA		1,000	1,000		0,000	1,000	0,001	0,325	0,000	0,000	0,00 7	0,000	0,281	0,000	156,3	b
4	Tungstato	Si		0,000	0,001	0,000		0,001	1,000	0,061	1,000	0,000	0,00 0	0,000	0,000	0,000	144,9	a
5	Molibdato	Ti		0,939	1,000	1,000	0,001		0,005	0,772	0,000	0,000	0,00 1	0,000	0,067	0,000	154,9	c
6	Molibdato	Zi		0,000	0,005	0,001	1,000	0,005		0,305	0,960	0,000	0,00 0	0,000	0,000	0,000	146,4	a b
7	Molibdato	RA		0,077	0,751	0,325	0,061	0,772	0,305		0,016	0,000	0,00 0	0,000	0,001	0,000	151,4	bc
8	Molibdato	Si		0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,960	0,016		0,000	0,00 0	0,000	0,000	0,000	143,8	a
9	Sem revestimento	Ti		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00 2	0,647	0,000	0,002	173,7	c
10	Sem revestimento	Zi		0,043	0,001	0,007	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,002		0,212	0,871	0,000	164,4	b
11	Sem revestimento	RA		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,647	0,21 2		0,005	0,000	169,8	b
12	Sem revestimento	Si		0,733	0,072	0,281	0,000	0,067	0,000	0,001	0,000	0,000	0,87 1	0,005		0,000	161,3	a
13	Controle células	100% Controle células	100%	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,00 0	0,000	0,000		182,8	d

		1	2	3	Média	
Ti	1	Tungstato	0,939	0,000	157,7	A
	2	Molibdato	0,939	0,000	154,9	A
	3	Sem revestimento	0,000	0,000	173,7	B
Zi	1	Tungstato	0,005	0,001	155,0	B
	2	Molibdato	0,005	0,000	146,4	A
	3	Sem revestimento	0,001	0,000	164,4	C

		1	2	3	Média	
RA	1	Tungstato	0,325	0,000	156,3	A
	2	Molibdato	0,325	0,000	151,4	A
	3	Sem revestimento	0,000	0,000	169,8	B
Si	1	Tungstato	1,000	0,000	144,9	A
	2	Molibdato	1,000	0,000	143,8	A
	3	Sem revestimento	0,000	0,000	161,3	B

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 11/09/2017.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 11 de setembro de 2015.

CLÁUDIA VIVIANE GUIMARÃES PELLISSARI